

Maurício Batista Paes Landim

A hipercolesterolemia abole o efeito cardioprotetor do pré e pós-condicionamento isquêmico em um modelo experimental de isquemia e reperfusão em ratos

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

Área de concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Palandri Chagas

São Paulo

2009

Maurício Batista Paes Landim

A hipercolesterolemia abole o efeito cardioprotetor do pré e pós-condicionamento isquêmico em um modelo experimental de isquemia e reperfusão em ratos

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

Área de concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Palandri Chagas

São Paulo

2009

Dedicatória

Dedico esta tese à memória de José Emiliano Paes Landim Filho, meu pai, magistrado, professor universitário, homem probo e exemplo a todas as gerações que tiveram a oportunidade de com ele conviver.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, força maior que nos rege, a QUEM volto os meus pensamentos nos momentos difíceis e a QUEM agradeço sempre o dom da vida.

À minha mãe, Maria do Amparo, que compartilhou comigo as angústias das inúmeras indas e vindas a São Paulo, mas sempre com um olhar de apoio e estímulo.

A toda a minha família, irmãos, sobrinhos, primos, tios, etc., que sempre admiraram a minha persistência para alcançar um objetivo que muitas vezes parecia distante.

À memória de meu tio José Wilson, um médico no sentido mais completo da palavra e, acima de tudo, um educador. Gostaria muito de entregar-lhe pessoalmente esta tese e agradecer-lhe pelo exemplo de profissional que foi.

À tia Julieta, que sempre me recebeu de forma acolhedora em sua casa, minha eterna gratidão pela importante contribuição para a realização deste sonho.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Palandri Chagas, por ter me recebido e acreditado nos meus propósitos e intenções, meu eterno agradecimento.

Ao Prof. Dr. Protásio Lemos da Luz, por gentilmente ter me recebido e permitido que eu desenvolvesse esta pesquisa, usando a estrutura que ele construiu ao longo de uma grande jornada de trabalho.

Ao Dr. Casella Filho, quem primeiro “me sondou” e desafiou, a quem devo parte deste sucesso.

Ao Dr. Paulo Magno, um amigo, cujo caminho cruzou o meu em um momento em que uma palavra de estímulo se tornava fundamental para prosseguir nos desafios.

A todos os funcionários, amigos e colegas do INCOR que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha vitória, em especial, ao Roberto e ao Leandro, que se desdobraram em me mostrar o melhor caminho a seguir. Aos dois, meu eterno agradecimento.

Ao meu amigo e sócio, Prof. Dr. Luiz Ayrton Santos Júnior, com quem dividi horas a fio no debate acadêmico e viu este trabalho ser gestado, nascer e começar a distribuir seus frutos. Um profissional e mestre que muito orgulha a medicina piauiense.

Aos meus alunos queridos, pois sem eles como um fim último, certamente não valeria a pena ter escolhido este caminho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo valioso apoio financeiro, sem o qual esta pesquisa não se realizaria.

“Somos o que fazemos, mas somos principalmente o
que fazemos para mudar o que somos”

Eduardo Galeano

Esta tese está de acordo com com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Cardioproteção: pré e pós-condicionamento.....	02
Pré-condicionamento miocárdico.....	02
Pós-condicionamento miocárdico.....	06
1.2 Cardioproteção e hipercolesterolemia.....	09
Pré-condicionamento miocárdico na hipercolesterolemia.....	10
Pós-condicionamento miocárdico na hipercolesterolemia.....	12
Papel do óxido nítrico.....	13
Papel da dimetilarginina assimétrica (ADMA).....	16
1.3 Justificativa.....	23
1.4 Objetivos.....	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3. RESULTADOS.....	37
4. DISCUSSÃO.....	53
5. CONCLUSÃO.....	63
6. REFERÊNCIAS.....	65

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA	Dimetilarginina assimétrica
AKT	Proteínas quinases B
ATP	Adenosina trifosfato
CT	Colesterol total
COX-2	Ciclooxigenase 2
DDAH	Dimetilarginina dimetilaminohidrolase
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ELISA	Imunoensaio enzimático
ERK 1/2	Quinase regulada por sinal extracelular 1/2
GC	Guanilato ciclase
GC_s	Guanilato ciclase solúvel
GMP_c	Guanosina monofosfato cíclico
GSK-3B	Glicogênio sintase 3 beta
HDL	Lipoproteína de baixa densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HSP	Proteína de choque quente
I/R	Isquemia e reperfusão
I/RHIPER	Isquemia e reperfusão hipercolesterolêmico
JAK	Janus quinase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
L-NMMA	N ^G -monometil-L-arginina

LOX-1	Receptor 1 de LDL-ox lecitina “like”
MEK ½	Quinase regulada por sinal extracelular/proteína mitógeno ativada
mKATP	Canal de potássio mitocondrial ATP – dependente
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
mPTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
NOS_e	Sintase do óxido nítrico endotelial
NOS_i	Sintase do óxido nítrico induzível
PC	Isquemia e reperfusão com pré-condicionamento
PCHIPER	Isquemia e reperfusão com pré-condicionamento hipercolesterolêmico
PDF	Pressão diastólica final
PI3K	Fosfoinositide 3 quinase
PKC	Proteína quinase C
PKC_ε	Proteína quinase C épsilon
PKG	Proteína quinase G
POC	Isquemia e reperfusão com pós-condicionamento
POCHIPER	Isquemia e reperfusão com pós-condicionamento hipercolesterolêmico
PRMT	Proteína arginina metil transferase
PTCA	Angioplastia coronária transluminal percutânea
RISK	Quinases de salvamento da lesão de reperfusão
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDMA	Dimetilarginina simétrica
STAT	Transdutores e ativadores do sinal de transcrição
TNF	Fator de necrose tumoral

SÍMBOLOS

g	gramas
h	horas
mg%	miligramas por cento
min	minutos
mg/Kg	miligramas por quilo
mmHg	milímetros de mercúrio
mM	milimoles
p	significância
s	segundos
μmol/l	micromol por litro
μm	micrômetro
>	maior que
<	menor que
%	porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de síntese, ação e metabolismo da dimetilarginina assimétrica.....	18
Figura 2 - Fluxograma para a realização do infarto do miocárdio experimental.....	31
Figura 3 - Procedimento cirúrgico para oclusão da artéria coronária descendente anterior do rato.....	32
Figura 4 - Momento de oclusão da artéria coronária descendente anterior do rato usando catéter de polietileno.....	32
Figura 5 - Curva pressórica do ventrículo esquerdo do rato (traçado superior).....	35
Figura 6 - Delimitação da área de infarto do miocárdio experimental em um animal do grupo I/R.....	47
Figura 7 - Delimitação da área de infarto do miocárdio experimental em um animal do grupo PC.....	47
Figura 8 - Delimitação da área de infarto do miocárdio experimental em um animal do grupo POC.....	48
Figura 9 - Delimitação da área de infarto do miocárdio experimental em	

um animal do grupo I/RHIPER..... 48

Figura 10 - Delimitação da área de infarto do miocárdio experimental em

um animal do grupo PCHIPER..... 49

Figura 11 - Delimitação da área de infarto do miocárdio experimental em

um animal do grupo POCHIPER..... 49

Figura 12 - Pressão diastólica final média 5 min antes e depois do infarto

do miocárdio experimental em todos os grupos..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da dieta hiperlipídica usada nos animais.....	27
Tabela 2 - Taxa de mortalidade pós-operatória entre os grupos.....	38
Tabela 3 - Pesos dos animais antes do infarto do miocárdio experimental.....	39
Tabela 4 - Probabilidade de significância (p) entre os pesos dos animais. Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos.....	40
Tabela 5 - Colesterol total dos animais antes do infarto do miocárdio experimental.....	41
Tabela 6 - Probabilidade de significância (p) entre o colesterol total dos animais. Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos.....	42
Tabela 7 - ADMA plasmática dos animais antes do infarto do miocárdio experimental.....	43
Tabela 8 - Probabilidade de significância (p) entre a ADMA dos animais. Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos.....	44
Tabela 9 - Tamanho do infarto do miocárdio experimental dos animais oito dias após oclusão da artéria coronária descendente anterior.....	45
Tabela 10 - Probabilidade de significância (p) entre os valores do infarto do miocárdio experimental dos animais. Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos.....	46

RESUMO

Landim MBP. A hipercolesterolemia abole o efeito cardioprotetor do pré e pós-condicionamento isquêmico em um modelo experimental de isquemia e reperfusão em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

O pré e pós-condicionamento isquêmico são fenômenos cardioprotetores que limitam o dano tecidual no infarto agudo do miocárdio. Seus efeitos benéficos ocorrem através da ativação de complexas vias sinalizadoras intracelulares, que têm a inibição da formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial como efector final comum. A presença de fatores de risco, como a hipercolesterolemia, pode interferir nos resultados finais quando se lança mão de tais medidas cardioprotetoras. Entretanto, há na literatura achados contraditórios que não mostram interferência do colesterol elevado sobre a cardioproteção do pré-condicionamento isquêmico. No pós-condicionamento isquêmico, mais recentemente descrito, as primeiras evidências também mostram resultados conflitantes, que carecem de mais estudos. A baixa disponibilidade do óxido nítrico presente na hipercolesterolemia está associada a níveis elevados de dimetilarginina assimétrica, um inibidor da óxido nítrico sintetase, e pode ser o responsável por abolir os benefícios de ambas as medidas cardioprotetoras aqui estudadas. Procuramos, neste trabalho, avaliar a influência da hipercolesterolemia sobre o pré e pós-condicionamento isquêmico, e correlacionar os níveis de colesterol total e dimetilarginina assimétrica com o tamanho do infarto do miocárdio experimental em ratos anestesiados. Nós encontramos um maior tamanho do infarto nos animais hipercolesterolêmicos apesar do uso destas medidas cardioprotetoras.

Descritores: hipercolesterolemia, cardiotônicos, óxido nítrico, fatores de risco, ratos

SUMMARY

Landim MBP. Hypercholesterolemia abolishes the cardioprotective effect of ischemic pre and postconditioning in an experimental model of ischemia and reperfusion in rats [thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2009.

Ischemic pre and postconditioning are cardioprotective phenomena that limit heart tissue damage in acute myocardial infarction. Its beneficial effects occur through the activation of complex intracellular signaling pathways, which have the inhibition of the formation of the mitochondria permeability transition pore as common final effector. The presence of risk factors such as hypercholesterolemia may interfere with final results when it makes use of such cardioprotective measures. However, there are contradictory findings in the literature which show no interference of high cholesterol on cardioprotection of ischemic preconditioning. In ischemic postconditioning, more recently described, the initial evidences also shows conflicting results, which require further studies. The low availability of nitric oxide present in hypercholesterolemia is associated with high levels of asymmetric dimethylarginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, and may be responsible for removing the benefits of both cardioprotective measures studied here. The objective of our study was to assess the effect of hypercholesterolemia on ischemic pre and postconditioning and correlate the levels of total cholesterol and asymmetric dimethylarginine with the size of experimental myocardial infarction in anesthetized rats. We found a larger myocardial infarction in the hypercholesterolemic animals despite the use of these cardioprotective measures.

Keywords: hypercholesterolemia, cardioprotective, nitric oxide, risk factors, rats

1. INTRODUÇÃO

1.1 CARDIOPROTEÇÃO: PRÉ E PÓS-CONDICIONAMENTO

Estratégias para limitar o dano miocárdico no infarto agudo incluem, além da reperfusão precoce,¹ a melhora da resistência endógena das células cardíacas para a privação de sangue, que pode ser obtida ao se estimular seus mecanismos de sobrevivência que funcionam como uma adaptação molecular ao “stress” isquêmico.

Estes processos de adaptação constituem-se em fenômenos cardioprotetores que têm o ciclo isquemia/reperfusão como desencadeador. Dentre estes fenômenos podemos citar o “stunned” e a hibernação do miocárdio, que compartilham mecanismos fisiopatológicos comuns. A primeira situação é definida como uma prolongada e reversível disfunção do coração isquêmico, que persiste após a reperfusão, a despeito da normalização do fluxo sanguíneo.² O miocárdio hibernante representa uma condição em que um prolongado estado subagudo ou crônico de isquemia miocárdica resulta em um novo equilíbrio, no qual a necrose miocárdica não se instala porque o metabolismo e função estão ambos reduzidos, proporcionais a uma concomitante redução do fluxo coronário.³ Outros dois fenômenos descritos são o pré e o pós-condicionamento miocárdico.

Pré-condicionamento miocárdico

O pré-condicionamento isquêmico do miocárdio foi primeiro descrito em 1986⁴ e consistia de quatro ciclos de cinco minutos de isquemia não letal, intercalados por cinco minutos de reperfusão, logo anterior ao período de isquemia letal. Posteriormente, outros protocolos foram descritos que também tinham em comum breves períodos de

isquemia intercalados por breves períodos de reperfusão. Os efeitos benéficos deram-se na diminuição do tamanho do infarto, na geração de lactato, na taxa de queda da adenosina trifosfato (ATP) e, por último, na diminuição da arritmia e disfunção contrátil. O grande desafio passou a ser entender as vias sinalizadoras ativadas neste fenômeno e como esta ativação proporciona a tão desejada proteção.

Este fenômeno é possível no ser humano e em várias outras espécies, incluindo roedores, porcos, coelhos, carneiros e o cão, como foi descrito originalmente. Ocorre em nível mitocondrial e celular e é possível em outros órgãos, tais como o cérebro, o intestino, a pele, o músculo esquelético, a retina, os rins, a bexiga e o fígado.^{5,6} Esta proteção é perdida se o tempo entre o protocolo pré-condicionante e a isquemia letal ultrapassar uma hora, todavia uma segunda janela do pré-condicionamento, a forma tardia, ocorre aproximadamente 24 horas após, que pode se estender de 72 a 96 horas e envolve regulação gênica.⁷

As vias de transdução de sinais ativadas na cardioproteção proporcionada pelo pré-condicionamento isquêmico clássico ou precoce têm sido elucidadas, embora existam muitos questionamentos sobre o verdadeiro mecanismo subjacente a esta forma de proteção. Em síntese, o estímulo pré-condicionante gera ligantes endógenos, tais como adenosina, bradicinina e opióides, que iniciam uma complicada transdução de sinais, que compreende receptores acoplados à proteína G, receptor para o fator de crescimento epidérmico, fosfoinositide 3 quinase (PI3K), proteínas quinases B (AKT), sintase do óxido nítrico endotelial (NOS_e), óxido nítrico (NO), guanilato ciclase (GC), guanosina monofosfato cíclico (GMPc) e proteína quinase G (PKG), que mediam o sinal pré-condicionante da superfície celular para a mitocôndria,⁶ onde a PKG, via

proteína quinase C épsilon (PKC ϵ), abre os canais de potássio mitocondriais ATP-dependentes (mKATP).^{8,9} A abertura destes canais gera espécies reativas de oxigênio (ROS)¹⁰ que têm duas ações potenciais: ativar proteínas quinases no citosol, tais como Akt, quinase regulada por sinal extracelular (Erk $\frac{1}{2}$), proteínas quinases p38 mitógeno ativadas e proteína quinase C (PKC), que retransmitem o sinal cardioprotetor dentro da fase isquêmica letal,⁶ e inibir a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP).¹¹

O mPTP é um poro inespecífico da membrana interna, cuja abertura nos primeiros minutos da reperfusão miocárdica media a morte celular por desacoplar a fosforilação oxidativa e induzir edema mitocondrial.¹² A supressão da formação deste poro na mitocôndria é consequência da ligação do receptor acoplado à PKG¹³ e, segundo Hausenloy et al.,¹⁴ da ativação da Akt e Erk $\frac{1}{2}$, que compreendem a via das quinases de salvamento da lesão de reperfusão (RISK).

Vários agentes farmacológicos foram implicados nesta forma de proteção miocárdica, considerados mais seguros e exequíveis na prática clínica. Dentre outros, temos adenosina, acetilcolina, bradicinina, angiotensina II, norepinefrina, opióides, agonistas da eritropoietina, fator de ativação plaquetária, álcool e anestésicos voláteis.^{6,15-20}

No pré-condicionamento tardio, o NO que é gerado pela NOSe, agindo via formação de ROS, ativa uma ampla relação de fatores de transcrição redox-sensíveis, tais como o fator de necrose tumoral (TNF) kappa B, proteína 1 e transdutores e ativadores do sinal de transcrição (família STAT),²¹ que, por sua vez, mediam

cardioproteção por aumentar a síntese de proteínas cardioprotetoras, tais como, manganês superóxido dismutase (MnSOD),²² sintase do óxido nítrico induzível (NOSi),²³ ciclooxigenase 2 (COX-2),²⁴ aldose redutase²⁵ e proteínas de choque quente (HSP).²⁶ Outras proteínas também estão envolvidas no pré-condicionamento tardio, tais como as proteínas de membranas integrais, localizadas nas membranas internas da mitocôndria.²⁷

Algumas drogas também mimetizam o pré-condicionamento tardio, tais como a nitroglicerina, as estatinas, os inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), os bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II, os inibidores da fosfodiesterase 5 e o resveratrol.²⁸⁻³³ O exercício físico também é implicado como um fenômeno mimetizador do pré-condicionamento tardio.³⁴

A demonstração de que breves períodos precedentes de isquemia em um órgão remoto também oferece proteção miocárdica na situação de oclusão coronariana sustentada, permite a formulação do conceito de pré-condicionamento remoto, primeiro introduzido por Przyklenk et al.⁵ O potencial protetor do miocárdio, nesta forma de pré-condicionamento, é muito bem demonstrado em um recente estudo em que quatro ciclos de cinco minutos de isquemia/reperfusão no membro inferior proporciona cardioproteção em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca.³⁵

Apesar de dois estudos clínicos com angioplastia coronária transluminal percutânea (PTCA) mostrarem o potencial do pré-condicionamento em proteger o coração isquêmico,^{36,37} este potencial não tem sido amplamente aproveitado no cenário clínico. A necessidade da intervenção antes do episódio isquêmico letal é uma grande

limitação desta comprovada estratégia limitadora do dano miocárdico. Somente em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica ou transplante cardíaco,³⁸ bem como em situações de angina instável é possível pôr em prática o que as pesquisas básicas demonstram. O uso farmacológico de substâncias protetoras do miocárdio passou a ser uma opção prática, como demonstra o pré-tratamento com bradicinina e adenosina em pacientes submetidos à PTCA.^{39,40}

Pós-condicionamento miocárdico

Um estudo pioneiro mostra uma redução do tamanho do infarto do miocárdio em corações caninos, obtida a partir da aplicação de curtos períodos sucessivos de isquemia/reperfusão, no final do episódio isquêmico letal e imediato início da reperfusão,⁴¹ observação esta que permitiu a criação do conceito de pós-condicionamento isquêmico do miocárdio. Outros estudos também mostram o efeito cardioprotetor deste fenômeno em gatos, coelhos e ratos.⁴²⁻⁴⁴

Em humanos, ocorre uma melhora da velocidade do fluxo coronário e função cardíaca e uma redução da produção de radicais livres em pacientes submetendo-se à intervenção coronária percutânea de emergência e pós-condicionamento isquêmico.⁴⁵ O uso anterior à remoção do clampeamento aórtico após cirurgia de revascularização coronária também mostra benefícios.⁴⁶

As vias intrínsecas do pós-condicionamento miocárdico, a exemplo do pré-condicionamento, não são ainda muito bem entendidas. Estudos demonstram redução do “stress” oxidativo e do acúmulo de cálcio mitocondrial,⁴⁷ melhora da função

endotelial e redução da inflamação.⁴¹ Foi identificada uma via de transdução de sinais semelhante àquela usada no pré-condicionamento, compreendendo receptores acoplados a PKC,⁴⁸ a via RISK,^{49,50} os canais mKATP⁵¹ e o mPTP.⁵² A via RISK inclui vários sistemas sinalizadores, como a PI3K/Akt, glicogênio sintase-3 beta (GSK-3B), quinase regulada por sinal extracelular/proteína mitógeno ativada (MEK ½), Erk ½, e tem todos eles ativados no momento da reperfusão, em ambas as formas de proteção miocárdica.^{49,53,54} A via janus quinase (JAK)/STAT, que também compreende a via RISK, foi recentemente demonstrado também estar envolvida na cardioproteção do pré-condicionamento miocárdico.⁵⁵

O papel das ROS mitocondriais é aparentemente paradoxal no pós-condicionamento miocárdico. Inicialmente foi mostrado uma atenuação de sua geração pelo estímulo cardioprotetor no momento da isquemia/reperfusão miocárdica,⁵⁶ por outro lado, também foi mostrada a geração de ROS nesta forma de cardioproteção.⁵⁷ Uma pequena quantidade de ROS gerada durante os ciclos isquemia/reperfusão, na fase de reperfusão, inicia várias vias sinalizadoras que levam a ativação de quinases de sobrevivência que culminam por inibir o mPTP.⁵⁸ O pós-condicionamento miocárdico isquêmico, além de abrir os mKATP, ativa NOSe e, desta forma, libera NO.⁴³ A administração de 5-hidroxicanoato, um bloqueador seletivo destes canais, e glibenclamida, um bloqueador não seletivo, abole a cardioproteção proporcionada por esta forma de reperfusão modificada.⁴³

Agentes farmacológicos em uso clínico para as mais diversas finalidades têm sabidamente como alvo a via RISK. Estudos pré-clínicos mostram que a insulina reduz o tamanho do infarto do miocárdio quando administrada na reperfusão, associada à

glicose e potássio, ao ativar esta via.⁵⁹ Este efeito não é observado em um grande estudo randomizado controlado realizado em pacientes com infarto agudo do miocárdio.⁶⁰ A eritropoietina demonstra ser segura e efetiva na melhoria da função cerebral em pacientes acometidos de acidente vascular cerebral agudo,⁶¹ porém faltam ainda evidências no cenário de infarto agudo do miocárdio.

A morfina aplicada no início da reperfusão mimetiza o efeito cardioprotetor do pós-condicionamento isquêmico, implicando os receptores opióides k.⁶² A ciclosporina é o único agente farmacológico em uso clínico que comprovadamente inibe diretamente a formação do mPTP, porém com limitações quanto às dosagens e efeitos colaterais.⁶³ Anestésicos voláteis mimetizam o pós-condicionamento quando administrados no momento da reperfusão miocárdica.⁶⁴ Um possível mecanismo de ação intrínseco é a ativação da via RISK.⁶⁵

O pós-condicionamento isquêmico remoto também é descrito ao se evidenciar que curtos episódios de isquemia/reperfusão renal, aplicados no final da isquemia miocárdica letal, proporcionam cardioproteção em ratos.⁶⁶ A aplicabilidade clínica ficou evidenciada nos estudos de intervenção coronária percutânea,⁶⁷ contudo sua natureza invasiva tornou a estratégia restrita a estes grupos de indivíduos. Um estudo mostra que pós-condicionamento isquêmico remoto de membro reduz o tamanho do infarto do miocárdio por inibir “stress” oxidativo.⁶⁸ O mesmo é visto quando aplicado em um modelo suíno.⁶⁹

1.2 CARDIOPROTEÇÃO E HIPERCOLESTEROLEMIA

O efeito benéfico do pré e pós-condicionamento miocárdicos observado em animais com corações saudáveis, pode não ser reproduzido no cenário clínico em que se encontra uma alta prevalência de desordens como a insuficiência cardíaca, a hipertensão arterial, a hipertrofia cardíaca, a hiperglicemia, a obesidade e a hipercolesterolemia.

Vários trabalhos na literatura procuram explicar o mecanismo exato da interferência do estado hiperlipidêmico nas consequências da lesão isquemia/reperfusão e no pré e pós-condicionamentos miocárdicos. É mostrado que mudanças na microviscosidade das membranas sarcolêmica e mitocondrial, em vez de um efeito direto dos altos níveis de lipoproteínas e aterosclerose coronária, sejam os responsáveis pela severidade do dano tecidual.⁷⁰

A hipercolesterolemia aguda, induzida por uma dieta rica em colesterol a 2%, por três dias, independentemente de seus efeitos aterogênicos, aumenta a extensão do infarto do miocárdio após oclusão coronária aguda e reperfusão em coelhos “in vivo”.⁷¹ Uma dieta rica em colesterol por 8 semanas proporciona um aumento na elevação do segmento ST em resposta à isquemia induzida por marcapasso de alta frequência de estimulação em coelhos conscientes.⁷² Em ratos diabéticos não insulino-dependentes tipo “zucker fatty”, alimentados por 4 semanas com dieta hipercolesterolêmica, também encontramos um tamanho maior do infarto do miocárdio.⁷³ Pacientes hiperlipidêmicos, por sua vez, também apresentam uma susceptibilidade maior do coração à isquemia aguda, durante angioplastia coronária.⁷⁴

Por outro lado, outros estudos não mostram esta influência da hiperlipidemia sobre as consequências da isquemia/reperfusão do miocárdio, podendo esta condição mesmo tornar o coração mais resistente ao “stress” isquêmico. Em corações isolados de ratos, alimentados com dieta rica em colesterol a 2%, por 24 semanas, apesar da pressão diastólica final basal se encontrar elevada, os parâmetros funcionais cardíacos isquêmicos e pós-isquêmicos não são significativamente prejudicados.^{75,76} Uma explicação para tais achados não é clara, entretanto a hiperlipidemia a longo prazo, que pode causar aterosclerose severa e disfunção hepática, pode levar a várias condições patológicas extra-cardíacas, que, adicionalmente, pode influenciar a susceptibilidade do miocárdio à isquemia em vários modelos animais de hiperlipidemia e aterosclerose.⁷⁷

Pré-condicionamento miocárdico na hipercolesterolemia

Vários mecanismos podem contribuir para a perda do pré-condicionamento miocárdico em modelos animais hiperlipidêmicos, como, por exemplo, uma diminuição na biodisponibilidade de NO devido ao “stress” nitrosativo aumentado, a ativação de metaloproteinases de matrix e uma aumentada atividade da ecto-5'-nucleotidase, como também o aumento na morte celular apoptótica via cascata caspase 1.⁷⁸⁻⁸¹

Outro mecanismo implicado, além da diminuição na biodisponibilidade do NO,⁷⁵ é a inibição da expressão cardioprotetora da HSP 70.⁸² Por sua vez, o aumento patológico nas espécies reativas de nitrogênio e oxigênio na hipercolesterolemia e

hiperglicemia rompem as vias sinalizadoras citoprotetoras miocárdicas, o que interfere com as ações do pré-condicionamento.⁷⁷

Em pacientes hiperlipidêmicos submetidos à angioplastia coronariana, a perda do efeito benéfico do pré-condicionamento clássico está correlacionada com os níveis aumentados de colesterol total (CT) e lipoproteína de baixa densidade (LDL).⁸³ O efeito limitador do tamanho do infarto proporcionado pelo pré-condicionamento isquêmico clássico também é atenuado em coelhos alimentados com dieta enriquecida com 1% de colesterol.⁷⁸ Todavia, há relatos na literatura, em estudos com animais, que contradizem tais evidências e não mostram influência da hiperlipidemia sobre o efeito benéfico do pré-condicionamento isquêmico clássico no coração.⁸⁴⁻⁸⁷

Quanto ao pré-condicionamento tardio, estudos experimentais relatam que a hipercolesterolemia rompe as vias bioquímicas induzidas por NO, o que suprime a cardioproteção.⁸⁸ Em um modelo de isquemia de demanda induzida por marcapasso ventricular de alta frequência, em coelhos conscientes, o efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico tardio somente ocorre em animais hiperlipidêmicos quando o número de ciclos da isquemia pré-condicionante é aumentado, comparado a um número menor aplicado em animais normolipidêmicos.⁸⁹

Neste mesmo modelo animal, ao usar-se oclusão e reperfusão coronária, a perda do efeito limitador do tamanho do infarto pelo pré-condicionamento tardio ocorre devido ao não aumento da síntese da tetrahydrobiopterina, um cofator essencial para a NOSi e outras enzimas.⁹⁰ O mesmo ocorre nesta forma de proteção miocárdica

induzida por doadores de NO; neste caso, devido ao rompimento de vias bioquímicas distais que geram NO e que iniciam a adaptação tardia à isquemia.⁹¹

Ueda et al.⁸⁰ mostram que a pravastatina restaura o efeito limitador do tamanho do infarto do pré-condicionamento isquêmico, o qual se encontra abolido pela hipercolesterolemia, em coelhos alimentados com dieta rica em colesterol. Entretanto, Fodor et al.⁹² mostram, em um estudo mais recente, um efeito adverso da estatina sobre o efeito limitador do infarto do pré-condicionamento clássico e pós-condicionamento, com esta droga interferindo com seus mecanismos celulares. Mais estudos serão necessários para estabelecer o uso ótimo deste grupo de drogas no cenário da isquemia/reperfusão aguda do miocárdio.

Pós-condicionamento miocárdico na hipercolesterolemia

Muito pouco é conhecido sobre o efeito da hiperlipidemia sobre o pós-condicionamento, talvez por ser uma forma de cardioproteção mais recentemente estudada. Trabalhos recentes mostram a perda do efeito benéfico do pós-condicionamento em animais com hiperlipidemia experimental.^{85,93}

Também é mostrado que a ação benéfica do pós-condicionamento sobre o fenômeno do “no-reflow” é perdida em animais hipercolesterolêmicos.⁹⁴ Tal fato, segundo os autores, implica que esta forma de cardioproteção aja por preservar a função endotelial. É possível que a reduzida biodisponibilidade do NO possa ser responsável, à medida que a via NO- guanilato ciclase solúvel (GC_S) está implicada no seu mecanismo intrínseco.

Contrariando tais achados, Donato et al.⁹⁵ mostram uma redução no dano miocárdico em animais infartados e hipercolesterolêmicos que são submetidos ao pós-condicionamento isquêmico.

Papel do óxido nítrico

A cascata de eventos fisiopatológicos que compõem a lesão de reperfusão, tais como o aumento na expressão de moléculas de adesão, na aderência de leucócitos nas células endoteliais das artérias coronárias reperfundidas, na transmigração de polimorfonucleares e subsequente dano tecidual devido à apoptose do tecido reperfundido, pode ter a reduzida biodisponibilidade do NO como um evento iniciador.⁹⁶ Seus efeitos cardioprotetores são conhecidos há muito tempo, apesar de muitos autores correlacionarem a produção de NO ao “stress” oxidativo e dano celular vistos neste cenário.

Vários mecanismos são descritos em que o NO pode agir diretamente e indiretamente sobre a mitocôndria para preservar sua integridade bioenergética através da lesão isquemia/reperfusão. Um estudo em camundongos deficientes em NOSe mostra que o tamanho do infarto foi significativamente maior seguindo isquemia/reperfusão.⁹⁷ Corroborando este achado, camundongos com expressão aumentada da NOSe cardíaca estão protegidos contra o infarto do miocárdio.⁹⁸

A forte afinidade do NO com a mitocôndria e sua cadeia transportadora de elétrons durante a fase isquêmica impede que na reperfusão haja uma maior geração de ROS, sobrecarga de cálcio e, por fim, abertura do mPTP.^{99,100} Burwell e Brookes¹⁰¹

demonstram que a inibição irreversível do complexo I da cadeia respiratória pela S-nitrosação é cardioprotetora por limitar o excesso de formação de ROS durante a reperfusão.

Costa e Garlid¹⁰² demonstram que o NO induz a abertura dos canais de mKATP de uma maneira PKC- ϵ dependente ou por um mecanismo independente ainda não bem definido. West et al.¹⁰³ mostram que um aumento na biodisponibilidade do NO pode, verdadeiramente, limitar a formação do mPTP. A proteção proporcionada pela via NO-GC_S-GMP_C também é atribuída à inibição destes poros.¹⁰⁴

No pré-condicionamento clássico, o NO endógeno parece não ser importante, enquanto o NO exógeno exerce proteção miocárdica.¹⁰⁵ Na forma tardia, o NO gerado pela NOSe inicia uma cascata de eventos moleculares que culminam na ativação tardia da NOSi, a qual confere cardioproteção.¹⁰⁶ A expressão aumentada da NOSi própria do cardiomiócito proporciona uma diminuição no tamanho do infarto do miocárdio após 30 minutos de hipóxia global, seguida por 40 minutos de reperfusão, em corações isolados de camundongos.¹⁰⁷

Dados da literatura também implicam o NO como fazendo parte no mecanismo intrínseco do pós-condicionamento miocárdico.¹⁰⁸ A fosforilação da NOSe também é induzida no pós-condicionamento miocárdico, juntamente com a AKt, porém a inibição da PI3K reverte este processo e a conseqüente proteção miocárdica resultante.⁴⁹ Um estudo mostra a ausência desta proteção ao inibir a sintase do óxido nítrico (NOS) (via L-NAME) e também documenta a ativação da PI3K durante o pós-condicionamento.¹⁰⁹ Estes achados verdadeiramente implicam o NO, provavelmente gerado pela NOSe,

como é necessário no desenvolvimento do efeito clinicamente relevante da limitação da necrose miocárdica proporcionada pelo pós-condicionamento.

O NO também desempenha um papel central na cardioproteção induzida por uma série de agentes farmacológicos. As estatinas aumentam a sua produção e atenuam a extensão da necrose miocárdica, seguindo isquemia/reperfusão, em camundongos “in vivo”, de uma maneira NOSe dependente.¹¹⁰ Esta classe de drogas também têm ações cardioprotetoras diretas sobre os miócitos cardíacos.^{111,112}

Inibidores da fosfodiesterase-5 atenuam a lesão isquemia/reperfusão do miocárdio através do NO e mKATP.^{30,113} Também foi avaliado o efeito protetor dos inibidores da ECA e dos bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II sobre o tamanho do infarto em modelos de isquemia/reperfusão miocárdica; estes benefícios requerem que o NO esteja disponível.^{31,32} O uso da terapia gênica para aumentar a disponibilidade de NO e proporcionar uma persistente e, possivelmente, permanente proteção miocárdica, representa uma nova abordagem conceitual para a limitação do tamanho do infarto.^{114,115}

Papel da dimetilarginina assimétrica (ADMA)

Esta molécula é caracterizada como um aminoácido de origem intracelular, encontrado naturalmente circulando no plasma, na urina, tecidos e células.¹¹⁶ É sintetizada quando resíduos de arginina nas proteínas nucleares são metilados pela ação da proteína arginina metiltransferase (PRMT), amplamente distribuída no corpo humano, através de uma modificação pós-translacional que adiciona um ou dois grupos metil aos nitrogênios da guanidina incorporados nas proteínas¹¹⁷ (Figura 1).

Há dois tipos de PRMT, com várias isoformas: a tipo1, que cataliza a formação da ADMA, e a tipo 2, que propicia a formação da dimetilarginina simétrica (SDMA), porém ambas as enzimas podem monometilar, formando a N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), das quais somente as metiladas assimetricamente (ADMA e L-NMMA) são inibidoras da NOS. A hidrólise destas proteínas metiladas provoca o aparecimento de metilarginas livres no citosol.

A ADMA inibe as três isoformas da NOS, sendo equipotente com o L-NMMA, podendo também desacoplar esta enzima, o que gera superóxido, além de ter outros alvos diferentes na célula.¹¹⁸ A administração de ADMA em ratos causa um aumento na resistência vascular renal e pressão sanguínea,¹¹⁹ o que comprova sua ação biológica “in vivo”. Uma ação adicional independente é demonstrada “in vivo”, onde a infusão crônica induz lesões vasculares em camundongos “knockout” para a NOS ϵ .¹²⁰ Adicionalmente, as três metilargininas interferem no transporte da L-arginina mediado pelo transportador de aminoácido catiônico de membrana plasmática (canal γ^+), explicando o efeito inibidor da geração de NO da SDMA.¹²¹

A excreção renal é responsável, parcialmente, pela eliminação das metilargininas, principalmente a SDMA, contudo a ADMA e a L-NMMA também são extensivamente metabolizadas e geram citrulina e dimetilamina pela ação da dimetilarginina dimetilaminohidrolase (DDAH)¹²² (Figura 1). Este grupo enzimático apresenta, em organismos superiores, duas isoformas codificadas pelos genes localizados nos cromossomas 1 (DDAH-1) e 6 (DDAH-2), com distintas distribuições teciduais, mas atividades aparentemente similares.¹²³

A incubação de células endoteliais com o TNF alfa ou com a lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox) reduz a atividade desta enzima.¹²⁴ Fatores outros como o “stress” oxidativo, proporcionado pela S-nitrosilação e níveis altos de glicose e homocisteína também contribuem para prejudicar a atividade da DDAH, causando o acúmulo da ADMA.^{125,126} Achados também sugerem a participação do fígado no metabolismo das dimetilargininas ao demonstrarem que os hepatócitos expressam abundantemente os canais y+ em suas membranas e contêm grandes quantidades de DDAH.^{127,128}

A aterosclerose experimental induzida em animais com dieta rica em colesterol associa-se com níveis plasmáticos elevados de ADMA e consequente disfunção endotelial, fato demonstrado em coelhos¹²⁹ e macacos.¹³⁰ Em humanos, as evidências apontam para uma correlação positiva entre a ADMA e os níveis de colesterol. Em um grupo de indivíduos assintomáticos hipercolesterolêmicos, a concentração de ADMA plasmática média é aproximadamente duas vezes mais alta que nos sujeitos normocolesterolêmicos cruzados para a mesma idade e, nos grupos combinados, a ADMA tem uma associação positiva com a LDL.¹³¹

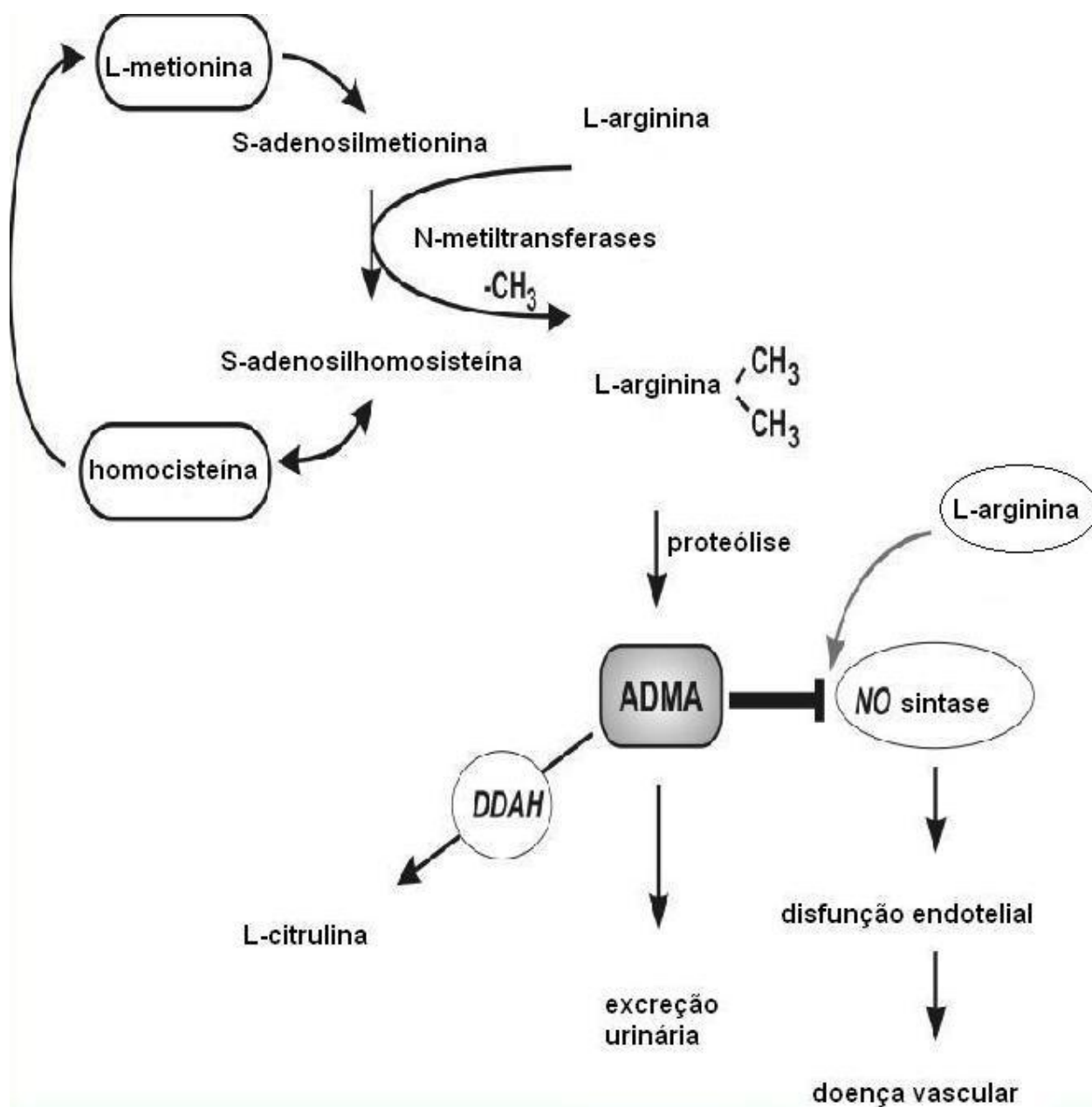


Figura 1. Vias de síntese, ação e metabolismo da dimetilarginina assimétrica. ADMA, dimetilarginina assimétrica. DDAH, dimetilarginina dimetilaminohidrolase. CH₃, radical metil

Porém, outros estudos não mostram esta última associação.¹³² Talvez a oxidação da LDL na parede vascular possa ser responsável pelo efeito desta lipoproteína sobre a elevação da ADMA, através de sua ação sobre a inibição da atividade da DDAH. Por sua vez, a ADMA pode aumentar a expressão do receptor 1 de LDL-ox lecitina “like” (LOX-1), o principal receptor para a LDL-ox nas células endoteliais,¹³³ o que forma um ciclo vicioso que contribui para a aterogênese.

A homocisteína também é um elemento chave no ciclo de metilação da arginina, no qual a S-adenosilmetionina é o doador metil para a arginina formando S-adenosilhomocisteína, que, por sua vez, é hidrolisado em homocisteína (Figura 1). Como a ADMA contém dois grupos metil, sua síntese é acompanhada pela geração de dois equivalentes de homocisteína, o que a torna, portanto, uma fonte deste aminoácido, apesar de não ser a única e nem a mais importante. Um grande estudo de coorte populacional¹³⁴ mostra uma moderada, mas altamente significativa associação positiva entre ADMA plasmática e homocisteína.

Os mecanismos de aumento nos níveis de ADMA associados a diabetes ou resistência à insulina não estão esclarecidos, como é observado em modelos animais de diabetes tipo 1 e 2 e em pacientes com diabetes tipo 2 ou resistência à insulina.¹²⁵ Porém esta observação é contestada em estudos clínicos envolvendo diabéticos tipo 2.¹³⁵ Níveis altos também são encontrados no diabetes gestacional e diabetes tipo 1,¹³⁶ na insuficiência cardíaca,¹³⁷ na hipertensão pulmonar,^{138,139} e na pré-eclâmpsia.¹⁴⁰

O estudo CARDIAC,¹⁴¹ multicêntrico, que teve como objetivo avaliar a potencial relação entre ADMA plasmática e o risco de doença cardíaca coronária mostra que

manifestações de doenças cardiovasculares, em particular quando associadas com outros fatores de risco, tais como hipertensão arterial, hipercolesterolemia, diabetes mellitus e fumo, são acompanhadas por concentrações plasmáticas de ADMA elevadas. Uma concentração acima de 1,75 $\mu\text{mol/litro}$ eleva o risco significativamente.

A ADMA tem uma concentração muito estreita na população geral, que mesmo discretamente aumentada associa-se com um risco cardiovascular elevado.¹³⁴ As medidas originais foram realizadas usando-se cromatografia líquida de alta performance (HPLC), que é, ainda hoje, o método predominante.¹⁴² Os níveis no plasma de adultos saudáveis variam entre 0,3 e 1 $\mu\text{mol/l}$ ¹⁴³ e no fluido espinhal 0,01 e 0,07 $\mu\text{mol/l}$.¹⁴⁴ Atualmente vários métodos que usam espectrometria de massa acoplada a um sistema de separação têm sido descritos e estes métodos têm reduzido os limites de detecção.¹⁴⁵ Anticorpos contra ADMA são comercialmente disponíveis e um método de imunoensaio enzimático (ELISA) foi recentemente descrito, o qual pode detectar ADMA em amostras de plasma e soro.¹⁴⁶

A arginina melhora a função endotelial de pacientes com hipercolesterolemia e aumenta a distância percorrida por pacientes com doença vascular periférica.¹⁴⁷ Drogas que inibem o sistema renina angiotensina aldosterona, como os inibidores da ECA, os bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II e os antagonistas da aldosterona, especialmente os dois primeiros grupos, diminuem a ADMA plasmática por mecanismos ainda não muito claros, talvez pela reversão do “stress” oxidativo proporcionado pela angiotensina II, um formador de ROS.

Há relatos que mostram algum efeito das estatinas sobre o metabolismo da ADMA em humanos e anéis aórticos de ratos,^{148,149} e outro estudo mostra que os níveis basais de ADMA são importantes nos efeitos benéficos da pravastatina sobre a melhora da função endotelial.¹⁵⁰ A ação dos fibratos sobre o níveis de ADMA são demonstrados em ratos e em estudos com células “in vitro”.¹⁵¹ Porém, não se observam os mesmos efeitos quando se utilizam indivíduos hipertrigliceridêmicos.¹⁵² A niacina também tem influência na queda dos níveis plasmáticos de ADMA em pacientes com lipoproteína de alta densidade (HDL) baixa, possivelmente por depletar os níveis de S-adenosilmetionina.¹⁵³

As tiazolidinedionas mostram influência sobre a liberação de ADMA a partir de células endoteliais “in vitro” e sobre os níveis plasmáticos em ratos “in vivo”.^{154,155} Um estudo clínico com este grupo de medicamentos evidencia uma diminuição na ADMA de maneira considerável em indivíduos hipertensos não diabéticos.¹⁵⁶ Faltam estudos com estas drogas em pacientes diabéticos e modelos animais de diabéticos. A metformina reduz os níveis de ADMA em pacientes diabéticos tipo 2, porém não ficou claro se este efeito é somente consequência do melhor controle glicêmico.¹⁵⁷ É interessante notar que esta droga é estruturalmente similar à ADMA e pode ser transportada pelos canais γ +.¹⁵⁸

Compostos com propriedades antioxidantes também reduzem os níveis de ADMA, preservando a função endotelial.¹⁵⁹ Em humanos, observa-se que a vitamina E diminui a ADMA plasmática em pacientes com insuficiência renal crônica.¹⁶⁰ O efeito redutor da ADMA dos estrógenos é confirmado em estudos clínicos placebo-controlados sobre terapia de reposição hormonal, em mulheres pós-menopausadas.¹⁶¹

Em um grande ensaio clínico, placebo controlado, randomizado, em mulheres pós-menopausadas saudáveis, a ADMA plasmática diminui significativamente, porém a razão L-arginina/ADMA não se altera, o que nos leva à conclusão de um efeito neutro da terapia de reposição hormonal sobre as concentrações de ADMA e produção de NO.¹⁶²

A aspirina reduz a ADMA plasmática devido a suas propriedades antioxidantes.¹⁶³ Vitaminas redutoras da homocisteína plasmática não têm os efeitos esperados de reduzir os níveis de ADMA concomitante com seus efeitos sobre aquele aminoácido.¹⁶⁴ Somente um estudo clínico mostrou um efeito redutor da ADMA, quando da administração do ácido fólico a sujeitos hiperhomocisteinêmicos.¹⁶⁵ O uso da eritropoietina humana recombinante aumenta a quantidade de ADMA e reduz a atividade da DDAH em células endoteliais cultivadas,¹⁶⁶ o que nos leva a deduzir que seus efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular possam ter a ADMA como um mediador importante. Gomes et al.¹⁶⁷ demonstram o benefício do treinamento físico sobre os níveis de ADMA em portadores de síndrome metabólica.

Há poucos relatos sobre o papel da ADMA no cenário da isquemia/reperfusão e proteção miocárdica. Vegh et al.¹⁶⁸ relatam que o efeito benéfico do pré-condicionamento isquêmico em evitar arritmias induzidas por isquemia/reperfusão durante a primeira janela de proteção miocárdica foi abolida pelo L-NAME. Penna et al.¹⁶⁹ demonstram que 3 minutos de infusão do L-NAME completamente evitaram a proteção induzida pelo pós-condicionamento. A administração sistêmica de inibidores da NOS antes da isquemia ou logo anterior à reperfusão mostra um aumento no tamanho do infarto, um efeito reversível pela administração de L-arginina.¹⁷⁰

Encontram-se concentrações significativamente reduzidas de ADMA em homogeneizado de tecido miocárdico de cachorro em regiões de baixa perfusão, mas não isquêmica, quando comparadas a regiões bem perfundidas,¹⁷¹ tal fato demonstra a importância da NOS em condições patológicas. Em estados de doença, como na hipertensão “bordeline” e hipercolesterolemia familiar, a ADMA regula o fluxo sanguíneo miocárdico induzido por dipiridamol.¹⁷²

Um estudo mostra que níveis elevados de ADMA propiciam um aumento nas moléculas de adesão e leucócitos e um maior dano ao miocárdio na isquemia/reperfusão.¹⁷³ Intervenções na atividade ou expressão da DDAH no início da reperfusão podem se constituir modalidade terapêutica para minorar a extensão da necrose.

1.3 JUSTIFICATIVA

O pré e o pós-condicionamento isquêmico são fenômenos protetores presentes em corações de animais e humanos, com efeito na redução do tamanho da área infartada. Há relatos na literatura, não unânimes, que mostram que a hipercolesterolemia, situação em que a disfunção endotelial e inflamação em baixo grau estão presentes, propicia um maior dano miocárdico após isquemia e reperfusão agudas e influencia negativamente os benefícios do pré e pós-condicionamento isquêmico do miocárdio.

O acúmulo da ADMA e conseqüente queda na biodisponibilidade do NO, nestas situações de risco aumentado, particularmente na hipercolesterolemia, torna-a um

potencial marcador de disfunção endotelial e aterosclerose futura, com implicações para uso clínico. A associação entre níveis séricos altos de ADMA e marcadores inflamatórios vem sendo descrita na literatura, contribuindo para o entendimento de que a aterosclerose tem no seu mecanismo iniciador inflamação em baixo grau e disfunção endotelial.

Julgamos importante estabelecer a influência dos níveis sanguíneos elevados de colesterol total e consequente elevação da ADMA sobre o dano miocárdico no cenário da isquemia e reperfusão associados com pré e pós-condicionamento isquêmico.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Primário

Avaliar a influência da hipercolesterolemia sobre o dano miocárdico em ratos submetidos à isquemia e reperfusão associados com pré e pós-condicionamento isquêmico;

1.4.2 Secundário

Correlacionar os níveis sanguíneos de colesterol total e ADMA com o tamanho do infarto agudo do miocárdio em ratos hipercolesterolêmicos submetidos à isquemia e reperfusão associados com pré e pós-condicionamento isquêmico;

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Aprovação pela Comissão de Ética

Experimento aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos Pesquisa (CAPESQ) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) em sessão de 28/09/06, com o número 931/06.

Animais

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com idade entre seis e oito semanas. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto do Coração do HC-FMUSP, com temperatura ambiente entre 22-24°C e com ciclo claro/escuro. Foram mantidos cinco animais por gaiola. Os animais controles foram alimentados com ração Nuvital® (Nuvilab Nutrientes S/A, Curitiba, PR, Brasil) fornecida pelo biotério e água “ad libitum”. Os animais intervenção foram alimentados exclusivamente com ração rica em colesterol a 2% fornecida pela Nutri Experimental® (Campinas, SP, Brasil), que seguiu as recomendações do “American Institute of Nutrition” (AIN 93G), (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição da dieta hiperlipídica usada nos animais

COMPONENTE	QUANTIDADE (%)
Carboidratos ¹	51,95
Fonte protéica ²	20,00
Lipídios ³	18,00
Fibras	5,00
Mistura mineral	1,00
Mistura vitamínica	3,00
L-cistina	0,30
Bitartarato de colina	0,25
Ácido cólico	0,50
TOTAL	100,00

NOTA: As misturas vitamínicas e minerais seguem as recomendações do “American Institute of Nutrition” (AIN-93G).

¹ Fração carboidratos: 55,8% de amido, 25,8% de maltodextrina e 18,3% de sacarose.

² Fonte protéica (caseína comercial = 85% de proteína).

³ Fração lipídica: 66,7% de gordura de coco, 26,4% de óleo de soja e 6,9% de colesterol.

Grupos de estudo e protocolo experimental (Figura 2)

Foram utilizados 107 ratos. Todos os animais foram submetidos a um infarto do miocárdio experimental, através de oclusão da artéria coronária descendente anterior,

por um período de 30 min, seguidos de reperfusão (artéria aberta). Oito dias após, foi realizada uma avaliação do tamanho do infarto do miocárdio a que foram submetidos.

Três grupos de animais serviram de controle, os quais foram submetidos à dieta padrão. O grupo isquemia e reperfusão (I/R) foi submetido apenas à oclusão da descendente anterior por 30 min, seguida de reperfusão, e o grupo isquemia e reperfusão com pré-condicionamento (PC) foi submetido ao pré-condicionamento isquêmico, com três períodos de 5 min de isquemia, intercalados por igual período de reperfusão, antes do período isquêmico letal. O grupo isquemia e reperfusão com pós-condicionamento (POC) foi submetido ao pós-condicionamento isquêmico, com três períodos de 10 s de isquemia, intercalados com três períodos de 10 s de reperfusão, no primeiro minuto após o período isquêmico letal.

Os outros três grupos de animais foram submetidos à dieta hiperlipídica, por oito semanas, e ao final deste prazo, o grupo isquemia e reperfusão hipercolesterolêmico (I/RHUPER) foi submetido apenas à oclusão da descendente anterior, por 30 min, seguida de reperfusão. O grupo isquemia e reperfusão com pré-condicionamento hipercolesterolêmico (PCHIPER) foi submetido ao pré-condicionamento isquêmico, com três períodos de 5 min de isquemia, intercalados por igual período de reperfusão, antes do período isquêmico letal. O grupo isquemia e reperfusão com pós-condicionamento hipercolesterolêmico (POCHUPER) foi submetido ao pós-condicionamento isquêmico, com três períodos de 10 s de isquemia, intercalados por igual período de reperfusão, no primeiro minuto após o período isquêmico letal.

Nos seis grupos experimentais foram realizadas coletas de sangue antes do infarto experimental, através da canulação da veia jugular direita, para dosagem dos

níveis séricos de CT pelo método enzimático-trinder (Labtest Diagnóstica S.A®, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), e dos níveis de dimetilarginina assimétrica (ADMA) pelo método ELISA (LDL-Diagnóstika®, Hamburgo, Alemanha).

Drogas utilizadas

Durante o experimento foram utilizados os anestésicos xylazina e ketamina, cloreto de potássio a 19,1% e formaldeído a 4%.

Procedimento cirúrgico

Os animais foram pesados e anestesiados com xylazina (10 mg/Kg) e ketamina (90 mg/Kg), administrados por via intraperitoneal. Foram intubados com uma cânula de polietileno tamanho 14, conectada a um ventilador mecânico Harvard®, modelo 683 (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA), específico para animais de pequeno porte, com um volume corrente de 1,1 ml de ar/100g de peso corporal e com frequência de 70 a 75 ciclos/minuto. Foi feita a inserção de um catéter de polietileno (PE 50) em veia jugular direita, após incisão em região cervical anterior, para obtenção de amostras de sangue para dosagens bioquímicas, antes do infarto experimental, e canulação da artéria carótida comum esquerda para aferição da pressão distólica final (PDF) do ventrículo esquerdo, também executada imediatamente antes e 5 min após o infarto experimental.

Após tricotomia, foi realizada uma toracotomia lateral esquerda com abertura do quarto ou quinto espaços intercostais. As costelas foram separadas com um afastador

de tórax para expor o coração. Foi feita a abertura do pericárdio, visibilização da artéria coronária descendente anterior esquerda, com o auxílio de uma lupa (Figura 3), e oclusão desta artéria, durante 30 min, com fio de polipropileno 6.0 (Prolene®, Ethicon, Inc., Somerville, NJ, USA), no seu terço proximal, a cerca de 1 mm de sua origem, seguida da liberação da mesma. Para esta oclusão o fio foi apertado contra um catéter de polietileno e ao final do período desejado de isquemia foi liberado e retirado do campo cirúrgico (Figura 4). Nos grupos PC e PCHIPER, antes da oclusão que levou ao infarto (isquemia “index”), foi feita uma oclusão por 5 min, três períodos, intercalados por três períodos iguais de reperfusão, pré-condicionamento isquêmico. Nos grupos POC e POCHIPER, após a oclusão que levou ao infarto (isquemia “index”), foi feita uma oclusão por 10 s, três períodos, intercalados por três períodos, também de 10 s, de reperfusão, pós-condicionamento isquêmico. Após o término deste procedimento, a parede torácica foi fechada por planos utilizando-se fio de nylon 4.0 (Mononylon®, Ethicon Inc., São José dos Campos, SP, Brazil). Foi retirado o catéter da veia jugular direita e o catéter transdutor de pressão utilizado na artéria carótida comum esquerda. Passado o efeito da anestesia, foi desligado o ventilador, retirada a cânula de intubação e os animais colocados em caixa aquecida por uma fonte de luz infravermelha, com suplementação de oxigênio por aproximadamente uma a duas horas.

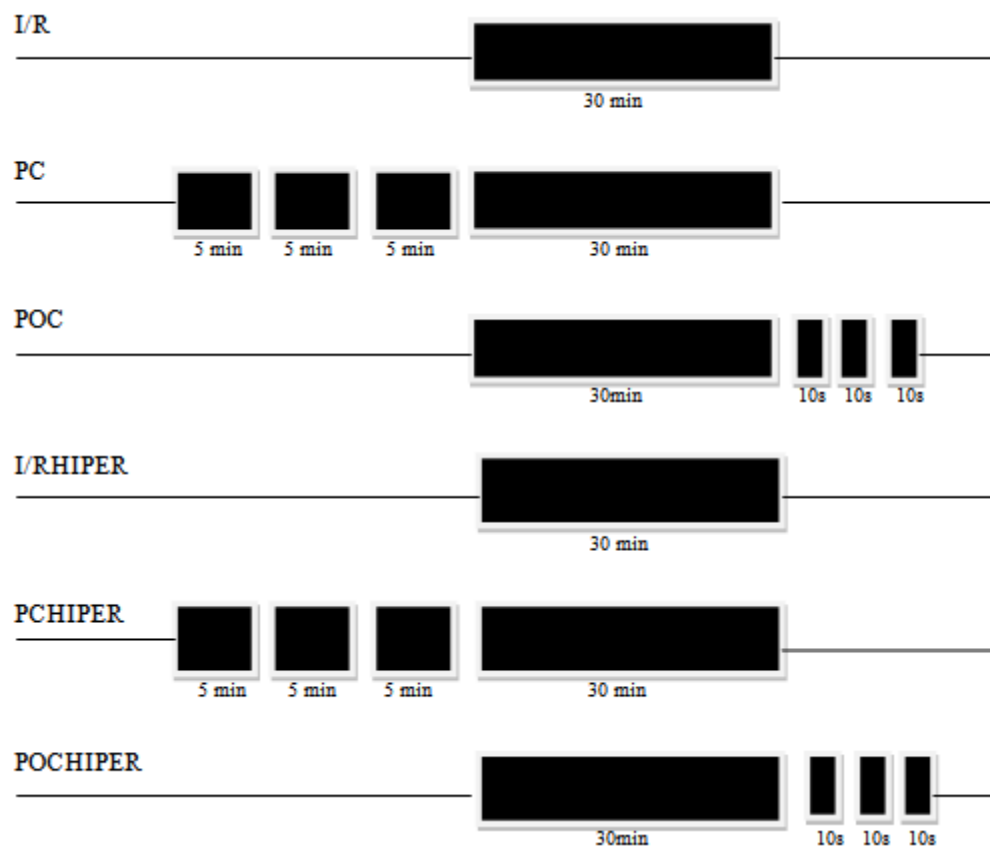



Figura 2. Fluxograma para a realização do infarto do miocárdio experimental. I/R, isquemia e reperfusão. PC, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento. POC, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento. I/RHIPER, isquemia e reperfusão hipercolesterolêmico. PCHIPER, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento hipercolesterolêmico. POCHIPER, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento hipercolesterolêmico. , isquemia (oclusão da artéria coronária descendente anterior)



Figura 3. Procedimento cirúrgico para oclusão da artéria coronária descendente anterior do rato



Figura 4. Momento de oclusão da artéria coronária descendente anterior do rato usando cateter de polietileno. Seta (➡), catéter de polietileno

Avaliação morfométrica

Oito dias após a realização do infarto agudo do miocárdio, os animais foram novamente anestesiados com solução de xylazina, 10 mg/Kg e ketamina, 90 mg/Kg, administrados por via intraperitoneal. Em seguida foram posicionados em decúbito dorsal e uma incisão cutânea foi feita estendendo-se do abdome ao tórax. O coração foi exposto, após rebater-se o diafragma, e o animal perfundido, sob pressão constante de 80 mmHg, com solução fisiológica contendo cloreto de potássio (14 mM). Após a constatação da parada cardíaca, a solução fisiológica, contendo cloreto de potássio, foi substituída por uma solução de formol tamponado a 4 %. O coração foi retirado e mantido por 24 h em formol tamponado. Após este período, os corações foram seccionados no ponto médio entre a base e o ápex e um “slice” disposto em cassetes plásticos do tipo processador/incluser.

Os cassetes foram processados em aparelho autotécnico com ciclo total de 12 h para a desidratação, diafanização e parafinização do material. Os tecidos incluídos em parafina foram cortados em micrótomo (3 µm de espessura) e dispostos em lâminas. As lâminas foram observadas em uma lupa ligada a um sistema de digitalização de imagem (Leica Imaging Systems®, Cambridge, UK) e as imagens digitalizadas dos corações foram analisadas com o uso de um “software” (ImageQuant® – Leica®).

Determinação da área do infarto

A área do infarto nos diferentes grupos experimentais foi quantificada em cortes submetidos à coloração de tricrômio de Masson (azul) e análise com o uso do “software” mencionado (ImageQuant® – Leica®). A área infartada foi definida como porcentagem do ventrículo esquerdo positiva para marcação de colágeno, indicando a presença e a extensão de zona cicatricial, em relação à área total transversa do ventrículo esquerdo.

Medida da PDF do ventrículo esquerdo

Foi introduzido pela artéria carótida comum esquerda um cateter sensor de pressão para rato, modelo SPR 407, 1,6 F, Millar® (Harvard Apparatus, Inc, Holliston, MA, USA), que foi conectado a um sistema de medida de pressão MP100WSW® (Biopac Systems, Inc, Goleta, CA, USA). Para análise da curva e medidas da PDF do ventrículo esquerdo foi utilizado o “software” AcqKnowledge®, v. 3.7 (Biopac Systems, Inc, Goleta, CA, USA). A constatação da correta posição do cateter no interior do ventrículo esquerdo foi dada pela característica da curva pressórica (Figura 5).

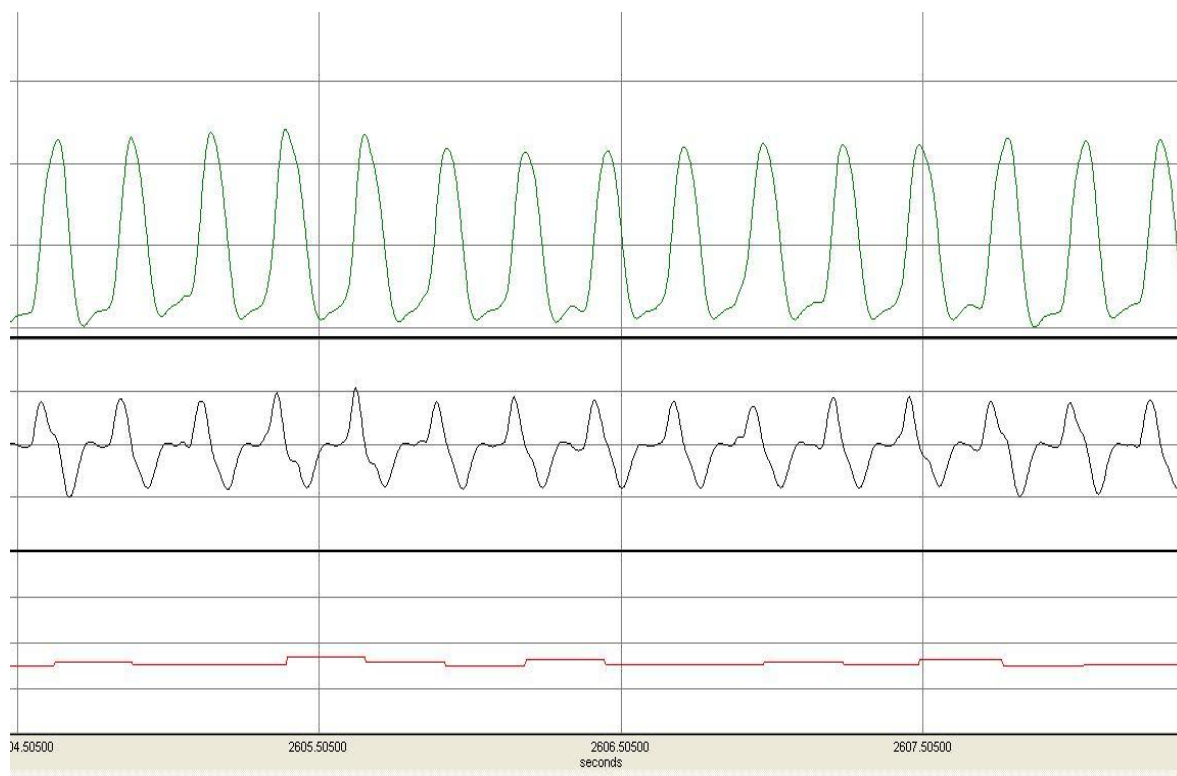


Figura 5. Curva pressórica do ventrículo esquerdo do rato (traçado superior)

Análise estatística dos dados

As variáveis quantitativas, mensuradas em um único momento, foram apresentadas descritivamente em tabelas contendo média, erro padrão da média, desvio padrão, valores mínimos e máximos. As médias dos grupos foram avaliadas com análise de variância com um fator de classificação. Quando significativa, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey para discriminar as diferenças entre grupos.

As variáveis quantitativas, mensuradas em dois momentos (pré e pós), foram apresentadas descritivamente em um gráfico. As médias foram avaliadas com análise de variância para medidas repetidas, onde as três hipóteses básicas foram testadas:

H₀₁: Os perfis de médias são paralelos, ou seja, o comportamento dos grupos é igual ao longo do tempo;

H₀₂: Os perfis de médias são coincidentes, ou seja, não existe diferença de médias entre os grupos;

H₀₃: Não há efeito de tempo, ou seja, os perfis são paralelos ao eixo das abscissas.

Utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson quando se correlacionou a ADMA plasmática ao colesterol total com o tamanho do infarto experimental. A comparação da mortalidade entre os grupos foi realizada através do teste da razão de verossimilhança. Utilizou-se o programa SPSS® (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, Illinois, USA) nos referidos cálculos. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3. RESULTADOS

Mortalidade (Tabela 2)

Não houve diferença na taxa de mortalidade pós-operatória entre os grupos.

Tabela 2 - Taxa de mortalidade pós-operatória entre os grupos

GRUPO	OPERADO (n)	ÓBITO (%)
I/R	22	54,55
PC	13	46,15
POC	15	46,67
I/RHIPER	20	60,00
PCHIPER	13	61,54
POCHIPER	24	66,67

NOTA: I/R, isquemia e reperfusão. PC, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento. POC, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento. I/RHIPER, isquemia e reperfusão hipercolesterolêmico. PCHIPER, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento hipercolesterolêmico. POCHIPER, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento hipercolesterolêmico. $p=0,786$. n, número de animais. %, porcentagem

Peso corporal (Tabela 3)

Observou-se diferença significativa para maior entre os pesos dos animais hipercolesterolêmicos quando comparados aos normocolesterolêmicos, fato não observado ao se comparar os pesos entre os animais de mesma dieta (Tabela 4).

Tabela 3 – Peso dos animais antes do infarto do miocárdio experimental

GRUPO	N	MÉDIA (g)	DESVIO- PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
I/R	10	247,80±13,81	43,64	171	307
PC	7	304,00±10,93	28,86	273	347
POC	8	256,00±22,70	64,03	170	366
I/RHIPER	8	409,00±12,41	35,02	345	473
PCHIPER	5	451,20±23,70	52,87	406	528
POCHIPER	8	391,38±12,80	36,12	314	426

NOTA: I/R, isquemia e reperfusão. PC, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento. POC, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento. I/RHIPER, isquemia e reperfusão hipercolesterolêmico. PCHIPER, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento hipercolesterolêmico. POCHIPER, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento hipercolesterolêmico. p=0,000. MÉDIA, inclui desvio padrão da média. N, número de animais. g, gramas

Tabela 4 - Probabilidade de significância (p) entre os pesos dos animais.
 Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos

GRUPO	I/R	PC	POC	I/RHIPER	PCHIPER	POCHIPER
I/R,n=10		0,133	0,999	0,000	0,000	0,000
PC,n=7			0,319	0,001	0,000	0,006
POC,n=8				0,000	0,000	0,000
I/RHIPER,n=8					0,567	0,968
PCHIPER,n=5						0,199
POCHIPER,n=8						

NOTA: I/R, isquemia e reperfusão. PC, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento. POC, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento. I/RHIPER, isquemia e reperfusão hipercolesterolêmico. PCHIPER, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento hipercolesterolêmico. POCHIPER, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento hipercolesterolêmico. n, número de animais

Colesterol total (Tabela 5)

O mesmo se observou para o colesterol total. Os níveis sanguíneos foram maiores nos grupos em dieta hiperlipídica quando comparados aos grupos em dieta habitual. Na análise dos grupos com mesma dieta, não se observaram diferenças estatísticas (Tabela 6).

Tabela 5 – Colesterol total dos animais antes do infarto do miocárdio experimental

GRUPO	N	MÉDIA (mg%)	DESVIO- PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
I/R	10	69,50±4,70	14,86	49	85
PC	7	73,71±4,17	11,03	61	91
POC	8	75,25±4,18	11,80	53	88
I/RHIPER	8	133,38±8,65	24,40	109	181
PCHIPER	5	112,00±5,88	13,13	94	123
POCHIPER	8	129,00±10,72	30,24	104	198

NOTA: I/R, isquemia e reperfusão. PC, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento. POC, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento. I/RHIPER, isquemia e reperfusão hipercolesterolêmico. PCHIPER, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento hipercolesterolêmico. POCHIPER, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento hipercolesterolêmico. $p=0,000$. MÉDIA, inclui desvio padrão da média. N, número de animais. mg%, miligramas por cento

Tabela 6 - Probabilidade de significância (p) entre o colesterol total dos animais. Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos

GRUPO	I/R	PC	POC	I/RHIPER	PCHIPER	POCHIPER
I/R,n=10		0,998	0,988	0,000	0,003	0,000
PC,n=7			1,000	0,000	0,019	0,000
POC,n=8				0,000	0,021	0,000
I/RHIPER,n=8					0,394	0,997
PCHIPER,n=5						0,640
POCHIPER,n=8						

NOTA: I/R, isquemia e reperfusão. PC, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento. POC, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento. I/RHIPER, isquemia e reperfusão hipercolesterolêmico. PCHIPER, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento hipercolesterolêmico. POCHIPER, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento hipercolesterolêmico. n, número de animais

ADMA plasmática (Tabela 7)

Os níveis plasmáticos de ADMA foram similares entre os grupos em dieta habitual. Nos animais em dieta hiperlipídica, observaram-se níveis mais elevados, porém sem significância entre os grupos. Somente no grupo PCHIPER, a ADMA encontrou-se significativamente elevada quando comparada aos animais normocolesterolêmicos (Tabela 8).

Tabela 7 – ADMA plasmática dos animais antes do infarto do miocárdio experimental

GRUPO	N	MÉDIA ($\mu\text{mol/l}$)	DESVIO- PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
I/R	10	0,97 \pm 0,04	0,13	0,81	1,18
PC	7	0,93 \pm 0,05	0,14	0,77	0,19
POC	8	0,97 \pm 0,04	0,14	0,76	1,18
I/RHIPER	8	1,20 \pm 0,06	0,19	0,83	1,45
PCHIPER	5	1,27 \pm 0,08	0,19	0,99	1,51
POCHIPER	8	1,20 \pm 0,08	0,25	0,89	1,67

NOTA: I/R, isquemia e reperfusão. PC, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento. POC, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento. I/RHIPER, isquemia e reperfusão hipercolesterolêmico. PCHIPER, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento hipercolesterolêmico. POCHIPER, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento hipercolesterolêmico. $p=0,001$. MÉDIA, inclui desvio padrão da média. N, número de animais. $\mu\text{mol/l}$, micromol por litro

Tabela 8 - Probabilidade de significância (p) entre a ADMA dos animais. Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos

GRUPO	I/R	PC	POC	I/RHIPER	PCHIPER	POCHIPER
I/R,n=10		0,999	1,000	0,080	0,038	0,083
PC,n=7			0,999	0,059	0,027	0,061
POC,n=8				0,102	0,047	0,105
I/RHIPER,n=8					0,984	1,000
PCHIPER,n=5						0,983
POCHIPER,n=8						

NOTA: I/R, isquemia e reperfusão. PC, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento. POC, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento. I/RHIPER, isquemia e reperfusão hipercolesterolêmico. PCHIPER, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento hipercolesterolêmico. POCHIPER, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento hipercolesterolêmico. n, número de animais

Tamanho do infarto (Tabela 9)

Nos animais normocolesterolêmicos, observou-se um menor tamanho do infarto nos grupos submetidos ao pré e pós-condicionamento isquêmico (PC e POC). Entretanto no PC não se detectou diferença estatística quando comparado ao grupo I/R. Nos hipercolesterolêmicos não se observou diferença estatística nos grupos PCHIPER e POCHIPER, ambos submetidos à cardioproteção, quando comparados ao I/RHIPER. Comparando-se os animais em dieta habitual e hiperlipídica de mesmo

protocolo, não se observaram diferenças estatisticamente significantes nos tamanhos dos infartos (Tabela 10) (Figuras 6 a 11).

Tabela 9 – Tamanho do infarto do miocárdio experimental dos animais oito dias após oclusão da artéria coronária descendente anterior

GRUPO	N	MÉDIA (%)	DESVIO- PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
I/R	10	12,31±1,37	4,34	4,77	16,94
PC	7	8,25±1,87	4,95	2,4	18,15
POC	8	6,10±0,95	2,70	2,36	10,43
I/RHIPER	8	7,95±0,84	2,38	4,35	10,76
PCHIPER	5	13,55±1,16	2,60	10,54	16,64
POCHIPER	8	8,00±1,62	4,57	2,94	15,18

NOTA: I/R, isquemia e reperfusão. PC, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento. POC, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento. I/RHIPER, isquemia e reperfusão hipercolesterolêmico. PCHIPER, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento hipercolesterolêmico. POCHIPER, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento hipercolesterolêmico. p=0,004. MÉDIA, inclui desvio padrão da média. N, número de animais. %, porcentagem

Tabela 10 - Probabilidade de significância (p) entre os valores do infarto do miocárdio experimental dos animais. Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos

GRUPO	I/R	PC	POC	I/RHIPER	PCHIPER	POCHIPER
I/R, n=10		0,278	0,016	0,176	0,991	0,186
PC, n=7			0,882	1,000	0,188	1,000
POC, n=8				0,924	0,016	0,916
I/RHIPER, n=8					0,126	1,000
PCHIPER, n=5						0,132
POCHIPER, n=8						

NOTA: I/R, isquemia e reperfusão. PC, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento. POC, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento. I/RHIPER, isquemia e reperfusão hipercolesterolêmico. PCHIPER, isquemia e reperfusão com pré-condicionamento hipercolesterolêmico. POCHIPER, isquemia e reperfusão com pós-condicionamento hipercolesterolêmico. n, número de animais

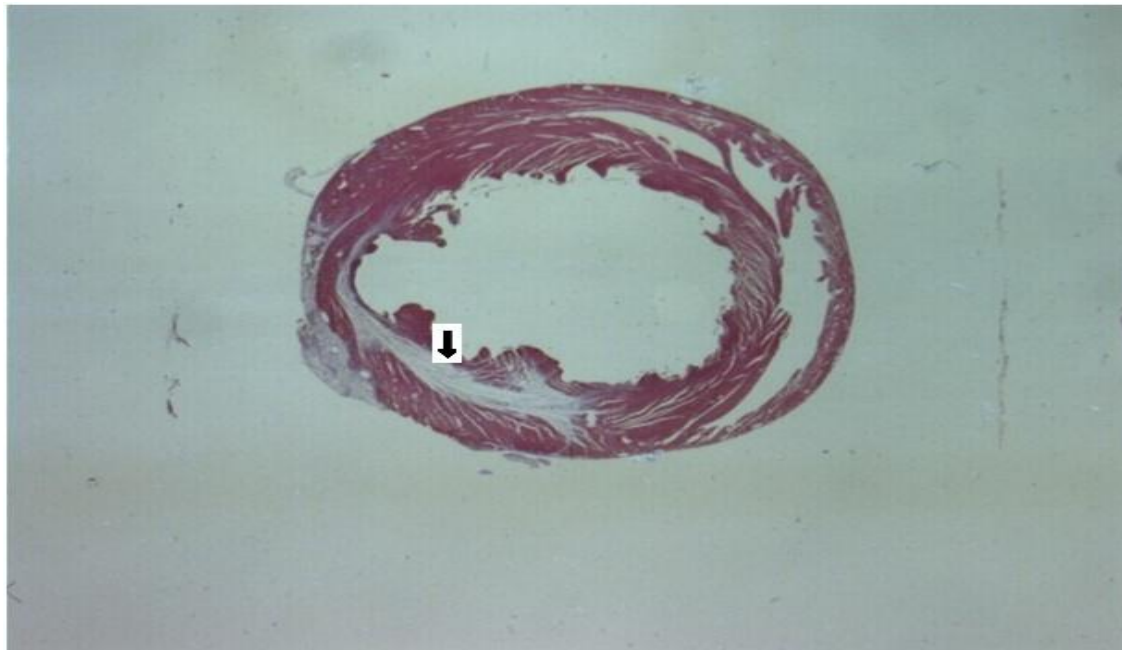


Figura 6. Delimitação da área de infarto do miocárdio experimental em um animal do grupo I/R. Seta (**➡**), área de infarto (MASSON)

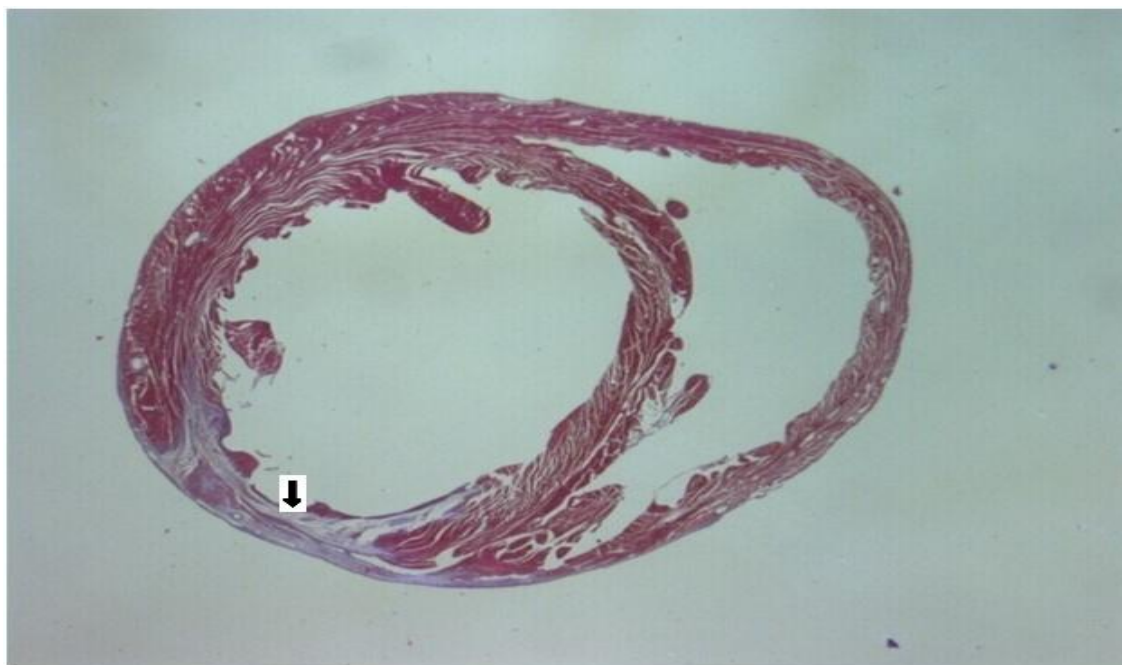


Figura 7. Delimitação da área de infarto do miocárdio experimental em um animal do grupo PC. Seta (**➡**), área de infarto (MASSON)

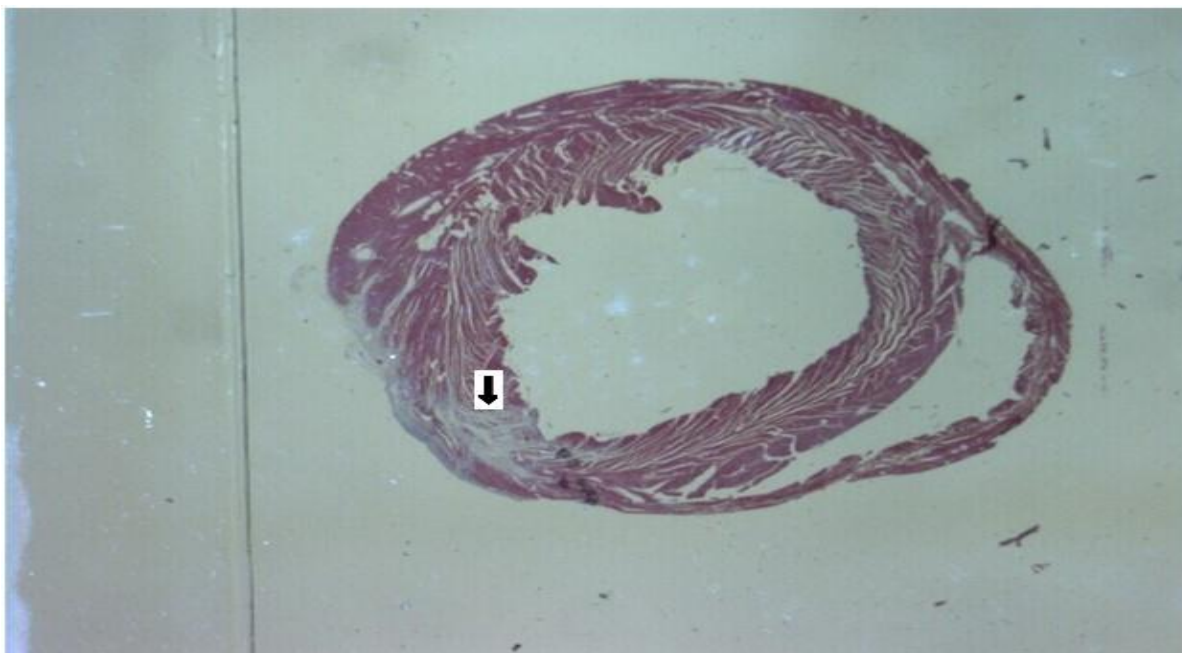


Figura 8. Delimitação da área de infarto do miocárdio experimental em um animal do grupo POC. Seta (➡), área de infarto (MASSON)

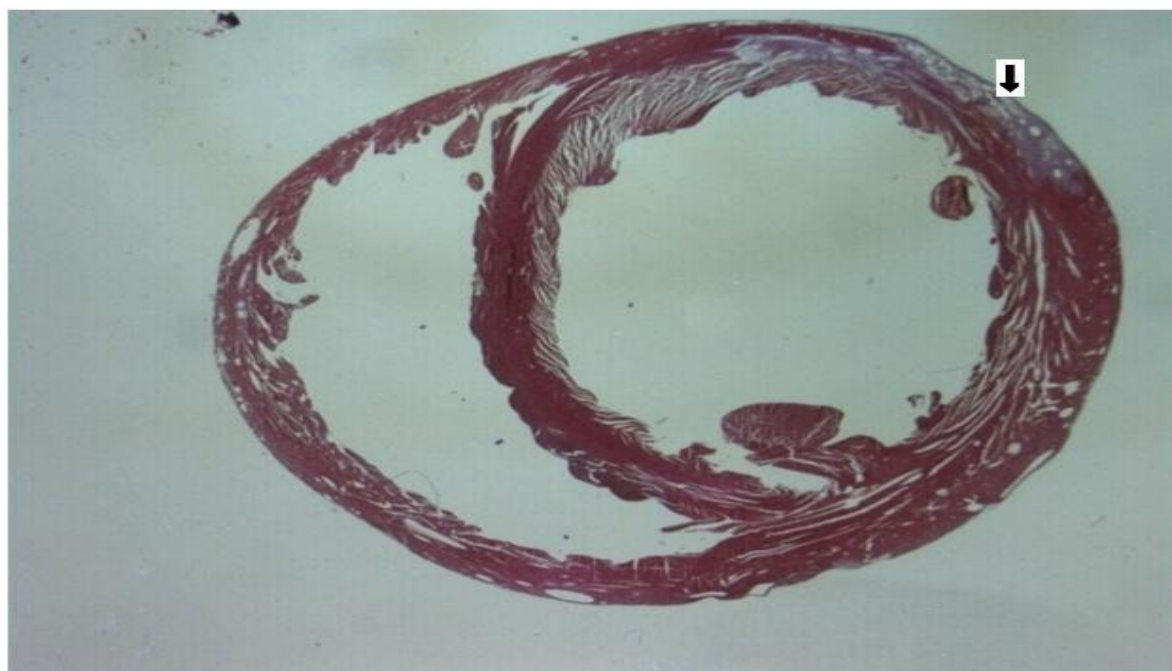


Figura 9. Delimitação da área de infarto do miocárdio experimental em um animal do grupo I/RHUPER. Seta (➡), área de infarto (MASSON)

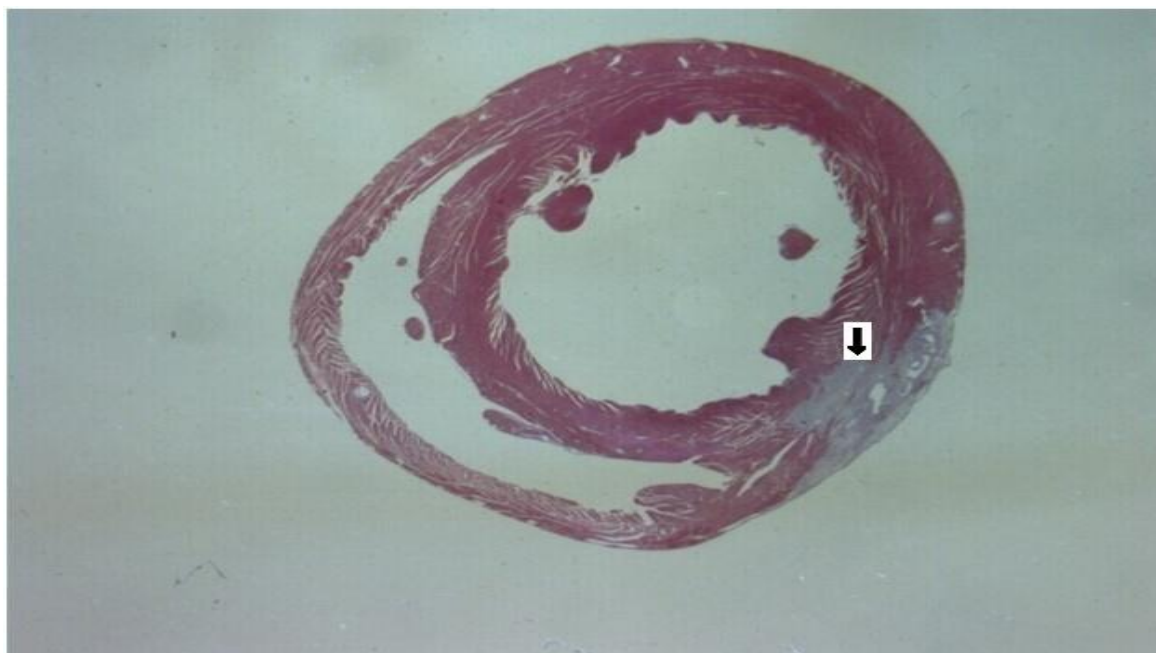


Figura 10. Delimitação da área de infarto miocárdio experimental em um animal do grupo PCHIPER. Seta (➡), área de infarto (MASSON)

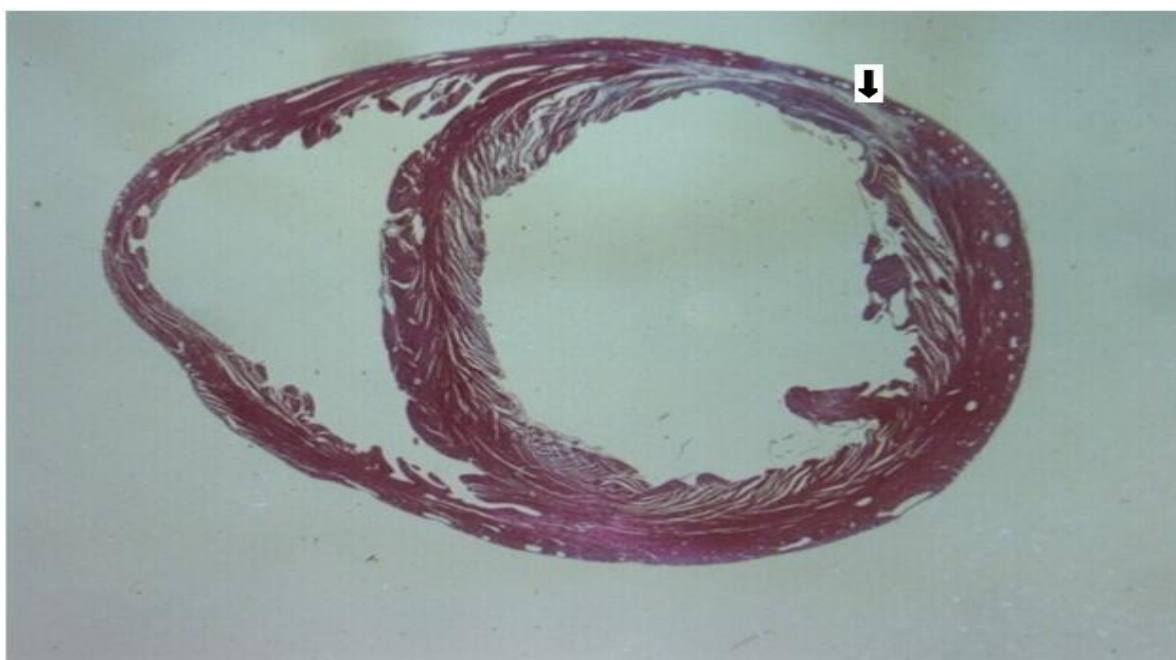


Figura 11. Delimitação da área de infarto do miocárdio experimental em um animal do grupo POCHIPER. Seta (➡), área de infarto (MASSON)

Correlação entre CT sérico e tamanho do infarto experimental

A correlação, quando se analisaram todos os animais, foi -0,114 ($p=0,449$). Quando se correlacionou grupo a grupo, observou-se, para o grupo I/R -0,371 ($p=0,292$), para o grupo PC -0,045 ($p=0,924$), para o grupo POC 0,144 ($p=0,734$), para o grupo I/RHIPER 0,098 ($p=0,817$), para o grupo PCHIPER -0,194 ($p=0,755$), para o grupo POCHIPER -0,071 ($p=0,867$). Ao correlacionarem-se todos os animais em dieta habitual, observou-se um coeficiente de -0,253 ($p=0,223$). Nos animais hipercolesterolêmicos, observou-se um coeficiente de -0,226 ($p=0,325$).

Correlação entre ADMA plasmática e tamanho do infarto experimental

A correlação, quando se analisaram todos os animais, foi -0,077 ($p=0,611$). Quando se correlacionou grupo a grupo, observou-se, para o grupo I/R -0,020 ($p=0,956$), para o grupo PC -0,753 ($p=0,051$), para o grupo POC 0,090 ($p=0,832$), para o grupo I/RHIPER -0,330 ($p=0,425$), para o grupo PCHIPER -0,431 ($p=0,469$) e para o grupo POCHIPER -0,057 ($p=0,893$). Ao correlacionarem-se todos os animais em dieta habitual, observou-se um coeficiente de -0,179 ($p=0,393$). Nos animais hipercolesterolêmicos, observou-se um coeficiente de -0,055 ($p=0,814$).

Correlação entre CT sérico e ADMA plasmática

A correlação, quando se analisaram todos os animais, foi 0,536 ($p=0,000$). Quando se correlacionou grupo a grupo, observou-se, para o grupo I/R -0,170

($p=0,639$), para o grupo PC 0,187 ($p=0,688$), para o grupo POC -0,511 ($p=0,196$), para o grupo I/RHIPER -0,272 ($p=0,515$), para o grupo PCHIPER 0,722 ($p=0,168$) e para o grupo POCHIPER 0,465 ($p=0,245$). Ao correlacionarem-se todos animais em dieta habitual, observou-se um coeficiente de -0,190 ($p=0,363$). Nos animais hipercolesterolêmicos, observou-se um coeficiente de 0,176 ($p=0,445$).

PDF do ventrículo esquerdo 5 min antes e 5 min após o infarto experimental (Figura 12)

Observou-se uma maior PDF nos 5 min após o infarto experimental em todos os animais, independente da dieta utilizada, sem diferenças entre os grupos. Também não se observou diferenças nas pressões entre todos os grupos, independente da dieta utilizada, antes do infarto experimental.

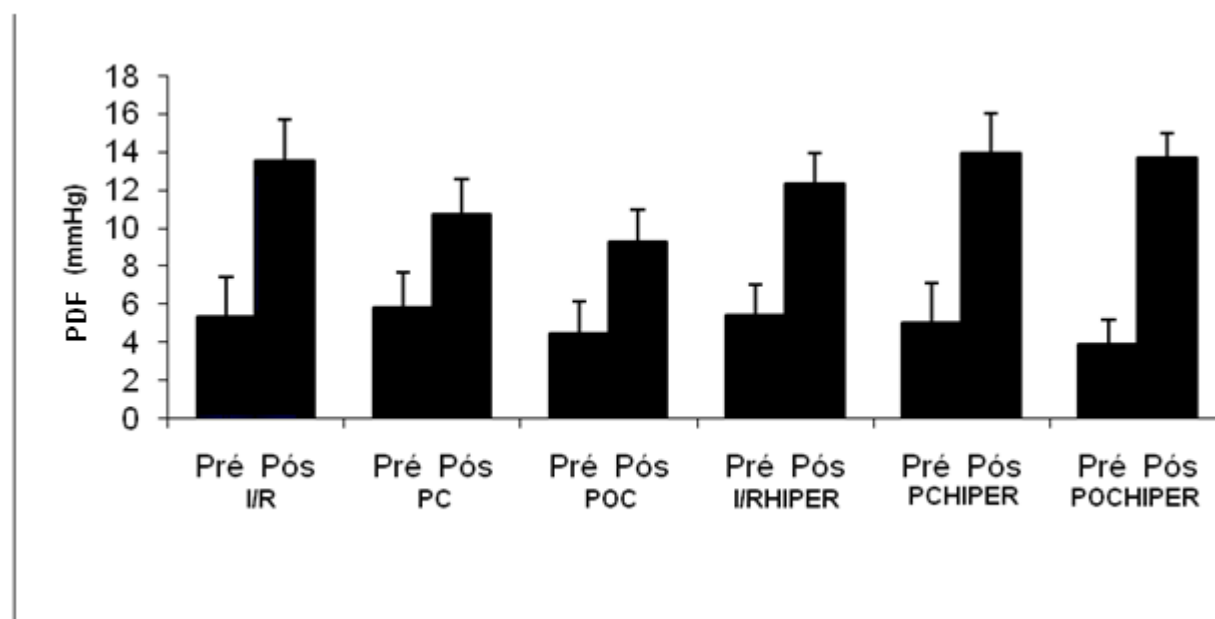


Figura 12. Pressão diastólica final média 5 min antes e depois do infarto do miocárdio experimental em todos os grupos. mmHg, milímetros de mercúrio

Análise de Variância para Medidas Repetidas

H ₀₁	0,171	Os perfis de médias são paralelos
H ₀₂	0,362	Os perfis de médias são coincidentes
H ₀₃	0,000	As médias do momento PRÉ são diferentes do momento PÓS

4. DISCUSSÃO

No cenário do infarto agudo do miocárdio, quando todas as medidas preventivas falham, tornam-se importantes a reperfusão precoce, uma realidade mesmo longe dos grandes centros, e as medidas cardioprotetoras que elicitam mecanismos endógenos inerentes ao miócito, como o pré e o pós-condicionamento isquêmico, a despeito das dificuldades de torná-las aplicáveis na prática, principalmente, o pré-condicionamento.

Em nosso estudo, observou-se nos animais controles um efeito benéfico do pós-condicionamento isquêmico sobre o tamanho do infarto, enquanto no pré-condicionamento, apesar da redução da lesão, não se encontrou diferenças estatísticas em relação ao grupo isquemia/reperfusão isoladamente. Nos animais hipercolesterolêmicos, observou-se a ausência dos efeitos salutares de ambas as formas de cardioproteção. A ADMA elevou-se significativamente somente no grupo PCHIPER, porém não houve correlação entre ela e o tamanho do infarto em nenhum dos grupos.

Uma dieta rica em colesterol a 2%, durante oito semanas, proporcionou um aumento no peso e no CT sérico dos animais (Tabelas 3 e 5). A ausência de diferença estatística na mortalidade entre os grupos (Tabela 2) mostrou que a hipercolesterolemia e o excesso de peso não foram determinantes nos resultados encontrados no que se refere à extensão do dano miocárdico. Em outras palavras, eles, isoladamente, não contribuíram para uma maior mortalidade.

Um grande número de modelos animais de laboratório têm sido testados,¹⁷⁴ como o rato, no qual podemos induzir hipercolesterolemia com dietas ricas em triglicérides e colesterol, com ou sem ácido cólico.¹⁷⁵ Em nossa pesquisa utilizou-se

uma dieta rica em colesterol (a 2%), numa mistura que também continha carboidratos, proteínas, triglicerídeos, ácido fólico, vitaminas e minerais, estes dois últimos de acordo com as recomendações do “American Institute of Nutrition” (AIN-93G).¹⁷⁶

Apesar da diferença observada no nível de CT entre os animais em dieta habitual e aqueles com dieta hipercolesterolêmica (Tabela 5), os níveis absolutos alcançados pelo segundo grupo não foram tão superiores quando comparados aos encontrados por Matos et al.¹⁷⁷ Estes autores usaram componentes dietéticos similares aos nossos e por um mesmo período de tempo. Não encontramos uma explicação clara para tal achado, apesar dos animais hipercolesterolêmicos terem tido seus pesos médios significativamente elevados em todos os grupos (Tabela 3). Sabemos que o rato tem a característica de ser resistente à hipercolesterolemia e aterosclerose experimentais.^{178,179}

Bartus et al.¹⁷⁹ mostram que os ratos, além de serem resistentes à hipercolesterolemia, apresentam resistência à disfunção endotelial induzida por níveis elevados de colesterol, o que não é observado quando os mesmos estão hipertrigliceridêmicos. Estes mesmos autores também mostram a ausência de efeito da hipercolesterolemia sobre a resposta inflamatória.¹⁸⁰ Por outro lado, em um estudo piloto, nosso grupo observou que uma dieta rica em colesterol por 10 semanas, não menos que isso, provocou disfunção endotelial em ratos.¹⁸¹

Dados da literatura mostram uma evidente associação entre a ADMA plasmática e os níveis séricos de colesterol em humanos, principalmente o LDL.¹³¹ Como observou-se em coelhos e macacos, uma dieta rica em colesterol, que produz

aterosclerose experimental, eleva os níveis plasmáticos de ADMA, com consequente disfunção endotelial.^{129,130} Em nosso estudo, a dieta hipercolesterolêmica, por 8 semanas, foi suficiente para elevar os níveis de CT, porém não se observou uma consistente e significativa elevação nos níveis de ADMA (Tabela 7), apesar dos mesmos encontrarem-se em níveis mais elevados do que no grupo controle. Vale ressaltar que não dosamos as frações de colesterol, como o HDL e LDL. Talvez esta última fração não tenha se elevado a níveis suficientes para que possam ter influenciado a ADMA plasmática.

Apenas o grupo hipercolesterolêmico que se submeteu ao protocolo do pré-condicionamento isquêmico (PCHIPER) teve os níveis de ADMA e CT significativamente elevados, quando comparados aos grupos normocolesterolêmicos (Tabelas 5 e 7), um achado relevante de nossa pesquisa, especialmente quando o comparamos com o grupo PC, no qual foi usado o mesmo protocolo de proteção miocárdica. Outros modelos experimentais de elevação da ADMA plasmática são descritos, tais como ratos diabéticos.^{125,135,182} Como a LDL-ox é implicada na elevação da ADMA, através de sua ação sobre a inibição da atividade da DDAH,¹³³ uma alternativa de modelo experimental seria a injeção daquela subfração de lipoproteína modificada com oxidantes nos animais, com a intenção de provocar elevação da ADMA e conseqüente inibição da NOS e disfunção endotelial.

A medida do tamanho do infarto em nosso experimento foi uma porcentagem da área transversa total do ventrículo esquerdo (Figura 9) e não uma porcentagem da área em risco, como bem demonstram Kloner e Dow¹⁸³ quando usam um modelo de avaliação aguda do tamanho do infarto com o trifeniltetrazolium para delimitar o

miocárdio viável dentro da área em risco. Se tivéssemos usado este modelo, talvez obteríamos uma área infartada proporcionalmente maior. O nosso modelo de infarto com reperfusão e sobrevida pode também ter contribuído, de algum modo, para uma menor extensão da lesão miocárdica, a despeito de a reperfusão “per se” contribuir para a necrose do miócito.⁹⁶

O sacrifício dos animais no oitavo dia pós-infarto também pode ter contribuído para uma zona menor de fibrose e menor marcação pelo tricrômio de Masson. No período de tempo utilizado (oito dias), podemos encontrar células ainda vivas, porém inviáveis, e que seriam certamente substituídas por tecido de reparação. Também, o tempo de isquemia letal utilizado, 30 min, talvez não tenha sido suficiente para proporcionar maiores danos aos miócitos. Outros tempos de isquemia letal também são utilizados em estudos que tiveram como objetivo avaliar o tamanho do infarto agudo do miocárdio em ratos.¹⁸³

A hipercolesterolemia não interferiu no tamanho do infarto quando se utilizou somente isquemia e reperfusão (Tabela 9). Observou-se de fato uma menor extensão do mesmo, porém não se constatou significância estatística entre estes dois grupos de mesmo protocolo (I/R e I/RHIPER). O excesso de colesterol, em nosso estudo, pode ter contribuído para uma menor extensão da lesão miocárdica, pelo menos na situação em que se usou apenas isquemia e reperfusão isoladamente. Este achado é comparável ao que mostra Girod et al.¹⁸⁴, ao usarem camundongos com dieta rica em colesterol, entretanto não encontramos explicações óbvias na literatura de tal vantagem da hipercolesterolemia.

Outros autores mostram a influência negativa da hipercolesterolemia sobre a lesão isquemia/reperfusão miocárdica em cobaias.^{71,72} O mesmo é demonstrado em humanos e ratos diabéticos que reproduzem a síndrome metabólica encontrada no homem e associada à disfunção endotelial.^{73,74} Todos os outros grupos hipercolesterolêmicos também não apresentaram uma área de infarto maior, com significância estatística, quando comparados ao normocolesterolêmicos (Tabela 10).

Quando se avaliou os efeitos das medidas cardioprotetoras nos grupos com dieta habitual (Tabela 9), observou-se um significativo tamanho menor do infarto no grupo submetido ao pós-condicionamento isquêmico (POC). O mesmo não se observou no grupo submetido ao infarto com pré-condicionamento isquêmico (PC). Neste último, o tamanho médio do infarto foi menor, porém sem atingir significância estatística (Tabela 10), todavia, quando comparado ao grupo I/R, observamos uma tendência de benefício desta forma de cardioproteção nestes animais. Nossos achados são comparáveis ao encontrado na literatura, que mostra a extensão dos benefícios destes fenômenos cardioprotetores a várias espécies, além do ser humano, estando os roedores incluídos.¹⁸³

Nos animais hipercolesterolêmicos, não se observou os efeitos salutaros do pré e pós-condicionamento, com a extensão do dano miocárdico nos mesmos sendo até maior quando comparados aos submetidos somente à isquemia e reperfusão, porém sem significância estatística (Tabelas 9 e 10). Este fato também é observado no homem e está correlacionado com os níveis aumentados de CT e LDL.⁸³ Contrapondo-se aos nossos resultados e aos da literatura, há relatos de ausência de influência

negativa da hiperlipidemia no efeito benéfico do pré-condicionamento miocárdico clássico sobre o coração de animais.⁸⁴⁻⁸⁷

Compartilhamos a opinião de Ferdinandy et al.⁷⁷ que, ao analisarem tais contradições, afirmam que, em alguns modelos animais de aterosclerose, observa-se uma disfunção hepática importante que altera a fisiopatologia complexa da dislipidemia que pode interferir nos mecanismos intrínsecos da cardioproteção, abolindo-a, uma explicação para nossos achados. Por outro lado, sabemos da resistência do rato para aterosclerose e para uma dislipidemia mais acentuada, fato observado em nosso experimento, e, seguindo este raciocínio, esperávamos uma ação benéfica sobre o tamanho do infarto nos ratos hipercolesterolêmicos submetidos ao pré-condicionamento miocárdico isquêmico clássico.

A observação de que o pós-condicionamento isquêmico do miocárdio também não atuou em nossos animais hipercolesterolêmicos contribui para alimentar a controvérsia encontrada na literatura. Existem autores que relatam resultados similares ao nosso, nos quais o dano tecidual não foi menor em animais hipercolesterolêmicos submetidos a esta mais recente forma de reperfusão modificada, que é cardioprotetora.^{85,93} Todavia, também encontramos uma redução do tamanho do infarto em animais hipercolesterolêmicos submetidos ao pós-condicionamento miocárdico isquêmico.⁹⁵

Vários autores, que mostram resultados similares ao nosso, propõem teorias que procuram explicar a ausência da cardioproteção em animais hipercolesterolêmicos,⁷⁸⁻⁸¹ dentre elas temos a reduzida biodisponibilidade do NO, que

pode ter contribuído para a ausência dos efeitos benéficos do pré e pós-condicionamento isquêmico do miocárdio aplicados nos mesmos, resultado encontrado no nosso experimento. No pré-condicionamento miocárdio tardio, seu papel está bem descrito,¹⁰⁶ entretanto, sua importância na forma clássica enseja ainda algumas discussões.¹⁰⁵ Em relação ao pós-condicionamento miocárdico, também encontramos evidências do NO no mecanismo cardioprotetor intrínseco,¹⁰⁸ onde a importância dele foi evidenciada.⁹⁴

A baixa biodisponibilidade do NO na hipercolesterolemia pode ocorrer às custas do aumento na ADMA. Os níveis de ADMA plasmática não apresentaram diferenças significativas entre os grupos normocolesterolêmicos, nos quais os valores encontrados estavam dentro da faixa de normalidade para o método utilizado,¹⁴⁸ um resultado já esperado (Tabela 7). Os valores médios nos grupos hipercolesterolêmicos, apesar de mais elevados, foram semelhantes, também sem diferença estatística.

Na comparação entre os animais em dieta habitual e hipercolesterolêmica de mesmo protocolo, somente no grupo PCHIPER a ADMA elevou-se de maneira significativa quando comparada aos animais em dieta habitual (Tabela 8), especialmente o grupo PC. É interessante notar que neste grupo foi observado um infarto do miocárdio de tamanho maior, constatação esta que pode nos levar a inferir que a ADMA elevada e consequente reduzida disponibilidade de NO contribuíram para uma maior quantidade de necrose miocárdica. Por outro lado, esta observação ocorreu somente neste grupo, e não se repetiu nos demais com dieta rica em colesterol.

A implicação da elevação da ADMA e, indiretamente, o bloqueio da NOSe é uma hipótese, na nossa concepção, bastante razoável para a ausência dos efeitos benéficos tanto do pré como do pós-condicionamento miocárdico. Como bem relatam Vegh et al.¹⁶⁸ e Penna et al.¹⁶⁹, a infusão de L-NAME aboliu a ação do pré-condicionamento miocárdico clássico e do pós-condicionamento miocárdico. Sabemos da importância do NO no mecanismo intrínseco das formas de cardioproteção aqui estudadas, principalmente no pré-condicionamento miocárdico tardio, com menores implicações na forma clássica e no pós-condicionamento miocárdico. Porém existem ainda controvérsias na literatura, e este papel do NO ainda não está estabelecido definitivamente.

Não encontramos correlação entre os níveis de ADMA plasmática e o tamanho do infarto do miocárdio quando comparamos todos os grupos independentemente, ou somente os animais normocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos entre si ou quando agrupamos todos os animais, independentemente da dieta a que foram submetidos. Tal achado contraria nossa hipótese de que a ADMA é um marcador de maior dano miocárdico e responsável pela ausência da cardioproteção observada nos animais hipercolesterolêmicos. Mais pesquisas básicas serão necessárias, talvez usando um modelo animal mais adequado de disfunção endotelial associada a níveis patológicos deste inibidor da NOS. Uma alternativa será mostrar uma ação direta da ADMA, infundindo-a no animal, no momento da isquemia e reperfusão, com e sem as medidas cardioprotetoras aqui estudadas.

Na correlação entre CT e ADMA, quando se observou todos os animais conjuntamente, encontramos uma correlação positiva com significância estatística, o

que prova que a hipercolesterolemia realmente contribui para aumentar a ADMA plasmática, como mostrou nosso estudo. Porém, na análise grupo a grupo, esta correlação não se mostrou sempre positiva e significativa, talvez porque o número de animais de cada grupo não foi suficiente para demonstrar esta relação.

Ao se correlacionar CT e tamanho do infarto, não se observou nenhuma influência entre estas duas variáveis. Tal fato nos mostra que a hipercolesterolemia “per se” não é capaz de ser um marcador de pior ou melhor prognóstico na situação de infarto agudo do miocárdio, porém ficou evidente que a mesma pode abolir, mesmo que indiretamente, os efeitos salutares do pré e pós-condicionamento isquêmico do miocárdio. Entretanto, na isquemia e reperfusão isoladas, nossos achados foram surpreendentes, o que contribuirá para ampliarmos a discussão da hipercolesterolemia no cenário do infarto agudo do miocárdio.

A avaliação da extensão do infarto também foi realizada através da análise da PDF dos animais 5 min antes do protocolo isquêmico e 5 min após o mesmo (Figura 12). A ausência de diferença entre os grupos no momento pré-infarto revela uma uniformização da técnica em todos os animais, que se encontravam naquele momento em condições hemodinâmicas iguais, onde se deduz não ter havido situações que possam ter interferido no tamanho do infarto quando comparamos os animais nos diferentes grupos. Aos cinco minutos pós-infarto, também não encontramos diferenças significativas nas pressões de enchimento ventricular esquerdas, talvez pelo fato de o tamanho dos infartos ter sido semelhante entre os grupos, com exceção do grupo POC. A PDF em cada grupo elevou-se de maneira significativa quando comparamos os momentos pré e pós-infarto, servindo de referência para a eficácia da técnica.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo, de acordo com os resultados apresentados, levou-nos às seguintes conclusões:

1. A hipercolesterolemia nos ratos aboliu o efeito benéfico sobre o dano miocárdico do pré e pós-condicionamento isquêmico;
2. Os níveis sanguíneos de colesterol total e ADMA não se correlacionaram com o tamanho do infarto agudo do miocárdio nos ratos com dieta habitual e hipercolesterolêmica, submetidos à isquemia e reperfusão associados com pré e pós-condicionamento isquêmico;

6. REFERÊNCIAS

1. Maroko PR, Kjekshus JK, Sobel BE, Watanabe T, Covell JW, Ross J Jr, Braunwald E. *Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions.* Circulation. 1971;43(1):67-82.
2. Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. *Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs.* J Clin Invest. 1975;56(4):978-85.
3. Rahimtoola SH. *A perspective on the three large multicenter randomized clinical trials of coronary bypass surgery for chronic stable angina.* Circulation. 1985;72(6 Pt 2): V123-V35.
4. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.* Circulation. 1986;74(5):1124-36.
5. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion.* Circulation. 1993;87(3):893-9.
6. Yellon DM, Downey JM. *Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology.* Physiol Rev. 2003;83(4):1113-51.
7. Yellon DM, Baxter GF. *A "second window of protection" or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection?* J Mol Cell Cardiol. 1995;27(4): 1023-34.
8. Costa AD, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, Critz SD. *Protein Kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria.* Circ Res. 2005;97(4):329-36.

9. Jaburek M, Costa AD, Burton JR, Costa CL, Garlid KD. *Mitochondrial PKC epsilon and mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel copurify and coreconstitute to form a functioning signaling module in proteoliposomes.* Circ Res. 2006;99(8):878-83.
10. Andrukhiv A, Costa AD, West IC, Garlid KD. *Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;291(5):H2067-74.
11. Costa AD, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC, Garlid KD. *The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition.* J Biol Chem. 2006;281(30):20801-8.
12. Hausenloy DJ, Yellon DM. *The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion.* J Mol Cell Cardiol. 2003;35(4):339-41.
13. Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, Halestrap AP. *Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart.* J Physiol. 2003;549(Pt 2):513-24.
14. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu M, Yellon DM. *Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005;288(2): H971-6.
15. Krieg T, Qin Q, Philipp S, Alexeyev MF, Cohen MV, Downey JM. *Acetylcholine and bradykinin trigger preconditioning in the heart through a pathway that includes Akt and NOS.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004;287(6):H2606-11.
16. Gross ER, Gross GJ. *Ischemic Preconditioning And Myocardial Infarction: An Update and Perspective.* Drug Discov Today Dis Mech. 2007;4(3):165-74.

17. Penna C, Mognetti B, Tullio F, Gattullo D, Mancardi D, Pagliaro P, Alloatti G. *The platelet activating factor triggers preconditioning-like cardioprotective effect via mitochondrial K-ATP channels and redox –sensible signaling.* J Physiol Pharmacol. 2008;59(1):47-54.
18. Miyamae M, Camacho SA, Zhou HZ, Diamond I, Figueredo VM. *Alcohol consumption reduces ischemia-reperfusion injury by species-specific signaling in guinea pigs and rats.* Am J Physiol. 1998;275(1 Pt 2):H50-6.
19. Sharma A, Singh M. *Possible mechanism of cardioprotective effect of angiotensin preconditioning in isolated rat heart.* Eur J Pharmacol. 2000;406(1):85-92.
20. Parikh V, Singh M. *Possible role cardiac mast cells norepinephrine-induced myocardial preconditioning.* Methods Find Exp Clin Pharmacol. 1999;21(4): 269-74.
21. Dawn B, Bolli R. *Role of nitric oxide in myocardial preconditioning.* Ann N Y Acad Sci. 2002;962:18-41.
22. Hoshida S, Yamashita N, Otsu K, Hori M. *The importance of manganese superoxide dismutase in delayed preconditioning: involvement of reactive oxygen species and cytokines.* Cardiovasc Res. 2002;55(3):495-505.
23. Zhao TC, Kukreja RC. *Late preconditioning elicited by activation of adenosine A(3) receptor in heart: role of NF-kappa B, iNOS and mitochondrial K(ATP) channel.* J Mol Cell Cardiol. 2002;34(3):263-77.
24. Shinmura K, Xuan YT, Tang XL, Kodani E, Han H, Zhu Y, Bolli R. *Inducible nitric oxide synthase modulates cyclooxygenase-2 activity in the heart of conscious rabbits during the late phase of ischemic preconditioning.* Circ Res. 2002;90(5):602-8.

25. Shinmura K, Bolli R, Liu SQ, Tang XL, Kodani E, Xuan YT, Srivastava S, Bhatnagar A. *Aldose reductase is an obligatory mediator of the late phase of ischemic preconditioning*. *Circ Res*. 2002;91(3):240-6.
26. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. *Cardiac stress protein elevation 24h after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction*. *Circulation*. 1993;88(3):1264-72.
27. McLeod CJ, Aziz A, Hoyt RF Jr, McCoy JP Jr, Sack MN. *Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia*. *J Biol. Chem*. 2005;280(39):33470-6.
28. Hill M, Takano H, Tang XL, Kodani E, Shirk G, Bolli R. *Nitroglycerin induces late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits despite development of nitrate tolerance*. *Circulation*. 2001;104(6):694-9.
29. Jones SP, Gibson MF, Rimmer DM 3rd, Gibson TM, Sharp BR, Lefer DJ. *Direct vascular and cardioprotective effects of rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor*. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(6):1172-8.
30. Ockaili R, Salloum F, Hawkins J, Kukreja RC. *Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(3):H1263-9.
31. Yang B, Li D, Phillips MI, Mehta P, Mehta JL. *Myocardial angiotensin II receptor expression and ischemia–reperfusion injury*. *Vasc Med*. 1998;3(2):121-30.
32. Yang XP, Liu YH, Shesely EG, Bulagannawar M, Liu F, Carretero OA. *Endothelial nitric oxide gene knockout mice: cardiac phenotypes and the effect of angiotensin-*

converting enzyme inhibitor on myocardial ischemia/reperfusion injury. Hypertension. 1999;34(1):24-30.

33. Hattori R, Otani H, Maulik N, Das DK. *Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002;282(6):H1988-95.
34. Akita Y, Otani H, Matsuhisa S, Kyo S, Enoki C, Hattori R, Imamura H, Kamihata H, Kimura Y, Iwasaka T. *Exercise-induced activation of cardiac sympathetic nerve triggers cardioprotection via redox-sensitive activation of eNOS and upregulation of iNOS.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;292(5):H2051-9.
35. Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M, Frndova H, Li J, Holtby HM, Cox PN, Smallhorn JF, Van Arsdell GS, Redington AN. *Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans.* J Am Coll Cardiol. 2006;47(11): 2277-82.
36. Airaksinen KE, Huikuri HV. *Antiarrhythmic effects of repeated coronary occlusion during balloon angioplasty.* J Am Coll Cardiol. 1997;29(5):1035-8.
37. Eltchaninoff H, Cribier A, Tron C, Derumeaux G, Koning R, Hecketsweiller B, Letac B. *Adaptation to myocardial ischemia during coronary angioplasty demonstrated by clinical, electrocardiographic, echocardiographic and metabolic parameters.* Am Heart J. 1997;133(4):490-6.
38. Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM, Kemp M, Hooper J, Yellon DM. *Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery.* Heart. 1997;77(4):314-8.

39. Leesar MA, Stoddard MF, Manchikalapudi S, Bolli R. *Bradykinin-induced preconditioning in patients undergoing coronary angioplasty*. J Am Coll Cardiol. 1999; 34(3):639-50.
40. Leesar MA, Stoddard MF, Xuan YT, Tang XL, Bolli R. *Nonelectrocardiographic evidence that both ischemic preconditioning exist in humans*. J Am Coll Cardiol. 2003; 42(3):437-45.
41. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003;285(2):H579-88.
42. Na HS, Kim YI, Yoon YW, Han HC, Nahm SH, Hong SK. *Ventricular premature beat-driven intermittent restoration of coronary blood flow reduces the incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation in a cat model of regional ischemia*. Am Heart J. 1996;132(1 Pt 1):78-83.
43. Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV. *Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways*. J Am Coll Cardiol. 2004;44(5):1103-10.
44. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J. *Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion*. Cardiovasc Res. 2004;62(1):74-85.
45. Ma XJ, Zhang XH, Luo M, Li CM, Shao JH. *Effects of preconditioning and postconditioning on emergency percutaneous coronary intervention in patients with*

- acute myocardial infarction*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2007;87(2):114-7. [Abstract, MEDLINE 2007].
46. Yellon DM, Hausenloy DJ. *Realizing the clinical potential of ischemic preconditioning and postconditioning*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2005;2(11):568-75.
47. Sun HY, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen, Zhao ZQ. *Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005;288(4):H1900-8.
48. Philipp S, Yang XM, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV. *Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade*. Cardiovasc Res. 2006;70(2):308-14.
49. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. *Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway*. Circ Res. 2004;95(3):230-2.
50. Darling CE, Jiang R, Maynard M, Whittaker P, Vinten-Johansen J, Przyklenk K. *'Postconditioning' via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK 1/2*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005;289(4):H1618-26.
51. Galagudza M, Kurapeev D, Minasian S, Valen G, Vaage J. *Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm*. Eur J Cardiothorac Surg. 2004;25(6):1006-10.
52. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raissy O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. *Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition*. Circulation. 2005;111(2): 194-7.

53. Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. *The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning*. Trends Cardiovasc Med. 2005;15(2):69-75.
54. Tsang A, Hausenloy DJ, Yellon DM. *Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005;289(1):H2-7.
55. Suleman N, Somers S, Smith R, Opie LH, Lecour SC. *Dual activation of STAT-3 and AKT is required during the trigger phase of ischaemic preconditioning*. Cardiovasc Res. 2008;79(1):127-33.
56. Downey JM, Cohen MV. *A really radical observation-a comment on Penna et al. in Basic Res Cardiol (2006) 101:180-189*. Basic Res Cardiol. 2006;101(2):190-1.
57. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, Losano G, Pagliaro P. *Postconditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation*. Basic Res Cardiol. 2006;101(2):180-9.
58. Cohen MV, Yang XM, Downey JM. *The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis*. Circulation. 2007;115(14):1895-903.
59. Jonassen AK, Sack MN, Mjos OD, Yellon DM. *Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 Kinase cell-survival signaling*. Circ Res. 2001;89(12):1191-8.
60. Mehta SR, Yusuf S, Diaz R, Zhu J, Pais P, Xavier D, Paolasso E, Ahmed R, Xie C, Kazmi K, Tai J, Orlandini A, Pogue J, Liu L; CREATE-ECLA Trial Group Investigators. *Effect of glucose-insulin-potassium infusion on mortality in patients*

- with acute ST-segment elevation myocardial infarction: the CREATE-ECLA randomized controlled trial.* JAMA. 2005;293(4):437-46.
61. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Rütther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sirén AL. *Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial.* Mol Med. 2002;8(8):495-505.
62. Chen Z, Li T, Zhang B. *Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts.* J Surg Res. 2008;145(2):287-94.
63. Gomez L, Li B, Mewton N, Sanchez I, Piot C, Elbaz M, Ovize M. *Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: translation to patients.* Cardiovasc Res. 2009;83(2):226-33.
64. Obal D, Scharbatke H, Barthel H, Preckel B, Müllenheim J, Schlack W. *Cardioprotection against reperfusion injury is maximal with only two minutes of sevoflurane administration in rats.* Can J Anaesth. 2003;50(9):940-5.
65. Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Scharbatke H, Preckel B, Schlack W. *The influence of mitochondrial KATP-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo.* Anesth Analg. 2005;101(5): 1252-60.
66. Kerendi F, Kin H, Halkos ME, Jiang R, Zatta AJ, Zhao ZQ, Guyton RA, Vinten-Johansen J. *Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors.* Basic Res Cardiol. 2005;100(5):404-12.

67. Laskey WK. *Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study.* Catheter Cardiovasc Interv. 2005;65(3):361-7.
68. Li CM, Zhang XH, Ma XJ, Luo M. *Limb ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia-reperfusion injury.* Scand Cardiovasc J. 2006;40(5):312-7.
69. Andreka G, Vertesaljai M, Szantho G, Font G, Piroth Z, Fontos G, Juhasz ED, Szekely L, Szelid Z, Turner MS, Ashrafian H, Frenneaux MP, Andreka P. *Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pig.* Heart. 2007;93(6):749-52.
70. Venter H, Genade S, Mouton R, Huisamen B, Harper IS, Lochner A. *Myocardial membrane cholesterol: effects of ischaemia.* J Mol Cell Cardiol. 1991;23(11):1271-86.
71. Golino P, Maroko PR, Carew TE. *The effect of acute hypercholesterolemia on myocardial infarct size and the no-reflow phenomenon during coronary occlusion-reperfusion.* Circulation. 1987;75(1):292-8.
72. Szilvassy Z, Ferdinandy P, Szilvassy J, Nagy I, Karcsu S, Lonovics J, Dux L, Koltai M. *The loss of pacing-induced preconditioning in atherosclerotic rabbits: role of hypercholesterolemia.* J Mol Cell Cardiol. 1995;27(12):2559-69.
73. Hoshida S, Yamashita N, Otsu K, Kuzuya T, Hori M. *Cholesterol feeding exacerbates myocardial injury in Zucker diabetic fatty rats.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000;278(1):H256-H62.

74. Ungi I, Ungi T, Ruzsa Z, Nagy E, Zimmermann Z, Csont T, Ferdinandy P. *Hypercholesterolemia attenuates the anti-ischemic effect of preconditioning during coronary angioplasty*. Chest. 2005;128(3):1623-8.
75. Ferdinandy P, Szilvassy Z, Horvath LI, Csont T, Csonka C, Nagy E, Szentgyörgyi R, Nagy I, Koltai M, Dux L. *Loss of pacing-induced preconditioning in rat hearts: role of nitric oxide and cholesterol-enriched diet*. J Mol Cell Cardiol. 1997;29(12):3321-33.
76. Ferdinandy P, Csonka C, Csont T, Szilvassy Z, Dux L. *Rapid pacing-induced preconditioning is recaptured by farnesol treatment in hearts of cholesterol-fed rats: role of polyprenyl-derivatives and nitric oxide*. Mol Cell Biochem. 1998;186(1-2):27-34.
77. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. *Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning*. Pharmacol Rev. 2007;59(4):418-58.
78. Ferdinandy P, Schulz R. *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning*. Br J Pharmacol. 2003;138(4):532-43.
79. Giricz Z, Lalu MM, Csonka C, Bencsik P, Schulz R, Ferdinandy P. *Hyperlipidemia attenuates the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning: role of matrix metalloproteinase-2 inhibition*. J Pharmacol Exp Ther. 2006;316(1):154-61.
80. Ueda Y, Kitakaze M, Komamura K, Minamino T, Asanuma H, Sato H, Kuzuya T, Takeda H, Hori M. *Pravastatin restored the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning blunted by hypercholesterolemia in the rabbit model of myocardial infarct*. J Am Coll Cardiol. 1999;34(7):2120-5.

81. Wang TD, Chen WJ, Mau TJ, Lin JW, Lin WW, Lee YT. *Attenuation of increased myocardial ischemia-reperfusion injury conferred by hypercholesterolemia through pharmacological inhibition of the caspase-1 cascade.* Br J Pharmacol . 2003;138(2):291-300.
82. Csont T, Balogh G, Csonka C, Boros I, Horváth I, Vigh L, Ferdinandy P. *Hyperlipidemia induced by high cholesterol diet inhibits heat shock response in rat hearts.* Biochem Biophys Res Commun. 2002;290(5):1535-8.
83. Kyriakides ZS, Psychari S, Iliodromitis EK, Kolettis TM, Sbarouni E, Kremastinos DT. *Hyperlipidemia prevents the expected reduction of myocardial ischemia on repeated balloon inflations during angioplasty.* Chest. 2002;121(4):1211-5.
84. Kremastinos, DT, Bofilis E, Karavolias GK, Papalois A, Kaklamanis L, Iliodromitis EK. *Preconditioning limits myocardial infarct size in hypercholesterolemic rabbits.* Atherosclerosis. 2000;150(1):81-9.
85. Iliodromitis EK, Zoga A, Vrettou A, Andreadou I, Paraskevaidis IA, Kaklamanis L, Kremastinos DT. *The effectiveness of postconditioning and preconditioning on infarct size in hypercholesterolemic and normal anesthetized rabbits.* Atherosclerosis. 2006;188(2):356-62.
86. Jung O, Jung W, Malinski T, Wiemer G, Schoelkens BA, Linz W. *Ischemic preconditioning and infarct mass: the effect of hypercholesterolemia and endothelial dysfunction.* Clin Exp Hypertens. 2000;22(2):165-79.
87. Li G, Tokuno S, Tähep IdP, Vaage J, Löwbeer C, Valen G. *Preconditioning protects the severely atherosclerotic mouse heart.* Ann Thorac Surg. 2001;71(4):1296-303.

88. Tang XL, Stein AB, Shirk G, Bolli R. *Hypercholesterolemia blunts NO donor-induced late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits*. Basic Res Cardiol. 2004;99(6):395-403.
89. Szekeres, L, Szilvássy Z, Ferdinandy P, Nagy I, Karcsu S, Csáti S. *Delayed cardiac protection against harmful consequences of stress can be induced in experimental atherosclerosis in rabbits*. J Mol Cell Cardiol. 1997;29(7):1977-83.
90. Tang XL, Takano H, Xuan YT, Sato H, Kodani E, Dawn B, Zhu Y, Shirk G, Wu WJ, Bolli R. *Hypercholesterolemia abrogates late preconditioning via a tetrahydrobiopterin-dependent mechanism in conscious rabbits*. Circulation. 2005;112(14):2149-56.
91. Tang XL, Stein AB, Shirk G, Bolli R. *Hypercholesterolemia blunts NO donor-induced late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits*. Basic Res Cardiol. 2004;99(6):395-403.
92. Kocsis GF, Pipis J, Fekete V, Kovács-Simon A, Odendaal L, Molnár E, Giricz Z, Janáky T, van Rooyen J, Csont T, Ferdinandy P. *Lovastatin interferes with the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning and postconditioning in rat hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;294(5):H2406-9.
93. Kupai K, Csonka C, Benesik P, Fodor G, Csont T, Ferdinandy P. *The cardioprotective effect of postconditioning is lost in cholesterol diet-induced hyperlipidemia in rats*. J Mol Cell Cardiol. 2006;40:976-7. [abstract. MEDLINE 2006].
94. Zhao JL, Yang YJ, You SJ, Cui CJ, Gao RL. *Different effects of postconditioning on myocardial no-reflow in the normal and hypercholesterolemic mini-swines*. Microvasc Res. 2007;73(2):137-42.

95. Donato M, D'Annunzio V, Berg G, Gonzalez G, Schreier L, Morales C, Wikinski RL, Gelpi RJ. *Ischemic postconditioning reduces infarct size by activation of A1 receptors and K⁺(ATP) channels in both normal and hypercholesterolemic rabbits.* J Cardiovasc Pharmacol. 2007;49(5):287-92.
96. Lefer AM, Weyrich AS, Buerke M. *Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischaemia-reperfusion injury.* Cardiovasc Res. 1994;28(3):289-94.
97. Jones SP, Girod WG, Palazzo AJ, Granger DN, Grisham MB, Jourd'Heuil D, Huang PL, Lefer DJ. *Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in absence of endothelial cell nitric oxide synthase.* Am J Physiol. 1999;276(5 Pt 2):H1567-73.
98. Jones SP, Greer JJ, Kakkar AK, Ware PD, Turnage RH, Hicks M, van Haperen R, de Crom R, Kawashima S, Yokoyama M, Lefer DJ. *Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004;286(1):H276-82.
99. Moncada S, Erusalimsky JD. *Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis?* Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3(3):214-20.
100. Giuffre A, Sarti P, D'Itri E, Buse G, Soulimane T, Brunori M. *On the mechanism of inhibition of cytochrome c oxidase by nitric oxide.* J Biol Chem. 1996;271(52):33404-8.
101. Burwell LS, Brookes PS. *Mitochondria as a target for the cardioprotective effects of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury.* Antioxid Redox Signal. 2008;10(3):579-99.
102. Costa AD, Garlid KD. *Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS and MPT.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;295(2):H874-82.

103. West MB, Rokosh G, Clark D, Liu S, Guo Y, Bolli R, et al. *Nitric oxide prevents mitochondrial permeability transition during ischemia-reperfusion: implications for the cardioprotective effects of late preconditioning.* Circulation. 2004;110:III236.
104. Wang G, Liem DA, Vondriska TM, Honda HM, Korge P, Pantaleon DM, Qiao X, Wang Y, Weiss JN, Ping P. *Nitric oxide donors protect murine myocardium against infarction via modulation of mitochondrial permeability transition.* American Journal of Physiol Heart Circ Physiol. 2005;288(3):H1290-5.
105. Nakano A, Liu GS, Heusch G, Downey JM, Cohen MV. *Exogenous nitric oxide can trigger a preconditioned state through a free radical mechanism, but endogenous nitric oxide is not a trigger of classical ischemic preconditioning.* J Mol Cell Cardiol. 2000;32(7):1159-67.
106. Bolli R, Dawn B, Tang XL, Qiu Y, Ping P, Xuan YT, Jones WK, Takano H, Guo Y. *The nitric oxide hypothesis of late preconditioning.* Basic Res Cardiol. 1998;93(5):325-38.
107. West MB, Rokosh G, Obal D, Velayutham M, Xuan YT, Hill BG, Keith RJ, Schrader J, Guo Y, Conklin DJ, Prabhu SD, Zweier JL, Bolli R, Bhatnagar A. *Cardiac myocyte-specific expression of inducible nitric oxide synthase protects against ischemia/reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition.* Circulation. 2008;118(19):1970-8.
108. Martin C, Schulz R, Post H, Boengler K, Kelm M, Kleinbongard P, Gres P, Skyschally A, Konietzka I, Heusch G. *Microdialysis-based analysis of interstitial NO in situ : NO synthase-independent NO formation during myocardial ischemia.* Cardiovasc Res. 2007;74(1):46-55.

109. Yang XM, Philipp S, Downey JM, Cohen MV. *Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation.* Basic Res Cardiol. 2005;100(1):57-63.
110. Scalia R, Gooszen ME, Jones SP, Hoffmeyer M, Rimmer DM 3rd, Trocha SD, Huang PL, Smith MB, Lefer AM, Lefer DJ. *Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice.* Circulation. 2001;103(21):2598-603.
111. Jones SP, Teshima Y, Akao M, Marban E. *Simvastatin attenuates oxidant-induced mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes.* Circ Res. 2003;93(8):697-9.
112. Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, Kitakase M, Liao JK. *Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy.* J Clin Invest. 2001;108(10):1429-37.
113. Salloum F, Yin C, Xi L, Kukreja RC. *Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart.* Circ Res. 2003;92(6):595-7.
114. Li Q, Guo Y, Xuan YT, Lowenstein CJ, Stevenson SC, Prabhu SD, Wu WJ, Zhu Y, Bolli R. *Gene therapy with inducible nitric oxide synthase protects against myocardial infarction via a cyclooxygenase-2-dependent mechanism.* Circ Res. 2003;92(7):741-8.
115. Li QH, Guo Y, Tan W, Stevenson SC, Lowenstein CJ, Wu WJ, et al. *Long-term effects of gene therapy with inducible nitric oxide synthase on myocardial infarct size.* Circulation. 2003;108:IV92.

116. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. *Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure.* Lancet.1992;339 (8793):572-5.
117. Wada K, Inoue K, Hagiwara M. *Identification of methylated proteins by protein arginine N-methyltransferase 1, PRMT 1, with a new expression cloning strategy.* Biochim Biophys Acta. 2002;1591(1-3):1-10.
118. Pou S, Keaton L, Surichamorn W, Rosen GM. *Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric oxide synthase.* J Biol Chem.1999;274(14):9573-80.
119. Gardiner SM, Kemp PA, Bennett T, Palmer RM, Moncada S. *Regional and cardiac haemodynamic effects of NG, NG, dimethyl-L-arginine and their reversibility by vasodilators in conscious rats.* Br J Pharmacol.1993;110(4):1457-64.
120. Suda O, Tsutsui M, Morishita T, Tasaki H, Ueno S, Nakata S, Tsujimoto T, Toyohira Y, Hayashida Y, Sasaguri Y, Ueta Y, Nakashima Y, Yanagihara N. *Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: involvement of renin-angiotensin system and oxidative stress.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24(9):1682-8.
121. Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, Forstermann U. *Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y^+ carrier hCAT-2B.* Nitric Oxide. 1997;1(1):65-73.
122. Ogawa T, Kimoto M, Watanabe H, Sasaoka K. *Metabolism of NG,NG-and dimethylarginine and NG, N'G-dimethylarginine in rats.* Arch Biochem Biophys. 1987;252(2):526-37.

123. Leiper J, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister R, Charles IG, Whitley GS, Vallance P. *Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology to microbial arginine deiminases.* Biochem J. 1999;343 Pt 1:209-14.
124. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. *Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase.* Circulation. 1999;99(24):3092-5.
125. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP. *Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase.* Circulation. 2002;106(8):987-92.
126. Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. *Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine.* Circulation. 2001;104(21):2569-75.
127. Hattori Y, Kasai K, Gross SS. *Cationic amino acid transporter gene expression in cultured vascular smooth muscle cells and in rats.* Am J Physiol. 1999;276(6 Pt 2):H2020-8.
128. Kimoto M, Whitley GS, Tsuji H, Ogawa T. *Detection of NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in human tissues using a monoclonal antibody.* J Biochem. 1995;117(2):237-8.
129. Yu XJ, Li YJ, Xiong Y. *Increase of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in serum of high cholesterol fed rabbits.* Life Sci. 1994;54(12):753-8.

130. Böger RH, Bode-Böger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR. *Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(6):1557-64.
131. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. *Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia.* Circulation. 1998;98(18):1842-7.
132. Päivä H, Laakso J, Lehtimäki T, Isomustajärvi M, Ruokonen I, Laaksonen R. *Effect of high-dose statin treatment on plasma concentrations of endogenous nitric oxide synthase inhibitors.* J Cardiovasc Pharmacol. 2003;41(2):219-22.
133. Smirnova IV, Sawamura T, Goligorsky MS. *Upregulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in endothelial cells by nitric oxide deficiency.* Am J Physiol Renal Physiol. 2004;287(1):F25-32.
134. Teerlink T. *Measurement of asymmetric dimethylarginine in plasma: methodological considerations and clinical relevance.* Clin Chem Lab Med. 2005;43(10):1130-8.
135. Päivä H, Lehtimäki T, Laakso J, Ruokonen I, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Laaksonen R. *Plasma concentrations of asymmetric-dimethyl-arginine in type 2 diabetes associate with glycemic control and glomerular filtration rate but not with risk factors of vasculopathy.* Metabolism. 2003;52(3):303-7.
136. Mittermayer F, Mayer BX, Meyer A, Winzer C, Pacini G, Wagner OF, Wolzt M, Kautzky-Willer A. *Circulating concentrations of asymmetrical dimethyl-L-arginine are*

- increased in women with previous gestational diabetes.* Diabetologia. 2002;45(10):1372-8.
137. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. *Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23(8):1455-9.
138. Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmer HE. *Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension.* J Cardiovasc Pharmacol. 2001;37(4):489-92.
139. Kielstein JT, Böde-Böger SM, Hesse G, Martens-Lobenhoffer J, Takacs A, Fliser D, Hoepfer MM. *Asymmetrical dimethylarginine in idiopathic pulmonary arterial hypertension.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25(7):1414-8.
140. Savvidou M, Hingorani A, Tsikas D, Frolich J, Vallance P, Nicolaidis K. *Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently developed pre-eclampsia.* Lancet. 2003;361(9368): 1511- 7.
141. Schulze F, Lenzen H, Hanefeld C, Bartling A, Osterziel KJ, Goudeva L, Schmidt-Lucke C, Kusus M, Maas R, Schwedhelm E, Strödter D, Simon BC, Mügge A, Daniel WG, Tillmanns H, Maisch B, Streichert T, Böger RH. *Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study.* Am Heart J. 2006;152(3):493:e1-8.

142. Paik WK, Kim S. *Omega-N-methylarginine in protein*. J Biol Chem. 1970;245(1):88-92.
143. Teerlink T, Nijveldt RJ, de Jong S, van Leeuwen PA. *Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography*. Anal Biochem. 2002;303(2):131-7.
144. Abe T, Tohgi H, Murata T, Isobe C, Sato C. *Reduction in asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease*. Neurosci Lett. 2001;312(3):177-9.
145. Vishwanathan K, Tackett RL, Stewart JT, Bartlett MG. *Determination of arginine and methylated arginines in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2000;748(1):157-66.
146. Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, Böger RH. *Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay*. Clin Chem Lab Med. 2004;42(12):1377-83.
147. Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Creutzig A, Alexander K, Frölich JC. *Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease*. J Am Coll Cardiol. 1998;32(5):1336-44.
148. Lu TM, Ding YA, Leu HB, Yin WH, Sheu WH, Chu KM. *Effect of rosuvastatin on plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with hypercholesterolemia*. Am J Cardiol. 2004;94(2):157-61.

149. Yin QF, Xiong Y. *Pravastatin restores DDAH activity and endothelium-dependent relaxation of rat aorta after exposure to glycated protein*. J Cardiovasc Pharmacol. 2005;45(6):525-32.
150. Janatuinen T, Laakso J, Laaksonen R, Vesalainen R, Nuutila P, Lehtimäki T, Raitakari OT, Knuuti J. *Plasma asymmetric dimethylarginine modifies the effect of pravastatin on myocardial blood flow in young adults*. Vasc Med. 2003;8(3):185-9.
151. Yang TL, Chen MF, Luo BL, Yu J, Jiang JL, Li YJ. *Effect of fenofibrate on LDL-induced endothelial dysfunction in rats*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2004;370(2):79-83.
152. Dierkes J, Westphal S, Martens-Lobenhoffer J, Luley C, Bode-Böger SM. *Fenofibrate increases the L-arginine:ADMA ratio by increase of L-arginine concentration but has no effect on ADMA concentration*. Atherosclerosis. 2004;173(2):239-44.
153. Westphal S, Borucki K, Luley C, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. *Treatment with niacin lowers ADMA*. Atherosclerosis. 2006;184(2):448-50.
154. Osanai T, Saitoh M, Sasaki S, Tomita H, Matsunaga T, Okumura K. *Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells*. Hypertension. 2003;42(5):985-90.
155. Wakino S, Hayashi K, Tatematsu S, Hasegawa K, Takamatsu I, Kanda T, Homma K, Yoshioka K, Sugano N, Saruta T. *Pioglitazone lowers systemic asymmetric dimethylarginine by inducing dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rats*. Hypertens Res. 2005;28(3):255-62.

156. Stühlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS. *Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor*. JAMA. 2002;287(11):1420-6.
157. Asagami T, Abbasi F, Stuelinger M, Lamendola C, McLaughlin T, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS. *Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes*. Metabolism. 2002;51(7):843-6.
158. Khan NA, Wiernsperger N, Quemener V, Havouis R, Moulinoux JP. *Characterization of metformin transport system in NIH 3T3 cells*. J Cell Physiol. 1992;152(2):310-6.
159. Jiang L, Li NS, Li YJ, Deng HW. *Probucol preserves endothelial function by reduction of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor level*. Br J Pharmacol. 2002;135(5):1175-82.
160. Saran R, Novak JE, Desai A, Abdulhayoglu E, Warren JS, Bustami R, Handelman GJ, Barbato D, Weitzel W, D'Alecy LG, Rajagopalan S. *Impact of vitamin E on plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) in chronic kidney disease (CKD): a pilot study*. Nephrol Dial Transplant. 2003;18(11):2415-20.
161. Post MS, Verhoeven MO, van der Mooren MJ, Kenemans P, Stehouwer CD, Teerlink T. *Effect of hormone replacement therapy on plasma levels of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine: a randomized, placebo-controlled 12-week study in healthy early postmenopausal women*. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(9):4221-6.
162. Verhoeven MO, Hemelaar M, van der Mooren MJ, Kenemans P, Teerlink T. *Oral, more than transdermal, oestrogen therapy lowers asymmetric dimethylarginine in*

- healthy postmenopausal women: a randomized, placebo-controlled study.* J Intern Med. 2006;259(2):199-208.
163. Bode-Böger SM, Martens-Lobenhoffer J, Täger M, Schröder H, Scalera F. *Aspirin reduces endothelial cell senescence.* Biochem Biophys Res Commun. 2005;334(4):1226-32.
164. Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, Bode-Böger SM, Tsikas D, Hornig B, Frölich JC, Böger RH. *ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins.* Cardiovasc Res. 2003;57(1):244-52.
165. Holven KB, Haugstad TS, Holm T, Aukrust P, Ose L, Nenseter MS. *Folic acid treatment reduces elevated plasma levels of asymmetric dimethylarginine in hyperhomocysteinaemic subjects.* Br J Nutr. 2003;89(3):359-63.
166. Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Postel SC, Tager M, Bode-Böger SM. *Erythropoietin increases asymmetric dimethylarginine in endothelial cells: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase.* J Am Soc Nephrol. 2005;16(4):892-98.
167. Gomes VA, Casella-Filho A, Chagas AC, Tanus-Santos JE. *Enhanced concentrations of relevant markers of nitric oxide formation after exercise training in patients with metabolic syndrome.* Nitric Oxide. 2008;19(4):345-50.
168. Vegh A, Szekeres L, Parratt J. *Preconditioning of the ischaemic myocardium; involvement of the L-arginine nitric oxide pathway.* Br J Pharmacol. 1992;107(3): 648-52.
169. Penna C, Cappello S, Mancardi D, Raimondo S, Rastaldo R, Gattullo D, Losano G, Pagliaro P. *Post-conditioning reduces infarct size in the isolated rat heart: role of*

- coronary flow and pressure and the nitric oxide /cGMP pathway. Basic Res Cardiol.* 2006;101(2):168-79.
170. Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM. *The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. Circulation.*1992;86(1):279-88.
171. Laussmann T, Janosi RA, Fingas CD, Schlieper GR, Schlack W, Schrader J, Decking UK. *Myocardial proteome analysis reveals reduced NOS inhibition and enhanced glycolytic capacity in areas of low local blood flow. FASEB J.* 2002;16(6):628-30.
172. Paiva H, Laakso J, Laine H, Laaksonen R, Knuuti J, Raitakari OT. *Plasma asymmetric dimethylarginine and hyperemic myocardial blood flow in young subjects with borderline hypertension or familial hypercholesterolemia. J Am Coll Cardiol.* 2002;40(7):1241-7.
173. Stühlinger MC, Conci E, Haubner BJ, Stocker EM, Schwaighofer J, Cooke JP, Tsao PS, Pachinger O, Metzler B. *Asymmetric dimethyl L-arginine (ADMA) is a critical regulator of myocardial reperfusion injury. Cardiovasc Res.* 2007;75(2):417-25.
174. Moghadasian MH. *Experimental atherosclerosis: a historical overview. Life Sci.* 2002;70(8):855-65.
175. Lichtman AH, Clinton SK, Iiyama K, Connelly, PW, Libby P, Cybulsky MI. *Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice fed defined semipurified diets with and without cholate. Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(8):1938-44.
176. Reeves PG. *Components of the AIN-93G diets as improvements in the AIN-76A diet. J Nutr.* 1997;127(5 Suppl):838S-841S.

177. Matos SL, de Paula H, Pedrosa ML, Santos RC, Oliveira EL, Chianca Jr DA, Silva ME. *Dietary models for inducing hypercholesterolemia in rats. Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2005;48(2):203-9.
178. Joris I, Zand T, Nunnari JJ, Krolkowski FJ, Majno G. *Studies on the pathogenesis of atherosclerosis. I. Adhesion and emigration of mononuclear cells in the aorta of hypercholesterolemic rats.* Am J Pathol. 1983;113(3):341-58.
179. Bartus M, Lomnicka M, Lorkowska B, Franczyk M, Kostogrys RB, Pisulewski PM, Chlopicki S. *Hypertriglyceridemia but not hypercholesterolemia induces endothelial dysfunction in the rat.* Pharmacol Rep. 2005;57 Suppl:127-37.
180. Lorkowska B, Bartus M, Franczyk M, Kostogrys R, Pisulewski PM, Chlopicki S. *Hypercholesterolaemia does not alter endothelial function in spontaneously hypertensive rats.* J Pharmacol Exp Ther. 2006; 317(3):1019-26.
181. Moretto OPC, Casella-Filho A, Tanaka LY, Landim MP, Pereira VR, Souza LGO, et al. *A disfunção endotelial em ratos depende do período de administração da dieta hipercolesterolêmica.* RSCESP. 2008; 18(2): 73. (Apresentado no XXIX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo; 2008 Maio 1-3; São Paulo, Brasil. Abstracts).
182. Xiong Y, Lei M, Fu S, Fu Y. *Effect of diabetic duration on serum concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in patients and rats with diabetes.* Life Sci. 2005;77(2):149-59.
183. Dow J, Kloner RA. *Postconditioning does not reduce myocardial infarct size in an in vivo regional ischemia rodent model.* J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2007;12(2):153-63.

184. Girod WG, Jones SP, Sieber N, Aw TY, Lefer DJ. *Effects of hypercholesterolemia on myocardial ischemia-reperfusion injury in LDL receptor-deficient mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol.1999;19(11):2776-81.