

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS –**  
**FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA**

**Ação cardioprotetora da 3,5-dipalmitoil-nifedipina  
em cultura de cardioblastos submetidos à condição  
de isquemia e reperfusão**

**Eduarda Santa Helena**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, sob a orientação da Prof. Dr. Luiz Eduardo Maia Nery e co-orientação da Profa. Dr<sup>a</sup>. Carla Amorim Neves Gonçalves do Instituto de Ciências Biológicas.

Novembro de 2015

*“A vida sem ciência é uma espécie de morte.”*

*Sócrates*

## **Agradecimentos**

Primeiro agradeço a Deus pelas oportunidades oferecidas que me permitiram alcançar esse objetivo.

Aos meus pais, que me deram todo suporte durante essa caminhada, e muitas vezes renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu. A minha Mãe em especial pelas tantas vezes que escutei “não podes desistir do mestrado” ou “já rezei, hoje tuas coisas vão dar certo”. Meu sincero e eterno agradecimento.

Aos meus avós, que ajudaram na minha criação desde meu nascimento até hoje, o carinho e o amor que vocês me dedicaram me deram forças para conquistar todos os meus objetivos. Muito obrigada!

Ao meu namorado, e sua família maravilhosa que entraram no meio desta caminhada na minha vida. Ele sendo ouvinte atento de algumas dúvidas, inquietações, desânimos e sucessos, pelo apoio, e pela valorização sempre tão entusiasta do meu trabalho. Muito obrigada!

Agradeço à minha querida orientadora Profa. Dra. Carla Amorim Neves Gonçalves, a confiança, atenção e acima de tudo amizade. Nossa convivência me proporcionou um grande crescimento profissional. Muito obrigada por acreditar em mim e por permitir que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa desde 2009 onde conheci e me apaixonei pela ciência. Meus sinceros agradecimentos.

Agradeço ao meu querido orientador Prof. Dr. Luiz Eduardo Maia Nery que aceitou a minha orientação e mesmo não sendo na sua área me proporcionou total apoio e suporte, e, acima de tudo, confiou e acreditou que seria possível esse trabalho quando inúmeras coisas não saíram como o planejado. Tua Calma me ajudou e muito! Pela tua amizade e paciência meus sinceros agradecimentos.

À professora Ana Votto, por contribuir tanto conosco sempre, por ser uma excelente pessoa, tanto profissional como pessoalmente. Muito obrigada!

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

À minha estagiária Stefanie pelas conversas, descontração, apoio, ajuda ou por dizer àquelas palavrinhas que a gente precisa ouvir às vezes.

Também por escutar quando a gente precisa desabafar! Tu foste essencial para conclusão deste trabalho!

Ao pessoal do Laboratório de Cultura Celular da FURG, e aos demais, que fazem parte do dia-a-dia, pelo maravilhoso ambiente de trabalho.

A todos os funcionários do ICB, que sempre estão com sorriso no rosto recebendo e auxiliando a todos com tanto carinho.

Aos meus queridos amigos da ATbio 2012 que sempre me apoiam Fabio, Christopher, Cindy e Paula.

E a todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram durante essa caminhada, muito obrigada!

*“Se você esta lendo esta página é porque eu consegui. E não foi fácil chegar até aqui. Do processo seletivo, passando pela aprovação até a conclusão do mestrado, foi um longo caminho percorrido. Nada foi fácil, nem tão pouco tranquilo.”*

## Sumário

Resumo Geral	6
Introdução Geral	7
Objetivo Geral	14
Objetivos Específicos	14
Metodologia Geral	15
Manuscrito	19
Abstract	20
Introduction	21
Methodology	23
Results	26
Discussion	33
Conclusion	36
References	37
Conclusões Gerais	40
Referências Gerais	41

## Resumo Geral

Este trabalho investigou os efeitos agudos da nifedipina, um fármaco bloqueador de canal de cálcio utilizado como anti-hipertensivo, e seu híbrido graxo, a 3,5-dipalmitoil-nifedipina, formada de duas cadeias de ácido palmítico ligadas as extremidades da nifedipina. Sua ação foi estudada durante a indução da condição de isquemia e reperfusão em células cardíacas da linhagem H9c2 (cardioblastos) e comparada aos efeitos do endocanabinoide anandamida. As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com soro fetal de bovino (10%), e antibiótico e antimicótico (1%). As concentrações utilizadas dos fármacos foram de 10 e 100µM. Avaliou-se a viabilidade celular utilizando o ensaio colorimétrico de MTT, a indução de apoptose e necrose por microscopia de fluorescência e a geração de espécies reativas de oxigênio por fluorimetria. Cardioblastos ( $1 \times 10^5$  células/mL) receberam as drogas previamente a indução de hipóxia em placas de 24 ou 96 poços (conforme o ensaio a ser realizado) permanecendo em tratamento por 30 minutos, tempo da hipóxia. Os grupos experimentais foram: controle (cardioblastos meio de cultura DMEM), H/R (cardioblastos em meio de cultura DMEM + indução da hipóxia e reoxigenação - H/R), jejum (cardioblastos em PBS), jejum + H/R (cardioblastos em PBS + indução da hipóxia e reoxigenação), jejum + veículo (cardioblastos em PBS + 10% do veículo dos fármacos - DMSO), jejum + H/R + veículo (cardioblastos em PBS + 10% DMSO + indução da hipóxia e reoxigenação), anandamida (cardioblastos em jejum PBS + AEA 10 ou 100 µM), anandamida + H/R (cardioblastos em jejum PBS + AEA 10 ou 100 µM + indução da hipóxia e reoxigenação), nifedipina (cardioblastos em jejum PBS + NIF 10 ou 100 µM), nifedipina + H/R (cardioblastos em jejum PBS + NIF 10 ou 100 µM NIF + indução da hipóxia e reoxigenação), 3,5- dipalmitoil-nifedipina (cardioblastos em jejum PBS + DPN 10 ou 100 µM DPN) e 3,5- dipalmitoil-nifedipina (cardioblastos em jejum PBS + DPN 10 ou 100 µM DPN + indução da hipóxia e reoxigenação). Todas moléculas testadas reduziram o estresse oxidativo quando comparadas ao grupo veículo. A viabilidade celular observada após ao processo de isquemia e reperfusão, aumentou quando as células eram tratadas com anandamida em ambas as doses e com a 3,5-dipalmitoil-nifedipina na concentração de 100 µM. Demonstrou-se por tanto, que o processo hibridização de duas cadeias de ácido palmítico a uma molécula de nifedipina atribuiu um maior efeito cardioprotetor à molécula, reduzindo os danos provocados pela isquemia e reperfusão em cultura de cardioblastos.

## **Introdução Geral**

A doença cardiovascular pode ser definida como qualquer afecção que dificulte ou impeça a boa circulação sanguínea no organismo. As doenças cardiovasculares são as líderes de morte no mundo o que demonstra que o seu conhecimento sobre formas de prevenção e de atenuação ainda é limitado (WHO, 2011). Embora tenha havido inúmeros avanços no cuidado de doenças cardíacas ao longo dos últimos 20 anos, as taxas de hospitalização e mortalidade permanecem elevadas (Go et al., 2013). Os hábitos da sociedade nos dias de hoje, como a má alimentação, sedentarismo, estresse e uso em excesso de substâncias tóxicas como tabaco e álcool, conduzem aos índices crescentes de patologias no aparelho cardiovascular (Lim et al., 2012).

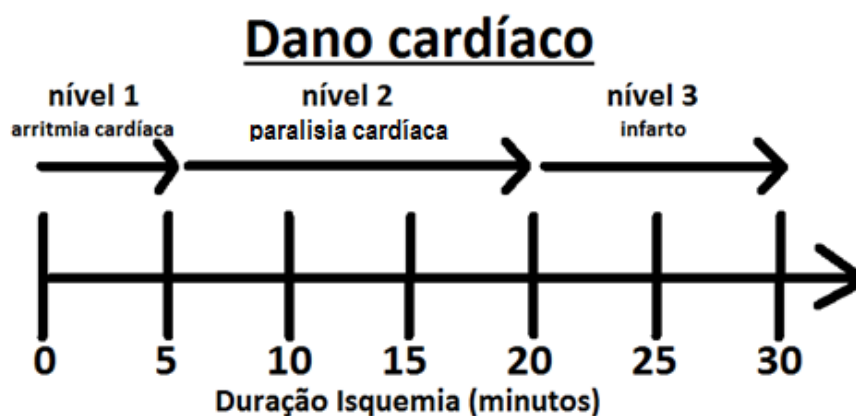
Uma das doenças cardíacas em destaque é a hipertensão arterial, que é um fator correlacionado com a alta incidência de mortalidade em todo o mundo (Lim et al., 2012), e é responsável por mais da metade de todos os acidentes vasculares cerebrais e doenças cardíacas, como o infarto do miocárdio (WHO, 2010). Existem ainda previsões de que um terço dos adultos em todo o mundo terá hipertensão até 2025 (Kearney et al., 2005), o que pode agravar a situação. Com o aumento da idade, o número de hipertensos aumenta, e isto é reflexo de fatores ambientais e de estilo de vida, bem como alterações hemodinâmicas causadas pela rigidez da vasculatura arterial, especialmente na aorta (Kearney et al., 2005).

Embora muitas abordagens farmacológicas já existam, o desenvolvimento de novas estratégias para tratar a hipertensão e proteger o coração, ou ainda atenuar ou prevenir os danos causados por isquemia e reperfusão (I/R) durante o infarto agudo do miocárdio continua necessário. O dano miocárdico pós isquemia e reperfusão é a principal causa de morbidade e mortalidade do mundo (Lloyd-Jones et al., 2010; Hausenloy & Yellon 2013). Os pacientes hipertensos são os mais acometidos pela I/R (Lim et al., 2012), por isso a importância dos estudos que buscam um medicamento que atenua a pressão arterial ao mesmo tempo que seja capaz de prevenir ou mitigar os danos da I/R miocárdica.

A isquemia ocorre quando o fluxo arterial é insuficiente para manter as funções normais de um órgão ou tecido. A isquemia pode ser total quando o fluxo arterial for insuficiente para manter a vida celular ou tecidual, ou parcial, que mantém a viabilidade celular (D'Alecy & Zelenock, 1990). A reperfusão ocorre quando o tecido ou órgão

isquêmico volta a receber o aporte de sangue em condições normais. Esse processo ativa monócitos, macrófagos e neutrófilos levando a um aumento da produção e liberação de espécies reativas do oxigênio (Evora, 1996). O nível de lesão do miocárdio induzida por I/R pode variar desde um pequeno insulto resultando em nenhum dano permanente, até uma grave lesão culminando em disfunção elétrica cardíaca e morte celular. De fato, uma grande lesão de I/R para o coração pode resultar na incapacidade permanente ou na morte do paciente acometido.

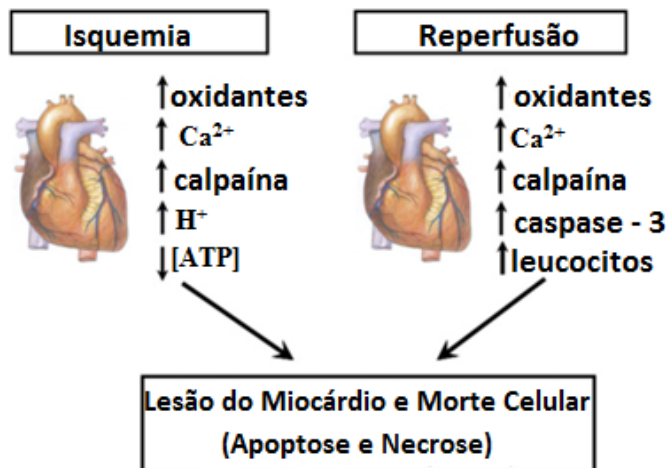
Dependendo da duração da isquemia, três níveis de lesão cardíaca induzida por I/R são descritas por Powers (2007; 2008). O menor nível de lesão ocorre quando o período isquêmico tem a duração menor que 5 minutos, estando este nível de lesão associado à arritmias cardíacas; o segundo nível de lesão cardíaca induzida por I/R ocorre quando o período isquêmico se estende de 5 a 20 minutos, neste nível ocorre paralisia do miocárdio (*stunning* cardíaco), déficit na contratibilidade e ainda pode ocorrer morte celular; o terceiro nível é alcançado quando o período isquêmico é superior a 20 minutos, levando a morte celular por necrose ou apoptose além de danos mitocondriais (Figura 1).



**FIGURA1. Desenho esquemático dos três níveis de lesão miocárdica decorrentes de isquemia e reperfusão (adaptado de Powers et al., 2007).**

Durante a I/R no miocárdio, um dos principais problemas associados às doenças cardiovasculares (Powers, et al., 2008), ocorrem perturbações iônicas, aumentando o estresse oxidativo, o que acaba gerando morte celular e necrose do tecido (Figura 2).





**FIGURA2. Alterações de íons e moléculas durante a I/R (adaptado de Power, 2008).**

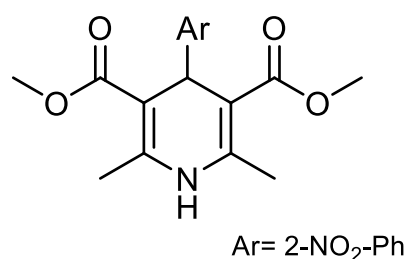
A hipóxia, uma condição de diminuição dos níveis de oxigênio, induz danos aos cardiomiócitos que podem levar a apoptose (Jiang et al., 2011). A apoptose pode ser causada pela perda da fosforilação oxidativa e bloqueio da atividade da ATPase, perturbando a homeostase iônica da célula, aumentando a quantidade de cálcio citoplasmático e ativando enzimas autolíticas como proteases, endonucleases e fosfolipases, danificando completamente a célula (Guyton, 1988).

Evidências indicam que vários fatores inter-relacionados, como a diminuição dos níveis de ATP celular, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o acúmulo de íons hidrogênio e a geração de espécies reativas de nitrogênio (ERN) contribuem para os danos causados pela I/R (Powers et al., 2008), sendo o estresse oxidativo a principal causa de morte celular durante o processo de I/R (Wen, 2013). O estresse oxidativo é o desbalanço entre a concentração de ERO e a produção de defesas antioxidantes, que leva a um dano no organismo, por exemplo, o aumento da taxa de produção de superóxido e geração de peróxido de hidrogênio (Droge, 2002), ativando assim mecanismos de defesa antioxidantes. As ERO ainda podem comprometer o funcionamento de proteínas cardíacas como: canais iônicos, bombas de cálcio e proteínas contráteis envolvidas no mecanismo de excitação da contração do coração (Misra, 2009). Deste modo, terapias com moléculas antioxidantes que regulem tais canais iônicos se tornam alvos importantes de estudo a fim de mitigar os efeitos da I/R.

Durante a reperfusão, a restauração do fluxo sanguíneo e do suprimento de oxigênio desencadeia um aumento na geração de ERO, que pode induzir respostas

apoptóticas e/ou necróticas nas células atingidas (Van Golen, 2012). Durante a reoxigenação que simula então a reperfusão *in vitro*, as células ativam uma ampla gama de cascatas de reações enzimáticas, resultando em estímulos pró-apoptóticos e necróticos (Bond & Greenfield, 2007). As trocas de íons e a estrutura das membranas também são alteradas, devido ao aumento de ERO (Dringen, 2005). O efeito destes processos é, entre outros, um aumento da permeabilidade de  $\text{Ca}^{2+}$ , e conseqüentemente o aumento dos níveis intracelulares de cálcio.

Dentre as abordagens farmacológicas para o tratamento da hipertensão encontra-se a nifedipina (NIF) (Figura 3) um fármaco pertencente à família das hidropiridinas, caracterizado por apresentar ação bloqueadora do canal de cálcio, sendo um potente vasodilatador utilizado, como anti-hipertensivo (Charlton & Thampson, 2015). A NIF também é eficaz na inibição da ativação do fator de necrose tumoral kapa beta (NFkB) e contribui assim para a diminuir a inflamação, além de um aumento da função endotelial na circulação coronariana (Takase, 2005). A NIF exerce seu efeito clínico devido ao relaxamento do músculo liso dos vasos, levando a redução da resistência vascular periférica e melhorando a perfusão coronariana. Ela também exerce efeito inotrópico negativo sobre o tecido cardíaco ainda que atenuado pelo aumento do reflexo na frequência cardíaca em resposta à vasodilatação (McDonald, 1994). A NIF é indicada para o tratamento da hipertensão além do tratamento da angina e desordens na circulação periférica.



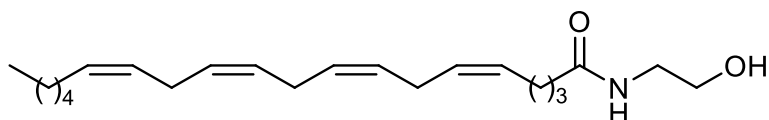
**FIGURA 3. Estrutura molecular da Nifedipina.**

O maior uso da NIF é para o tratamento da hipertensão, reduzindo a pressão sanguínea e aumentando o fluxo sanguíneo coronariano, através da inibição específica da entrada de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) por meio de canais do tipo L, em células do músculo liso (Saida & Van Breemen, 1983). A NIF exerce efeitos em células endoteliais cultivadas,

no entanto estas células não expressam canais de cálcio tipo L (Fukuo, 2002), demonstrando que os efeitos da NIF não são restritos a esses canais.

A NIF mostrou também promover a re-endotelização após a lesão vascular, sendo cogitada para a proteção contra a aterosclerose através da inibição de apoptose das células endoteliais e supressão de inflamação vascular, efeitos atribuídos às propriedades antioxidantes da droga (Fukuo, 2002; Sugano, 2002). No entanto, se sabe pouco ainda sobre os possíveis efeitos da nifedipina sobre o miocárdio, mas um dos efeitos colaterais conhecidos é a taquicardia (Liang, 2002).

Pensando em novos tratamentos antioxidantes para I/R com base no histórico de uso de canabinóides exógenos, como por exemplo o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, surgiram estudos que evidenciaram os potenciais benefícios clínicos, como o efeito antioxidante e anti-inflamatório, para diversas doenças entre elas I/R (Pertwee, 2006; Karsak et al., 2007). A presença de receptores canabinóides levou à descoberta de substâncias produzidas endogenamente, denominadas endocanabinóides que são amidas graxas, como por exemplo, a anandamida (ou araquidonoiletanolamida) (AEA) (Figura 4) (Pertwee et al., 2010). Em um modelo de isquemia/reperfusão em ratos, a AEA diminuiu a incidência de arritmias ventriculares e reduziu o tamanho do infarto, através da ativação de receptores CB2 (Krylatov et al., 2001).



**FIGURA 4. Estrutura molecular da Anandamida.**

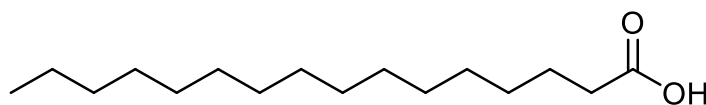
Os receptores CB1 estão localizados no cérebro, no coração e na vasculatura (Pertwee et al., 2010; Bonz et al., 2003). Já os receptores CB2, são expressos principalmente no sistema imunológico, mas recentemente a sua presença no cérebro, miocárdio e nas células musculares, também tem sido demonstrada (Pertwee et al., 2010). Nos últimos anos, a extensa pesquisa enfocando as ações biológicas dos endocanabinóides indicou que estes têm papéis importantes regulando várias condições fisiológicas e patológicas (Pertwee et al., 2010). Um estudo farmacológico com modelo de isquemia em corações isolados de ratos identificou efeitos cardioprotetores dos ligantes do receptor CB2 (Lepicier, 2003), além disso, foi identificado também efeitos benéficos, atenuando o estresse oxidativo no tecido cardíaco de ratos submetidos I/R em

comparação com ratos também submetidos a I/R que não expressavam receptores CB2 (Wang, 2012).

A literatura tem demonstrado a relação entre receptores canabinóides e estresse oxidativo, confirmando a ação antioxidante dos ligantes destes receptores em linhagens celulares de tumor pancreático humano (Carracedo, 2006). Mas o efeito antioxidante não está somente na ligação dos endocanabinóides com seus receptores segundo García (2007), estes ligantes possuem atividade antioxidante, independentemente da ativação dos receptores CB1 / CB2, resposta observada pelo tratamento com endocanabinóides em células neuronais que não expressam esses receptores.

Alguns estudos demonstram que os endocanabinóides têm importante papel modulador sobre a função do sistema cardiovascular sob várias condições patológicas, tais como a hipertensão, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (Batkai & Pacher 2009; Montecucco & Di Marzo, 2012). Experimentos com o endocanabinóide anandamida, realizado em preparações de Langendorff com corações de ratos (Ugdyzhekova 2002) têm revelado um efeito inotrópico negativo que pode ser à base da sua capacidade de diminuir o débito cardíaco como observado em estudos realizados *in vivo* em ratos (Wagner, 2001). Além disso, a AEA mostrou efeitos antiarrítmicos *in vivo* em miocárdio ratos (Krylatov et al., 2002; Ugdyzhekova, 2001).

Entre as moléculas graxas que também podem exercer efeitos importantes sobre o organismo, além da AEA, está o ácido palmítico (Figura 5).



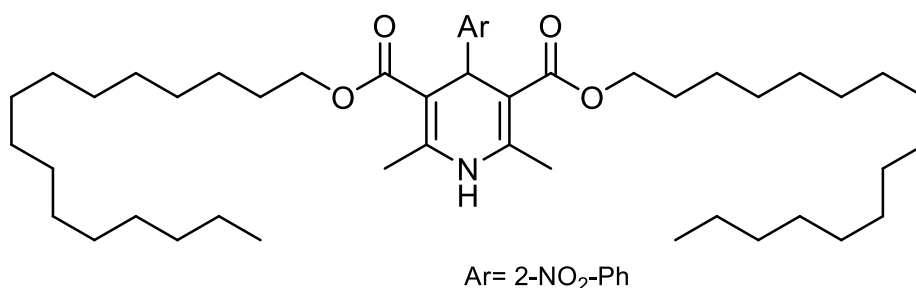
**FIGURA 5. Estrutura molecular do ácido palmítico.**

É universalmente reconhecido que a qualidade e quantidade de gorduras na dieta podem contribuir para o aparecimento e progressão de muitas doenças crônicas que impactam a saúde humana. Os níveis excessivos de ácidos graxos saturados ou um desequilíbrio entre os níveis gorduras saturadas e gorduras insaturadas têm sido implicados em doenças como: diabetes, obesidade, aterosclerose e doenças cardiovasculares (Hooper, 2011). Os ácidos graxos são capazes de modular as vias

moleculares envolvidas na apoptose, estando o ácido palmítico, por exemplo, implicado na indução de apoptose em diferentes tipos celulares, incluindo cardiomiócitos neonatais (Cetrullo, 2012).

O processo de unir moléculas a amidas graxas demonstrou uma essencial importância para a atividade biológica, provavelmente por facilitar a permeabilidade nas células dessas novas moléculas (D'Oca et al., 2010; Rodrigues, 2013). Novas drogas com moléculas híbridas que atenuem o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e o estresse oxidativo tem sido propostas atualmente na literatura, com isso modificações ou hibridização com a molécula nifedipina tem sido propostas (Tenti 2014) como: uma dihidropiridina com os meta-hidroxil substituídos 3-aryl para aumentar a afinidade da molécula com receptor de canais de cálcio do tipo L (Galvis-Pareja, 2014); com a decomposição a Nifedipina se forma uma nitrosnifedipine o que aumenta seu efeito antioxidante mas que não atua como anti-hipertensivo (Horinouchi, 2011).

Para este trabalho foi sintetizada uma molécula híbrida inédita a partir da junção de duas moléculas de ácido palmítico em cada extremidade da molécula de nifedipina, afim de conferir a essa molécula propriedades que auxiliem na mitigação de danos causados pela I/R. Esta molécula foi denominada de 3,5-dipalmitoil-nifedipina (dihexadecyl 2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate) (DPN) (Figura 6).



**FIGURA 6. Estrutura molecular 3,5-dipalmitoil-nifedipina.**

Essa molécula híbrida, 3,5-dipalmitoil-nifedipine, foi sintetizada com o objetivo de agregar propriedades antioxidantes à molécula da nifedipina, a semelhança dos efeitos clássicos de moléculas graxas como a anandamida, ou potencializar efeitos já conhecidos.

Alguns estudos indicam um papel cardioprotetor de ligantes dos receptores CB2 após o infarto do miocárdio (Wang, 2012; Montecucco, 2009), contudo a intervenção na

fase pré-isquêmica também poderia revelar-se extremamente útil para os pacientes e assim prevenir/atenuar os efeitos do infarto do miocárdio (Heusch, 2013).

Sabendo que o processo de isquemia do miocárdio é um problema mundial de saúde este trabalho investigou os efeitos agudos do bloqueador de canal de cálcio nifedipina e seu híbrido graxo, a 3,5-dipalmitoil-nifedipina, durante o processo de indução de hipóxia e reoxigenação em células cardíacas da linhagem H9c2 (cardioblastos).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito agudo do bloqueador de canal de cálcio nifedipina (NIF) e seu híbrido graxo, a 3,5-dipalmitoil-nifedipina (DPN), durante a indução da condição isquemia e reperfusão em células cardíacas da linhagem H9c2 (cardioblastos) e comparar com o efeito da anandamida (AEA).

### **Objetivos específicos**

Quantificar os níveis de espécies reativas de oxigênio após a indução da condição de isquemia e reperfusão em células cardíacas da linhagem H9c2, tratadas com NIF, DPN e AEA durante a hipóxia.

Avaliar a viabilidade celular após a indução da condição de isquemia e reperfusão em células cardíacas da linhagem H9c2, tratadas com NIF, DPN e AEA durante a hipóxia.

Verificar a indução de apoptose ou necrose após a indução da condição de isquemia e reperfusão em células cardíacas da linhagem H9c2, tratadas com NIF, DPN e AEA durante a hipóxia.

## **Metodologia Geral**

### **Manutenção das células**

A linhagem de cardioblastos de embriões de *Rattus norvegicus* H9c2 foi obtida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro e mantida em garrafas de cultura à 37°C, em meio DMEM suplementado com bicarbonato de sódio (1,5 g/L), L-glutamina (4 mM), Hepes (25 mM), 4,5 g/L de glicose, 1% de antibiótico (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml) e antimicótico (anfotericina 0,25 µg/ml) com adição de 10% de soro fetal bovino. As células eram mantidas de maneira que a confluência não ultrapassasse 80%.

### **Síntese da 3,5-dipalmitoil-Nifedipina**

A um balão de fundo redondo equipado com uma barra de agitação e condensador de refluxo magnético foram adicionados o  $\beta$ -cetoéster palmítico (2 mmol), 2-nitro-benzaldeído (1 mmol), acetato de amônio (3 mmol), metanol (5 mL) e ácido sulfâmico (30% molar) como catalisador. A mistura foi submetida a refluxo por 24 h. Depois, o produto bruto foi arrefecido até à temperatura ambiente, concentrou-se in vácuo e purificou-se por cromatografia em coluna em hexano: acetato de etila (80:20 v/v), ficando o produto com um aspecto de uma pasta sólida amarela.

### **Delineamento Experimental**

As células H9c2 ( $1 \times 10^5$  células/ml) foram tratadas em placas de 24 ou 96 poços (conforme o ensaio a ser realizado) com meio de cultura DMEM, à 37°C por 24h para aderência. As moléculas foram testadas nas concentrações de 10 e 100 µM e colocadas imediatamente antes da hipóxia e permaneceram por 30 minutos, tempo de duração da hipóxia. Os grupos experimentais foram divididos como representado na tabela 1.

**Tabela 1. Grupos experimentais do estudo.**

Grupos	Meio	PBS	DMSO	H/R
Controle	X			
H/R	X			X
Jejum		X		
Jejum + H/R		X		X
Jejum		X	X	
Jejum + H/R		X	X	X
Anandamida		X	X	
Anandamida + H/R		X	X	X
Nifedipina		X	X	
Nifedipina + H/R		X	X	X
3,5- dipalmitoil-nifedipina		X	X	
3,5- dipalmitoil-nifedipina + H/R		X	X	X

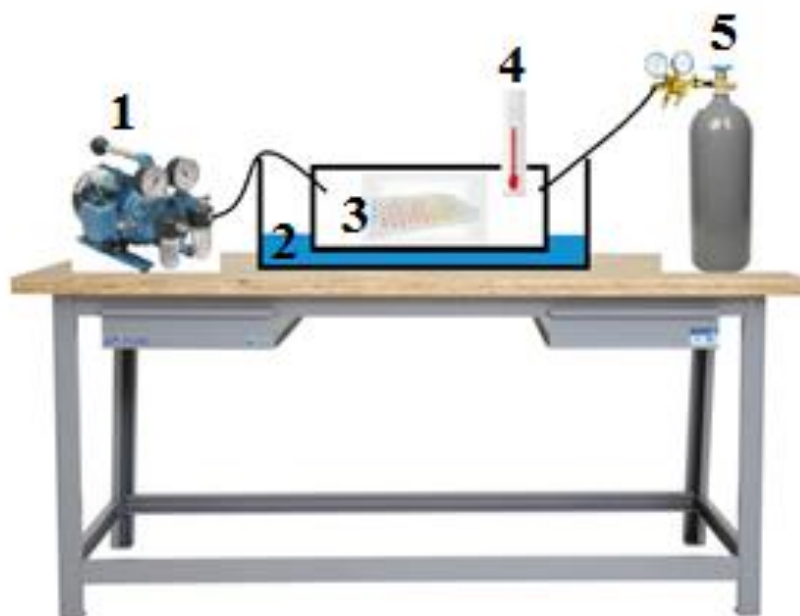
**Tabela 1. Grupos experimentais do estudo.** Controle (cardioblastos meio de cultura DMEM), H/R (cardioblastos em meio de cultura DMEM + indução da hipóxia e reoxigenação - H/R), jejum (cardioblastos em PBS), jejum + H/R (cardioblastos em PBS + indução da hipóxia e reoxigenação), jejum + veículo (cardioblastos em PBS + 1% do veículo dos fármacos - DMSO), jejum + H/R + veículo (cardioblastos em PBS + 1% DMSO + indução da hipóxia e reoxigenação), anandamida (cardioblastos em jejum PBS + AEA 10 ou 100  $\mu$ M), anandamida + H/R (cardioblastos em jejum PBS + AEA 10 ou 100  $\mu$ M + indução da hipóxia e reoxigenação), nifedipina (cardioblastos em jejum PBS + NIF 10 ou 100  $\mu$ M), nifedipina + H/R (cardioblastos em jejum PBS + NIF 10 ou 100  $\mu$ M NIF + indução da hipóxia e reoxigenação), 3,5- dipalmitoil-nifedipina (cardioblastos em jejum PBS + DPN 10 ou 100  $\mu$ M DPN) e 3,5- dipalmitoil-nifedipina (cardioblastos em jejum PBS + DPN 10 ou 100  $\mu$ M DPN + indução da hipóxia e reoxigenação).

### **Indução da hipóxia e reoxigenação (H/R)**

As condições de hipóxia foram obtidas substituindo-se o meio de cultura pelo meio experimental constituído de tampão PBS (pH 6,8 à 37°C) e incubando-se as placas em uma câmara de hipóxia com passagem de nitrogênio acoplada à uma bomba de vácuo a fim de diminuir a pressão de oxigênio (Figura.7). Após 30 minutos de hipóxia o



PBS foi substituído por meio de cultura DMEM e as condições de normóxia (reoxigenação) restabelecidas, submetendo-se às placas ao período de reoxigenação por mais 30 minutos. Os grupos controles à condição de H/R tiveram suas placas mantidas em estufa (37°C com 5% de CO<sup>2</sup> pelo tempo total do experimento, 1h). Cada experimento foi repetido com todos os tratamentos três vezes independentemente com no mínimo as amostras em triplicata. Ao final do período de reoxigenação as células foram preparadas para as análises a seguir.



**FIGURA 7. Desenho esquemático do aparato para indução de H/R para cultura de células. 1-bomba de vácuo; 2- cuba de banho-maria à 37 °C; 3- placa de células; 4-termômetro; 5- cilindro de nitrogênio.**

### **Viabilidade celular**

As células H9c2 ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram incubadas em meio DMEM à 37°C em placas de 96 poços por 24h para aderência. A viabilidade celular das células tratadas com AEA, Nifedipina, 3,5-dipalmitoil-Nifedipina e seus controles (n= 21), foi avaliada logo após a HR pelo método de MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il,2,5-difeniltetrazólio). Resumidamente, as células foram lavadas com PBS e adicionado meio com 10% de MTT e incubadas por 3 horas à 37°C. Após o meio foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) e realizada a leitura imediatamente em absorbância de 490 nm, em espectrofotômetro com leitora de placas

(800 ELX Universal Microplacas Reader, Bio-TEK). Os valores foram expressos em valores arbitrários.

### **Análise de apoptose e necrose**

A avaliação de apoptose e necrose foi realizada de acordo com Ribble (2005) modificado. As células H9c2 ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram incubadas em meio DMEM à 37°C em placas de 96 poços por 24h para aderência. Para realizar a análise de apoptose e necrose as células foram tratadas com AEA, Nifedipina, 3,5-dipalmitoil-Nifedipina e seus controles (n= 15), e logo após a reoxigenação foi adicionada 2 µl de solução de trabalho composta por PBS, com 100 µg/mL de laranja de acridina e 100 µg/ml de brometo de etídio nas células. A análise foi realizada a partir das imagens capturadas de cada poço da placa (20X) em microscópio de epifluorescência (Olympus IX81). As células foram analisadas utilizando-se o Programa Image J, e os dados foram expressos em número de células contadas e pela percentagem de células viáveis, em apoptose ou necrose, em relação ao número total de células em cada poço. As células foram classificadas como se segue: células marcadas em tons de amarelo-laranja no citoplasma e núcleo com fluorescência verde foram consideradas como viáveis; células com núcleo laranja e apresentando cromatina fragmentada foram consideradas apoptóticas; as células com núcleo manchado de laranja uniformemente foram consideradas necrosadas.

### **Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracelular**

As células H9c2 ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram incubadas em meio DMEM à 37°C em placas de 24 poços por 24h para aderência. Após a reoxigenação as células foram ressuspensas com o uso de tripsina, transferidas para eppendorfs, e incubadas a 37°C por 30 minutos em PBS com diacetato de 2',7'diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF-DA) na concentração final de 40 µM. Após incubação com H<sub>2</sub>DCF-DA, as células foram lavadas com PBS. Após foram retiradas alíquotas de 160 µL de cada amostra, dispostas em triplicata em uma placa de 96 poços e a intensidade da fluorescência foi determinada durante 90 minutos à 37°C em fluorímetro Victor 2 (PerkinElmer) com comprimentos de onda de excitação de 485 nm e emissão em 520 nm. Níveis de ERO foram expressos unidades de fluorescência.

### **Análise estatística**

Cada experiência foi repetida em três vezes independentes com no mínimo as amostras em triplicata. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  SE. Os pressupostos de Normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnof) e homocedasticidade de variâncias (teste de Levene) foram testados. Análise de variância de uma via (ANOVA) foi utilizada para determinar as diferenças significativas entre os grupos, seguida pelo teste *a posteriori de Tukey HSD*. O nível de significância estatística foi determinado em 5%.

**Cardioprotective role of the novel hybrid 3,5-dipalmitoyl-nifedipine in cardioblasts culture subjected to ischemic and reperfusion condition**

Eduarda Santa-Helena<sup>1,2</sup>, Stefanie Teixeira<sup>2</sup>, Diego da Costa Cabrera<sup>3</sup>, Caroline Da Ros Montes D'Oca<sup>3</sup>, Marcelo G. M. D'Oca<sup>3</sup>, Ana Paula S. Votto<sup>1,2</sup>, Luiz Eduardo Maia Nery<sup>1,2</sup> and Carla Amorim Neves Gonçalves<sup>1,2</sup>

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brazil

2 Instituto de Ciências Biológicas, FURG, Rio Grande, RS, Brazil

3 Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica, Escola de Química e Alimentos, FURG, Rio Grande, RS, Brazil

Corresponding author: Luiz Eduardo Maia Nery. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália Km 8, CEP 96201-900, Rio Grande, RS - Brazil.

Phone/Fax: +55 53 32336848 or +55 53 32336854

E-mail address: famnery@terra.com.br

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brazil Zip Code: 96203-900 Rio Grande, RS, Brazil.

## **Abstract**

Knowing that the process of myocardial ischemia is a global health problem this study investigated, for the first time, the acute effects of the calcium channel blocker nifedipine and its new fatty hybrid with palmitic acid, the 3,5-dipalmitoyl-nifedipine, comparing to the endocannabinoid anandamide, during the process of induction of ischemia and reperfusion in H9c2 heart cells of the strain (cardiomyoblast). Cardiomyoblast ( $1 \times 10^5$  cells/ml) were treated in 24 or 96 well plates (according to the performed test) remaining with the treatment until the end of hypoxia induction. After this, the cells were distributed into the following groups: control (in DMEM culture medium), H/R (in DMEM culture medium + induction of hypoxia and reoxygenation), starvation (in PBS), starvation + H/R (PBS + induction of hypoxia and reoxygenation), starvation + vehicle (PBS + DMSO), starvation + H/R (PBS + DMSO + induction of hypoxia and reoxygenation), anandamide (AEA + starvation), anandamide + H/R (AEA + starvation + induction of hypoxia and reoxygenation), nifedipine (NIF + starvation), nifedipine + H/R (NIF + starvation + induction of hypoxia and reoxygenation), 3,5-dipalmitoyl-nifedipine (DPN + starvation) and 3,5-dipalmitoyl-nifedipine + H/R (DPN + starvation + induction of hypoxia and reoxygenation). The molecules were tested at concentrations of 10 and 100  $\mu\text{M}$ , treated 24h after assembly of the experimental plates and immediately before the H/R. We assessed cell viability using the MTT colorimetric assay, induction of apoptosis and necrosis by fluorescent microscopy and ROS generation was by fluorimetry. All molecules tested managed to reduce the levels of oxidative stress compared to the starvation + vehicle group. Cell viability was enhanced when cells were induced by ischemia and reperfusion process, only in the treatments with both doses of anandamide and 3,5-dipalmitoyl-nifedipine at a concentration of 100  $\mu\text{M}$ . Those same treatments also reduced cell death. It is shown therefore that the process of hybridization of nifedipine to two palmitic acid chains at a assigns a greater cardioprotective effect to this molecule, reducing the damage caused by ischemia and reperfusion in cardiomyoblast culture.

## **Keywords**

**calcium blocker - H9c2 - hypoxia and reoxygenation - infarction - palmitic acid**

## 1. Introduction

Cardiovascular disease is a worldwide public health problem, and damage after myocardial ischemia and reperfusion (I/R) is the leading cause of morbidity and mortality in the world [1, 2]. Hypertensive patients are the most affected by I/R [3], enhancing the importance of studies that looking a drug that attenuates the blood pressure and that at the same time is able to prevent or mitigate I/R myocardial damage.

Evidence indicates that several interrelated factors such as the decrease in cellular ATP levels, the production of reactive oxygen species (ROS), the accumulation of hydrogen ions and the generation of reactive nitrogen species contribute to the damage caused by I/R [4]. Oxidative stress has been the main cause of cell death during the I/R process [5]. The restoration of blood flow and the return of oxygen supply generate ROS that trigger cell death by apoptosis and necrosis [6].

During reoxygenation, the membrane integrity is compromised by oxidation of the phospholipids, which leads to an uncontrolled ion permeability [6]. The ROS can still compromise the function of cardiac proteins such as: ion channels, calcium pumps and contractile proteins involved in excitation mechanism of heart contraction [7]. These processes may lead to an increase in the permeability of  $\text{Ca}^{2+}$ , and consequently an increase in intracellular calcium levels. However it is still unclear as calcium channels play its role after myocardial I/R [8].

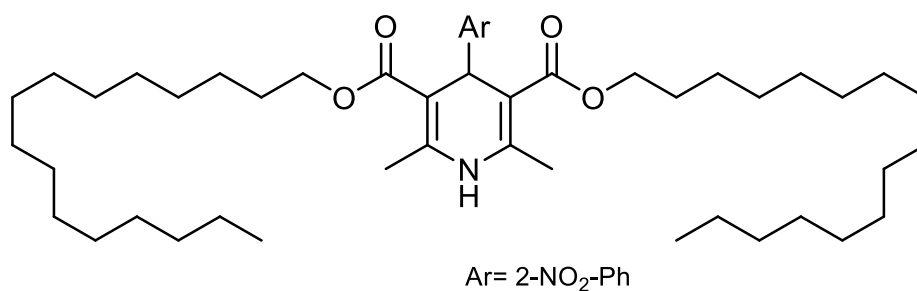
Among the pharmacological approaches for the treatment of hypertension, nifedipine (NIF) is widely used [9]. This drug belonging to the family of dihydropyridines, characterized by blocking action of the calcium channel and also act as potent vasodilator, widely used as antihypertensive [9]. NIF lowers blood pressure through increase coronary blood flow, by blocking the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  in smooth muscle cells by  $\text{Ca}^{2+}$  channels L-type [10]. However, one of its known effects on the myocardium is tachycardia [11]. The treatment of cardiovascular diseases with hybrid molecules may comprise more than one pharmacological action in a single drug, thereby providing an efficient alternative to potentiate already known effects or assign new effect molecules, ideal to treat those with more than one cardiac condition [12].

NIF is also effective in inhibiting the activation of tumor necrosis factor kappa beta (NFkB) and thus contributes to decrease inflammation, and increased endothelial

function in coronary circulation [13]. NIF exerts its clinical effect due to relaxation of the smooth muscle of blood vessels, leading to reduced peripheral vascular resistance and improving coronary perfusion. It also has a negative inotropic effect on cardiac tissue, attenuated by increased reflection in heart rate in response to vasodilation [14]. NIF has effects in culture endothelial cells, however these cells do not express L-type calcium channels [15], demonstrating that the effects of NIF are not restricted to these channels. NIF also showed to promote the re-endothelialization after vascular injury, considered to protect against atherosclerosis by inhibiting endothelial cell apoptosis and suppression of vascular inflammation, effects attributed to the antioxidant properties of the drug [15, 16].

The literature has demonstrated the relationship between cannabinoid receptors and oxidative stress, confirming the antioxidant action of ligands of these receptors in cell lines of human pancreatic tumor [17]. But, the antioxidant effect of endocannabinoids is not only in the connection with their receptors. According to García [18], endocannabinoids have antioxidant activity independently of activation of CB1/CB2 receptors in neuronal cells. Some studies show that endocannabinoids play an important modulatory role on the function of the cardiovascular system in various pathological conditions such as hypertension, myocardial infarction and heart failure [19, 20]. Experiments with the endocannabinoid anandamide (AEA), held in Langendorff preparations with rats hearts [21] have shown a negative inotropic effect, that may underlie their ability to decrease cardiac output as noted at *in vivo* studies in rats [22]. In addition, the AEA showed antiarrhythmic effects *in vivo* in rat myocardium [23, 24].

For this study was synthesized a novel hybrid molecule, 3,5-dipalmitoyl-nifedipine (dihexadecyl 2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate) (DPN) (Figure 1), in order to impart properties to this molecule to assist in mitigating damage caused by H/R. In the process of joining molecules, the fatty amides demonstrated an essential importance for biological activity probably to facilitate the permeability in the cells of these new molecules [25]. Knowing that myocardial ischemia process is a global health problem this work had as objective to study the acute effects of calcium channel blocker nifedipine and its hybrid fatty during ischemic and reperfusion in cardiac cells H9c2 line (cardiomyoblast) and compare with the effect of anandamide.



**FIGURA 1.** The structure of new hybrid 3,5-dipalmitoyl-nifedipine (DPN).

## 2. Methodology

### 2.1 Cell cultures

The Wistar rats embryos cardiomyoblast cell line H9c2 was obtained from the Bank of Cells of Rio de Janeiro and maintained in culture bottles at 37 °C in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) supplemented with sodium bicarbonate (1.5 g/L), L-glutamine (4 mM), Hepes (25 mM), glucose (4,5 g/L), 1 % antibiotic (penicillin 100 U/ml and streptomycin 100 µg/ml) and antimycotic (amphotericin 0,25 µg/ml) with added 10% fetal bovine serum. Cells were maintained in a manner that did not exceed 80% confluence.

### 2.2 Experimental procedure for synthesis of 3,5-dipalmitoyl-Nifedipine

To a round-bottom flask equipped with a magnetic stir bar and reflux condenser were added palmitic β-keto ester (2 mmol), 2-nitro-benzaldehyde (1 mmol), ammonium acetate (3 mmol), methanol (5 mL) and sulfamic acid (30 mol%) as catalyst. The mixture was submitted to reflux by 24 h. After, the crude was cooled to ambient temperature, concentrated in vacuum and purified by column chromatography using hexane: ethyl acetate (80:20) as eluent giving the pure yellow paste. *dihexadecyl 2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate*: MW 767 g.mol<sup>-1</sup>; paste-yellow solid; NMR <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.88 (t, 6H, *J*= 6.0 Hz), 1.26 (m, 52H), 1.54 (m, 4H), 2.31 (s, 6H), 3.94 (m, 2H), 4.06 (m, 2H), 5.82 (s, 1H), 5.97 (bs, 1H), 7.23 (m, 1H), 7.45 (t, 1H, *J*= 7.5 Hz), 7.53 (d, 1H, *J*= 9.0 Hz), 7.72 (d, 1H, *J*= 9.0 Hz); <sup>13</sup>C (75 Mz, CDCl<sub>3</sub>) δ 14.0, 19.5, 22.6, 25.8, 28.5, 29.2, 29.3, 29.5, 29.6, 31.8, 34.6, 64.2 (2C), 103.7 (2C), 123.9, 126.8, 131.2, 132.6, 142.5, 144.5, 144.6, 147.7, 163.3 (2C).

### 2.3 Experimental Design



The H9c2 cells (1x10 cells/mL) were placed in 24 or 96 well plates (according to the test performed) with DMEM culture medium at 37 °C for 24 hours for adhesion. After this time the cells were distributed the following groups: control (in DMEM culture medium), H/R (in culture medium DMEM + induction of hypoxia and reoxygenation), starvation (in PBS), starvation + H/R (in PBS + induction hypoxia and reoxygenation), starvation + vehicle (in PBS + 1% dimethylsulfoxide, DMSO), anandamide (AEA + starvation), Anandamide + H/R (AEA + starvation + vehicle + induction of hypoxia and reoxygenation), nifedipine (NIF + starvation), nifedipine + H/R (NIF + starvation + induction of hypoxia and reoxygenation), 3,5-dipalmitoyl-nifedipine (DPN + starvation) and 3,5-dipalmitoyl-nifedipine + H/R (DPN + starvation + induction of hypoxia and reoxygenation). All groups were tested with induction of hypoxia and reoxygenation (groups H/R), or in the absence of this condition. The molecules were administered at concentration of 10 and 100 µM, always 24h after assembly of the experimental plates and immediately before the H/R induction.

#### **2.4 Induction of hypoxia and reoxygenation (H/R)**

The hypoxia conditions were obtained by replacing the culture medium by the experimental medium consisting of PBS buffer (pH 6,8 at 37 °C) and the plates were incubated in a hypoxic chamber with nitrogen passage coupled to a vacuum pump, order to decrease the oxygen pressure. After 30 minutes of hypoxia, PBS was replaced by DMEM and normoxic conditions restored by subjecting the plates to the reoxygenation period for another 30 minutes. The control groups without H/R condition had their plates kept in a incubator (37 °C with 5% CO<sub>2</sub> by the total time of the experiment). All experiments were performed in triplicate, and by the end of reoxygenation period the cells were prepared for the following analysis. Each experiment was repeated three times independently with minimum triplicate of samples.

#### **2.5 Cell viability**

Viability of cells with was evaluated by MTT method (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium). Briefly, cells were rinsed with PBS and added DMEM with 10% MTT and incubated for 3 hours at 37 °C. After, DMEM was removed and formazan crystals were dissolved in 200 µl of DMSO (Sigma) and immediately reading its absorbance values at 490 nm in a spectrophotometer with a plate reader (800 ELX Universal Microplate Reader, Bio-TEK). Values were expressed as arbitrary valeus.

## **2.6 Analysis of apoptosis and necrosis**

Assessment of apoptosis and necrosis was performed according Ribble [26] modified. To perform the analysis of apoptosis and necrosis of cells after reoxygenation was added 2 µl of working solution composed of PBS, 100 µg/ml acridine orange and 100 µg/ml ethidium bromide. The analysis was performed from the captured images of each well of the plate (20x) in epifluorescence microscope (Olympus IX81). Cells were analyzed using the Image J program, and the data were expressed as number of cells counted and the percentage of viable cells, in apoptosis or necrosis in relation to the total number of cells in each well. Cells were classified according Kosmider [27] modified as follows: cells stained yellow-orange tones in the cytoplasm and nucleus with green fluorescence were considered viable; cells with nucleus orange and presenting fragmented chromatin were considered apoptotic; cells nucleus stained with orange uniformly were considered necrotic.

## **2.7 Generation of reactive oxygen species (ROS)**

After reoxygenation, cardiomyoblast and its controls were suspended using trypsin, placed in eppendorf tubes and incubated at 37 °C for 30 minutes in PBS with diacetate 2',7'diclorofluoresceina (H<sub>2</sub>DCF-DA) in the final concentration of 40 µM. After incubation with H<sub>2</sub>DCF-DA, the cells were washed with PBS once and resuspended. Aliquots of 160 µL of each sample placed in triplicate in a 96 well plate and fluorescence intensity was determined during 90 minutes at 37 °C in fluorometer Victor 2 (Perkin-Elmer) with excitation wavelengths of 485 nm and emission at 520 nm. ROS levels were expressed in of fluorescence unit.

## **2.8 Statistical analysis**

Each experiment was repeated at least three independent times with samples at least in triplicate. The results were expressed as mean ± SE. The assumptions of normality (Kolmogorov-Smirnov test) and variances of homoscedasticity (Levene test) were tested. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine significant differences between groups, followed by Tukey post test HSD. The level of statistical significance was set at 5%.

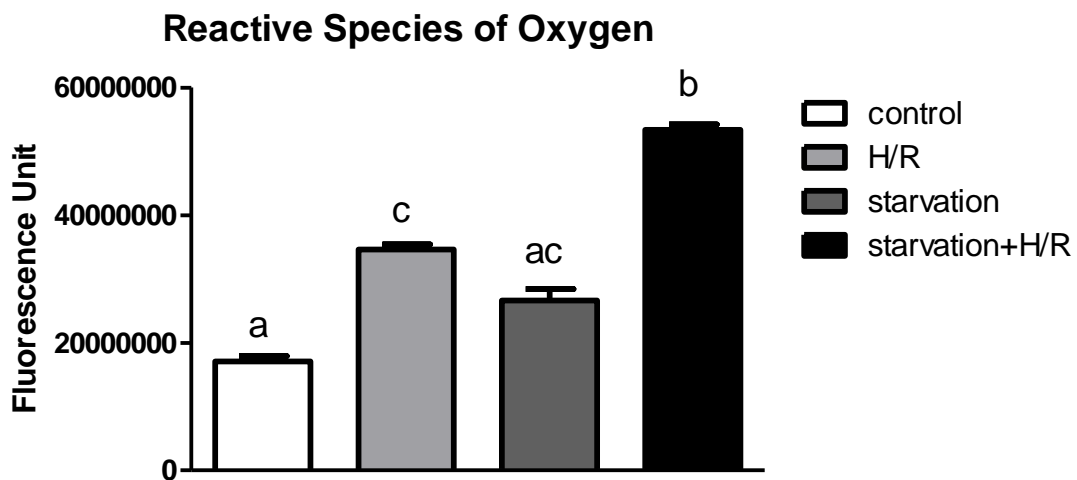
## **3. Results**

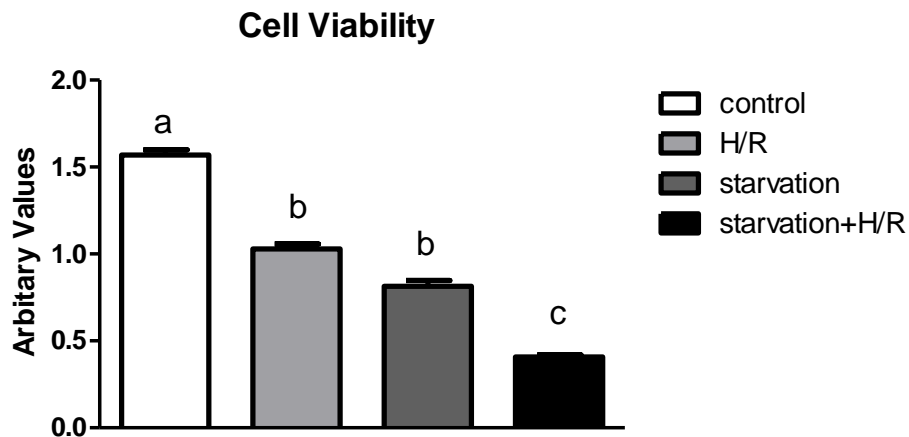
### **3.1 Induction of ischemia and reperfusion condition**

To confirm the effectiveness of ischemic and reperfusion simulation protocol was initially tested the effect of H/R and starvation, separate and together. Our results showed that when the cell line H9c2 is exposed only to H/R there is an increase of 50.7% in the generation of reactive oxygen species in the control group (Figure 2A) and a significant decrease in cell viability 45% compared to the control group (Figure 2B).

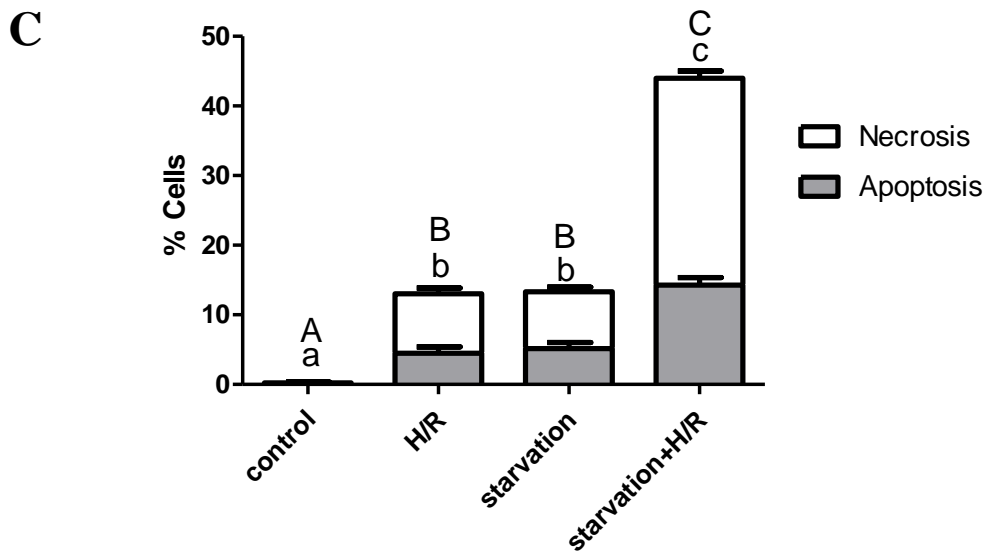
These differences are even greater when the cells are subjected to H/R and starvation. In this condition occurs an increase of 68.1% and a decrease 75% on ROS production (Figure 2A) and cell viability (Figure 2B) respectively. In the analysis of apoptosis and necrosis we can also observe that when the cells are subjected to H/R or starvation is induced death by necrosis (Figure 2C) which is greater when treatments are combined H/R + starvation. Apoptosis was induced significantly ( $p < 0.05$ ) by treatment H/R + starvation. These results demonstrate that our protocol H/R + starvation was effective by increasing the amount of reactive oxygen species and decreased cell viability simulating the damage induced by ischemia and reperfusion.

**A**



**B**

**Apoptosis and Necrosis**

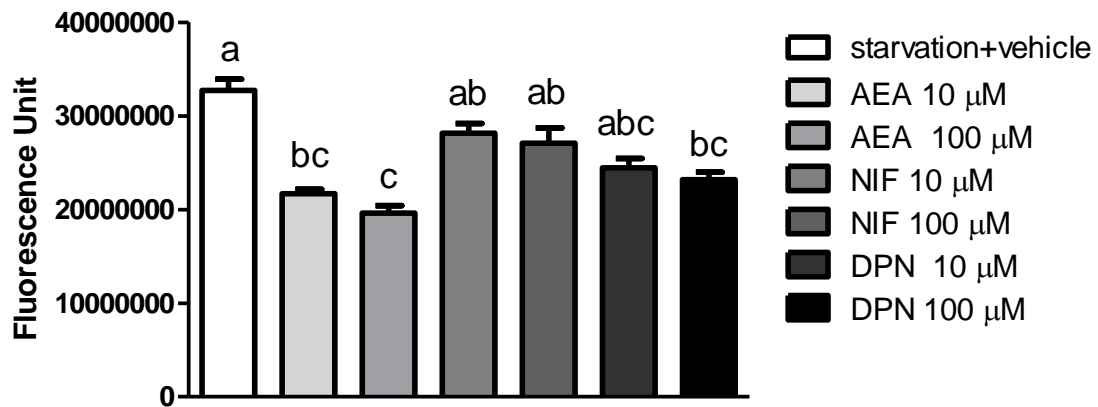


**FIGURE 2. (A) ROS generation in H9C2 cells submitted to the hypoxia and reoxygenation protocol. (B) Percentage of cell viability immediately after treatment with hypoxia and reoxygenation protocol (C) Percentage of viable, apoptotic and necrotic H9c2 cells, immediately after treatment. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error. Different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) among groups. Uppercase letters in the figure 2C refer to necrotic cells and lowercase letters refer to apoptotic ones ( $p < 0.05$ ).**

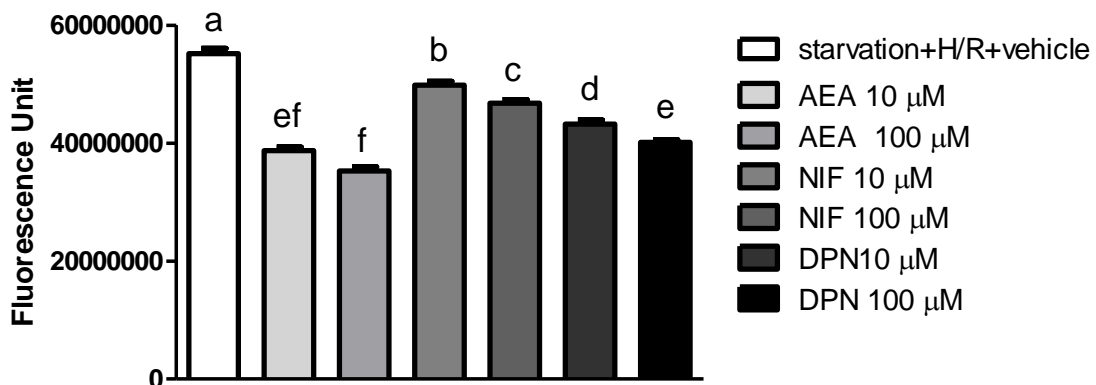
### 3.2 Cardioprotective effect of the treatments

The results showed that H9c2 cells when subjected only to starvation (Figure 3) in both AEA concentrations (10  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$ ) and the highest concentration of 3,5-dipalmitoyl-nifedipine (DPN) (100  $\mu\text{M}$ ) showed a reduction in the levels of ROS in relation to starvation + vehicle, 33.75%, 40.05% and 29.20% respectively. But, when subjected to H/R + starvation, all molecules show a reduction of reactive oxygen species ( $p < 0.05$ ). This decrease was more intense in both concentrations of AEA (10  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$ ) 30% and 36.30% respectively and DPN 100  $\mu\text{M}$  (27.9%) (Figure 3 B).

**A**



**B**

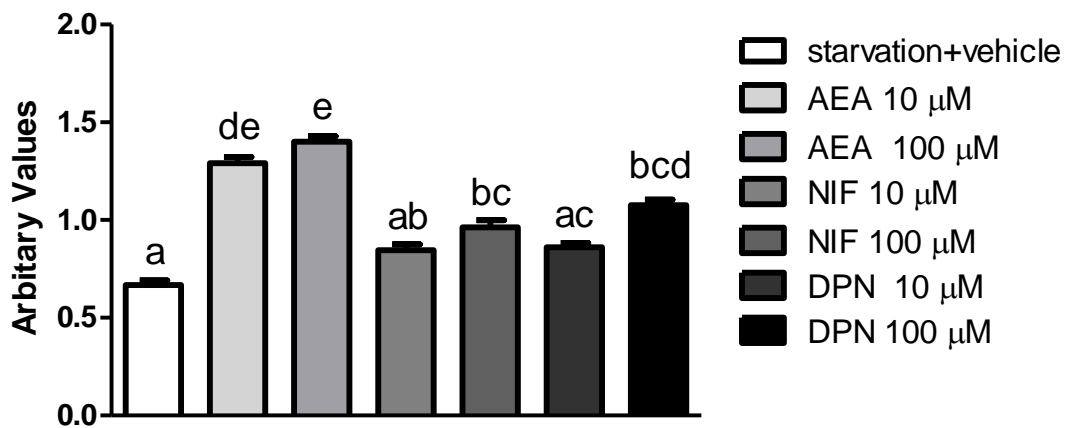


**FIGURE 3. (A) ROS generation in H9C2 cells exposed to starvation treated with anandamide, nifedipine and 3,5-dipalmitoyl-nifedipine (B) ROS generation in H9C2 cells immediately before hypoxia, starvation and reoxygenation treated with anandamide, nifedipine and 3,5-dipalmitoyl-nifedipine . Data are expressed**

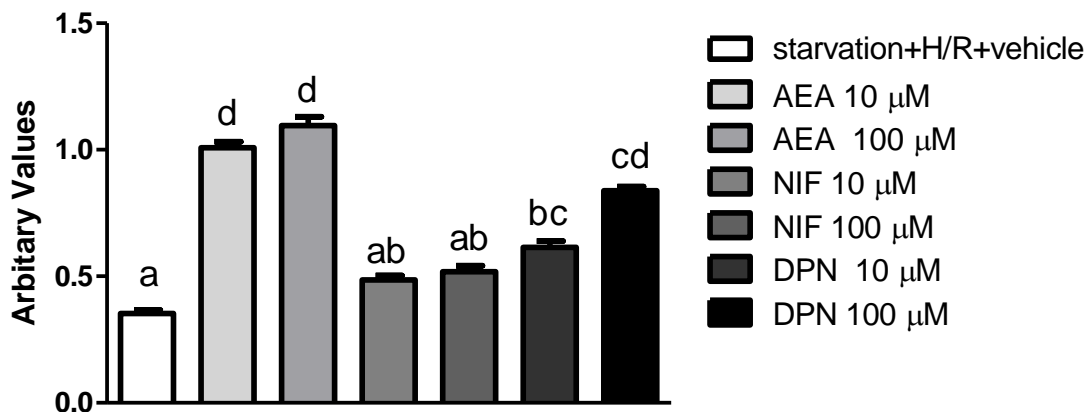
**fluorescence unit as mean  $\pm$  standard error, different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) among groups.**

The viability of the cell line H9c2, when subjected only to starvation (Figure 4A) was significantly increased ( $p < 0.05$ ) with AEA 10  $\mu\text{M}$  in 93.5%, AEA 100  $\mu\text{M}$  in 110.06%, DPN 100  $\mu\text{M}$  at 61.39% and NIF 100  $\mu\text{M}$  in 44.25%. However, when these cells are induced to H/R + starvation (Figure 4B) that is an ischemic condition, cells treated with either anandamide as with 3,5-dipalmitoyl-nifedipine at both concentrations, showed greater viability ( $p < 0.05$ ). This increase was of 185.20% for AEA of 10  $\mu\text{M}$  and 209% for AEA 100  $\mu\text{M}$ , and 73.8% and 138.7% for a DPN 10  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$ , respectively. This increase in cell viability makes us suggest a protective effect of these molecules to the damage caused by H/R. NIF at concentrations of 10  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$  did not differ significantly from starvation + vehicle during H/R ( $p > 0.05$ ).

**A**



**B**

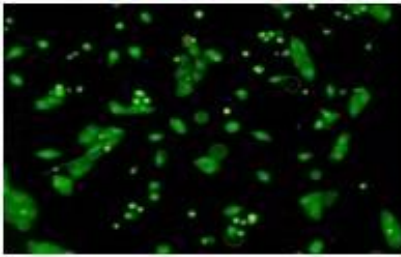


**FIGURE 4.(A) Cell viability H9C2 cells exposed to starvation in the presence and anandamide, nifedipine and 3,5-dipalmitoyl-nifedipine (B) Cell viability H9C2**

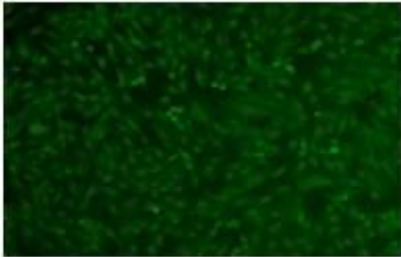
**cells immediately treatment with hypoxia and starvation in the presence and anandamide, nifedipine and 3,5-dipalmitoyl-Nifedipine. All Data arbitrary values are shown as mean  $\pm$  standard error, different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).**

As can be observed in figure 5A and 6, H9c2 cells in starvation treated with nifedipine at both concentrations, showed the highest values of apoptotic and necrotic cells, these values are statistically equal to the starvation+ vehicle group ( $p > 0.05$ ). However treatments AEA and DPN in the two concentration decreased significantly ( $p < 0.05$ ) cell death either by necrosis or apoptosis. When H9c2 cells are subjected to ischemic conditions (Figure 5B, 6), cells treated with both concentrations of Anandamide and DPN 100  $\mu$ M show a decrease in death by apoptosis and necrosis. NIF in both concentrations and DPN 10 $\mu$ M did not diluted death by apoptosis and necrosis.

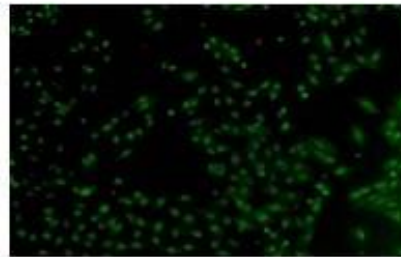
starvation + vehicle



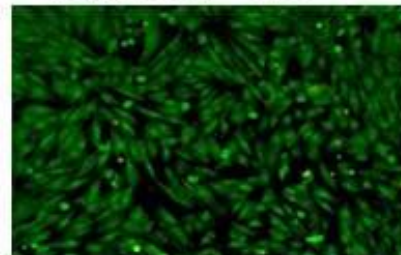
starvation + AEA



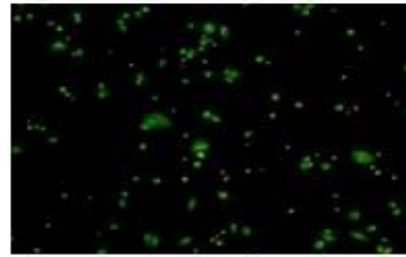
Starvation + NIF



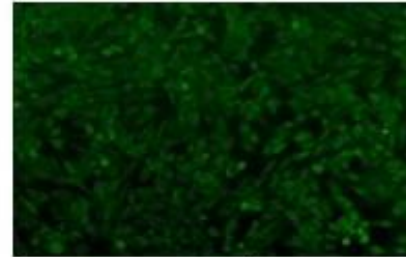
Starvation + DPN



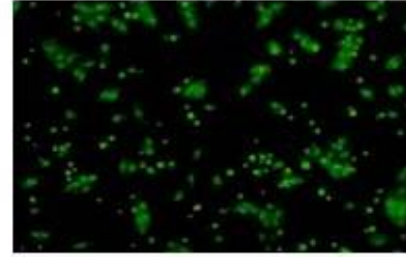
starvation + H/R + vehicle



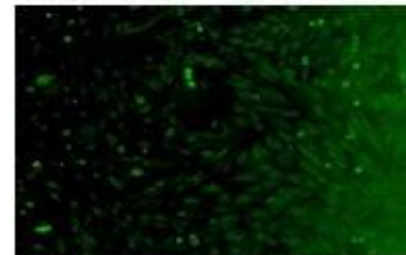
starvation + H/R + AEA



starvation + H/R + NIF

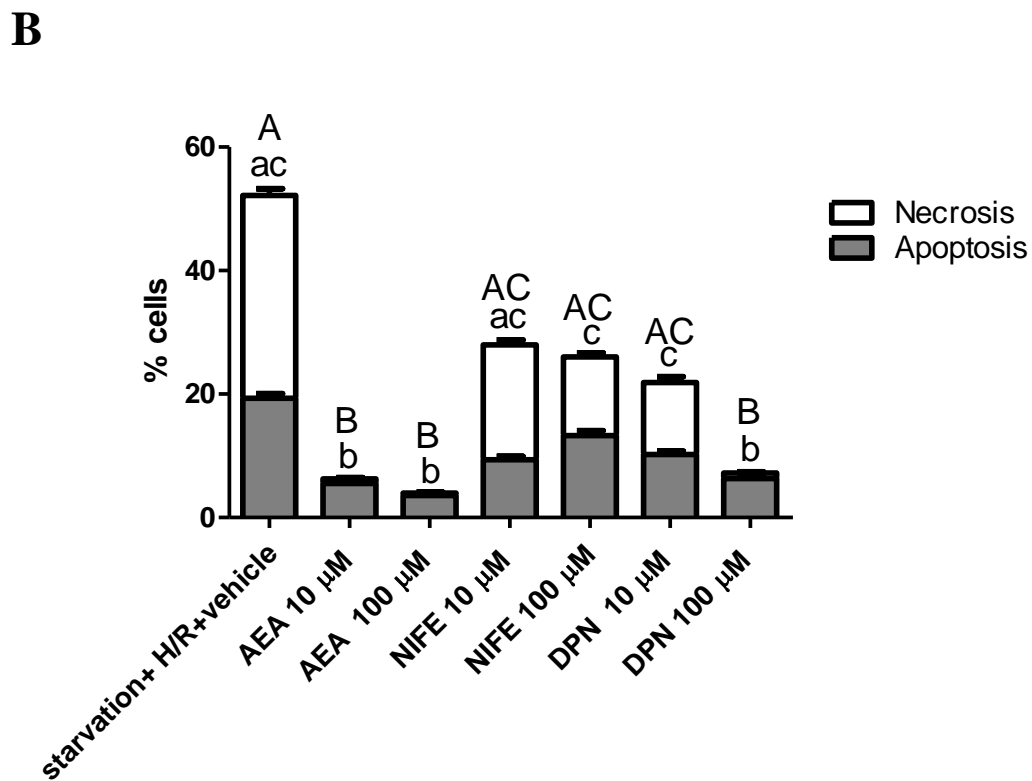
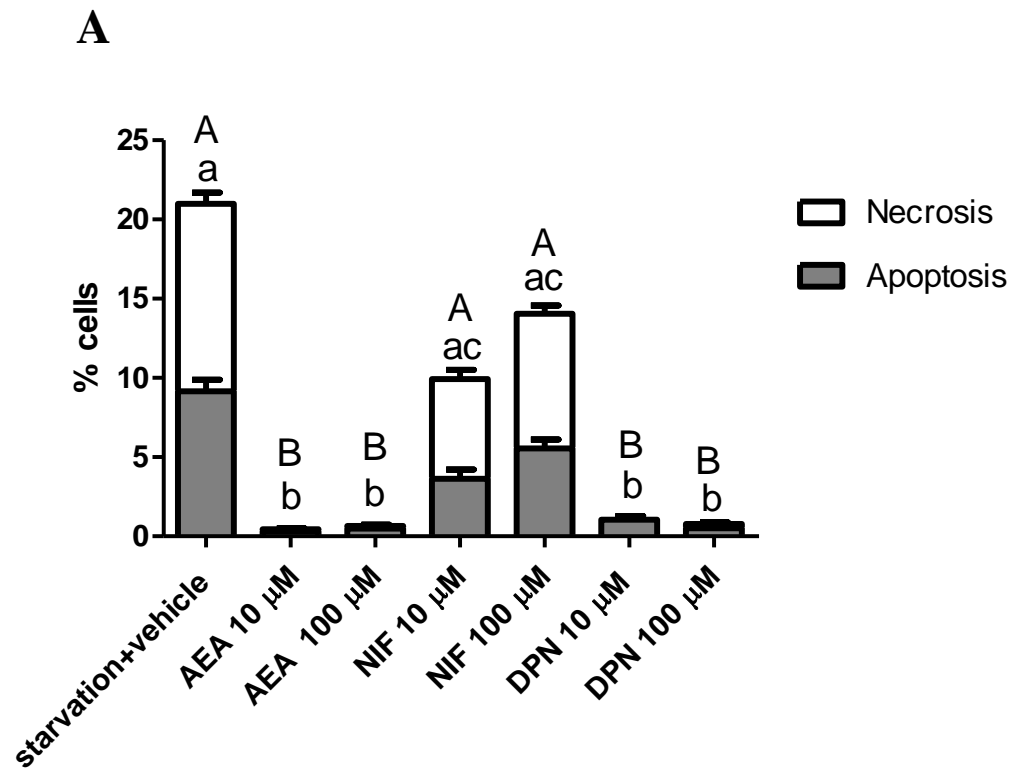


starvation + H/R + DPN



**FIGURE 5. Visual field of cells in the vehicle group demonstrating viable cells and cells treated showing viable cells, in apoptosis or necrosis captured by fluorescence microscopy. Cells stained yellow-orange tones in the cytoplasm and nucleus with green fluorescence were considered viable; cells with nucleus orange and presenting fragmented chromatin were considered apoptotic; cells nucleus stained with orange uniformly were considered necrotic.**





**FIGURE 6.** Percentage of viable, apoptotic and necrotic H9c2 cells immediately after treatment of hypoxia and nutrient deprivation with 10  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$  of anandamide (AEA), nifedipina (NIF) and 3,5-dipalmitoyl-nifedipine (DPN) from the visual field captured by a fluorescence microscope. Data are percentage of cells  $\pm$  standard error. Different letters indicate significant differences compared to the

**control, necrotic cells uppercase letters and apoptotic cells lowercase letters, respectively (p <0.05).**

### **3. Discussion**

In ischemia and reperfusion condition, major damage to heart tissue occur during reperfusion. Two factors may explain this: one assign the damage to the large influx of  $\text{Ca}^{2+}$  into the cell, the other assigns those changes as a result of oxidative stress [28]. In the looking of cardioprotective drugs that reduce or prevent damage from ischemia and reperfusion [29,30], researches have proposed new drugs with hybrid molecules that attenuate  $\text{Ca}^{2+}$  influx and oxidative stress [31, 32, 33].

This study demonstrated that administration of 3,5-dipalmitoyl-nifedipine (DPN) at concentrations of 10 and 100  $\mu\text{M}$  in rats cardiomyoblast cell line (H9c2) submitted to starvation and ischemia and reperfusion condition reduced the oxidative stress and increased cell viability, besides decreasing cell death by apoptosis and necrosis. Treatment with nifedipine has not significantly improved cell viability, or attenuated cell death, but did reduce significantly the generation of reactive oxygen species (ROS).

It has been well accepted that changes in mitochondrial function lead to ROS increase and consequently increase oxidative damage, and possibly a greater induction of apoptosis and necrosis, which are among the main damage of ischemic injury to the heart [34]. There is evidence that an increase in the absorption of antioxidants as food and medicines can protect against cardiovascular disease [35]. The antioxidant effect attributed nifedipine is already well described in the literature [36, 37]. Although nifedipine (5 $\mu\text{M}$ ) have antioxidant effect in primary cultures of endothelial cells of human umbilical cord, as well as in rat pheochromocytoma cells treated with 10 $\mu\text{M}$  [15, 32]. Studies in homogenized heart rats treated with 2.7 mM nifedipine also confirmed the antioxidant activity of this molecule [38]. In this work it was observed that in cardiomyoblast culture, nifedipine (10 and 100  $\mu\text{M}$ ) in a condition of ischemia and reperfusion also showed antioxidant activity in a dose-dependent manner.

Nifedipine is capable of improving the functions related to angiogenesis in endothelial cells, such as differentiation, migration besides improving the responses of cells against stress, decreasing cell death, for example [39]. According Arora [40], nifedipine has cytoprotective effects in the concentration of 10  $\mu\text{M}$ . This result was also repeated in the same concentration as nifedipine protected pancreatic  $\beta$ -cells in the endoplasmic reticulum stress-induced by glucose, decreasing the number cells that have

undergone apoptosis and enhancing cell viability [41]. Our results demonstrate that treatment with 100 $\mu$ M nifedipine in starvation condition significantly increased cell viability, but in the condition of ischemia and reperfusion does not occur until a dose of 100  $\mu$ M. There is evidence that although the nifedipine has vasodilating action in normoxic conditions, it did not act as a vasodilator in hypoxic conditions [42] and may be the reason why in the experimental conditions here presented the nifedipine had no effect on cell viability during the induction of ischemic condition. Together, these findings suggest that the cytoprotective action of nifedipine dependent of concentration, cell type and conditions of normoxia or hypoxia.

Another substance that has shown a significant cardioprotective effect in a model of ischemia and reperfusion in rats is anandamide, which decreased the incidence of ventricular arrhythmias and reduces infarct size, through the activation of cannabinoid receptor CB2 [43]. Additionally, antioxidants effects have been identified in heart tissue of rats submitted to I/R as compared to rats also subjected to I/R that do not express CB2 receptors [44]. Anandamide (100 nM) is also able to suppress calcium overload during I/R in cardiac myocytes, thus lowering the production of ROS [45], which agrees with our results that administration anandamide at concentrations of 10  $\mu$ M and 100  $\mu$ M decrease reactive oxygen species by 30% and 36.30% respectively in cardiomyoblast induced to H/R, proving the antioxidant action of this molecule.

Anandamide has also been identified as protective in toxicity models *in vitro* [46], as cytoprotective. The use of cannabinoids as a therapeutic use for multiple sclerosis, Parkinson's disease and cardiac or cerebral ischemia has been suggested to improve the cell viability [47, 48]. It was also demonstrated in our results since anandamide at both concentrations increased cell viability of cardiomyoblast subjected to H/R 185.20% and 209% respectively compared to the starvation+ vehicle group. Analysis of the type of death in cardiomyoblast induced to H/R treated with anandamide, in both concentrations and the treatment with 3,5-dipalmitoyl-nifedipine at a concentration of 100  $\mu$ M, reduced the values of apoptosis and necrosis.

The fatty acids can modulate the molecular pathways involved in apoptosis, being palmitic acid, e.g., involved in the induction of apoptosis in different cell types, including neonatal cardiomyocytes [49]. Fatty acids are molecules consisting of a hydrocarbon chain and a carboxyl grouping that are classified as saturated as is the case of palmitic acid or unsaturated as seen in anandamide molecule. The process of adding

unsaturated or saturated fatty acids to modify, add or enhance the effects of drugs is known in the literature, the arrangement in time to add this fatty acid can also influence the effect that is assigned to the molecule [50].

The continuous search for new strategies for the treatment of cardiac disorders as multifunctional drugs has been gaining attention, combining two pieces as a drug and another molecule [38], such as 3,5-dipalmitoyl-nifedipine. Others analogues of dihidropirimidinonas hybrids with fatty acids (DHPM-fatty acids) has already been described in the literature as anti-proliferative on glioma cells [51], of which the analogs derivatives of palmitic and oleic acid, have become the most promising in the treatment of this type of tumor [52]. NIF has effects in cultured endothelial cells, however these cells do not express L-type calcium channels [15], demonstrating that the effects of NIF are not restricted to these channels [53]. The H9c2 cells only express calcium channels type L to differentiate, and this condition did not happen during this experiment.

In H9c2 line, joint administration of the polyunsaturated fatty eicosapentaenoic acid (EPA or omega-3) and palmitic acid is capable of modulating the expression of LC3 gene involved in autophagosome formation response and promote an protective effect against apoptosis induced by palmitic acid [49]. Our results with the new molecule, 3,5-dipalmitoyl-nifedipine demonstrate that, when administered at a concentration of 100  $\mu$ M just prior to induction of ischemia and reperfusion condition improved cell viability decreasing cell death by necrosis and further by apoptosis in cardiomyoblast. The 3,5-dipalmitoyl-nifedipine also decreases the production of reactive oxygen species caused by hypoxia and reoxygenation process, showing that this molecule has an antioxidant effect at this moment, thus improving the results when compared to treatment with nifedipine.

These results are very important since there is evidence that the process of joining molecules to fatty amides enhances known effects of the molecule, probably by increasing the permeability of these molecules in cells [25]. This increases of antioxidant effect can also add in the treatment of other diseases, since it is known that the ingestion of drugs with increased antioxidant effect can protect against cardiovascular disease [54].

#### **4. Conclusion**

All cardiovascular disease trigger the death of heart cells by apoptosis or necrosis, interventions to improve this condition has to be added to decrease the damage/impact of heart diseases such as those related to ischemia and reperfusion. Our molecule synthesized 3,5-dipalmitoyl-nifedipine not only decreased ROS in cardiomyoblast subjected to ischemic and reperfusion condition, but also improved cell viability in 138.7% in dose-dependent manner. It demonstrate that the hybridization procedure of two chains of palmitic acid to a nifedipine molecule assigns a greater cardioprotective effect to the molecule, reducing the damage caused by ischemia and reperfusion in cardiomyoblast culture.

#### **Acknowledgements**

We also thank the CAPES for granting the scholarship of ESH.

## References

1. Lloyd-Jones, D.; Adams, R.J.; Brown, T.M.; et al. *Circulation*. 2010, 121, 46.
2. Hausenloy, D.J.; Yellon, D.M. *Journal of Clinical Investigation*. 2013, 123, 92.
3. Lim, S. S.; Vos, T.; Flaxman, A.D.; et al. *Lancet*. 2012, 380, 2224.
4. Powers, S.K.; Quindry, J.C.; Kavazis, A. N.; Avazis, A. N.; *Free Radical Biology & Medicine*. 2008, 44, 193.
5. Wen, Y.D.; Wang, H.; Kho, S.H.; Rinkiko, S.; Sheng, X.; Shen, H.M.; Zhu, Y.Z. *PLoS One*. 2013, 8, 53147.
6. Van Golen, R.F.; Van Gulik, T.M.; Heger M. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012, 52, 1382.
7. Misra, M.K.; Sarwat, M.; Bhakuni, P.; Tuteja, R.; Tuteja, N. *Medical Science Monitor*. 2009. 15, 209.
8. Osipov, R.M.; Robich, M.P.; Feng, J.; Liu, Y.; Clements, R.T.; Glazer, H.P.; Sodha, N.R.; Szabo, C.; Bianchi, C.; Sellke, F.W. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2009, 54, 287.
9. Charlton, M.; Thampson J.P. *Pharmacology for Anesthesia and Intensive Care*. 2015, 16, 5.
10. Saida, K.; Van Breemen, C. *Circulation Research*. 1983, 52, 137.
11. Liang, J.C.; Yeh, J.L.; Wang, C.S.; Liou, S.F.; Tsai, C.H.; Chen, I.J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2002, 10, 719.
12. Nguyen, J.-T.; Velazquez, C.A.; Knaus, E.E.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2005, 13, 1725.
13. Takase, H.; Toriyama, T.; Sugiyama, M.; Nakazawa, A.I.; Hayashi, K.; Goto, T.; Sugiura, T.; Ikeda, K.; Sato, K.; Ueda, R.; Dohi, Y. *American Journal of Cardiology*. 2005, 95, 1235.
14. McDonald, T.F.; Pelzer, S.; Trautwein, W.; Pelzer, D.J. *cells Physiology*. 1994, 74, 365.
15. Fukuo, K.; Yang, J.; Yasuda, O.; Mogi, M.; Suhara, T.; Sato, N.; Suzuki, T.; Morimoto, S.; Ogihara, T. *Circulation*. 2002, 106, 356.
16. Sugano, M.; Tsuchida, K.; Makino, N. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2002, 40, 146.
17. Carracedo, A.; Gironella, M.; Lorente, M.; Garcia, S.; Guzmán, M.; Velasco, G.; Iovanna, J.L. *American Association for Cancer Research*. 2006, 66, 6748.
18. García, L.M.; Morales, J.E.T.; Figueredo, Y.N.; Montalbán, M.; Suárez, H.R.C. *Revista Cubana Farmacia*. 2007, 41, 1561.
19. Batkai, S.; Pacher, P. *Pharmacological Research*. 2009, 60, 99.
20. Montecucco, F.; Di Marzo, V. *Trends IN Pharmacological Sciences*. 2012, 33, 331.
21. Ugdyzhkova, D.S.; Krylatov, A.V.; Bernatskaya, N.A.; Maslov, L.N.; Mechoulam, R.; Pertwee, R.G. *Experimental Biology and Medicine*. 2002, 133, 125.

22. Wagner, J.A.; Jarai, Z.; Batkai, S.; Kunos, G. *European Journal of Pharmacology*. 2001, 423, 203.
23. Krylatov, A.V.; Uzhachenko, R.V.; Maslov, L.N.; et al. *Experimental Biology and Medicine*. 2002, 133, 122.
24. Ugdyzhekova, D.S.; Bernatskaya, N.A.; Stefano, J.B.; Graier, V.F.; Tam, S.W.; Mekhoulam, R. *Experimental Biology and Medicine*. 2001, 131, 251.
25. D'Oca, C.R.M.; Coelho, T.; Marinho, T.G.; Hack, C.R.L.; Duarte, R.C.; Silva, P.A.; D'Oca, M.G.M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010, 20, 5255.
26. Ribble, D.; Goldstein, N.B.; Norris, D.A.; Shellman, Y.G.; *BMC Biotechnol* 2005, 5, 201.
27. Kosmider B.; Zyner, E.; Osiecka, R.; Ochocki, J. *Mutation Research*. 2004, 563, 61.
28. Perrelli, M. G.; et al. *World Journal of Cardiology*. 2011, 3, 186.
29. Parang, P.; Singh, B.; Arora, R. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and therapeutics*. 2005, 10, 217.
30. Wolff, J. A.; Budker, V. *Avanços na genética*. 2005, 54, 1.
31. Galvis-Pareja, D.; Zapata-Torres, G.; Hidalgo, J.; Ayala, P.; Pedrozo, Z.; Ibarra, C.; Diaz-Araya, G.; Hall, A.R.; Vicencio, J.M.; Nuñez-Vergara, L.; Lavandero, S. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2014, 279, 53.
32. Horinouchi, Y.; Tsuchiya, K.; Taoka, C.; Tajima, S.; Kihira, Y.; Matsuda, Y.; Shishido, k.; Yoshida, M.; Hamano, S.; Kawazoe, K.; Ikeda, Y.; Ishizawa, K.; Tomita, S.; Tamaki, T.; *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2011, 59, 208.
33. Tenti, G., Parada, E.; Le n, R.; Egea, J.; Martínez-Revelles, S.; Briones, A.M.; Sridharan, V.; Lopez, M.G.; Ramos, M.T.; Mendez, J.C.; *Journal of Medicinal Chemistry* . 2014, 57, 431.
34. Assaly, R.; de Tassigny, A.; Paradis, S.; Jacquin, S.; Berdeaux, A.; Morin, D. *European Journal of Pharmacology*. 2012, 675, 6.
35. Morton, L.W.; Abu-Amsha, Caccetta, R.; Puddey, I. B.; Croft, K.D. *Clinical and Experimental Pharmacology and physiology*. 2000, 27, 152.
36. Yamada, T.; Nagata, K.; Cheng, X.W.; Obata, K.; Saka, M.; Miyachi, M.; Naruse, K.; Nishizawa, T.; Noda, A.; Izawa, H.; Kuzuya, M.; Okumura, K.; Murohara, T.; Yokota, M.; *European Journal of Pharmacology*. 2009, 615, 163.
37. Turkes, C.; Soyut, H.; Beydemir, S. *Pharmacological Reports*. 2014, 66, 74.
38. Misik, V., Stasko, A.; Gergel, D.; Ondrias, K. *Molecular Pharmacology*. 1991, 40, 435.
39. Sugiura, T.; Kondo, T.; Kureishi-Bando, Y.; Numaguchi, Y.; Yoshida, O.; Dohi, Y.; Kimura, G.; Ueda, R.; Rabelink, T.J.; Murohara, T. *Hypertension*. 2008, 52, 491.
40. Arora, D.K.; Mohammed, A.M.; Kowluru, A. *Apoptosis*. 2013, 18, 1.
41. Wang, Y.; Gao, L.; Li, Y.; Chen, H.; Sun, Z.; *International Journal of Molecular Sciences*. 2011, 12, 7569.
42. Broadley, K.J.; Maddock, H.L.; *Journal of Autonomic Pharmacology*, 1996, 16, 363.

43. Krylatov, A.V.; Ugdyzhekova, D.,S.; Bernatskaya, N.A.; Maslov, L.N.; Mekhoulam, R.; Pertwee, R.G.,; et al. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2001,5,131.
44. Wang, P.F.; Jiang, L.S.; Bu, J.; Huang, X.J.; Song, W.; Du, Y.P.; He, B. J. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2012, 59, 301.
45. Li, Q.; Cui,N.; Du, Y.; Ma, H.; Zhang, Y. *PLOS ONE*. 2013, 8, 63386.
46. Milton, N.G.N. *Neuroscience Letters*. 2002, 332, 127.
47. Guzman, M.; Sanchez, C.; Galve-Roperh, I. *Journal of Molecular Medicine*. 2001, 78, 613.
48. Mauler, F.; Mittendorf, J.; Horvath, E.; De Vry, J. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002, 302, 359.
49. Cetrullo, S.; Tantini, B.; Flamigni, F.; Pazzini, C.; Facchini, A.; Stefanelli, C.; Calderera, C.M.; Pignatti, C. *Nutrients*. 2012, 4, 78.
50. Rodrigues, M.O.; Cantos, J.B.; D'Oca, C.R.M.; Soares, K.L.; Coelho, T.S.; Piovesan, L.A.; Russowsky, D.; Silva, P.A.; D'Oca, M.G.M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2013, 21, 6910
51. Treptow, T.G.M.;Figueiró, F.; Jandrey, E.H.F.; Battastini, A.M.O.; Salbego, C.G.; Hoppe, J.B.; Tabora, P.S.; Rosa, S.B.; Piovesan, L.A.; D'Oca, C.R.M.; Russowsky, D.; D'Oca, M.G.M. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015, 95, 552.
52. dos Santos,D.S.; Piovesan, L.A.; D'Oca, C.R.M.; Hack, C.R.L.; Treptow, T.G.M.; Rodrigues, M.O.;Vendramini-Costa, D.B.; Ruiz, A.L.T.G.; de Carvalho, J.E.; D'Oca, M.G.M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2015, 23, 340.
53. Ménard, C.; Pupier, S.; Mornet, D.; Kitzmann, M.; Nargeot J.; Lory, P. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274, 41.
54. Morton, L.W.; Caccetta R.A.A.; PuddeyI, B.; Croft, K.D. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2000, 27, 152.



## **Conclusões Gerais**

Nosso protocolo de indução de isquemia e reperfusão se mostrou eficiente causando danos celulares de estresse oxidativo e morte celular. As três moléculas testadas: anandamida, nifedipina e a 3,5-dipalmitoil-nifedipina conseguiram diminuir os níveis de estresse oxidativo quando comparadas ao grupo jejum+veículo. A viabilidade celular foi melhorada quando as células foram induzidas ao processo de isquemia e reperfusão em presença de anandamida em ambas as doses (10  $\mu$ M e 100  $\mu$ M) e de 3,5-dipalmitoil-nifedipina na concentração de 100  $\mu$ M. Estes três tratamentos também conseguiram diminuir significativamente a morte celular por apoptose e necrose. Demonstra-se portanto, que o processo de hibridização de duas cadeias de ácido palmítico a uma molécula de nifedipina atribuiu um maior efeito cardioprotetor à molécula, reduzindo os danos provocados pela isquemia e reperfusão em cultura de cardioblastos.

Nossa molécula sintetizada a 3,5 dipalmitoil-nifedipina não só diminuiu os ERO em cardioblastos submetidos a H/R, como melhorou a viabilidade celular em até 138,7% de maneira dose-dependente, provavelmente por ter aumentado a lipofilicidade da molécula de nifedipina.

Estudos futuros devem testar se a maior lipofilicidade dada à nifedipina pela hibridização (3,5 dipalmitoil-nifedipina) manteve o efeito esperado da molécula em bloquear os canais de cálcio do tipo L, mantendo assim também a característica anti-hipertensiva da nifedipina. Também seria interessante testar o processo de hibridização com outros ácidos graxos. O tempo da administração das drogas também pode ser testado, em nosso trabalho as drogas foram administradas somente durante a hipóxia, podendo ter outro efeito se a administração for durante todo período de hipóxia e reoxigenação ou somente na reoxigenação.

## **Bibliografia Geral**

- Batkai, S.; Pacher, P. *Pharmacological Research*. 2009, 60, 99.
- Bond, C.E.; Greenfield, S.A. *Glia*. 2007,55, 1348.
- Bonz, A.; Laser, M.; Kullmer, S.; et al. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2013, 41, 657.
- Carracedo, A.; Gironella, M.; Lorente, M.;Garcia, S.; Guzma'n, M.; Velasco,G.; Iovanna, J.L. *American Association for Cancer Research*. 2006, 66, 6748.
- Cetrullo, S.; Tantini, B.; Flamigni, F.; Pazzini, C.; Facchini, A.; Stefanelli, C.; Caldarera, C.M.; Pignatti, C. *Nutrients*. 2012, 4, 78.
- Charlton, M.; Thompson J.P. *Pharmacology for Anesthesia and Intensive Care*. 2015, 16, 5.
- D'Alecy, L.G.; ZelenockELENOK, G.B. *Pathophysiology Of Ischemia And Hypoxia*, Mosby company. 1990, 86, 147.
- D'Oca, C.R.M.; Coelho,T.; Marinho,T.G.; Hack, C.R.L.; Duarte, R.C.; Silva, P.A.; D'Oca, M.G.M.; at al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010, 20, 5255.
- Dringen, R. *Antioxidants redox Signal*. 2005,7,1223.
- Droge, W. *Physiological Reviews*. 2002, 82, 47.
- Evora, P.R.B.; Pearson, P.J.; Seccombe, J.F.; Schaff, H.V. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. 1996, 4. 66.
- Fukuo, K.; Yang, J.; Yasuda, O.; Mogi, M.; Suhara, T.; Sato, N.; Suzuki, T.; Morimoto, S.; Ogihara, T. *Circulation*.2002, 106, 356.
- Galvis-Pareja, D.; Zapata-Torres, G.; Hidalgo, J.; Ayala, P.; Pedrozo, Z.; Ibarra, C.; Diaz-Araya, G.; Hall, A.R.; Vicencio, J.M.; Nuñez-Vergara, L.; Lavandero, S. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2014, 279, 53.
- García, L.M.; Morales, J.E.T.; Figueredo, Y.N.; Montalbán, M.; Suárez, H.R.C. *Revista Cubana Farmacia*. 2007, 41, 1561.
- Go, A.S.; Mozaffarian, D.; Roger, V.L.; Benjamin, E.J.; Berry, J.D.; Blaha, M.J.; et al. *American Heart Association*. 2013, 292, 129.
- Guyton, A. C. *Fisiologia Humana*, sexta ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1988.

Hausenloy, D.J.; Yellon, D.M. *Journal of Clinical Investigation*. 2013, 123, 92.

Heusch, G. *Lancet*. 2012, 381, 166.

Hooper, L.; Summerbell, C.D.; Thompson, R.; Sills, D.; Roberts, F.G.; Moore, H.; Davey Smith, G. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011, 6, 2137.

Horinouchi, Y.; Tsuchiya, K.; Taoka, C.; Tajima, S.; Kihira, Y.; Matsuda, Y.; Shishido, k.; Yoshida, M.; Hamano, S.; Kawazoe, K.; Ikeda, Y.; Ishizawa, K.; Tomita, S.; Tamaki, T.; *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2011, 59,208.

Jiang, M.; Zhang, C.; Wang, J.; et al. *Life Sciences*. 2011, 89, 182.

Karsak, M.; Gaffal, E.; Date, R.; Wang-Eckhardt, L.; Rehnelt, J.; Petrosino, S.; Starowicz, K.; Steuder, R.; Schlicker, E.; Cravatt, B.; Mechoulam, R.; Buettner, R.; Werner, S.; Di Marzo, V.; Tuting, T.; Zimmer, A. *Science*. 2007, 316, 1494.

Kearney, P.M.; Whelton, M.; Reynolds, K.; Muntner, P.; Whelton, P.K.; He, J. *Lancet*. 2005, 365, 217.

Kosmidis, B.; Zyner, E.; Osiecka, R.; Ochocki, J. *Mutation Research*. 2004, 563, 61.

Krylatov, A.V.; Ugdyzhekova, D.,S.; Bernatskaya, N.A.; Maslov, L.N.; Mekhoulam, R.; Pertwee, R.G.,; et al. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2001,5,131.

Krylatov, A.V.; Uzhachenko, R.V. ; Maslov, L.N.; et al. *Experimental Biology and Medicine*. 2002, 133, 122.

Lanas, F.; Avezum, A.; Bautista, L.E.; Diaz, R.; Luna, M., Islam, S.; Yusuf, S. *Revista Brasileira Hipertensão*. 2007, 14, 278.

Lepicier, P.; Bouchard, J.F.; Lagneux, C.; Lamontagne, D. *British Journal of Pharmacology*. 2003, 139, 805.

Liang, J.C.; Yeh, J.L.; Wang, C.S.; Liou, S.F.; Tsai, C.H.; Chen, I.J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2002, 10,719.

Lim, S. S.; Vos, T.; Flaxman, A.D.; et al. *Lancet*. 2012, 380, 2224.

Lloyd-Jones, D.; Adams, R.J.; Brown, T.M.; et al. *American Heart Association*. 2010. 121, 215.

*Journal of Clinical Investigation*. 2013, 123, 92.

McDonald, T.F.; Pelzer, S.; Trautwein, W.; Pelzer, D.J. *cells Physiology*. 1994, 74, 365.

Misra, M.K.; Sarwat, M.; Bhakuni, P.; Tuteja, R.; Tuteja, N. *Medical Science Monitor*. 2009, 15, 209.

Montecucco, F.; Di Marzo, V. *Trends IN Pharmacological Sciences*. 2012, 33, 331.

Montecucco, F.; Lenglet, S.; Braunersreuther, V.; Burger, F.; Pelli, G.; Bertolotto, M.; Mach, F.; Steffens, S. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2009, 46, 612.

Pertwee, R.G. *British Journal of Pharmacology*. 2006, 147, 163.

Pertwee, R.G.; Howlett, A.C.; Abood, M.E.; et al. *Pharmacological Reviews*. 2010, 62, 588.

Powers, S.K.; Murlasits, M.; Wu, M.; Kavazis A.N. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2007, 39, 1529.

Powers, S.K.; Quindry, J.C.; Kavazis, A. N.; Avazis, A. N.; *Free Radical Biology & Medicine*. 2008, 44, 193.

Ribble, D.; Goldstein, N.B.; Norris, D.A.; Shellman, Y.G.; *BMC Biotechnol* 2005, 5, 201.

Rodrigues, M.O.; Cantos, J.B.; D'Oca, C.R.M.; Soares, K.L.; Coelho, T.S.; Piovesan, L.A.; Russowsky, D.; Silva, P.A.; D'Oca, M.G.M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2013, 21, 6910.

Saida, K.; Van Breemen, C. *Circulation Research*. 1983, 52, 137.

Sugano, M.; Tsuchida, K.; Makino, N. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2002, 40, 146.

Takase, H.; Toriyama, T.; Sugiyama, M.; Nakazawa, A.I.; Hayashi, K.; Goto, T.; Sugiura, T.; Ikeda, K.; Sato, K.; Ueda, R.; Dohi, Y. *American Journal of Cardiology*. 2005, 95, 1235.

Tenti, G., Parada, E.; León, R.; Egea, J.; Martínez-Revelles, S.; Briones, A.M.; Sridharan, V.; López, M.G.; Ramos, M.T.; Menéndez, J.C.; *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014, 57, 4313.

Ugdyzhekova, D.S.; Bernatskaya, N.A.; Stefano, J.B.; Graier, V.F.; Tam, S.W.; Mekhoulam, R. *Experimental Biology and Medicine*. 2001, 131, 251.

Ugdyzhekova, D.S.; Krylatov, A.V.; Bernatskaya, N.A.; Maslov, L.N.; Mechoulam, R.; Pertwee, R.G. *Experimental Biology and Medicine*. 2002,133, 125.

Van Golen, R.F.; Van Gulik, T.M.; Heger M. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012,52,1382

Wang, P.F.; Jiang, L.S.; Bu, J.; Huang, X.J.; Song, W.; Du, Y.P.; He, B. J. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2012, 59, 301.

Wagner, J.A.; Jarai, Z.; Batkai, S.; Kunos, G. *European Journal of Pharmacology*. 2001, 423, 203.

Wen, Y.D.; Wang, H.; Kho, S.H.; Rinkiko, S.; Sheng, X.; Shen, H.M.; Zhu, Y.Z. PLoS One. 2013,8,53147.

World Health Organization Global Status Report on Noncommunicable Disease, 2010.

World Health Organization Global Status Disease, 2011.