



**República Federativa do Brasil**  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 1101935-2 B1**

**(22) Data do Depósito: 15/04/2011**

**(45) Data de Concessão: 12/12/2017**



\* B R P I 1 1 0 1 9 3 5 B 1 \*

---

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO ANTIOXIDANTE PARA PRESERVAÇÃO DE ÓRGÃOS E TECIDOS

**(51) Int.Cl.:** A01N 1/02; C09K 15/32

**(52) CPC:** A01N 1/0226,A61K 31/11,A61K 31/191,A61K 31/194,A61K 31/198,A61K 31/7004,A61K 31/715,A61K 33/04,A61K 38/085

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**(72) Inventor(es):** ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS; RUBÉN DARIO SINISTERRA;  
MARIANA MACEDO LAMACIE; JOACHIM GREILBERGER; REINHOLD WINTERSTEIGER;  
MICHAELA SCHWARZ; PETER MOSER; CHRISTIAN BÜCHERL-HARRER; ERNST KAGER

## Composição antioxidante para preservação de órgãos e tecidos

A presente invenção descreve uma composição antioxidante para preservação de órgãos e tecidos, preferencialmente durante a reperfusão após período de isquemia. Mais particularmente a presente tecnologia avalia os efeitos da combinação do alfa-cetoglutarato (AKG), 5-hidroxi-metilfurfural (5-HMF) e Ang (1-7) na preservação de órgãos e tecidos.

Os danos causados pelo processo de isquemia/reperfusão têm papel importante no campo de transplantes, no que concerne à função do órgão pós-transplante e a sobrevivência do paciente.

Devido ao aumento da divergência entre a disponibilidade e a demanda de órgãos, há um interesse especial na otimização do sucesso de cada transplante a longo prazo. Vários fatores de risco, tanto dependentes quanto independentes de antígenos, têm sido identificados como responsáveis pelo desempenho inicial e tardio do órgão transplantado, influenciando, portanto, na qualidade e expectativa de vida dos pacientes pós-transplante (Large SR. Is there a crisis in cardiac transplantation? *The Lancet*, 2002; 359 (9308):803-804; Wilhelm MJ, Pratschke J, Laskowski I, Tilney NL. Ischemia and reperfusion injury *Transplantation Reviews*, 2003;17 (3): 140-157).

Os riscos independentes de antígenos mais significativos que os órgãos transplantados sofrem são episódios transientes de isquemia quente relacionados à hipotensão do doador, ao processo de morte cerebral ou revascularização, bem como um período prolongado de isquemia fria, durante a preservação e estocagem do órgão, seguido de isquemia/reperfusão (Wilhelm MJ, Pratschke J, Laskowski I, Tilney NL. Ischemia and reperfusion injury *Transplantation Reviews*, 2003;17 (3): 140-157; Vassalli G, Gallino A, Weis M, von Scheidt W, Kappenberger L, von Segesser LK, Goy JJ. Alloimmunity and nonimmunologic risk factors in cardiac allograft vasculopathy. *European Heart Journal*, 2003; 24 (13): 1180-1188; Jahania MS, Sanchez JA, Narayan P, Lasley RD, Mentzer RM Jr. Heart preservation for transplantation: Principles and Strategies. *Annals of Thoracic Surgery*, 1999; 68: 1983-1987).

Um dos mecanismos fundamentais da injúria miocárdial I/R (isquemia/reperfusão) é a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS). O peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) formado pela reação do ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) com o óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) apresenta-se como um potente fator que contribui para a injúria I/R (Zweier JL, Hassan Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 2006;70:181-190). As RONS não só causam eventos agudos como miocárdio hibernante, infarto ou arritmias potencialmente letais, como também estão presentes no coração em falha crônica (Giodarno FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. *Journal of Clinical Investigation* 2005;115(3):500-508). Altos níveis de peroxidação de lipídios, encontrados em biópsias miocárdias, indicam a persistência do estresse oxidativo que contribui para a rejeição crônica conhecida como GCAD (graft coronary artery disease), que permanece como a principal causa de morte durante o primeiro ano após transplante de coração (Taylor DO, Edwards LB, Aurora P, Christie JD, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Kucheryavaya AY, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 25th Official Adult Heart Transplant Report-2008. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2008; 27 (9): 943-956; Schimke I, Schikora M, Meyer R, Duebel HP, Modersohn D, Kleber FX, Baumann G. Oxidative stress in the human heart is associated with changes in the antioxidative defense as shown after heart transplantation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2000; 204: 89-96).

A disfunção cardíaca está relacionada ao desequilíbrio entre RONS e NO (razão  $\text{ONOO}^-/\text{NO}$ ). A disponibilidade reduzida de NO e o aumento na formação de  $\text{ONOO}^-$  leva à disfunção vascular (Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research* 2000; 87: 840-844). No coração,  $\text{NO}_2^-$  é capaz de agir como um estoque endógeno de NO, liberado principalmente durante a isquemia, quando a geração de NO a partir de L-arginina pelas enzimas NOS (óxido nítrico sintetase) fica prejudicado. Por outro lado, uma inativação de  $\text{ONOO}^-$  também impede a nitração de aminoácidos como L-arginina formando nitro-L-arginina

conhecido como potencial inibidor da atividade de NOS formado facilmente durante a isquemia/reperfusão.

A modulação da geração das RONS, tanto por aumento dos mecanismos endógenos de defesa, quanto por administração de substâncias capazes de seqüestrar radicais livres, apresentou efeitos benéficos no sistema cardiovascular, não apenas experimentalmente (Supinski GS, Callahan LA. Polyethylene- Glycol Superoxid dismutase prevents endotoxin-induced cardiac dysfunction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2006;173:1240-1247; Gandhi C, Upaganalawar A, Balaraman R. Protection against *in vivo* focal myocardial ischemia/reperfusion injury induced arrhythmias and apoptosis by hesperidin. *Free Radical Research* 2009;43(9):817-827), como também clinicamente, particularmente em pacientes afetados por uma sobrecarga de radicais livres (Saliba W, El Fakih R, Shaheen W. Heart failure secondary to selenium deficiency, reversible after supplementation. *International Journal of Cardiology* 2008, doi: 10.1016/j.ijcard.2008.11.095; Odermarsky M, Lykkesfeldt J, Liuba P. Poor vitamin C status is associated with increased media thickness, decreased microvascular function, and delayed myocardial repolarization in young patients with type 1 diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition* 2009;90:447-452).

Recentemente demonstrou-se que o estresse oxidativo tem papel importante na resposta ao estresse cirúrgico que leva ao bloqueio do sistema regulador de NO. Principalmente durante transplantes, quando estão presentes episódios prolongados de I/R, a redução da atividade de NOS é agravada. A modulação do estresse oxidativo pela administração de antioxidantes mostrou reduzir a morbidade e a mortalidade em várias populações de pacientes (Humphrey CD, Pittman FE. A simple methylene blue-azure II basic fuchsin stain for epoxy- embedded tissue sections. *Stain Technology* 1974; 42:9-14).

A presente invenção compreende uma composição contendo Angotensina (1-7) em solução de infusão antioxidante (SIA) que contém ácido alfa-cetoglutarico ( $\alpha$ KG), 5-hidroxi-metil-furfural (5 HMF), traços de N-acetil-selênio-L-metionina e N-acetil-L-metionina

O  $\alpha$ KG é um intermediário do ciclo do ácido cítrico e localiza-se no citosol e na membrana mitocondrial interna. Participa de vários mecanismos como (i) a transaminação do  $\text{NH}_4^+$ , (ii) a descarboxilação oxidativa do succinil-CoA, gerando  $\text{CO}_2$  e  $\text{NADH}+\text{H}^+$ , o qual transfere sua redução equivalente à ubiquinona, necessária para a síntese de ATP, (iii) a gliconeogênese do lactato e (iv) o seqüestro do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Assume-se que  $\alpha$ KG também interaja com o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Halliwell B. and Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine, *Third Edition*, 1999, Oxford Press). Formas nitradas ou oxidadas da arginina pelo  $\text{ONOO}^-$  são capazes de inibir a produção de NO ao bloquear NOS. Além disto, uma modificação direta de NOS por  $\text{ONOO}^-$  resulta em uma superprodução de radicais do ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), que reage com NO formando  $\text{ONOO}^-$  (Sun J, Druhan LJ, Zweier JL. Dose-dependent Effects of Reactive Oxygen and Nitrogen Species on the Function of Neuronal Nitric Oxide Synthase. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 471:126-33).

Foi demonstrado que o conteúdo miocárdico de  $\alpha$ KG diminui durante cirurgias cardíacas e que o fornecimento desta substância, adicionada à cardioplegia sanguínea durante a ponte de safena, pode reduzir anormalidades metabólicas e, portanto, levar à proteção cardíaca (Kjellmann U, Bjoerk K, Ekroth R, Karlsson H, Jagenburg R, Nilsson F, Svensson G, Wernerman J.  $\alpha$ -ketoglutarate for myocardial protection in heart surgery. *The Lancet* 1995;345:552-55).

O 5-HMF foi recentemente descrito como um antioxidante ativo *in vitro* que leva a uma redução na oxidação de proteínas por radicais livres, como  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ou RONS, como  $\text{ONOO}^-$ . Além disto, o 5-HMF inibiu a atividade da mieloperoxidase e aumentou a expressão de enzimas de glutatona e da superóxido dismutase (Li YX, Yong L, Zhong-Ji Q, Moon-Moo K, Se-Kwon K. In Vitro Antioxidant Activity of 5-HMF Isolated from Marine Red Alga *Laurencia undulate* in Free Radical Mediated Oxidative Systems. *J. Microbiol Biotechnol*. 2009;19(11):1319-1327).

A administração adequada de traços do mineral essencial selênio (nível plasmático de 79-90 µg/l) é requerida para a atividade ótima de enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase e tioredoxina redutase. O estresse oxidativo aumentado devido à deficiência de selênio tem sido correlacionado a falhas no coração (Saliba W, El Fakih R, Shaheen W. Heart failure secondary to selenium deficiency, reversible after supplementation. *International Journal of Cardiology*, 2008, doi: 10.1016/j.ijcard.2008.11.095; Navas Acien A, Bleys J, Guallar E. Selenium Intake and Cardiovascular Risk: What is New? *Current Opinion in Lipidology*, 2008; (19):43-49).

Outra substância cardioprotetora largamente descrita é o peptídeo endógeno Angiotensina (1-7) [Ang (1-7)], um produto biologicamente ativo do sistema renina-angiotensina (Santos RA, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2005; 14: 1019-1031). Vários estudos experimentais mostraram seus efeitos antiarrítmicos, restauradores da função contrátil pós-isquêmica, antiproliferativos e vasodilatadores (Ferreira AJ, Santos RAS, Almeida AP. Angiotensin (1-7): Cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*, 2001; 38 (2): 665-668; Ferreira AJ, Santos RAS, Almeida AP. Angiotensin (1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2002; 35: 1083-1090; Tallant EA, Diz DI, Ferrario CM. Antiproliferative actions of angiotensin (1-7) in vascular smooth muscle. *Hypertension*, 1999; 34: 950-957; Sampaio WO, Santos RAS, Faria-Silva R, Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial Nitric Oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*, 2007 49: 185-192).

A Ang (1-7) foi testada em estudos clínicos e se mostrou eficiente e segura para o ser humano pelo menos até a dose diária máxima de 100 µg/kg. (Ueda S, Maemoto SM, Wada A, Ishii M, Brosnihan KB, Umemura S. Angiotensin-(1-7) potentiates bradykinin-induced vasodilatation in man. *Journal of Hypertension*, 2001; 19(11):2001-2009; Sasaki S, Higashi Y, Nakagawa K, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T. Effects of angiotensin-(1-7) on forearm circulation in normotensive subjects and patients with essential hypertension.

Hypertension, 2001; 38 (1):90-94; Rodgers KE, Oliver J, di Zerega GS. Phase I/II dose escalation study of angiotensin 1-7 [A(1-7)] administered before and after chemotherapy in patients with newly diagnosed breast cancer. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2006; 57:559-568; Rodgers KE, Xiong S, di Zerega GS. Effect of angiotensin II and angiotensin (1-7) on hematopoietic recovery after intravenous chemotherapy. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2003; 51: 97-106; Soto- Pantoja DR, Menon J, Gallagher PE, Tallant EA. Angiotensin (1-7) inhibits tumor angiogenesis in human lung cancer xenografts with a reduction in vascular endothelial growth factor. Molecular Cancer Therapeutics 2009 Jun; 8(6):1676-1683).

A presente invenção avalia o mecanismo e a eficácia da solução de infusão antioxidante (SIA) em combinação com Ang (1-7) na função cardíaca e na proteção miocárdica durante o processo de transplante de órgão. A Ang (1-7) apresenta efeitos vasodilatadores, antiproliferativos e antiemorrágicos. Estas propriedades são reduzidas durante a isquemia/reperfusão. A solução de infusão antioxidante (SIA) protege a nitração e portanto protege a função da angiotensina (1-7), especialmente na tirosina e na arginina, proibindo a inativação de NOS.

No estado da técnica, existem descrições de diversas composições para a preservação de órgãos e tecidos, mas nenhuma se assemelha à descrita na presente invenção. Como exemplo, citam-se os documentos abaixo.

O documento **FR 2715028** – Solution for preserving organs, tissues etc containing amino acids – descreve o uso de uma composição contendo ao menos um aminoácido que apresenta ação antiproteolítica para preservação de material biológico.

O documento **CA 2725020** - AQUEOUS SOLUTION FOR THE PRESERVATION OF TISSUES AND ORGANS – descreve uma solução contendo carvedilol, tacrolimus e trimetazidina.

O documento **US 2011008762** - Methods for Preserving Organs and Tissues – descreve solução contendo inibidor de calicreína.

O documento **EP 2269449** - A composition for the protection and preservation of organs, tissues or cells and the use thereof – descreve solução contendo um polifenol.

O documento **MX 2008007382** - ORGAN PRESERVATION AND/OR  
5 PERFUSION – descreve solução contendo inibidores de Proteína cinase C.

O documento **US 5498427** - Solutions for the perfusion, preservation and reperfusion of organs – descreve solução contendo glutathiona reduzida ou N-acetilcisteína.

O documento **US 5407793** - An aqueous heart preservation and  
10 cardioplegia solution – descreve solução contendo  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e adenosina.

O documento **CA 1170994** - PROTECTIVE SOLUTION FOR THE HEART AND KIDNEYS AND OTHER ORGANS AND METHOD FOR ITS PREPARATION – descreve solução contendo alfa-cetoglutarato, histidina, hidrocloreto de histidina e triptofano.

O documento **WO2006/127902** – PRESERVATION SOLUTION FOR  
15 ORGANS AND BIOLOGICAL TISSUES – descreve solução contendo uma prostaglandina, um doador de óxido nítrico, um agente formador de glutathiona, L-arginina e alfa-cetoglutarato.

**BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

**Figura 1– (A)** Efeito de SIA, nas concentrações de 5, 10 e 20%, sobre a duração e incidência de arritmias de reperfusão (medido em ASI: índice de severidade de arritmia). **(B)** Porcentagem de arritmias irreversíveis em corações perfundidos com KRS contendo SIA nas concentrações de 5, 10 e 20%. **(C)** Efeito de SIA 5% e Ang (1-7) 0,22 nmol/L sobre a duração e incidência de arritmias de reperfusão. **(D)** Porcentagem de arritmias irreversíveis em corações perfundidos com KRS contendo SIA 5% e Ang (1-7) 0,22 nmol/L.

**Figura 2– (A,B)** Efeito de SIA, nas concentrações de 5, 10 e 20%, sobre o fluxo da coronária durante o tempo basal, a oclusão e a reperfusão. **(C,D)** Efeito de SIA 5% e Ang (1-7) 0,22 nmol/L sobre o fluxo da coronária durante o tempo basal, a oclusão e a reperfusão.

**Figura 3–** Efeito de SIA, nas concentrações de 5, 10 e 20%, sobre a tensão sistólica **(A)** e diastólica **(B)** durante e após a oclusão. Efeito de SIA 5% e Ang (1-7) 0,22 nmol/L sobre a tensão sistólica **(C)** e diastólica **(D)** durante e após a oclusão.

**Figura 4–** Efeito de SIA, nas concentrações de 5, 10 e 20%, sobre a concentração de nitrito.

**Figura 5–** Determinação de sequestro de peroxinitrito (ONOO-) por SIA pela técnica de quimioluminescência.

**Figura 6–** Determinação de sequestro de peroxinitrito (ONOO-) por Ang (1-7) pela técnica de quimioluminescência.

**Figura 7–** Medida do fluxo da coronária na isquemia fria após uso de SIA 20% sozinho e da combinação de SIA 20% com Ang. (1-7).

**Figura 8–** Medida da tensão sistólica na isquemia fria após o uso de SIA 20% sozinho e da combinação de SIA 20% com Ang. (1-7).

**Figura 9–** Micrografia eletrônica de varredura da camada endothelial do endocárdio de coração de rato. **(A)** Coração de rato nativo, recentemente excisado, sem cardioplegia, sem reperfusão. **(B)** Células endoteliais de coração

de rato perfundido com SIA 20% mais Angiotensin (1-7). **(C)** Células endoteliais de coração de rato perfundido com SIA 20%. **(D)** Células endoteliais de coração de rato perfundido com Angiotensina (1-7). **(E)** Células endoteliais de coração de rato perfundido com solução Krebs Ringer (controle).

- 5 **Figura 10**– Fotomicrografia. **(A)** Coração de rato nativo, recentemente excisado, sem cardioplegia, sem reperfusão. **(B)** Células endoteliais de coração de rato perfundido com SIA 20% mais Angiotensina (1-7). **(C)** Células endoteliais de coração de rato perfundido com SIA 20%. **(D)** Células endoteliais de coração de rato perfundido com Angiotensina (1-7). **(E)** Células endoteliais
- 10 de coração de rato perfundido com solução Krebs Ringer (controle).

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

Na presente tecnologia é avaliada a eficácia da combinação de SIA (Tabela 1) com Ang (1-7) na preservação de órgãos e tecidos durante o processo de transplante de órgão.

- 5 Para testar os efeitos dessa combinação os experimentos foram realizados com perfusão de corações tanto com apenas KRS e Ang (1-7) 0,22 nmol/L (n=5), quanto com a mesma solução em combinação com SIA 5% (n=5). A concentração de Ang (1-7) foi escolhida de acordo com estudos anteriores (Ferreira AJ, Santos RAS, Almeida AP. Angiotensin (1-7):
- 10 Cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. Hypertension, 2001; 38 (2): 665-668; Ferreira AJ, Santos RAS, Almeida AP. Angiotensin (1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2002; 35: 1083-1090).

**Tabela 1 – Composição da solução SIA**

COMPOSTO	QUANTIDADE	CONCENTRAÇÃO (mM)
$\alpha$ -cetoglutarato	9,0 g	61,64
5-hidroxi-metilfurfural	3,0 g	23,79
N- Acetil-Selênio-L- metionina	2,0 mg	0,0084
N-Acetil-L -metionina	100,0mg	0,52
Glicose	30,0 g	166,52
H <sub>2</sub> O	1 litro	

- 15 A presente invenção pode ser melhor compreendida, de forma não limitante, através dos exemplos que se seguem:

### **Exemplo 1: Preparação e perfusão do coração isolado (isquemia quente)**

Para preparo do coração isolado (isquemia quente), ratos Wistar machos, com 12-14 semanas de idade, 250-300 g, foram decapitados 10 a 15

minutos após injeção intraperitoneal de 400 IU de heparina. Foi realizada então a toracotomia e o coração foi rapidamente separado de suas estruturas vizinhas e excisado. Através de uma ponte aórtica de  $1,0 \pm 0,3$  cm, o coração foi conectado ao aparelho Langendorffe perfundido com solução Krebs Ringer (KRS). O fluido de perfusão foi mantido a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , com pressão de 70 mmHg e oxigenação constante (5%  $\text{CO}_2/95\% \text{O}_2$ ). Um transdutor de força (modelo TSD 104 A, Biopac) foi conectado ao ápice dos ventrículos para registrar a força contrátil (tensão, g) em um computador, através de um sistema de aquisição de dados (Biopac System, Santa Barbara, CA). Aplicou-se aos corações uma tensão diastólica de 1,0 a 0,2g. A atividade elétrica foi gravada com um ECG (Nihon Kohden, Japan). O fluxo coronário foi medido coletando-se a perfusão após um período de 1 minuto em intervalos regulares. Os corações foram perfundidos por um período inicial de 20 minutos com KRS. Após este período, os corações foram perfundidos por um período adicional de 20 minutos com KRS (controle, n=5) ou com KRS contendo SIA (**Tabela 1**) nas concentrações de 5%; 10% ou 20% (para cada grupo, n=5).

Após o período de equilíbrio, a artéria coronária anterior descendente esquerda (LAD) foi ligada pelo método descrito por Lubbe (Lubbe WF, Davies PS, Opiel LH. Ventricular arrhythmias associated with coronary antifibrillatory action of antiarrhythmic agents. *Cardiovascular Research*, 1978; 12: 212–220), abaixo do apêndice auricular esquerdo juntamente com as veias adjacentes. A ligadura foi liberada após 15 minutos, e a perfusão com KRS foi realizada por mais 30 minutos. As arritmias cardíacas foram definidas como a presença de taquicardia ventricular e/ou fibrilação ventricular após a liberação da ligadura da artéria coronária. A incidência e a duração das arritmias pós-isquêmicas foram observadas em cada experimento e classificadas de acordo com o índice de severidade de arritmia (ASI) (Bernauer W, Ernenputsch I. Antagonistic effects of alpha –adrenoceptor blocking agents on arrhythmias, enzyme release and myocardial necrosis in isolated rat hearts with coronary occlusion and reperfusion. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 1988; 338: 88-95).

Nas concentrações de 5 e 10%, SIA não produziu efeito significativo na duração e incidência de arritmias de reperfusão. Porém, uma redução significativa das arritmias pós-isquêmicas foi observada quando SIA 20% foi aplicado na solução de perfusão (**Figura 1A**). O efeito de SIA 20% foi evidenciado por um decréscimo de aproximadamente 90% na ASI ( $1,2 \pm 0,489$  contra  $12,0 \pm 0,003$  para o grupo controle). Além disto, a ocorrência de arritmias irreversíveis foi abolida nos corações perfundidos com KRS contendo SIA na maior concentração testada (**Figura 1B**). Em 100% dos corações controle observou-se taquicardia ventricular e fibrilação durante a reperfusão, enquanto SIA 20% inibiu a geração destas arritmias em 40% dos corações.

O uso de Angiotensina (1-7) sozinha reduziu a ASI para  $5,60 \pm 1,93$  ( $p = 0,01$ ) comparada com o controle, enquanto que o uso de Angiotensina (1-7) em combinação com SIA 5% apresentou uma alta redução da ASI, para  $4,67 \pm 0,66$  ( $p = 0,0001$ ; **Figura 1C**). Além disto, a ocorrência de arritmias irreversíveis foi abolida em corações perfundidos com KRS contendo a combinação de Ang (1-7) com SIA 5% (**Figura 1D**).

SIA 20% induziu um aumento significativo e imediato no fluxo da coronária durante o tempo basal, a oclusão e a reperfusão, enquanto SIA 5% induziu apenas um pequeno, mas significativo, aumento no fluxo da coronária (**Figura 2A e 2B**). Porém, não foram observadas mudanças no fluxo com SIA 10%.

Os grupos que receberam SIA sozinho ou em combinação com Ang (1-7)  $0,22$  nmol/L apresentaram um aumento no fluxo da coronária quando comparados com o controle ou com Ang (1-7) sozinha. O aumento foi significativamente maior usando a combinação SIA 5% + Ang (1-7)  $0,22$  nmol/L, comparado com SIA 5% sozinho (**Figuras 2C e 2D**).

SIA 20% aumentou significativamente a tensão sistólica durante todo o experimento. Em contrapartida, SIA 5% e 10% não melhoraram a função contrátil durante e após a oclusão (**Figura 3A**).

A função diastólica foi preservada durante todo o experimento com uso de SIA 20%, mas SIA 5% e 10% aumentaram a tensão diastólica durante a reperfusão (**Figura 3B**).

A combinação SIA 5%+ Ang (1-7) 0,22 nmol/L apresentou um aumento significativo na tensão sistólica (**Figura 3C**), mas não afetou a tensão diastólica (**Figura 3D**).

#### **EXEMPLO 2 - Medida de Nitrito**

Para determinar se SIA ou seus ingredientes afetam de alguma maneira o nitrito ou NO, cinco amostras de perfundidos foram coletadas no período basal (15 minutos), no período de oclusão (5 e 15 minutos) e no período de reperfusão (5 e 25 minutos). As amostras foram imediatamente estocadas a -80°C para posterior medida de nitrito, que foi realizada utilizando-se 2, 3-Diaminonaftaleno (DAN) na perfusão, como descrito por Misko (Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM, Currie MG. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Analytical Biochemistry*, 1993; 214(1):11-6). As concentrações de nitrito no período basal, de oclusão e de reperfusão são significativamente maiores com o uso de SIA 10% e 20%, se comparadas com o controle (KRS) devido ao efeito do SIA sobre a conversão do peroxinitrito a nitrito (**Figura 4**). O consumo de peroxinitrito pelo alfa-cetoglutarato, um dos principais ingredientes de SIA, levou à formação de ácido succínico e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). No coração,  $\text{NO}_2^-$  age como um estoque endógeno de NO, liberado especialmente durante a isquemia, quando a geração de NO a partir de L-arginina pelas enzimas NOS é abolida.

#### **EXEMPLO 3 - Determinação de sequestro de peroxinitrito (ONOO-) por SIA e por Ang (1-7) pela técnica de quimioluminescência**

ONOO- foi preparado de acordo com Hughes and Nicklin (Hughes MN, Nicklin HG. The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *Journal of the Chemical Society*, 1968, 450-452). A concentração de ONOO- foi determinada em espectrofotômetro 302nm, com um coeficiente de extinção de 1670 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. O consumo de peroxinitrito foi medido com a técnica de luminescência de acordo com Radi e cols. (Radi R,

Consgrove TP, Beckman JS, Freeman BA. Peroxynitrite- induced luminol chemiluminescence. *Biochemical Journal*, 1993; 290:51-57). 5  $\mu$ L de 30mM ONOO- foram transferidos para uma placa branca de microtitulação de 96 poços (Nunc, Denmark). 0, 5, 7,5, 10, 15, 20 e 25% da solução de SIA foram pipetados diretamente sobre o ONOO-. Imediatamente após, adicionou-se o luminol (volume total de reação de 200 $\mu$ L) para detecção da quimioluminescência em leitor de luminescência BMG (Lumistar, BMG, Germany) a cada segundo, entre 0 e 40 segundos. O sinal de luminescência foi expresso em contagem por segundo (cps).

10 Como mostrado na **Figura 5**, SIA foi capaz de diminuir o dano oxidativo de maneira dose dependente: 5% de SIA reduziram o sinal para 58% comparado com o controle; 7,5% para 16%, 10% para 11%, 15% para 3%, 20% para 1% e 25% para quase 0%.

Estudos de interação de ONOO- com Ang. (1-7) foram medidos pelo mesmo procedimento, usando diferentes concentrações de Ang.(1-7) (0 – 0,16 mM) dissolvida em PBS 10 mM pH 7,4.

Como mostrado na **Figura 6**, Ang (1-7) foi capaz de reagir com ONOO- em concentrações muito baixas. O sinal de quimioluminescência de ONOO- com 0,8 mM Ang (1-7) foi reduzido para quase 50% comparado com o controle ( $p < 0,001$ ). Curiosamente, com concentrações mais baixas de Ang (1-7) a inibição aumentou: 63,4% com 0,16 mM Ang (1-7) e 75% com 0,04 mM Ang (1-7), comparada com o controle ( $p < 0,001$ ).

Os resultados de quimioluminescência mostram que a Ang (1-7) contendo os aminoácidos L-tirosina e L-arginina reage rapidamente com ONOO-. Os efeitos sinérgicos de SIA impedem a nitração da Ang (1-7) e portanto prolongam a função da Ang (1-7) levando a um aumento significativo do fluxo da coronária e da tensão sistólica e um decréscimo significativo da tensão diastólica durante a isquemia quente e a isquemia fria.

#### **EXEMPLO 4 – Preparação e perfusão de coração isolado (isquemia fria)**

30 A laparotomia foi realizada em ratos previamente anestesiados com 0,1 ml/100 mg de sódio tiopental. A veia cava inferior (IVC) foi exposta e 400 IU de

heparina foram administrados por via intravenosa. Após 1 minuto, a IVC e a aorta abdominal (AAo) foram cortadas para exsanguinação.

5 A toracotomia foi realizada rapidamente, o timo foi removido cuidadosamente e a veia cava superior foi cortada 1-2 mm antes de sua confluência para o átrio direito. O sangue quente foi removido da cavidade torácica. O tronco braquiocefálico foi grampeado a 2-3 mm após sua saída do arco aórtico. Um segundo grampo foi colocado entre a saída do tronco braquiocefálico e a artéria carótica esquerda.

10 A solução cardioplégica Celsior® (IMSTIX SANGSTADT, France) foi aplicada via tronco braquicefálico. A cardioplegia foi realizada sem ar e a uma pressão constante (5mL /min). Simultaneamente, o coração foi resfriado usando-se solução cardioplégica e gelo. Após a detenção cardíaca, os corações foram retirados através de corte da AAo, do IVC 1-2 mm antes de sua confluência com RA e os pulmões.

15 Os corações foram estocados em (1) Celsior® (n=10), ou em Celsior® contendo: (2) 20% de SIA (n= 6), (3) (0,22 nmol/L) Ang. (1-7) (n=7) ou (4) a combinação de ambos (n=4), a 4°C por 6 horas antes de serem conectados ao sistema de perfusão Langendorff.

20 Após curto período de estabilização (10 minutos, perfusão KRS), os corações foram perfundidos por 60 minutos com (1) KRS (controle, n=10), (2) KRS + SIA 20% (SIA, n= 8), (3) KRS + Ang-(1-7) (0,22 nmol/L) (Angiotensina, n=8) e (4) KRS + Ang-(1-7) (0,22 nmol/L) + SIA 20% (Ang + SIA, n= 5). Os primeiros 10 minutos de estabilização não foram usados para análise estatística.

25 Imediatamente após a reperfusão, o ventrículo direito foi retirado e fixado para histologia e microscopia eletrônica.

O fluxo da coronária foi aumentado por SIA 20% sozinho (\* $p < 0,001$  vs. controle e  $^{\circ}p < 0,001$  vs. Ang (1-7)) e pela combinação de SIA 20% com Ang. (1-7) (#  $p < 0,003$  vs. SIA + Ang (1-7), **Figura 7**).

A tensão sistólica foi aumentada pelo uso da combinação de SIA 20% com Ang. (1-7) (\* $p < 0,001$  vs. controle, **Figura 8**).

#### **EXEMPLO 5 – Análise Histológica**

Para exame histológico, blocos de tecido do ventrículo esquerdo foram  
5 fixados em glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,1  
mol/L pH 7,2, embebidos em historesina (LKB, Bromma, Sweden) e cortados  
para obtenção de seções de 4 $\mu$ m, que foram coradas com uma mistura de  
metileno blue-azure II e fucsina básica (Humphrey CD, Pittman FE. A simple  
methylene blue-azure II basic fuchsin stain for epoxy- embedded tissue  
10 sections. Stain Technology, 1974; 42:9-14).

Para análise ultraestrutural, os corações de rato foram fixados em uma  
mistura de glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2%, pós-fixados em OsO<sub>4</sub> 2  
%, desidratados, secos e salpicados com ouro. Micrografias eletrônicas  
representativas foram capturadas usando DSM 950 (Zeiss). Todos os grupos  
15 foram comparados com um coração de rato nativo, recentemente excisado.

Ao nível ultraestrutural, a morfologia das células de corações recém-  
excisados e imediatamente fixados (**Figura 9A**) mostrou-se muito semelhante à  
das células endoteliais de corações perfundidos com SIA + Ang (1-7) (**Figura  
9B**). As células endoteliais de ambos os grupos mostraram uma morfologia  
20 poligonal com várias microvilosidades na superfície celular e zonas de contato  
claramente visíveis entre as células. As células endoteliais de corações  
perfundidos com solução Krebs exibiram uma superfície celular mais lisa com  
poucas microvilosidades (**Figura 9E**).

O exame histológico do ventrículo esquerdo exposto a SIA e Ang. (1-7)  
25 apresentou endotélio e tecido conectivo subjacente ao endocárdio intactos. As  
células musculares do coração também apresentaram aparência normal  
(**Figura 10B**). A parede cardíaca exposta à solução Krebs (Figura 10E)  
continha, além de áreas com morfologia normal, regiões com alterações  
estruturais, especialmente em áreas de células musculares do endocárdio e  
30 subendocárdio. Além disto, o tecido conectivo adjacente à lâmina endotelial  
apresentou processos degenerativos refletidos por falhas (gaps). Alguns

cardiomiócitos apresentaram níveis variados de desintegração, chegando à miocitólise, refletida pela vacuolização.

### **Análise estatística**

Os dados são mostrados como a média  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA seguido do teste de Newman Keul or de by two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## REIVINDICAÇÕES

1. **COMPOSIÇÃO ANTIOXIDANTE** caracterizada por compreender uma combinação de alfa-cetogluturato, 5-hidroxi-metilfurfural, N- Acetil-Selênio-L-metionina, N-Acetil-L -metionina, Glicose e Angiotensina (1-7).

2. **COMPOSIÇÃO ANTIOXIDANTE**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo alfa-cetogluturato estar presente preferencialmente a 61.64 mM.

3. **COMPOSIÇÃO ANTIOXIDANTE**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo 5-hidroxi-metilfurfural estar presente preferencialmente a 23.79 mM.

4. **COMPOSIÇÃO ANTIOXIDANTE**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo N- Acetil-Selênio-L-metionina estar presente preferencialmente a 0.0084 mM.

5. **COMPOSIÇÃO ANTIOXIDANTE**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo N-Acetil-L -metionina estar presente preferencialmente a 0.52 mM.

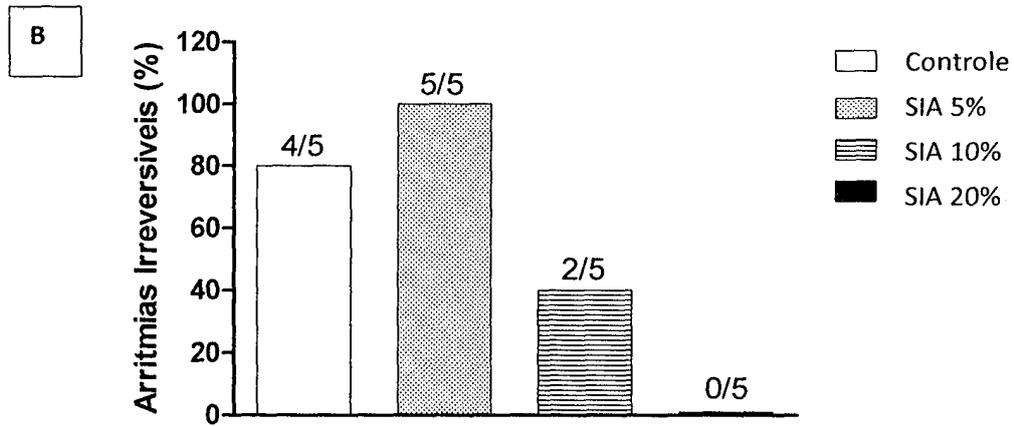
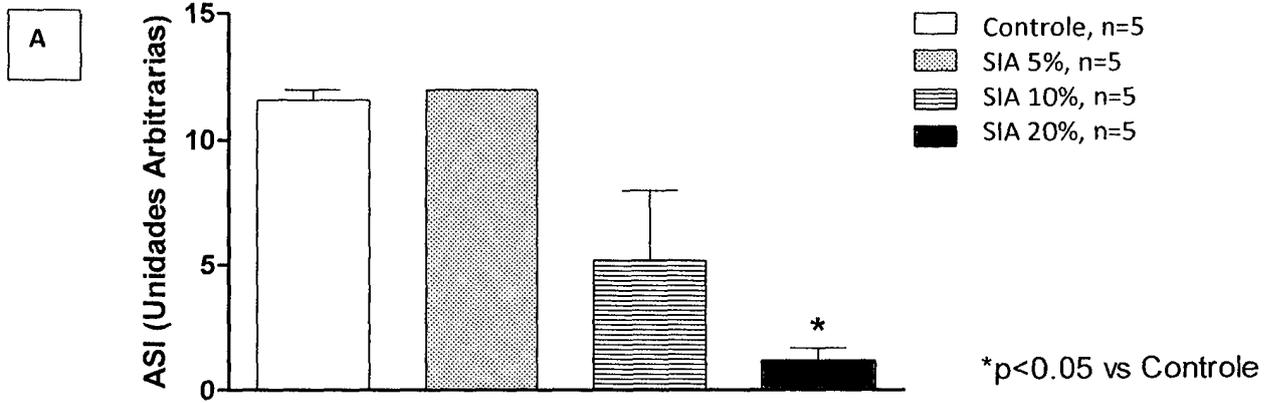
6. **COMPOSIÇÃO ANTIOXIDANTE**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo Glicose estar presente preferencialmente a 166.52 mM.

7. **COMPOSIÇÃO ANTIOXIDANTE**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo Angiotensina (1-7) estar presente preferencialmente a 0.22 nM.

8. **USO DA COMPOSIÇÃO ANTIOXIDANTE**, conforme definido pelas reivindicações 1 a 7, caracterizado por ser na preservação de órgãos e tecidos.

9. **USO DA COMPOSIÇÃO ANTIOXIDANTE**, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por ser preferencialmente na preservação de órgãos e tecidos durante a reperfusão após período de isquemia.

## FIGURAS



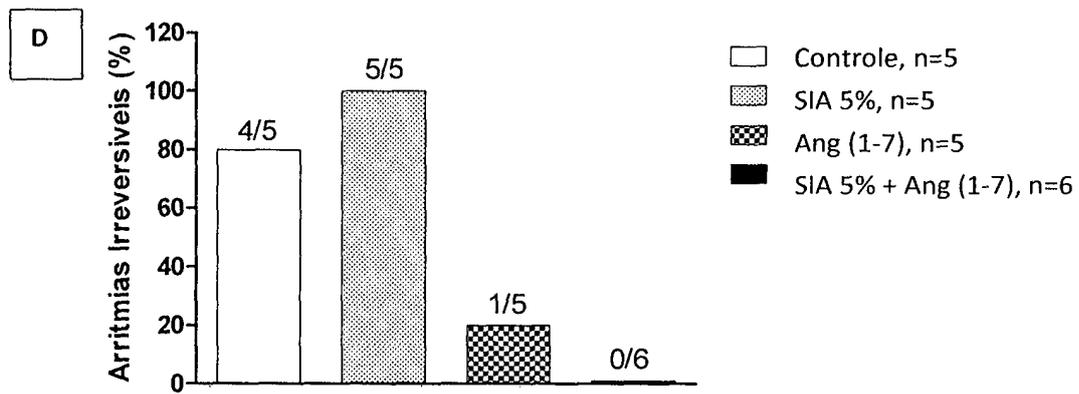
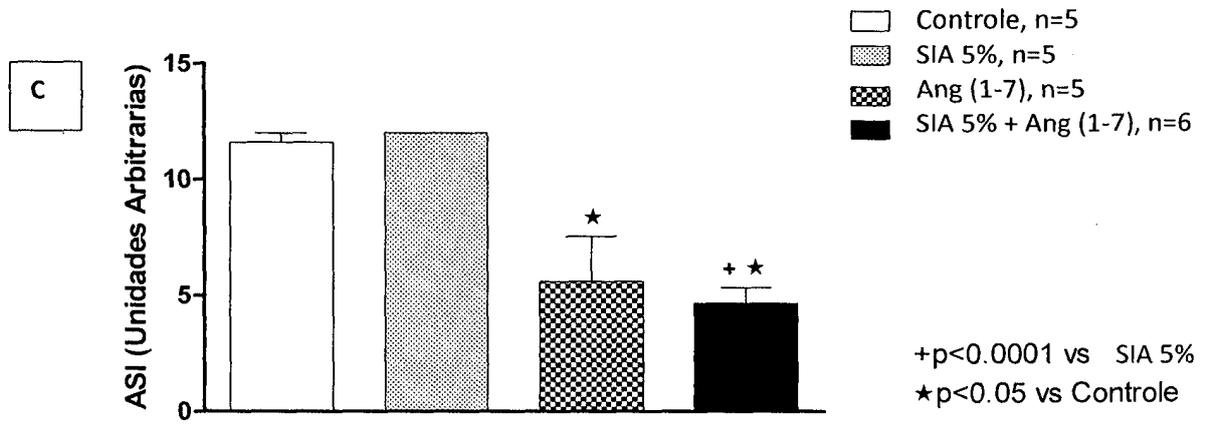
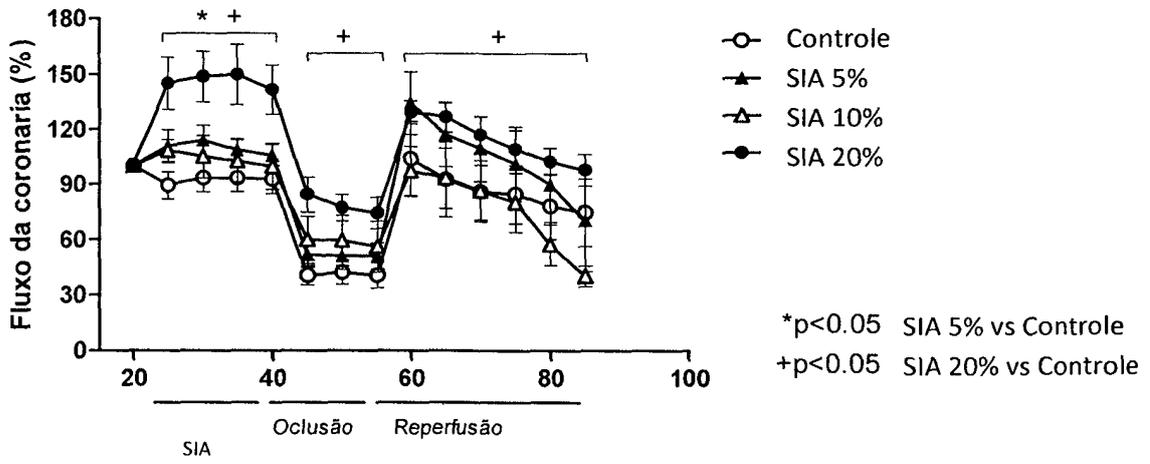
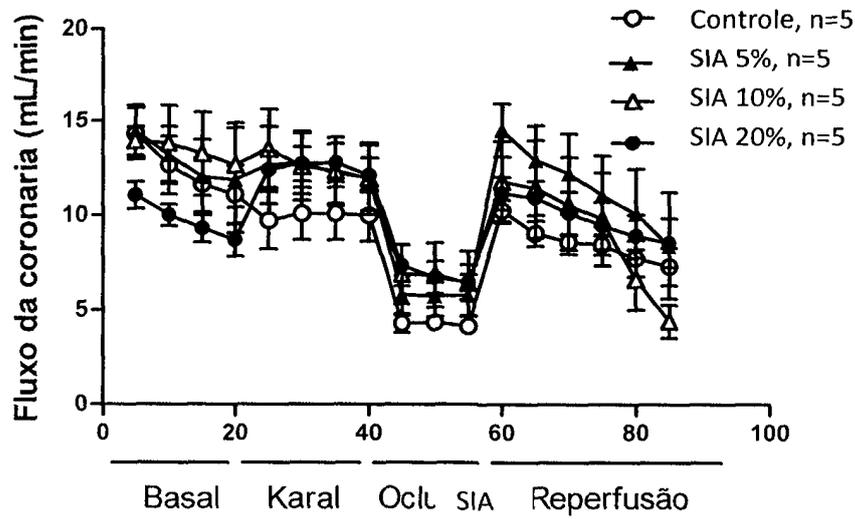


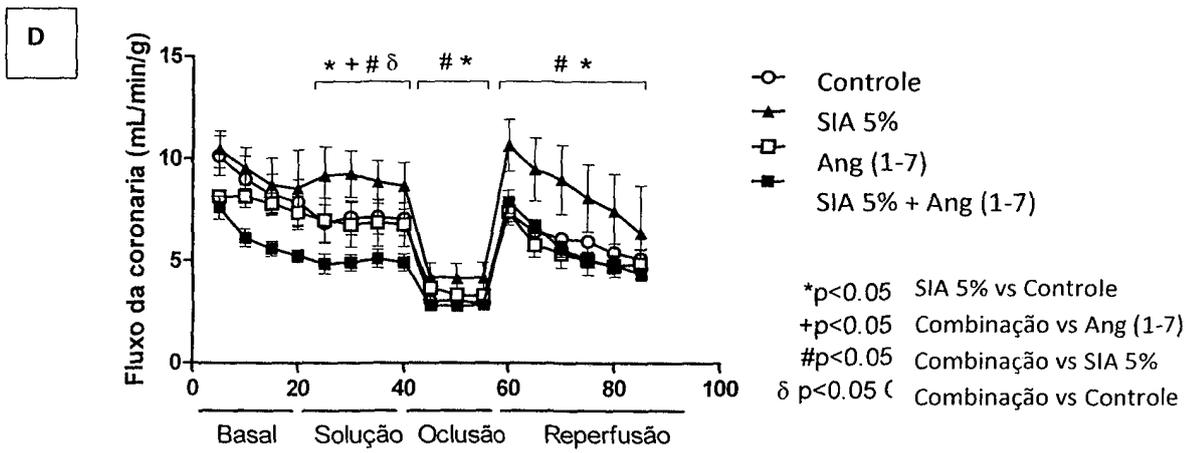
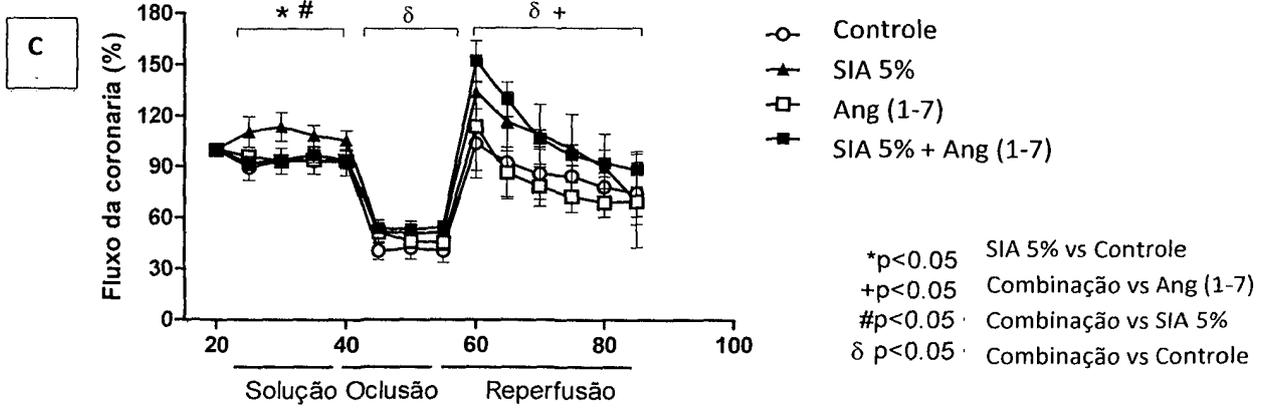
Figura 1

A



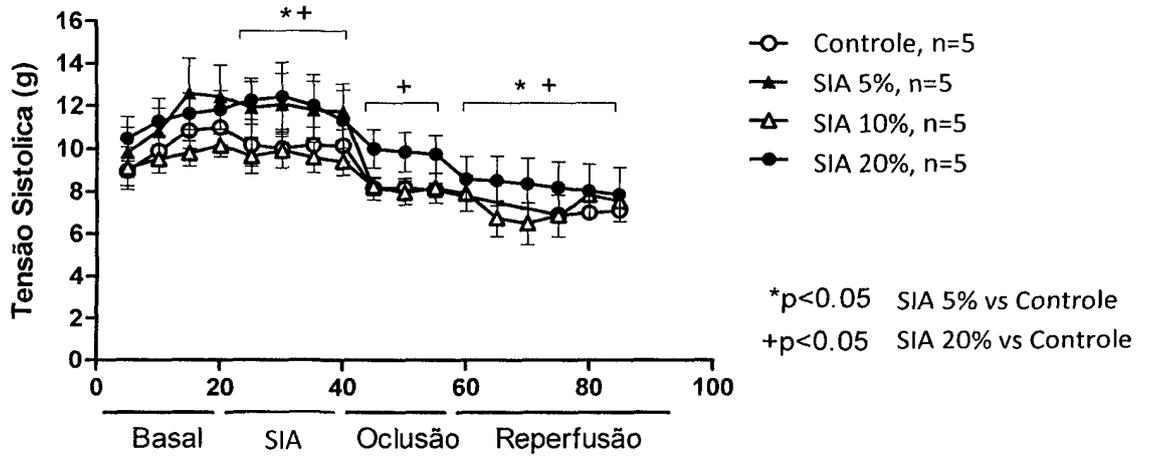
B



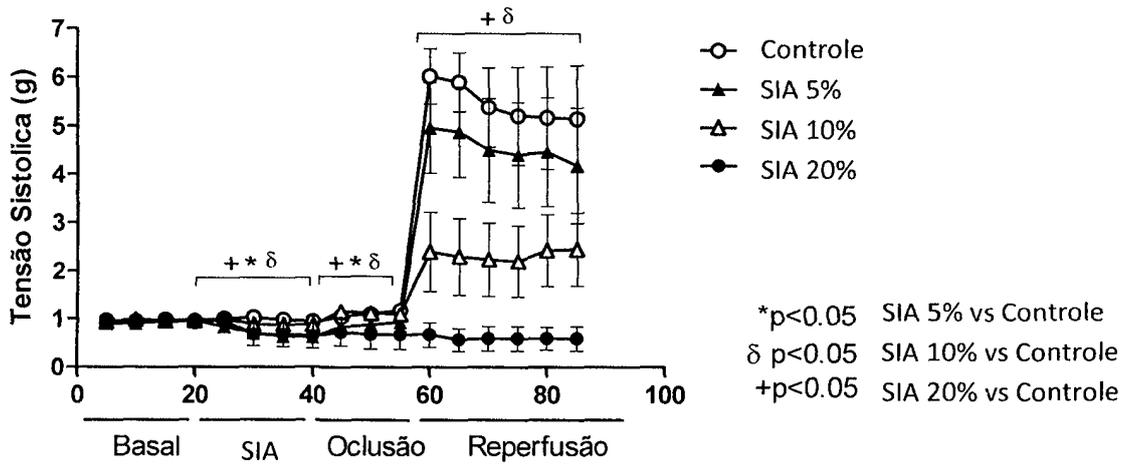


**Figura 2**

A



B



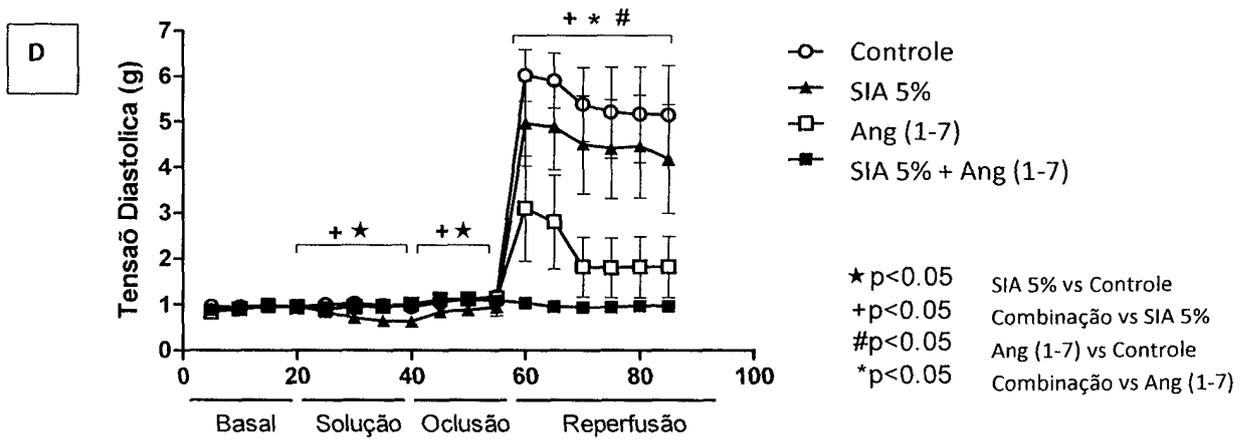
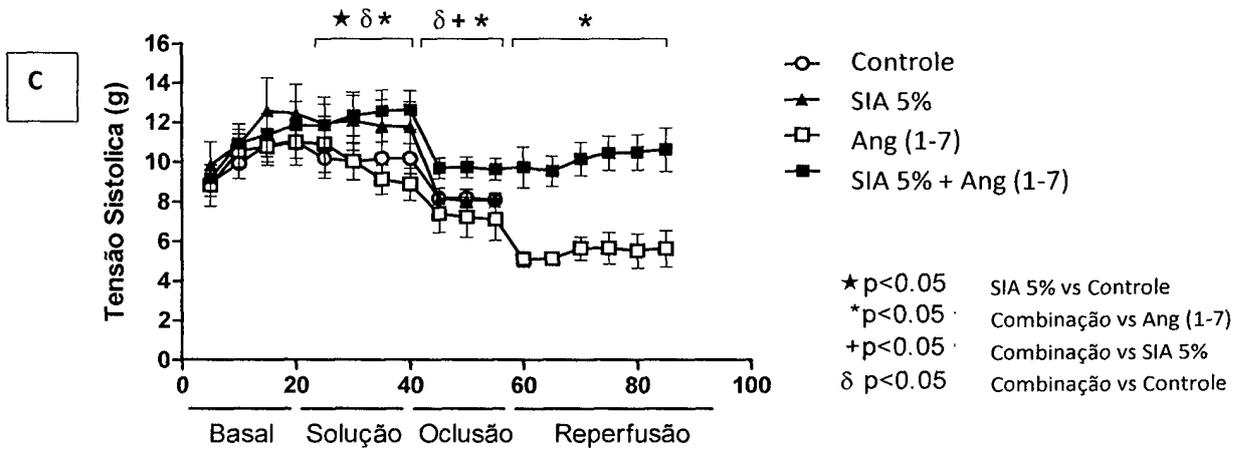


Figura 3

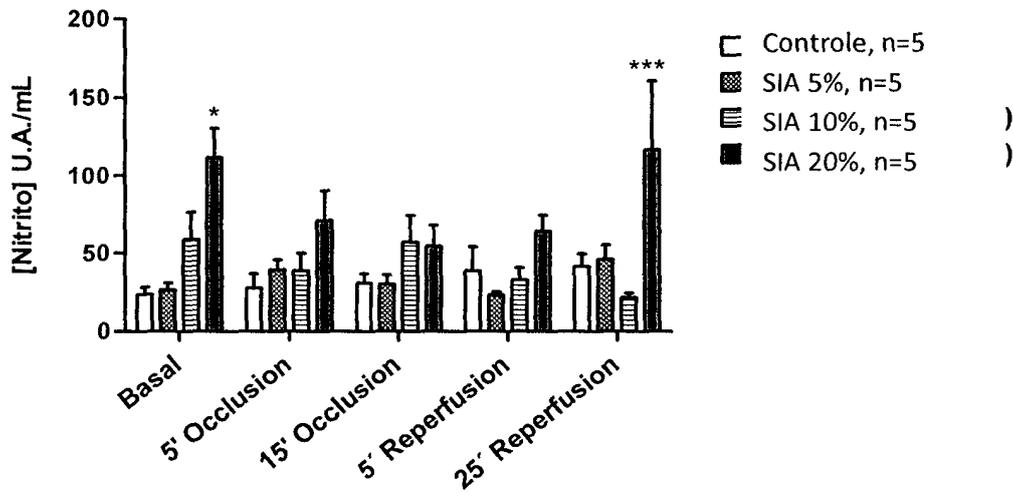


Figura 4

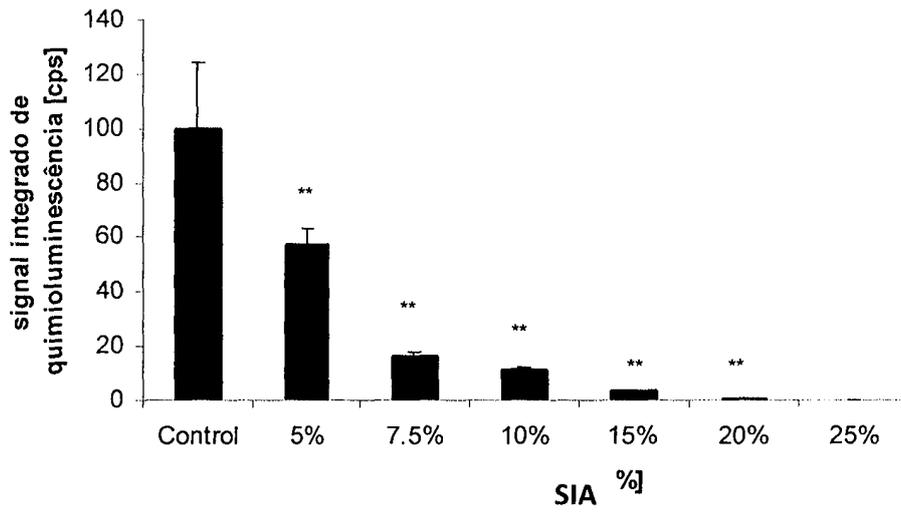


Figura 5

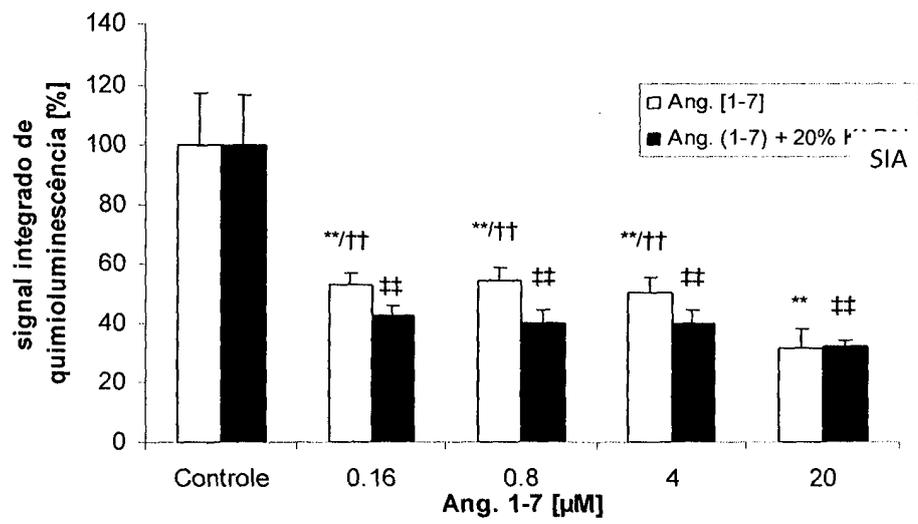


Figura 6

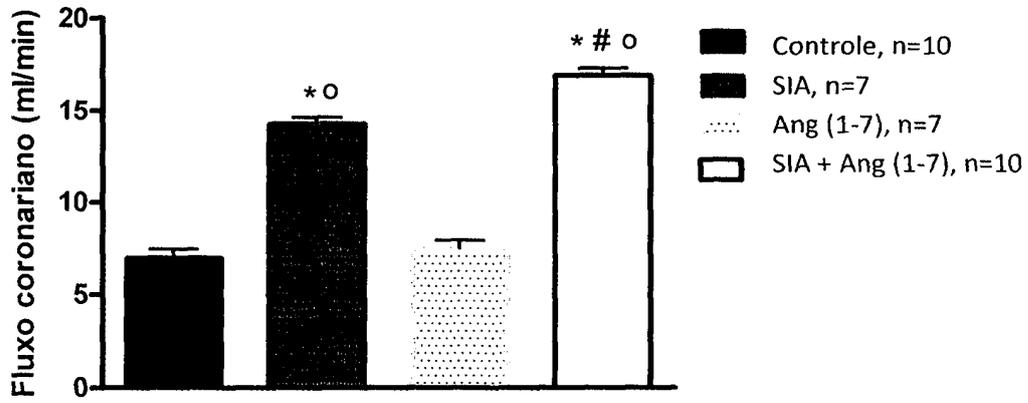


Figura 7

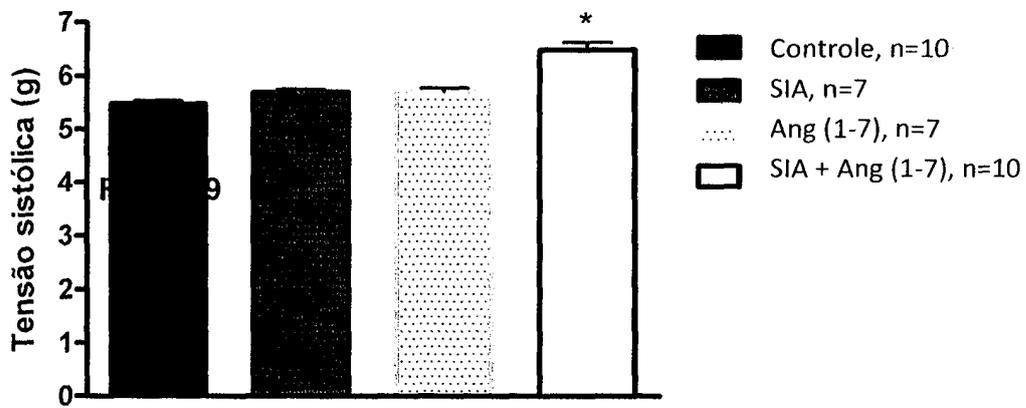


Figura 8

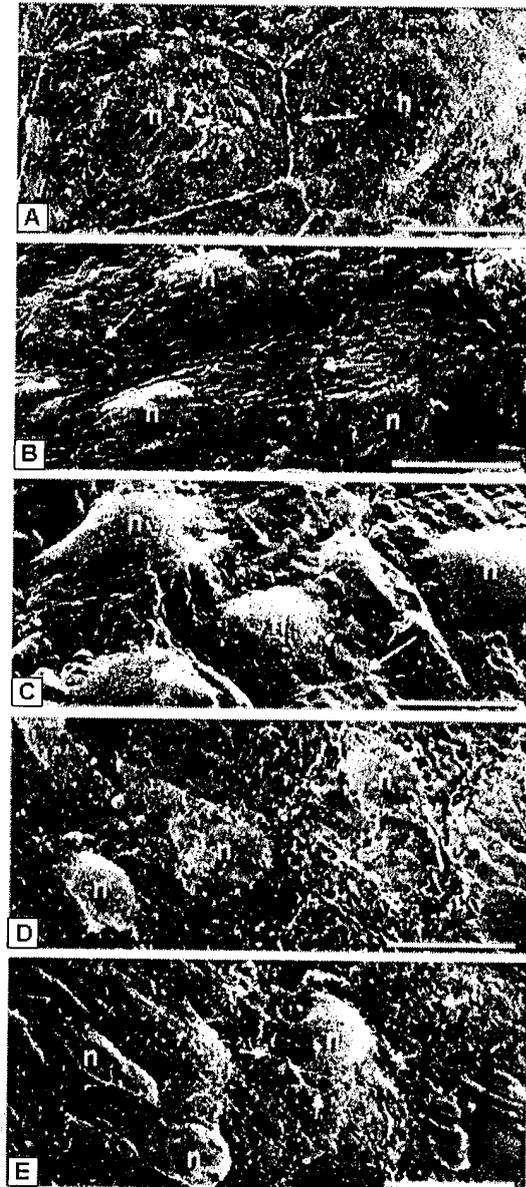


Figura 9

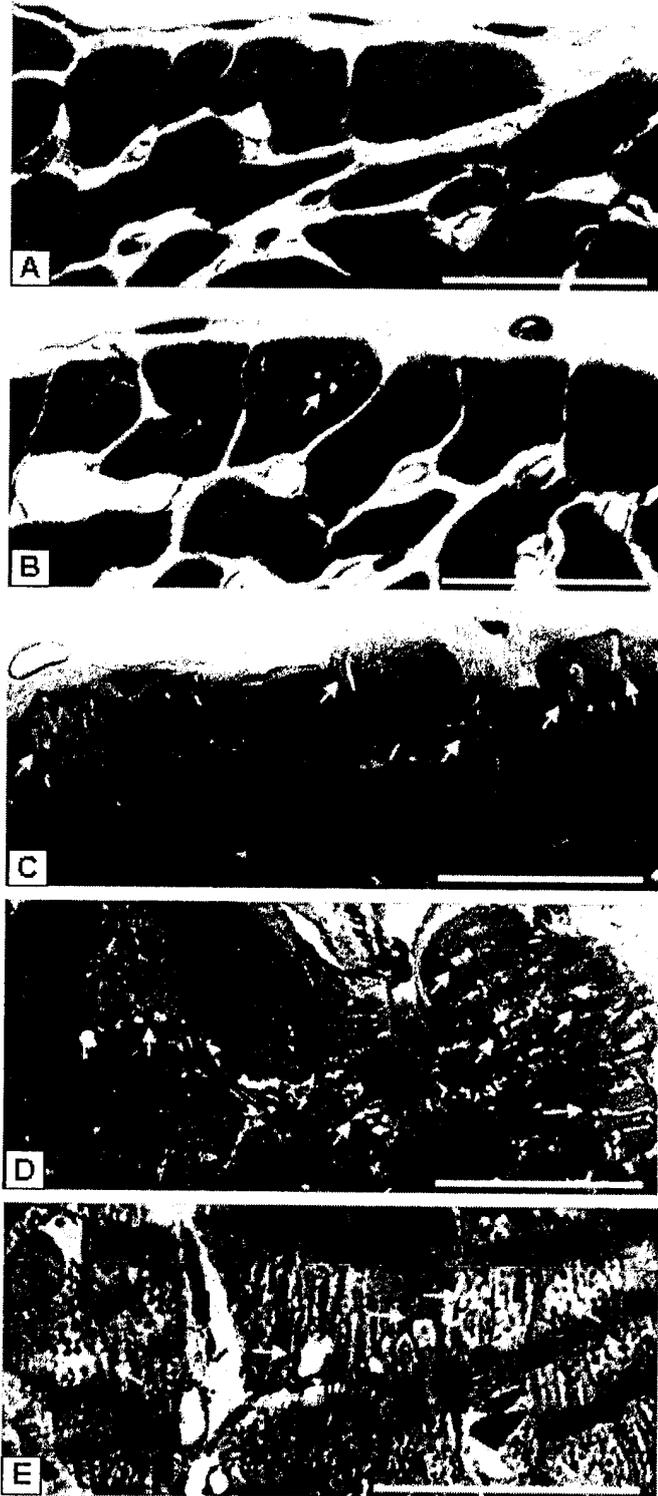


Figura 10