

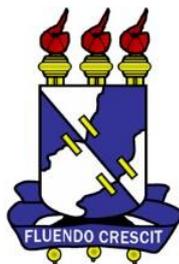
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

JULIO ALVES DA SILVA NETO

EFEITO POTENCIAL CARDIOPROTETOR DA EPIRONOLACTONA EM
CORÇÃO ISOLADO DE RATO

SERGIPE

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

EFEITO POTENCIAL CARDIOPROTETOR DA ESPIRONOLACTONA EM
CORÇÃO ISOLADO DE RATO

JULIO ALVES DA SILVA NETO

ORIENTADORA: CARLA MARIA LINS DE VASCONCELOS (PhD)

Monografia de conclusão do curso de
Farmácia, realizada no Laboratório de
Biofísica do Coração Prof. Antônio Paes de
Carvalho

SERGIPE

2017

RESUMO

A espironolactona é um medicamento usado há muitas décadas na prática clínica para o tratamento da insuficiência cardíaca em associação com os digitálicos cardiotônicos. No entanto, são escassos os estudos dos efeitos cardíacos diretos da espironolactona no coração assim como sua ação cardioprotetora frente à intoxicação digitálica. Para tanto, foram feitos experimentos em corações isolados de ratos machos (Wistar) montados em sistema de perfusão retrógrada de Langendorff, com solução nutriente de Krebs-Henseleit ($32 \pm 0,5^\circ\text{C}$), sob fluxo constante (10 mL. min^{-1}). Foram avaliados os efeitos agudos da espironolactona ($10 \mu\text{.mol. L}^{-1}$) sobre os parâmetros eletrocardiográficos (ECG) e sobre a pressão ventricular esquerda (PVE) que foi determinada com auxílio de um balonete de látex inflado (150 mmHg) e acoplado a um transdutor de pressão. Os protocolos foram executados na ausência e na presença de drogas que inibem correntes de potássio: tetraetilamônio (20 m.mol. L^{-1}) ou glibenclamida ($100 \mu\text{.mol. L}^{-1}$) e na presença da ouabaína ($100 \mu\text{.mol. L}^{-1}$), um inibidor da Na^+/K^+ -ATPase. Os resultados mostraram que a espironolactona prolongou o intervalo PR do ECG, reduziu os intervalos QT e o QTc sem alterar a duração do complexo QRS. Na presença dos inibidores de canais para potássio foi observado que o TEA, mas não a glibenclamida, reduziu o prolongamento do PRi gerado pela espironolactona; ao mesmo tempo, observou-se que a redução do QT e QTc pela espironolactona foi atenuado na presença destes inibidores. A espironolactona potencializou o aumento da pressão ventricular esquerda e reduziu as alterações eletrocardiográficas induzidas pela ouabaína, tais como aumento do QT_i e bradicardia. A espironolactona também melhorou a severidade da arritmia diminuindo o bloqueio atrioventricular (aumento do PRi) induzido pela ouabaína. Além disso, a espironolactona melhorou o relaxamento diastólico ventricular, que é uma das metas para o tratamento da insuficiência cardíaca. A resposta contrátil induzida pela espironolactona isoladamente é bifásica, ou seja, inicialmente é inotrópica positiva, contudo reduz a pressão ventricular esquerda com o decorrer da perfusão. A primeira derivada temporal de relaxamento do ventrículo também é reduzida pela espironolactona. Tendo em mãos estes dados, pode-se afirmar que a espironolactona atua diretamente no músculo cardíaco, apresentando um potencial cardioprotetor porque atua reduzindo o tempo de repolarização do ECG por facilitar correntes de potássio e melhora o relaxamento diastólico. Além disso, ela previne as alterações no ECG sem prejudicar a resposta inotrópica promovida pela ouabaína.

ABSTRACT

Spironolactone is a drug that have been widely used for many decades in clinical practice to heart failure treatment, often in association to digitalis. However, there are few reports about its effects directly in the heart tissue as well as the cardioprotection against digitalis toxicity. Thus, experimental protocols were carried out using isolated male rat hearts (Wistar) mounted in Langendorff apparatus perfused with Krebs-Henseleit nutrient solution ($32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) under constant flow ($10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) in wich were evaluated the acute effects of spironolactone ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) to electrocardiographic parameters (ECG) and left ventricular pressure using a latex cuff inflated at 150 mmHg and coupled to transducer. Protocols were performed in absence or presence of potassium channels blockers as tetraethylammonium (20 m.mol L^{-1}) or glibenclamide ($100 \mu\text{.mol L}^{-1}$) or ouabain ($100 \mu\text{.mol L}^{-1}$), an $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase inhibitor. Data shown that spironolactone have increased PR interval of ECG and reduced QT and QTc in same time without QRS duration change. To presence of potassium channel inhibitors, TEA showed, but no glibenclamide, the reduction of PRi lengthening spironolactone-induced, in same time, QT and QTc shortening promoted by spironolactone were reduced. Spironolactone rises the left ventricular pressure increased by ouabain and ameliorates the electrocardiographic changes ouabain-induced, such as QT_i prolongation, bradycardia and fist degree blockade (PR_i prolongation). Diastolic ventricular relaxation was improved to spironolactone presence while it is one of goals to heart failure treatment. The spiroolonactone-induced contractile response is double: earliest is inotropic positive however reduces the left ventricular pressure along the perfusion. The first derivative of ventricular relaxation is reduced by spironolactone. Having in hands these data we can prove that spironolactone acts directly in the heart tissue shortening the ECG repolarization time by means of potassium currents facilitation and ameliorates the diastolic ventricular relaxation, also prevents alterations at ECG shape digitalis-induced without impairment its inotropic positive effect.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação estrutural da espironolactona, demonstrando um grupamento esteroide associado a um anel lactônico e grupamento acetato ligado por um átomo de enxofre. É um fármaco apolar e pouco solúvel em água (22 mg/L à 25°C), de coeficiente de partição octanol/água de 2,78; ponto de fusão de 134,5°C. Dados disponíveis em U.S. National Library of Medicine (Bethesda, MD, EUA) 3
- Figura 2 – Interpolação temporal dos potenciais de ação do nodo sinusal (SA) que são os potenciais de marcapasso, capazes de excitar as outras células do coração gerando outros potenciais de ação no átrio (A), no nodo atrioventricular (AV), feixe de His (H), Fibras de Purkinje (PJ), endocárdio ventricular (VEN) e epicárdio ventricular (VEP). A resultante vetorial de todos os potenciais de ação gerados no coração permite a formação do traçado do eletrocardiograma (ECG). Superiormente está desenhado um potencial de ação lento (SA) e logo abaixo um potencial de ação rápido (A). Imagem adaptada (Paes de Carvalho, 1976). 6
- Figura 7- Efeitos da espironolactona sobre os parâmetros eletrocardiográficos em coração isolado de rato. (A) intervalo PR, (B) complexo QRS, (C) intervalo QT, (D) intervalo QT corrigido (QTc), (E) intervalo RR e (F) traçados representativos do ECG na ausência (superior) ou na presença de 10 μ .mol. L⁻¹ de espironolactona, após 5 minutos de perfusão. No traçado do ECG, a linha contínua refere-se ao intervalo RR e a linha tracejada ao intervalo QT (* p < 0,05 vs controle: teste t de Student, n = 7-8). 20
- Figura 8– Registro representativo da pressão intraventricular esquerda na presença de espironolactona (10 μ .mol. L⁻¹) em coração isolado de rato. 22
- Figura 9– Efeito da espironolactona (10 μ .mol. L⁻¹) após 1 min (ESP 1 min) ou 10 min de perfusão (ESP 10 min) sobre os parâmetros contráteis em coração isolado de rato. (A) Variação da pressão ventricular esquerda (Δ PVE), (B) Variação da pressão ventricular diastólica final (Δ PVD), (C) derivada máxima da contração ((+) dP/dt) e (D) derivada máxima do relaxamento ((-) dP/dt). * (p < 0,05 vs controle) ou # (p < 0,05 vs ESP 1 min): ANOVA seguida de teste de Tukey (n = 8) 22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros eletrocardiográficos do coração isolado submetido à perfusão com espironolactona (ESP) na presença de bloqueadores de canais para potássio.....	21
Tabela 2- Parâmetros contráteis obtidos a partir das curvas de pressão do ventrículo esquerdo nos diferentes grupos experimentais	23
Tabela 3- Média dos parâmetros de função ventricular aferidos nos corações isolados, nos diferentes blocos de experimentos.....	25

Sumário

RESUMO	3
ABSTRACT.....	4
1 INTRODUÇÃO	3
1.1 Por que a espironolactona deve ser estudada em modelos de biologia experimental?.....	3
1.2. Como o coração dos mamíferos funciona?	5
1.2.1 <i>Excitação cardíaca</i>	5
1.2.2 <i>Contração cardíaca</i>	7
1.3 Usando o eletrocardiograma como ferramenta de pesquisa.....	7
1.4 Estudo da função do ventrículo esquerdo	9
1.5 Variação na performance cardíaca promovida pelo bloqueio da bomba de sódio e potássio.....	10
2 OBJETIVO.....	12
2.1 Geral	12
2.2 Específicos	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Animais.....	13
3.2 Soluções e drogas.....	13
3.3 Protocolos experimentais	13
3.3.1 <i>Montagem do coração isolado</i>	13

3.3.1.1. Registro do eletrocardiograma.....	14
3.3.1.2 Registro da pressão intraventricular esquerda	16
3.3.1.3 Determinação da frequência espontânea do coração	17
3.4 Análise estatística	17
4 RESULTADOS.....	18
4.1 Efeitos da espironolactona sobre os parâmetros eletrocardiográficos.....	18
4.2 Alterações eletrocardiográficas da espironolactona associadas a inibidores de correntes de potássio	18
4.3 Alterações induzidas pela espironolactona sobre a pressão do ventrículo esquerdo	21
<i>4.3.1 Alterações induzidas pela espironolactona na pressão ventricular frente aos inibidores de correntes de potássio</i>	<i>23</i>
4.4 Ação da espironolactona sobre os efeitos mediados pela ouabaína (inibidor da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase).....	24
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 Por que a espironolactona deve ser estudada em modelos de biologia experimental?

A espironolactona é um esteroide sintético, nomeado quimicamente como ácido (3-(3-oxo-7 α -acetil-17 β -hidroxi-4-androsten-17 α -il) γ -lactona-propiónico (HERTZ e TULLNER, 1958a), transformado em medicamento e usado na prática clínica a partir da década de 1950 como antagonista do receptor de aldosterona para controlar a pressão arterial e outras condições cardiovasculares (HERTZ; TULLNER, 1958; HOLLANDER; WILKINS, 1966). A partir daí, os portadores de insuficiência cardíaca, quando usuários deste fármaco, passaram a apresentar aumento da sobrevida (Wolf et al., 1966), reafirmada por estudos clínicos multicêntricos (Pitt, 1999).

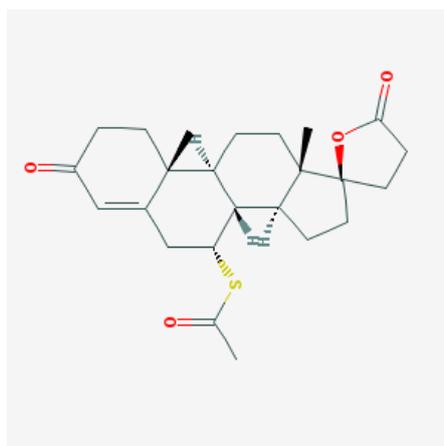


Figura 1 – Representação estrutural da espironolactona, demonstrando um grupamento esteroide associado a um anel lactônico e grupamento acetato ligado por um átomo de enxofre. É um fármaco apolar e pouco solúvel em água (22 mg/L à 25°C), de coeficiente de partição octanol/água de 2,78; ponto de fusão de 134,5°C. Dados disponíveis em U.S. National Library of Medicine (Bethesda, MD, EUA)

A eficácia da espironolactona é tradicionalmente justificada por um mecanismo clássico de ação, pelo qual este fármaco realiza antagonismo competitivo no receptor citosólico de mineralocorticoide (MR), presente no citoplasma de diversas células, prioritariamente nos rins (Corvol et al., 1975). Como consequência, é reduzida a

probabilidade da aldosterona se associar ao receptor MR e se deslocar até o núcleo para induzir a síntese das proteínas induzidas pela aldosterona (Chai et al., 2005), muitas destas proteínas são responsáveis pela retenção de íons e remodelamento cardiovascular (Sheng et al., 2016). À luz deste mecanismo se atribui o efeito anti-hipertensivo da espironolactona, no entanto, diversas evidências sugerem que há outros fenômenos biológicos no corpo humano para além da fisiologia renal, que parecem estar relacionados com a eficácia da espironolactona (Barbato et al., 2004; Hermidorff et al., 2015; Selye, 1969).

Neste aspecto, experimentalmente tem se demonstrado efeitos imediatos da espironolactona, certamente exteriores ao processo genômico, que podem justificar esta eficácia terapêutica. Há publicações que descrevem a capacidade da espironolactona, quando agudamente aplicada, de reduzir a contratilidade de vasos sanguíneos isolados (SORRENTINO et al., 2000), de reduzir correntes iônicas através de canais para cálcio (Dacquet et al., 1987; Mironneau et al., 1990), inibir um tipo específico de canais de potássio em células cardíacas (Caballero et al., 2005), reduzir o tônus vascular induzido por ouabaína (Sorrentino et al., 1996), reduzir a probabilidade de intoxicação induzida por cardiotônicos digitálicos (Selye, Mecs e Tamura, 1969) e minimizar a fibrose resultante do remodelamento cardiovascular (Zhao et al., 2015).

Alguns pesquisadores buscaram compreender a relação entre espironolactona e os cardiotônicos digitálicos porque a associação destas duas categorias de fármacos é frequentemente prescrita e se mostra eficaz na melhoria dos sintomas da insuficiência cardíaca (Rifka et al., 1978; Steimer, 2003; Thomas e Maddox, 1981). Além do mais, um dos metabólitos ativos da espironolactona, a canrenona, promove bloqueio parcial da bomba de sódio e potássio (Finotti e Palatini, 1981; Semplicini et al., 1995; Song e Du, 2014) e também consegue inibir correntes de cálcio em cardiomiócito de rato (Costa et al., 2009). Pensando nisso, deve-se investigar a capacidade de múltiplos mecanismos de ação para a espironolactona.

Considerando que a espironolactona faz parte de diversos protocolos terapêuticos atualmente preconizados na prática clínica (Ferreira et al., 2014; Johnston, 2016; Pitt et al., 2014), resolvemos analisar a resposta aguda deste fármaco no coração isolado de rato, avaliando o fenômeno da contratilidade do miocárdio por meio dos parâmetros de pressão do ventrículo esquerdo e de eletricidade cardíaca, aferida pelo eletrocardiograma (ECG).

Pretende-se com isso, tentar mostrar se há uma ação direta e aguda da espironolactona sobre o funcionamento do coração, sempre pensando que tal investigação poderá contribuir com o esclarecimento de novos mecanismos de ação para este fármaco e gerar *insights* para outros grupos de pesquisa que porventura atuem na pesquisa clínica.

1.2. Como o coração dos mamíferos funciona?

A capacidade que o coração tem de funcionar espontaneamente gerava indagações por importantes pensadores como Galeno (129-199 a.C.) e Leonardo da Vinci (1452-1529). Os filósofos eram curiosos acerca dos mecanismos que permitiam o batimento cardíaco como sinal da vida e porque este órgão continuava funcionando por alguns segundos quando retirado do corpo dos animais.

Com o uso do galvanômetro utilizado por Einthoven foi possível a medições de correntes elétricas existentes simultaneamente ao batimento cardíaco (Noble, 1979) e captados na superfície do corpo (Garcia, 1997). Descobriu-se então que há um fenômeno elétrico, gerado por fluxo de íons (Miller, 2004), que precede o batimento do coração para que este órgão realize o bombeamento de sangue do ventrículo esquerdo para os vasos sanguíneos (Garcia, 2002) e para o melhor entendimento deste processo, convencionou chama-lo de acoplamento excitação-contração (Bers, 2002; Brady, 1963; Fabiato e Fabiato, 1972).

1.2.1 Excitação cardíaca

A automaticidade é a propriedade relacionada a capacidade do coração gerar estímulos elétricos espontaneamente, por meio de variações na permeabilidade seletiva a íons, conseqüentemente excitando as demais fibras miocárdicas (Garcia, 2002; Matheus Nascimento, J.H.; Campos de Carvalho, 2009). Esta excitação surge em células especializadas, de maior permeabilidade aos íons cálcio e relativamente baixo limiar de despolarização: são as células de marcapasso (Shibata e Giles, 1985). O conjunto destas células forma o nodo sinoatrial (ou sinusal) (Garcia, 2002; Guyton e Hall, 1997), que se agrupam no átrio direito. Estas células se despolarizam espontaneamente, mediante influxo de íons, prioritariamente íons Ca^{++} (Noble, 1979; Paes de Carvalho, 1976) e se repolarizam por efluxo de íons K^+ , em um processo repetitivo que contribui com a frequência cardíaca e

denomina-se automaticidade.(Baruscotti, Bucchi e DiFrancesco, 2005; Dale Dubin, 2004; Deccache, 1971)

Então, os estímulos elétricos gerados no nodo sinoatrial são modulados pelo nodo atrioventricular e, posteriormente, distribuídos pelos tecidos condutores: feixe de His e fibras de Purkinje para a estimulação do miocárdio, especialmente os que formam as câmaras ventriculares; processo este denominado excitabilidade (Garcia, 2002).

Predominam neste processo de excitabilidade celular a geração de potenciais elétricos, que são potenciais de ação. Estes podem ser classificados em lentos ou nodais e rápidos ou não-nodais (Matheus-Nascimento; Campos de Carvalho, 2009).

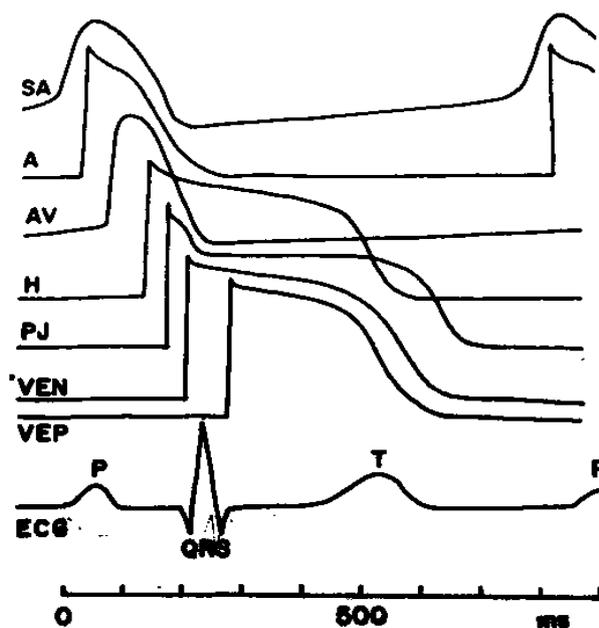


Figura 2 – Interpolação temporal dos potenciais de ação do nodo sinusal (SA) que são os potenciais de marcapasso, capazes de excitar as outras células do coração gerando outros potenciais de ação no átrio (A), no nodo atrioventricular (AV), feixe de His (H), Fibras de Purkinje (PJ), endocárdio ventricular (VEN) e epicárdio ventricular (VEP). A resultante vetorial de todos os potenciais de ação gerados no coração permite a formação do traçado do eletrocardiograma (ECG). Superiormente está desenhado um potencial de ação lento (SA) e logo abaixo um potencial de ação rápido (A). Imagem adaptada (Paes de Carvalho, 1976).

1.2.2 Contração cardíaca

O estímulo primário para a contração cardíaca é o potencial de ação que excita as células do coração aumentando a permeabilidade aos íons cálcio (Ca^{++}), que ocorre prioritariamente pelos canais para cálcio do tipo L (Berridge, Lipp e Bootman, 2000; Bers, 2002, 2008). Por sua vez, este Ca^{++} promove liberação de outros íons cálcio provenientes dos estoques intracelulares de cálcio, prioritariamente o cálcio abrigado no interior do retículo sarcoplasmático. Este processo é denominado CIC-R ou *calcium-induced calcium release* (Fabiato e Fabiato, 1972; Fabiato, 1983). No sentido inverso, a uma bomba de cálcio (SERCA ou Ca^{++} -ATPase) realiza recaptura dos íons cálcio de volta para o retículo sarcoplasmático, reduzindo a força contrátil no músculo cardíaco (Bidwell *et al.*, 2009; Chen, 2014). A fosfolambam é uma proteína da célula, ativada por AMP cíclico (Bidwell *et al.*, 2009) que atua fosforilando a SERCA, aumentando assim a capacidade de sequestro de íons cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Chen, 2014; Mattiazzi *et al.*, 2005).

O aumento da concentração intracelular de Ca^{++} no citoplasma permite que este se associe a troponina C que, interagindo com a troponina I, tropo miosina e actina, promoverá o fenômeno contrátil (Katz e Lorell, 2000; Katz, 1967). Posteriormente este fenômeno cessa, por conta da redução temporária de afinidade dos microfilamentos contráteis pelo cálcio, que desfazem as pontes cruzadas e também pela extrusão de parte destes íons do citoplasma (Chapman, 1973) e se repete harmonicamente este processo. Na ausência de cálcio no meio extracelular não ocorre contratilidade no coração de mamíferos (Ringer e Buxton, 1887).

A variação da força contrátil do músculo cardíaco é denominada inotropismo. Assim, as variações que promovem aumento de força são denominadas de efeito inotrópico positivo e as que reduzem a força cardíaca de efeito inotrópico negativo (Katz, 1967)

1.3 Usando o eletrocardiograma como ferramenta de pesquisa

O eletrocardiograma é o registro gráfico da atividade elétrica cardíaca, resultante do tráfego da corrente elétrica ao longo do coração, provendo informações sobre a frequência, o ritmo e a morfologia cardíaca, tendo-se um tipo padrão de traçado (Dale Dubin, 2004; Ding *et al.*, 2015; Nasario-Junior *et al.*, 2013). Nele, uma onda P representa a despolarização atrial,

um complexo QRS representa a despolarização ventricular e uma onda T que representa a repolarização ventricular conforme a frequência cardíaca (Wang et al., 2008).

As modificações nos intervalos das ondas do eletrocardiograma podem proporcionar inferências sobre o funcionamento dos canais iônicos que regulam a excitabilidade cardíaca. Pode-se esperar, por exemplo, que variáveis que porventura alterem correntes de sódio, cálcio ou potássio expressem alterações no traçado de ECG.

Os canais para potássio são importantes no processo de excitabilidade cardíaca. Eles são proteínas de membrana capazes de promover o efluxo de íons potássio (K^+) da célula por transporte passivo (Tamargo et al., 2004). O coração de mamíferos expressa grande variedade de canais para potássio e o funcionamento deles regula o potencial de repouso, a refratariedade e a duração do potencial de ação cardíaco (Chiamvimonvat et al., 2016; Ramón, 1982). Além disso, eles contribuem com a cardioproteção (Nichols, 2016; Randall, 1995; Shao et al., 2013) porque condições patológicas como o diabetes e a doença arterial coronariana prejudicam a repolarização cardíaca, configurando-se um risco cardíaco (Coutinho *et al.*, 2014). Alterações no funcionamento destes canais podem ser indiretamente identificadas por variações no sinal do eletrocardiograma (Tikkanen e Huikuri, 2015), nas configurações do potencial de ação cardíaco (fig. 3) ou aferidas diretamente pelas correntes de potássio (Xu, Guo e Nerbonne, 1999; Xu, Haodong, Li e Nerbonne, 1999) mensuráveis em células isoladas pela técnica de patch clamp (Sakmann e Neher, 1984).

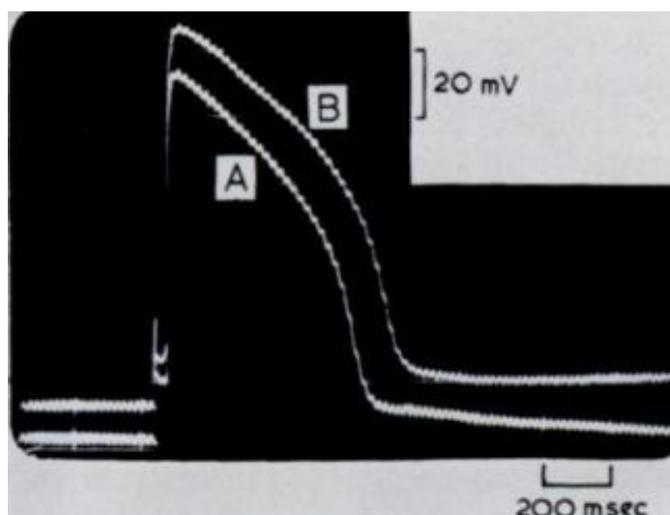


Figura 3 – Imagem representando (A) o traçado típico do potencial de ação do ventrículo com duração normal e (B) a mesma medição na presença do inibidor de canais para potássio, tetraetilamônio, demonstrando um potencial de ação que se sustenta por mais tempo mediante a reduzida capacidade dos canais para potássio realizarem a repolarização (Nayler e Emery, 1964). Este fenômeno pode ser indicado por prolongamento do intervalo QT no ECG.

1.4 Estudo da função do ventrículo esquerdo

A câmara ventricular esquerda recebe o sangue das veias pulmonares e ejeta para a aorta por meio de uma contração. Este processo garante o aporte de sangue para o corpo inteiro; sendo assim, alguns parâmetros frequentemente são empregados para medir a eficiência e a eficácia deste processo (Campos-Filho, 1976; Guyton e Hall, 1997). As extremidades do registro da contração ventricular demonstram uma pressão sistólica com o valor máximo da contração e uma pressão diastólica final (Fig. 5), que é o momento em que o ventrículo esquerdo relaxa e se enche de sangue para a próxima sístole (Katz, 1977).

A sístole pode ser dividida em pelo menos 2 momentos: um inicial em que não ocorre alteração no volume da câmara ventricular (contração isovolúmica ou isovolumétrica) seguida de uma fase de ejeção, pela qual nos mamíferos, o sangue atravessa a válvula aórtica para ser distribuído por todo o corpo. A diástole também apresenta um comportamento isotônico e isovolúmico. O comprometimento desta capacidade contrátil do coração corresponde a um sinal de doenças como a insuficiência cardíaca (Albaghdadi, Gheorghiad e Pitt, 2011; Barbato et al., 2004; Fukuta e Little, 2007) e a dinâmica dos íons cálcio no citosol do

cardiomiócito, a capacidade de encurtamento das células ventriculares, a formação das pontes cruzadas pelos microfilamentos contráteis e a responsividade das válvulas cardíacas participam da regulação da contração e do relaxamento ventricular (Hinken e Solaro, 2007).

Em raciocínio semelhante, fármacos na circulação sanguínea podem modificar o funcionamento ventricular, em funcionamento espontâneo em condição experimental (Katz, 1977), podendo-se a partir disso inferir fenômenos que possam ocorrer no processo circulatório como um todo, aprimorando fatores que possam melhorar a eficiência cardíaca.

Assim, foram escolhidos os seguintes parâmetros para estudo:

- (A) Pressão ventricular esquerda: tensão máxima que o ventrículo desenvolve frente uma pós-carga, capaz de abrir a válvula cardíaca e ejetar o sangue via aorta.
- (B) Pressão diastólica final: é um nível basal de tensão que permite inferência sobre a capacidade do ventrículo se encher de sangue.
- (C) Derivadas temporais da curva de contração (+dp/dt) e de relaxamento (-dp/dt): taxa de contração ventricular pelo tempo, que permite inferências sobre a velocidade do trabalho cardíaco e do consumo energético.

1.5 Variação na performance cardíaca promovida pelo bloqueio da bomba de sódio e potássio

A proteína de membrana denominada Na^+/K^+ -ATPase desempenha uma importante função no coração ao promover a retirada de íons sódio e internalização de íons potássio mediante consumo de ATP (Katz, 1985), denominando-a então de bomba de sódio e potássio. Neste transporte de íons ela gera um gradiente eletroquímico negativo no cardiomiócito, permitindo condições para a despolarização cardíaca. Porém, quando se bloqueia a bomba de sódio e potássio ela gera adaptações instantâneas na célula que refletem na eletricidade e na contratilidade do coração (Altamirano *et al.*, 2006; Katz, 1985; Scheiner-Bobis, 2011).

São capazes de bloquear a bomba de sódio e potássio os compostos inorgânicos de lítio e vanádio (Brody, 1981) ou compostos orgânicos; sendo o principal deles os glicosídeos cardiotônicos (ou digitálicos) (Fisch e Knoebel, 1985; Wang *et al.*, 2010). Estes glicosídeos

têm origem natural em plantas e animais e são usados como fármacos, sendo exemplo deles a digoxina, a digitoxina e a ouabaína.

Classicamente, quando a bomba de sódio é bloqueada por um glicosídeo cardiotônico ocorre o acúmulo de íons sódio e o trocador sódio/cálcio modifica sua configuração passando a promover influxo de cálcio e efluxo de sódio (Altamirano *et al.*, 2006; Reuter *et al.*, 2005). Este aumento de cálcio da célula promove efeito inotrópico positivo melhorando a performance do coração, melhorando também os sintomas da insuficiência cardíaca. Ao mesmo tempo, o índice terapêutico baixo faz com que os glicosídeos cardiotônicos apresentem um potencial tóxico relacionado a dose.

Por outro lado, têm-se demonstrado que a Na^+/K^+ -ATPase realiza um sistema robusto de transdução de sinal capaz de modificar diversas funções celulares como a apoptose, contratilidade, geração de espécies reativas de oxigênio e mobilização de cálcio (Arnon, Hamlyn e Blaustein, 2000; Chanda *et al.*, 2008; Dostanic-larson *et al.*, 2006; Nishio *et al.*, 2004; Schoner e Scheiner-Bobis, 2007; Song *et al.*, 2014).

A espironolactona é frequentemente prescrita associada a um cardiotônico, por isso levantamos a hipótese de que a espironolactona protege contra as alterações elétricas promovidas pelos cardiotônicos por um efeito agudo.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

- Avaliar o potencial cardioprotetor da espironolactona em coração isolado de rato.

2.2 Específicos

- Caracterizar as alterações eletrocardiográficas induzidas agudamente pela espironolactona em coração isolado de rato;
- Avaliar os efeitos agudos da espironolactona sobre os parâmetros da pressão do ventrículo esquerdo de corações isolados.
- Avaliar a influência de bloqueadores de canais para potássio na resposta farmacológica da espironolactona;
- Avaliar a resposta aguda da espironolactona sobre as alterações cardíacas induzidas por ouabaína;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus*), de massa corporal entre 250 e 300 g, provenientes do Biotério setorial do departamento de Fisiologia da UFS. Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água, foram submetidos a ciclos claro/escuro de 12/12 horas, sob temperatura controlada ($23 \pm 3^\circ\text{C}$). Durante a execução dos experimentos foram obedecidas as normas de manipulação dos animais propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) sob número de protocolo 51/2016.

3.2 Soluções e drogas

Foram utilizados os fármacos e drogas seguintes: espironolactona, ouabaína, tetraetilamônio, glibenclamida e heparina.

Solução nutriente de Krebs-Henseleit foi preparada em água purificada por destilação seguida de osmose reversa e com a seguinte composição de sais (em mmol. L⁻¹): NaCl 120,0; KCl 5,4; MgCl₂ 1,2; NaHCO₃ 27,0; NaH₂PO₄ 2,0; CaCl₂ 2H₂O 1,25 e C₆H₁₂O₆ 11,0 (pH = 7,4). Para prevenir microembolia coronariana esta solução foi filtrada a vácuo (Harrison e Raymond, 1951) com membrana de éster de celulose com poro de 0,45 μ.mol. L⁻¹ (Millipore: Massachussets, EUA).

3.3 Protocolos experimentais

3.3.1 Montagem do coração isolado

Os ratos receberam dose intraperitoneal de heparina (200 U.I./kg) e em seguida, foram decapitados por guilhotina 15 minutos após a administração de heparina (Tucci e Maciel, 1977). O tórax foi aberto, o coração foi removido, lavado com solução nutriente gelada (0–4°

C) e montado em sistema de perfusão aórtica do tipo Langendorff de fluxo constante de 10 mL/min (bomba peristáltica, Milan) de solução de Krebs-Henseleit (K-H). Esta solução foi aerada por mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂) e aquecido a 32 ± 0,1 °C (Bomba HAAKE C/F3). O coração foi mantido submerso em solução de K-H contida em Becker (50 mL).

Após montado, o coração foi submetido à estabilização por cerca de 30 minutos. Em seguida, o coração foi perfundido com espironolactona (10 μ.mol. L⁻¹) isoladamente ou em associações com inibidores de canais para potássio: tetraetilamônio (TEA, 20 m.mol. L⁻¹) ou glibenclamida (20 m.mol. L⁻¹) ou com o inibidor da bomba de sódio e potássio, ouabaína (100 μ.mol. L⁻¹).

3.3.1.1. Registro do eletrocardiograma

Os potenciais elétricos do coração foram captados por meio de três eletrodos de prata cloretada, preenchidos com solução salina (AgCl/NaCl 1 M) imersos na solução que banhava o coração. Os sinais eletrocardiográficos foram monitorados e pré-amplificados por um cardioscópio (EMAI RX10) e, posteriormente amplificados e digitalizados (PowerLab 4/35 ADInstrument). Os sinais foram armazenados em microcomputador para processamento off-line por meio de programa específico (LabChart 8.0 ADInstruments). (Fig. 6).

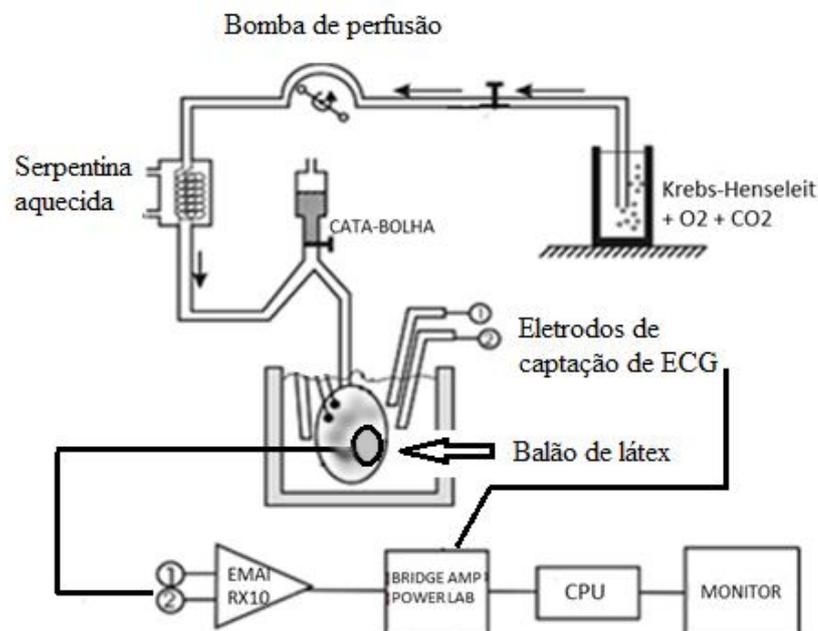


Figura 4 - Representação esquemática do sistema de perfusão aórtica de fluxo constante do tipo Langendorff usado para obter os sinais eletrocardiográficos e a frequência espontânea do marcapasso dominante.

O eletrocardiograma registra os eventos relacionados à despolarização e repolarização dos átrios e ventrículos. A onda P representa a despolarização atrial e as ondas do complexo QRS e T, correspondem à despolarização e à repolarização ventricular, respectivamente (CONDE GARCIA, 1997; LANTIERI e BERTOLETTI, 2009). Neste tipo de traçado, entre outros aspectos, é importante a análise de dois intervalos (Fig. 6):

1- intervalo PR (medido do pico da onda P até o pico da onda R), pois ele representa o tempo gasto pela onda despolarizante para trafegar do nodo sinusal até as massas ventriculares;

2- intervalo QT (medido do início do complexo QRS até o pico da onda T), porque ele representa as fases de despolarização e repolarização ventricular, ou seja, sua duração equivale à duração do potencial de ação ventricular (Coutinho et al., 2014; Hasnain e Vieweg, 2014; Lu et al., 1999). O intervalo QT foi corrigido pela frequência cardíaca pela fórmula de Bazzet:

$$(QT_c = QT_i / \sqrt{RR})$$

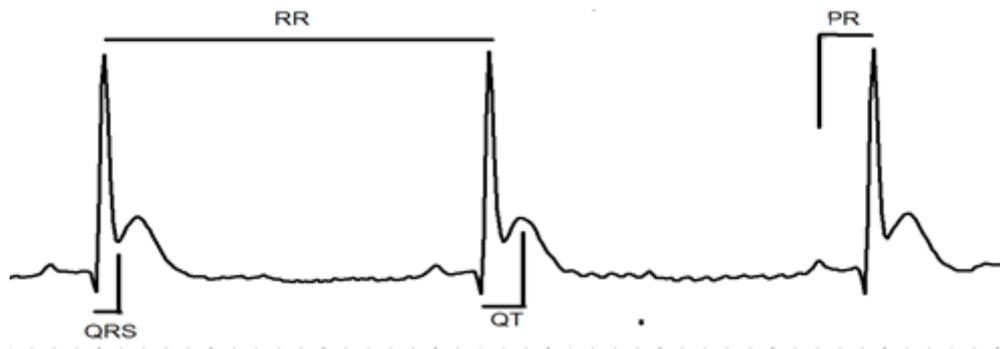


Figura 5 – Representação gráfica do traçado padrão do eletrocardiograma obtidos no sistema de aquisição na condição basal de um coração de rato em funcionamento artificial no aparato de Langendorff, demonstrando as ondas P, Q, R, S e T pelos intervalos aferidos (PR, QRS, QT e RR).

3.3.1.2 Registro da pressão intraventricular esquerda

A pressão no interior do ventrículo esquerdo (PVE) foi determinada, em coração com batimento espontâneo, por meio de um balonete de látex insuflado com água até uma pressão de 150 mmHg. O átrio esquerdo foi retirado e o balonete introduzido no ventrículo esquerdo do coração isolado (Bell, Mocanu e Yellon, 2011). Esta tubulação estava acoplada a um transdutor de pressão (MLT0699/A), cujos sinais foram amplificados (Bridge Amp FE221 ADInstrument), digitalizados (PowerLab 4/35 ADInstrument) e gravados em computador. Todo o sistema hidráulico usado para determinar a pressão intraventricular estava preenchido com água destilada e foi calibrado com a ajuda de um manômetro de mercúrio.

Os parâmetros avaliados nos traçados de pressão ventricular foram: pressão ventricular sistólica, diastólica e média (sistólica menos diastólica) em milímetros de mercúrio (mmHg); derivadas máxima da contração (+dP/dt) e do relaxamento (-dP/dt) (fig.5). Esses parâmetros foram determinados na presença ou na ausência de espironolactona.

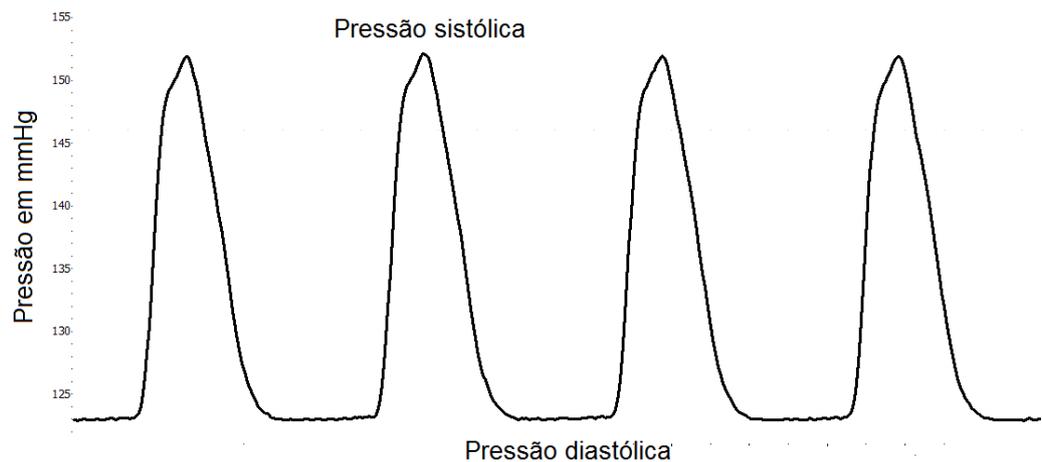


Figura 6 – Registro típico da pressão ventricular esquerda de um coração isolado de rato, obtida por meio de um balonete de látex (inflado a 150 mmHg) acoplado a um transdutor de pressão.

3.3.1.3 Determinação da frequência espontânea do coração

Para avaliar o efeito da espirolactona sobre a frequência cardíaca espontânea em corações isolados de ratos e, perfundidos retrogradamente pela aorta, os corações foram mantidos sem estimulação elétrica. Utilizando o software WindaqEx foi possível determinar os intervalos RR e convertê-los em frequência cardíaca (bpm).

3.4 Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e estatisticamente analisados pelo Graphpad Prism (San Diego, USA) processando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e submetido ao teste t de Student não-pareado ou, quando apropriado, análise de variância (ANOVA) de uma via, *post test* de Tukey, considerando estatisticamente diferente em $p < 0,05$. Foi considerado valor de “n” como o número de animais usados.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da espironolactona sobre os parâmetros eletrocardiográficos

Em coração isolado submetido à perfusão aórtica de fluxo constante, os resultados mostraram que a espironolactona ($10 \mu\text{mol. L}^{-1}$), após 5 minutos de perfusão, prolongou o intervalo PR de 57 ± 1 ms ($n = 8$) para 61 ± 1 ms ($p < 0,05$, $n = 7$, Fig. 7 A) sem alterar a duração do complexo QRS (Fig. 7B). Além disso, a espironolactona reduziu o intervalo QT (QTi) de $43 \pm 0,5$ ms para $39,9 \pm 0,6$ ms ($p < 0,05$, Fig. 7C) e o QTc de 83 ± 1 para 76 ± 1 ($p < 0,05$, $n = 7$, Fig. 7D). Com relação ao intervalo RR, observou-se redução do RR de $0,31 \pm 0,005$ s para $0,26 \pm 0,003$ s ($p < 0,05$, Fig. 7E) após perfusão espironolactona, o que significa aumento da frequência cardíaca (193 bpm para 230 bpm). A Fig. 7F mostra registros representativos do ECG em situação controle (painel superior) e na presença da espironolactona (painel inferior). Podemos observar que espironolactona aumentou a frequência cardíaca verificado pela redução do intervalo RR de 0,3 s para 0,24s e encurtou o QTi de 42,5 ms para 40 ms.

4.2 Alterações eletrocardiográficas da espironolactona associadas a inibidores de correntes de potássio

Como sabemos a redução do intervalo QT reflete um encurtamento da duração do potencial de ação ventricular. Um dos fatores responsáveis por esse encurtamento pode ser a abertura de canais para potássio que aceleram a repolarização ventricular. Para investigar se o encurtamento do QTi induzido pela espironolactona estava associado a ativação de canais para potássio, foram realizados experimentos na presença de bloqueadores de canais para potássio. Foram feitos experimentos na presença de tetraetilamônio (TEA) (inibidor inespecífico de canais para potássio) e glibenclamida (inibidor seletivo para canais de potássio dependentes de ATP). Como esperado, o intervalo QT foi prolongado por ação dos inibidores de canais para potássio (Tabela 1) aumentando o QTi de $43 \pm 0,5$ ms (controle) para 57 ± 2 ms (TEA) e $47 \pm 2,2$ ms (glibenclamida) (dados não mostrados). Os resultados revelarem que o TEA (20 mM) foi capaz de prevenir a redução do QTi induzido pela espironolactona

(Tabela 1). Por outro lado, glibenclamida ($100 \mu\text{.mol. L}^{-1}$) não foi capaz de impedir a redução do QT_i induzido pela espironolactona. A espironolactona também foi capaz de reduzir o QT_c de 83 ± 1 ms para 76 ± 1 ms ($p < 0,05$). Na presença de TEA esse encurtamento do QT_c foi abolido (83 ± 1 ms). Por outro lado, glibenclamida não foi capaz de prevenir o encurtamento do QT_c promovido pela espironolactona (73 ± 2 ms).

Com relação ao PR_i, podemos observar que apenas o TEA foi capaz de prevenir o aumento do PR_i induzido pela espironolactona (Tabela 1). Como podemos verificar na Tabela 1, a espironolactona reduziu o intervalo RR, o que significa aumento da frequência cardíaca. Ambos TEA e glibenclamida foram capazes de impedir a redução do intervalo RR induzida pela espironolactona.

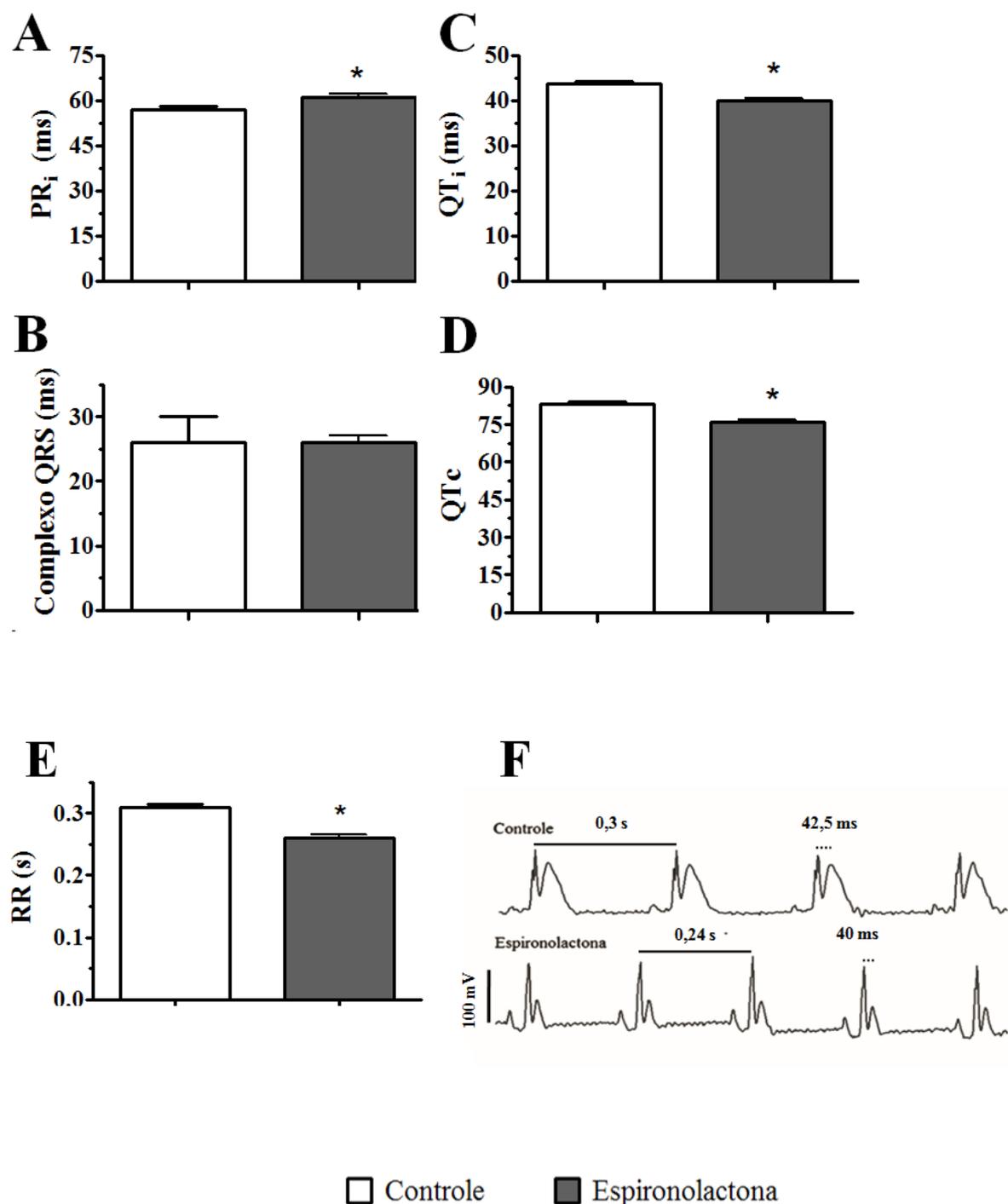


Figura 3- Efeitos da espironolactona sobre os parâmetros eletrocardiográficos em coração isolado de rato. (A) intervalo PR, (B) complexo QRS, (C) intervalo QT, (D) intervalo QT corrigido (QTc), (E) intervalo RR e (F) traçados representativos do ECG na ausência (superior) ou na presença de 10 μ .mol. L-1 de espironolactona, após 5 minutos de perfusão. No traçado do ECG, a linha contínua refere-se ao intervalo RR e a linha tracejada ao intervalo QT (* $p < 0,05$ vs controle: teste t de Student, $n = 7-8$).

Tabela 1 – Parâmetros eletrocardiográficos do coração isolado submetido à perfusão com espironolactona (ESP) na presença de bloqueadores de canais para potássio.

	PRi (ms)	QRS (ms)	QTi (ms)	QTc	RR (ms)	FC (bpm)	n
Controle	57 ± 1	26 ± 4	43 ± 0,6	83 ± 1	0,31 ± 0,01	202 ± 3	8
ESP	61 ± 1*	26 ± 1	39 ± 0,8*	76 ± 1*	0,26 ± 0,03*	237 ± 2*	7
ESP + TEA	52 ± 1*#	22 ± 1*	50 ± 2*#	83 ± 1#	0,35 ± 0,01*#	177 ± 5*#	6
ESP + GLI	71 ± 1*#	30 ± 1,3*	43 ± 2,1	73 ± 2*#	0,36 ± 0,03*#	181 ± 5*#	5

Espironolactona (ESP), tetraetilamônio (TEA), glibenclamida (GLI), frequência cardíaca. * $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs ESP usando ANOVA seguida de teste de Tukey.

4.3 Alterações induzidas pela espironolactona sobre a pressão do ventrículo esquerdo

A Fig.8 mostra um traçado representativo da pressão do ventrículo esquerdo (PVE) sob a ação da espironolactona. Podemos observar que este fármaco apresentou uma resposta bifásica sobre a PVE. Inicialmente ela aumentou a PVE seguida de uma redução da PVE que retornou a situação controle. Analisando os parâmetros contráteis, os resultados mostraram que após 1 minuto de perfusão do coração com a espironolactona ($10 \mu\text{mol. L}^{-1}$) houve um aumento da ΔPVE em $17 \pm 4,7 \text{ mmHg}$ ($p < 0,05$, $n = 5$). Após 10 minutos, a PVE retornou a situação controle (Fig. 9 A). A pressão diastólica final (ΔPVD) sofreu redução em função do tempo, de $-1,7 \pm 0,59 \text{ mmHg}$ e $-5,6 \pm 0,9 \text{ mmHg}$, após 1 e 10 minutos de perfusão, respectivamente ($p < 0,05$; $n = 6$, Fig. 9B). Analisando a primeira derivada máxima de contração ($+dP/dt$) os resultados mostraram não haver diferença significativa entre espironolactona e o controle (Fig. 9 C). Entretanto, houve redução da $+dP/dt$ apenas com 10 minutos de perfusão da espironolactona (de $-848 \pm 65 \text{ mmHg. s}^{-1}$ para $-577 \pm 57 \text{ mmHg. s}^{-1}$, $p < 0,05$; $n = 6$) (Fig. 9 D).



Figura 4– Registro representativo da pressão intraventricular esquerda na presença de espironolactona ($10 \mu\text{mol. L}^{-1}$) em coração isolado de rato.

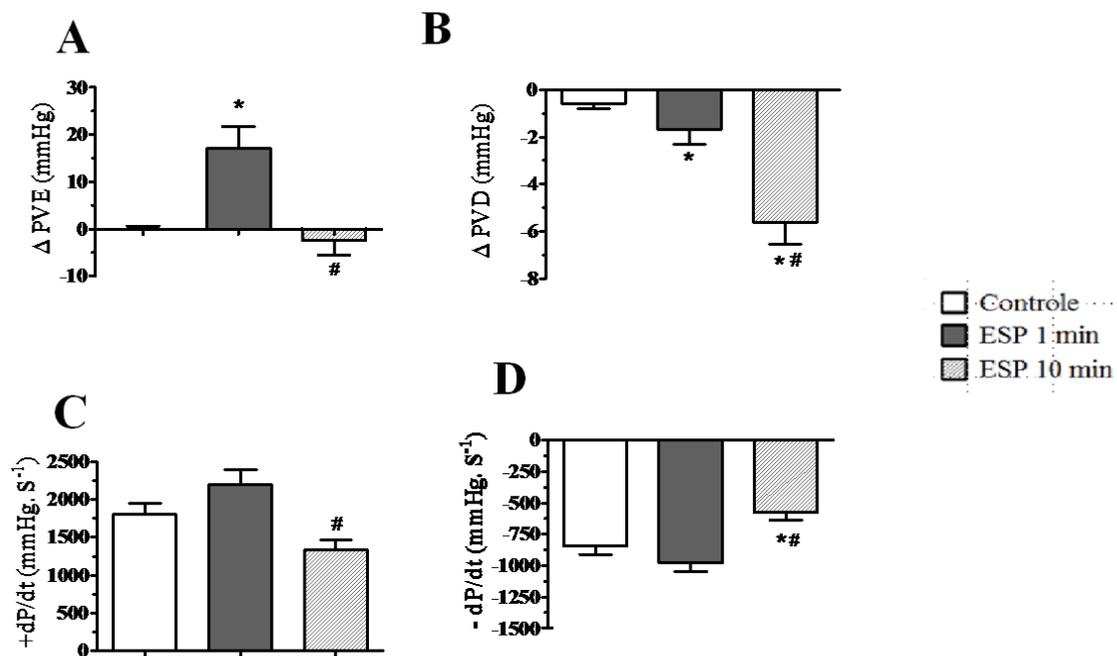


Figura 5– Efeito da espironolactona ($10 \mu\text{mol. L}^{-1}$) após 1 min (ESP 1 min) ou 10 min de perfusão (ESP 10 min) sobre os parâmetros contráteis em coração isolado de rato. (A) Variação da pressão ventricular esquerda (ΔPVE), (B) Variação da pressão ventricular diastólica final (ΔPVD), (C) derivada máxima da contração ($+dP/dt$) e (D) derivada máxima do relaxamento ($-dP/dt$). * ($p < 0,05$ vs controle) ou # ($p < 0,05$ vs ESP 1 min): ANOVA seguida de teste de Tukey ($n = 8$)

4.3.1 Alterações induzidas pela espironolactona na pressão ventricular frente aos inibidores de correntes de potássio

Prosseguindo a análise da função ventricular adotando os mesmos protocolos realizados nos experimentos de ECG, foi avaliada a resposta da espironolactona na presença de inibidores de canais para potássio. Como resultado, observamos que nem TEA nem glibenclamida foram capazes que impedir o aumento da pressão do ventrículo induzida pela espironolactona.

Tabela 2- Parâmetros contráteis obtidos a partir das curvas de pressão do ventrículo esquerdo nos diferentes grupos experimentais

	ΔPVE (mmHg)	ΔPVD (mmHg)	+dP/dt (mmHg. s ⁻¹)	-dP/dt (mmHg. s ⁻¹)
	1-2 min			
Controle	0 ± 0,6	-0,64 ± 0,21	1804 ± 145	-846 ± 65
ESP	17 ± 4,7*	-1,7 ± 0,59	2196 ± 192	-978 ± 69
ESP + TEA	7,8 ± 3,3	-1,2 ± 1,1	2319 ± 292	-1047 ± 131
ESP + GLI	14 ± 2,0*	-1,6 ± 1,9	1805 ± 125	-838 ± 51
	10 min			
ESP	-2,3 ± 3,2	-5,6 ± 0,9*	1340 ± 126 [#]	-577 ± 57* [#]
ESP + TEA	-1,6 ± 4,0	-2,5 ± 2,0	2037 ± 199	-873 ± 119
ESP + GLI	3,6 ± 1,3*	-5,4 ± 2,4	1421 ± 167	-625 ± 30

Varição da pressão média ventricular esquerda (ΔPVE , em mmHg), variação da pressão ventricular diastólica final (ΔPVD , em mmHg), derivada temporal sistólica máxima (+dP/dt, em mmHg. s⁻¹) e diastólica (-dP/dt em mmHg. s⁻¹). Dados adquiridos nos tempos de 1 e 2 mim ou 10 minutos de perfusão com (ESP) espironolactona, (TEA) tetraetilamônio, (GLI) glibenclamida. * (p < 0,05 vs controle) e [#] (p<0,05 vs ESP): análise de variância- ANOVA, seguida de teste de Tukey (n = 5-10 animais).

4.4 Ação da espironolactona sobre os efeitos mediados pela ouabaína (inibidor da Na^+/K^+ -ATPase)

Para avaliar a ação da espironolactona sobre os efeitos mediados pelo inibidor da Na^+/K^+ -ATPase, usou-se ouabaína ($100 \mu\text{mol. L}^{-1}$) que foi perfundida na presença e na ausência de espironolactona ($10 \mu\text{mol. L}^{-1}$). A Fig. 9 mostra que a ouabaína promoveu aumento na duração do intervalo PRi (A), QT_i (C) e RR (D). Entretanto, a espironolactona foi capaz de impedir todas essas alterações eletrocardiográficas induzidas pela ouabaína.

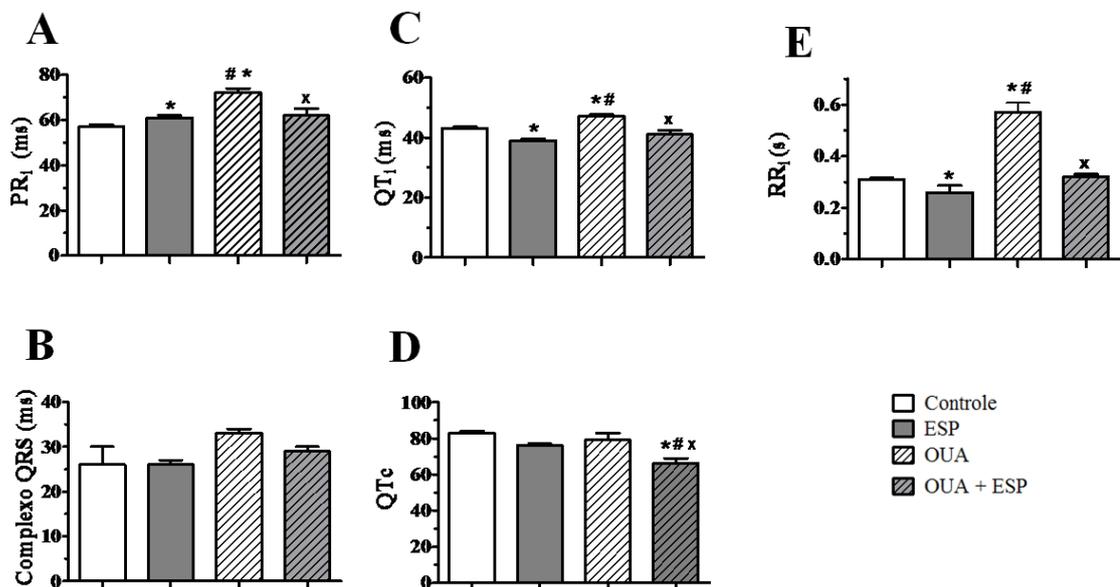


Figura 10 – Ação da espironolactona sobre os efeitos eletrocardiográficos mediados pela ouabaína, um inibidor da Na^+/K^+ -ATPase em coração de rato. (A) intervalo PR, (B) complexo QRS, (C) intervalo QT, (D) intervalo QT corrigido ou QTc e (E) intervalo RR, na ausência (controle) ou presença de espironolactona (ESP), ouabaína (OUA) ou a associação (OUA + ESP).(* p < 0,05 vs controle, # p < 0,05 vs ESP, x p < 0,05 vs OUA: ANOVA seguido de teste de Tukey, n = 6-7).

A tabela 3 mostra que a espironolactona ou ouabaína, após 1 a 2 minutos de perfusão, induziram um incremento de PVE de $17 \pm 4,7 \text{ mmHg}$ e $14,0 \pm 1,1 \text{ mmHg}$, respectivamente. Entretanto, após 10 minutos de perfusão, a PVE diminuiu significativamente, retornando a situação controle. No início da perfusão, a associação da espironolactona e ouabaína potencializou o

aumento da PVE que aumentou para $25 \pm 5,7$ mmHg ($p < 0,05$) reduzindo para $15 \pm 5,2$ mmHg ($p < 0,05$), após 10 minutos de perfusão.

A espironolactona também não modificou a resposta induzida pela ouabaína sobre a pressão ventricular diastólica (PVD), de maneira semelhante, a derivada máxima da sístole (+) dP/dt não foi modificada nesta condição experimental. Curiosamente, a derivada máxima da diástole (-) dP/dt se elevou (em módulo) de -978 ± 69 mmHg. s⁻¹ para -1354 ± 130 mmHg. s⁻¹ ($p < 0,05$).

Tabela 3- Média dos parâmetros de função ventricular aferidos nos corações isolados, nos diferentes blocos de experimentos.

	Δ PVE (mmHg)	Δ PVD (mmHg)	+dP/dt (mmHg. s ⁻¹)	-dP/dt (mmHg. s ⁻¹)
1-2 min				
Controle	$0 \pm 0,6$	$-0,64 \pm 0,21$	1804 ± 145	-846 ± 65
ESP	$17 \pm 4,7^*$	$-1,7 \pm 0,5$	2196 ± 192	-978 ± 69
OUA	$14,0 \pm 1,1^*$	$-2,1 \pm 0,14$	1902 ± 33	-771 ± 24
ESP + OUA	$25 \pm 5,7^*$	$0,93 \pm 2,0$	1863 ± 343	-872 ± 280
10 min				
ESP	$-2,3 \pm 3,2^\#$	$-5,6 \pm 1,9^*$	1340 ± 126	-577 ± 57
OUA	$3,1 \pm 0,9$	$-4,9 \pm 1,0$	1187 ± 158	$-430 \pm 11^\#$
ESP + OUA	$15 \pm 5,2^{*\dagger}$	$-3,9 \pm 1,6$	1807 ± 335	$-1354 \pm 130^{*\dagger}$

Variações da pressão ventricular esquerda (Δ PVE em mmHg), pressão diastólica final (Δ PVD em mmHg) e na derivada máxima sistólica (+) dP/dt (mmHg. s⁻¹) e diastólica (-) dP/dt (mmHg. s⁻¹). Dados adquiridos no início da perfusão das drogas (1 e 2 minutos) ou no tempo de 10 minutos de perfusão contínua. Espironolactona (ESP), ouabaína (OUA). (* $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs ESP 1-2 min, † $p < 0,05$ vs ESP 10 min: Análise de variância- ANOVA seguida de teste de Tukey). (n = 5-6 animais).

5 DISCUSSÃO

A espironolactona é um fármaco amplamente empregado na prática clínica desde a década de 1960 (Hollander e Wilkins, 1966b; Wolf et al., 1966), com grande eficácia na sobrevida de portadores de insuficiência cardíaca (Pitt et al., 2014; Pitt, 1999). Muitos pacientes com insuficiência cardíaca congestiva fazem uso de cardiotônicos digitálicos para aumentar a contratilidade e o bombeamento de sangue pelo coração e, frequentemente, o digitálico é prescrito juntamente com a espironolactona (Wang et al., 2010).

Os cardiotônicos, pelo baixo índice terapêutico, predisõem os usuários a efeitos colaterais, sendo a intoxicação digitálica uma dos principais acometimentos (Fisch e Knoebel, 1985; Wenger et al., 1985), e a espironolactona previne contra estes efeitos colaterais (Selye, Mecs e Tamura, 1969). Neste aspecto, o sinergismo entre espironolactona e os digitálicos foi atribuído a questões farmacocinéticas voltadas para o metabolismo e excreção deste fármaco (Steimer, 2003; Thomas e Maddox, 1981; Waldorff et al., 1983). No entanto, não tem sido estudada uma relação aguda entre espironolactona e digitálicos, buscamos aprofundar o entendimento desta combinação de fármacos diretamente sobre o coração.

Avaliamos primeiramente os efeitos eletrocardiográficos e contráteis da espironolactona em coração isolado de rato para conhecer o padrão de resposta nas condições experimentais empregadas. Assim, no traçado eletrocardiográfico, um dos efeitos observados foi o prolongamento do intervalo PR, também conhecido como bloqueio atrioventricular de primeiro grau (BAV). Esse prolongamento pode ocorrer como resultado de pelo menos 2 fenômenos: (1) prolongamento do tempo de retenção deste impulso elétrico nas células do nodo atrioventricular (NAV) (Waldo et al., 1973) ou (2) redução da velocidade de condução no sistema de condução elétrico pelo feixe de His e fibras de Purkinje (Bartos, Grandi e Ripplinger, 2015; Deccache, 1971; Noujaim et al., 2004). Considerando que a condução elétrica pelo NAV envolve o influxo de correntes de cálcio e diminuição da condutância ao potássio, é possível sugerir que a espironolactona desempenha ação direta em canais iônicos como parte do seu mecanismo de ação. Uma parcela da população apresenta bloqueios atrioventriculares assintomáticos sem que isso represente comprometimento cardíaco (Nisbet et al., 2016; Noujaim et al., 2004).

Um fenômeno que chamou a atenção neste trabalho foi a capacidade da espironolactona reduzir o intervalo QT ou QTc em relação ao controle. Sabe-se que o intervalo QT reflete a duração do potencial de ação ventricular (Chiamvimonvat et al., 2016; Kristof et al., 2012; Virag et al., 2009). O encurtamento do QT, em geral, significa que a repolarização ventricular foi mais rápida, provavelmente, por abertura de canais para potássio (Chiamvimonvat et al., 2016; Li, McLerie e Lopatin, 2004). Para avaliar o envolvimento de canais de potássio no mecanismo de ação da espironolactona e na redução do QT_i foram feitas manobras farmacológicas com o uso de 2 bloqueadores de canais para potássio: tetraetilamônio (TEA, antagonista de canais para potássio operados por voltagem) e glibenclamida (antagonista de canais para potássio sensíveis a ATP) (Chiamvimonvat et al., 2016; Li, McLerie e Lopatin, 2004; Tamargo et al., 2004; Xu, H, Li e Nerbonne, 1999). Os resultados mostraram que na presença de TEA, o encurtamento do QT_i induzido pela espironolactona desapareceu (TEA), permitindo-se atribuir a espironolactona a capacidade aumentar correntes de efluxo de potássio.

O prolongamento do intervalo QT é razão para desaprovação de muitos fármacos para uso clínico (Abi-Gerges et al., 2006) e se a espironolactona consegue reduzir este intervalo (como mostrado nos nossos experimentos), ela pode ser útil contra efeitos colaterais potencialmente induzidos por medicamentos que prolonguem o intervalo QT, como os antidepressivos, antipsicóticos, anti-inflamatórios não-esteroidais ou nas síndromes do QT longo (Etheridge et al., 2003; Hasnain e Vieweg, 2014; Kristof et al., 2012; Pavão et al., 2014).

Na pressão ventricular esquerda, a espironolactona promoveu uma resposta bifásica, inicialmente houve um aumento da pressão seguida de uma diminuição da força que retornou a situação controle. A resposta inotrópica positiva induzida por espironolactona já havia sido descrita em coração de rato (Barbato et al., 2004), que atribuiu a este fármaco o poder de aumentar a atividade da ATPase da miosina. Por outro lado, a literatura relata que espironolactona inibiu, em célula hepática, a atividade Na⁺/K⁺-ATPase (Miner Jr., Sneller e Crawford, 1983), o que levaria a um aumento intracelular de Na⁺. Esse aumento na concentração de sódio ativaria o trocador Na⁺/Ca⁺⁺ na configuração de 'outward', o que iria favorecer um maior influxo de cálcio (Arnon, Hamlyn e Blaustein, 2000; Katz, 1977), elevando assim a contratilidade cardíaca (Herzig e Mohr, 1984; Katz, 1977). Essa capacidade

de inibir a atividade da Na^+/K^+ -ATPase é uma propriedade típica dos glicosídeos cardiotônicos.

Reconhecidamente, os glicosídeos cardiotônicos promovem efeito dromotrópico negativo, prolongando o intervalo PR (Calleja e Guerrero, 1973) e elevando a contratilidade cardíaca (Altamirano et al., 2006; Vassalle et al., 1961; Wenger et al., 1985). Nossos resultados mostraram que a espironolactona apresentou uma resposta semelhante ao dos glicosídeos cardiotônicos, ou seja, aumentou PRi e a força contrátil. Desta forma, resolvemos investigar a possibilidade do efeito da espironolactona ser semelhante ao da ouabaína, que é um inibidor da Na^+/K^+ -ATPase. Este raciocínio já havia sido hipotetizado por outros pesquisadores (Mironneau et al., 1990; Rifka et al., 1978; Steimer, 2003; Thomas e Maddox, 1981). Os resultados mostraram que a espironolactona foi capaz de impedir todas as alterações eletrocardiográficas induzidas pela ouabaína, tais como aumento do PRi, QT_i e RR. Esses achados sugerem que a espironolactona possa estar agindo no mesmo sítio de ligação da ouabaína na Na^+/K^+ -ATPase e, dessa forma, diminuindo a resposta elétrica da ouabaína. Por outro lado, a resposta inotrópica positiva da ouabaína foi potencializada na presença de espironolactona. Sabemos que os glicosídeos cardiotônicos, por aumentar a força miocárdica, são frequentemente prescritos para pacientes com insuficiência cardíaca (Altamirano et al., 2006; Deccache, 1971; Song et al., 2014). A associação da espironolactona com ouabaína potencializou a resposta contrátil, mas diminuiu as alterações eletrocardiográficas induzidas pela ouabaína, tal como o aumento do QT_i. Cruz e Matsuda (1994) mostraram que a ouabaína e outros glicosídeos cardiotônicos conseguem inibir a corrente de potássio retificadora retardada (K_{dr}) e, conseqüentemente, prolongar o potencial de ação cardíaco aumentando o QT_i (Cruz e Matsuda, 1994). Como a espironolactona impediu esse aumento de QT_i induzido pela ouabaína, podemos sugerir que a espironolactona aumenta a corrente de potássio.

No entanto, a ação do glicosídeo sobre a bomba de sódio e potássio cardíaca se realiza mediante a inversão no sentido do fluxo do trocador sódio/cálcio, que passa a internalizar íons cálcio após ação do glicosídeo na Na^+/K^+ -ATPase. Sabe-se que a participação do trocador sódio/cálcio de membrana contribui com os efeitos induzidos por digitálicos (Amran, Homma e Hashimoto, 2011), ao mesmo tempo que a participação deste trocador é baixa na fisiologia normal do coração do rato (Bassani, Bassani e Bers, 1994).

Assim, a resposta da espironolactona ao mitigar os efeitos da ouabaína, permite-nos sugerir que, pelo menos em parte, o mecanismo de ação da espironolactona antagoniza alterações cardíacas induzidas por digitálicos, podendo isso implicar na redução do risco de toxicidade promovida por digitálicos (Selye, Mecs e Tamura, 1969), afinal, o efeito diurético atribuído a este fármaco pode ser resultante da perturbação da bomba de sódio e potássio nos túbulos distais dos néfrons (Horisberger e Giebisch, 1987). Moléculas de natureza esteroideal são frequentemente estudadas pela possibilidade de atuar em diferentes tipos de receptor farmacológico (ARIËNS, 1964), neste caso, a espironolactona parece atuar na Na^+/K^+ -ATPase como ligante, sem desencadear todas as ações que um glicosídeo cardiotônico ativaria na Na^+/K^+ -ATPase.

Sabe-se que a bomba de recaptura de cálcio do citoplasma para o retículo sarcoplasmático (SERCA) tem papel importante na pressão diastólica (Fukuta e Little, 2007; Periasamy e Janssen, 2008; Schmidt et al., 1998) Então, pode-se verificar que há uma modificação no processo de mobilização e recaptura de cálcio pelo retículo sarcoplasmático por ação da espironolactona, observando a capacidade deste fármaco reduzir a pressão diastólica final e desacelerar o relaxamento ventricular.

6 CONCLUSÃO

Em coração isolado de rato, a espironolactona reduz o intervalo QT, ou seja, aumenta o efluxo de potássio facilitando a repolarização da célula cardíaca. Em condições em que há o remodelamento cardíaco, canalopatias ou em outras condições patológicas que resultem em aumento do intervalo QT, se potencializa o risco cardíaco. Como a espironolactona reduz este intervalo do ECG ela tem um potencial cardioprotetor.

O sinergismo da espironolactona com a ouabaína potencializou o aumento da pressão ventricular esquerda induzida pela ouabaína, ao mesmo tempo em que inibiu as alterações eletrocardiográficas, tais como aumento do QT_i e bradicardia. Houve também uma melhora na severidade da arritmia, por diminuir o bloqueio atrioventricular (caracterizado pelo aumento do PR_i). Além disso, a espironolactona melhorou o relaxamento diastólico ventricular, possivelmente por aprimorar os mecanismos de recaptura de íons cálcio para os estoques intracelulares da célula cardíaca. A redução da pressão diastólica é uma das metas para o tratamento da insuficiência cardíaca.

Assim, nas condições experimentais realizadas neste trabalho, a espironolactona apresenta ação cardioprotetora direta sobre o coração, por diminuir os efeitos tóxicos da ouabaína e por potencializar o seu inotropismo positivo.

REFERÊNCIAS

ABI-GERGES, N.; SMALL, B. G.; LAWRENCE, C. L.; HAMMOND, T. G.; VALENTIN, J.-P.; POLLARD, C. E. Gender differences in the slow delayed (IKs) but not in inward (IK1) rectifier K⁺ currents of canine Purkinje fibre cardiac action potential: key roles for IKs, beta-adrenoceptor stimulation, pacing rate and gender. **British journal of pharmacology**, v. 147, n. 6, p. 653–60, 2006.

ALBAGHDADI, M.; GHEORGHIADÉ, M.; PITT, B. Novel drugs Mineralocorticoid receptor antagonism : therapeutic potential in acute heart failure syndromes. p. 2626–2633, 2011.

ALTAMIRANO, J.; LI, Y.; DESANTIAGO, J.; PIACENTINO, V.; HOUSER, S. R.; BERS, D. M. The inotropic effect of cardioactive glycosides in ventricular myocytes requires Na⁺-Ca²⁺ exchanger function. **The Journal of physiology**, v. 575, n. Pt 3, p. 845–854, 2006.

AMRAN, M. S.; HOMMA, N.; HASHIMOTO, K. Effects of SEA0400 on Ouabain-induced Arrhythmias in Guinea Pigs. **Journal of Scientific Research**, v. 4, n. 1, 2011.

ARIËNS, E. . Drug-Receptor Interaction: Interaction of One or More Drugs with Different Receptor Systems. *In: Medicinal Chemistry: A Series of Monographs (Molecular Pharmacology)*. [s.l.] Academic Press, 1964. v. 3, Part Ap. 287–393.

ARNON, A.; HAMLYN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P. Ouabain augments Ca⁽²⁺⁾ transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na⁽⁺⁾. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 279, n. 2, p. H679-91, ago. 2000.

BARBATO, J. C.; RASHID, S.; MULROW, P. J.; SHAPIRO, J. I.; FRANCO-SAENZ, R. Mechanisms for aldosterone and spironolactone-induced positive inotropic actions in the rat heart. **Hypertension**, v. 44, n. 5, p. 751–757, 2004.

BARTOS, D. C.; GRANDI, E.; RIPPLINGER, C. M. Ion Channels in the Heart. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 3, p. 1423–1464, jul. 2015.

BARUSCOTTI, M.; BUCCHI, A.; DIFRANCESCO, D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 107, n. 1, p. 59–79, 2005.

BASSANI, J. W.; BASSANI, R. A.; BERS, D. M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. **The Journal of physiology**, v. 476, n. 2, p. 279–93, 1994.

BELL, R. M.; MOCANU, M. M.; YELLON, D. M. Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 50, n. 6, p. 940–950, 2011.

BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 1, n. 1, p. 11–21, out. 2000.

BERS, D. M. coupling. v. 415, n. January, 2002.

_____. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annual review of physiology**, v. 70, p. 23–49, 2008.

BIDWELL, P.; BLACKWELL, D. J.; HOU, Z.; ROBIA, S. L. FRET from SERCA to Phospholamban is Decreased by Thapsigargin and Anti-PLB Antibody, but not by Calcium. **Biophysical Journal**, v. 96, n. 3 sup 1, p. 143a, 18 fev. 2009.

BRADY, A. Excitation and Excitation-Contraction Coupling in Cardiac Muscle. **Physiology**, n. July, 1963.

BRODY, T. M. Na⁺, k⁺-ATPase activity and cardiac glycoside action. In: WILKERSON, R. D. (Ed.). . **Cardiac pharmacology (Physiologic and pharmacologic bases of drug therapy)**. New York: Academic Press, 1981. p. 95–112.

CABALLERO, R.; VAQUERO, M.; TAMARGO, J.; DELPO, E. Spironolactone and its main metabolite canrenoic acid block. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, n. 1, p. 146–161, 2005.

CALLEJA, H. B.; GUERRERO, M. X. Prolonged PR interval and coronary artery disease '. n. July 1972, p. 372–376, 1973.

CAMPOS-FILHO, C. DE M. O coração como bomba. In: KRIEGER, E. M. (Ed.). . **Fisiologia Cardiovascular**. [s.l.] SBC, 1976. p. 369.

CHAI, W.; GARRELD, I. M.; ARULMANI, U.; SCHOEMAKER, R. G.; LAMERS, J. M. J.; DANSER, A. H. J. Genomic and nongenomic effects of aldosterone in the rat heart: why is spironolactone cardioprotective? **British Journal of Pharmacology**, v. 145, n. 5, p. 664–671, 2005.

CHANDA, D.; KRISHNA, A. V.; GUPTA, P. K.; SINGH, T. U.; PRAKASH, V. R.; SHARMA, B. Role of Low Ouabain-Sensitive Isoform of Na⁺ + -K⁺ -ATPase in the Regulation of Basal Tone and Agonist-Induced Contractility in Ovine Pulmonary Artery. v. 52, n. 2, p. 167–175, 2008.

CHAPMAN, B. R. A. By R. A. CHAPMAN From the Department of Physiology, University of Leicester, Leicester LE1 7RH (Received 12 July 1972). p. 209–232, 1973.

CHEN, Z. Competitive displacement of wild-type phospholamban from the Ca²⁺-free cardiac calcium pump by phospholamban mutants with different binding affinities. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 76, p. 130–137, 2014.

CHIAMVIMONVAT, N. *et al.* Potassium currents in the heart: Functional roles in repolarization, arrhythmia and therapeutics. **The Journal of physiology**, v. 0, p. 1–64, 2016.

CONDE GARCIA, E. A. **Biofísica**. [s.l.] Sarvier, 1997.

CORVOL, P.; MICHAUD, A.; MENARD, J.; FREIFELD, M.; MAHOUDEAU, J. Antiandrogenic effect of spiro lactones: mechanism of action. **Endocrinology**, v. 97, n. 1, p. 52–58, jul. 1975.

COSTA, A. R.; TORRES, L. B.; MEDEI, E.; RICARDO, R. A.; FRANÇA, J. P.; SMAILI, S.; NASCIMENTO, J. H. M.; OSHIRO, M. E. M.; BASSANI, J. W. M.; FERREIRA, A. T.; TUCCI, P. J. F. The negative inotropic action of canrenone is mediated by L-type calcium current blockade and reduced intracellular calcium transients. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 2, p. 580–

587, 2009.

COUTINHO, D. C. O.; MONNERAT-CAHLI, G.; FERREIRA, A. J.; MEDEI, E. Activation of angiotensin-converting enzyme 2 improves cardiac electrical changes in ventricular repolarization in streptozotocin-induced hyperglycaemic rats. **Europace**, v. 16, n. 11, p. 1689–1696, 2014.

CRUZ, J. DOS S.; MATSUDA, H. Depressive effects of arenobufagin on the delayed rectifier K⁺ current of guinea-pig cardiac myocytes. **European journal of pharmacology**, v. 266, n. 3, p. 317–325, fev. 1994.

DACQUET, C.; LOIRAND, G.; MIRONNEAU, C.; MIRONNEAU, J.; PACAUD, P. Spironolactone inhibition of contraction and calcium channels in rat portal vein. **British journal of pharmacology**, v. 92, n. 3, p. 535–544, nov. 1987.

DALE DUBIN, M. D. **Interpretação Rápida do ECG**, 2004.

DECCACHE, W. **Arritmias cardíacas**. [s.l.] Atheneu, 1971.

DING, Q.; BAI, Y.; TINOCO, A.; MORTARA, D.; DO, D.; BOYLE, N. G.; PELTER, M. M.; HU, X. Developing new predictive alarms based on ECG metrics for bradysystolic cardiac arrest. **Physiological Measurement**, v. 36, n. 12, p. 2405–2422, 2015.

DOSTANIC-LARSON, I.; LORENZ, J. N.; HUYSSSE, J. W. VAN; NEUMANN, J. C.; MOSELEY, A. E.; LINGREL, J. B.; DOSTANIC, I.; JON, C. Molecular Mechanisms Linking Salt to Hypertension and biological significance of their cardiac glycoside binding site. **Americal Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, p. 524–528, 2006.

ETHERIDGE, S. P.; COMPTON, S. J.; TRISTANI-FIROUZI, M.; MASON, J. W. A New Oral Therapy for Long QT Syndrome: Long-Term Oral Potassium Improves Repolarization in Patients with HERG Mutations. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 42, n. 10, p. 1777–1782, 2003.

FABIATO, A.; FABIATO, F. Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibers with disrupted or closed sarcolemmas - Calcium-dependent cyclic and tonic contractions. **Circulation Research**, v. 31, n. 3, p. 293–307, 1972.

FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. **The American journal of physiology**, v. 245, n. 1, p. C1–C14, 1983.

FERREIRA, J. P.; SANTOS, M.; ALMEIDA, S.; MARQUES, I.; BETTENCOURT, P.; CARVALHO, H. Mineralocorticoid receptor antagonism in acutely decompensated chronic heart failure. **European Journal of Internal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 67–72, 2014.

FINOTTI, P.; PALATINI, P. Canrenone as a partial agonist at the digitalis receptor site of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 217, n. 3, p. 784–790, jun. 1981.

FISCH, C.; KNOEBEL, S. B. Digitalis cardiotoxicity. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 5, n. 5, p. 91A–98A, 1985.

FUKUTA, H.; LITTLE, W. C. Contribution of Systolic and Diastolic Abnormalities to Heart Failure With a Normal and a Reduced Ejection Fraction. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 49,

n. 4, p. 229–240, 2007.

GARCIA, E. A. C. **Biofísica** Sarvier, , 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9a. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 1997.

HARRISON, G. .; RAYMOND, W. H. A. Preparation of clean chemical solutions. **British Medical Journal**, v. 2, p. 930–932, 1951.

HASNAIN, M.; VIEWEG, W. V. R. QTc interval prolongation and torsade de pointes associated with second-generation antipsychotics and antidepressants: A comprehensive review. **CNS Drugs**, v. 28, n. 10, p. 887–920, 2014.

HERMIDORFF, M. M. .; FARIA, G. D. O. .; AMÂNCIO, G. D. C. S. .; ASSIS, L. V. M. . DE; ISOLDI, M. C. . Non-genomic effects of spironolactone and eplerenone in cardiomyocytes of neonatal Wistar rats: Do they evoke cardioprotective pathways? **Biochemistry and Cell Biology**, v. 93, n. 1, p. 83–93, 2015.

HERTZ, R.; TULLNER, W. W. Progestational activity of certain steroid-17-spirolactones. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 99, n. 2, p. 451–452, nov. 1958a.

_____. Progestational activity of certain steroid-17-spirolactones. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 99, n. 2, p. 451–452, nov. 1958b.

HERZIG, S.; MOHR, K. Action of ouabain on rat heart: comparison with its effect on guinea-pig heart. **British Journal of Pharmacology**, v. 82, n. 1, p. 135–142, 1984.

HINKEN, A. C.; SOLARO, R. J. A dominant role of cardiac molecular motors in the intrinsic regulation of ventricular ejection and relaxation. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 22, n. 16, p. 73–80, 2007.

HOLLANDER, W.; WILKINS, R. W. The pharmacology and clinical use of rauwolfia, hydralazine, thiazides, and aldosterone antagonists in arterial hypertension. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 8, n. 4, p. 291–318, jan. 1966a.

_____. The pharmacology and clinical use of rauwolfia, hydralazine, thiazides, and aldosterone antagonists in arterial hypertension. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 8, n. 4, p. 291–318, jan. 1966b.

HORISBERGER, J. D.; GIEBISCH, G. Potassium-sparing diuretics. **Renal physiology**, v. 10, n. 3–4, p. 198–220, 1987.

JOHNSTON, C. SP 01-3 ALDOSTERONE ANTAGONISTS IN HEART FAILURE. **Journal of hypertension**, v. 34 Suppl 1, p. e28, set. 2016.

KATZ, A.; LORELL, B. Regulation of cardiac contraction and relaxation. **Circulation**, v. 102, p. 69–74, 2000.

KATZ, A. M. **Physiology of the heart**. New York: Raven Press, 1977.

KATZ, A M. Regulation of cardiac muscle contractility. **The Journal of general physiology**, v. 50, n. 6, p. Suppl:185-96, 1967.

_____. Effects of digitalis on cell biochemistry: sodium pump inhibition. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 5, n. 5 Suppl A, p. 16A–21A, 1985.

KRISTOF, A. *et al.* Diclofenac prolongs repolarization in ventricular muscle with impaired repolarization reserve. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e53255, 2012.

LANTIERI, L. C.; BERTOLETTI, J. C. **Interpretação Eletrocardiográfica Adulta e Pediátrica**. [s.l.] Artmed, 2009.

LI, J.; MCLERIE, M.; LOPATIN, A. N. Transgenic upregulation of IK1 in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 287, n. July 2004, p. H2790–H2802, 2004.

LU, H. R.; YU, F.; DAI, D. Z.; REMEYSEN, P.; CLERCK, F. DE. Reduction in QT dispersion and ventricular arrhythmias by ischaemic preconditioning in anaesthetized, normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 13, n. 4, p. 445–454, 1999.

MATHEUS NASCIMENTO, J.H.; CAMPOS DE CARVALHO, A. C. Eletrofisiologia do coração. *In*: CURI, R.; PROCÓPIO, J. (Ed.). **Fisiologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. .

MATTIAZZI, A.; MUNDIÑA-WEILENMANN, C.; GUOXIANG, C.; VITTONI, L.; KRANIAS, E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. **Cardiovascular Research**, v. 68, n. 3, p. 366–375, 2005.

MILLER, D. J. Sydney Ringer; physiological saline, calcium and the contraction of the heart. **The Journal of physiology**, v. 555, n. Pt 3, p. 585–587, 2004.

MINER JR., P. B.; SNELLER, M.; CRAWFORD, S. S. Spironolactone- and canrenone-induced changes in hepatic (Na⁺,K⁺)ATPase activity, surface membrane cholesterol and phospholipid, and fluorescence polarization in the rat. **Hepatology**, v. 3, n. 4, p. 481–488, 1983.

MIRONNEAU, J.; SAYET, I.; RAKOTOARISOA, L.; DACQUET, C.; MIRONNEAU, C. Interactions of spironolactone with (+)-[3H]-isradipine and (-)-[3H]-desmethoxyverapamil binding sites in vascular smooth muscle. **British journal of pharmacology**, v. 101, n. 1, p. 6–7, set. 1990.

NASARIO-JUNIOR, O.; BENCHIMOL-BARBOSA, P. R.; TREVIZANI, G. A.; MAROCOLO, M.; NADAL, J. Effect of aerobic conditioning on ventricular activation: A principal components analysis approach to high-resolution electrocardiogram. **Computers in Biology and Medicine**, v. 43, n. 11, p. 1920–1926, 2013.

NAYLER, W. G.; EMERY, P. F. The positive inotropic activity of tetraethylammonium ions and their effect on radiocalcium movement. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 114, p. 116–23, 1964.

NICHOLS, C. G. Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Currents in Heart Disease and Cardioprotection. **Cardiac Electrophysiology Clinics**, v. 8, n. 2, p. 323–335, 21 set. 2016.

NISBET, A. M.; CAMELLITI, P.; WALKER, N. L.; BURTON, F. L.; COBBE, S. M.; KOHL, P.; SMITH, G. L. Journal of Molecular and Cellular Cardiology Prolongation of atrio-

ventricular node conduction in a rabbit model of ischaemic cardiomyopathy: Role of fibrosis and connexin remodelling. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 94, p. 54–64, 2016.

NISHIO, M.; RUCH, S. W.; KELLY, J. E.; AISTRUP, G. L.; SHEEHAN, K.; WASSERSTROM, J. A. Ouabain Increases Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release in Cardiac Myocytes. v. 308, n. 3, p. 1181–1190, 2004.

NOBLE, D. **The initiation of the heartbeat**. 2a. ed. Oxford: Clarendon Press, 1979.

NOUJAIM, S. F.; LUCCA, E.; MUÑOZ, V.; PERSAUD, D.; BERENFELD, O.; MEIJLER, F. L.; JALIFE, J. From mouse to whale: A universal scaling relation for the PR interval of the electrocardiogram of mammals. **Circulation**, v. 110, n. 18, p. 2802–2808, 2004.

PAES DE CARVALHO, A. Excitação Cardíaca. *In*: KRIEGER, E. M. (Ed.). **Fisiologia Cardiovascular**. Sociedade ed. São Paulo: [s.n.]. p. 369.

PAVÃO, M. L. R. C.; ONO, V. C.; ARFELLI, E.; SIMÕES, M. V.; MARIN NETO, J. A.; SCHMIDT, A. Sudden Cardiac Death and Short QT Syndrome. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 37–40, 2014.

PERIASAMY, M.; JANSSEN, P. M. L. Molecular Basis of Diastolic Dysfunction. **Heart failure clinics**, v. 4, n. 1, p. 13–21, jan. 2008.

PITT, B. *et al.* Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. **The New England journal of medicine**, v. 370, n. 15, p. 1383–92, 2014.

PITT, P. Numb Er 10 the Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients With Severe Heart Failure. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 709–717, 1999.

RAMÓN, F. Prolonged action potential from squid axons. *In*: PAES DE CARVALHO, A.; HOFFMAN, B. F.; LIEBERMAN, M. (Eds.). **Normal and abnormal conduction in the heart**. [s.l.] Futura Publishing Company, 1982. p. 510.

RANDALL, M. D. The involvement of ATP-sensitive potassium channels and adenosine in the regulation of coronary flow in the isolated perfused rat heart. p. 3068–3074, 1995.

REUTER, H.; POTT, C.; GOLDBERGER, J. I.; HENDERSON, S. A.; PHILIPSON, K. D.; SCHWINGER, R. H. G. Na⁺-Ca²⁺ exchange in the regulation of cardiac excitation-contraction coupling. **Cardiovascular Research**, v. 67, n. 2, p. 198–207, 2005.

RIFKA, S. M.; PITA, J. C.; VIGERSKY, R. A.; WILSON, Y. A.; LORIAUX, D. L. Interaction of digitalis and spironolactone with human sex steroid receptors. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 46, n. 2, p. 338–344, 1978.

RINGER, S.; BUXTON, D. W. Concerning the Action of Calcium, Potassium, and Sodium Salts upon the Eel's Heart and upon the Skeletal Muscles of the Frog. **The Journal of physiology**, v. 8, n. 1, p. 15–19, fev. 1887.

SAKMANN, B.; NEHER, E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. **Annual review of physiology**, v. 46, p. 455–472, 1984.

SCHEINER-BOBIS, G. The Na⁽⁺⁾, K⁽⁺⁾-ATPase: more than just a sodium pump.

Cardiovascular research, v. 89, n. 1, p. 6–8, 2011.

SCHMIDT, U.; HAJJAR, R. J.; HELM, P. A.; KIM, C. S.; DOYE, A. A.; GWATHMEY, J. K. Contribution of abnormal sarcoplasmic reticulum ATPase activity to systolic and diastolic dysfunction in human heart failure. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 30, n. 10, p. 1929–1937, 1998.

SCHONER, W.; SCHEINER-BOBIS, G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. **Am J Cardiovasc Drugs**, v. 7, p. 173–189, 2007.

SELYE, H. Spironolactone actions, independent of mineralocorticoid blockade. **Steroids**, v. 13, n. 6, p. 803–808, jun. 1969.

SELYE, H.; MECS, I.; TAMURA, T. Effect of spironolactone and norbolethone on the toxicity of digitalis compounds in the rat. **British journal of pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 485–488, out. 1969.

SEMPPLICINI, A.; SERENA, L.; VALLE, R.; CELOTTI, G.; FELICE, M.; FONTEBASSO, A.; PESSINA, A. C. Ouabain-inhibiting activity of aldosterone antagonists. n. 94, p. 110–113, 1995.

SHAO, Y.; REDFORS, B.; MATTSON-HULTÉN, L.; SCHARING TÄNG, M.; DARYONI, E.; SAID, M.; OMEROVIC, E. Adenosine prevents isoprenaline-induced cardiac contractile and electrophysiological dysfunction. **European Journal of Pharmacology**, v. 718, n. 1–3, p. 475–483, 2013.

SHENG, L.; YANG, M.; DING, W.; ZHANG, M.; NIU, J.; QIAO, Z.; GU, Y. Epidermal growth factor receptor signaling mediates aldosterone-induced profibrotic responses in kidney. **Experimental Cell Research**, v. 346, n. 1, p. 99–110, 2016.

SHIBATA, E. F.; GILES, W. R. Ionic currents that generate the spontaneous diastolic depolarization in individual cardiac pacemaker cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 22, p. 7796–800, 1985.

SONG, D.; DU, T. Ammonium activates ouabain-activated signalling pathway in astrocytes: therapeutic potential of ouabain antagonist. **Current neuropharmacology**, v. 12, n. 4, p. 334–341, 2014.

SONG, H.; KARASHIMA, E.; HAMLIN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P. Ouabain-digoxin antagonism in rat arteries and neurones. **The Journal of physiology**, v. 592, n. Pt 5, p. 941–69, 2014.

SORRENTINO, R.; CIRINO, G.; CALIGNANO, A.; MANCUSO, F.; SORRENTINO, L.; ANDRIUOLI, G.; PINTO, A. Increase in the basal tone of guinea pig thoracic aorta induced by ouabain is inhibited by spironolactone canrenone and potassium canrenoate. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 519–525, out. 1996.

SORRENTINO R, AUTORE G, CIRINO G, D'EMMANUELE DE VILLA BIANCA R, CALIGNANO A, VANASIA M, ALFIERI C, SORRENTINO L, P. A. Effect of spironolactone and its metabolites on contractile property of isolated rat aorta rings. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 36, n. 2, p. 230–5, 2000.

STEIMER, W. “Lack of clinically significant interference by spironolactone with the

AxSYM Digoxin II assay” only applies to low-dose therapy with spironolactone. Therapeutic drug monitoring United States, ago. 2003.

TAMARGO, J.; TAMARGO, J.; CABALLERO, R.; CABALLERO, R.; GÓMEZ, R.; GÓMEZ, R.; VALENZUELA, C.; VALENZUELA, C.; DELPÓN, E.; DELPÓN, E. Pharmacology of cardiac potassium channels. **Cardiovascular Research**, v. 62, p. 9–33, 2004.

THOMAS, R.; MADDOX, T. The interaction of spironolactone and digoxin: a review and evaluation. **Therapeutic drug monitoring**, v. 3, n. 2, p. 117–120, 1981.

TIKKANEN, J. T.; HUIKURI, H. V. Characteristics of “malignant” vs. “benign” electrocardiographic patterns of early repolarization. **Journal of Electrocardiology**, v. 48, n. 3, p. 390–394, 2015.

TUCCI, P. J. F.; MACIEL, R. H. Estabilidade Funcional do Coração. **Anais Brasileiros de Cardiologia**, p. 423–427, 1977.

VASSALLE, B. M.; GREENSPAN, K.; PH, D.; HOFFMAN, B. F. An Analysis of Arrhythmias Induced by Ouabain in Intact Dogs. v. XIII, n. August, p. 132–149, 1961.

VIRAG, L.; ACSAI, K.; HALA, O.; ZAZA, A.; BITAY, M.; BOGATS, G.; PAPP, J. G.; VARRO, A. Self-augmentation of the lengthening of repolarization is related to the shape of the cardiac action potential: implications for reverse rate dependency. **British journal of pharmacology**, v. 156, n. 7, p. 1076–1084, abr. 2009.

WALDO, A. L.; KAISER, G. A.; BOWMAN, F. O. J.; MALM, J. R. Etiology of prolongation of the P-R interval in patients with an endocardial cushion defect: Further observations on internodal conduction and the polarity of the retrograde P wave. **Circ**, v. 48, n. 1, p. 19–26, 1973.

WALDORFF, S.; HANSEN, P. B.; EGEBLAD, H.; BERNING, J.; BUCH, J.; KJAERGARD, H.; STEINESS, E. Interactions between digoxin and potassium-sparing diuretics. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 33, n. 4, p. 418–423, abr. 1983.

WANG, M. T.; SU, C. Y.; CHAN, A. L. F.; LIAN, P. W.; LEU, H. B.; HSU, Y. J. Risk of digoxin intoxication in heart failure patients exposed to digoxin-diuretic interactions: A population-based study. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 70, n. 2, p. 258–267, 2010.

WANG, Y.; AGRAFIOTI, F.; HATZINAKOS, D.; PLATANIOTIS, K. N. Analysis of Human Electrocardiogram for Biometric Recognition. **EURASIP Journal on Advances in Signal Processing**, v. 2008, n. 1, p. 1–11, 2008.

WENGER, T. L.; BUTLER, V. P.; HABER, E.; SMITH, T. W. Treatment of 63 severely digitalis-toxic patients with digoxin-specific antibody fragments. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 5, n. 5, p. 118A–123A, 1985.

WOLF, R. L.; MENDLOWITZ, M.; ROBOZ, J.; STYAN, G. P.; KORNFELD, P.; WEIGL, A. Treatment of hypertension with spironolactone. Double-blind study. **JAMA**, v. 198, n. 11, p. 1143–1149, dez. 1966.

XU, H.; GUO, W.; NERBONNE, J. M. Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. **The Journal of general physiology**, v. 113, n. 5, p. 661–678, 1999.

XU, H.; LI, H.; NERBONNE, J. M. Elimination of the transient outward current and action potential prolongation in mouse atrial myocytes expressing a dominant negative Kv4 α subunit. p. 11–21, 1999.

XU, H.; LI, H.; NERBONNE, J. M. Elimination of the transient outward current and action potential prolongation in mouse atrial myocytes expressing a dominant negative Kv4 alpha subunit. **The Journal of physiology**, v. 519 Pt 1, p. 11–21, ago. 1999.

ZHAO, H.; GU, D. W.; LI, H. T.; GE, Q. F.; LI, G. P. Inhibitory effects of spironolactone on myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 14, n. 3, p. 10315–10321, 2015.