



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JOSÉ EVALDO RODRIGUES DE MENEZES FILHO

**OS ISÔMEROS DO ISOPULEGOL BLOQUEIAM CANAIS PARA
CÁLCIO TIPO-L E ATENUAM A HIPERTROFIA CARDÍACA EM
RATO: VIA PKA E ERK 1/2**

ARACAJU

2019

Menezes-Filho, J.E.R. . Os isômeros do isopulegol modulam a sinalização do cálcio e atenuam a hipertrofia cardíaca em ratos: via PKA e EK 1/2. 2019.

JOSÉ EVALDO RODRIGUES DE MENEZES FILHO

**OS ISÔMEROS DO ISOPULEGOL BLOQUEIAM CANAIS PARA CÁLCIO
TIPO-L E ATENUAM A HIPERTROFIA CARDÍACA EM RATO: VIA PKA E
ERK 1/2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Sergipe como requisito à obtenção do grau de
Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior

Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Maria Lins de Vasconcelos

ARACAJU

2019

JOSÉ EVALDO RODRIGUES DE MENEZES FILHO

**OS ISÔMEROS DO ISOPULEGOL BLOQUEIAM CANAIS PARA CÁLCIO
TIPO-L E ATENUAM A HIPERTROFIA CARDÍACA EM RATO: VIA PKA E
ERK 1/2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Sergipe como requisito à obtenção do grau de
Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 17/06/2019

ARACAJU

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Menezes Filho, José Evaldo Rodrigues de

M543i Os isômeros do isopulegol bloqueiam canais para cálcio tipo-I e atenuam a hipertrofia cardíaca em rato: via PKA e ERK 1/2 / José Evaldo Rodrigues de Menezes Filho ; orientador Lucindo José Quintans Júnior ; coorientadora Carla Maria Lins de Vasconcelos. – Aracaju, 2019.

108 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Hipertrofia do coração. 2. Monoterpenos. 3. Estresse oxidativo. I. Quintans Júnior, Lucindo José, orient. II. Vasconcelos, Carla Maria Lins de, coorient.. III. Título.

CDU 616.12-007.61

**OS ISÔMEROS DO ISOPULEGOL BLOQUEIAM CANAIS PARA CÁLCIO
TIPO-L E ATENUAM A HIPERTROFIA CARDÍACA EM RATO: VIA PKA E
ERK 1/2**

Tese apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal
de Sergipe como requisito à obtenção do grau
de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 17/06/2019

Dr. Lucindo José Quintans Júnior (Orientador)

Dra. Carla Maria Lins de Vasconcelos (Coorientadora)

Dra. Flávia Viana Moreira (1º membro)

Dra. Luana Heimfarth (2º membro)

Dr. André Sales Barreto (3º membro)

Dr. Charles dos Santos Estevam (4º membro)

Suplentes

Dra. Vanessa Pereira Tortelli (1º suplente)

Dr. Américo Azevedo de Souza (2º suplente)

“Agradeça, agradeça, agradeça! Agradeça sempre! Agradeça por tudo que você tem, por tudo que recebe. Agradeça por tudo que ainda vai receber! Agradeça até por aquilo que não entende e também não aceita!

Essa é a melhor maneira e também a mais inteligente de ter uma atitude positiva em relação à vida! O próprio ato de agradecer atrai o melhor para você.

Agradeça pelos fracos, pelos chatos, pelos pobres de espírito. Agradeça pelos amigos, por aquelas pessoas que te agradam!

Agradeça pelos momentos felizes. Não deixe de manifestar gratidão aos membros de sua família. Seus pais, seus irmãos são os vínculos mais fortes que você tem!

O ato de agradecer ajuda o coração! Ajuda a mente a se abrir! Talvez para sair desse buraco que muitas vezes você se encontra é preciso agradecer. Experimente agradecer a tudo e a todos! Agora!

Não é possível você passar por essa vida sem ter o hábito de agradecer! Gratidão continuada, entende isso? Demonstrar pelo seu exemplo, pelos gestos, pelo afeto, pelo olhar, pelo coração, a gratidão que você tem por ter vindo a esse mundo!

Você sempre terá algo pelo que agradecer e quando começar a fazer isso, observe-se! Fique atento e perceba como a vida fica mais gostosa de ser compartilhada. Assim como é certo que é dando que se recebe, também é verdade que é agradecendo que se alcança!”

Luiz Carlos Mazzini

Ao meu irmão Osvaldinho, minha âncora e meu maior exemplo,
DEDICO

A Deus,
O autor da minha vida
OFEREÇO

RESUMO

MENEZES-FILHO, José Evaldo Rodrigues. **OS ISÔMEROS DO ISOPULEGOL BLOQUEIAM CANAIS PARA CÁLCIO TIPO-L E ATENUAM A HIPERTROFIA CARDÍACA EM RATO: VIA PKA E ERK 1/2**. Tese de doutorado em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2019.

Introdução: A hipertrofia cardíaca (HC) é caracterizada pelo remodelamento do tecido cardíaco acompanhada de alteração na sua função contrátil e elétrica. O isopulegol é um monoterpeno alcoólico com atividades antioxidante, ansiolítica e anticonvulsivante. **Objetivos:** Investigar os efeitos dos isômeros (+)-isopulegol ((+)-ISP) e (-)-isopulegol ((-)-ISP) na sinalização do cálcio intracelular e hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol (ISO). **Métodos:** Os efeitos contráteis dos isômeros foram avaliados em átrio esquerdo montado em cuba para órgão isolado e em cardiomiócito ventricular de rato pela fração de encurtamento usando sistema de detecção de bordas (Ionoptix). Em cardiomiócito ventricular isolado, foram avaliados a corrente de cálcio tipo-L ($I_{Ca,L}$) pela técnica de ‘patch-clamp’ na configuração ‘whole-cell’ bem como o transiente intracelular de cálcio usando a microscopia confocal (sonda FLUO 4AM) em situação controle e após a incubação com 100 μ M dos isômeros do ISP. O *docking* foi feito para avaliar a interação dos isômeros com o canal para cálcio tipo-L. A HC foi induzida pela administração de ISO (4,5 mg/kg, 7 dias, i.p). Foram avaliados 4 grupos de animais: 1) controle (salina 0,9% + DMSO 0,1%), 2) isoproterenol (ISO), 3) ISO + (-)-ISP (50 mg/kg) e 4) ISO + (+)-ISP (50 mg/kg). Nos animais hipertróficos e tratados, foram avaliados os parâmetros morfométricos, eletrocardiográficos, marcadores séricos bioquímicos (LDH, CPK e CK-MB), estresse oxidativo (TBARS, SOD, CAT e GPx), mediadores inflamatórios (TNF- α e IL-1 β), expressão de proteínas (PKA C- α , CAMKII, α/β CAMKII, ERK $^{1/2}$ total, p-ERK $^{1/2}$, SERCA, sarcalumelina, PP1 γ e NCX). **Resultados:** o (-)-ISP ($CE_{50} = 533,0 \pm 53,80 \mu$ M) e o (+)-ISP ($CE_{50} = 1836 \pm 165,71 \mu$ M) reduziram a contratilidade atrial, de modo dependente de concentração. Em cardiomiócito ventricular, após a incubação com 100 μ M de (-)-ISP e (+)-ISP, foi observado tanto redução da fração de encurtamento (40% e 28%) quanto redução da $I_{Ca,L}$ (em 68% e 59%), respectivamente. Além disso, os (-)-ISP e (+)-ISP reduziram o transiente intracelular do cálcio em 21% e 22%, respectivamente. O *docking* revelou a interação do (-)-ISP e (+)-ISP com o canal para cálcio do tipo-L com energias -65,84 Kcal/mol e -63,09 Kcal/mol, respectivamente. Os animais hipertróficos apresentaram aumento na relação peso do coração/peso corporal ($5,12 \pm 0,09$ mg/g, $p < 0,05$), bem como do peso do coração/comprimento da tibia ($364,20 \pm 13,74$ mg/cm, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($3,52 \pm 0,11$ mg/g; $246,2 \pm 6,33$ mg/cm) e que foram atenuados pelo tratamento com o (-)-ISP ($4,26 \pm 0,11$ mg/g e $299,40 \pm 7,45$ mg/cm) e (+)-ISP ($4,42 \pm 0,03$ mg/g e $318,10 \pm 3,24$ mg/cm). O (-)-ISP e (+)-ISP foram capazes de prevenir as alterações eletrocardiográficas (aumento do QRS, QTc e deflexão intrinsecóide) e o aumento dos níveis séricos de LDH, CPK e CPK-MB dos animais hipertróficos. Além disso, o tratamento dos animais com (-)-ISP e (+)-ISP foi capaz de reduzir o estresse oxidativo promovendo diminuição do TBARS e aumento da SOD, CAT e GPx, assim como redução de TNF- α (em 59% e 10,24%) e IL1- β (em 34% e 55%), respectivamente. O tratamento dos animais com (-)-ISP e (+)-ISP diminuiu a superexpressão de proteínas envolvidas na HC (PKA, ERK1/2 e NCX), assim como, preveniu a diminuição da expressão da SERCA e sarcalumelina. **Conclusão:** Os isômeros do isopulegol bloqueiam canais para cálcio tipo-L reduzindo o transiente intracelular de cálcio no cardiomiócito ventricular apresentando efeito cardioprotetor em modelo de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol.

Descritores: Monoterpenos, hipertrofia cardíaca, sinalização do cálcio, estresse oxidativo, coração, isoproterenol.

ABSTRACT

MENEZES-FILHO, José Evaldo Rodrigues. **ISOPULEGOL ISOMERS BLOCK L-TYPE CALCIUM CHANNEL AND ATTENUATE THE CARDIAC HYPERTROPHY IN RATS: PKA AND ERK 1/2 PATHWAY** . PhD thesis in Health Sciences, Federal University of Sergipe, Aracaju, 2019.

Introduction: Cardiac hypertrophy (CH) is characterized by the remodeling of cardiac muscle associated with change in its contractile and electrical function. Isopulegol is an alcoholic monoterpene with antioxidant, anxiolytic and anticonvulsant activities. **Objectives:** To investigate the effects of (+)-isopulegol ((+) - ISP) and (-)-isopulegol ((-) -ISP) isomers on intracellular calcium signaling and cardiac hypertrophy induced by isoproterenol (ISO). **Methods:** The contractile effects of isomers were evaluated in rat left atrium mounted and ventricular cardiomyocyte of rat by shortening fraction using edge detection system (Ionoptix). In ventricular cardiomyocyte were evaluated the L-type calcium current ($I_{Ca,L}$) by patch-clamp technique in 'whole-cell' configuration and intracellular calcium transient by confocal microscopy (FLUO 4AM) was investigated in control situation and after incubation with 100 μ M of both isomers. The docking was done to analysis the interaction of isomers with the L-type calcium channel. Cardiac hypertrophy was induced by administration of ISO (4.5 mg/kg, 7 days, i.p.). Four groups of animals were evaluated: 1) control (saline 0.9% + DMSO 0.1%), 2) isoproterenol (ISO), 3) ISO + (-)-ISP (50 mg/kg) and 4) ISO + (+)-ISP (50 mg/kg). In hypertrophic and treated animals were evaluated morphometric and electrocardiographic parameters, biochemical markers (LDH, CPK and CK-MB), oxidative stress (TBARS, SOD, CAT e GPx), inflammatory mediators (TNF- α and IL1- β), expression of proteins (PKA C- α , CAMKII, α/β CAMKII, ERK $\frac{1}{2}$ total, p-ERK $\frac{1}{2}$, SERCA, sarcalumenin, PP1 γ e NCX). **Results:** showed that (-)-ISP (EC_{50} = 533.0 $\pm$ 53.80 μ M) and (+)-ISP (EC_{50} = 1836 $\pm$ 165.71 μ M) reduced the atrial contractility, of concentration dependent manner. In ventricular cardiomyocytes, after incubation with 100 μ M of (-)-ISP and (+)-ISP was observed reduction of shortening fraction (40% and 28%) and $I_{Ca,L}$ (68% and 59%), respectively. In addition, (-)-ISP e (+)-ISP reduced the intracellular calcium transient in 21% and 22%, respectively. The docking revealed the interaction of (-)-ISP and (+)-ISP with the L-type calcium channel with energies -65.84 Kcal/mol and -63.09 Kcal/mol. Hypertrophic animals presented increase of heart weight/body weight ratio (5.12 $\pm$ 0.09 mg/g, p < 0.05) as well as heart weight/tibia length ratio (364.20 $\pm$ 13.74 mg/cm, p < 0.05) in compared to control (3.52 $\pm$ 0.11 mg/g; 246.2 $\pm$ 6.33 mg/cm) and were attenuated with treatment with (-)-ISP (4.26 $\pm$ 0.11 mg/g and 299.40 $\pm$ 7.45 mg/cm) and (+)-ISP (4.42 $\pm$ 0.03 mg/g and 318.10 $\pm$ 3.24 mg/cm). (-)-ISP and (+)-ISPs were able to prevent electrocardiographic changes (increase of QRS, QTc and intrinsicoid deflection) and increase of serum levels of LDH, CPK and CPK-MB of hypertrophic animals. In addition, the treatment of hypertrophic animals with (-)-ISP and (+)-ISP the oxidative promoted decrease of TBARS and increase of SOD, CAT and GPx. Furthermore, inflammatory mediators TNF- α (in 59% and 40%) and IL1- β (in 34% and 55%) were reduced in the two groups treated with (-)-ISP and (+)-ISP, respectively. Treatment of animals with (-)-ISP and (+)-ISP decreased the overexpression of proteins involved in cardiac hypertrophy (PKA, ERK1/2, NCX), as well as prevented the decrease of SERCA and sarcalumenin expression. **Conclusion:** The isopulegol isomers block L-type calcium channels reducing the intracellular calcium transient in the ventricular cardiomyocyte exhibiting cardioprotective effect in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy model

Descriptors: Monoterpenes, cardiac hypertrophy, calcium signaling, oxidative stress, heart, isoproterenol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do coração: câmaras cardíacas, veias, artérias e valvas	5
Figura 2. Micrografia eletrônica, em corte longitudinal, mostrando o sarcômero	6
Figura 3. Estrutura do sarcômero	6
Figura 4. Sistema de condução elétrica do coração	8
Figura 5. Potencial de ação cardíaco ventricular mostrando as suas fases	10
Figura 6. Mecanismos celulares da contração muscular	12
Figura 7. Ação dos agonistas de receptores β -adrenérgicos no transporte de cálcio e na maquinaria contrátil do músculo cardíaco	15
Figura 8. Representação das diferenças entre hipertrofia cardíaca concêntrica e excêntrica	19
Figura 9. Estrutura química dos isômeros do isopulegol	26
Figura 10. Esquema da montagem experimental usada para determinar a força de contração atrial	31
Figura 11. Traçado representativo de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz, e os parâmetros avaliados	33
Figura 12. Protocolo de pulso executado para avaliar o efeito dos isômeros do isopulegol sobre o curso-temporal da corrente de cálcio tipo-L ($I_{Ca,L}$) em cardiomiócito isolado de rato	34
Figura 13. Delineamento experimental usado para indução e tratamento da hipertrofia cardíaca, nos diferentes grupos experimentais	35
Figura 14. Eletrocardiograma normal, mostrando as ondas de despolarização (P, QRS) e repolarização (T), e os principais intervalos (PR, QT e RR) e segmentos (ST)	37
Figura 15. Efeito inotrópico negativo dos isômeros do isopulegol (ISP) em átrio esquerdo isolado de rato	45
Figura 16. Efeito dos isômeros do isopulegol (ISP) sobre o encurtamento celular em cardiomiócito ventricular de rato	47
Figura 17. Efeito dos isômeros do isopulegol (ISP) sobre a corrente de cálcio tipo-L ($I_{Ca,L}$) em cardiomiócito ventricular de rato	48
Figura 18. Efeito dos isômeros do isopulegol (ISP) sobre a o transiente intracelular global de cálcio	49
Figura 19. Estudo de docking para a interação da nifedipina e dos isômeros do isopulegol (ISP) com o canal para cálcio tipo-L (Cav 1.2)	50
Figura 20. Os isômeros do isopulegol atenuaram a hipertrofia cardíaca por marcadores morfométricos	52
Figura 21. Efeito dos isômeros do isopulegol sobre os parâmetros do ECG in	53

vivo

Figura 22. Os isômeros dos isopulegol (ISP) reduzem a lesão tecidual da hipertrofia cardíaca por diminuição dos marcadores bioquímicos 55

Figura 23. Avaliação do estresse oxidativo dos corações hipertróficos e submetidos ao tratamento com os isômeros do isopulegol (ISP) 58

Figura 24. Interleucinas envolvidas no processo inflamatório na hipertrofia cardíaca 59

Figura 25. Imunoconteúdo de proteínas envolvidas na hipertrofia cardíaca nos diferentes grupos experimentais 60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclase
ADP	Difosfato de adenosina
AEC	Acoplamento excitação-contração
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AR	Receptor adrenérgico
ATP	Trifosfato de adenosina
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
bpm	Batimentos por minuto
CAMKII	Calmodulina quinase II
Cav-L	Canal para cálcio operado por voltagem do tipo-L
CICR	Liberação de cálcio induzida por cálcio
CE ₅₀	Concentração efeito 50%
CPK-TOTAL	Creatinofosfoquinase
CPK-MB	Creatinofosfoquinase isoforma encontrada principalmente no coração
CTR	Controle
DCV	Doenças cardiovasculares
DI	Deflexão intrinsecóide
DMSO	Dimetilsilfóxido
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
ECG	Eletrocardiograma
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
GCPR	Receptor acoplado a proteína G
GDP	Guanidina difosfato
GPx	Glutathione peroxidase
GTP	Guanidina trifosfato
HC	Hipertrofia Cardíaca
ISO	Isoproterenol
ISP	Isopulegol
I _{Ca,L}	Corrente de cálcio tipo-L

I _{tof}	Corrente transitória de saída de potássio
LHD	Lactato desidrogenase
LOX	Lisil oxidase
MDA	Malondialdeído
MEF2A	Fator 2 A intensificador específico miócito
NAV	Nodo atrioventricular
NCX –	Trocador Na ⁺ /Ca ⁺²
NFAT	Fator nuclear ativado por células T
NSA	Nodo sinusal
Nav	Canais para sódio operados por voltagem
K _{ir}	Canal para potássio de retificação de entrada
PA	Potencial de ação
PLB	Fosfolambam
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PP1-γ	Proteína fosfatase 1-gama
PRi	Intervalo PR do eletrocardiograma
PMCA	ATPase de Ca ⁺² da membrana plasmática
QTi	Intervalo QT do eletrocardiograma
QRS	Complexo QRS do eletrocardiograma
RA	Receptor Adrenérgico
RS	Retículo Sarcoplasmático
RyR	Receptor da Rianodina
SARC	Sarcalumelina
SERCA	ATPase de Ca ⁺² do retículo sarcoplasmático
SNA	Sistema nervoso autônomo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNS	Sistema nervoso simpático
SNP	Sistema nervoso parassimpático
SOD –	Superóxido dismutase
TnC	Troponina C
TnI	Troponina I
TnT	Troponina I

SUMÁRIO

RESUMO	ix
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Estrutura e função do coração.....	4
2.2 Contratilidade do músculo cardíaco	5
2.3 Excitabilidade do miocárdio	8
2.4 Potencial de ação cardíaco e canais iônicos.....	9
2.4.1 Canais para Cálcio.....	10
2.5 Acoplamento excitação-contração e relaxamento do músculo cardíaco	12
2.6 Estimulação β -adrenérgica.....	14
2.7 Hipertrofia cardíaca	16
2.8 Indução da hipertrofia cardíaca por agonistas dos receptores β -adrenérgicos. 22	
2.9 Óleos Essenciais	24
2.9.1 Isopulegol	26
3. HIPÓTESE	28
4. OBJETIVOS.....	29
4.1. Objetivo geral	29
4.2. Objetivos específicos	29
5. MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1 Animais.....	30
5.2 Preparo dos isômeros do isopulegol	30
5.3 Efeito (+) e (-)-isopulegol sobre a contratilidade atrial	30
5.4 Efeito (+) e (-)-isopulegol sobre a contratilidade do cardiomiócito	31
5.5 Efeito do (+) e (-)-isopulegol sobre a corrente de cálcio tipo-L	33
5.6 Efeito do (+) e (-)-isopulegol sobre o transiente intracelular de cálcio	34
5.7 Avaliação do efeito anti-hipertrófico do (+) e (-)-isopulegol em coração de rato	35
5.7.1 Parâmetros morfométricos	36

5.7.2	Determinação dos marcadores bioquímicos de dano tecidual	36
5.7.3	Modelagem Molecular (Docking)	36
5.8	Registro eletrocardiográfico (ECG)	37
5.9	Avaliação do estresse oxidativo dos corações	38
5.9.1	Preparação dos tecidos para a mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividades enzimáticas	38
5.9.2	Efeito do (+) e (-) isopulegol sobre a expressão de proteínas envolvidas no processo hipertrófico	40
5.9.3	Determinação das concentrações de TNF- α e IL-1 β no tecido cardíaco	41
5.9.4	PCR em tempo real	Erro! Indicador não definido.
5.10	Análise estatística	42
6.	RESULTADOS	43
6.1.	Efeito dos isômeros (-)-isopulegol e (+)-isopulegol sobre a força contrátil do átrio esquerdo de ratos	43
6.2	Efeitos dos isômeros (+)-isopulegol e (-)-isopulegol sobre a contratilidade célula de cardiomiócito ventricular	44
6.3	Efeitos do (+)-isopulegol e (-)-isopulegol sobre a corrente de Ca ⁺² tipo-L em cardiomiócito ventricular	44
6.4	Efeito do (-)-isopulegol e (+)-isopulegol sobre o transiente intracelular de Ca ⁺² em cardiomiócito ventricular	46
6.5	Estudo do ‘docking’ do canal de cálcio tipo-L	47
6.6	Avaliação da atividade anti-hipertrófica do (-)-isopulegol e (+)-isopulegol em corações de ratos	49
6.7	Parâmetros morfométricos	49
6.8	Parâmetros eletrocardiográficos	50
6.9	Marcadores bioquímicos de dano tecidual	52
6.10	Análise qPCR	Erro! Indicador não definido.
6.11	Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes	53
6.12	Análise das interleucinas envolvidas no processo inflamatório na hipertrofia cardíaca	55
6.13	Análise do imunoconteúdo de proteínas envolvidas na hipertrofia cardíaca	55
7.	DISCUSSÃO	59
8.	CONCLUSÃO	68

9. REFERÊNCIAS.....	69
---------------------	----

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são consideradas a principal causa de morte em países ricos e emergentes (Mendis *et al.*, 2015). Em 2015, aproximadamente 17 milhões de pessoas morreram de DCV correspondendo a 31% de todas as mortes no mundo (Writing Group *et al.*, 2016). Em 2030, estima-se que esse número deva aumentar para 26,3 milhões de pacientes com DCV (Mendis *et al.*, 2015). A ‘American Heart Association’ considera que, em 2030, o custo global com DCV será de 1,4 bilhões de dólares, sendo considerado um custo elevado para os sistemas públicos de saúde. No Brasil, foi constatado em 2013 que 29,8% dos óbitos foram decorrentes de DCV (Rocha *et al.*, 2017).

Diante de um aumento de pré-carga ou pós-carga, o coração passa por um processo adaptativo caracterizado por aumento da massa cardíaca conhecido como hipertrofia cardíaca (HC). Inicialmente, a HC aumenta a contratilidade cardíaca em decorrência do aumento do número de sarcômeros em paralelo no cardiomiócito. Além disso, ocorrem mudanças na expressão de genes que induzem alterações no metabolismo, contratilidade cardíaca e sobrevivência do cardiomiócito que podem culminar em insuficiência cardíaca, arritmias e morte súbita. Portanto, a presença da HC constitui-se em um importante fator de risco cardiovascular (Balakumar *et al.*, 2010; Samak *et al.*, 2016).

Como característica da HC tem-se, inicialmente, um aumento concêntrico da massa do ventrículo, ou seja, redução da dimensão da câmara ventricular associada com aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo. Nessa situação, a espessura do cardiomiócito aumenta mais que o seu comprimento. Nessa condição, observa-se ainda a função contrátil preservada. Entretanto, essa condição progride para dilatação da câmara ventricular conhecida como hipertrofia excêntrica, onde o comprimento do cardiomiócito aumenta mais do que sua espessura o que compromete a função contrátil do músculo (remodelação mal-adaptativa). A hipertrofia patológica é geralmente acompanhada de fibrose no interstício e região perivascular e morte dos cardiomiócitos, com aumento dos níveis de colágeno tipo I e ativação de miofibroblastos (Maillet *et al.*, 2013).

A HC pode ser induzida experimentalmente pela administração crônica de isoproterenol, um agonista β -adrenérgico. O processo de lesão miocárdica induzida pelo

isoproterenol está baseado na toxicidade gerada pela sobrecarga de cálcio, decorrente da ativação dos canais para cálcio sarcolemiais. Estudos mostraram que o verapamil (antagonista do canal de cálcio), usado como vasodilatador no tratamento da isquemia coronariana, reduziu a pressão arterial e a frequência cardíaca em animais que recebem isoproterenol. Os resultados mostraram que o verapamil protegeu contra o aparecimento de lesões no miocárdio, alterações eletrocardiográficas e altos níveis plasmáticos de troponina I, prevenindo também as alterações hemodinâmicas. Os efeitos protetores foram atribuídos à atividade antagonista de cálcio da droga (Bombig et al., 1996; Pinneli et al., 2004; Ferreira Filho et al., 2010).

A literatura relata que os constituintes isolados de óleos essenciais, tais como os terpenos exibem a capacidade de inibir canais para cálcio tipo-L na membrana do cardiomiócito, de forma semelhante ao verapamil, reduzindo a contratilidade do coração. Dentre esses terpenos podemos citar a R-(+)-pulegona (Cerqueira et al., 2011), cis-epóxi-carvona (Souza, 2013), (-)-carvona (Silva, 2019), geraniol (Menezes-Filho et al., 2014), nerol (Menezes-Filho et al., 2019), nerolidol e farnesol (Souza, 2016, Vasconcelos et al., 2017) e terpineno 4-ol (Gondim et al., 2017). Os antagonistas para canal para cálcio vêm sendo empregados no tratamento da hipertensão arterial, angina do peito, arritmias cardíacas e HC (Pitt, 1997; Muntwyler, Follath, 2001, Lubsen et al., 2005, Takami, Shigematsu, 2003, Fagard et al., 2009).

Além de atuarem como antagonistas do cálcio, os terpenos também apresentam potente atividade antioxidante (Guimarães et al., 2010; Rabito *et al.*, 2013; de Andrade *et al.*, 2017). É sabido que a capacidade antioxidante está envolvida na prevenção e proteção de patogênese das DCV, tais como a HC (Bell *et al.*, 2001; Date *et al.*, 2002; Liao, 2004). Vários compostos naturais, por apresentarem atividade antioxidante têm sido investigados por seus efeitos cardioprotetores frente a HC (Silva *et al.*, 2019). Dentre eles podemos citar o honokiol (composto bifenólico) (Pillai *et al.*, 2015), curcumina (Li *et al.*, 2008), apocinina (Salem *et al.*, 2018), extrato do *Ginkgo biloba* (Mesquita *et al.*, 2017), coenzima Q10 (Ghule *et al.*, 2009), ácido gálico (Ryu *et al.*, 2016), luteína (Conceição, 2019), entre outros.

Dentre os monoterpenos destaca-se o isopulegol, um monoterpeno alcoólico encontrado em óleos essenciais de uma variedade grande de plantas aromáticas. O isopulegol tem sido utilizado na fabricação de perfumes com composição floral, porém, a sua principal utilidade vem sendo como intermediário sintético na preparação do

mentol (Chuah *et al.*, 2001). O isopulegol pode ser encontrado na forma de dois isômeros o (-)-isopulegol e (+)-isopulegol. Esse monoterpeno apresenta uma variedade de atividades biológicas já reportadas na literatura: atividade depressora do sistema nervoso central e ansiolítica (Silva *et al.*, 2007), anticonvulsivante (Silva *et al.*, 2009b), antioxidante, gastroprotetora (Silva *et al.*, 2009a), anti-tumoral, antifúngica (Salem *et al.*, 2018), anti-inflamatória (Bounihi *et al.*, 2013) e anti-microbiana (Ebani *et al.*, 2018). Entretanto, não há estudos mostrando a ação do isopulegol sobre canais para cálcio no cardiomiócito e contratilidade cardíaca nem sobre o seu efeito sobre a hipertrofia cardíaca.

Como a literatura relata que o isopulegol tem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, e como os monoterpenos geralmente atuam como antagonistas do cálcio, o presente estudo visou avaliar a ação do isopulegol sobre os canais para cálcio tipo-L e a contratilidade celular assim como investigar o seu efeito sobre a hipertrofia cardíaca patológica. Além disso, como sabemos que existe diferença no efeito desempenhado decorrente da alteração posicional de radicais e da quiralidade, nesse estudo vamos investigar a ação de dois isômeros do isopulegol.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estrutura e função do coração

O coração é o órgão responsável pela função do sistema cardiovascular de distribuir sangue para os tecidos, com o objetivo de fornecer as células os nutrientes essenciais ao metabolismo celular e removendo-lhes os catabólitos. O músculo cardíaco funciona como uma bomba que, durante a sístole, propulsiona o sangue através dos vasos sanguíneos para os pulmões onde serão realizadas as trocas gasosas, e também, impulsiona o sangue para os tecidos do corpo. O coração é constituído por 4 câmaras (2 átrios e 2 ventrículos) (Fig. 1), sendo que os ventrículos assumem a função mecânica principal e os átrios atuam como câmaras de compensação para estabilizar a pressão venosa pulmonar durante variações do retorno venoso e da demanda ventricular. Para exercer essa função, o coração dispõe de vários mecanismos de controle, de natureza mecânica e elétrica para produzir as contrações necessárias para impulsionar o sangue a todos os tecidos do corpo humano (Koeppen, 2011).

O coração direito faz parte da circulação pulmonar enquanto que o coração esquerdo faz parte da circulação sistêmica. A espessura da parede de cada uma das câmaras está diretamente relacionada com a sua função. Os ventrículos, por apresentarem pressões maiores, apresentam uma parede mais espessa que as dos átrios que desenvolvem uma pressão menor. O ventrículo esquerdo apresenta uma parede mais espessa, pois é responsável pela alta pressão da circulação sistêmica, enquanto os átrios apresentam uma parede menos espessa, pois desenvolvem uma pressão menor para impulsionar o sangue para a circulação pulmonar (Fuster *et al.*, 2004).

A contratilidade cardíaca é mantida graças à geração e condução do estímulo elétrico pelo miocárdio sendo regulada pela concentração do cálcio intracelular $[Ca]_i$ e pela sensibilidade dos elementos contráteis ao íon cálcio (Karakı *et al.*, 1997), regulando a força contrátil. O sistema excito-condutor do coração é composto pelo nodo sinoatrial (NSA), pelas vias atriais internodais, pelo nodo atrioventricular (NAV), pelo feixe de His e suas ramificações, e pelo sistema de Purkinje. O NS é responsável por gerar o sinal elétrico enquanto os demais componentes são responsáveis por conduzir os potenciais de ação pelo coração (Katz, 1992; Koeppen, 2011).

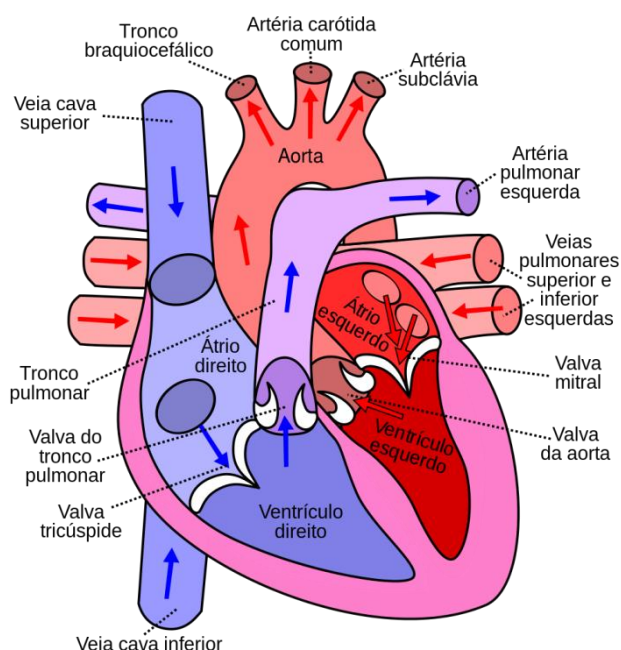


Figura 1 – Estrutura do coração: câmaras cardíacas, veias, artérias e valvas (Hall et al., 2011).

2.2 Contratilidade do músculo cardíaco

As propriedades contráteis do músculo cardíaco se devem a um especializado sistema de membranas e compartimentos intracelulares, organizados de forma a permitir uma comunicação sincronizada entre as partes da célula (Morimoto, 2007). As células musculares apresentam um sistema contrátil organizado, constituído pelo sarcômero, que é a unidade contrátil do miocárdio. O sarcômero é uma estrutura limitada por duas linhas Z, entre as quais existem regiões claras (banda I) e escuras (bandas A). A banda I é formada por filamentos finos de actina que se ligam a linha Z (Stenger *et al.*, 1961; Katz, 1992). A banda A é formada por filamentos finos e grossos de miosina. Na porção lateral da unidade sarcomérica os filamentos grossos e finos estão sobrepostos, e na região central são encontrados somente filamentos grossos, localizada no meio da banda A, chamada de banda H (Fig. 2).

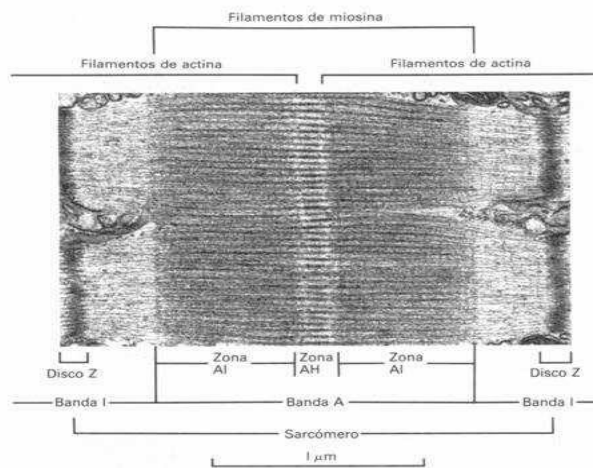


Figura 2 - Micrografia eletrônica, em corte longitudinal, mostrando o sarcômero limitado por duas linhas Z. No centro da banda A encontra-se a linha M (McGavin, 2011).

A miosina e a actina, principais proteínas contráteis presentes no sarcômero, interagem entre si, favorecendo o processo da contração muscular. Os filamentos finos são constituídos de actina, tropomiosina e troponina (C, I e T) (Stenger *et al.*, 1961; Katz, 1992).

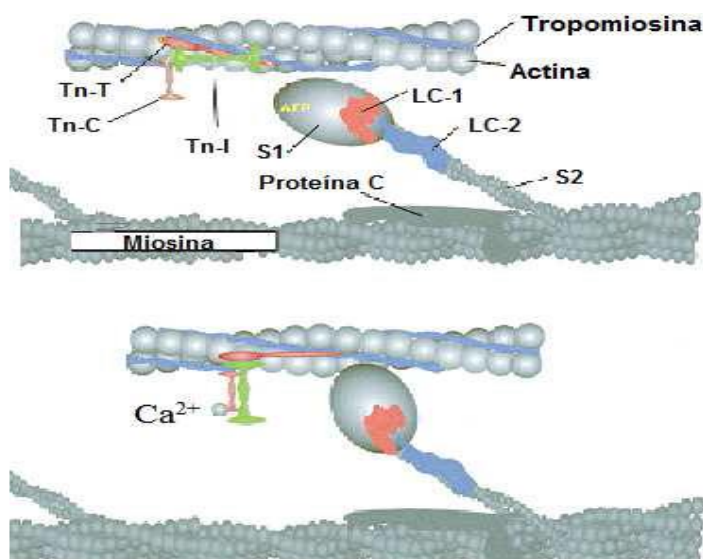


Figura 3 – Estrutura do sarcômero. As proteínas contráteis que estão envolvidas no processo de ativação e regulação da contração estão representadas no painel superior (diástole) e no painel inferior (sístole). Tn, troponina; S1, cabeça globular da miosina; S2, pescoço da miosina; LC1 e LC2, cadeias leves de miosina A haste de miosina contém a proteína C (Piazzesi *et al.*, 1995).

A miosina é uma proteína grande e complexa que apresenta duas partes estruturais, uma cauda e uma cabeça. As caudas se agregam para formar os filamentos grossos e na cabeça encontram-se os sítios de hidrólise do ATP (ATPase) e os sítio de fixação com a actina (Fig. 3). A interação miosina-actina ativa a ATPase que hidrolisa ATP com, consequente, liberação de energia para a contração muscular. As pontes cruzadas e os filamentos finos interagem entre si puxando os filamentos finos em direção ao centro do sarcômero, encurtando o sarcômero, à medida que os discos Z vão se aproximando (Schaub *et al.*, 1998; Morimoto, 2008)

Os filamentos de actina apresentam uma organização complexa com outras proteínas e são sustentados pela estrutura fibrilar da tropomiosina, que tem como função estruturar e bloquear os sítios de interação entre a actina e miosina. As troponinas estão ancoradas a estrutura fibrilar da tropomiosina e exerce funções distintas. A troponina T (TnT) está ancorada à tropomiosina e ligada a ela está a troponina C (TnC) que possui os sítios de ligação para o íon cálcio. A troponina I (TnI), cobre o sítio de interação da actina com a miosina (Schaub *et al.*, 1998).

No estado de repouso, quando a $[Ca]_i$ está baixa ($\sim 10^{-7}$ M) os sítios de ligação da TnC estão livres e a TnI forma um complexo com a actina e TnT. Dessa forma, reduzindo a afinidade da actina pela miosina e mantendo a tropomiosina em uma posição que bloqueia o sítio de ligação da actina para a formação das pontes cruzadas. A contração muscular é iniciada pelo processo de despolarização da célula que resulta em aumento na $[Ca]_i$ ($\sim 10^{-6}$ a 10^{-5} M) e sua ligação com a TnC. Isso irá promover a ligação entre TnI e TnC, que diminui a inibição sobre a actina e leva ao deslocamento da tropomiosina – que, por sua vez, desbloqueia os sítios ativos da actina, garantindo assim a formação das pontes cruzadas, ou seja, a interação entre a actina e miosina (Bers, 2008). O encurtamento do músculo cardíaco durante a contração é dado pelo deslizamento dos filamentos finos sobre os filamentos grossos (Stenger *et al.*, 1961; Katz, 1992).

A actina e miosina são as proteínas que realmente realizam a atividade contrátil do músculo, enquanto a tropomiosina e troponina são consideradas proteínas moduladoras da contração. A célula miocárdica está densamente ocupada por mitocôndrias que são essenciais no suprimento de energia para as células para realizar o bombeamento vigoroso e contínuo de sangue (Bocalini *et al.*, 2012).

2.3 Excitabilidade do miocárdio

O ciclo cardíaco corresponde ao período entre o início de um batimento cardíaco até o início de um novo batimento. Ele pode ser dividido em duas fases: contração ou sístole (quando ocorre a ejeção de sangue para a circulação) e o relaxamento ou diástole (quando o coração se enche de sangue). No átrio direito, próximo a veia cava superior, situa-se o NSA, que no coração normal, é responsável pela gênese da atividade elétrica cardíaca e, por isso é considerado o marcapasso cardíaco (Koeppen, 2011). A atividade marcapasso do coração é gerada por células especializadas, que geram potências de ação de forma cíclica e sem a necessidade de qualquer estímulo extrínseco (Karaki *et al.*, 1997). Os potências de ação, gerados pelas células marcapasso, são conduzidos pelos átrios (direito e esquerdo) através de fibras de condução atrial, desencadeando a sístole atrial. Em seguida, o impulso elétrico segue para o NAV (situado na porção inferior do septo inter-atrial direito), onde se propaga com baixa velocidade de condução, promovendo um retardo na propagação das ondas elétricas para os ventrículos. Em seguida, o estímulo continua através do Feixe de His, que se estende para a musculatura ventricular, dividindo-se em ramo direito e ramo esquerdo. Os ramos vão dar origem as fibras de Purkinje que constituem uma extensa rede de condução intraventricular, responsáveis em despolarizar os ventrículos e iniciar a sístole ventricular (Fig. 4). O Feixe de His e as fibras de Purkinje propagam os potenciais de ação em alta velocidade por toda a extensão dos ventrículos, garantindo assim uma atividade contrátil sincronizada e maior eficiência na sístole ventricular (Katz, 1992).

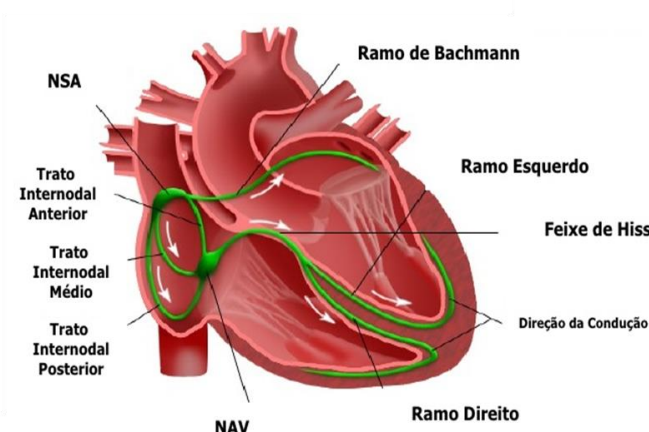


Figura 4 – Sistema de condução elétrica do coração. NSA, nodo sinatrial; NAV, nodo atrioventricular (Costanzo, 2018).

2.4 Potencial de ação cardíaco e canais iônicos

A fisiologia contrátil da célula cardíaca se deve à movimentação de íons através da membrana, que promove mudanças no potencial de repouso da célula cardíaca, gerando os potenciais de ação (PA) desencadeando o processo de contração celular (Hille, 1992). O fluxo de íons cálcio pelos canais iônicos irá ativar estruturas dentro das células para que ocorra a liberação de cálcio dos estoques intracelulares. O cálcio liberado, por sua vez, ativa a maquinaria contrátil da célula resultando na contração muscular. O processo contrátil é finalizado pela recaptação do cálcio por sistemas especializados, encerrando a contração celular (Bers, 2002).

O PA é caracterizado por uma alteração transitória no potencial de repouso chegando a valores positivos e retornando, posteriormente, ao potencial de repouso. Estímulos elétricos, mecânicos e químicos podem alterar o potencial de repouso da célula para um valor crítico, denominado limiar de excitação, deflagrando o PA (Aidley *et al.*, 1996). O PA das células contráteis do coração (átrio e ventrículo), também chamado de potencial de ação completo ou rápido, é dividido em 5 fases (Fig. 5) (Nerbonne *et al.*, 2005)

Fase 4 – Potencial de repouso: grande parte dos canais dependentes de voltagem está fechado e somente contribuem ativamente os canais K_1 (canal de potássio retificador de entrada) que estão com a condutância alta e os canais para potássio sensíveis a ATP.

Fase 0 – Fase de despolarização: ocorre uma rápida despolarização da célula, pela abertura dos canais para sódio operados por voltagem (Nav), resultando em influxo rápido de íons Na^+ para o meio intracelular e no desencadeamento do PA. Nessa fase temos também o início da abertura do componente rápido da corrente transitória de saída de potássio (I_{tof}). Nessa fase, o canal para potássio de retificação de entrada (K_{ir} ou K_1) tem sua condutância diminuída, contribuindo para manter a célula despolarizada.

Fase 1 – Fase de repolarização incompleta: nessa fase ocorre a inativação dos Nav e uma contribuição mais expressiva da I_{tof} . Ainda em decorrência da despolarização ocorrida na fase 0, ocorre o início da ativação (-40 mV) dos canais para cálcio operados por voltagem do tipo-L (Cav-L).

Fase 2 – Fase de platô: nessa fase ocorre a ativação mais expressiva Cav-L iniciada na fase 1. O influxo de cálcio por estes canais é responsável pela ativação da maquinaria

contrátil da célula. Ocorre a inativação da I_{tof} e o canal K_{ir} ainda permanece fechado. Contudo, outros canais de potássio dependentes de voltagem com uma cinética de ativação mais lenta (I_{Ks}) começam a ser ativados.

Fase 3 – Fase de repolarização completa: nessa fase ocorre a inativação $Cav-L$ e aumento da condutância das I_{Ks} . Além disso, os canais K_1 aumentam sua condutância contribuindo ainda mais para o processo de repolarização.

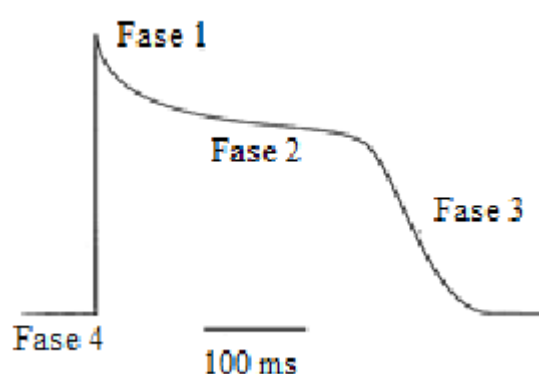


Figura 5 – Potencial de ação cardíaco ventricular mostrando as suas fases (Nerbonne *et al.*, 2005).

2.4.1 Canais para Cálcio

O miocárdio expressa dois tipos de canais para Ca^{+2} denominados canal para Ca^{+2} tipo-L e tipo-T. O canal para Ca^{+2} tipo-L “large conductance” possui alta condutância (25 pS) com abertura do canal com longa duração e ativação em voltagens mais positivas. O canal para Ca^{+2} tipo-T caracteriza-se por possuir uma baixa condutância (8 pS), abertura transitória do canal e ativação em voltagens mais negativas (Nowycky *et al.*, 1985; Bers, 2002).

No miocárdio, a corrente de Ca^{+2} tipo-L ($I_{Ca,L}$) é a de maior magnitude, sendo que a $I_{Ca,T}$ de menor magnitude. A $I_{Ca,L}$ está envolvida em dois importantes eventos que acontecem no coração: 1) na manutenção do platô do PA cardíaco e 2) na liberação de

Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático (RS). Esse Ca^{+2} que é liberado no citosol ativa os miofilamentos (Roden *et al.*, 2002).

O influxo de Ca^{+2} nos cardiomiócitos regula a contração da célula e também participa do processo de regulação da expressão gênica celular (Benitah *et al.*, 2010). Os canais para Ca^{+2} tipo-L são os canais que predominam em pequenos roedores. Existem diversas subunidades que funcionam como regulatórias ou auxiliares nessa família de canais, que são: $\alpha 2\delta$, $\beta 2$ e γ . Há três subfamílias de canais para Ca^{+2} ($\text{Cav}_{\alpha 1}$, $\text{Cav}_{\alpha 2}$ e $\text{Cav}_{\alpha 3}$). Dentro da subfamília $\text{Cav}_{\alpha 1}$, existem 4 tipos de proteínas que podem ser expressas ($\text{Cav}1.1$, $\text{Cav}1.2$, $\text{Cav}1.3$ e $\text{Cav}1.4$). Todos esses canais produzem a $\text{I}_{\text{Ca,L}}$. No cardiomiócito, a principal família que gera a $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ é a que tem o fenótipo correspondente a $\text{Cav}1.2 \alpha 1\text{C}$. As proteínas responsáveis pela expressão da corrente de Ca^{+2} tipo-T são as $\text{Cav}3.1$ e $\text{Cav}3.2$. Na literatura, ainda há divergências em relação a essa subdivisão (Nerbonne *et al.*, 2005).

A maior parte do Ca^{+2} que entra no miócito cardíaco durante a contração, ocorre através da $\text{I}_{\text{Ca,L}}$. A inativação da $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ depende muito do aumento de Ca^{+2} na célula, que pode ocorrer pelo influxo deste e pela sua liberação no citosol através do RS. Como a inativação do canal depende da concentração de Ca^{+2} é provável que com a entrada desse íon haja uma sinalização direta no canal. Essa inativação dependente de Ca^{+2} gera um mecanismo de “feedback” que limita o influxo de Ca^{+2} na célula através da $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ (Maier *et al.*, 2002).

A calmodulina (CaM) é um crítico mensageiro que participa da sinalização de vários eventos que ocorrem na célula. A interação Ca^{+2} -CaM regula proteínas envolvidas no transporte de Ca^{+2} , em canais iônicos, na contração celular, no metabolismo celular, na expressão gênica, na expressão de proteínas quinases e na proliferação celular. A CaM se liga a quatro íons Ca^{+2} , e os domínios de ligação I e II possuem maior afinidade para o Ca^{+2} do que o III e IV. Os sítios de ligação para o Ca^{+2} quando a célula está no repouso, estão desocupados, mas quando a célula contrai os níveis de Ca^{+2} aumentam. Como consequência, a CaM muda o seu estado conformacional, se liga ao Ca^{+2} e se torna ativa para se ligar a proteínas alvo com alta afinidade (Maier *et al.*, 2002).

Em canais para cálcio tipo-L, a CaM atua como mediador da inativação da $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ agindo sobre esses sítios na região carboxi terminal da subunidade $\alpha 1\text{C}$. Quando os canais para cálcio estão abertos o cálcio, que entra e o cálcio que é liberado do RS, se

ligam à CaM que interage com a região IQ do canal, produzindo sua inativação. A CaM dependente de proteína quinase II (CaMKII), também faz parte do processo de regulação da $I_{Ca,L}$ (Maier *et al.*, 2002).

2.5 Acoplamento excitação-contração e relaxamento do músculo cardíaco

O processo de acoplamento excitação-contração (AEC) do coração (Fig. 6) é constituído por um conjunto de mecanismos que são desencadeados pela despolarização da célula, gerada pelo PA, que dispara a maquinaria contrátil e promove a contração. O AEC depende basicamente dos íons cálcio, que tem papel de segundo mensageiro, que em resposta a excitação elétrica ativa o processo contrátil (Bers, 2002; Iribe *et al.*, 2008).

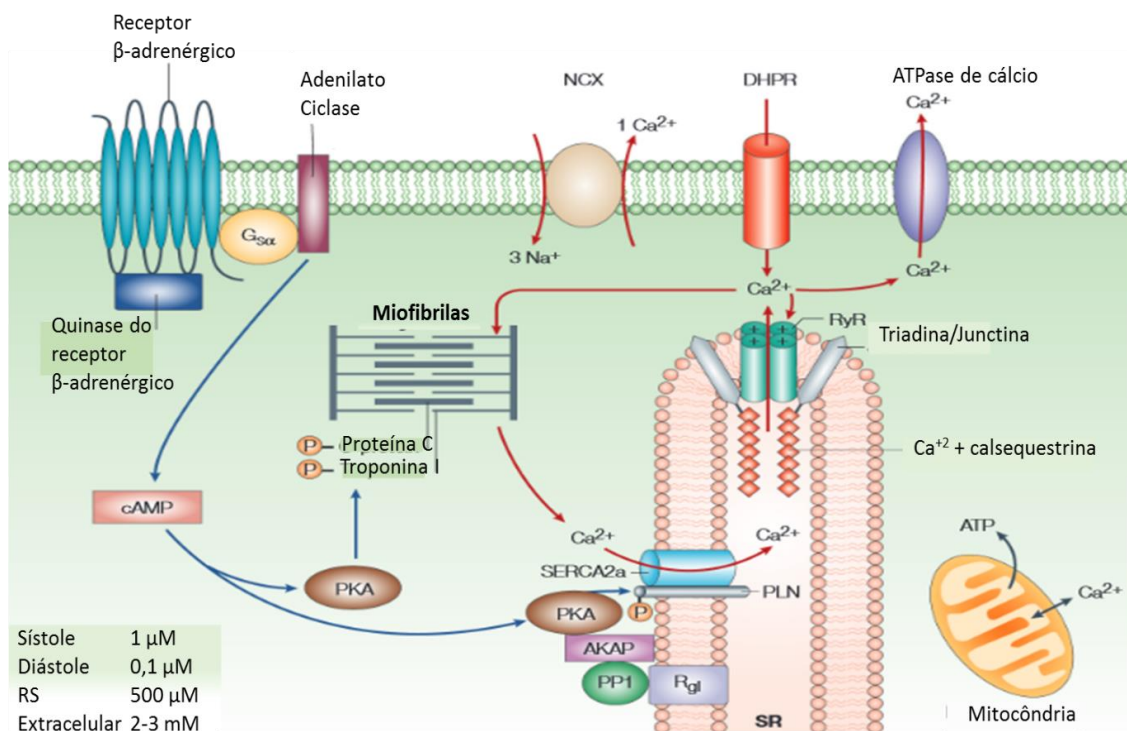


Figura 6 – Mecanismos celulares da contração muscular mostrando que o fenômeno da liberação de Ca^{2+} induzido por Ca^{2+} (CICR) envolve canais de cálcio tipo-L sarcolemais e receptores de rianodina (RyR) da membrana do retículo sarcoplasmático (RS). Na figura inserida, estão curvas relativas ao potencial de ação (PA), à concentração intracelular de cálcio $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e a força de contração muscular; NCX: trocador sódio/cálcio; PLB: fosfolambam (MacLennan *et al.*, 2003; Bers, 2008).

Os túbulos T, também chamados de túbulos transversos, são invaginações irregulares do sarcolema que permitem que o mesmo chegue até o interior da célula

cardíaca. Os túbulos T têm como função aproximar o sarcolema das proteínas contráteis e organelas intracelulares, principalmente o RS. Essas invaginações são importantes devido às grandes dimensões das células cardíacas e necessidade de transmissão rápida do estímulo elétrico por toda extensão celular (de Tombe, 2003).

O PA chega até os túbulos T, ativando os Cav-L, culminando no influxo de cálcio do meio extracelular para o intracelular. O aumento do $[Ca^{+2}]_i$ ativa os canais para cálcio localizados na membrana do RS, chamados de receptores de rianodina (RyR). A abertura dos RyR permite que o cálcio estocado no RS seja liberado no citosol, a favor de seu gradiente eletroquímico, fenômeno conhecido como “liberação de Ca^{+2} induzida por Ca^{+2} ” (CICR) (Bers, 2002; Cens *et al.*, 2006). A entrada de Ca^{+2} e sua subsequente liberação do RS aumentam a $[Ca^{+2}]_i$, ativando os miofilamentos e a maquinaria contrátil (Bers, 2002).

Após o processo de contração, para que ocorra o relaxamento, o Ca^{+2} deve ser recaptado por diferentes proteínas que são responsáveis por diminuir a $[Ca^{+2}]_i$, são elas: a Ca^{+2} ATPase RS (SERCA), o trocador Na^{+}/Ca^{+2} (NCX), o uniporte mitocondrial de Ca^{+2} e a ATPase de cálcio da membrana plasmática (PMCA) (Bers, 2002; Bers, 2008).

A SERCA é uma bomba de cálcio responsável, a depender da espécie, por recapturar cerca de 70 a 90% do Ca^{+2} liberado no processo de contração (Bassani *et al.*, 1994). Ela bombeia o íon Ca^{+2} do citosol para o lúmen do RS, contra o gradiente de concentração e, conseqüentemente, com gasto de ATP. A SERCA é uma proteína com aproximadamente 100 kDa, possui 10 domínios transmembranar e um sítio que é alvo de fosforilação por uma proteína denominada fosfolambam (PLB), que regula sua atividade (Bers, 2002). A PLB é um inibidor endógeno da SERCA e sua fosforilação aumenta a atividade da bomba e a recaptura de Ca^{+2} . O NCX é responsável por 7-20% da retirada de cálcio do citosol e o restante é recapturado pelos transportadores mitocondriais, ou é transportado para fora da célula pela PMCA (Bassani *et al.*, 1994; Bers, 2002; Haghighi *et al.*, 2004).

Cessado o estímulo elétrico, a liberação de Ca^{+2} é cessada, e a $[Ca^{+2}]_i$ retorna para os valores basais, permitindo assim o relaxamento do cardiomiócito (Bers, 2002).

2.6 Estimulação β -adrenérgica

O sistema nervoso autônomo (SNA) é dividido em sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático (SNP) tendo um papel vital na manutenção e modulação de diversos processos fisiológicos. A ativação dos receptores adrenérgicos, pelo SNS, afeta a contratilidade miocárdica e a frequência cardíaca. O principal receptor adrenérgico (RA) expresso no miocárdio é o do tipo β e, possivelmente, a grande maioria dos efeitos descritos para a ativação SNS no coração é decorrente da interação com este receptor, que tem como isoforma mais predominante a β_1 -RA, representando 75-80% dos β -RA no miocárdio, seguida da isoforma β_2 RA (15-18%) e β_3 RA (2-3%) (Lymperopoulos *et al.*, 2013).

Os RA estão acoplados à proteína G (Fig. 7) e possuem 7 domínios transmembranares (Grimm *et al.*, 2010; Santulli *et al.*, 2016). As proteínas G são heterotriméricas e constituídas pelas subunidades α , β e γ . No estado inativo, a subunidade $G\alpha$ está acoplada ao GDP (guanidina difosfato), do lado interno da membrana plasmática. Quando ocorre uma estimulação dos RA pelos agonistas, este receptor sofre mudança conformacional, promovendo uma alteração alostérica também da proteína G. Esta libera o GDP e liga-se ao GTP (guanidina trifosfato), o que faz com que $G\alpha$ se desligue do dímero $\beta\gamma$. A subunidade $G\alpha$ ativa a adenilato ciclase (AC) que passa a sintetizar AMP cíclico (AMPC) a partir de ATP. O AMPC é um segundo mensageiro que ativa a proteína quinase A (PKA), uma quinase tetramérica, que em sua forma inativa é formada por duas subunidades reguladoras (R) e duas catalíticas (C). Ela é ativada quando duas moléculas de AMPC se ligam a cada uma das subunidades R, causando um decréscimo de afinidade entre as porções catalíticas e reguladoras da quinase. Esta diminuição de afinidade leva a dissociação das partes, com a formação de um dímero da subunidade R, e dois monômeros das subunidades C (Grimm *et al.*, 2010; Santulli *et al.*, 2016).

Os agonistas dos RA são capazes de promover efeito inotrópico, cronotrópico e lusitrópico positivo no coração. O efeito inotrópico positivo (aumento da força de contração) acontece por meio do aumento do influxo de cálcio no citosol que acontece devido à fosforilação, mediada pela PKA, dos Cav-L e RyR. Além disso, também ocorre efeito cronotrópico positivo (aumento da frequência cardíaca). Isso resultará em um maior influxo de cálcio na célula durante o processo de AEC, porém mais cálcio terá

que ser recaptado em um período de tempo mais curto, pois quando há aumento de frequência cardíaca, o tempo total de contração e relaxamento diminui (efeito lusitrópico positivo). A diminuição de cálcio do citosol ocorre pelo aumento da receptação de cálcio pelo SERCA, induzido pela fosforilação do fosfolamban pela PKA. A PKA irá fosforilar também a TnI, reduzindo a afinidade da TnC pelo cálcio. Este mecanismo auxilia as bombas de cálcio, ajudando no processo de relaxamento do músculo cardíaco (Bers, 2002; Grimm *et al.*, 2010; Bernstein *et al.*, 2011; Santulli *et al.*, 2016).

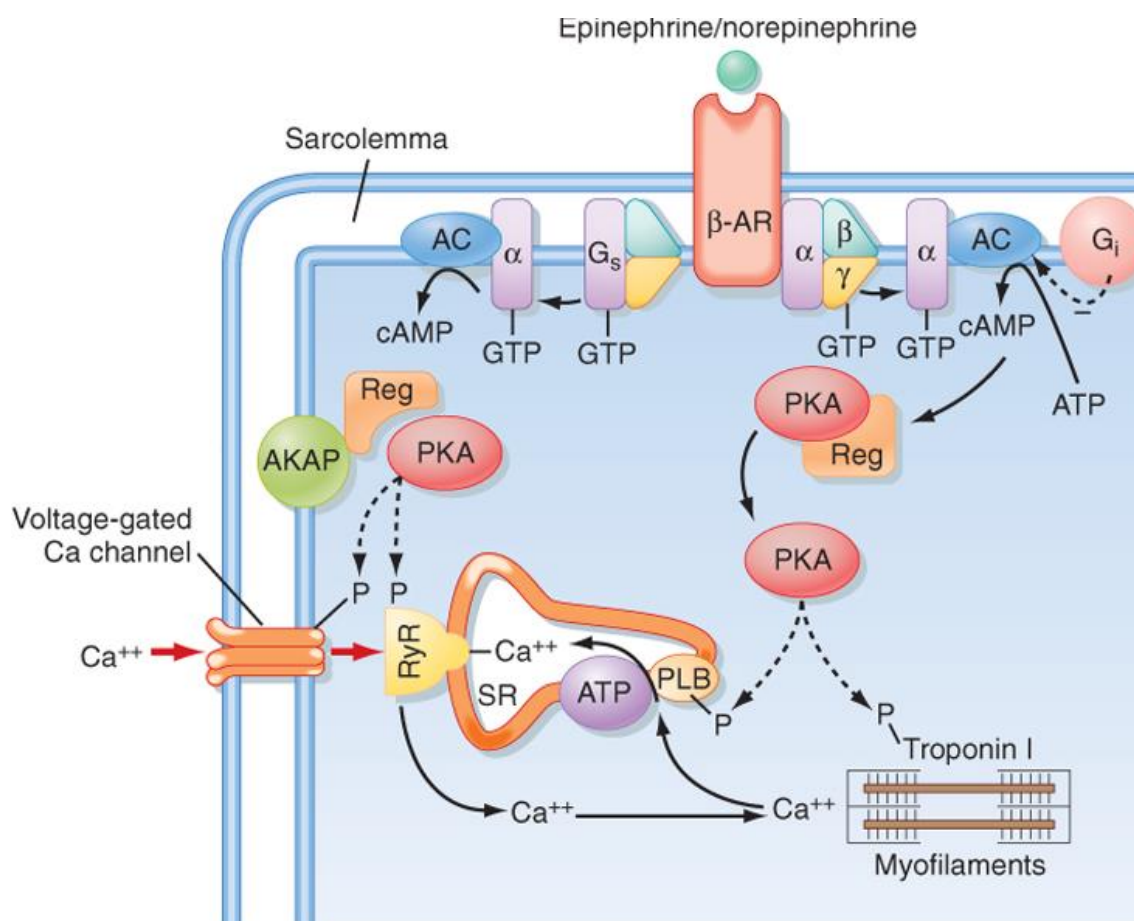


Figura 7 – Ação dos agonistas de receptores β-adrenérgicos no transporte de cálcio e na maquinaria contrátil do músculo cardíaco. A via β-adrenérgica é constituída por receptores β-adrenérgicos (β-AR), proteína G (Gs), adenilil ciclase (AC), Monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), (SR) Retículo Sarcoplasmático, (PLB) Fosfolamban, guanosina difosfato (GDP) e guanosina trifosfato (GTP) (Bers, 2002).

2.7 Hipertrofia cardíaca

As doenças cardiovasculares (DCV) são consideradas a principal causa de morte em países ricos e emergentes (Mendis *et al.*, 2015). Em 2015, aproximadamente 17 milhões de pessoas morreram de DCV representando 31% de todas as mortes no mundo (Writing Group *et al.*, 2016). Segundo a Organização mundial de Saúde, em 2030, o número de DCV deve aumentar para 26,3 milhões (Mendis *et al.*, 2015). A ‘American Heart Association’ estima que em 2030 o custo global com as DCV será de aproximadamente 1,4 bilhões de dólares, sendo considerado um custo muito elevado para os sistemas públicos de saúde. No Brasil, essa estimativa foi similar, uma vez que em 2013, 29,8% dos óbitos foram decorrentes de DCV (Indio do Brasil *et al.*, 2013)

Um estilo de vida sedentário é considerado um importante fator de risco cardiovascular, por isso, atualmente, a importância da prática regular de exercício físico alcançou ampla aceitação pela população e pela comunidade médica. Cada vez mais pessoas ao redor do mundo incluem em seu dia-a-dia a prática regular de exercícios físicos (Lucini *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2015; Eijsvogels *et al.*, 2016).

Dentre as DCV, podemos destacar a hipertrofia cardíaca (HC) que constitui um importante fator de risco cardiovascular. A HC é caracterizada por um processo adaptativo do miocárdio, em resposta ao aumento de sua atividade ou de sobrecarga funcional. Esta adaptação do coração pode ocorrer em resposta a uma maior necessidade metabólica que impõe o aumento do débito cardíaco (indução hormonal, ex.: resposta ao isoproterenol) ou da carga pressórica ou de volume em resposta adaptativa a condições patológicas (como na hipertensão arterial). O resultado desse incremento do trabalho do coração traduz-se em elevação da massa cardíaca devido ao aumento no tamanho dos miócitos e/ou do estroma conjuntivo (Machida *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 2000; Agrawal *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015; Lazzeroni *et al.*, 2016; Samak *et al.*, 2016).

As HC decorrentes de sobrecargas de pressão, de volume ou devido ao treinamento físico, apresentam características fenotípicas e funcionais distintas, mas tem como fator patogênico comum o aumento da carga hemodinâmica imposta ao coração.

Quando associada a condições fisiopatológicas, a HC assume importância pois aumenta o risco de morbidade e mortalidade do paciente, tendo como consequência o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, arritmias e morte súbita (Mudd *et al.*, 2008; Agrawal *et al.*, 2010; Balakumar *et al.*, 2010; Samak *et al.*, 2016).

O crescimento patológico do coração ocorre em resposta a um aumento no stress biomecânico induzido tanto por fatores extrínsecos (aumento de pressão e/ou volume em doenças como hipertensão e/ou disfunção nas válvulas cardíacas) ou em resposta a fatores intrínsecos (como o remodelamento cardíaco induzido por isquemia ou cardiomiopatias hipertróficas) e está associado com a perda de miócitos, substituição fibrótica, disfunção contrátil e aumento do risco de insuficiência cardíaca e morte súbita. Por outro lado, o crescimento fisiológico do coração inclui o crescimento pós-natal normal, crescimento induzido pela gravidez e a hipertrofia induzida pelo exercício (Bernardo *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015; Koeck *et al.*, 2016; Lazzeroni *et al.*, 2016; Samak *et al.*, 2016; Shimizu *et al.*, 2016).

A HC pode ser classificada em dois tipos, a HC fisiológica e a patológica (Heineke *et al.*, 2006). No desenvolvimento da HC patológica, os cardiomiócitos aumentam de tamanho devido ao aumento da síntese e incorporação de elementos contráteis, que está associado com um remodelamento que inclui também mudanças na rede de colágeno e na angiogênese. O crescimento do cardiomiócito excede a capacidade dos capilares em fornecer nutrientes e oxigênio, levando a hipóxia cardíaca e, consequentemente, perda de cardiomiócitos e substituição fibrótica. O aumento na deposição de colágeno no miocárdio promove um aumento na rigidez dos ventrículos, dificultando o enchimento diastólico e podendo desencadear a insuficiência cardíaca. O sistema renina-angiotensina-aldosterona tem sido considerado um forte estimulante da formação da matriz cardíaca, uma vez que a angiotensina II e a aldosterona estimulam a síntese de colágeno no miocárdio. Já no desenvolvimento da HC fisiológica, induzida pelo exercício físico, as características do estroma conjuntivo não se alteram e, consequentemente, não ocorre prejuízo funcional do músculo cardíaco (Machida *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 2000; Bernardo *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2015; Koeck *et al.*, 2016; Piek *et al.*, 2016; Shimizu *et al.*, 2016).

Durante a HC patológica, o coração passa por duas fases distintas, sendo a primeira chamada de compensatória e a segunda, descompensada. Na fase

compensatória, o coração responde ao estímulo hipertrófico com aumento de trabalho não trazendo impactos negativos à sua morfologia e a sua função contrátil. Por outro lado, a fase descompensada inicia-se logo após a fase compensada e é caracterizada pelo início dos processos de disfunção cardíaca e falência do órgão (Luethy *et al.*, 1964; Shimizu *et al.*, 2016).

Além das alterações na expressão de proteínas contráteis, estruturais e relacionadas às vias metabólicas, o crescimento patológico do miocárdio apresenta também uma modificação no padrão de expressão de proteínas do programa fetal. As alterações moleculares observadas durante o desenvolvimento desse processo hipertrófico são similares àqueles observados durante o desenvolvimento fetal do coração. A reativação deste programa gênico fetal é uma resposta adaptativa ao estresse, ocasionando a mudanças mal-adaptativas da função cardíaca (Molkentin, 2004; Barry *et al.*, 2008; Haberland *et al.*, 2009; Moc *et al.*, 2015; Samak *et al.*, 2016).

Nessa reativação fetal estão incluídos os genes que modificam a estrutura dos sarcômeros, como o aumento da proporção da isoforma V₃ da miosina em relação à isoforma V₁. Também estão incluídos os genes que modificam o metabolismo energético, e os que aumentam a expressão dos componentes do sistema renina-angiotensina próprio do coração. Essa reprogramação gênica tem como objetivo poupar substratos de alta energia e melhorar o desempenho contrátil do músculo ventricular frente à maior demanda de trabalho (Molkentin, 2004; Koeck *et al.*, 2016).

Esta ativação gênica ocorre numa fase mais precoce da hipertrofia. Quando o coração hipertrófico começa a apresentar perda de função contrátil, iniciando o processo de insuficiência cardíaca, começam a ocorrer alterações da expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas na homeostase iônica dos miócitos. Nessa fase, evidencia-se um aumento na expressão genes codificadores do peptídeo natriurético atrial (ANP) e do NCX e uma diminuição da expressão dos genes codificadores da SERCA (Molkentin, 2004).

O estímulo que dispara o processo de reativação gênica pode ser químico ou mecânico. Muitos estímulos químicos, como os agonistas β -adrenérgicos (ex. isoproterenol), a angiotensina II e a endotelina-1 estimulam a síntese proteica no coração induzindo o desenvolvimento de hipertrofia patológica (Olesen *et al.*, 1988; Pohl *et al.*, 1991).

Podemos classificar as hipertrofias patológicas ou fisiológicas em concêntrica ou excêntrica, baseadas na alteração na forma do coração e no estímulo iniciador (Fig. 8). Na hipertrofia concêntrica, ocorre um aumento da massa ventricular decorrente de um aumento da espessura da parede e redução dos diâmetros cavitários. Com relação ao crescimento dos miócitos, ocorre à adição de sarcômeros em paralelo, o que aumenta a secção transversa das células. Já na hipertrofia excêntrica, ocorre um aumento da massa ventricular e da espessura da parede ventricular, mas com aumento dos diâmetros cavitários. A adição de sarcômeros em série, permite que a célula aumente de comprimento (Barry *et al.*, 2008; Bernardo *et al.*, 2010; Maillet *et al.*, 2013; Koeck *et al.*, 2016).

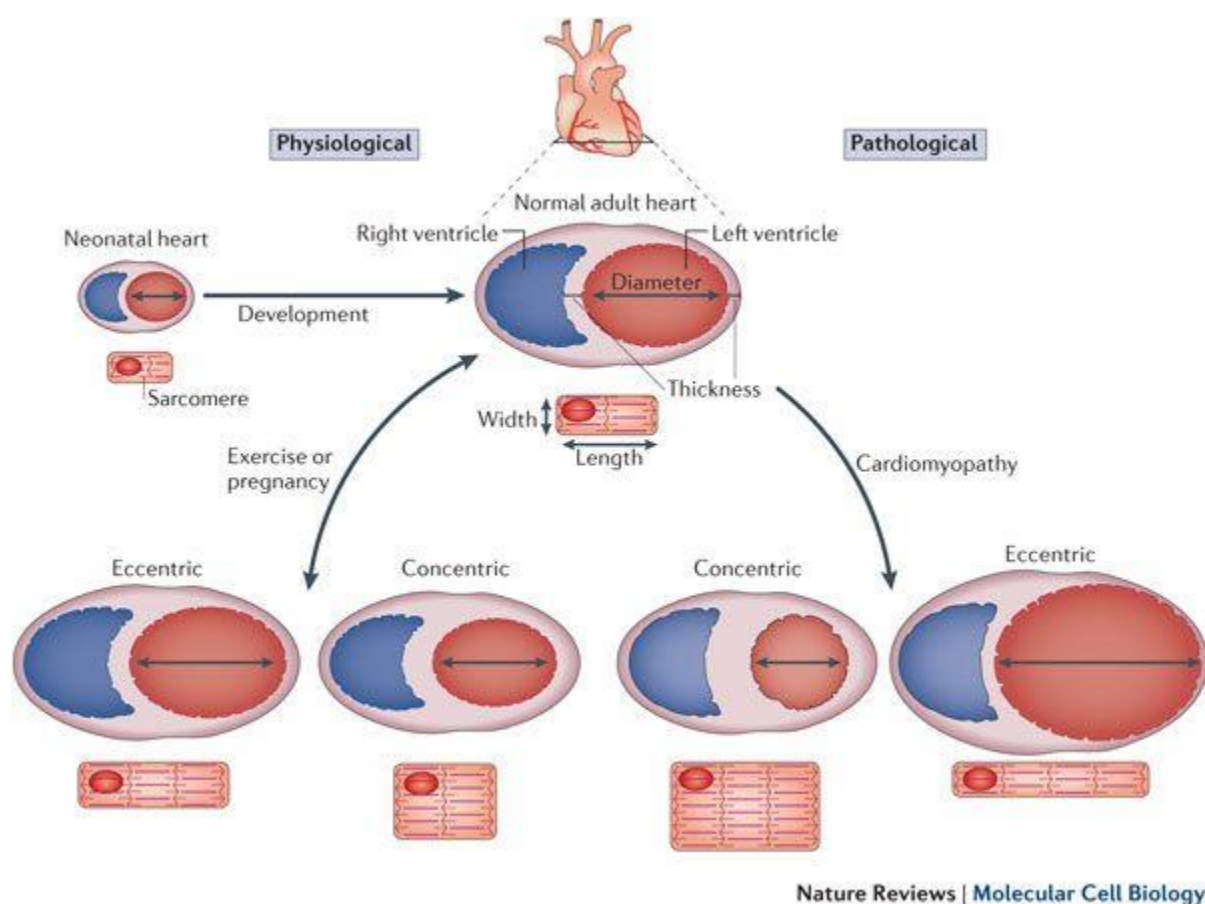


Figura 8. Representação das diferenças entre hipertrofia cardíaca concêntrica e excêntrica (Maillet *et al.*, 2013).

Um estímulo patológico causado por uma sobrecarga de pressão, como observado na hipertensão arterial, ou em decorrência de um aumento de resistência à ejeção, resulta em uma hipertrofia concêntrica. Em contraste, um estímulo patológico causado por sobrecarga de volume, resulta em uma hipertrofia excêntrica (Bernardo *et al.*, 2010; Koeck *et al.*, 2016; Lazzeroni *et al.*, 2016).

O coração pode utilizar diferentes substratos de energia, dependendo de sua carga de trabalho e das concentrações destes substratos na corrente sanguínea. Este é considerado um mecanismo adaptativo que permite que o miocárdio produza, de forma contínua, ATP a partir de diversas condições fisiológicas (van der Vusse *et al.*, 1992). No coração saudável, a oxidação de ácidos graxos é considerada via metabólica responsável pela geração de energia, sendo 60-70% da produção de ATP, e a glicose e o lactato são responsáveis por 30% desta produção. Na hipertrofia patológica observa-se uma diminuição da oxidação de ácidos graxos e aumento do metabolismo de glicose, como um mecanismo de proteção do coração. O mesmo ocorre durante o desenvolvimento cardíaco fetal, quando a oferta de oxigênio é limitada prejudicando o transporte e metabolismo de ácidos graxos, assim a glicose é o substrato principal utilizado pelo coração. Por outro lado, na hipertrofia fisiológica induzida pelo exercício físico, ocorre um aumento da oxidação de ácidos graxos e da glicose (Ostadal *et al.*, 1999; Davila-Roman *et al.*, 2002; van Bilsen *et al.*, 2009; Bernardo *et al.*, 2010; Samak *et al.*, 2016; Shimizu *et al.*, 2016).

Várias vias de sinalização celular estão envolvidas na indução da resposta hipertrófica do miocárdio à sobrecarga hemodinâmica. Os mecanismos de membrana, ativados por estímulos de natureza mecânica, hormonal ou parácrina/autócrina, estimulam vias de crescimento celular envolvendo uma ou mais enzimas com características de GTPases e/ou quinases, que ativam fatores de transcrição responsáveis pela regulação da expressão gênica (Barry *et al.*, 2008; Balakumar *et al.*, 2010; Bernardo *et al.*, 2010; Maillet *et al.*, 2013; Koeck *et al.*, 2016; Samak *et al.*, 2016; Shimizu *et al.*, 2016).

A HC induzida pela norepinefrina ou isoproterenol (ISO) está associada com aumento dos níveis de AMPc intracelular e super ativação da proteína quinase A (PKA) (Fu *et al.*, 2014). O ISO ativa os receptores β -adrenérgicos, uma subclasse de receptor acoplado a proteína G (GCPR) na membrana do cardiomiócito (Chien *et al.*, 1997). Ambos adrenoceptores $\alpha 1$ e $\beta 1$ contribuem para a indução de mecanismos intracelulares

que levam ao aumento do peso do ventrículo esquerdo (Zierhut *et al.*, 1989). Ativação desses receptores promovem à ativação da adenilil ciclase, aumentando os níveis de AMPc e estimulação da PKA. A PKA é capaz de disparar o remodelamento cardíaco, que é caracterizado por mudanças na estrutura celular, tamanho e forma do coração (Rababa'h *et al.*, 2014). A PKA possui uma série de alvos que aumentam a sinalização do Ca^{+2} intracelular. A PKA pode fosforilar canais para cálcio dependentes de voltagem, levando a um aumento no tempo de abertura do canal ou aumento na probabilidade de abertura do canal, aumentando assim o influxo Ca^{+2} . A PKA também fosforila a o PLB e a sarcolipina, proteínas expressas no retículo sarcoplasmático que interagem fisicamente entre si e inibem o transporte de Ca^{+2} via SERCA. Na HC ocorre diminuição na expressão de sarcolipina (modulador da SERCA semelhante ao PLB) e da SERCA, isto leva ao aumento no bombeamento de Ca^{+2} que predispõe os miócitos atriais a eventos pró-arrítmicos (Bhupathy *et al.*, 2007).

As alterações no funcionamento dos canais iônicos do sarcolema levam a variações da concentração iônica intracelular, o que pode representar estímulo inicial para ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (Heineke *et al.*, 2006). Dentre a superfamília das MAPK, a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), a quinase c-jun NH_2 -terminal (JUNK) e a quinase p38 são mediadores da sinalização hipertrófica das células miocárdicas, pois induzem a transcrição de genes associados à hipertrofia (Bueno *et al.*, 2000)

Na HC tem-se ativação de genes como o peptídeo natriurético atrial (ANP) e peptídeo natriurético cerebral (BNP) (Miteva *et al.*, 2016). A ativação da quinase p70^{S6} (proteína ribossomal S6 quinase) e JNK2 também está implicada no desenvolvimento de HC induzida por catecolaminas *in vivo* (Leicht *et al.*, 2002). A EPAC1 e EPAC2 (Proteína ativada diretamente pelo AMPc) também são ativados diretamente pelo AMPc, com diferentes localizações subcelulares e funções. A EPAC1 é predominantemente expressa no coração, localizada principalmente no envelope nuclear, e é regulada em resposta à sobrecarga de pressão e na insuficiência cardíaca através de um aumento nos níveis de AMPc que ocorre por estimulação do receptor β -adrenérgico. A superexpressão da EPAC1 induz HC por ativação da calcineurina-NFAT (fator nuclear ativado por células T) e as vias CaMKII-MEF2A (fator 2 A intensificador específico miócito), independentemente de PKA (Morel *et al.*, 2005; Metrich *et al.*, 2008). A calcineurina é uma proteína fosfatase serina/treonina ativada por Ca^{+2} que

desfosforila o NFAT e promove sua migração para o núcleo. No núcleo, o NFAT interage com cofatores de transcrição como o GATA4 ou MEF2A (Molkentin *et al.*, 1998). Em contraste, a EPAC2 está localizada nos túbulos transversais e está envolvida com as arritmias induzidas por receptores β -adrenérgicos (Pereira *et al.*, 2015).

2.8 Indução da hipertrofia cardíaca por agonistas dos receptores β -adrenérgicos

A estimulação dos receptores β -adrenérgicos é responsável por modular a força de contração e a frequência cardíaca (Kadambi *et al.*, 1996; Grimm *et al.*, 2010). O SNA libera altas concentrações de catecolaminas na circulação resultando na estimulação crônica dos receptores β -adrenérgicos. É possível que este seja um mecanismo compensatório para aumentar a contratilidade do órgão (Ni *et al.*, 2011). Entretanto, a ativação sustentada destes receptores é prejudicial ao coração, pois, induz o crescimento patológico do órgão, disfunção ventricular, apoptose e insuficiência cardíaca (Kaye *et al.*, 1995; Port *et al.*, 2001; Brum *et al.*, 2002; Bristow, 2003; Grimm *et al.*, 2010). Desta forma, a estimulação crônica dos receptores β -adrenérgicos contribui para a progressão de patologias cardíacas e aumento da mortalidade tanto em modelo animal quanto em humanos.

A estimulação β -adrenérgica envolve também a ativação da PKA e consequente fosforilação das proteínas SERCA, PLB, RyR2 e canais para cálcio do tipo L presentes no sarcolema. A hiperatividade dos RyR2, induzida pela fosforilação da PKA, provoca o vazamento de cálcio do RS, durante a diástole, causando depleção dos estoques de cálcio, promovendo redução da contratilidade celular. Este processo contribui para o ‘estresse’ do RS - um conhecido mecanismo indutor da insuficiência cardíaca, isquemia e cardiomiopatia dilatada (Marx *et al.*, 2000; Bers, 2002; Orrenius *et al.*, 2003; Okada *et al.*, 2004; Maier *et al.*, 2007a).

Modelos animais de cardiomiopatias são fundamentais para o estudo dos processos bioquímicos, biofísicos e cascatas celulares envolvidas no desenvolvimento de patologias cardíacas. O entendimento destas vias fornece os substratos necessários à manipulação do sistema e elaboração de estratégias terapêuticas visando à reversão do quadro patológico ou a melhora na qualidade de vida dos pacientes. O modelo de HC

induzida por ISO (agonista β -adrenérgico), utilizada no presente estudo, é utilizado por diversos grupos de pesquisa no mundo (Mesquita *et al.*, 2017).

Modificações na geometria, composição do tecido cardíaco e expressão gênica caracterizam o que denominamos remodelação miocárdica. A remodelação miocárdica é a resposta adaptativa a diversos estímulos como a sobrecarga de pressão e volume, ativação neuro-humoral, inflamação e outros agentes físicos e biológicos (Anversa *et al.*, 1975).

O processo inflamatório é uma resposta primária do organismo a uma lesão atuando na remoção do agente prejudicial além de promover a restauração da estrutura do tecido e a função fisiológica (Ashley *et al.*, 2012). A resposta inflamatória é composta por quatro componentes: indutores inflamatórios, receptores que detectam os indutores, mediadores inflamatórios que são liberados a partir da ativação dos receptores e tecidos alvos afetados pelos mediadores inflamatórios (Medzhitov, 2008). Na HC, já se sabe que o tratamento diário com ISO aumenta a expressão de citocinas inflamatórias local como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) (Murray *et al.*, 2000).

Embora exista atualmente uma ampla gama de agentes farmacológicos disponíveis no mercado para o tratamento das DCV, ainda continua sendo um desafio para a medicina o controle e a prevenção dessas doenças. Diante desse contexto, se faz necessário a busca por novas ferramentas para o tratamento de DCV por um custo relativamente baixo para os sistemas de saúde e para a população. Dentre os fortes e promissores candidatos a fármacos para o tratamento de DCV, estão relatados os produtos naturais que vem demonstrando, nos últimos anos, um papel potencial nos efeitos terapêuticos dessas doenças (Rabito *et al.*, 2013; de Andrade *et al.*, 2017). O nosso grupo de pesquisa mostrou que o extrato obtido do *Ginkgo biloba* apresentou atividade cardioprotetora em modelo experimental de HC induzida pelo ISO (Mesquita *et al.*, 2017). Além disso, a descrição dos constituintes químicos das plantas e óleos essenciais enriqueceu bastante o arsenal farmacológico utilizado no tratamento de DCV, como a HC, auxiliando também no entendimento dos seus mecanismos fisiopatológicos (Newman *et al.*, 2016). Os óleos essenciais e seus constituintes isolados, obtidos a partir de plantas aromáticas, são uma nova opção de substâncias biologicamente ativas, que estão sendo utilizados no estudo pré-clínico de novos candidatos a drogas úteis no tratamento de DCV (Silva *et al.*, 2019).

2.9 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos orgânicos de natureza volátil, produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, os quais são constituídos por hidrocarbonetos (terpenos e sesquiterpenos) e compostos oxigenados (alcoóis, ésters, aldeídos, cetonas, lactonas e derivados fenólicos) (Edris, 2007)

Os constituintes predominantes nestas misturas são os terpenos ou fenilpropanoides. Efeitos biológicos decorrentes da ação de óleos essenciais representam fatores pelos quais diversas plantas possuem potencial terapêutico, onde estes óleos estão presentes em diversos órgãos da planta, tais como raízes, caules, folhas, flores e sementes, bem como na casca e entrecasca de caules (Preedy, 2016).

Os óleos essenciais são constituídos de cerca de 90% de monoterpenos, os quais são moléculas relativamente pequenas que apresentam em sua constituição duas unidades isoprênicas, com geralmente dez átomos de carbono ligados entre si (Preedy, 2016). Os monoterpenos podem apresentar isomeria configuracional, onde são observadas alterações em átomos ou radicais ligados a carbonos assimétricos. Podemos citar os óleos essenciais de *Mentha spicata* que apresentam em sua composição os enantiômeros (S)-(-)-limoneno e (S)-(-)-carvona e de *Anethum sowa*, que possuem os enantiômeros (R)-(+)-limoneno e (R)-(+)-carvona (Aggarwal *et al.*, 2002). De fato, estes enantiômeros são classificados como estereoisômeros (isômeros com configuração estereoquímica diferenciada) e estes, por sua vez, podem ser classificados em enantiômeros, cujas imagens especulares não são sobreponíveis e diastereoisômeros, os quais não possuem imagem especular (Solomons *et al.*, 2014).

De fato, diferenças na estereoquímicas das moléculas podem resultar em alterações nas propriedades biológicas, a exemplo do (+)-linalol apresentou um efeito estimulante do SNC enquanto o (-)-linalol apresentou um efeito depressor (Hoferl *et al.*, 2006). Além disso, a atividade anticonvulsivante e ansiolítica apresentada pela forma racêmica do linalol tem sido atribuída, principalmente, ao seu enantiômero (-)-linalol (Santos *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2017). Já R-(+)-limoneno, demonstrou uma maior atividade biológica frente a microorganismos quando comparado ao seu isômero (S)-(-)-limoneno (Lis-Balchin *et al.*, 1997). De fato, alguns dos processos de ação de drogas envolvem interação também com biomoléculas, onde enzimas e receptores demonstram

melhor interação em um dos pares de isômeros configuracionais (Aggarwal *et al.*, 2002).

Os enantiômeros podem apresentar diferenças nas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas, e em algumas situações, a presença de um dos pares pode atuar inibindo a metabolização do outro par (Hubbard *et al.*, 1986). Ao longo dos anos, o desenvolvimento de substâncias estereoquimicamente puras tornou-se um dos grandes alvos de investigação sobre as possíveis identificações de diferenças em atividade biológica (Nation, 1994).

Os enantiômeros apresentam diferença de afinidade em suas ligações com o receptor, o que pode levar a atividades biológicas divergentes. Nesse contexto, estudos têm sido desenvolvidos para determinar os efeitos farmacológicos de enantiômeros isolados de drogas quirais procurando ponderar sua maior eficácia e segurança diante o composto racêmico (Caldwell, 1995). O conhecimento sobre a atividade de enantiômeros isolados passou a ter importância na década de 60, quando mulheres grávidas fizeram uso da talidomida na forma racêmica e muitos recém-nascidos apresentaram graves deficiências. Posteriormente, descobriu-se que apenas o isômero (+) possui efeito analgésico e sedativo, enquanto o outro, (-), apresenta teratogenicidade (Knoche *et al.*, 1994).

De fato, vários fármacos enantioméricos possuem diferenças consideráveis nas atividades biológicas desempenhadas por cada um dos enantiômeros isoladamente, tais como: verapamil® (enantiômero (+) desempenha ação antitumoral, enantiômero (-) desempenha ação antiarrítmica), propranolol® (enantiômero (+) desempenha ação contraceptiva, enantiômero (-) desempenha ações anti-hipertensiva e antiarrítmica) e talidomida® (enantiômero (+) desempenha ações sedativa e hipnótica, enantiômero (-) apresenta alto potencial para induzir a formação de teratomas) (Bermudez *et al.*, 1996).

Os óleos essenciais de uma grande variedade de plantas aromáticas, tais como *Corymbia citriodora* Hook (A. Vernin *et al.*, 2004), *Eucalyptus citriodora* Hook (Rao *et al.*, 2003) e *Zanthoxylum schinifolium* (Paik *et al.*, 2005) apresentam em sua constituição o monoterpene isopulegol que pode ser encontrado em duas formas enantioméricas: (+)-isopulegol e (-)-isopulegol.

2.9.1 Isopulegol

O isopulegol (p-ment-8-en-3-ol) de fórmula química $C_{10}H_{18}O$ (Fig. 9) é um monoterpene alcoólico, 3-oxigenado, da família do p-mentano (Bhatia *et al.*, 2008). O isopulegol tem sido utilizado, até então, na fabricação de perfumes com composição floral, porém, a sua principal utilidade vem sendo como intermediário sintético na preparação do mentol (Chuah *et al.*, 2001).

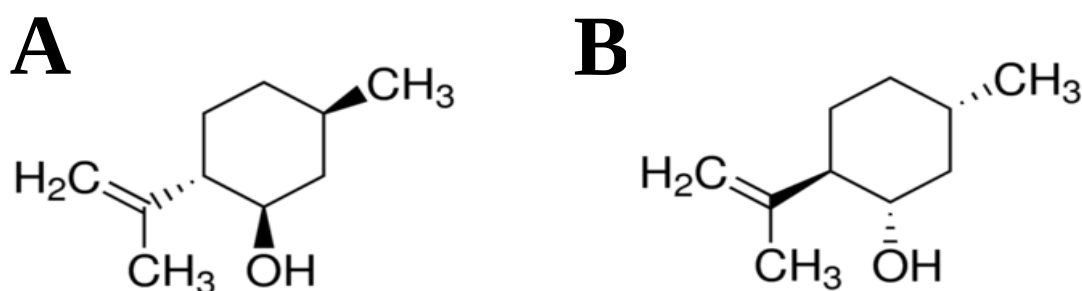


Figura 9. Estrutura química dos isômeros do isopulegol. (A) (-)-isopulegol e (B) (+)-isopulegol

Na medicina popular o chá do eucalipto, possui em seu óleo essencial o isopulegol, que é usado no tratamento de dores e infecções (Silva *et al.*, 2003). Além disso, foi demonstrado que o eucalipto possui propriedades antimicrobiana, antituberculose e antioxidante (Alvarenga *et al.*, 2014; Ebani *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018; Miguel *et al.*, 2018) e outras espécies de plantas contendo isopulegol apresentaram atividades antifúngica (Salem *et al.*, 2018), antiinflamatória (Bounihi *et al.*, 2013), anticâncer (Salem *et al.*, 2018), gastroprotetora (Silva *et al.*, 2009a) e preservação hepato-renal promovida pelo consumo de etanol (Mohamed *et al.*, 2016) em modelos animais.

Usualmente, o isopulegol também pode ser extraído a partir do óleo essencial da citronela, sendo o composto majoritário o (+)-citronelal (monoterpene aldeído acíclico). A partir da ciclização do (+)-citronelal, em meio ácido, pode ser obtido a mistura de isopulegol. Como o (+)-citronelal possui dois carbonos quirais ou assimétricos, na ciclização são formados quatro diferentes estereoisômeros do isopulegol: (-)-isopulegol, (+)-isopulegol, (+)-neo-isopulegol e (+)-neoiso-isopulegol (Chuah *et al.*, 2001).

Um crescente número de trabalhos tem demonstrado que o isopulegol apresenta uma variedade de atividades biológicas. O isopulegol administrado em ratos, por via intraperitoneal, nas doses de 25 e 50 mg/kg, induziu efeitos depressor do SNC e ansiolítico nos animais, sem afetar a coordenação motora dos mesmos (Silva *et al.*, 2007). Foi demonstrado ainda que o isopulegol apresentou atividade anticonvulsivante por induzir modulação positiva dos receptores GABA(A) sensíveis a benzodiazapínicos.

Além disso, estudos evidenciaram que o isopulegol apresentou potente atividade antioxidante, uma vez que o mesmo foi capaz de aumentar a atividade da catalase e aumentar os níveis de glutatona no hipocampo dos camundongos (Silva *et al.*, 2009b). Vários estudos têm mostrado que uma dieta rica em substâncias antioxidantes (ácido gálico, vitamina C e D, coenzima Q10) pode prevenir o aparecimento de DCV (Vinson *et al.*, 1995; de Andrade *et al.*, 2017), tais como a hipertrofia cardíaca.

Os óleos essenciais além de apresentarem propriedade antioxidante possuem também outras ações farmacológicas, tais como ação bloqueadora de canal para cálcio sarcolemal. Como a literatura relata o efeito bioprotetor do isopulegol sobre o sistema nervoso central e suas propriedades antioxidantes e como não há estudos mostrando os possíveis efeitos cardioprotetores do (+) e (-)-isopulegol, objetivamos com o presente projeto estudar as propriedades farmacológicas e terapêuticas deste monoterpeno em modelo experimental de HC induzida por ISO. Além disso, como o isopulegol apresenta um centro quiral podendo ser biossintetizado por alguns vegetais na forma dos enantiômeros (-)-isopulegol e (+)-isopulegol, resolvemos também avaliar os efeitos dos dois monoterpenos no coração.

3. HIPÓTESE

Os isômeros do isopulegol bloqueiam canais para cálcio tipo-L e atenuam os efeitos hipertróficos induzidos pela estimulação crônica dos receptores β -adrenérgicos no coração de rato.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

- Avaliar o efeito dos isômeros do isopulegol sobre a sinalização do cálcio intracelular, assim como sobre a hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol.

4.2. Objetivos específicos

Caracterizar os efeitos dos isômeros do isopulegol sobre a:

- Contratilidade em átrio esquerdo e em cardiomiócito ventricular;
- Corrente de cálcio tipo-L em cardiomiócito isolado;
- Transiente intracelular de cálcio em cardiomiócito isolado;
- Interação molecular com o canal para cálcio do tipo-L;

Avaliar os efeitos dos isômeros do isopulegol sobre a hipertrofia cardíaca, determinando:

- Parâmetros morfométricos;
- Parâmetros eletrocardiográficos;
- Marcadores bioquímicos de dano tecidual;
- Expressão gênica de proteínas envolvidas na hipertrofia cardíaca;
- Estresse oxidativo;
- Interleucinas;
- Expressão de proteínas envolvidas na hipertrofia cardíaca.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Nos procedimentos experimentais foram utilizados ratos *Wistar* adultos (250-300 g), fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEUA 260/2014) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), foram mantidos no biotério do ICB-UFMG. Os animais, mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas a temperatura (20-25°C), foram alimentados livremente com ração comercial (Ração Nuvlab®, Brasil) e água *ad libitum*. As carcaças foram encaminhadas para o freezer do Departamento Bioquímica e Imunologia. O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG sob o protocolo nº 260/2014 (CEUA/UFMG) (Anexo I).

5.2 Preparo dos isômeros do isopulegol

Os isômeros do isopulegol (C₁₀H₁₈O, peso molecular 154,25) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). O (-)-isopulegol ((-)-ISP, (1R,2S,5R)-2-Isopropenyl-5-methylcyclohexanol, (1R,3R,4S)-p-Menth-8-en-3-ol, apresentou uma pureza ≥98% (Lot#STBD9399V). O (+)-isopulegol ((+)-ISP, (1S,2R,5S)-2-Isopropenyl-5-methylcyclohexanol, (1S,3S,4R)-p-Menth-8-en-3-ol, (Lot#BCBR0688V) apresentou uma pureza 99%. Nos experimentos *in vivo* e *in vitro* o isopulegol foi diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) a 0,1% e 0,04%, respectivamente.

5.3 Efeito (+) e (-)-isopulegol sobre a contratilidade atrial

Os ratos foram decapitados em guilhotina, os corações foram retirados e o átrio esquerdo isolado montado em cuba para órgão contendo solução de Krebs–Henseleit (K-H) (em mM: NaCl 120, KCl 5,4, MgCl₂ 1,2, NaHCO₃ 27,0, CaCl₂ 1,25, glicose 11, NaH₂PO₄ 2,0, pH 7,4). Os átrios foram mantidos a 29 ± 0,1 ° C, oxigenados com uma mistura de carbogênio (95% O₂ e 5% de CO₂) e estirados para uma tensão de repouso de 10 mN. O músculo foi submetido à estimulação do campo de 1 Hz, 70 V (duração do pulso: 1,5 ms) (3072 Digitimer estimulador controlado por um programador D4030

Digitimer; Welwyn Garden City, Hertfordshire, AL7 3BE, Inglaterra). A força atrial foi captada utilizando um transdutor de força isométrico (HP FTA 10-1 Sunborn, HP 8805B, Chicago, Illinois, EUA), os sinais foram digitalizados (DATAQ DI400, DI 205, Windaq PRO Aquisição, Ohio, Akron, EUA) e armazenados em um computador (Fig. 10). A força atrial foi medida em situação-controle e também após a incubação em concentrações crescentes dos (+)-ISP e (-)-ISP (1 a 5000 μM). Para cada concentração, a amplitude da força atrial foi determinada, permitindo, assim que fossem determinadas as respectivas CE_{50} (concentração da droga capaz de reduzir em 50% a resposta máxima).

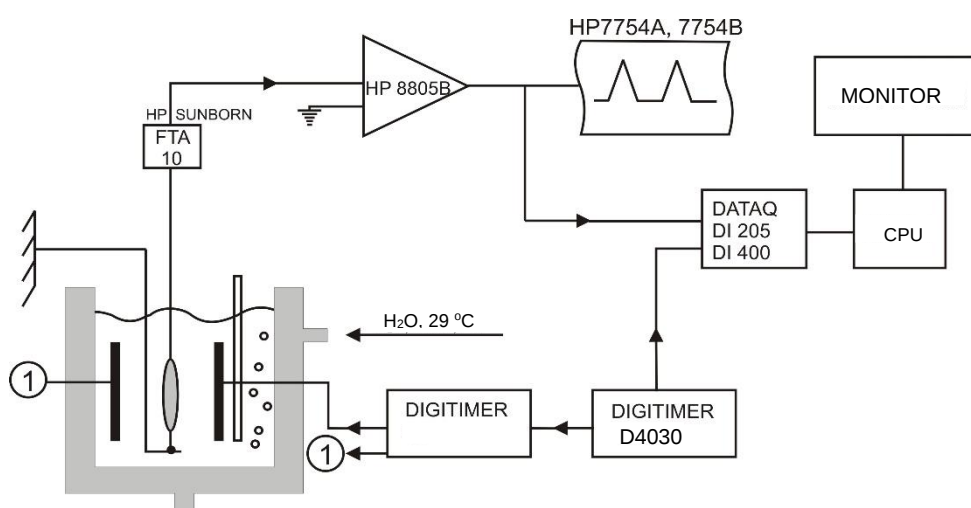


Figura 10 - Esquema da montagem experimental usada para determinar a força de contração atrial. A força atrial foi medida com um transdutor isométrico (HP FTA 10) acoplado a um amplificador (HP 8805B). Os sinais foram registrados em polígrafo (HP7754A, 7754B) e armazenados em computador (Dataq DI205, DI400, Windaq Pro Acquisition). O átrio foi estimulado a 1 Hz, 70 V e 1,5 ms (Digitimer D3072, Digitimer D4030).

5.4 Efeito (+) e (-)-isopulegol sobre a contratilidade do cardiomiócito

Os cardiomiócitos ventriculares esquerdos de rato foram isolados por digestão enzimática, conforme o protocolo descrito (Shioya, 2007), com algumas modificações. Os corações foram perfundidos com solução CIB ('cell isolation buffer') sem cálcio, contendo (em mM): 130 NaCl, 5,4 KCl, 0,5MgCl₂, 0,33 NaH₂PO₄, 22 de glucose, 25 HEPES, e 0,4 EGTA (pH 7,4), mantido a 37°C durante 3 min, para a limpeza do

coração. Em seguida, o coração foi perfundido com CIB contendo 0,3 mM de CaCl_2 , collagenase tipo II (1 mg/mL), protease tipo XXIII (0,06 mg/mL) e tripsina (0,06 mg/mL). Após 6 minutos de perfusão, o coração foi removido da cânula, os átrios removidos e descartados, e os ventrículos foram seccionados e submetidos a uma digestão enzimática adicional (10 min, 37° C) em CIB contendo 0,7 mM de CaCl_2 acrescido de collagenase (1 mg/mL), protease tipo XXIII (0,06 mg/mL) e tripsina (0,06 mg/mL). Posteriormente, as células foram isoladas do tecido por digestão mecânica com pipeta de pasteur por meio de agitação leve. Essa solução, contendo as células isoladas, foi filtrada, centrifugada a 1000 rpm por 60 s, ressuspensa em solução CIB contendo 1,2 mM de CaCl_2 e albumina bovina sérica (BSA, 2 mg/mL), por 10 min, a 37°C. Por fim, as células foram centrifugadas novamente (1000 rpm por 60 s) e mantidas em solução Tyrode (em mM): 140 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl_2 , 0,33 NaH_2PO_4 , 11 de Glicose, 5 HEPES e 1,8 CaCl_2 (pH 7,4). As células foram usadas por no máximo 4 h depois da dissociação.

A contração dos cardiomiócitos foi determinada medindo-se a alteração do comprimento celular usando um sistema de detecção de bordas (Ionoptix, EUA) montado em um microscópio invertido. Os cardiomiócitos foram colocados em uma câmara experimental com a base de vidro e banhados com a solução de Tyrode (em mM: NaCl 150, KCl 5,4, MgCl_2 0,5, Hepes 10, Glicose 10, CaCl_2 1,8, pH 7,4 ajustado com NaOH). A visualização das células foi feita em um monitor por meio de uma câmera (Myocam da Ionoptix) com 240 Hz, que foi acoplada ao microscópio. Foi usado o programa de detecção de imagens Ionwizard 6.3 da Ionoptix. As células foram submetidas à estimulação de campo (1 Hz, 100 V, 4 ms) (Rodrigues *et al.*, 2018) utilizando um par de eletrodos de platina. As alterações longitudinais nas bordas dos cardiomiócitos foram capturadas pelo sistema de detecção de bordas e os dados gerados foram armazenados e analisados. A contratilidade celular (Fig. 11) foi avaliada em células controle e após a incubação com 100 μM do (+) e (-)-isopulegol. Utilizando o programa Ionoptix (EUA) foram avaliados os seguintes parâmetros: fração de encurtamento (%), comprimento do cardiomiócito (μm) e duração da sístole e diástole medidos a 10%, 50% e 90% da contração e do relaxamento do cardiomiócito, respectivamente.

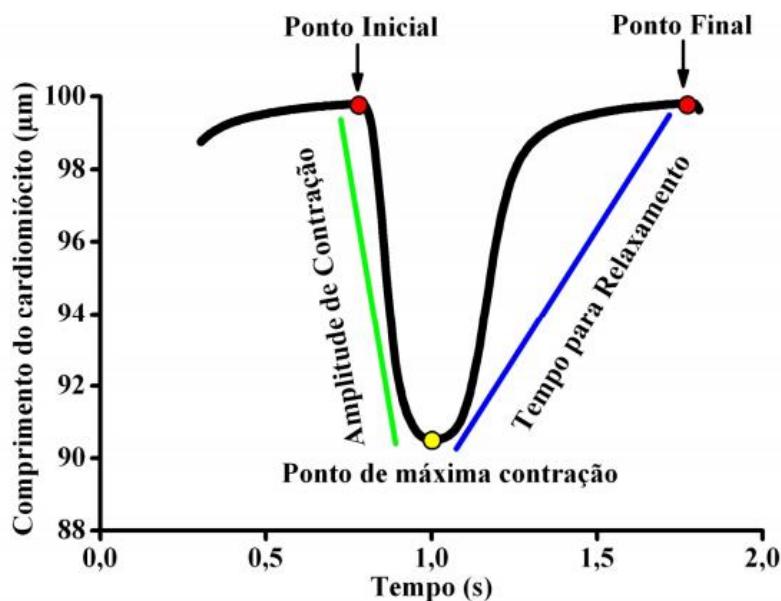


Figura 11. Traçado representativo de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz, e os parâmetros avaliados (Carneiro *et al.*, 2013).

5.5 Efeito do (+) e (-)-isopulegol sobre a corrente de cálcio tipo-L

A corrente de cálcio tipo-L ($I_{Ca,L}$) foi medida em cardiomiócitos ventriculares isolados. Registros na configuração ‘whole-cell’ ‘voltage-clamp’ foram obtidos a temperatura ambiente (22 - 25 °C) usando o amplificador EPC-10 patch clamp (HEKA Electronics, Rheinland-Pfalz, Germany) (de Menezes *et al.*, 2014). Após obter a configuração ‘whole-cell’, foram esperados 3 a 5 minutos para permitir o equilíbrio entre a solução interna da pipeta e o meio intracelular. As pontas dos eletrodos de registro apresentavam a resistência de 0,5 a 1,5 MΩ. Para medida da $I_{Ca,L}$, as pipetas de registro foram preenchidas com uma solução interna contendo (em mM): 120 CsCl, 20 TEACl, 5 NaCl, 10 HEPES, 5 EGTA, pH 7,2 com CsOH. A $I_{Ca,L}$ foi registrada na presença de 1,8 mM de Ca^{+2} extracelular (de Menezes *et al.*, 2014).

Para análise do curso temporal do efeito do (+) e (-)-isopulegol sobre a $I_{Ca,L}$ a partir de um potencial holding de -80 mV foi aplicado um pulso despolarizado para -40 mV durante 50 ms, com o objetivo de inativar os canais de Na^{+} e cálcio tipo-T. Em seguida, o potencial da célula foi elevado para 0 mV, durante 300 ms (Fig. 12). Esses protocolos foram repetidos a cada 10 s e foram feitos antes, durante e após a remoção de 100 µM de (+) e (-)-isopulegol.

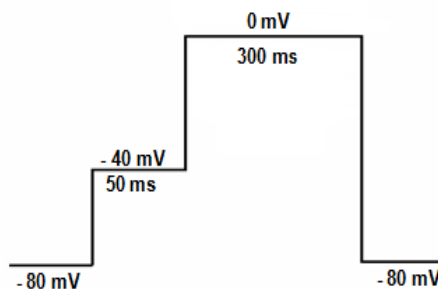


Figura 12. Protocolo de pulso executado para avaliar o efeito dos isômeros do isopulegol sobre o curso-temporal da corrente de cálcio tipo-L ($I_{Ca,L}$) em cardiomiócito isolado de rato.

5.6 Efeito do (+) e (-)-isopulegol sobre o transiente intracelular de cálcio

O transiente intracelular de Ca^{+2} foi determinado por meio de imagens obtidas com um microscópio confocal Zeiss 510 (Carl Zeiss). Os cardiomiócitos isolados foram pré-incubados com 5 μ M de Fluo-4 AM (forma química da sonda para a qual a membrana é permeável), por 30 minutos, à temperatura ambiente (27 ± 2 °C) e protegidos da luz. Em seguida, as células foram lavadas com solução de Tyrode, para remover o excesso de sonda. As células cardíacas foram expostas a 100 μ M dos isômeros de isopulegol durante 3 minutos. A sonda fluorescente Fluo-4 AM emite um sinal óptico quando se liga aos íons Ca^{+2} , sendo a intensidade do sinal proporcional à quantidade de Ca^{+2} ligado à sonda. O Fluo-4 AM foi excitado com laser de argônio (488 nm) e a intensidade da luz emitida foi detectada em 510 nm. As células foram estimuladas eletricamente (1 Hz, duração de 0,2 ms e amplitude supraliminar). O sistema de escaneamento META LSM 510 (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha), dotado de objetiva de imersão em óleo de 63X, foi usado para obter-se uma imagem confocal da fluorescência. Para a detecção dos transientes de Ca^{+2} , os miócitos foram escaneados (a cada 1,54 ms) em linha (512 pixels) passando ao longo do eixo longitudinal da célula. Os escaneamentos sequenciais dos cardiomiócitos foram armazenados a fim de criar imagens temporais bidimensionais do transiente intracelular de Ca^{+2} . Os processamentos digitais das imagens foram feitos com o auxílio de programas elaborados no LAMEX/UFMG e escritos em linguagem de programação IDL (Research System, Boulder, CO, USA). A quantidade de Ca^{+2} foi expressa como F/F_0 , onde F foi a fluorescência do sinal captado após a estimulação elétrica e F_0 a fluorescência emitida

pela célula durante o seu estado de quiescência (basal). As medidas foram feitas em situação controle e após 3 minutos de incubação com 100 μ M de (+) e (-)-isopulegol.

5.7 Avaliação do efeito anti-hipertrófico do (+) e (-)-isopulegol em coração de rato

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais e os tratamentos foram realizados durante 7 dias consecutivos. A hipertrofia cardíaca foi induzida pela administração do isoproterenol, um agonista do receptor β -adrenérgico não-específico (Gavioli *et al.*, 2014).

- 1) Grupo controle (CTR), animais que foram tratados com salina + DMSO 0,1% (i.p.);
- 2) Grupo hipertrofia cardíaca (ISO), animais que foram tratados com isoproterenol (4,5 mg/kg/dia, i.p.);
- 3) Grupo hipertrofia + (-)-isopulegol (ISO + (-)-ISP), animais que receberam ISO + (-)-isopulegol (50 mg/kg/dia, i.p.);
- 4) Grupo hipertrofia + (+)-isopulegol (ISO + (+)-ISP), animais que receberam ISO + (+)-isopulegol (50 mg/kg/dia, i.p.).

Os animais foram tratados com isoproterenol e após um intervalo de 30 minutos foram tratados com os monoterpênos. O delineamento experimental usado para indução e tratamento da hipertrofia cardíaca (7 dias), nos diferentes grupos experimentais, pode ser visto na Fig. 13.

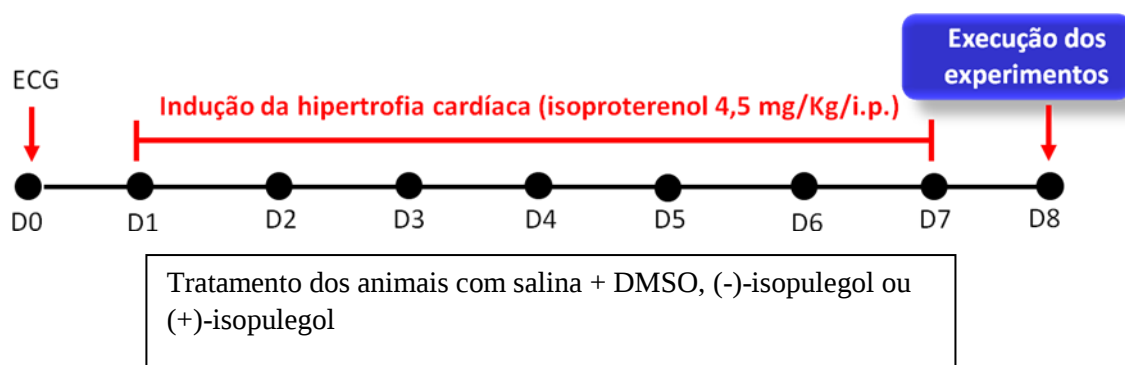


Figura 13. Delineamento experimental usado para indução e tratamento da hipertrofia cardíaca, nos diferentes grupos experimentais.

5.7.1 Parâmetros morfométricos

Para confirmar a HC nos animais, em todos os grupos experimentais, foram calculadas as razões entre o peso do coração/peso do animal e peso do coração/comprimento da tibia. Os corações foram pesados em balança analítica (Marte Modelo AY220) e o comprimento da tibia foi medido com o auxílio de um paquímetro. Essas determinações foram realizadas no oitavo dia.

5.7.2 Determinação dos marcadores bioquímicos de dano tecidual

Após o tratamento (oitavo dia), os animais foram decapitados, o tórax foi aberto para coleta do sangue diretamente do ventrículo esquerdo. Para obtenção do soro, o sangue foi centrifugado a 10.000 r.p.m., durante 10 minutos, a 4° C. As dosagens do da lactato desidrogenase (LDH), creatinofosfoquinase total (CPK-total) e creatinofosfoquinase fração MB (CPK-MB) foram feitas, em triplicata, usando o kit de dosagem comercial da Labtest®.

5.7.3 Modelagem Molecular (Docking)

A estrutura do canal para cálcio tipo-L (Cav1.2) foi baixada do Protein Data Bank (IDPDB 3G43). Os isômeros conformacionais (confômeros) 3D de ligantes, no formato.sdf, foram obtidos da PubChem (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Os ligantes (isômeros do isopulegol) foram submetidos ao acoplamento molecular usando o Molegro Virtual Docker v. 6.0.1 (MVD). Todos os compostos de água foram eliminados do Cav1.2 e o método foi preparado usando configurações de parâmetros padrão no mesmo software: GRID de 15 Å de raio. O algoritmo de pontuação da Moldock [GRID] foi usado como a função de escore e o algoritmo de busca foi Moldock (Thomsen *et al.*, 2006).

5.8 Registro eletrocardiográfico (ECG)

Como é sabido que a HC promove alterações eletrocardiográficas (Tanoue *et al.*, 2016), foi avaliado o eletrocardiograma (ECG) dos animais *in vivo* de todos os grupos experimentais. Para tanto, os ratos foram anestesiados por injeção i.p. de quetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) e mantidos na posição supina com respiração espontânea. Para a gravação dos ECGs de superfície, três eletrodos de aço inoxidável foram implantados subcutaneamente, os sinais (derivação II) foram amplificados no cardioscópio (EMAI RX10), digitalizados (PowerLab 4/35 ADInstrument) e armazenados em computador para processamento off-line. Em todos os grupos experimentais, a frequência cardíaca (FC), intervalo QT (QT_i), duração do complexo QRS e deflexão intrinsecóide (DI) foram medidas em 10 batimentos, como pode ser visto na Fig. 14. O QT_i foi corrigido pela frequência cardíaca usando a equação de Bazett corrigida ($QTc-B = QT_i / \sqrt{RR/f}$; $f=270$ ms (Kmecova *et al.*, 2010). Onde RR se refere ao intervalo RR do ECG.

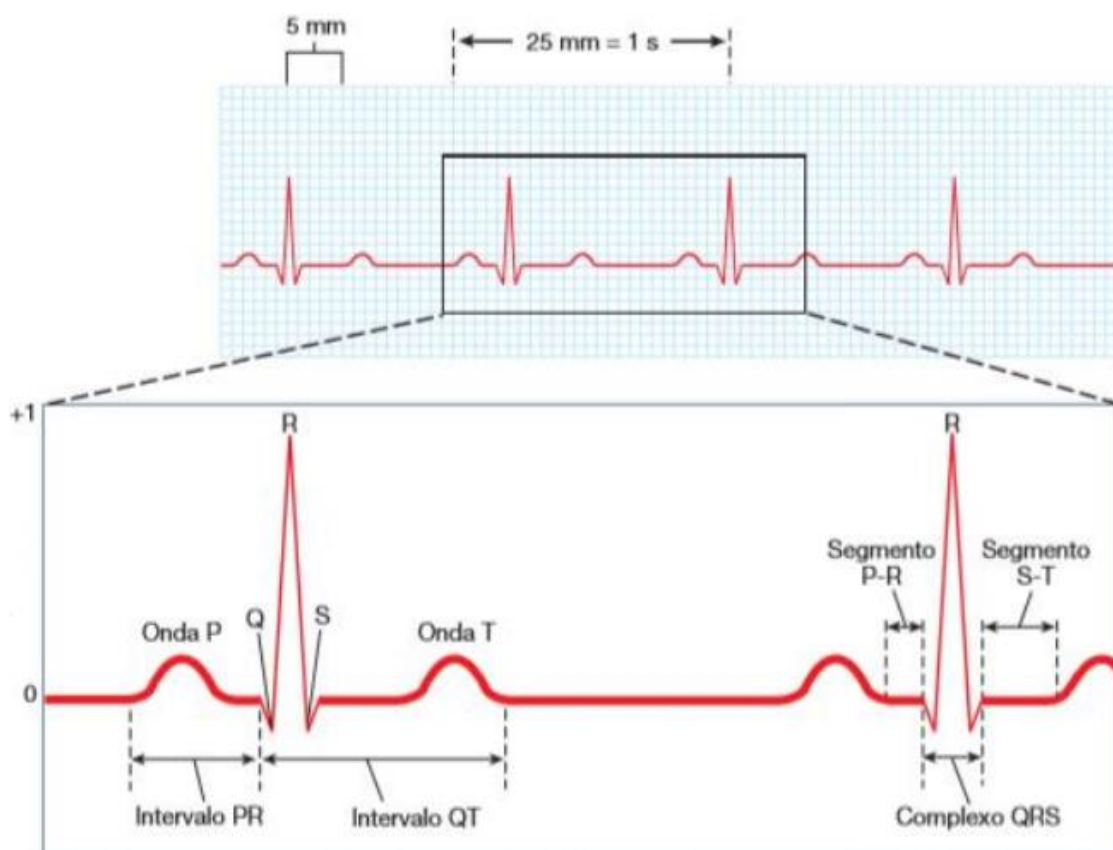


Figura 14. Eletrocardiograma normal, mostrando as ondas de despolarização (P, QRS) e repolarização (T), e os principais intervalos (PR, QT e RR) e segmentos (ST).

5.9 Avaliação do estresse oxidativo dos corações

5.9.1 Preparação dos tecidos para a mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividades enzimáticas

Os corações foram removidos, os ventrículos separados e homogeneizados (Euro Turrax T20b IKA LABORTECHNIK) durante 3 minutos, em solução salina/Tampão fosfato (pH 7,2), sempre mantidos no gelo. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 12.000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C. No sobrenadante, foram determinados os níveis de TBARS as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase. Para a determinação da atividade da glutathione peroxidase (GPx), as amostras foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,5, contendo 5mM de EDTA) e centrifugadas a 12.000 rpm, durante 20 minutos, a 4°C. A atividade da GPx foi determinada no sobrenadante.

A determinação da concentração proteica dos corações foi feita pelo método de (Lowry *et al.*, 1951). Para tanto, foi misturado 0,02 mL do sobrenadante (obtido após a homogeneização dos tecidos) e 2,5 mL da mistura contendo Na₂CO₃ (2%), CuSO₄ (1%) e tartarato duplo de sódio (2%), preparada nas proporções de 100:1:1. Após 10 minutos, foram adicionados 0,25 mL do reagente de Folin. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro, a 660 nm, após 20 minutos. Para a construção da curva padrão foi utilizada a albumina sérica bovina.

5.9.1.1 Determinação da peroxidação lipídica

O TBARS é um ensaio bioquímico utilizado para determinar a peroxidação lipídica no tecido pela reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (MDA) que é o principal produto da peroxidação lipídica. Os níveis de TBARS foram mensurados de acordo com o método descrito anteriormente (Ohkawa *et al.*, 1979). Para tanto, nas alíquotas do homogeneizado foram adicionadas em dodecil sulfato de sódio (SDS) a 8,1%, ácido acético 2,5 M (pH 3,4) e ácido tiobarbitúrico a 0,8%. A mistura foi incubada por 60 minutos a 95° C. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em

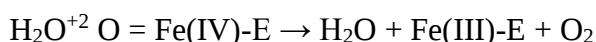
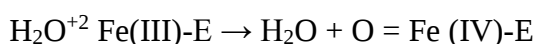
espectrofotômetro a 532 nm. Os níveis de TBARS foram expressos em nmol de MDA/mg proteína.

5.9.1.2 Atividade da superóxido dismutase

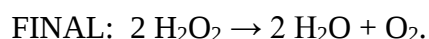
A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima antioxidante endógena que dismuta o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O ensaio da atividade da SOD foi realizado como descrito por (Dieterich *et al.*, 2000), com modificações (Gioda *et al.*, 2010). Para tanto, foi misturado 1 mL de solução tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,8) contendo 1 mM de DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético). Alíquotas do homogenato (30 μ L) foram adicionadas e a reação foi iniciada com a adição de 5 μ L pirogalol (0,2 mM). A leitura foi realizada no espectrofotômetro, a 420 nm, durante 3 minutos a 37°C. A atividade da SOD foi expressa em U/ μ g de proteína e foi determinada a partir da capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol, onde 1 U corresponde a 50% de inibição da auto-oxidação do pirogalol.

5.9.1.3 Atividade da catalase

A catalase (formalmente denominada hidroperoxidase) é uma enzima intracelular, encontrada na maioria dos organismos, que decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) segundo a reação química:



em que Fe-E representa o átomo de ferro do grupo hemo ligado à enzima.



O ensaio para determinação da atividade da catalase foi realizado conforme descrito por anteriormente (Nelson *et al.*, 1972). Para tanto, foram adicionados 2 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) a 60 μ L do sobrenadante, que foi obtido após a

homogeneização dos corações. Em seguida, foram adicionados 40 μL de H_2O_2 (3 M). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, a 240 nm, durante 1 minuto, a 25°C. A atividade da catalase foi expressa em $\Delta\text{E}/\text{min}/\mu\text{g}$ de proteína, sendo que ΔE corresponde à variação da atividade da catalase durante 1 minuto.

5.9.1.4 Atividade da glutathiona peroxidase

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) é proporcional ao consumo de NADPH e sua atividade foi realizada de acordo com o método descrito no Kit Cayman®. Nesse ensaio, 8 μL do sobrenadante (obtido após a homogeneização dos tecidos) foi misturado a 120 μL do tampão de ensaio (50 mM - Tris HCl pH 7, 5 mM EDTA) e 50 μL da mistura dos co-substratos (NADPH, glutathiona e glutathiona redutase). Logo em seguida, foram adicionados 20 μL do hidroperóxido de cumeno (substrato) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro, a 340 nm, durante 1 minuto, a 25°C. O princípio do ensaio baseia-se na oxidação do NADPH para NADP^+ que é acompanhada pela diminuição da absorção do NADPH. A atividade da GPx foi expressa em nmol NADPH/min/ μg proteína.

5.9.2 Efeito do (+) e (-) isopulegol sobre a expressão de proteínas envolvidas no processo hipertrófico

Para avaliar se o (+) e (-)-isopulegol teve a capacidade de promover alteração da expressão das proteínas envolvidas na HC (PKA C- α , CAMKII, α/β CAMKII, ERK 1/2 total, ERK 1/2 fosforilada, SERCA, sarcalumenina, PP1 γ , NCX) a análise pelo Western Blotting foi realizada nos corações submetidos à hipertrofia. Para tanto, os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise (RIPA: Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA - Na_2 5 mM, MgCl_2 1 mM, 1% Nonidet P40, 0,3% triton X-100, 0,5% de SDS e DTT 100 mM) (Thermo Scientific®). Em seguida, foram centrifugados a 10.000 g por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -80° C para posterior uso. As proteínas foram quantificadas de acordo com o método descrito por (Lowry *et al.*, 1951). Para tanto, 40 μg de proteínas foram separadas num gel de poliacrilamida (10%

e/ou 12%), a depender do peso molecular da proteína-alvo. As amostras foram aquecidas a 95° C por 5 minutos. As corridas foram realizadas com voltagem fixa em 120 V e tempo de ~1:30 horas. A transferência (BioRad) foi realizada, com voltagem fixa em 20 V e tempo de transferência variando entre 1 h. As membranas foram coradas em solução de Ponceau para verificar a qualidade da transferência. Logo após, as membranas foram lavadas em solução de TBS-Tween (em mmol/L: NaCl, 150; Tris, 25 e 0,05% de Tween 20, pH 8,0). Então as membranas foram incubadas e realizadas o bloqueio com uma solução contendo 5% de leite em pó (diluído em PBS-Tween - 0,3%) por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas por 18 a 20 horas (overnight), a 4° C com anticorpo primário diluído em solução de leite 1% em TBS-Tween.

Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: PKA C- α (#4782S, Cell Signaling, 1:1000), CAMKII (sc-13082, 1:500, Santa Cruz), α/β CAMKII (6881, 1:500, Millipore), ERK ½ total (#9102L, 1:1000, Cell Signaling), ERK ½ fosforilada (#34775, 1:1000, Cell Signaling), SERCA (sc-376235, 1:1000, Santa Cruz), Sarcalumenina (sc-58845, 1:1000, Santa Cruz), Proteína fosfatase 1-gama (PP1 γ , sc-6108, 1:500, Santa Cruz) e trocador Na⁺/Ca⁺² (NCX, sc-32881, 1:500, Santa Cruz).

Após este período, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário por 2 horas, com os seguintes anticorpos: anti-coelho (1:15000, Santa Cruz), anti-camundongo (1:15000, Santa Cruz) e anti-cabra (1:10000, Sigma-Aldrich). Logo após esse processo, as membranas foram novamente lavadas com TBS-Tween por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos). As bandas foram detectadas por reação de quimioluminescência utilizando o reagente ECL Plus® e analisadas no Image Quant TL®. Foram utilizados o GAPDH (sc-25778, 1:1000, Santa Cruz) e β -actina (#49675, 1:1000, Cell Signaling) para expressão total da proteína como normalizador da expressão.

5.9.3 Determinação das concentrações de TNF- α e IL-1 β no tecido cardíaco

As concentrações de TNF- α e IL-1 β foram determinadas nos tecidos cardíacos através de kits comerciais imunoenzimáticos (ELISA), segundo as instruções do

fabricante (Peprotech). As amostras foram medidas nos comprimentos de onda de 405 nm e 650 nm, e os resultados expressos em picogramas/miligrama de proteína.

5.10 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ SEM. As comparações estatísticas foram realizadas usando *GraphPad Prism 6* (San Diego, CA, EUA). Normalidade e igualdade de variância foram processadas pelo teste de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pelo teste t-student ou one-way ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Efeito dos isômeros (-)-isopulegol e (+)-isopulegol sobre a força contrátil do átrio esquerdo de ratos

No átrio esquerdo isolado, os isômeros (-)-ISP e (+)-ISP diminuíram a força contrátil de maneira dependente da concentração, e este efeito foi parcialmente restituído após a retirada desses monoterpenos do banho ('washout'). Os valores de CE_{50} calculados para a (-)-ISP e (+)-ISP foram $533,0 \pm 53,80 \mu M$ e $1836 \pm 165,71 \mu M$, respectivamente, apresentando diferença significativa ($n = 6$, $p < 0,05$) sendo a (-)-ISP aproximadamente 3 vezes mais potente (Fig. 15A). Entretanto, não houve diferença significativa no efeito máximo (E_{max}) observado para a (-)-ISP e (+)-ISP que foi de 98,8% e 89,6%, respectivamente ($n = 6$) (Fig.15B).

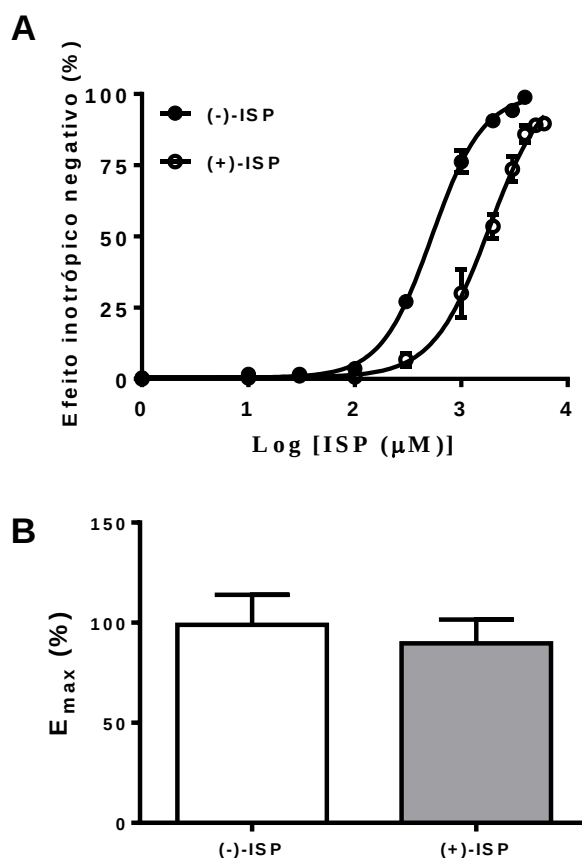


Figura 15. Efeito inotrópico negativo dos isômeros do isopulegol (ISP) em átrio esquerdo isolado de rato. (A) Curvas concentração-resposta e (B) eficácia máxima (E_{max}) do (-)-ISP e (+)-ISP no átrio ($n = 6$) (Teste t).

6.2 Efeitos dos isômeros (+)-isopulegol e (-)-isopulegol sobre a contratilidade célula de cardiomiócito ventricular

Foi avaliado o efeito dos isômeros do isopulegol sobre a contratilidade em cardiomiócitos ventriculares de rato. A Fig. 16A apresenta traçados representativos das contrações celulares em situação controle e após a incubação da (-)-ISP e (+)-ISP, na concentração de 100 μ M. Pode-se observar que os isômeros avaliados não alteraram o comprimento celular do cardiomiócito no repouso, como pode ser visto na Fig. 16B. Com a relação à fração de encurtamento celular, os resultados mostraram que os dois isômeros diminuíram esse parâmetro significativamente. Na situação controle, as células apresentaram uma fração de encurtamento de $12,12 \pm 0,36\%$ ($n = 94$), que foi reduzido para $7,26 \pm 0,44\%$ ($n = 83$) e $8,25 \pm 0,37\%$ ($n = 81$) após a incubação das células com a (-)-ISP e (+)-ISP, respectivamente ($p < 0,05$, Fig. 16C). Como se pode constatar, a redução da fração de encurtamento com a (-)-ISP foi superior ao da (+)-ISP ($p < 0,05$). Na Fig. 16D e E observa-se que não houve diferença significativa na velocidade da contração (duração da sístole) e do relaxamento (duração da diástole) dos cardiomiócitos tratadas com (-)-ISP e (+)-ISP, mensurados a 10%, 50% e 90% dos tempos de contração do cardiomiócito.

6.3 Efeitos do (+)-isopulegol e (-)-isopulegol sobre a corrente de Ca^{+2} tipo-L em cardiomiócito ventricular

Como os resultados mostraram que os 2 isômeros reduziram a contratilidade atrial e celular, resolveu-se investigar o envolvimento da corrente de Ca^{+2} tipo-L ($I_{\text{Ca,L}}$) no mecanismo de ação da (-)-ISP e (+)-ISP, uma vez que existe uma dependência da força de contração com o influxo de cálcio no miocárdio. Dessa forma, utilizando a técnica de “*patch-clamp*” na modalidade “*voltage-clamp whole-cell*” foram feitas as medidas das $I_{\text{Ca,L}}$ em cardiomiócitos ventriculares isolados. A Fig. 17A mostra os registros representativos da $I_{\text{Ca,L}}$ em situação controle e com os dois isômeros do isopulegol. Pode-se, então, observar que tanto o (-)-ISP quanto com o (+)-ISP reduziram a $I_{\text{Ca,L}}$. As Fig. 17B e C mostram o curso temporal da $I_{\text{Ca,L}}$ após a incubação com 100 μ M de (-)-ISP e (+)-ISP, respectivamente, no qual observa-se a redução da $I_{\text{Ca,L}}$ em função do tempo. O (-)-ISP diminui o pico da $I_{\text{Ca,L}}$ de $-24,32 \pm 0,32$ pA/pF ($n = 20$ células) para

$-7,58 \pm 0,18$ pA/pF ($n = 20$ células, $p < 0,05$) enquanto que com a (+)-ISP ela foi reduzida para $-9,93 \pm 0,25$ pA/pF ($n = 20$ células, $p < 0,05$). Na Fig. 17D a análise estatística revelou que a (-)-ISP foi mais eficaz em reduzir a $I_{Ca,L}$ em comparação a (+)-ISP ($p < 0,05$).

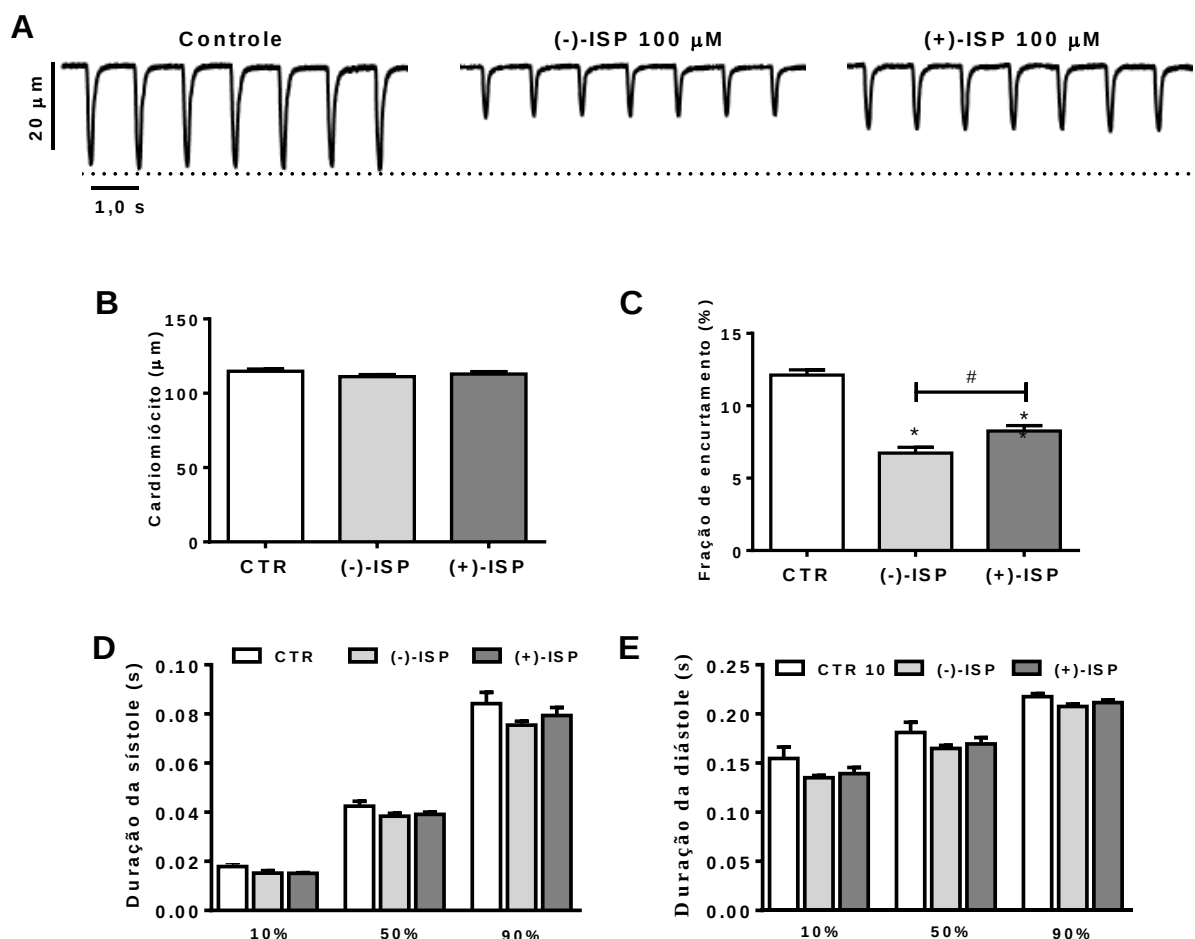


Figura 16. Efeito dos isômeros do isopulegol (ISP) sobre o encurtamento celular em cardiomiócito ventricular de rato. (A) registros do encurtamento celular no controle e com 100 μM de (-)-ISP e (+)-ISP, (B) comprimento do cardiomiócito, (C) fração de encurtamento, (D) duração da sístole e (E) duração da diástole medidos a 10%, 50% e 90% dos tempos de contração e relaxamento do cardiomiócito ($n = 94$ células), 100 μM de (-)-ISP ($n = 83$ células) e 100 μM de (+)-ISP ($n = 81$ células). * $p < 0,05$ vs controle e # $p < 0,05$ vs (-)-ISP (ANOVA one-way seguido do teste de Tukey).

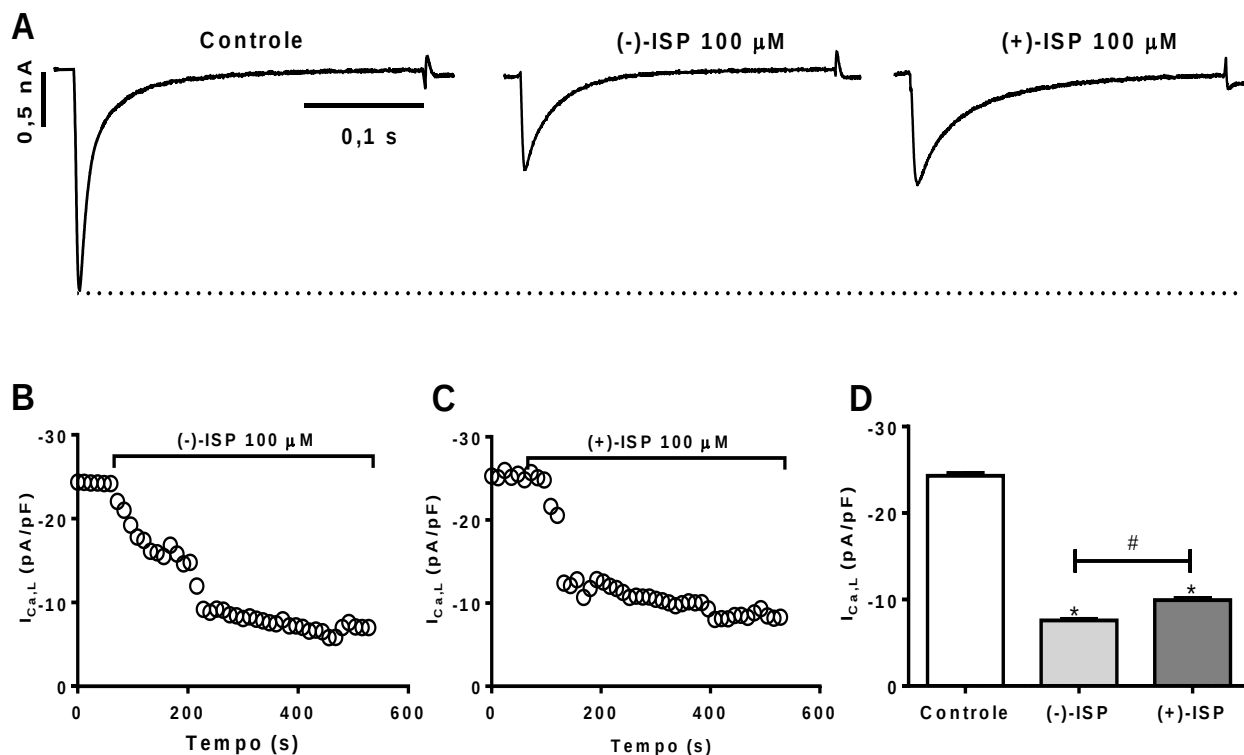


Figura 17. Efeito dos isômeros do isopulegol (ISP) sobre a corrente de cálcio tipo-L ($I_{Ca,L}$) em cardiomiócito ventricular de rato. (A) Registros representativos da $I_{Ca,L}$ no controle e com 100 μ M de (-)-ISP e (+)-ISP, (B) e (C) curso temporal da $I_{Ca,L}$ após a incubação com 100 μ M de (-)-ISP e (+)-ISP, respectivamente. (D) resultado médio da $I_{Ca,L}$ no controle (n = 20) e com 100 μ M de (-)-ISP (n = 20) e (+)-ISP (n = 20). (*p < 0,05 vs controle e #p < 0,05 vs (-)-ISP). (ANOVA one-way seguido do teste de Tukey).

6.4 Efeito do (-)-isopulegol e (+)-isopulegol sobre o transiente intracelular de Ca^{+2} em cardiomiócito ventricular

Como os dois isômeros reduziram a $I_{Ca,L}$, resolveu-se investigar suas ações sobre o transiente intracelular global de cálcio ($[Ca^{+2}]_i$), em cardiomiócitos carregados com FLUO 4-AM. As medidas dos $[Ca^{+2}]_i$ foram feitas em células controle (n = 5 ratos, 60 células) e em células submetidas a 100 μ M de (-)-ISP (n = 5 ratos, 51 células) e 100 μ M de (+)-ISP (n = 5 ratos, 50 células). A Fig. 18A e B mostram, respectivamente, as imagens pseudo-coloridas típicas e os traçados representativos do $[Ca^{+2}]_i$, registrados no controle e com o (-)-ISP e (+)-ISP. Como demonstrado na Fig. 18C, a exposição dos

cardiomiócitos a 100 μM desses isômeros promoveu redução do transiente $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de $2,49 \pm 0,06$ u.a. para $1,95 \pm 0,06$ u.a. na presença do (-)-ISP ($p < 0,05$), sendo observada também uma diminuição para $1,93 \pm 0,05$ u.a com a (+)-ISP ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa no transiente de cálcio entre os dois isômeros testados.

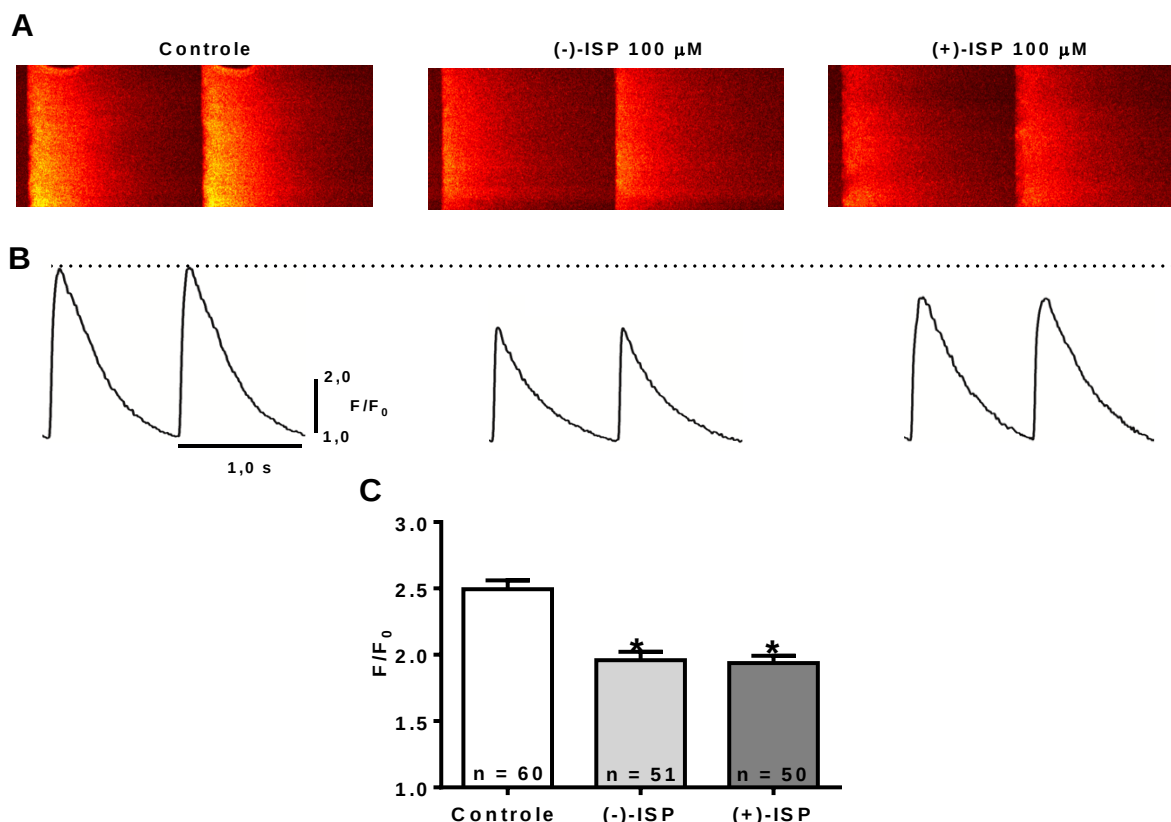


Figura 18. Efeito dos isômeros do isopulegol (ISP) sobre o transiente intracelular global de cálcio. (A) Imagens pseudo-coloridas do transiente intracelular de cálcio, (B) traçado representativo do transiente intracelular de cálcio e (C) pico do transiente de cálcio normalizado (F/F_0) na situação controle ($n = 60$ células) e após a incubação com a (-)-ISP ($n = 51$ células) e (+)-ISP ($n = 50$ células) (* $p < 0,05$) (ANOVA one-way seguido do teste de Tukey).

6.5 Estudo do ‘docking’ do canal de cálcio tipo-L

No estudo de ‘docking’ para o canal para cálcio dependente de voltagem (Cav 1.2), a energia obtida com a nifedipina (controle positivo, bloqueador de canal para cálcio tipo-L) foi de -87,89 Kcal/mol (Fig.19A), apresentando 3 interações estéricas entre átomos apolares e 2 ligações de hidrogênio entre a nifedipina e o canal. Já com o (-)-ISP (Fig. 19B) a energia alcançada foi de -65,84 Kcal/mol e foram observadas

apenas 2 interações estéricas entre átomos apolares com o canal para cálcio. Com relação a interação do (+)-ISP e o canal para cálcio (Fig. 19C), os resultados mostraram que a energia adquirida foi menor (-63,09 Kcal/mol) apresentando apenas 1 interação estérica entre átomos apolares. Observa-se que a (-)-ISP apresentou uma maior força de interação com o Cav 1.2.

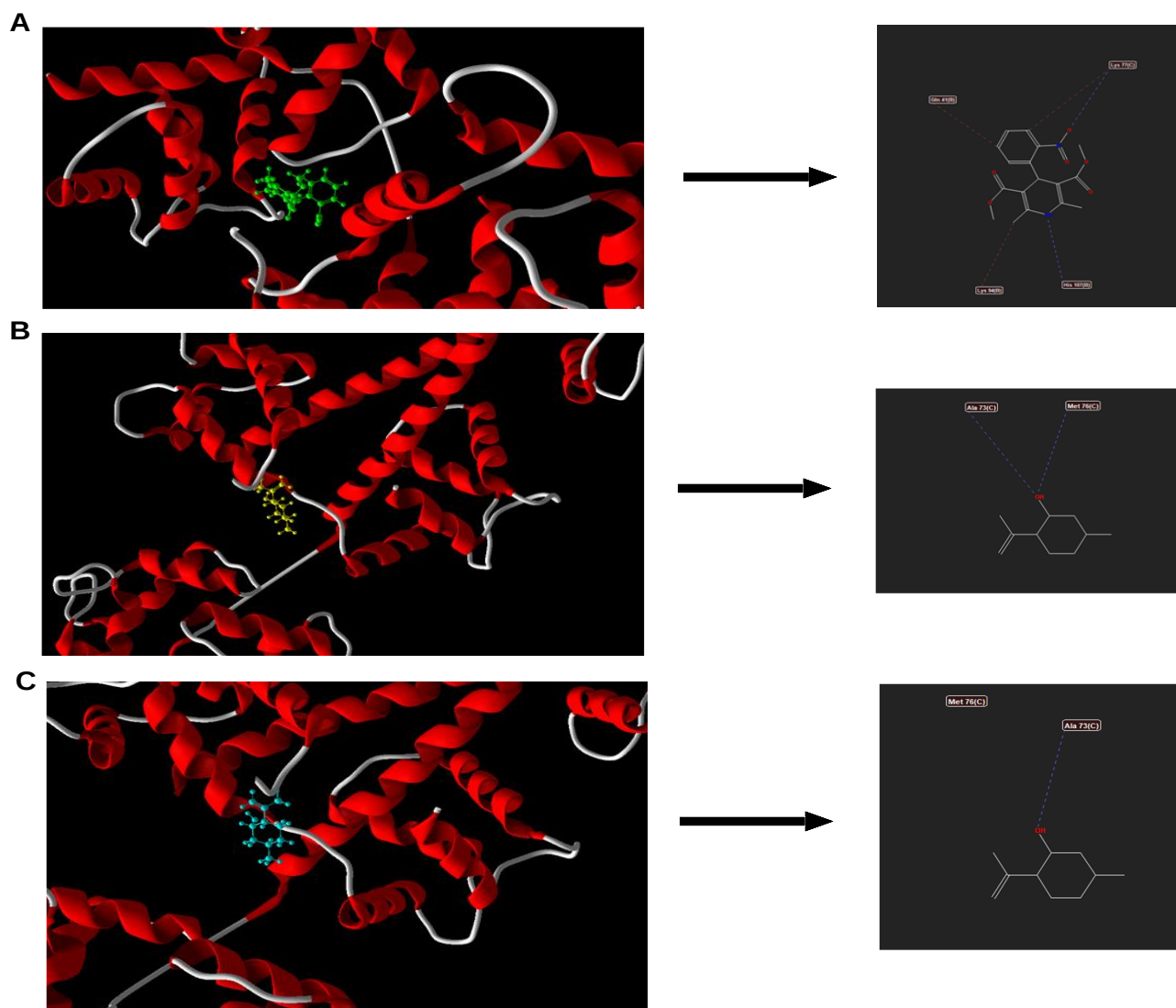


Figura 19. Estudo do ‘docking’ para a interação da nifedipina e dos isômeros do isopulegol (ISP) com o canal para cálcio tipo-L (Cav 1.2). (A) Nifedipina, (B) (-)-ISP e (C) (+)-ISP.

6.6 Avaliação da atividade anti-hipertrófica do (-)-isopulegol e (+)-isopulegol em corações de ratos

Como os monoterpenos exibiram um bloqueio para canais para Ca^{+2} em corações de ratos, e segundo a literatura o isopulegol também possui atividade antioxidante e anti-inflamatório (Silva *et al.*, 2009a) resolvemos investigar a sua ação em um modelo experimental de HC induzida por ISO (agonista β -AR).

6.7 Parâmetros morfométricos

Os resultados morfométricos mostraram que os animais hipertróficos, tratados com (ISO), apresentaram aumento na relação peso do coração/peso corporal ($5,12 \pm 0,09$ mg/g, $p < 0,05$), bem como aumento na relação peso do coração/comprimento da tíbia ($364,20 \pm 13,74$ mg/cm, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($3,52 \pm 0,11$ mg/g e $246,2 \pm 6,33$ mg/cm, respectivamente, Fig. 20A e B). Nos animais tratados com ISO + (-)-ISP houve diminuição do peso do coração/peso do corporal ($4,26 \pm 0,11$ mg/g, 16,68%, $p < 0,05$, Fig. 20A) e peso do coração/comprimento da tíbia ($299,40 \pm 7,45$ mg/cm, 17,80%, $p < 0,05$, Fig. 20B). O grupo tratado com ISO + (+)-ISP apresentou também redução do peso do coração/peso do corporal ($4,42 \pm 0,03$ mg/g, 13,56%, $p < 0,05$, Fig. 20A) e do peso do coração/comprimento da tíbia ($318,10 \pm 3,24$ mg/cm, 12,55%, $p < 0,05$, Fig. 20B) em relação ao grupo ISO.

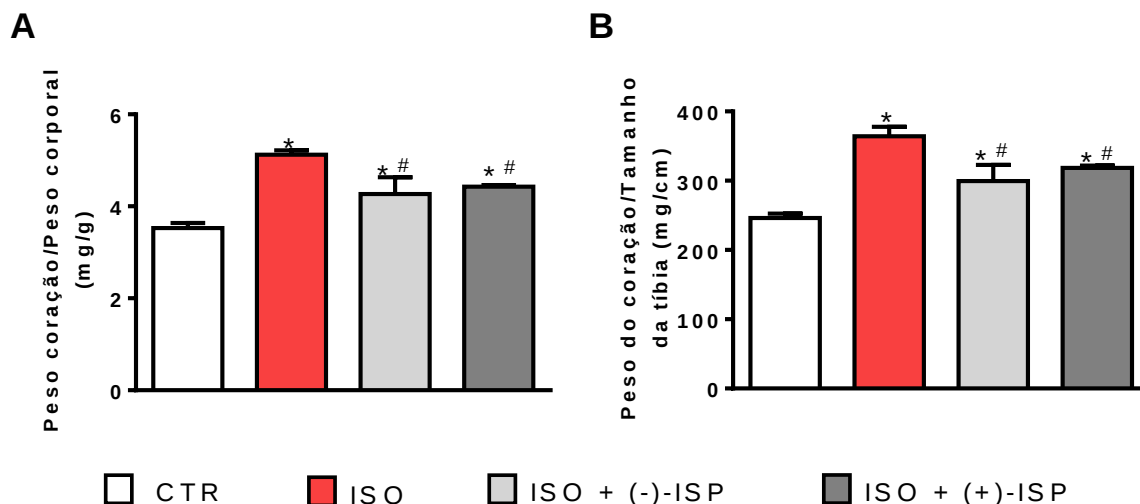


Figura 20. Os isômeros dos isopulegol atenuaram a hipertrofia cardíaca por marcadores morfométricos. (A) Relação peso coração/peso corporal (mg/g) em ratos nas situação controle, tratados com ISO, ISO + (-)-ISP e ISO + (+)-ISP. **(B)** Relação peso coração/comprimento da tíbia com os respectivos tratamentos (* $p < 0,05$ vs CRT, # $p < 0,05$ vs ISO, $n = 8$) (ANOVA one-way seguido do teste de Tukey).

6.8 Parâmetros eletrocardiográficos

A HC induz alterações eletrocardiográficas principalmente decorrente do remodelamento do ventrículo esquerdo caracterizado pelo aumento da massa muscular. Traçados experimentais estão representados na (Fig. 21A) situação controle, (Fig. 21B) tratados com ISO, (Fig. 21C) tratados com ISO + (-)-ISP e (Fig. 21D) tratados com ISO + (+)-ISP. Os resultados mostraram que os animais tratados com ISO apresentaram HC, aumento da parede do ventrículo esquerdo, uma vez que foi constatado aumento da duração do complexo QRS (de $19,0 \pm 0,5$ ms para $26,0 \pm 0,001$ ms, $p < 0,05$, Fig. 21E) e aumento da deflexão intrínseca (DI) (de $12,0 \pm 1,2$ ms para $19,0 \pm 0,5$ ms, $p < 0,05$, Fig. 21F) em relação ao grupo controle. Além disso, os animais do grupo hipertrofia apresentaram aumento do QTc ($254,9 \pm 25,4$ ms) em relação ao grupo controle ($155,5 \pm 4,5$ ms). Interessantemente, o tratamento dos animais tanto com a (-)-ISP quanto (+)-ISP foi capaz de prevenir o aumento do QRS ((-)-ISP: $17,0 \pm 1,6$ ms e (+)-ISP: $20,1 \pm 0,9$ ms, $p < 0,05$, Fig. 21E), prevenir o aumento do DI ((-)-ISP: $13,0 \pm 0,5$ ms e (+)-ISP: $13,0 \pm 0,3$ ms, $p < 0,05$, Fig. 20F) e QTc ((-)-ISP: $174,0 \pm 3,0$ ms e (+)-ISP: $155,5 \pm 4,0$ ms, $p < 0,05$, Fig. 21G). Por outro lado, não foram observadas alterações no intervalo

PR (PRi) (Fig. 21H) e frequência cardíaca (FC) (Fig. 21I) em todos os grupos experimentais avaliados.

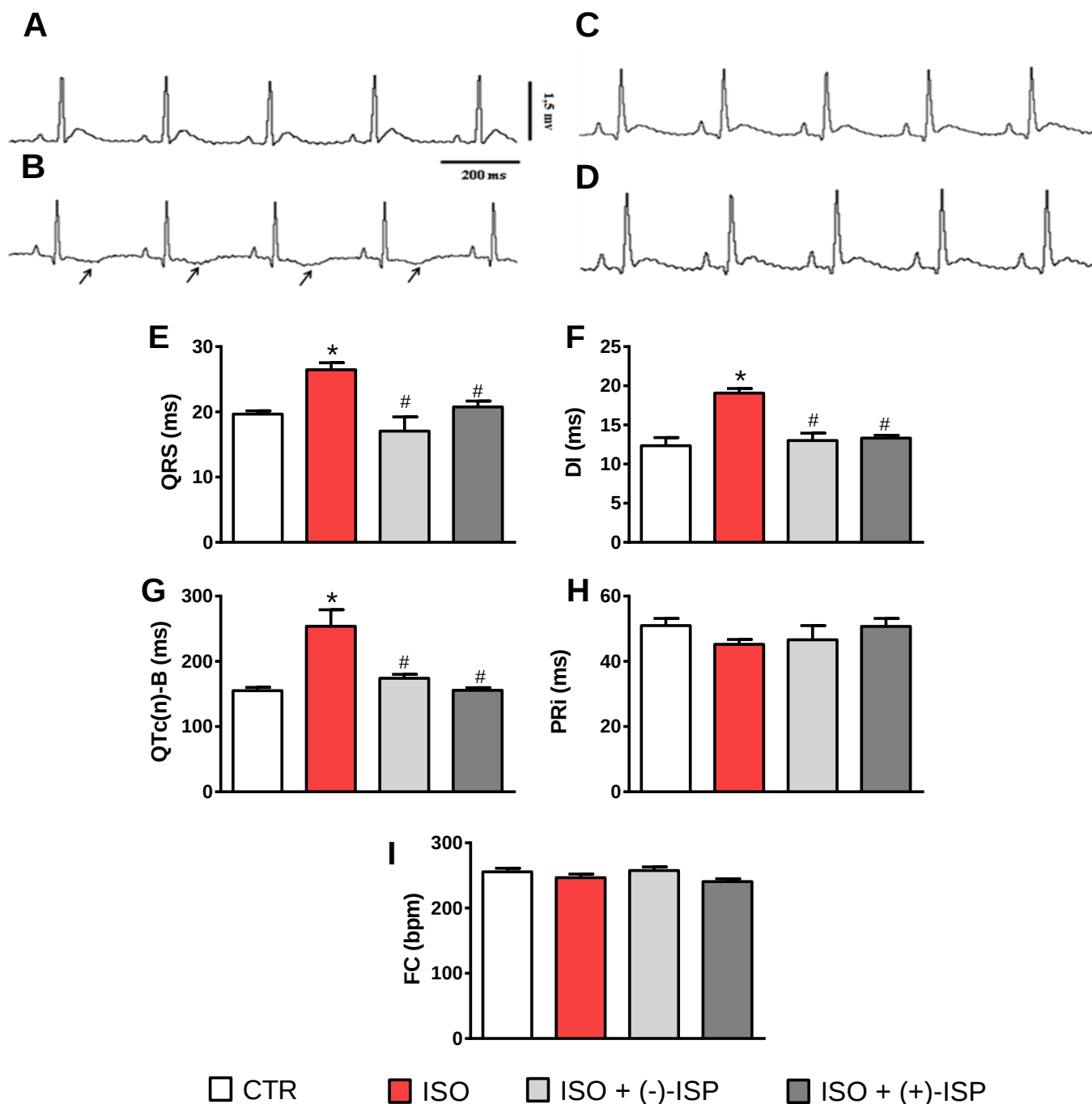


Figura 21. Efeito dos isômeros do isopulegol sobre os parâmetros do ECG *in vivo*. Registros representativos do ECG nos grupos submetidos aos tratamentos (A) grupo controle, (B) grupo isoproterenol (ISO) a seta representa inversão de onda T, (C) ISO + (-)-isopulegol e (D) ISO (+)-isopulegol; (E) Resultado do complexo QRS (ms), (F) Deflexão intrínseca (DI, ms), (G) intervalo QTc(n)-B (ms), (H) intervalo PR (PRi) e (I) Frequência cardíaca (FC, bpm) em animais controle, tratados ISO, ISO + (-)-ISP e ISO + (+)-ISP, respectivamente (n = 6, *p < 0,05 vs CTR, #p < 0,05 vs ISO) (ANOVA one-way seguido do teste de Tukey).

6.9 Marcadores bioquímicos de dano tecidual

O dano tecidual dos corações hipertróficos e tratados com os dois isômeros do isopulegol foi avaliado pela determinação, no soro, dos marcadores bioquímicos: lactato desidrogenase (LDH), creatinofosfoquinase (CPK-TOTAL) e sua isoenzima CPK-MB. Os resultados mostraram que esses três marcadores estavam significativamente aumentados nos corações hipertróficos em relação ao grupo controle (Fig. 22A, B e C). Os animais do grupo ISO + (-)-ISP apresentaram redução da LDH (de $213,5 \pm 3,6$ para $156,8 \pm 1,19$ U/L, $p < 0,05$, Fig. 22A), CPK-total (de $178,8 \pm 2,53$ U/L para $104,3 \pm 1,34$ U/L, $p < 0,05$, Fig. 22B) e CPK-MB (de $47,10 \pm 0,82$ U/L para $31,89 \pm 0,36$ U/L, $p < 0,05$, Fig. 22C) em relação ao grupo hipertrofia. Esse mesmo resultado foi observado nos animais tratados com a ISO + (+)-ISP com diminuição significativa dos marcadores LDH ($129,4 \pm 2,09$ U/L, $p < 0,05$, Fig. 22A), CPK-total ($94,33 \pm 1,8$ U/L, $p < 0,05$, Fig. 22B) e CPK-MB ($24,33 \pm 0,88$ U/L, $p < 0,05$, Fig. 22C). Interessantemente, os resultados mostraram que houve diferença significativa na resposta cardioprotetora entre os isômeros, sendo a (+)-ISP mais eficiente em diminuir o dano tecidual observado na HC.

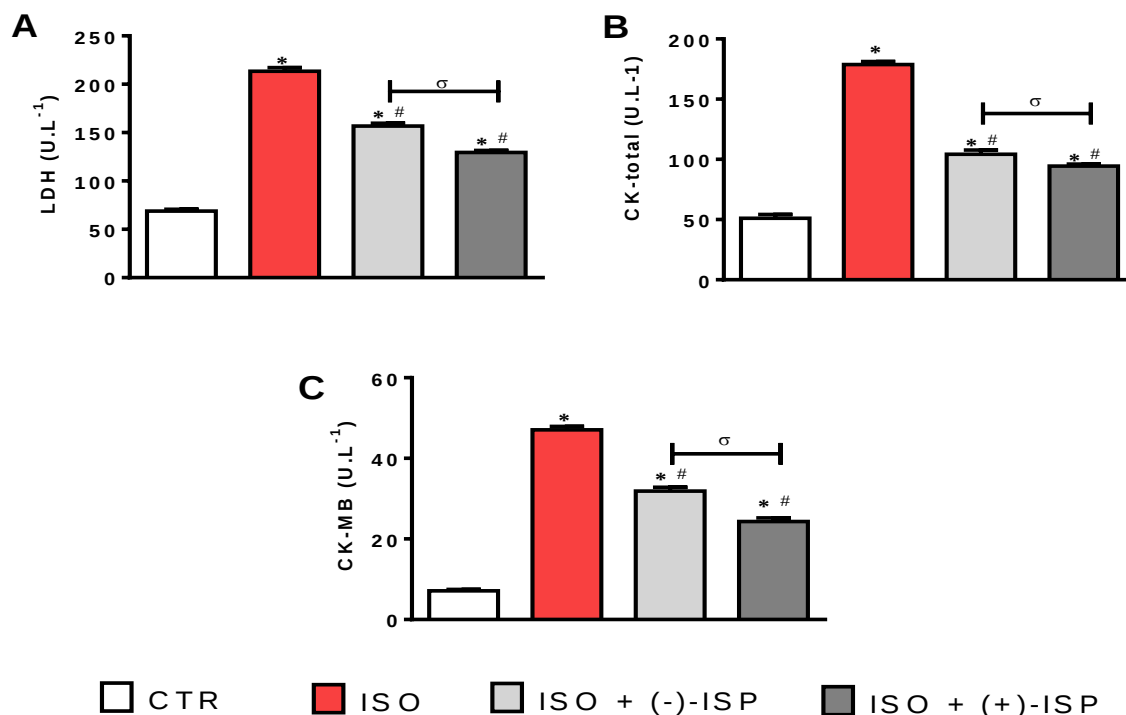


Figura 22. Os isômeros dos isopulegol (ISP) reduzem a lesão tecidual da hipertrofia cardíaca por diminuição dos marcadores bioquímicos. (A) Lactato desidrogenase (LDH), (B) Creatinafosfoquinase – Total (CPK total) e (C) Creatina Fosfoquinase – MB (CPK-MB) (* $p < 0,05$ vs CRT, # $p < 0,05$ vs ISO, $\sigma p < 0,05$ (+)-ISP vs (-)-ISP, $n = 7$) (ANOVA one-way seguido do teste de Tukey).

6.10 Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes

A HC está associada com aumento na produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição das reservas antioxidantes (Monsalvo-Villegas *et al.*, 2018b). Os resultados mostraram que os corações hipertróficos apresentaram aumento na peroxidação lipídica (de $1,933 \pm 0,0915$ para $3,012 \pm 0,092$ nmol MDA/mg proteína), evidenciado pelo aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente o malondialdeído (Fig. 24A). Esse aumento foi prevenido pelo tratamento dos animais com os dois isômeros do isopulegol ($n = 5$, $p < 0,05$, Fig. 24A). Entretanto, o tratamento dos animais com o (-)-ISP, reduziram a peroxidação lipídica (de $3,012 \pm 0,092$ para $1,961 \pm 0,100$ nmol MDA/mg proteína, $p < 0,05$) o isômero (+)-ISP houve a redução da peroxidação lipídica (de $3,012 \pm 0,092$ unidade para $2,411 \pm 0,081$ nmol MDA/mg proteína, $p < 0,05$).

As atividades da SOD (de $0,013 \pm 0,002$ para $0,009 \pm 0,002$ U/ μ g proteína, $p < 0,05$), catalase (de $0,405 \pm 0,023$ para $0,205 \pm 0,008$ Δ E/min/ μ g proteína, $p < 0,05$) e

GPx (de $0,309 \pm 0,003$ para $0,215 \pm 0,006$ nmol/min/ μ g proteína, $p < 0,05$) apresentaram-se reduzidas nos corações hipertróficos em relação ao grupo controle (Fig. 24 B, C e D). O tratamento dos animais com (-)-ISP foi capaz de aumentar a atividade da SOD ($0,009 \pm 0,001$ para $0,012 \pm 0,001$ U/ μ g proteína, $p < 0,05$), catalase (de $0,205 \pm 0,008$ para $0,297 \pm 0,019$ Δ E/min/ μ g proteína) e da GPx (de $0,215 \pm 0,006$ para $0,288 \pm 0,032$ nmol/min/ μ g proteína). A (+)-ISP também foi capaz de aumentar a atividade da SOD (de $0,009 \pm 0,001$ para $0,012 \pm 0,002$ U/ μ g proteína), catalase (de $0,205 \pm 0,008$ para $0,324 \pm 0,010$ Δ E/min/ μ g proteína) e da GPx (de $0,215 \pm 0,006$ para $0,309 \pm 0,005$ nmol/min/ μ g proteína).

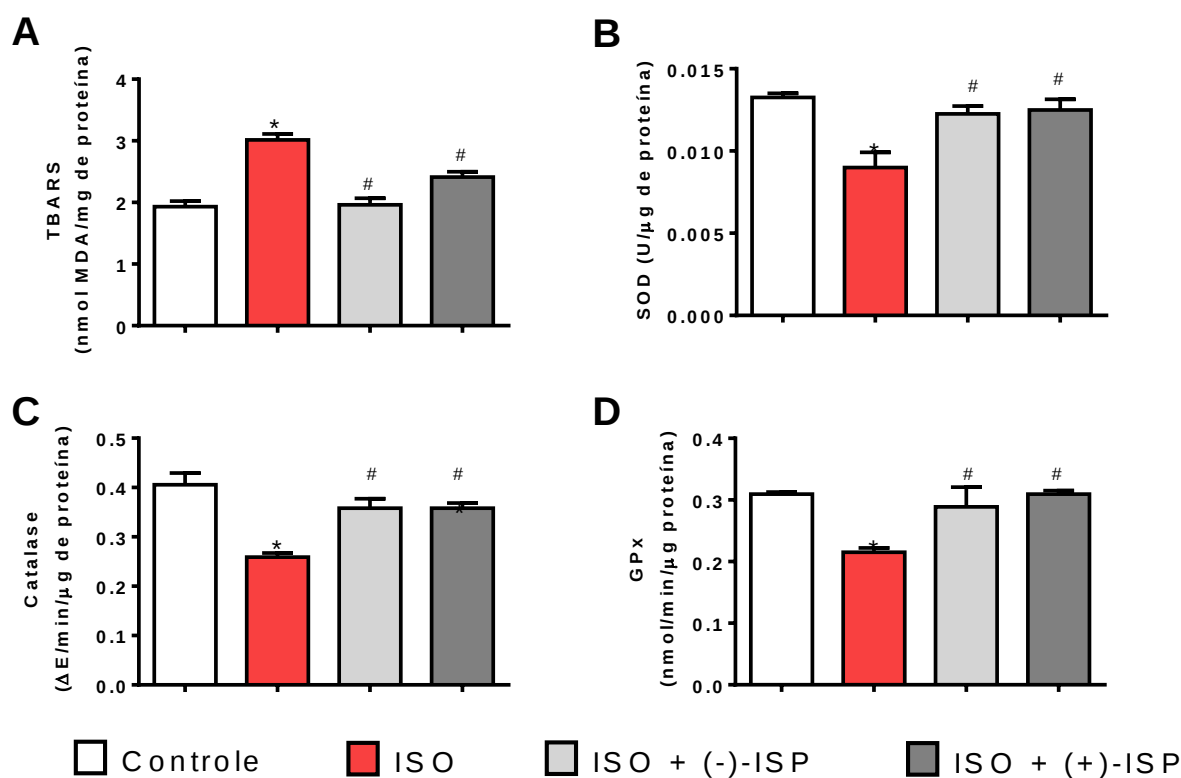


Figura 24. Avaliação do estresse oxidativo dos corações hipertróficos e submetidos ao tratamento com os isômeros do isopulegol (ISP). (A) Níveis de TBARS, (B) atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), (C) atividade da enzima catalase, atividade da glutathione peroxidase (GPx) nos corações dos animais controle, tratados ISO, ISO + (-)-ISP e ISO + (+)-ISP ($n = 5$, * $p < 0,05$ vs CRT, # $p < 0,05$ vs ISO) (ANOVA one-way seguido do teste de Tukey).

6.12 Análise das interleucinas envolvidas no processo inflamatório na hipertrofia cardíaca

Os resultados mostraram aumento na concentração de TNF- α ($2,76 \pm 0,32$ pg/mg de proteína, $p < 0,05$) no grupo ISO nos tecidos cardíacos em relação ao grupo CTR ($6,88 \pm 0,77$ pg/mg de proteína). Entretanto, o TNF- α teve uma redução significativa no grupo ISO + (-)-ISP (de $6,88 \pm 0,77$ para $4,35 \pm 0,45$ pg/mg de proteína) e no grupo ISO + (+)-ISP (de $6,88 \pm 0,77$ para $3,07 \pm 0,45$ pg/mg de proteína) ($p < 0,05$). A IL-1 β nos tecidos cardíacos no grupo ISO foi também aumentada ($8,69 \pm 1,12$ pg/mg de proteína) quando comparada com o grupo controle ($5,67 \pm 0,46$ pg/mg de proteína) (Fig. 25A). Houve redução da IL-1 β no grupo ISO + (-)-ISP (de $8,69 \pm 1,12$ para $3,36 \pm 0,32$ pg/mg de proteína) e no grupo ISO + (+)-ISP (de $8,69 \pm 1,12$ para $5,19 \pm 0,85$ pg/mg de proteína) (Fig. 25B).

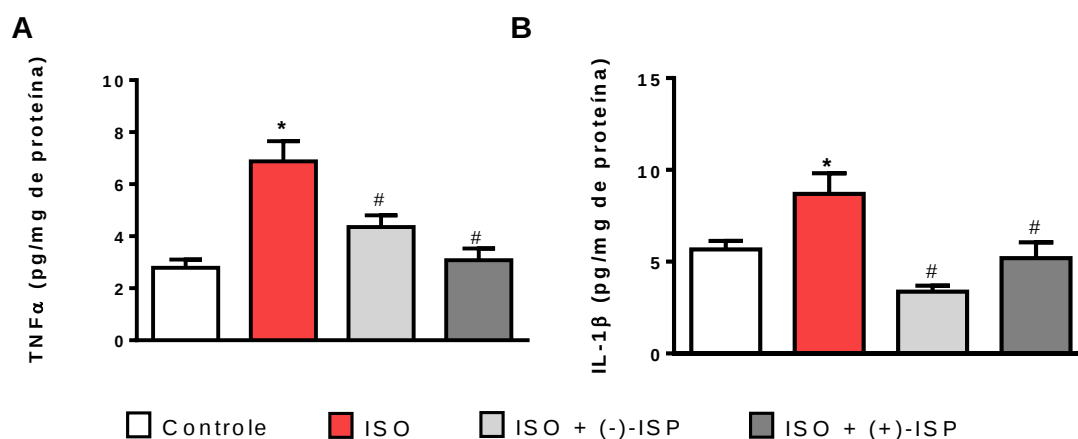


Figura 25. Interleucinas envolvidas no processo inflamatório na hipertrofia cardíaca. (A) TNF- α e (B) IL-1 β total nos corações dos animais controle, tratados com isoproterenol (ISO), ISO + (-)-ISP e ISO + (+)-ISP ($n = 5$, * $p < 0,05$ vs CRT, # $p < 0,05$ vs ISO) (ANOVA one-way seguido do teste de Tukey).

6.13 Análise do imunoconteúdo de proteínas envolvidas na hipertrofia cardíaca

Na análise do imunoconteúdo de proteínas envolvidas na HC, nossos resultados mostraram o aumento da expressão da PKA no coração hipertrófico ($1,53 \pm 0,06$) em relação aos grupos controle ($1,00 \pm 0,08$) havendo redução da expressão nos corações dos animais tratados com (-)-ISP ($0,95 \pm 0,06$, $p < 0,05$) e (+)-ISP ($1,04 \pm 0,15$, $p < 0,05$) (Fig. 26A). A Fig. 26B mostra que não houve alteração nos níveis de expressão da

pCAMKII (α e β) nos diferentes grupos experimentais. Analisando a via de sinalização de ERK1/2, os resultados mostraram aumento significativo da p-ERK1/2/ERK1/2 total no grupo hipertrofia ($0,13 \pm 0,03$, $p < 0,05$) em relação ao controle ($0,07 \pm 0,005$) (Fig. 26C). Interessantemente, os tratamentos com a (-)-ISP ($0,025 \pm 0,002$, $p < 0,05$) e (+)-ISP ($0,064 \pm 0,007$, $p < 0,05$) foram capazes de prevenir esse aumento na fosforilação observada na HC.

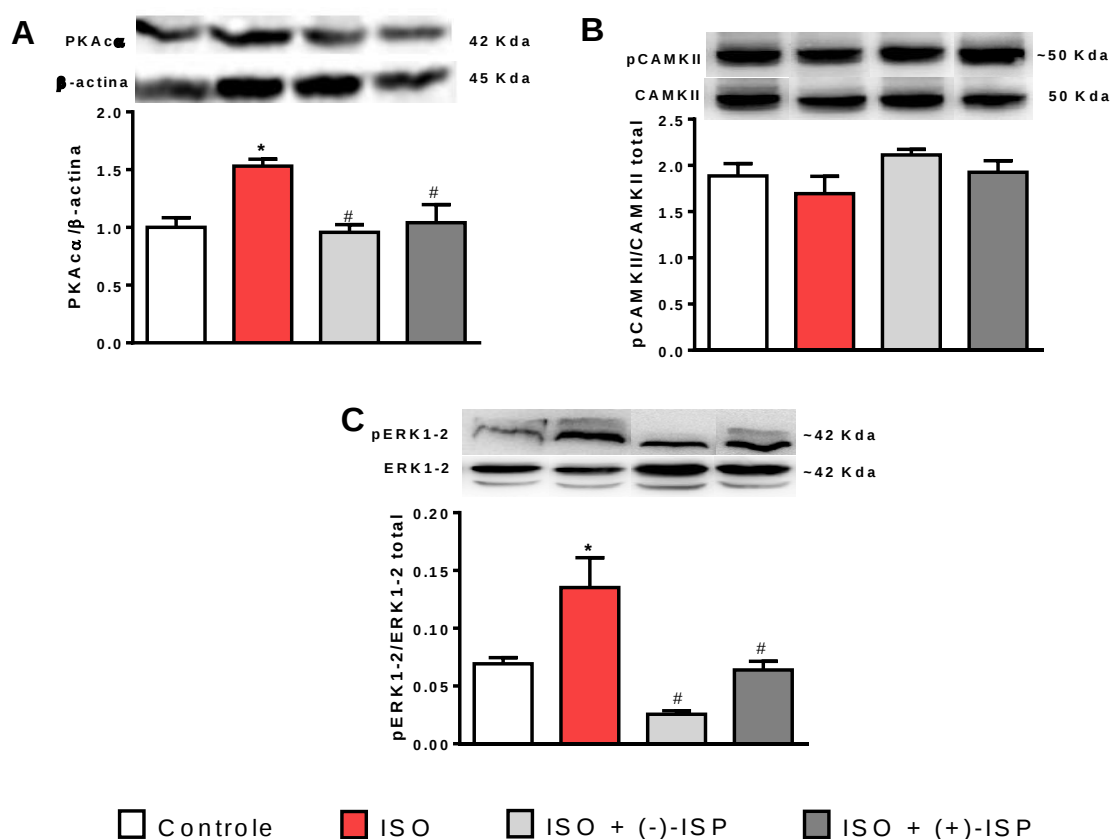


Figura 26. Imunoconteúdo de proteínas envolvidas na hipertrofia cardíaca nos diferentes grupos experimentais. (A) PKA C-α, (B) pCAMKII/CAMKII total, (C) pERK 1/2/ERK1/2 total nos corações dos animais controle, tratados com isoproterenol, ISO, ISO + (-)-ISP e ISO + (+)-ISP (n = 4, *p < 0,05 vs CRT, #p < 0,05 vs ISO) (ANOVA one-way seguido do teste de Tukey).

A Fig. 27 mostra a expressão proteica da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA), PP1-γ, sarcalumelina (SARC) e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (NCX) nos diferentes grupos experimentais. Ao avaliar a expressão proteica da SERCA, foi observado que a HC promoveu redução significativa da sua expressão ($0,67 \pm 0,04$, $p < 0,05$) quando comparado com grupo controle ($1,13 \pm 0,06$). Em contraste, os ratos

tratados com o (-)-ISP e (+)-ISP a expressão da SERCA foi restaurada à situação controle (Fig. 27A). Como observado na Fig. 27B, a expressão da PP1- γ foi reduzida no grupo hipertrofia ($1,39 \pm 0,16$, $p < 0,05$) em relação ao controle ($2,49 \pm 0,17$). Entretanto, os tratamentos com a (-)-ISP e (+)-ISP não foram capaz de prevenir essa alteração. Nossos resultados mostraram que a HC induziu diminuição na expressão da sarcalumelina ($0,16 \pm 0,03$, $p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($0,35 \pm 0,04$). Os tratamentos dos animais com a (-)-ISP e (+)-ISP foram capazes de prevenir essa alteração para $0,44 \pm 0,01$ e $0,42 \pm 0,02$, respectivamente (Fig. 27C). A expressão do NCX apresentou-se aumentada no grupo hipertrofia ($1,42 \pm 0,16$, $p < 0,05$, Fig. 27D) quando comparado ao controle ($0,68 \pm 0,16$) sendo prevenido com o tratamento com o (-)-ISP ($0,81 \pm 0,015$, $p < 0,05$) e o (+)-ISP ($0,91 \pm 0,048$, $p < 0,05$).

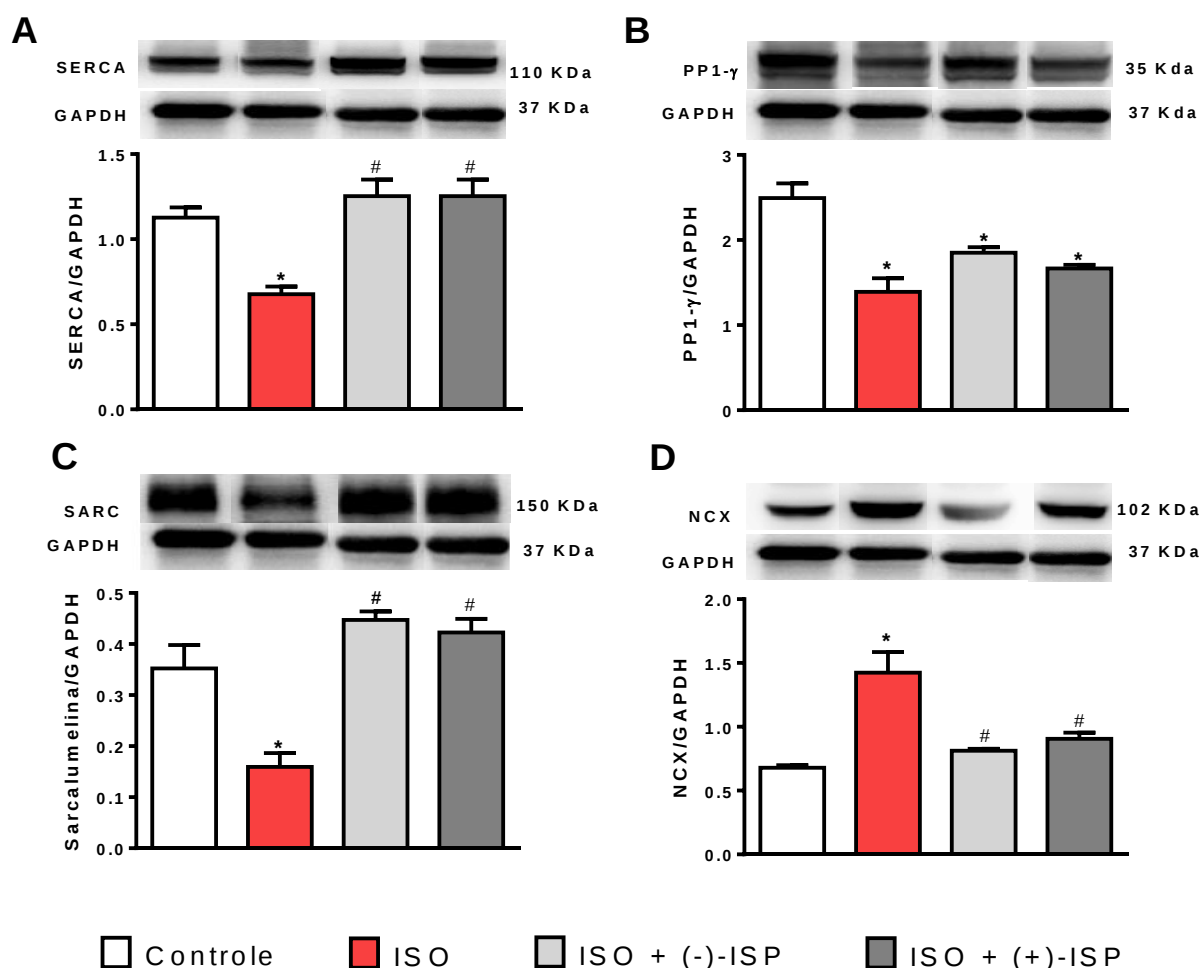


Figura 27. Imunoconteúdo de proteínas envolvidas na hipertrofia cardíaca nos diferentes grupos experimentais. Expressão das proteínas (A) bomba de cálcio do

retículo sarcoplasmático, SERCA, **(B)** Proteína fosfatase 1-gama, PP1- γ , **(C)** sarcalumelina, SARC e **(D)** trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, NCX, nos corações dos animais em situação controle, tratados com isoproterenol, ISO, ISO + (-)-ISP e ISO + (+)-ISP (n = 3, *p < 0,05 vs CRT, #p < 0,05 vs ISO) (ANOVA one-way seguido do teste de Tukey).

7. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados os efeitos dos isômeros do isopulegol sobre parâmetros contráteis e sobre a sinalização do cálcio intracelular em coração de rato. Além disso, foram investigadas suas atividades anti-hipertróficas, bem como as vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento da HC patológica.

A princípio foi observado que os isômeros (-)-ISP e (+)-ISP reduziram a força de contração em átrio isolado de rato, sendo o (-)-ISP 3,5 vezes mais potente que o (+)-ISP. Em cardiomiócito ventricular de rato, os resultados também mostraram que os dois isômeros reduziram a fração de encurtamento celular, sendo a redução também maior com a (-)-ISP quando comparado com a (+)-ISP. Outro fato importante foi que não houve alteração do tamanho da célula no repouso (baseline) na presença de (-)-ISP ou (+)-ISP, ou seja, não houve alteração no tamanho do sarcômero comparada com a do controle. Apesar da redução da contratilidade celular, não houve diferença significativa na velocidade da contração e do relaxamento dos cardiomiócitos tratadas com (-)-ISP (+)-ISP.

Esse efeito inotrópico negativo dos isômeros do isopulegol também foi observado com outros monoterpenos. Como mostrado, em átrio de cobaia, a ação inotrópica negativa de 7 terpenos estruturalmente relacionados: nerol, nerolidol, farnesol, geraniol, citronelol, 3-metil-butenol-1ol (Vasconcelos *et al.*, 2018). Nesse estudo, foi evidenciado que a potência relativa dos terpenos estava relacionada ao número de unidades isoprênicas, sendo os sesquiterpenos (C_5H_8)₃ mais potentes que os monoterpenos (C_5H_8)₂ que, por sua vez, foram mais potentes que os hemiterpenos (C_5H_8). Outros terpenos induziram redução da contratilidade cardíaca, tais como a R(+)-pulegona (de Cerqueira *et al.*, 2011) e geraniol (de Menezes *et al.*, 2014) em coração de cobaia. O 1,8-cineol também diminuiu a força contrátil do músculo papilar do ventrículo esquerdo de rato (Soares *et al.*, 2005). A rotundifolana induziu vasorelaxamento em aorta isolada de rato (Cardoso Lima *et al.*, 2012). Outros terpenos podem apresentar resposta bifásica sobre a contratilidade miocárdica, a exemplo do (-)-terpineno-4-ol que induziu efeito inotrópico positivo em concentrações na faixa de micromolar e reduziu a força de contração atrial em concentrações na faixa de milimolar (Gondim *et al.*, 2017).

A contratilidade do músculo cardíaco depende da concentração de cálcio intracelular (Bers, 2002). Dessa forma, uma diminuição do influxo de cálcio, por canais

para cálcio tipo-L sarcolemais, induz uma menor liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático pelos receptores de rianodina (RyR) promovendo um efeito inotrópico negativo. Diante disso, foi levantado como hipótese para a redução da força contrátil induzida pelos isômeros do isopulegol, uma ação sobre canais para cálcio tipo-L. Os nossos resultados mostraram, através de técnica de “patch-clamp whole-cell” que tanto a (-)-ISP quanto a (+)-ISP foram capazes de reduzir a corrente de cálcio tipo-L ($I_{Ca,L}$) sendo a (-)-ISP mais eficaz em reduzir a $I_{Ca,L}$ em comparação a (+)-ISP. Essa diminuição de $I_{Ca,L}$ pode responsável pelo decréscimo de força atrial e celular promovida pelos isômeros.

A literatura relata que os monoterpenos são compostos que apresentam ampla atividade farmacológica com capacidade de modular várias correntes iônicas de membrana, incluindo as correntes de Ca^{+2} (Rocha *et al.*, 2019). O bloqueio da $I_{Ca,L}$ foi relatado por vários terpenos em células cardíacas, tais como a R(+)-pulegona (de Cerqueira *et al.*, 2011) e geraniol (de Menezes *et al.*, 2014) em cardiomiócito ventricular de camundongo, pelo nerol em cardiomiócito isolado de cobaia (de Menezes-Filho *et al.*, 2019), pelo (-)-mentol em cardiomiócito ventricular de coelho (Baylie *et al.*, 2010), pelo timol em células canina e ventricular humana (Santos *et al.*, 2011), pela rotundifolona (Peixoto-Neves *et al.*, 2010) e farnesol em músculo liso de ratos (Roullet *et al.*, 1997; Magyar *et al.*, 2004). O (-)-terpineno-4-ol, que apresentou resposta inotrópica bifásica em átrio de rato, aumentou a $I_{Ca,L}$ em concentrações baixas (μM) e reduziu em concentrações mais altas (mM) (Gondim *et al.*, 2017).

Durante o processo de acoplamento-excitação do miocárdio, ocorre despolarização da célula, abertura de canais para cálcio tipo-L e, consequentemente, influxo de íons cálcio. Esse íon Ca^{+2} que entra, irá se ligar aos RyR do retículo sarcoplasmático induzindo a sua abertura e liberação do Ca^{+2} estocado no citosol. A concentração de Ca^{+2} aumenta no citosol promovendo o processo de contração muscular. Para o relaxamento muscular ocorrer, a concentração intracelular de Ca^{+2} livre, precisa diminuir de 10^{-5} M para valores da ordem de 10^{-7} ou 10^{-9} M (Chemla *et al.*, 2000). Essa redução do Ca^{+2} permite a sua dissociação da troponina C (TnC). O esvaziamento do Ca^{+2} citoplasmático se dá por meio de quatro vias conhecidas, que são a SERCA, o NCX, Ca^{+2} -ATPase sarcolemal e Ca^{+2} -ATPase mitocondrial (Bers, 2002). Essa variação na concentração intracelular de Ca^{+2} , que aumenta na contração e diminui no relaxamento, é chamado de transiente intracelular de Ca^{+2} .

No transiente global intracelular, foi possível observar que o (-)-ISP e (+)-ISP reduziram em aproximadamente 20% a amplitude do transiente de $[Ca^{+2}]_i$, não havendo diferença significativa entre os dois isômeros avaliados. Esse resultado é bem plausível, uma vez que havendo diminuição do influxo de cálcio na célula, haverá também uma menor liberação de cálcio pelos RyRs do retículo sarcoplasmático (RS), diminuindo a concentração de cálcio intracelular.

Os dados obtidos até o presente momento mostraram que o (-)-ISP foi mais potente que a (+)-ISP no que se refere ao efeito inotrópico negativo e a redução da corrente de Ca^{+2} tipo-L. Os resultados do docking mostraram que a (-)-ISP possui um nível de interação de -65,84 Kcal/mol, com 2 interações estéricas entre átomos apolares com o canal para cálcio tipo-L. Por outro lado, a (+)-ISP mostrou um nível de interação um pouco menor (-63,09 Kcal/mol) apresentando apenas 1 interação estérica entre átomos apolares com o canal para cálcio tipo-L. Esses dados corroboram o menor efeito do (+)-ISP sobre os parâmetros avaliados no presente estudo. Com relação à interação da nifedipina com o canal (bloqueador clássico dos canais para Ca^{+2} tipo-L), usado como controle, os resultados mostraram uma maior energia de interação (-87,89 Kcal/mol) com 3 interações estéricas entre átomos apolares e 2 ligações de hidrogênio.

Os nossos resultados demonstram que os dois isômeros atuam como drogas bloqueadoras de canais para Ca^{+2} tipo-L (LTCC). Tem sido demonstrado na literatura que os bloqueadores de LTCC atenuam a hipertrofia, por diminuir a carga de Ca^{+2} intracelular, sugerindo que o Ca^{+2} ativa cascatas de sinalização para induzir hipertrofia patológica (Maier *et al.*, 2007b; Chen *et al.*, 2011).

A HC é um processo adaptativo do miocárdio que quando associada a condições fisiológicas e patológicas leva a um aumento do risco de morbidade e mortalidade, tendo como consequência o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Bernardo *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015; Lazzeroni *et al.*, 2016; Samak *et al.*, 2016). Estudos mostram que o tratamento com drogas antioxidantes é uma importante conduta farmacológica em diversas patologias, dentre elas, as doenças cardiovasculares (Fernandes *et al.*, 2015; Eijssvogels *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2016; Roth *et al.*, 2017).

Na HC induzida por isoproterenol (ISO), ocorre remodelamento cardíaco com aumento da razão peso do coração/peso corporal e da relação peso do coração/comprimento da tíbia (Singh *et al.*, 2011; Mesquita *et al.*, 2017). Interessantemente, nossos resultados mostraram que houve prevenção do aumento do peso dos corações nos grupos tratados tanto com o (-)-ISP quanto com o (+)-ISP.

Assim, pode-se afirmar que a severidade das alterações cardíacas foi melhorada nos grupos tratados com isômeros do isopulegol, uma vez que os parâmetros morfométricos foram parcialmente preservados. Esses dados sugerem que os isômeros têm um papel protetor contra a HC induzido pelo ISO.

Além de alterações morfométricas, o coração hipertrófico apresenta alterações nas suas propriedades elétricas e contráteis. O ECG é um dos métodos mais clássicos utilizados para diagnosticar lesões cardíacas podendo refletir a atividade elétrica do coração e identificar vários danos ao miocárdio em áreas específicas (Guo *et al.*, 2016). É comum ser evidenciado na HC um padrão de ECG com aumento na duração do complexo QRS (tempo para ativação ou despolarização dos ventrículos) e da deflexão intrinsecóide (DI) (tempo para ativação ou despolarização do ventrículo esquerdo). Em decorrência do aumento da massa dos ventrículos ocorre aumento do QRS e da DI, uma vez que a onda de despolarização gastará mais tempo para despolarizar toda a massa do ventrículo. Em relação ao complexo QRS, foi observado aumento em sua duração no grupo HC, uma vez que o aumento da massa do ventrículo esquerdo ocasiona um retardo na despolarização da massa do ventrículo (Zago *et al.*, 2015; Bacharova *et al.*, 2017). Os grupos tratados com os isômeros do isopulegol preveniram o aumento do QRS e, de maneira indireta, pode-se mensurar que houve uma diminuição da espessura do ventrículo esquerdo.

O intervalo PR mede o tempo de condução da onda elétrica desde o nodo sinusal, passando pelo nodo AV, até as fibras de Purkinje (Azevedo, 1999). Nos nossos resultados, não houve alteração do intervalo PR (Fig. 21D) nos animais com hipertrofia induzida por ISO. A literatura mostra que com relação ao intervalo PR (PRi) pacientes com HC podem apresentar pouca ou nenhuma alteração neste intervalo (Hancock *et al.*, 2009).

Além disso, a HC vem acompanhada de intervalo QTc prolongado e inversão da onda T decorrente de isquemia miocárdica (Higham *et al.*, 1995). Quando foi avaliado o QTc, que corresponde ao tempo gasto na despolarização e repolarização ventricular, houve um aumento em sua duração nos corações hipertrofiados, esse resultado corrobora com os achados no presente trabalho, é justificável porque provavelmente Em pacientes hipertensos com HC, o aumento da massa do VE foi associado duração prolongada do intervalo QRS e QT (Dritsas *et al.*, 1992; Baillard *et al.*, 2000; Oikarinen *et al.*, 2004).

O aumento do QRS está relacionado ao dano miocárdico difuso, onde o miocárdio é substituído por fibrose ou quando ocorre aumento lesões (Mazzoleni *et al.*, 1975; Kushawaha *et al.*, 2016) Prolongamento do intervalo QT e QRS em animais tratados com ISO pode indicar um retardo na condução ventricular (Galinier *et al.*, 1997; Kral'ova *et al.*, 2008). Tanto o (-)-ISP e o (+)-ISP foram capazes de prevenir essa alteração.

Diferente dos átrios, onde a repolarização começa onde se inicia a despolarização, o processo de despolarização dos ventrículos ocorre do endocárdio para o epicárdio, enquanto que a repolarização ocorre do epicárdio para o endocárdio (Azevedo, 1999). Isso se deve as células epicárdicas apresentarem um potencial de ação mais curto do que as células endocárdicas (Nerbonne, 2016) Essa diferença regional se deve a maior expressão das correntes de potássio 'transient outward' ($I_{to,f}$ e $I_{to,s}$) nas células epicárdicas que diminui a duração do potencial de ação (Wickenden *et al.*, 1999; Nerbonne, 2016). Por isso, o complexo QRS apresenta o mesmo sentido da onda T (Azevedo, 1999). Na hipertrofia, como há um desequilíbrio entre o crescimento da massa muscular e do leito capilar, ocorre redução do fluxo coronariano promovendo diminuição do suprimento de nutrientes no coração podendo levar a isquemia e necrose miocárdica. Assim, alterações da repolarização ventricular, com presença de onda T negativa, são sugestivas de isquemia subepicárdica (Azevedo, 1999). A inversão da onda T foi observada nos animais hipertróficos, o que se significa que os animais, ao decorrer do tratamento, sofreram uma isquemia do miocárdio (Mansur *et al.*, 2006; Krensek *et al.*, 2009), padrão esse que foi completamente abolido com o tratamento com os isômeros. Portanto, podemos afirmar que os resultados mostraram mecanismos cardioprotetores do (-)-ISP e (+)-ISP frente às alterações eletrocardiográficas observadas no grupo hipertrofia.

Em contextos clínicos, a elevação na concentração das enzimas séricas (LDH, CK e CK-MB) é considerada como um biomarcador vital de dano miocárdico, indicando várias doenças cardíacas, como miocardite e infarto do miocárdio (Villani, 1990). A lesão miocárdica induzida por ISO foi ainda demonstrada por elevação significativa das atividades dessas enzimas séricas, que são liberados dos miócitos comprometidos (Akila *et al.*, 2016; Eladwy *et al.*, 2018). O aumento na atividade dessas enzimas em ratos tratados com ISO está de acordo com estudos anteriores (Panda *et al.*, 2017; Eladwy *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). Entretanto, os tratamentos dos animais

com o (-)-ISP e (+)-ISP promoveu uma redução significativa nos níveis séricos de LDH, CPK-total e CK-MB demonstrando que houve atenuação do dano miocárdico induzido por ISO. O (+)-ISP foi capaz de atenuar mais os níveis dessas enzimas que o (-)-ISP.

Já é sabido que a estimulação dos receptores β 1-adrenérgicos aumenta a produção de EROS, assim como diminui a capacidade das enzimas antioxidantes (Birben *et al.*, 2012; Monsalvo-Villegas *et al.*, 2018a). Nosso estudo mostrou que o tratamento com ISO aumentou significativamente os produtos da peroxidação lipídica nos tecidos cardíacos, associada à diminuição da atividade da catalase, SOD e GPx o que aponta para um aumento no estresse oxidativo nos corações hipertroáficos. O declínio nas atividades de SOD, CAT e GPx em tecido cardíaco, submetido ao tratamento com ISO, demonstra o aumento na produção de radicais livres, principalmente superóxido e peróxido de hidrogênio, o que causa lesão miocárdica (Aliahmat *et al.*, 2012). Esses resultados são consistentes com estudos anteriores que relataram o envolvimento do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica na hipertrofia cardíaca e cardiotoxicidade induzidas pelo ISO (Chattopadhyay *et al.*, 2003; Tanriverdi *et al.*, 2017). Interessantemente, essas alterações foram prevenidas com o tratamento com ambos os isômeros do isopulegol. Isto sustenta seguramente o efeito antioxidante e protetor do tecido cardíaco nos animais tratados com o isopulegol. As propriedades antioxidantes do isopulegol já tinham sido descritas na literatura, uma vez que o mesmo foi capaz de aumentar a atividade da catalase e aumentar os níveis de glutathionas no hipocampo dos camundongos (Silva *et al.*, 2009b).

O estresse oxidativo também pode induzir respostas inflamatórias ativando fatores de transcrição sensíveis à ação redox, que culminam com a liberação de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , IL-1 β , ciclo-oxigenase-2 (COX-2), e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Kumari *et al.*, 2018). Foi evidenciado no que nos corações hipertrofiados com ISO há aumento das concentrações de TNF- α e IL-1 β , corroborando a literatura (Dai *et al.*, 2019). Além disso, acredita-se que o aumento dessas citocinas também possa estar relacionado com o desenvolvimento de déficit cardíaco, fibrose e morte celular (Rosenkranz *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2018). Desta forma, esses fatos sugerem que o aumento das concentrações de TNF- α e IL-1 β no coração hipertrofiado e o déficit da função cardíaca que observados no grupo ISO estão associados entre si. Contudo, sabe-se que monoterpenos podem inibir o processo inflamatório reduzindo as concentrações de citocinas (Quintans *et al.*, 2019). Então se decidiu investigar o papel dos isômeros do isopulegol frente ao processo inflamatório da

HC, mensurando a atividade de suas principais citocinas e foi observado redução das atividades do TNF- α e IL-1 β .

Está bem estabelecido na literatura que a estimulação simpática promove ativação da PKA que é importante para a regulação da frequência e contratilidade cardíaca (Reiken *et al.*, 2003; Endoh, 2004). Entretanto, a ativação persistente do sistema simpático mediado pelo ISO (catecolamina) pode induzir HC patológica e disfunção contrátil. Na análise da expressão de proteínas envolvidas na HC nossos resultados revelaram aumento na expressão da PKA e ERK1/2 nos corações hipertróficos que foi prevenido com os tratamentos com os isômeros do isopulegol. Esse resultado está de acordo com o descrito na literatura que mostra o aumento da expressão da PKA e ERK1/2 na HC (Mutlak *et al.*, 2015; Tham *et al.*, 2015). A ativação de ERK1/2 foi relatada como mediadora de processos adaptativos e mal-adaptativos no coração (Lorenz *et al.*, 2009).

A proteína calmodulina quinase II dependente de Ca^{+2} (CaMKII) fosforila várias proteínas que participam da sinalização do Ca^{+2} , incluindo o RyR, fosfolamban e canais para Ca^{+2} tipo-L (Maier *et al.*, 2007a). Estudos recentes usando modelos animais mostraram que a CaMKII está altamente ativada na HC e que a sua superexpressão pode induzir HC, insuficiência cardíaca e arritmias ventriculares (Wu *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2017). Sabe-se que a ativação crônica da via β -adrenérgica, induz hipertrofia e insuficiência cardíaca, por ativar a CaMKII e aumentar o Ca^{+2} intracelular, levando a ocorrência de arritmias malignas (Maier *et al.*, 2002). Apesar dessas evidências, os nossos resultados não revelaram alteração na expressão da CaMKII nos grupos experimentais.

No coração, a recaptação do Ca^{+2} é modulada principalmente pela SERCA. Na HC a expressão da SERCA está diminuída o que culmina com a diminuição da carga de cálcio estocada no RS. Diante disso, haverá uma menor liberação de cálcio no citosol promovendo diminuição da contratilidade cardíaca (Mesquita *et al.*, 2017). Os nossos resultados mostraram uma menor expressão da SERCA nos corações hipertróficos, sendo prevenida com o tratamento com o (-)-ISP e (+)-ISP. Estudos mostram que o aumento da expressão da SERCA melhora a capacidade contrátil dos ventrículos melhorando o quadro de insuficiência cardíaca típica da HC patológica (Anwar *et al.*, 2008; Kranias *et al.*, 2012; Tham *et al.*, 2015). Estudos mostram que antagonistas β -adrenérgicos reverterem às alterações na expressão da SERCA melhorando a função contrátil (Wisloff *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2009; Al-Dissi *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013).

Como o tratamento dos animais com (-)-ISP e (+)-ISP aumentou a expressão da SERCA podemos indiretamente afirmar, que houve melhora na função contrátil dos corações dos animais hipertróficos.

O equilíbrio entre a fosforilação e a desfosforilação de proteínas regula quase todos os processos biológicos. As proteínas fosfatases são classificadas em três subgrupos: 1) serina/treonina, 2) tirosina ou 3) fosfatases específicas. As proteínas fosfatases serina/treonina incluem a proteína fosfatase 1 (PP1), proteína fosfatase 2A (PP2A) e proteína fosfatase 2B (PP2B ou calcineurina), sendo a principal classe de fosfatase no coração de mamíferos. Como a PP1 desfosforila o fosfolamban (PLB) exercendo uma função oposta da PKA que fosforila o PLB, a sua atividade aumentada ou a sua superexpressão melhora a função cardíaca (Gergs *et al.*, 2019). A PP1 é essencial para manter a função cardíaca fisiológica, estando sua expressão reduzida na HC. Nossos resultados mostraram redução da expressão PP1 γ no grupo hipertrofia, e o tratamento dos animais com (-)-ISP e (+)-ISP não foi possível restabelecer a expressão da PP1 γ .

A sarcalumenina é uma glicoproteína encontrada na cisterna longitudinal do RS responsável pelo tamponamento de Ca⁺² no músculo cardíaco, de forma semelhante à calsequestrina. Entretanto, a calsequestrina está condensada na cisterna terminal do RS, onde também estão localizados os RyRs. Em contraste, a sarcalumenina que está distribuída no RS longitudinal, fica co-localizada com a SERCA e o PLB (Shimura *et al.*, 2008; Jiao *et al.*, 2009; Jiao *et al.*, 2012). Nossos resultados mostraram que a expressão de sarcalumenina estava diminuída na HC patológica. Alguns autores sugerem que a interação funcional entre sarcalumenina e a SERCA2a aumenta a estabilidade da SERCA facilitando o sequestro de Ca⁺² para o RS. Assim, a interação da sarcalumenina com a SERCA2a desempenha um papel essencial na preservação da função cardíaca sob estresse mecânico, como a que ocorre na sobrecarga de pressão (Shimura *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2015). Os nossos resultados mostraram que o tratamento com ISO diminuiu a expressão da sarcalumenina, sendo prevenida com os tratamentos com (-)-ISP e (+)-ISP.

Além da SERCA, o trocador Na⁺/Ca²⁺ (NCX) também é responsável pelo transporte de Ca²⁺ no miócito cardíaco (Bers, 2002). Estudos prévios demonstraram que a estimulação crônica com norepinefrina induziu uma superexpressão do NCX no rato *in vitro* e *in vivo* (Schillinger *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Zwadlo *et al.*, 2005). Existem vários relatos de que a expressão de NCX está elevada em corações com infarto

e HC (Sipido et al., 2002; Javidanpour et al., 2018). Nossos resultados também mostraram a superexpressão do NCX na HC que foi prevenido com os tratamentos com (-)-ISP e (+)-ISP (Studer et al., 1994; Jordan et al., 2002). A expressão do NCX está aumentada por conta do desbalanço da homeostase do Ca^{+2} que ocorre na HC. Como resultado, a base molecular da resposta hipertrófica aumentando a expressão do NCX, é importante para restabelecer o equilíbrio do Ca^{+2} intracelular (Tomaselli et al., 1999).

Os resultados obtidos mostraram que os isômeros (-)-ISP e (+)-ISP reduzem a corrente de cálcio tipo-L e o transiente intracelular de cálcio no miócito cardíaco promovendo diminuição da contratilidade cardíaca. Em modelo de HC, induzida por ISO, os resultados mostraram que o (-)-ISP e (+)-ISP foram capazes de prevenir ou atenuar as alterações morfométricas, eletrocardiográficas e bioquímicas características da HC patológica. Além disso, o tratamento dos animais hipertróficos com o (-)-ISP e (+)-ISP foi capaz de prevenir o estresse oxidativo e a expressão de genes relacionados à HC, ANP, BNP e LOX. A superexpressão de PKA, ERK1/2, NCX e a diminuição da expressão da SERCA e sarcalumenina foram prevenidas com os tratamentos com os isômeros do isopulegol. Esses resultados apontam para o efeito cardioprotetor dos isômeros do isopulegol frente à HC patológica induzida por estimulação dos receptores β -adrenérgicos.

8. CONCLUSÃO

Podemos concluir que os isômeros do isopulegol promovem:

- Redução da contratilidade em átrio esquerdo e em cardiomiócito ventricular isolado;
- Diminuição da corrente de cálcio tipo-L em cardiomiócito isolado;
- Redução do transiente intracelular do cálcio em cardiomiócito isolado;
- Interação molecular com o canal para cálcio do tipo-L;

Em modelo de HC patológica, os isômeros do isopulegol promovem:

- Atenuação das alterações morfométricas características da HC, tal como aumento da massa cardíaca;
- Prevenção das alterações eletrocardiográficas observadas nos corações hipertróficos, tais como aumento da duração do complexo QRS, QTc e DI.
- Diminuição dos marcadores bioquímicos (LDH, CPK, CK-MB) nos corações hipertróficos;
- Diminuição do estresse oxidativo (TBARS, SOD, CAT e GPx) nos corações hipertróficos;
- Diminuição de mediadores inflamatórios (TNF- α e IL1- β) nos corações hipertróficos;
- Diminuição da superexpressão de proteínas envolvidas na HC (PKA, ERK1/2, NCX) assim como preveniu a diminuição da expressão da SERCA e sarcalumalina.

9. REFERÊNCIAS

- A. Vernin G, Parkanyi C, Cozzolino F, Fellous R (2004). *GC/MS Analysis of the Volatile Constituents of Corymbia citriodora Hook. from Réunion Island*. edn, vol. 16.
- Aggarwal KK, Khanuja SPS, Ahmad A, Kumar TRS, Gupta VK, Kumar S (2002). Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour Frag J* **17**(1): 59-63.
- Agrawal R, Agrawal N, Koyani CN, Singh R (2010). Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol Res* **61**(4): 269-280.
- Aidley DJ, Stanfield PR (1996). *Ion Channels: Molecules in Action*. edn. Cambridge University Press.
- Akila P, Vennila L (2016). Chlorogenic acid a dietary polyphenol attenuates isoproterenol induced myocardial oxidative stress in rat myocardium: An in vivo study. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **84**: 208-214.
- Al-Dissi AN, Weber LP (2011). Resveratrol preserves cardiac function, but does not prevent endothelial dysfunction or pulmonary inflammation after environmental tobacco smoke exposure. *Food Chem Toxicol* **49**(7): 1584-1591.
- Aliahmat NS, Noor MR, Yusof WJ, Makpol S, Ngah WZ, Yusof YA (2012). Antioxidant enzyme activity and malondialdehyde levels can be modulated by Piper betle, tocotrienol rich fraction and *Chlorella vulgaris* in aging C57BL/6 mice. *Clinics* **67**(12): 1447-1454.
- Alvarenga RFR, Wan BJ, Inui T, Franzblau SG, Pauli GF, Jaki BU (2014). Airborne Antituberculosis Activity of *Eucalyptus citriodora* Essential Oil. *J Nat Prod* **77**(3): 603-610.
- Anderson ME, Brown JH, Bers DM (2011). CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* **51**(4): 468-473.
- Anversa P, Vitali-Mazza L, Gandolfi A, Loud AV (1975). Morphometry and autoradiography of early hypertrophic changes in the ventricular myocardium of adult rat. A light microscopic study. *Lab Invest* **33**(2): 125-129.
- Anwar A, Schluter KD, Heger J, Piper HM, Euler G (2008). Enhanced SERCA2A expression improves contractile performance of ventricular cardiomyocytes of rat under adrenergic stimulation. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **457**(2): 485-491.

Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ (2012). Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **43**(1): 385-406.

Azevedo DF (1999). Iniciação a eletrocardiografia. *ArtMed*.

Bacharova L, Estes EH (2017). Left ventricular hypertrophy by the surface ECG. *Journal of electrocardiology* **50**(6): 906-908.

Baillard C, Mansier P, Ennezat PV, Mangin L, Medigue C, Swynghedauw B, *et al.* (2000). Converting enzyme inhibition normalizes QT interval in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **36**(3): 350-354.

Balakumar P, Jagadeesh G (2010). Multifarious molecular signaling cascades of cardiac hypertrophy: Can the muddy waters be cleared? *Pharmacol Res* **62**(5): 365-383.

Barry SP, Davidson SM, Townsend PA (2008). Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**(10): 2023-2039.

Bassani RA, Bassani JWM, Bers DM (1994). Relaxation in Ferret Ventricular Myocytes - Unusual Interplay among Calcium-Transport Systems. *J Physiol-London* **476**(2): 295-308.

Baylie RL, Cheng H, Langton PD, James AF (2010). Inhibition of the cardiac L-type calcium channel current by the TRPM8 agonist, (-)-menthol. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **61**(5): 543-550.

Bell JP, Mosfer SI, Lang D, Donaldson F, Lewis MJ (2001). Vitamin C and quinapril abrogate LVH and endothelial dysfunction in aortic-banded guinea pigs. *Am J Physiol-Heart C* **281**(4): H1704-H1710.

Benitah JP, Alvarez JL, Gomez AM (2010). L-type Ca^{+2} current in ventricular cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* **48**(1): 26-36.

Bermudez JA, Barragat P (1996). [Chiral Drugs: from the chemical dimension to political discussion]. *Cadernos de saude publica* **12**(1): 47-51.

Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Therapeut* **128**(1): 191-227.

Bernstein D, Fajardo G, Zhao M (2011). THE ROLE OF beta-ADRENERGIC RECEPTORS IN HEART FAILURE: DIFFERENTIAL REGULATION OF CARDIOTOXICITY AND CARDIOPROTECTION. *Progress in pediatric cardiology* **31**(1): 35-38.

Bers DM (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**(6868): 198-205.

Bers DM (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* **70**: 23-49.

Bhatia S, McGinty D, Letizia C, Api AM (2008). *Fragrance Material Review on isopulegol*. edn, vol. 46 Suppl 11.

Bhupathy P, Babu GJ, Periasamy M (2007). Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{+2} ATPase. *Journal of molecular and cellular cardiology* **42**(5): 903-911.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal* **5**(1): 9-19.

Bocalini D, dos Santos L, Antonio E, Santos A, Davel A, V Rossoni L, *et al.* (2012). *Myocardial remodeling after large infarcts in rat converts post rest-potential in force decay*. edn, vol. 98.

Bounihi A, Hajjaj G, Alnamer R, Cherrah Y, Zellou A (2013). In Vivo Potential Anti-Inflammatory Activity of Melissa officinalis L. Essential Oil. *Advances in pharmacological sciences* **2013**: 101759.

Bristow M (2003). Antiadrenergic therapy of chronic heart failure: surprises and new opportunities. *Circulation* **107**(8): 1100-1102.

Brum PC, Kosek J, Patterson A, Bernstein D, Kobilka B (2002). Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **283**(5): H1838-1845.

Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, *et al.* (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Embo J* **19**(23): 6341-6350.

Caldwell J (1995). Stereochemical Determinants of the Nature and Consequences of Drug-Metabolism. *J Chromatogr A* **694**(1): 39-48.

Cardoso Lima T, Mota MM, Barbosa-Filho JM, Viana Dos Santos MR, De Sousa DP (2012). Structural relationships and vasorelaxant activity of monoterpenes. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences* **20**(1): 23.

Carneiro MA, Quintao JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, da Cunha DNQ, *et al.* (2013). The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *Journal of molecular and cellular cardiology* **57**: 119-128.

Cens T, Rousset M, Leyris JP, Fesquet P, Charnet P (2006). Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca^{+2} channels. *Prog Biophys Mol Bio* **90**(1-3): 104-117.

Chattopadhyay A, Biswas S, Bandyopadhyay D, Sarkar C, Datta AG (2003). Effect of isoproterenol on lipid peroxidation and antioxidant enzymes of myocardial tissue of mice and protection by quinidine. *Molecular and cellular biochemistry* **245**(1-2): 43-49.

Chemla D, Coirault C, Hebert JL, Lecarpentier Y (2000). Mechanics of Relaxation of the Human Heart. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* **15**: 78-83.

Chen XW, Nakayama H, Zhang XY, Ai XJ, Harris DM, Tang MX, *et al.* (2011). Calcium influx through Cav1.2 is a proximal signal for pathological cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* **50**(3): 460-470.

Chien KR, Shimizu M, Hoshijima M, Minamisawa S, Grace AA (1997). Toward molecular strategies for heart disease--past, present, future. *Japanese circulation journal* **61**(2): 91-118.

Chuah GK, Liu SH, Jaenicke S, Harrison LJ (2001). Cyclisation of citronellal to isopulegol catalysed by hydrous zirconia and other solid acids. *J Catal* **200**(2): 352-359.

Costanzo LS (2018). *Fisiologia*. edn. Elsevier Editora Ltda.

Dai H, Chen L, Gao D, Fei A (2019). Phosphocreatine Attenuates Isoproterenol-Induced Cardiac Fibrosis and Cardiomyocyte Apoptosis. *Biomed Res Int* **2019**: 5408289.

Date M-o, Morita T, Yamashita N, Nishida K, Yamaguchi O, Higuchi Y, *et al.* (2002). The antioxidant N-2-mercaptopropionyl glycine attenuates left ventricular hypertrophy in in vivo murine pressure-overload model. *Journal of the American College of Cardiology* **39**(5): 907-912.

Davila-Roman VG, Vedala G, Herrero P, de las Fuentes L, Rogers JG, Kelly DP, *et al.* (2002). Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* **40**(2): 271-277.

de Andrade TU, Brasil GA, Endringer DC, da Nobrega FR, de Sousa DP (2017). Cardiovascular Activity of the Chemical Constituents of Essential Oils. *Molecules* **22**(9).

de Cerqueira SVS, Gondim ANS, Roman-Campos D, Cruz JS, Passos AGD, Lauton-Santos S, *et al.* (2011). R(+)-pulegone impairs Ca^{+2} homeostasis and causes negative inotropism in mammalian myocardium. *Eur J Pharmacol* **672**(1-3): 135-142.

de Menezes JER, Gondim ANS, Cruz JS, de Souza AA, dos Santos JNA, Conde-Garcia EA, *et al.* (2014). Geraniol Blocks Calcium and Potassium Channels in the Mammalian Myocardium: Useful Effects to Treat Arrhythmias. *Basic Clin Pharmacol* **115**(6): 534-544.

de Tombe PP (2003). Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. *Journal of biomechanics* **36**(5): 721-730.

Dieterich S, Bieligg U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J (2000). Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* **101**(1): 33-39.

Dritsas A, Sbarouni E, Gilligan D, Nihoyannopoulos P, Oakley CM (1992). QT-interval abnormalities in hypertrophic cardiomyopathy. *Clinical cardiology* **15**(10): 739-742.

Ebani VV, Najar B, Bertelloni F, Pistelli L, Mancianti F, Nardoni S (2018). Chemical Composition and In Vitro Antimicrobial Efficacy of Sixteen Essential Oils against *Escherichia coli* and *Aspergillus fumigatus* Isolated from Poultry. *Veterinary sciences* **5**(3).

Edris AE (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother Res* **21**(4): 308-323.

Eijsvogels TMH, Fernandez AB, Thompson PD (2016). Are There Deleterious Cardiac Effects of Acute and Chronic Endurance Exercise? *Physiological reviews* **96**(1): 99-125.

Eladwy RA, Mantawy EM, El-Bakly WM, Fares M, Ramadan LA, Azab SS (2018). Mechanistic insights to the cardioprotective effect of blueberry nutraceutical extract in isoprenaline-induced cardiac hypertrophy. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **51**: 84-93.

Endoh M (2004). *Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: Physiological and pathophysiological relevance*. edn, vol. 500.

Feng Y, Cheng J, Wei B, Wang Y (2017). CaMKII inhibition reduces isoproterenol-induced ischemia and arrhythmias in hypertrophic mice. *Oncotarget* **8**(11): 17504-17509.

Fernandes T, Barauna VG, Negrao CE, Phillips MI, Oliveira EM (2015). Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs. *Am J Physiol-Heart C* **309**(4): H543-H552.

Fu Q, Kim S, Soto D, De Arcangelis V, DiPilato L, Liu S, *et al.* (2014). A long lasting β 1 adrenergic receptor stimulation of cAMP/protein kinase A (PKA) signal in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* **289**(21): 14771-14781.

Fuster V, Hurst JW, Alexander RW, O'Rourke RA (2004). *Hurst's the Heart*. edn. McGraw-Hill, Medical Pub. Division.

Galinier M, Balanescu S, Fourcade J, Dorobantu M, Boveda S, Massabuau P, *et al.* (1997). Prognostic value of ventricular arrhythmias in systemic hypertension. *J Hypertens* **15**(12 Pt 2): 1779-1783.

Gavioli M, Lara A, Almeida PW, Lima AM, Damasceno DD, Rocha-Resende C, *et al.* (2014). Cholinergic signaling exerts protective effects in models of sympathetic hyperactivity-induced cardiac dysfunction. *Plos One* **9**(7): e100179.

Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, *et al.* (1990). A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* **62**(5): 999-1006.

Gergs U, Trapp T, Bushnaq H, Simm A, Silber R-E, Neumann J (2019). Age-Dependent Protein Expression of Serine/Threonine Phosphatases and Their Inhibitors in the Human Cardiac Atrium. *Advances in Medicine* **2019**: 9.

Ghule AE, Kulkarni CP, Bodhankar SL, Pandit VA (2009). Effect of Pretreatment With Coenzyme Q(10) on Isoproterenol-Induced Cardiotoxicity and Cardiac Hypertrophy in Rats. *Curr Ther Res Clin E* **70**(6): 460-471.

Gioda CR, Barreto TD, Primola-Gomes TN, de Lima DC, Campos PP, Capettini LDA, *et al.* (2010). Cardiac oxidative stress is involved in heart failure induced by thiamine deprivation in rats. *Am J Physiol-Heart C* **298**(6): H2039-H2045.

Gomes AV, Kazmierczak K, Cheah JX, Gilda JE, Yuan CC, Zhou Z, *et al.* (2015). Proteomic analysis of physiological versus pathological cardiac remodeling in animal

models expressing mutations in myosin essential light chains. *Journal of muscle research and cell motility* **36**(6): 447-461.

Gondim ANS, Lara A, Santos-Miranda A, Roman-Campos D, Lauton-Santos S, Menezes-Filho JER, *et al.* (2017). (-)-Terpinen-4-ol changes intracellular Ca^{+2} handling and induces pacing disturbance in rat hearts. *Eur J Pharmacol* **807**: 56-63.

Grimm M, Brown JH (2010). Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *Journal of molecular and cellular cardiology* **48**(2): 322-330.

Guimaraes AG, Oliveira GF, Melo MS, Cavalcanti SC, Antonioli AR, Bonjardim LR, *et al.* (2010). Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **107**(6): 949-957.

Guo SL, Han LN, Liu HW, Si QJ, Kong DF, Guo FS (2016). The future of remote ECG monitoring systems. *Journal of geriatric cardiology : JGC* **13**(6): 528-530.

Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature reviews. Genetics* **10**(1): 32-42.

Haghighi K, Gregory KN, Kranias EG (2004). Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase-phospholamban interactions and dilated cardiomyopathy. *Biochem Bioph Res Co* **322**(4): 1214-1222.

Hall JE, GUYTON AC (2011). *Guyton E Hall Tratado De Fisiologia Médica*. edn. Elsevier Editora Ltda.

Hancock EW, Deal BJ, Mirvis DM, Okin P, Kligfield P, Gettes LS, *et al.* (2009). AHA/ACCF/HRS recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram: part V: electrocardiogram changes associated with cardiac chamber hypertrophy: a scientific statement from the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; the American College of Cardiology Foundation; and the Heart Rhythm Society: endorsed by the International Society for Computerized Electrocardiology. *Circulation* **119**(10): e251-261.

Heineke J, Molkenin JD (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Bio* **7**(8): 589-600.

Higham PD, Furniss S, Campbell RWF (1995). *QTD and components of the QT interval in ischaemia and infarction*. edn, vol. 73.

Hille B (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. edn. Oxford University Press, Incorporated.

Hoferl M, Krist S, Buchbauer G (2006). Chirality influences the effects of linalool on physiological parameters of stress. *Planta medica* **72**(13): 1188-1192.

Hubbard JW, Ganes D, Lim HK, Midha KK (1986). Chiral pharmacology and its consequences for therapeutic monitoring. *Clinical biochemistry* **19**(2): 107-112.

Indio do Brasil CK, Avezum A, Jr., Uint L, Del Monaco MI, Barros VM, Campos SY, *et al.* (2013). Cardiovascular prevention in coronary heart disease patients: guidelines implementation in clinical practice. *Revista brasileira de cirurgia cardiovascular : orgao oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* **28**(2): 238-247.

Iribe G, Kohl P (2008). Axial stretch enhances sarcoplasmic reticulum Ca^{+2} leak and cellular Ca^{+2} reuptake in guinea pig ventricular myocytes: experiments and models. *Progress in biophysics and molecular biology* **97**(2-3): 298-311.

Javidanpour S, Dianat M, Badavi M, Mard SA (2018). The inhibitory effect of rosmarinic acid on overexpression of NCX1 and stretch- induced arrhythmias after acute myocardial infarction in rats. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **102**: 884-893.

Jiao QB, Bai YZ, Akaike T, Takeshima H, Ishikawa Y, Minamisawa S (2009). Sarcalumenin is essential for maintaining cardiac function during endurance exercise training. *Am J Physiol-Heart C* **297**(2): H576-H582.

Jiao QB, Takeshima H, Ishikawa Y, Minamisawa S (2012). Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity. *Cell Calcium* **51**(1): 31-39.

Jordan MC, Quednau BD, Roos KP, Ross RS, Philipson KD, Nicholas SB (2002). Cyclosporin A regulates sodium-calcium exchanger (NCX1) gene expression in vitro and cardiac hypertrophy in NCX1 transgenic mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* **976**: 259-267.

Kadambi VJ, Ponniah S, Harrer JM, Hoit BD, Dorn GW, 2nd, Walsh RA, *et al.* (1996). Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *The Journal of clinical investigation* **97**(2): 533-539.

Karaki H, Ozaki H, Hori M, MitsuiSaito M, Amano KI, Harada KI, *et al.* (1997). Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* **49**(2): 157-230.

Katz AM (1992). Heart-Failure in 2001 - a Prophecy. *Am J Cardiol* **70**(10): C126-C131.

Kaye DM, Lefkovits J, Jennings GL, Bergin P, Broughton A, Esler MD (1995). Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *Journal of the American College of Cardiology* **26**(5): 1257-1263.

Kmecova J, Klimas J (2010). Heart rate correction of the QT duration in rats. *Eur J Pharmacol* **641**(2-3): 187-192.

Knoche B, Blaschke G (1994). Investigations on the in-Vitro Racemization of Thalidomide by High-Performance Liquid-Chromatography. *J Chromatogr A* **666**(1-2): 235-240.

Koeck I, Burkhard FC, Monastyrskaya K (2016). Activation of common signaling pathways during remodeling of the heart and the bladder. *Biochemical pharmacology* **102**: 7-19.

Koeppen B (2011). *Berne e Levy Fisiologia*. edn. Elsevier Editora Ltda.

Kral'ova E, Mokran T, Murin J, Stankovicova T (2008). Electrocardiography in Two Models of Isoproterenol-Induced Left Ventricular Remodeling. *Physiol Res* **57**: S83-S89.

Kranias EG, Hajjar RJ (2012). Modulation of Cardiac Contractility by the Phospholamban/SERCA2a Regulatome. *Circulation research* **110**(12): 1646-1660.

Krenek P, Kmecova J, Kucerovala D, Bajuszova Z, Musil P, Gazova A, *et al.* (2009). Isoproterenol-induced heart failure in the rat is associated with nitric oxide-dependent functional alterations of cardiac function. *Eur J Heart Fail* **11**(2): 140-146.

Kumari P, Saifi MA, Khurana A, Godugu C (2018). Cardioprotective effects of nanoceria in a murine model of cardiac remodeling. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements* **50**: 198-208.

Kushawaha SK, Thakurdesai P, Mohan V, Bodhankar SL (2016). Effect of cyclodextrin garcinol complex on isoproterenol-induced cardiotoxicity and cardiac hypertrophy in rats. *Diabetes* **2**(2): 12.

Lazzeroni D, Rimoldi O, Camici PG (2016). From Left Ventricular Hypertrophy to Dysfunction and Failure. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **80**(3): 555-564.

Lee IM, Shiroma EJ, Lobelo F, Puska P, Blair SN, Katzmarzyk PT, *et al.* (2012). Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet* **380**(9838): 219-229.

Leicht M, Greipel N, Raßler B, Zimmer H-G (2002). Catecholamine-induced cardiac hypertrophy in rats is associated with the activation of p70 kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase 2. *Experimental and clinical cardiology* **7**(2-3): 131-137.

Li HL, Liu C, de Couto G, Ouzounian M, Sun M, Wang AB, *et al.* (2008). Curcumin prevents and reverses murine cardiac hypertrophy (Retracted article. See vol 119, pg 2113, 2009). *Journal of Clinical Investigation* **118**(3): 879-893.

Li HL, Liu C, de Couto G, Ouzounian M, Sun M, Wang AB, *et al.* (2009). Curcumin prevents and reverses murine cardiac hypertrophy (Retraction of vol 118, pg 879, 2008). *Journal of Clinical Investigation* **119**(7): 2113-2113.

Li SY, Golden KL, Jiang Y, Wang GJ, Privratsky JR, Zhang X, *et al.* (2005). Inhibition of sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{+2} -ATPase differentially regulates contractile function in cardiac myocytes from normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of Ca^{+2} regulatory proteins. *Cell biochemistry and biophysics* **42**(1): 1-12.

Liao JK (2004). Statin therapy for cardiac hypertrophy and heart failure. *Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research* **52**(4): 248.

Lin TC, Wang SH, Huang CC, Lai YC, Song TY, Tsai MS (2018). Anti-Fatigue, Antioxidation, and Anti-Inflammatory Effects of Eucalyptus Oil Aromatherapy in Swimming-Exercised Rats. *The Chinese journal of physiology* **61**(5): 257-265.

Lis-Balchin M, Hart S (1997). A preliminary study of the effect of essential oils on skeletal and smooth muscle in vitro. *Journal of ethnopharmacology* **58**(3): 183-187.

Liu R, Correll RN, Davis J, Vagnozzi RJ, York AJ, Sargent MA, *et al.* (2015). Cardiac-specific deletion of protein phosphatase 1beta promotes increased myofilament protein phosphorylation and contractile alterations. *Journal of molecular and cellular cardiology* **87**: 204-213.

Liu W, Zi M, Tsui H, Chowdhury SK, Zeef L, Meng QJ, *et al.* (2013). A Novel Immunomodulator, FTY-720 Reverses Existing Cardiac Hypertrophy and Fibrosis From Pressure Overload by Targeting NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) Signaling and Periostin. *Circ-Heart Fail* **6**(4): 833-844.

Lorenz K, Schmitt JP, Vidal M, Lohse MJ (2009). Cardiac hypertrophy: Targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling. *Int J Biochem Cell B* **41**(12): 2351-2355.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **193**(1): 265-275.

Lucini D, Pagani M (2011). Exercise: Should it matter to internal medicine? *Eur J Intern Med* **22**(4): 363-370.

Luethy E, Scheu H, Alsleben U, Rothlin M, Krayenbuehl HP, Kako K (1964). [Stroke Volume and Pressure Loads in Compensated and Decompensated Hearts]. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* **94**: 692-697.

Lymperopoulos A, Rengo G, Koch WJ (2013). Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circulation research* **113**(6): 739-753.

Ma XW, Fu YN, Xiao H, Song Y, Chen RF, Shen J, *et al.* (2015). Cardiac Fibrosis Alleviated by Exercise Training Is AMPK-Dependent. *Plos One* **10**(6).

Machida S, Kariya F, Kobayashi K, Narusawa M (2000). Lack of Effect of Running Training at Two Intensities on Cardiac Myosin Isozyme Composition in Rats. *The Japanese Journal of Physiology* **50**(6): 577-583.

MacLennan DH, Kranias EG (2003). Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**(7): 566-577.

Magyar J, Szentandrassy N, Banyasz T, Fulop L, Varro A, Nanasi PP (2004). Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* **487**(1-3): 29-36.

Maier LS, Bers DM (2002). Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *Journal of molecular and cellular cardiology* **34**(8): 919-939.

Maier LS, Bers DM (2007a). Role of Ca^{+2} /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovascular research* **73**(4): 631-640.

Maier LS, Bers DM (2007b). Role of Ca^{+2} /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation–contraction coupling in the heart. *Cardiovascular research* **73**(4): 631-640.

Maillet M, van Berlo JH, Molkentin JD (2013). Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**(1): 38-48.

Mansur PH, Cury LK, Destro-Filho JB, Resende ES, Destro JP, de Oliveira LM, *et al.* (2006). [Analysis of electrocardiographic recordings associated with acute myocardial infarction]. *Arquivos brasileiros de cardiologia* **87**(2): 106-114.

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, *et al.* (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* **101**(4): 365-376.

Mazzoleni A, Curtin ME, Wolff R, Reiner L, Somes G (1975). On the relationship between heart weights, fibrosis, and QRS duration. *Journal of electrocardiology* **8**(3): 233-236.

McGavin D (2011). *Bases da Patologia em Veterinária*. edn. Elsevier Health Sciences.

Medzhitov R (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**(7203): 428-435.

Mendis S, Davis S, Norrving B (2015). Organizational Update The World Health Organization Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2014; One More Landmark Step in the Combat Against Stroke and Vascular Disease. *Stroke* **46**(5): E121-E122.

Mesquita TRR, de Jesus ICG, Dos Santos JF, de Almeida GKM, de Vasconcelos CML, Guatimosim S, *et al.* (2017). Cardioprotective Action of Ginkgo biloba Extract against Sustained beta-Adrenergic Stimulation Occurs via Activation of M2/NO Pathway. *Frontiers in pharmacology* **8**: 220.

Metrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel JL, Heymes C, Morel E, *et al.* (2008). Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation research* **102**(8): 959-965.

Miguel MG, Gago C, Antunes MD, Lagoas S, Faleiro ML, Megias C, *et al.* (2018). Antibacterial, Antioxidant, and Antiproliferative Activities of Corymbia citriodora and the Essential Oils of Eight Eucalyptus Species. *Medicines* **5**(3).

Miteva K, Van Linthout S, Pappritz K, Muller I, Spillmann F, Haag M, *et al.* (2016). Human Endomyocardial Biopsy Specimen-Derived Stromal Cells Modulate Angiotensin II-Induced Cardiac Remodeling. *Stem Cell Transl Med* **5**(12): 1707-1718.

Moc C, Taylor AE, Chesini GP, Zambrano CM, Barlow MS, Zhang X, *et al.* (2015). Physiological activation of Akt by PHLPP1 deletion protects against pathological hypertrophy. *Cardiovascular research* **105**(2): 160-170.

Mohamed WAM, Abd-Elhakim YM, Farouk SM (2016). Protective effects of ethanolic extract of rosemary against lead-induced hepato-renal damage in rabbits. *Exp Toxicol Pathol* **68**(8): 451-461.

Molkentin JD (2004). Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular research* **63**(3): 467-475.

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, *et al.* (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**(2): 215-228.

Monsalvo-Villegas A, Osornio-Garduno DS, Avila G (2018a). Long-Term Regulation of Excitation-Contraction Coupling and Oxidative Stress in Cardiac Myocytes by Pirfenidone. *Front Physiol* **9**: 1801.

Monsalvo-Villegas A, Osornio-Garduño DS, Avila G (2018b). Long-Term Regulation of Excitation-Contraction Coupling and Oxidative Stress in Cardiac Myocytes by Pirfenidone. *Frontiers in physiology* **9**: 1801-1801.

Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, *et al.* (2005). cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation research* **97**(12): 1296-1304.

Morimoto S (2007). Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovascular Research* **77**(4): 659-666.

Morimoto S (2008). Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovascular research* **77**(4): 659-666.

Mudd JO, Kass DA (2008). Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* **451**(7181): 919-928.

Murray DR, Prabhu SD, Chandrasekar B (2000). Chronic beta-adrenergic stimulation induces myocardial proinflammatory cytokine expression. *Circulation* **101**(20): 2338-2341.

Mutlak M, Kehat I (2015). Extracellular signal-regulated kinases 1/2 as regulators of cardiac hypertrophy. *Frontiers in pharmacology* **6**.

Nation RL (1994). Chirality in New Drug Development. *Clinical Pharmacokinetics* **27**(4): 249-255.

Nelson DP, Kiesow LA (1972). Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical biochemistry* **49**(2): 474-478.

Nerbonne JM (2016). Molecular basis of functional myocardial potassium channel diversity. *Cardiac electrophysiology clinics* **8**(2): 257-273.

Nerbonne JM, Kass RS (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological reviews* **85**(4): 1205-1253.

Newman DJ, Cragg GM (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* **79**(3): 629-661.

Ni L, Zhou C, Duan Q, Lv J, Fu X, Xia Y, *et al.* (2011). beta-AR blockers suppresses ER stress in cardiac hypertrophy and heart failure. *Plos One* **6**(11): e27294.

Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**(6027): 440-443.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* **95**(2): 351-358.

Oikarinen L, Nieminen MS, Viitasalo M, Toivonen L, Jern S, Dahlöf Br, *et al.* (2004). QRS duration and QT interval predict mortality in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension Study. *Hypertension* **43**(5): 1029-1034.

Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S, *et al.* (2004). Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* **110**(6): 705-712.

Olesen SP, Clapham DE, Davies PF (1988). Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature* **331**(6152): 168-170.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**(7): 552-565.

Ostadal B, Ostadalova I, Dhalla NS (1999). Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physiological reviews* **79**(3): 635-659.

Paik SY, Koh KH, Beak SM, Paek SH, Kim JA (2005). The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species. *Biol Pharm Bull* **28**(5): 802-807.

Panda S, Kar A, Biswas S (2017). Preventive effect of Agnucastolide C against Isoproterenol-induced myocardial injury. *Scientific reports* **7**(1): 16146.

Peixoto-Neves D, Silva-Alves KS, Gomes MDM, Lima FC, Lahlou S, Magalhaes PJC, *et al.* (2010). Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fund Clin Pharmacol* **24**(3): 341-350.

Pereira L, Rehmann H, Lao DH, Erickson JR, Bossuyt J, Chen J, *et al.* (2015). Novel Epac fluorescent ligand reveals distinct Epac1 vs. Epac2 distribution and function in cardiomyocytes. *P Natl Acad Sci USA* **112**(13): 3991-3996.

Piazzesi G, Lombardi V (1995). A Cross-Bridge Model That Is Able to Explain Mechanical and Energetic Properties of Shortening Muscle. *Biophys J* **68**(5): 1966-1979.

Piek A, de Boer RA, Sillje HH (2016). The fibrosis-cell death axis in heart failure. *Heart failure reviews* **21**(2): 199-211.

Pillai VB, Samant S, Sundaresan NR, Raghuraman H, Kim G, Bonner MY, *et al.* (2015). Honokiol blocks and reverses cardiac hypertrophy in mice by activating mitochondrial Sirt3. *Nature communications* **6**: 6656.

Pohl U, Lamontagne D (1991). Impaired tissue perfusion after inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Basic research in cardiology* **86 Suppl 2**: 97-105.

Port JD, Bristow MR (2001). Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* **33**(5): 887-905.

Preedy VR (2016). *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. edn. Academic Press.

Quintans JSS, Shanmugam S, Heimfarth L, Araujo AAS, Almeida J, Picot L, *et al.* (2019). Monoterpenes modulating cytokines - A review. *Food Chem Toxicol* **123**: 233-257.

Rababa'h A, Singh S, Suryavanshi SV, Altarabsheh SE, Deo SV, McConnell BK (2014). Compartmentalization role of A-kinase anchoring proteins (AKAPs) in mediating protein kinase A (PKA) signaling and cardiomyocyte hypertrophy. *International journal of molecular sciences* **16**(1): 218-229.

Rabito MJ, Kaye AD (2013). Complementary and alternative medicine and cardiovascular disease: an evidence-based review. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* **2013**: 672097.

Rao BRR, Kaul PN, Syamasundar KV, Ramesh S (2003). Comparative composition of decanted and recovered essential oils of *Eucalyptus citriodora* Hook. *Flavour Frag J* **18**(2): 133-135.

Reiken S, Lacampagne A, Zhou H, Kherani A, Lehnart SE, Ward C, *et al.* (2003). PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *The Journal of cell biology* **160**(6): 919-928.

Ribeiro AL, Duncan BB, Brant LC, Lotufo PA, Mill JG, Barreto SM (2016). Cardiovascular Health in Brazil: Trends and Perspectives. *Circulation* **133**(4): 422-433.

Rocha R, Martins W Manual de prevenção cardiovascular. Rocha RM. *Epidemiologia das doenças cardiovasculares e fatores de risco*. São Paulo: Planmark: 10-15.

Rocha W, A.O. Melo M, S. Alves R, Brito R, Rabelo TK, da S. Prado L, *et al.* (2019). *p-Cymene attenuates cancer pain via inhibitory pathways and modulation of calcium currents*. edn.

Roden DM, Balser JR, George AL, Jr., Anderson ME (2002). Cardiac ion channels. *Annual review of physiology* **64**: 431-475.

Rodrigues AC, Natali AJ, Cunha D, Costa A, Moura AG, Araujo Carneiro-Junior M, *et al.* (2018). Moderate Continuous Aerobic Exercise Training Improves Cardiomyocyte Contractility in Beta1 Adrenergic Receptor Knockout Mice. *Arquivos brasileiros de cardiologia* **110**(3): 256-262.

Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Haeuseler C, Kilter H, Seeland U, *et al.* (2002). Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1). *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **283**(3): H1253-1262.

Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, *et al.* (2017). Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *Journal of the American College of Cardiology* **70**(1): 1-25.

Roullet JB, Luft UC, Xue H, Chapman J, Bychkov R, Roullet CM, *et al.* (1997). Farnesol inhibits L-type Ca^{+2} channels in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* **272**(51): 32240-32246.

Russell B, Motlagh D, Ashley WW (2000). Form follows function: how muscle shape is regulated by work. *J Appl Physiol* **88**(3): 1127-1132.

Ryu Y, Jin L, Kee HJ, Piao ZH, Cho JY, Kim GR, *et al.* (2016). Gallic acid prevents isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and fibrosis through regulation of JNK2 signaling and Smad3 binding activity. *Scientific reports* **6**: 34790.

Samak M, Fatullayev J, Sabashnikov A, Zeriuoh M, Schmack B, Farag M, *et al.* (2016). Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. *Med Sci Monit Basic* **22**: 75-79.

Santos MRV, Moreira FV, Fraga BP, De Sousa DP, Bonjardim LR, Quintans LJ (2011). Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. *Rev Bras Farmacogn* **21**(4): 764-771.

Santulli G, Iaccarino G (2016). Adrenergic signaling in heart failure and cardiovascular aging. *Maturitas* **93**: 65-72.

Schaub MC, Hefti MA, Zuellig RA, Morano I (1998). Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms. *Cardiovascular research* **37**(2): 381-404.

Schillinger W, Fiolet JW, Schlotthauer K, Hasenfuss G (2003). Relevance of Na^{+} - Ca^{+2} exchange in heart failure. *Cardiovascular research* **57**(4): 921-933.

Shimura M, Minamisawa S, Takeshima H, Jiao Q, Bai Y, Umemura S, *et al.* (2008). Sarcalumenin alleviates stress-induced cardiac dysfunction by improving Ca^{+2} handling of the sarcoplasmic reticulum. *Cardiovascular research* **77**(2): 362-370.

Shioya T (2007). A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. *The journal of physiological sciences : JPS* **57**(6): 327-335.

Silva EAP, Carvalho JS, Guimaraes AG, Barreto RDS, Santos MRV, Barreto AS, *et al.* (2019). The use of terpenes and derivatives as a new perspective for cardiovascular disease treatment: a patent review (2008-2018). *Expert Opin Ther Pat* **29**(1): 43-53.

Silva J, Abebe W, Sousa SM, Duarte VG, Machado MIL, Matos ETA (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *Journal of ethnopharmacology* **89**(2-3): 277-283.

Silva LL, Balconi LS, Gressler LT, Garlet QI, Sutili FJ, Vargas APC, *et al.* (2017). S-(+)- and R-(-)-linalool: a comparison of the in vitro anti-Aeromonas hydrophila activity and anesthetic properties in fish. *An Acad Bras Cienc* **89**(1): 203-212.

Silva MI, de Aquino Neto MR, Teixeira Neto PF, Moura BA, do Amaral JF, de Sousa DP, *et al.* (2007). Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **88**(2): 141-147.

Silva MI, Moura BA, Neto MR, Tome Ada R, Rocha NF, de Carvalho AM, *et al.* (2009a). Gastroprotective activity of isopulegol on experimentally induced gastric lesions in mice: investigation of possible mechanisms of action. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **380**(3): 233-245.

Silva MI, Silva MA, de Aquino Neto MR, Moura BA, de Sousa HL, de Lavor EP, *et al.* (2009b). Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. *Fitoterapia* **80**(8): 506-513.

Singh BK, Pillai KK, Kohli K, Haque SE (2011). Isoproterenol-induced cardiomyopathy in rats: influence of Acorus calamus Linn.: A. calamus attenuates cardiomyopathy. *Cardiovascular toxicology* **11**(3): 263-271.

Sipido KR, Volders PG, Vos MA, Verdonck F (2002). Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? *Cardiovascular research* **53**(4): 782-805.

Soares MC, Damiani CE, Moreira CM, Stefanon I, Vassallo DV (2005). Eucalyptol, an essential oil, reduces contractile activity in rat cardiac muscle. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* **38**(3): 453-461.

Solomons TWG, Fryhle CB, Snyder SA (2014). *Organic chemistry*. edn.

Stenger RJ, Spiro D (1961). The Ultrastructure of Mammalian Cardiac Muscle. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* **9**(2): 325-351.

Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Bohm M, Hasenfuss G, *et al.* (1994). Gene expression of the cardiac Na(+)-Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure. *Circulation research* **75**(3): 443-453.

Tanoue MT, Kjeldsen SE, Devereux RB, Okin PM (2016). Relationship of diastolic function to new or persistent electrocardiographic left ventricular hypertrophy. *Blood pressure* **25**(6): 364-372.

Tanriverdi LH, Parlakpinar H, Ozhan O, Ermis N, Polat A, Vardi N, *et al.* (2017). Inhibition of NADPH oxidase by apocynin promotes myocardial antioxidant response and prevents isoproterenol-induced myocardial oxidative stress in rats. *Free radical research* **51**(9-10): 772-786.

Tham YK, Bernardo BC, Ooi JYY, Weeks KL, McMullen JR (2015). Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol* **89**(9): 1401-1438.

Thomsen R, Christensen MH (2006). MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem* **49**(11): 3315-3321.

Tomaselli GF, Marban E (1999). Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovascular research* **42**(2): 270-283.

van Bilsen M, van Nieuwenhoven FA, van der Vusse GJ (2009). Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental? *Cardiovascular research* **81**(3): 420-428.

van der Vusse GJ, Glatz JF, Stam HC, Reneman RS (1992). Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiological reviews* **72**(4): 881-940.

Vasconcelos CML, Oliveira ISN, Santos JNA, Souza AA, Menezes-Filho JER, Silva Neto JA, *et al.* (2018). Negative inotropism of terpenes on guinea pig left atrium: structure-activity relationships. *Natural product research* **32**(12): 1428-1431.

Vinson JA, Dabbagh YA, Serry MM, Jang JH (1995). Plant Flavonoids, Especially Tea Flavonols, Are Powerful Antioxidants Using an in-Vitro Oxidation Model for Heart-Disease. *J Agr Food Chem* **43**(11): 2800-2802.

Wang Y, Wang Q, Yu W, Du H (2018). Crocin Attenuates Oxidative Stress and Myocardial Infarction Injury in Rats. *International heart journal* **59**(2): 387-393.

Wickenden AD, Lee P, Sah R, Huang Q, Fishman GI, Backx PH (1999). Targeted expression of a dominant-negative Kv4. 2 K⁺ channel subunit in the mouse heart. *Circulation research* **85**(11): 1067-1076.

Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen O (2002). Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca⁺² sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovascular research* **54**(1): 162-174.

Writing Group M, Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, *et al.* (2016). Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **133**(4): e38-360.

Wu X, Li MJ, Chen SQ, Li S, Guo FR (2018). Pin1 facilitates isoproterenol-induced cardiac fibrosis and collagen deposition by promoting oxidative stress and activating the MEK1/2-ERK1/2 signal transduction pathway in rats. *Int J Mol Med* **41**(3): 1573-1583.

Wu Y, MacMillan LB, McNeill RB, Colbran RJ, Anderson ME (1999). CaM kinase augments cardiac L-type Ca^{+2} current: a cellular mechanism for long Q-T arrhythmias. *The American journal of physiology* **276**(6): H2168-2178.

Zago GT, Andreão RV, Rodrigues SL, Mill JG, Sarcinelli Filho M (2015). ECG-based detection of left ventricle hypertrophy. *Research on Biomedical Engineering* **31**(2): 125-132.

Zierhut W, Zimmer HG (1989). Triiodothyronine-induced changes in function, metabolism and weight of the rat heart: effects of alpha- and beta-adrenergic blockade. *Basic research in cardiology* **84**(4): 359-370.

Zwadlo C, Borlak J (2005). Disease-associated changes in the expression of ion channels, ion receptors, ion exchangers and Ca^{+2} -handling proteins in heart hypertrophy. *Toxicol Appl Pharm* **207**(3): 244-256.

ANEXO 01

ANEXO 02

Resumo Gráfico:

