



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**JOSÉ EVALDO RODRIGUES DE MENEZES FILHO**

**O GERANIOL REDUZ A CONTRATILIDADE E BLOQUEIA  
CANALIS IÔNICOS NO CORAÇÃO DE MAMÍFERO**

**ARACAJU**

**2014**

**JOSÉ EVALDO RODRIGUES DE MENEZES FILHO**

**O GERANIOL REDUZ A CONTRATILIDADE E BLOQUEIA  
CANALIS IÔNICOS NO CORAÇÃO DE MAMÍFERO**

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

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Maria Lins de Vasconcelos

**ARACAJU**

**2014**

**JOSÉ EVALDO RODRIGUES DE MENEZES FILHO**

**O GERANIOL REDUZ A CONTRATILIDADE E BLOQUEIA  
CANAIS IÔNICOS NO CORAÇÃO DE MAMÍFERO**

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

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

1º Examinador: Profa. Dra. Adriana Karla de Lima

---

2º Examinador: Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior

---

Orientadora: Profa. Dra. Carla Maria Lins de Vasconcelos

**PARECER**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

M543g Menezes Filho, José Evaldo Rodrigues de  
O geraniol reduz a contratilidade e bloqueia canais iônicos no coração de mamífero / José Evaldo Rodrigues de Menezes Filho, orientadora, Carla Maria Lins de Vasconcelos. -- Aracaju, 2014. 64 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Núcleo de pós-Graduação em Medicina, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2014.

1. Geraniol. 2. Monoterpenos. 3. Canais iônicos. 4. Coração - Doenças. 5. Arritmia. 6. Farmacologia. 7. Cardiologia. I. Vasconcelos, Carla Maria Lins de, orient., II. Título.

CDU 615:612.17

**Menezes-Filho, J.E.R . O geraniol reduz a contratilidade e bloqueia canais iônicos no coração de mamífero. 2014.**

“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

A Deus,  
O autor da minha vida  
**DEDICO**

Aos meus pais Ivonete e Evaldo,  
Aos meus irmãos LÍlian e Osvaldo,  
Amores da minha vida  
**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Um trabalho de investigação nunca é um trabalho solitário, mas sim a confluência do esforço e dedicação de muitos. Por isso, gostaria de agradecer:

A **Deus**, por me guiar e me proteger a cada dia.

Aos **meus familiares**, pelo constante apoio e incentivo ao longo dessa trajetória.

A minha Orientadora, Profa. Dra. **Carla Maria Lins de Vasconcelos**, com carinho, aceitou a tarefa de me orientar num momento em que poucos acreditavam que esta dissertação viesse a ser concluída. Com ela aprendi muito mais do que eletrofisiologia e a fazer ciência, aprendi que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma dissertação, mas vidas humanas. Ensinou-me que existe leveza e amizade em orientação. Sempre disponível e disposta a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver algum tipo de conhecimento. É minha referência profissional e pessoal, minha “construtora”. Tenho uma admiração sem tamanho.

Ao “meu avó” científico Prof. Dr. **Eduardo Antônio Conde Garcia**, no qual me espelho e me inspiro, nunca parou de me surpreender e suscitar admiração (sabe ser múltiplo em tudo que faz).

A Profa. Dra. **Sandra Lauton Santos** e toda sua família, pelo acolhimento em Belo Horizonte e incentivo.

A Profa. Dra. **Evaleide Oliveira Diniz**, pela convivência, palavras de conforto, atenção, sugestões durante todo o estudo e boas risadas, tornando o trabalho mais leve.

Aos Professores Dr. **Antônio Nei Santana Gondim** e Dr. **Jader Santos Cruz** do Laboratório de Membranas Excitáveis e Biologia Cardiovascular (LAMEx) da Universidade Federal de Minas Gerais, pela recepção, convívio, distrações no LAMEx e por possibilitarem a realização de parte desse trabalho.

Ao Prof. Dr. **Damião Pergentino de Sousa**, pelo fornecimento do geraniol e pelos ensinamentos acadêmicos prestados.

Aos companheiros e amigos do LBC, pela amizade, carinho, descontrações, constante colaboração e evolução conjunta, tornando cada experimento finalizado uma vitória: **Américo**

e **Nilson** (parceria fraterna e energia é indescritível), **Michel e Thássio** (convivência, construção, brigas e amizade, BH ficaria muito ruim sem vocês), **Ingrid** (carente, te adoro), **Coutinho** (o top dos tops), **Gracinha** (a mais “inha” que conheço), **Raquel** (Docinho), **Lucas’s, Valérias’s Péligris, Nalim, Valeska, Yasmim, Maraísa e Júlio Neto** (Pela amizade e coleguismo de sempre). Obrigado a todos vocês com muito carinho, sempre me fortalecendo a cada obstáculo.

A amiga **Jucy**, por toda a atenção, palavras de conforto e principalmente pela amizade que construímos durante esse período. Tenho um apreço imenso. Um parágrafo é seu.

Aos amigos, cuja pureza de coração e nobreza de caráter sempre me foram revigorantes: **Amigos de Tobias, Globais (May, Marcelinha, Makson e Nil), Amigos do Mestrado em Biotecnologia, Amigos da Farmácia e Mônica Melo.**

Aos amigos de curso **Mestrado em Ciências da Saúde 2012/1**, pela simples amizade de todos os dias, pela cumplicidade e pelo apoio.

A **Denise e Isabela**, do NPGME pela ajuda nos momentos de desespero. Vocês são as melhores.

Ao funcionário **José Osvaldo** pelo suporte técnico realizado no Biotério, pela atenção dispensada e pela amizade que nasceu desse convívio.

A todos **animais** que nos auxiliam, doando a própria existência, no entendimento da vida, cabendo a nós humanos utilizar este entendimento em prol de todos os seres vivos (todo meu respeito e amor).

A **Capes** pelo auxílio financeiro.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a **mim** mesmo por não ter desistido e ter força de recomeçar. A minha resiliência não foi apenas um trabalho, mas um exercício da fé na vida, em DEUS e na ciência. Nunca deixei o sol morrer, sem que tenham morrido meus rancores.

**José Evaldo Rodrigues de Menezes Filho**

## RESUMO

MENEZES-FILHO, José Evaldo Rodrigues. **O GERANIOL REDUZ A CONTRATILIDADE E BLOQUEIA CANAIS IÔNICOS NO CORAÇÃO DE MAMÍFERO**. Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2014.

O geraniol ( $C_{10}H_{18}O$ ) é um monoterpeno alcoólico acíclico, presente no óleo essencial de algumas plantas medicinais, frutas cítricas e ervas aromáticas, principalmente espécies do gênero *Cymbopogon*. São descritas propriedades bioquímicas e farmacológicas, tais como ação anticonvulsivante, analgésica, anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena e antimicrobiana. Neste trabalho buscou-se caracterizar os efeitos produzidos pelo geraniol sobre a contratilidade, atividade elétrica e seu possível potencial antiarrítmico em coração de mamífero. Para tanto, foram utilizados cobaia (*Cavia porcellus*) e camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57Bl/6J. Os estudos contráteis foram realizados em átrio esquerdo estirado a 1gf e estimulados com pulsos de corrente supralimiares, mantido em cuba para órgão isolado, submerso em solução de Tyrode modificada (8 mL) e aerado com mistura carbogênica (95 %  $O_2$  e 5 %  $CO_2$ ). A força de contração atrial foi captada por um transdutor isométrico. Os registros eletrocardiográficos foram realizados em coração isolado, sob perfusão aórtica de fluxo constante (8 mL/min), em sistema de Langendorff. Para estudar os efeitos do geraniol sobre as correntes de membrana, foram executados experimentos através da técnica de “patch-clamp”, na configuração “whole-cell”, em cardiomiócitos ventriculares de camundongo. No átrio, o geraniol reduziu a força de contração ( $\sim 98\%$ ,  $EC_{50} = 1510 \pm 160 \mu M$ ) enquanto que a nifedipina, usada como controle positivo, apresentou uma  $EC_{50}$  de  $0,90 \pm 0,66 \mu M$ . O geraniol, na concentração de 3 mM, diminuiu o inotropismo positivo de ambos  $CaCl_2$  e BAY K8644. Em cardiomiócito ventricular, a  $I_{Ca,L}$  foi reduzida em 50,7% ( $n = 5$ ,  $p < 0,0001$ ), após a perfusão com 300  $\mu M$  de geraniol. Além disso, o geraniol prolongou a duração do potencial de ação (DPA), medida a 50 % da repolarização (49,7%,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ), sem alterar o potencial de repouso. O aumento da DPA pode ser atribuído ao bloqueio dos canais para  $K^+$  “transient-outward” ( $I_{to}$ ) (59,7 %,  $n = 4$ ,  $p < 0,001$ ), canal de  $K^+$  não-inativado ( $I_{ss}$ ) (39,2 %,  $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ) e do canal para  $K^+$  “inward rectifier” ( $I_{K1}$ ) (33,7% ,  $n = 4$ ,  $p < 0,0001$ ). Em coração isolado ( $n = 6$ ), o geraniol aumentou o PRi e QT<sub>i</sub> sem afetar a duração do complexo QRS, reduzindo a pressão ventricular esquerda (83%) e a frequência cardíaca (16,5%). Além disso, o geraniol retardou o tempo para o início das arritmias induzidas por ouabaína em 128%, evitando em 30% o aumento da tensão diastólica sem, contudo, afetar o efeito inotrópico positivo da ouabaína ( $n = 6$ ). O geraniol exerce respostas inotrópicas e cronotrópicas negativas no coração de mamífero, por meio da diminuição das correntes para  $Ca^{2+}$  tipo-L e, prolonga a duração do potencial de ação ventricular por reduzir as correntes para  $K^+$  dependentes de voltagem. Tais efeitos podem ser responsáveis pelo efeito antiarrítmico do geraniol frente às arritmias induzidas por ouabaína “in vitro”.

**PALAVRAS-CHAVE:** Geraniol, monoterpenos, canais iônicos, contratilidade miocárdica, arritmias cardíacas.

## ABSTRACT

MENEZES-FILHO, José Evaldo Rodrigues. **GERANIOL REDUCES THE CONTRACTILITY AND BLOCKS ION CHANNELS IN MAMMALIAN HEART.** Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2014.

The geraniol ( $C_{10}H_{18}O$ ) is an acyclic monoterpene alcohol, present in the essential oil of some medicinal plants, herbs and citrus fruits, especially species of the genus *Cymbopogon*. Were described biochemical and pharmacological properties such as anticonvulsant action, analgesic, antiinflammatory, antioxidant, anticancer and antimicrobial activities. In this study we sought to characterize the effects produced by geraniol on contractility, electrical activity and its possible antiarrhythmic potential in mammalian heart. For this, we used guinea-pig (*Cavia porcellus*) and mice (*Mus musculus*) of C57Bl/6J strain. The contractile studies were performed in the left atria drawn 1GF and stimulated with pulses of suprathreshold current, maintained in Cuba for isolated organ submerged in modified Tyrode solution (8 mL) and aerated with carbogenic mixture (95%  $O_2$  and 5%  $CO_2$ ). The force of atrial contraction was recorded by an isometric transducer. Electrocardiographic recordings were performed on isolated heart under constant aortic perfusion flow (8 mL/min) in a Langendorff system. To study the effects of geraniol on current membrane, experiments were performed using the technique of patch-clamp in rat ventricular cardiomyocytes setup whole-cell. In the atrium, geraniol reduced the force of contraction ( $\sim 98\%$ ,  $EC_{50} = 1510 \pm 160 \mu M$ ) whereas nifedipine, used as positive control, showed a  $EC_{50}$  of  $0.90 \pm 0.66 \mu M$ . Geraniol, at 3 mM, decreased the positive inotropism of both  $CaCl_2$  and BAY K8644. In ventricular cardiomyocytes, the  $I_{Ca,L}$  was reduced by 50.7% ( $n = 5$ ,  $p < 0.0001$ ) after perfusion with 300  $\mu M$  of geraniol. Furthermore, geraniol prolonged the action potential duration (APD) measured at 50% of repolarization (49.7%,  $n = 5$ ,  $p < 0.05$ ), without changing the resting potential. The increase in APD can be attributed to blockade of  $K^+$  channel transient outward ( $I_{to}$ ) (59.7%,  $n = 4$ ,  $p < 0.001$ ), the  $K^+$  current non-inactivated ( $I_{ss}$ ) (39.2 %,  $n = 4$ ,  $p < 0.05$ ) and  $K^+$  current to inward rectifier ( $I_{K1}$ ) (33.7%,  $n = 4$ ,  $p < 0.0001$ ). In isolated heart, geraniol increased PRi and QT<sub>i</sub> without affecting the QRS ( $n = 6$ ) complex, and reduced both left ventricular pressure (83%) and heart rate (16.5%). Furthermore, geraniol delayed time for the start of ouabain-induced arrhythmias in 128%, preventing in 30% the increase of diastolic tension, however, without affect the positive inotropic effect induced by ouabain ( $n = 6$ ). Geraniol exerts negative inotropic and chronotropic responses in the mammalian heart by decreasing the L-type  $Ca^{2+}$  current and prolongs the duration of ventricular action potential by reducing potassium currents voltage-dependent. Such effects may be responsible for the antiarrhythmic effect of geraniol front the arrhythmias induced by ouabain in vitro.

**Keywords:** Geraniol, monoterpenes, ion channels, myocardial contraction, cardiac arrhythmias.

## LISTA DE FIGURAS

### **O geraniol reduz a contratilidade e bloqueia canais iônicos no coração de mamífero**

|                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Micrografia eletrônica, em corte longitudinal, mostrando o sarcômero limitado por duas linhas Z.....                                                                                                                                        | 3  |
| <b>Figura 2.</b> 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).....                                 | 7  |
| <b>Figura 3.</b> Mecanismos celulares da contração muscular mostrando que o fenômeno da liberação de $\text{Ca}^{2+}$ induzido por $\text{Ca}^{2+}$ (CICR) envolve canais de cálcio tipo-L sarcolemas e receptores de rianodina (RyR) da membrana do RS..... | 9  |
| <b>Figura 4.</b> Representação esquemática da organização ultra-estrutural do miócito ventricular e atrial.....                                                                                                                                              | 11 |
| <b>Figura 3.</b> Acoplamento excitação-contração (AEC) do miócito atrial.....                                                                                                                                                                                | 11 |
| <b>Figura 4.</b> Potencial de ação cardíaco típico e suas correntes nas principais fases responsáveis pelo potencial de ação de coração canino.....                                                                                                          | 13 |
| <b>Figura 7.</b> Estrutura molecular plana do isopreno.....                                                                                                                                                                                                  | 20 |
| <b>Figura 8.</b> Estrutura química dos monoterpenos.....                                                                                                                                                                                                     | 21 |
| <b>Figura 9.</b> Estrutura molecular plana do geraniol.....                                                                                                                                                                                                  | 19 |
| <b>Figura 10.</b> Esquema da montagem experimental usada para determinar a força de contração atrial.....                                                                                                                                                    | 27 |
| <b>Figura 11.</b> Protocolo de pulso executado para avaliar o efeito do geraniol sobre o curso-temporal da corrente de cálcio tipo ( $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ ).....                                                                                         | 28 |
| <b>Figura 12.</b> Protocolo de pulso executado para avaliar o efeito do geraniol sobre o a relação corrente-voltagem da corrente de cálcio tipo-L ( $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ ).....                                                                          | 29 |
| <b>Figura 13.</b> Protocolo de pulso executado para avaliar o efeito do geraniol sobre o curso-temporal da corrente de potássio ( $\text{I}_{\text{to}}$ ). .....                                                                                            | 30 |
| <b>Figura 14.</b> Protocolo de pulso executado para avaliar o efeito do geraniol sobre o a relação corrente-voltagem das correntes de potássio ( $\text{I}_{\text{to}}$ e $\text{I}_{\text{ss}}$ ).....                                                      | 31 |
| <b>Figura 15.</b> Protocolo de pulso executado para avaliar o efeito do geraniol sobre o curso-temporal da corrente de potássio ( $\text{I}_{\text{K1}}$ ).....                                                                                              | 31 |
| <b>Figura 16.</b> Protocolo de pulso executado para avaliar o efeito do geraniol sobre o a relação corrente-voltagem da corrente de potássio ( $\text{I}_{\text{K1}}$ ).....                                                                                 | 31 |

|                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 17.</b> Protocolo de executado para avaliar o efeito do geraniol sobre a modulação do potencial de ação de cardiomiócitos.....                                                                                                       | 32 |
| <b>Figura 18.</b> Representação esquemática do sistema de perfusão aórtica de fluxo constante do tipo Langendorff.....                                                                                                                         | 34 |
| <b>Figura 19.</b> Diagrama do protocolo experimental que será usado para avaliar o possível efeito antiarrítmico do geraniol.....                                                                                                              | 35 |
| <b>Figura 20.</b> Efeito do geraniol sobre a força contrátil do átrio esquerdo de cobaia.....                                                                                                                                                  | 36 |
| <b>Figura 21.</b> Efeitos do geraniol sobre a curva concentração-resposta do $\text{CaCl}_2$ e do BAY K8644.....                                                                                                                               | 36 |
| <b>Figura 22.</b> Efeito do geraniol sobre as correntes de cálcio tipo-L ( $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ ) em cardiomiócitos ventriculares.....                                                                                                     | 39 |
| <b>Figura 23.</b> Modulação da configuração do potencial de ação (PA) e potencial de repouso da membrana pelo geraniol em cardiomiócitos ventriculares.....                                                                                    | 40 |
| <b>Figura 24.</b> Efeito de 300 $\mu\text{M}$ de geraniol na corrente de saída de $\text{K}^+$ ( $\text{I}_{\text{to}}$ ) em cardiomiócitos ventriculares.....                                                                                 | 42 |
| <b>Figura 25.</b> Efeito do geraniol sobre a corrente de $\text{K}^+$ “inward rectifier current” ( $\text{I}_{\text{K1}}$ ) em cardiomiócito ventricular.....                                                                                  | 43 |
| <b>Figura 26.</b> Efeito do geraniol sobre parâmetros do ECG e pressão ventricular esquerda (PVE).....                                                                                                                                         | 45 |
| <b>Figura 27.</b> Traçados experimentais da contratilidade do átrio esquerdo de cobaia mostrando os efeitos inotrópico e arritmogênico de 1 $\mu\text{M}$ de ouabaína sob condição controle e após a pré-incubação com 1,5 mM de geraniol..... | 46 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|                  |                                                                             |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| $[Ca^{2+}]_i$ –  | Concentração intracelular de cálcio livre                                   |
| AEC –            | Acoplamento excitação-contração                                             |
| ATP –            | Trifosfato de adenosina                                                     |
| BAV –            | Bloqueio atrioventricular                                                   |
| bpm –            | Batimentos por minuto                                                       |
| $Cav$ –          | Canal para cálcio dependente de voltagem                                    |
| $CE_{50}$ –      | Concentração que produz 50% do seu efeito máximo                            |
| CICR –           | Calcium-induced calcium release”<br>Liberação de cálcio induzida por cálcio |
| CAM –            | Calmodulina                                                                 |
| CAMKII –         | Proteína cinase dependente de $Ca^{2+}$ /calmodulina                        |
| DHPRs –          | Canais da diidropiridinas                                                   |
| $E_{max}$ –      | Efeito máximo                                                               |
| $G/G_{max}$ –    | Condutância a uma dada voltagem/Condutância máxima                          |
| $I_{Ca,L}$ –     | Corrente de cálcio tipo-L                                                   |
| $I_{K,ACh}$ –    | Corrente de potássio sensível á acetilcolina                                |
| $I_{ss}$ –       | Corrente de potássio não inativada                                          |
| $I_{k1}$ –       | Corrente para potássio com retificação de entrada                           |
| $I_{kr}$ –       | Corrente para potássio com retificação retardada                            |
| $I_{to, fast}$ – | Corrente rápida para potássio transiente de saída                           |
| $I_{to, slow}$ – | Corrente lenta para potássio transiente de saída                            |
| jRS –            | Retículo sarcoplasmático juncional                                          |
| $Kv$ –           | Canal de potássio dependente de voltagem                                    |
| $Nav$ –          | Canal para sódio dependente de voltagem                                     |
| NAV –            | Nodo atrioventricular                                                       |
| NCX –            | Trocador $Na^+/Ca^{2+}$                                                     |
| NS –             | Nodo sinoatrial                                                             |
| nJRS –           | Retículo sarcoplasmático não juncional                                      |
| PA –             | Potencial de ação                                                           |
| PVE –            | Pressão ventricular esquerda                                                |

|                   |                                   |
|-------------------|-----------------------------------|
| PBL –             | Fosfolambam                       |
| PRi –             | Intervalo PR do eletrocardiograma |
| P, QRS, T –       | Ondas do Eletrocardiograma        |
| QT <sub>i</sub> – | Intervalo QT do eletrocardiograma |
| QRS –             | Complexo QRS do eletrocardiograma |
| RS –              | Retículo Sarcoplasmático          |
| RyR –             | Receptor da Rianodina             |
| Tn-C –            | Troponina C cardíaca              |
| Tn-I –            | Troponina I cardíaca              |
| Tn-T –            | Troponina T Cardíaca              |
| TEA –             | Tetraetilamônio                   |
| VOCs –            | Canais operados por voltagem      |

## SUMÁRIO

|                                                                                               |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>RESUMO .....</b>                                                                           | <b>x</b>    |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                         | <b>xi</b>   |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                                                                 | <b>xiii</b> |
| <b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....</b>                                                   | <b>xiv</b>  |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                      | <b>1</b>    |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                                                          | <b>3</b>    |
| 2.1 Estrutura do cardiomiócito .....                                                          | 3           |
| 2.2 Fisiologia do coração .....                                                               | 4           |
| 2.3 Contratilidade cardíaca.....                                                              | 5           |
| 2.4 Acoplamento excitação-contração do coração .....                                          | 8           |
| 2.3 Relaxamento da célula cardíaca.....                                                       | 12          |
| 2.5 Potencial de ação rápido ou completo.....                                                 | 13          |
| 2.5 Canais iônicos.....                                                                       | 14          |
| 2.5.1 Canais para sódio.....                                                                  | 15          |
| 2.5.2 Canais para cálcio .....                                                                | 16          |
| 2.5.3 Canais para potássio .....                                                              | 17          |
| 2.5.3.1 Corrente de potássio transiente de saída ( $I_{TO}$ ).....                            | 17          |
| 2.5.3.1 Corrente de potássio retificadora de entrada .....                                    | 18          |
| 2.5.3.1 Correntes retificadoras retardadas .....                                              | 18          |
| 2.6 Arritmias cardíacas .....                                                                 | 19          |
| 2.7 Óleos essenciais e constituintes .....                                                    | 20          |
| <b>3 OBJETIVOS .....</b>                                                                      | <b>25</b>   |
| 3.1 Objetivo geral .....                                                                      | 25          |
| 3.2 Objetivos específicos .....                                                               | 25          |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                             | <b>26</b>   |
| 4.1 Drogas .....                                                                              | 26          |
| 4.2 Animais .....                                                                             | 26          |
| 4.3 Protocolos experimentais .....                                                            | 27          |
| 4.3.1 Efeitos do geraniol sobre a contratilidade do átrio esquerdo de cobaia .....            | 27          |
| 4.3.2 Efeitos do geraniol no influxo de $Ca^{2+}$ em átrio esquerdo de cobaia .....           | 28          |
| 4.3.3 Avaliação do efeito do geraniol sobre as correntes de cálcio tipo-L ( $I_{Ca,L}$ )..... | 28          |
| 4.3.3.1 Avaliação do efeito do geraniol sobre o curso-temporal da $I_{Ca,L}$ .....            | 29          |

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3.3.2 Avaliação do efeito do geraniol sobre a relação corrente-voltagem da $I_{Ca,L}$ .....            | 30        |
| 4.3.4 Avaliação do efeito do geraniol sobre as correntes de potássio .....                               | 30        |
| 4.3.5 Efeitos do geraniol sobre o potencial de ação ventricular .....                                    | 33        |
| 4.3.6 Efeitos do geraniol sobre o perfil eletrocardiográfico e a pressão ventricular esquerda .....      | 34        |
| 4.3.7 Efeitos de geraniol sobre a arritmia induzida por ouabaína em átrio esquerdo de cobaia .....       | 35        |
| 4.4 Análise estatística .....                                                                            | 36        |
| <b>5 RESULTADOS .....</b>                                                                                | <b>37</b> |
| 5.1 Efeito do geraniol sobre a força contrátil do átrio esquerdo de cobaia .....                         | 37        |
| 5.2 Efeito do geraniol sobre o influxo de $Ca^{2+}$ no átrio esquerdo de cobaia .....                    | 38        |
| 5.3 Efeito do geraniol sobre a corrente de $Ca^{2+}$ tipo-L em cardiomiócito ventricular .....           | 39        |
| 5.4 Ação do geraniol sobre a configuração do potencial de ação ventricular .....                         | 40        |
| 5.5 Efeitos do geraniol sobre as correntes para potássio em cardiomiócito ventricular .....              | 42        |
| 5.6 Efeitos do geraniol sobre parâmetros eletrocardiográficos e pressão ventricular esquerda (PVE) ..... | 45        |
| 5.7 Efeitos do geraniol sobre a arritmia induzida pela ouabaína .....                                    | 45        |
| <b>6 DISCUSSÃO .....</b>                                                                                 | <b>48</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO.....</b>                                                                                  | <b>49</b> |
| <b>8 REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                | <b>53</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas aromáticas e medicinais como medicamento é tão antiga quanto à própria civilização, quando o homem primitivo ao se alimentar de determinadas plantas, observava que estas lhe traziam alívio para seus males. Também por observação dos animais, que por instinto, se alimentavam de algumas ervas, quando estavam adoentados (Correa Júnior 1994).

O potencial curativo apresentado pelas plantas medicinais deve-se a compostos complexos (metabólitos) que são sintetizados pelo próprio vegetal a partir de substâncias simples (Maciel *et al.* 2002). Assim, tem-se isolado e identificado diversas substâncias que se tornaram instrumentos valiosos para a descoberta de novas drogas mais eficazes e seguras (Peixoto Neto 2005).

Dentre os produtos naturais com interesse pela indústria farmacêutica utilizados no aumento de novas propostas terapêuticas para o uso de doenças cardiovasculares, sobressaem os monoterpenos, que são constituídos por duas unidades isoprênicas, as quais são formadas por cinco carbonos cada, representando cerca de 90% dos constituintes dos óleos essenciais (Bakkali *et al.* 2008). Eles apresentam diversas propriedades farmacológicas, incluindo as atividades antioxidante, antifúngica e antimicrobiana (Al Nomaani *et al.* 2013) e analgésica (Melo *et al.* 2010, Guimaraes *et al.* 2013). Diversos estudos indicam que os terpenos podem interagir com os canais iônicos de membrana, alterando suas propriedades biofísicas (Silva *et al.* 2011). Sobre o sistema cardiovascular, estudos mostram que diferentes monoterpenos são capazes de promover, entre outras ações, hipotensão, vasorelaxamento, redução da contratilidade e da frequência cardíaca (Santos *et al.* 2011). Podemos citar como exemplo a ação dos monoterpenos citrionelol (Bastos *et al.* 2010), carvacrol (Joca *et al.* 2012), timol (Magyar *et al.* 2004), mentol (Baylie *et al.* 2010) e R-(+)-pulegona (de Cerqueira *et al.* 2011) que atuam bloqueando canais para cálcio e sódio sensíveis à voltagem.

A regulação da contração do músculo cardíaco desempenha um papel integral em muitos processos fisiopatológicos, dessa forma, o músculo cardíaco possui um importante papel em todos os sistemas biológicos, e ainda representa uma ferramenta útil para a investigação das atividades biológicas de substâncias de origem natural ou sintética (Watterson *et al.* 2005).

A busca de substâncias que alteram a atividade elétrica no coração continua a ser uma importante área de investigação, como muitas doenças cardíacas estão relacionadas as

mudanças na atividade do canal iônico. Substâncias que alteram o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular podem ser drogas potenciais candidatos. Apesar da utilização humana do geraniol em alimentos, bebidas, medicamentos e produtos bucais pouco se sabe sobre os seus efeitos biológicos, em especial, sobre o miocárdio de mamíferos. Para este fim, foi investigada a ação de geraniol nas atividades contráteis e elétricas do coração dos mamíferos, bem como a sua possível ação de uma droga com potencial antiarrítmico de um modelo de arritmia induzida por RS sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ .

É muito importante caracterizar essas novas moléculas para ter uma melhor idéia de seu potencial terapêutico. Como não foi possível encontrar na literatura nenhum estudo científico mostrando a ação do geraniol sobre o músculo cardíaco, decidimos investigar o geraniol, utilizando medidas de tensão isométrica, técnica de “patch-clamp” e modelo de arritmia “in vitro” para explorar o possível mecanismo de ação responsável pelos seus efeitos cardiovasculares.

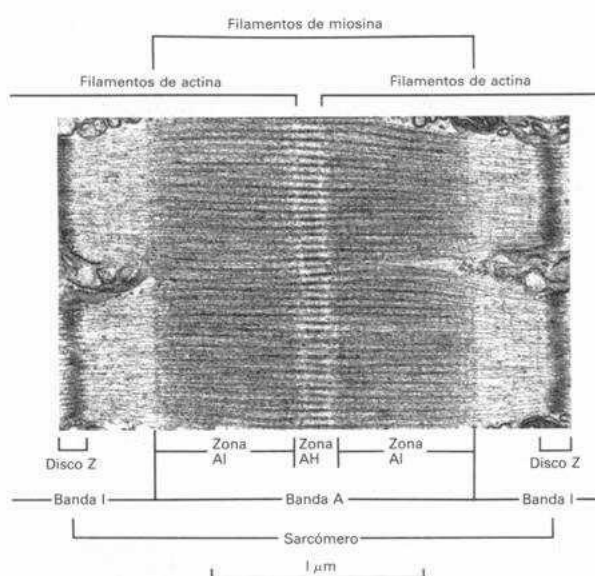
Dessa forma, espera-se obter com este estudo, um conhecimento mais aprofundado dos efeitos do geraniol sobre as atividades mecânica e elétrica do miocárdio e sua ação sobre as principais correntes iônicas da membrana. Assim, os resultados obtidos com este trabalho foi inéditos e abrirá espaço para descoberta de novas substâncias de origem natural, farmacologicamente ativas no coração.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ESTRUTURA DO CARDIOMIÓCITO

O cardiomiócito ventricular de mamífero possui um comprimento de aproximadamente 100-150  $\mu\text{m}$ , largura entre 10-20  $\mu\text{m}$  e altura de 10  $\mu\text{m}$  (Guatimosim *et al.* 2002). O músculo cardíaco, visto ao microscópio óptico, apresenta um padrão regular de estriações transversais, semelhante às células do músculo esquelético (McNutt 1975). A Fig.1, obtida por meio do microscópio eletrônico, mostra duas linhas Z. A disposição dessas linhas são responsáveis pelo padrão estriado visto ao microscópio óptico. A estrutura compreendida entre duas linhas Z denomina-se sarcômero. Cada um deles possui fisiologia e microanatomia que se assemelha, e por esse motivo ele é considerado a unidade funcional do sistema de miofilamentos capaz de gerar força no músculo (Voet *et al.* 2008).

Existem duas bandas entre as linhas Z, a banda I (representada pelas regiões claras) e a banda A (representada pelas regiões escuras). Podemos observar na Fig. 1, que na região central da banda I há uma linha Z onde os miofilamentos finos (70 Å) de actina-F se interconectam. A banda A, mais escura, é formada por filamentos de actina e miosinasobrepuestos. Dentro desta banda existe uma região mediana mais clara, a zona H. Ela é constituída de filamentos grossos (150 Å) formados por miosina, que se conectam entre si formando o disco M (McNutt 1975, Voet *et al.* 2008).



**Figura 1.** Micrografia eletrônica, em corte longitudinal, mostrando o sarcômero limitado por duas linhas Z. No centro da banda A encontra-se a linha M (Fonte: <http://www.efisioterapia.net/articulos/graficos/221-14.jpg>;imgrefur, acesso em 11/08/2013).

## 2.2 FISILOGIA DO CORAÇÃO

O coração é o órgão responsável pela função do sistema cardiovascular de distribuir sangue aos tecidos, fornecendo-lhes nutrientes essenciais ao metabolismo celular e removendo-lhes os catabólitos. O músculo cardíaco funciona como uma bomba que, ao contrair-se, impulsiona o sangue através dos vasos sanguíneos para os pulmões onde será feito as trocas de oxigênio e dióxido de carbono, e também, propulsiona o sangue para os tecidos do corpo.

Ele é dividido em duas partes: o ápice, que contém as paredes ventriculares; e a base, a qual contém a maioria das artérias e veias que permitem a entrada e saída de sangue. A circulação coronariana, responsável pelo fluxo sanguíneo que irriga as células cardíacas, também é um importante aspecto da fisiologia do órgão, sendo que defeitos associados a esse sistema podem acarretar o desenvolvimento de patologias (Fuster *et al.* 1998).

Para o exercício dessa função, vários mecanismos de controle, de natureza mecânica e elétrica convergem para que o órgão, como resposta, produza as contrações necessárias para impulsionar o sangue a todos os tecidos do corpo (Berne 2004).

Embora isso ocorra, há propagação de ondas elétricas por todo tecido cardíaco promovendo a contração das fibras miocárdicas permite o funcionamento da eficiente bomba cardíaca (Garcia 1998). Tal sistema é composto pelo nodo sino-atrial, pelas vias atriais internodais, pelo nodo átrio-ventricular, pelo feixe de His e suas ramificações, e pelo sistema de Purkinje. O início do sinal elétrico se dá no nodo sino atrial, e as demais partes são responsáveis pela condução desse sinal por todo o órgão. Por esse motivo, as células miocárdicas possuem fisiologia adaptada à geração e condução de sinais elétricos, em detrimento da função contrátil (Katz 1992).

O nódulo sinusal, que tem função de marcapasso, é uma estrutura importante para o funcionamento do músculo cardíaco, pois ele comanda o ritmo cardíaco e é a partir dele que é gerado o sinal elétrico para as outras partes do coração. Ele controla o ciclo cardíaco que é dividido em duas fases: diástole e sístole. A primeira é responsável pela entrada de sangue nos átrios e ventrículos e a última pela saída desse sangue para a circulação (Katz 1992).

No coração podem ser vistos, ao microscópio eletrônico, os discos intercalares. Eles apresentam as seguintes estruturas: a) *fascia adherens*, b) desmossomos ou *macula adherens*, c) *nexus* e d) regiões não-diferenciadas. As regiões do *fascia* e da *macula adherens* são

eletricamente densas e entre as membranas opostas há um espaço extracelular. Já os *nexi*, são segmentos curtos, densos, e dão a impressão de ser uma membrana única, pois não possuem um espaço entre as membranas juncionais. As regiões não-diferenciadas possuem as membranas celulares separadas pelo meio extracelular e apresentam densidade normal ao feixe eletrônico. Os *nexi* estão relacionados com o acoplamento elétrico nas células cardíacas (McNutt 1975).

Estudos confirmaram que o acoplamento elétrico entre as células miocárdicas estava ligado à integridade dos *nexi* (Demello 1982). Há um sincronismo entre as células que fazem com que a comunicação elétrica seja eficiente. Foi observado que, quando essas células se tocavam o valor da resistência era alto (100 MΩ) e quando elas contraíam ao mesmo tempo, a resistência caía (20 MΩ). Dessa forma, confirmou-se que a baixa impedância existente entre as células tornava a comunicação entre elas eficiente (Clapham *et al.* 1980).

## 2.3 CONTRATILIDADE CARDÍACA

A função contrátil cardíaca é mantida graças à geração e condução do estímulo elétrico sendo regulada pelo nível de cálcio citosólico e pela sensibilidade dos elementos contráteis ao cálcio (Karaki *et al.* 1997), regulando a força e a frequência dos batimentos cardíacos (Bers 1991). O sistema excito-condutor cardíaco é composto pelo nodo sinoatrial (NS), pelas vias atriais internodais, pelo nodo atrioventricular (NAV), pelo feixe de His e suas ramificações, e pelo sistema de Purkinje. O NS é responsável pelo início do sinal elétrico, e os demais componentes são responsáveis por conduzir tal sinal pelo coração (Katz 1992, Berne 2004).

O fenômeno da contração cardíaca pode ser mais bem compreendido a partir do conhecimento da fisiologia contrátil dos cardiomiócitos e dos componentes estruturais envolvidos neste processo. A alteração brusca na permeabilidade da membrana aos íons através da membrana plasmática permite que ocorram mudanças significativas no potencial de repouso da célula cardíaca, gerando o potencial de ação (PA) e, conseqüente, contração celular. A contratilidade celular cardíaca é governada por um rígido controle da concentração de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ). O mecanismo básico de ativação da maquinaria contrátil celular pelo PA ocorre, inicialmente, pela ativação dos canais iônicos sensíveis à voltagem presentes na membrana plasmática celular, sendo que a abertura de canais para cálcio de tipo-L permite o influxo de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) no miócito cardíaco (Bers 1991).

A principal organela que estoca o cálcio intracelular é o retículo sarcoplasmático (RS). No RS são encontrados receptores, canais e proteínas, que regulam a entrada e a saída de  $\text{Ca}^{2+}$  desse compartimento. O efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, durante a contração celular, ocorre através do canal para cálcio denominado receptor de rianodina (RyR), presente na membrana da organela (Bers 1991). No interior do RS, pode-se encontrar uma proteína que apresenta alta capacidade e baixa afinidade para se ligar aos íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Ela é conhecida como calsequestrina e uma das suas funções são minimizar a energia necessária para o bombeamento dos íons cálcio para o interior do RS (Bers *et al.* 1985, Bers 2002).

Mudanças nas concentrações de cálcio podem ser resultado do influxo de cálcio do meio extracelular e/ou pela liberação de cálcio dos estoques intracelulares, através da ativação receptores de RyR e receptores para o  $\text{IP}_3$  (trisfosfato de inositol) (Somlyo e Somlyo 1994, Karaki *et al.* 1997, Laporte *et al.* 2004). Esse mecanismo inclui canais de cálcio dependente de voltagem do tipo-L, canais de cátions não-seletivos, canais de cálcio ativados por liberação de cálcio (Karaki *et al.* 1997).

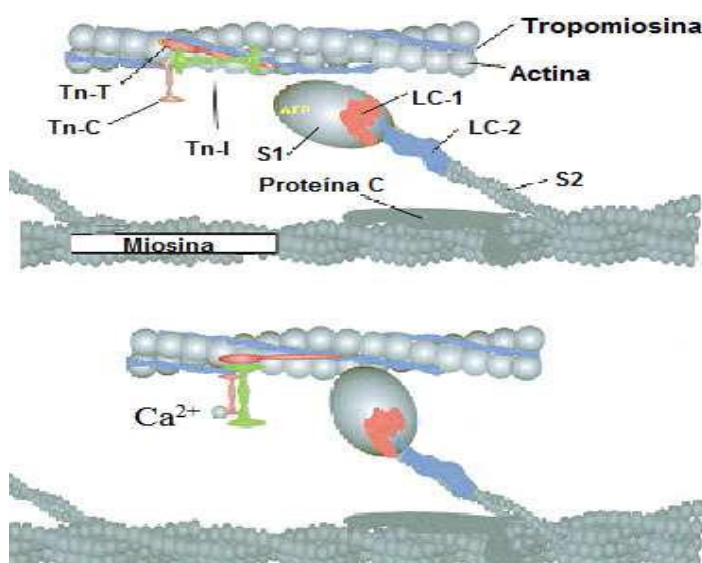
Quando o PA resultante ativa um canal de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana de um túbulo T (TT), um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  gera a abertura de canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS. O  $\text{Ca}^{2+}$  que flui para o citosol dá, então, início à contração de cada miofibrila. Sabendo que o sinal proveniente da membrana citoplasmática da célula é transmitido em milissegundos (através dos TT e do RS) para cada sarcômero dos cardiomiócitos, todas as miofibrilas contraem ao mesmo tempo. A elevação do  $\text{Ca}^{2+}$  é transiente, pois o  $\text{Ca}^{2+}$  é rapidamente bombeado de volta ao RS por uma bomba dependente de ATP (também chamada de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ou SERCA) abundante nesta membrana (de Tombe 2003).

Os filamentos finos são formados pelas três primeiras, já os filamentos grossos são formados pela miosina. O filamento de actina pode ser isolado na forma de actina G (globular) e actina F (filamentosa). A proteína actina G se polimeriza para formar a actina F, que se apresenta com estrutura filamentosa em forma de dupla hélice. A tropomiosina é formada por duas subunidades filamentosas em forma de hélice. Ela está situada ao lado das cadeias de actina F. Quando a fibra muscular não está contraída, ela se posiciona bloqueando os sítios de interação entre os filamentos de actina e as cabeças de miosina (Voet *et al.* 2008).

A contração cardíaca está intimamente associada a proteínas como a tropomiosina (68 kD), uma molécula longa que está posicionada no sulco da dupla hélice de actina (42 kD). Outra é a troponina (80 a 90 kD), um complexo de três polipeptídios: 1) troponina C (Tn-C), que é o sítio de ligação para o  $\text{Ca}^{2+}$ ; 2) troponina I (Tn-I), que cobre o sítio que permite a

interação da actina com a miosina e 3) troponina T (Tn-T), que é uma proteína que se liga fortemente à tropomiosina (de Tombe 2003).

A miosina é uma proteína composta por seis cadeias polipeptídicas. Ela possui duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves. Essas últimas são denominadas de cadeias leves essenciais (CLE) e cadeias leves regulatórias (CLR). A região amino-terminal de cada cadeia pesada é responsável pela formação de uma cabeça globular alongada, e a ela se ligam uma subunidade leve e uma regulatória. A metade carboxi-terminal é responsável pela formação de uma cauda em  $\alpha$ -hélice que é longa, fibrilar e que se associa em pares em forma de espiral enrolada (Piazzesi e Lombardi 1995, Voet *et al.* 2008) (Fig. 2)



**Figura 2.** 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 e Lombardi 1995).

Tanto no sarcolema, quanto nos TT, existem canais iônicos, proteínas receptoras, trocadores iônicos e outras estruturas especializadas. Canais para  $\text{Na}^+$ , canais para  $\text{K}^+$  e bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  são mais abundantes no sarcolema do que nos TT do músculo esquelético. Por outro lado, a densidade de canais para cálcio operados por voltagem (como os canais das diidropiridinas – DHPRs, também chamados de canais para cálcio tipo-L) é quatro vezes maior nos TT do que no sarcolema (Palade e Almers 1985). A distribuição de canais para cálcio ao longo da membrana plasmática, não é uniforme, ao estudar a membrana de células miocárdicas de coelho, observou-se que nela existia uma alta concentração de receptores das DHPRs nos TT, quando comparada à concentração existente no sarcolema (Bers 2002).

O conjunto formado pelo TT com as cisternas dos RS que se dispõem à sua volta, é conhecido como tríade. Ao conjunto formado pelo TT com uma das cisternas do RS, denomina-se de díade. As díades são consideradas unidades funcionais para o processo excitação-contração do músculo cardíaco (Sun *et al.* 1995).

A junção diádica é representada pela membrana sarcolemal do TT, pela fenda diádica e pela cisterna do RS. Nesta estrutura, estão os “couplons” formados por 10 a 25 DHPR situados no sarcolema e que estão posicionados em frente a 100 RyR, estes localizados na membrana do RS (Gathercole *et al.* 2000). Esta proporção cria uma margem de segurança para garantir que cada “couplon” desenvolva a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, quando for solicitado pela despolarização da membrana celular (Franzini-Armstrong *et al.* 1999).

As mitocôndrias respondem à elevação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e contribuem para a regulação espacial e temporal dos níveis citoplasmáticos deste íon, sobretudo durante os picos dos transientes de cálcio intracelular livre. Por conseguinte, a mitocôndria está também envolvida na recaptação e na liberação do cálcio intracelular, contribuindo assim para a recarga de  $\text{Ca}^{2+}$  existente no RS. A homeostase mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  é complexa e regulada por numerosos canais para  $\text{Ca}^{2+}$ , bombas e trocadores (Graier *et al.* 2007). Além de gerar energia para a contração muscular, as mitocôndrias possuem um papel direto, ainda que pequeno, no acoplamento excitação-contração da célula miocárdica. A mitocôndria possui um sistema uniporte de íons  $\text{Ca}^{2+}$  que serve para capturar o íon para o interior da organela, contribuindo, assim, para reduzir sua concentração citoplasmática e, por isso, para o relaxamento da célula muscular cardíaca. Esta contribuição, contudo, é de 1 a 3% do total de íons  $\text{Ca}^{2+}$  que são recaptados durante o relaxamento muscular (Bers 2002).

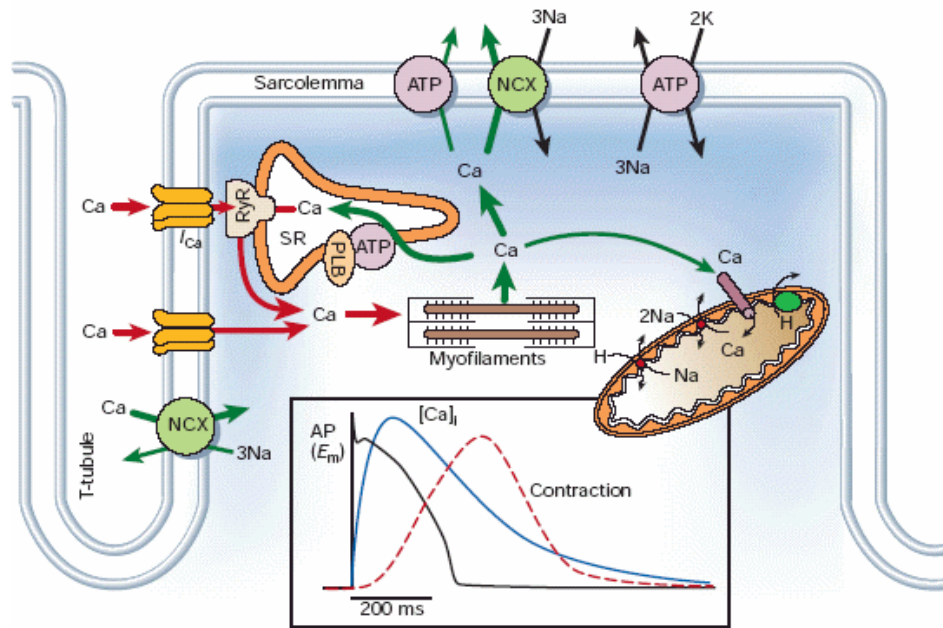
## 2.4 ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO DO CORAÇÃO (AEC)

O AEC é o processo que ocorre desde a despolarização da membrana excitável até a liberação de cálcio do RS e a contração da célula muscular (Bers 2002). Para isso, há a necessidade de que exista um influxo de íons cálcio proveniente do meio extracelular (Hobai e Levi 1999). O cálcio penetra nas células através de dois tipos de canais chamados de canais de cálcio tipo-L e tipo-T, ambos operados por voltagem (VOCs) “voltage-operated channels” (De Paoli *et al.* 2002).

A Fig. 3 mostra esquematicamente o AEC no músculo estriado cardíaco. O  $\text{Ca}^{2+}$  é essencial para atividade elétrica cardíaca juntamente com outros íons. Ele é o ativador direto dos miofilamentos, induzindo a contração e permitindo que o sangue seja propelido para as grandes artérias. Durante o PA cardíaco, o  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do meio extracelular alcança o meio intracelular principalmente através dos canais de cálcio do tipo-L, contribuindo para a formação do platô do PA. Além disso, existe uma contribuição, de menor significância, o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) que, agindo no sentido reverso, ajuda a elevar os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Blaustein 1999, Bers 2000, Bers 2006)

O aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular estimula a abertura de canais liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$  (RyR) existentes na membrana do RS, um processo denominado de liberação de cálcio induzida por cálcio (CICR), “calcium-induced calcium release” (Fabiato 1983). A entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula muscular, juntamente com o  $\text{Ca}^{2+}$  que é liberado do RS, eleva a concentração intracelular deste íon e, como consequência, proporciona sua ligação com a troponina C, iniciando o processo de geração de força contrátil. É notável o fato de que é necessário que apenas uma pequena fração dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L do sarcolema e dos RyR existentes na membrana do RS sejam ativados para que a contração muscular possa ocorrer (Bers 2002). O  $\text{Ca}^{2+}$  é um agente inotrópico positivo. Assim, uma diminuição da concentração extracelular deste íon reduz a força de contração miocárdica o que reduz o débito cardíaco (Bers 2006).

Três diferentes genes (ryr1, ryr2 e ryr3) expressam diferentes isoformas de RyR, estando presente no coração a isoforma do tipo 2 (RyR2). O RyR1 é o principal canal liberador de cálcio do RS no músculo estriado (Samso 1998), seguido do canal para  $\text{Ca}^{2+}$  ativado pelo  $\text{IP}_3$  (Ogawa 1994).



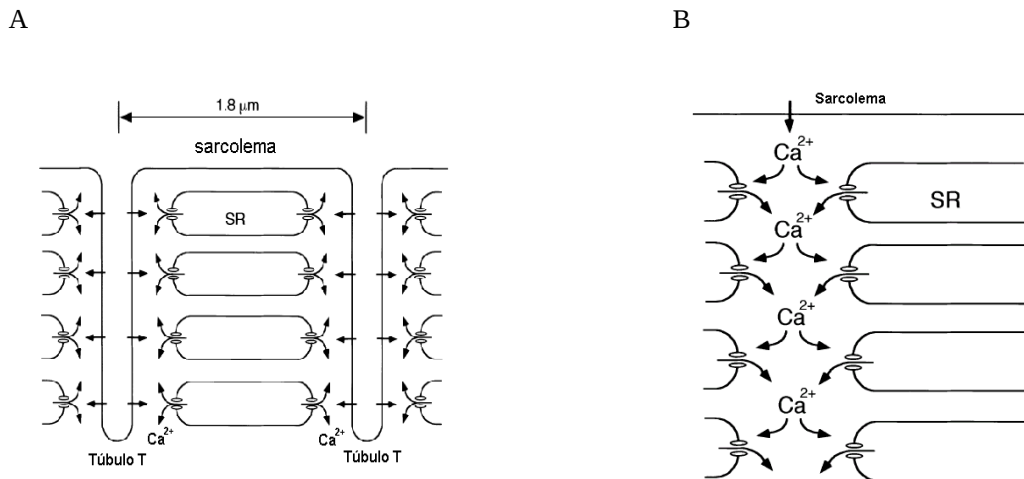
**Figura 3.** Mecanismos celulares da contração muscular mostrando que o fenômeno da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR) envolve canais de cálcio tipo L sarcolemais e receptores de rianodina (RyR) da membrana do RS. Na figura inserida, estão curvas relativas ao potencial de ação (PA), à concentração intracelular de cálcio  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e a força de contração muscular; NCX: trocador sódio/cálcio; PLB: fosfolambam (Bers 2006).

Uma característica importante do mecanismo de CICR é a sua capacidade para amplificar a informação recebida, pois uma pequena entrada de cálcio na célula leva a uma grande elevação do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. A elevação do  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma contribui para que, num mecanismo de “feedback” positivo, ocorra uma maior ativação dos RyRs, elevando, assim, rapidamente a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular livre (Niggli 1999).

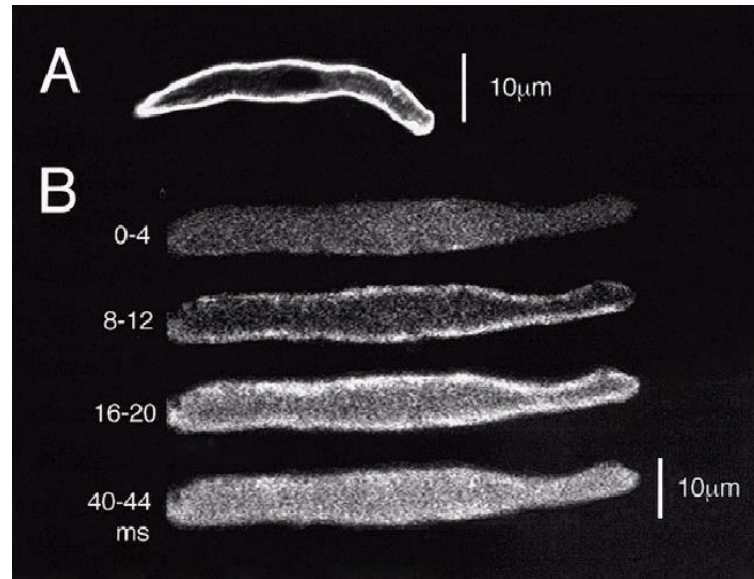
O processo de AEC apresenta-se de forma diferente nas células atriais e ventriculares. As células ventriculares evocam o processo de CICR no RS através da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por canais do tipo-L localizados nas invaginações do sarcolema (TT). Tais estruturas, garantem uma íntima conexão entre os canais do tipo-L e os RyR, permitindo haver uma liberação mais uniforme de cálcio (Blatter *et al.* 2003).

Nos miócitos atriais, o mecanismo de AEC e a regulação da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  parece ser um evento mais complexo. Estudos ultra-estruturais realizado por (McNutt 1975) e (Tanaka *et al.* 2001), mostraram a ausência de TT nas células atriais. Além disto, dois tipos de membrana do RS foram identificados: um deles situado periféricamente, isto é, voltado para o sarcolema (membrana juncional – jRS) e que está em íntima associação com a

membrana plasmática e outro localizado mais para o centro da célula, este chamado de membrana não-juncional do RS (njRS). Os RyRs estão ancorados nos dois tipos de membrana do RS e, provavelmente, participam do AEC. Devido ao padrão ultra-estrutural do RS atrial, a elevação da concentração intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  durante o AEC não é uniforme, mas aumenta progressivamente a partir da região sub-membranar, em direção ao centro do miócito (Gondim *et al.* 2009). Com o auxílio da microscopia confocal, foi possível registrar um transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em forma de U, indicado que primeiramente há um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  na periferia da célula antes que ele se propague para o citosol (Figs 4 e 5).



**Figura 4.** Representação esquemática da organização ultra-estrutural do miócito ventricular (A) e atrial (B). No miócito ventricular, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  sarcolemal dispara a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana do retículo sarcoplasmático (RS) resultando em um aumento simultâneo do  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma. No miócito atrial (B), o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  sarcolemal dispara a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS subsarcolemal e uma onda de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  propaga-se para o interior da célula (Tanaka *et al.* 2003).



**Figura 5.** Acoplamento excitação-contração (AEC) do miócito atrial. Em **A**, pode-se observar fluorescência (sonda di-2-ANEPEQ) apenas na região subsarcolemal confirmando a ausência de túbulos T no interior da célula. Em **B**, pode se observar que o  $\text{Ca}^{2+}$  começa a aumentar na periferia da célula e depois se espalha para o seu interior (Tanaka *et al.* 2003).

### 2.3 RELAXAMENTO DA CÉLULA CARDÍACA

Após a contração muscular, os músculos retornam à sua condição inicial, processo conhecido com relaxamento muscular. Do ponto de vista fisiológico, o relaxamento rápido e completo é um pré-requisito para a adaptação cardíaca a mudanças nas condições de carga, estimulação inotrópica ou alteração na frequência cardíaca (Chemla *et al.* 2000).

Para que o relaxamento da fibra muscular ocorra, é necessário que a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  diminua para os valores de repouso. Esse processo é iniciado pela dissociação do  $\text{Ca}^{2+}$  dos miofilamentos e pela diminuição de sua concentração no citosol. São cinco os principais mecanismos de remoção do cálcio do citosol: 1) ativação da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoendoplasmático (SERCA) na membrana do RS, que promove a recaptação do  $\text{Ca}^{2+}$  para o lúmen do RS; 2) ativação da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do sarcolema, que bombeia este íon para o meio extracelular; 3) o NCX presente na membrana celular, que, utilizando a energia proveniente do gradiente eletroquímico do íon sódio, transporta três íons  $\text{Na}^+$  para o meio intracelular e um íon  $\text{Ca}^{2+}$  no sentido inverso. Tal mecanismo pode operar também em sentido

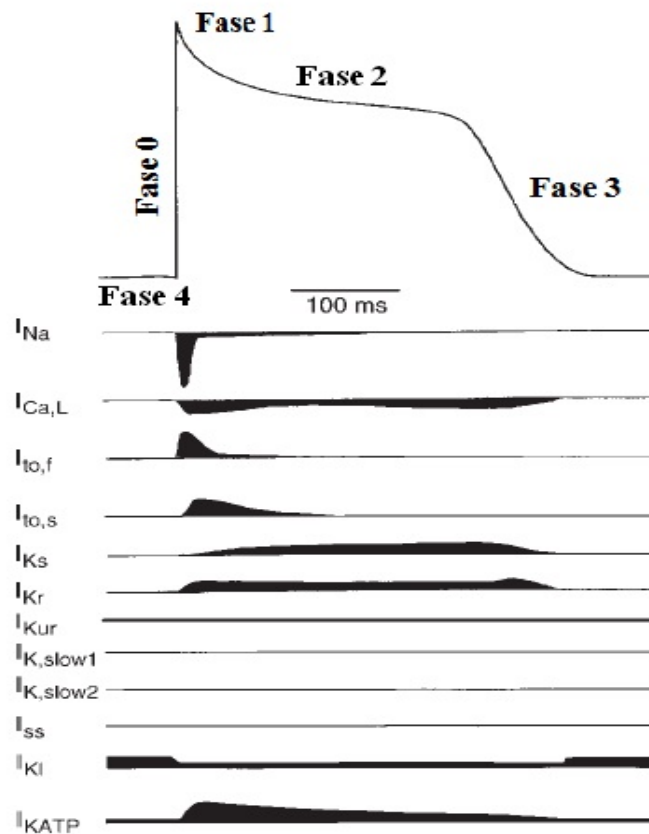
reverso. Este sistema contribui tanto para a elevação quanto para a diminuição da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  livre intracelular, modulando a intensidade da contração ou a velocidade do relaxamento (Bers 2006); 4) inativação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo-L (DHPRs), que ocorre com a repolarização celular, impedindo o influxo deste íon para o sarcoplasma; 5) sistema uniporte mitocondrial que remove o  $\text{Ca}^{2+}$  do sarcoplasma, sequestrando-o no interior das mitocôndrias, porém a contribuição deste sistema para o relaxamento é pequena (Maack 2007).

A SERCA está presente na membrana do RS, sendo responsável pela remoção da maior fração do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático para o lúmen do retículo (Bers 2002). Sua ativação é regulada pelo fosfolambam (PLB), o qual, em estado desfosforilado, inibe a SERCA. Assim, a fosforilação do PLB acelera a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS (Orchard 2008).

## 2.4 POTENCIAL DE AÇÃO RÁPIDO OU COMPLETO

Quando a diferença de potencial entre os lados da membrana de uma célula miocárdica atrial ou ventricular atinge o potencial limiar, os canais rápidos de  $\text{Na}^+$ , inicialmente fechados, começam a abrir-se rapidamente permitindo que este íon se mova do meio externo, onde está mais concentrado, para o meio intracelular. Esse rápido influxo de  $\text{Na}^+$  promove uma despolarização rápida e o potencial elétrico do interior da célula acaba por inverter sua polaridade, deixando de ser negativo (fase de repouso) para se tornar positivo (fase 0). O influxo de  $\text{Na}^+$  é limitado pela própria despolarização celular, pois, neste tipo de canal, ocorre um processo de inativação. No final da fase 0, ocorre diminuição da condutância da membrana ao  $\text{K}^+$  através dos canais  $\text{K}_1$  ou  $\text{K}_{ir}$  “inward rectifier channel”. Durante a fase seguinte (fase 1), acontece uma repolarização parcial da célula que se deve ao efluxo de  $\text{K}^+$  através dos canais  $\text{K}_{to}$  “transient outward channel” e ao influxo de íons  $\text{Cl}^-$ . Na fase 2, também chamada de platô, ocorre o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  que passam pelo canal de cálcio tipo-L existentes na membrana celular. A voltagem limiar para a abertura destes canais está em torno de  $-40$  a  $-50$  mV. Ainda na fase 2, os canais  $\text{K}_1$  permanecem com baixa condutância ao  $\text{K}^+$ , permitindo que a célula mantenha-se despolarizada. Somente na fase 3, a condutância global ao  $\text{K}^+$  volta

a aumentar, ocorrendo efluxo de  $K^+$  permitindo a repolarização da célula (Garcia 1998, Berne 2004) (Fig. 6).



**Figura 6.** Potencial de ação cardíaco típico e suas correntes nas principais fases responsáveis pelo potencial de ação de coração canino. Na parte inferior, principais correntes envolvidas no formato do potencial de ação cardíaco, assim como as fases do PA em que elas atuam (Nerbonne 2005).

## 2.5 CANAIS IÔNICOS

Os potenciais elétricos que são gerados na membrana das células dependem de correntes iônicas. Essas correntes atravessam a membrana e transportam íons como: sódio, cálcio, potássio, entre outros. Esses íons atravessam o sarcolema através de canais iônicos que possuem seletividade variada. Existem várias isoformas de canais iônicos operados por voltagem e a grande maioria possui uma subunidade alfa responsável pela formação do canal. Essa subunidade possui 4 domínios homólogos, de I a IV, e cada domínio possui 6 subunidades (6  $\alpha$ -hélices) que atravessam a membrana, de S1 a S6. No segmento quatro (S4)

há o sensor de voltagem, esta característica é a principal na identificação da família desses canais. Existe uma alça entre os segmentos S5 e S6 que forma o canal e o filtro seletivo, este é responsável pela propriedade de especificidade do canal, como por exemplo, qual o íon será transportado por ele. Esses canais ainda possuem outras subunidades que permitem que haja a modulação do canal (Yang e Horn 1995, Garcia 1998, Hille 2001).

### 2.5.1 CANAIS PARA SÓDIO

Os canais para  $\text{Na}^+$  estão presentes em várias estruturas como neurônios, músculo esquelético e cardíaco, e glândulas endócrinas. Eles são responsáveis por várias funções e, dentre elas, destaca-se a condução dos PA. Há uma grande variedade de canais para  $\text{Na}^+$ , mas aqui trataremos daqueles que se classificam como operados por voltagem. O canal para  $\text{Na}^+$  cardíaco possui estrutura homóloga ao canal para sódio do músculo esquelético (Bers e Ziolo 2001, Vora *et al.* 2005). Existem 10 tipos de canais para  $\text{Na}^+$ , classificados até então, e nas células cardíacas estão presentes os seguintes tipos: Nav (Canal para sódio dependente de voltagem) 1.1, 1.3, 1.4, 1.5 e 1.6. No cardiomiócito, o mais encontrado é o subtipo Nav 1.5 (Nerbonne 2005). Sua estrutura apresenta-se como uma grande proteína contínua, uma subunidade  $\alpha$  e 1 ou 2 subunidades  $\beta$  auxiliares menores. A subunidade  $\alpha$  possui o sensor de voltagem, o “gate” de ativação, o poro do íon e o “gate” de inativação. Essas subunidades são importantes na biofísica do canal (Amir *et al.* 2006). A subunidade  $\alpha$  do canal Nav 1.5, que predomina no coração, é codificada pelo gene SCN5A. Ele possui muitas variantes que são importantes no estudo das cardiopatias (Schroeter *et al.* 2010).

A função do canal para  $\text{Na}^+$  é gerar uma corrente positiva para o interior da célula, de forma rápida e iniciando o PA. A corrente de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ) é responsável pela rápida despolarização cardíaca que ocorre no início do potencial de ação (Sakmann *et al.* 2000).

As características que favorecem a participação dos Nav 1.5 na origem do PA é a magnitude da corrente gerada pela ativação desses canais (corrente > 200 nA) além de possuírem uma cinética de ativação (ordem de microssegundos) e inativação (ordem de milissegundos) extremamente rápidas (Nerbonne 2005).

### 2.5.2 CANAIS PARA CÁLCIO

No coração, existem dois tipos de canais para  $\text{Ca}^{2+}$ , canal para  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L e tipo-T. O canal para  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L “large conductance” foi denominado assim por possuir alta condutância (25 pS), abertura do canal com longa duração e ativação em voltagens mais positivas. O canal para  $\text{Ca}^{2+}$  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).

A corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) é a corrente de maior magnitude no miocárdio, sendo que a  $I_{\text{Ca,T}}$ , como já foi dito, encontra-se em menor magnitude. A  $I_{\text{Ca,L}}$  está envolvida em dois importantes eventos que acontecem no coração: o primeiro evento se caracteriza pela sua contribuição na manutenção do platô do PA cardíaco e o segundo evento acontece quando a corrente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  dispara a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS. Esse  $\text{Ca}^{2+}$  que é liberado no citosol ativa os miofilamentos (Roden *et al.* 2002).

O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nos cardiomiócitos provoca vários processos fazendo parte da regulação da contração da célula e também participa do processo de regulação da expressão gênica celular (Benitah *et al.* 2010). Os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\gamma$ . Há três subfamílias de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Cav}_{\alpha 1}$ ,  $\text{Cav}_{\alpha 2}$  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  $I_{\text{Ca,L}}$ . No cardiomiócito, a principal família que gera a  $I_{\text{Ca,L}}$  é a que tem o fenótipo correspondente a  $\text{Cav}1.2 \alpha 1\text{C}$ . As proteínas responsáveis pela expressão da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-T são as  $\text{Cav}3.1$  e  $\text{Cav}3.2$ . Na literatura, ainda há divergências em relação a essa subdivisão (Nerbonne 2005).

A maior parte do  $\text{Ca}^{2+}$  que entra no miócito cardíaco durante a contração, ocorre através da  $I_{\text{Ca,L}}$ . A inativação da  $I_{\text{Ca,L}}$  depende muito do aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  é provável que com a entrada desse íon haja uma sinalização direta no canal. Essa inativação dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  gera um mecanismo de “feedback” que limita o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula através da  $I_{\text{Ca,L}}$  (Maier 2002).

A calmodulina (CaM) é um crítico mensageiro que participa da sinalização de vários eventos que ocorrem na célula. A interação  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM regula proteínas envolvidas no

transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , 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  $\text{Ca}^{2+}$ , e os domínios de ligação I e II possuem maior afinidade para o  $\text{Ca}^{2+}$  do que o III e IV. Os sítios de ligação para o  $\text{Ca}^{2+}$  quando a célula está no repouso, estão desocupados, mas quando a célula contrai os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentam. Como consequência, a CaM muda o seu estado conformacional, se liga ao  $\text{Ca}^{2+}$  e se torna ativa para se ligar a proteínas alvo com alta afinidade (Maier 2002).

Em canais para cálcio tipo-L, a CaM atua como mediador da inativação da  $I_{\text{Ca,L}}$  agindo sobre esses sítios na região carboxi terminal da subunidade  $\alpha 1\text{C}$ . Quando os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  estão abertos o  $\text{Ca}^{2+}$ , que entra e o  $\text{Ca}^{2+}$  que é liberado do RS, se ligam à CaM que interage com a região IQ (modula a inativação do canal), produzindo sua inativação. A CaM dependente de proteína quinase II (CaMKII), também faz parte do processo de regulação da  $I_{\text{Ca,L}}$  (Maier 2002).

### 2.5.3 CANAIS PARA POTÁSSIO

Os canais para potássio apresentam uma diversidade molecular ainda maior do que os canais para sódio e cálcio. A família de proteínas sintetizadas no miocárdio possui uma grande variedade e é através delas que as correntes macroscópicas são formadas. Embora exista essa diversidade, há basicamente três tipos de corrente de potássio: correntes transientes, com ativação e inativação rápidas, correntes retificadoras retardadas, que apresentam diferentes cinéticas de ativação e inativação, e correntes retificadoras de entrada, todas estas estão presentes no coração (Nerbonne 2005).

#### 2.5.3.1 CORRENTE DE POTÁSSIO TRANSIENTE DE SAÍDA ( $I_{\text{To}}$ )

A corrente transiente de potássio é muito importante na fase inicial da repolarização incompleta do PA. Essa corrente possui grande densidade e uma cinética de ativação rápida. Existem duas formas de corrente de potássio transiente de saída:  $I_{\text{to}}$  rápida ( $I_{\text{to,f}}$ ) e a  $I_{\text{to}}$  lenta ( $I_{\text{to,s}}$ ). A  $I_{\text{to,f}}$  é mediada pelo canal Kv 4.2 e/ou Kv 4.3 e a  $I_{\text{to,s}}$  pelo canal Kv1.4 (Bers 2002).

Essas duas correntes são ativadas de forma muito rápida, mas a inativação da  $I_{to,f}$  ocorre antes da inativação da  $I_{to,s}$ . Em miócito de mamífero há principalmente a participação da  $I_{to,f}$ . Ambas  $I_{to,f}$  e  $I_{to,s}$  podem ser bloqueadas por 4-aminopiridina, mas somente a  $I_{to,f}$  é sensível a heteropodatoxina 2 e 3 (Xu *et al.* 1999).

### 2.5.3.2 CORRENTE DE POTÁSSIO RETIFICADORA DE ENTRADA

Há três tipos principais de correntes retificadoras de entrada presente nos cardiomiócitos:  $I_{K1}$  (Kir 2),  $I_{KATP}$  (Kir 6) e  $I_{KACh}$  (Kir 3), embora nem todos os tipos sejam expressos no coração. Alguns estudos demonstraram que os canais para potássio possuem diferentes papéis. Eles não só participam do controle do potencial de membrana, mas também contribuem para a fase final do PA (Anumonwo e Lopatin 2010). Em estudos anteriores, o fenômeno de retificação desses canais era entendido de forma diferente, ou seja, isso era relacionado a um mecanismo próprio do canal ou essa retificação dependia do  $Mg^{2+}$ . Porém, outros estudos relataram que esse fenômeno pode ocorrer através da dependência de voltagem do canal, podendo ser bloqueado por poliaminas como: espermina, spermidina, putrescina e cadaverina (Bers 2002).

### 2.5.3.3 CORRENTES RETIFICADORAS RETARDADAS

Além dos canais citados, existe um canal retificador com retardo: o canal para  $K^+$  ou canal  $K_{dr}$  “delayed rectifier channel”. A condutância ao potássio, por esse canal, aumenta de forma progressiva à medida que o PA vai se desenvolvendo. Assim há uma corrente máxima de saída no término da fase 2 (platô). Há dois subtipos de canais K: o  $K_s$  (que não é sensível ao sotalol) e o  $K_r$  (sensível ao sotalol). Quando esse canal é ativado é gerada a corrente  $I_K$ , que é reduzida pela amiodarona. Ao se opor ao aumento da condutância desse tipo de canal, essa substância age retardando a repolarização da célula alongando a duração do PA cardíaco (Garcia 1998).

## 2.6 ARRITMIAS CARDÍACAS

As arritmias cardíacas são perturbações do ritmo cardíaco decorrentes de anormalidades na geração dos impulsos elétricos, na sua condução ou uma combinação de ambos (Kastor 1996). Anormalidades da propagação do impulso incluem bloqueio de condução e reentrada do impulso cardíaco. A combinação de anormalidades de formação de impulsos e de propagação pode produzir arritmias complexas. As arritmias supraventriculares e ventriculares são diferentes com relação a sua origem, alterações no ECG e manifestações clínicas (Azevedo 1999). Dessa forma, é importante distinguir as arritmias supraventriculares das arritmias ventriculares. Os mecanismos subjacentes clínicos das arritmias cardíacas são de grande importância, entretanto, essas arritmias não são facilmente estudadas em situações clínicas. Hoje em dia, sofisticadas técnicas eletrofisiológicas estão disponíveis para estudar a fisiopatologia cardíaca, tanto “in vivo” como “in vitro”. Estas técnicas permitem estudar os mecanismos subjacentes de arritmias e os distúrbios de condução os modelos experimentais e em pacientes. Embora o conhecimento dos mecanismos de arritmias e distúrbios da condução tenha aumentado bastante, ainda há muito a ser explorado (Bhatt *et al.* 2005).

Vários modelos animais de arritmia supraventricular e taquicardia ventricular foram desenvolvidos para compreender a causa básica, a origem, os mecanismos possíveis, as manifestações e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento das arritmias cardíacas (Blatter *et al.* 2003). Embora a arritmia desenvolvida em animal não seja a mesma observada em humano, mecanismos arritmogênicos derivados a partir de experimentação animal têm auxiliado bastante no diagnóstico e na adaptação de estratégias terapêuticas. As estratégias terapêuticas para o tratamento de arritmias cardíacas incluem abordagens farmacológicas, ablação de focos específicos envolvidos na arritmogênese, cirurgias antiarrítmicas e dispositivos implantáveis projetados para responder a eventos de taquiarritmias e bradiarritmias sintomáticas.

Os fármacos antiarrítmicos podem ser classificados de acordo com o proposto por Vaughan Williams (1970) que classifica as drogas antiarrítmicas de acordo com suas propriedades eletrofarmacológicas e eletrofisiológicas. As drogas da classe I possuem ação anestésica local ou promovem estabilização da atividade da membrana. Eles agem bloqueando os canais rápidos para sódio produzindo uma diminuição na taxa máxima de despolarização da fase 0 do PA ventricular e retardando a condução intracárdica. Estes agentes podem ser ainda sub-classificados como classe Ia, Ib ou Ic em função dos seus efeitos

sobre os aspectos específicos da condução intracardíaca e refratariedade. Os antiarrítmicos da classe II bloqueiam os receptores  $\beta$ -adrenérgicos e, assim, reduzem a frequência cardíaca, diminuindo o cálcio intracelular e inibindo a automaticidade da despolarização marcapasso. Os antiarrítmicos de classe III prolongam a duração do PA, provavelmente, através do bloqueio dos canais para  $K^+$ . Os antiarrítmicos da classe IV bloqueiam canais para  $Ca^{2+}$  prejudicando a propagação de impulsos em regiões nodais e em áreas lesadas do miocárdio.

Uma maneira de induzir arritmia cardíaca “in vitro” é com a utilização de uma substância chamada ouabaína. A ouabaína, é um glicosídeo cardiotônico, que inibe a  $Na^+/K^+$ -ATPase na membrana plasmática, levando a um aumento dos níveis intracelulares de  $Na^+$ . O aumento do  $Na^+$  intracelular ativa o NCX na configuração “outward” que passa a transportar três íons  $Na^+$  para o meio extracelular e um íon cálcio para o meio intracelular. Esse mecanismo provoca o aumento na concentração interna de  $Ca^{2+}$  pelo NCX (Khatter *et al.* 1989). A sobrecarga de  $Ca^{2+}$  intracelular aumenta a recaptação e o estoque de cálcio dentro do RS através da SERCA. Após a saturação de cálcio no RS, o  $Ca^{2+}$  passa a ser liberado de forma oscilatória pelos RyR. A oscilação de  $Ca^{2+}$  induz um influxo de  $Na^+$  através do NCX na sua configuração “inward” e também através de canais catiônicos não-seletivos. O influxo de sódio forma uma corrente iônica identificada como corrente transiente de entrada ( $I_{Ti}$ ) (Lederer *et al.* 1984). A corrente induz uma despolarização oscilatória e, quando a despolarização alcança o limiar, os canais para  $Na^+$  voltagem-dependentes são ativados, resultando na geração de um PA. Este PA não gera um batimento regular, gera uma extrassístole iniciando o aparecimento de arritmias cardíacas (Kass *et al.* 1978, Wier 1984).

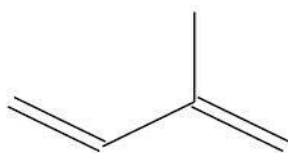
## 2.7 ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS CONSTITUINTES

Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de compostos orgânicos que apresentam natureza volátil e são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, os quais são constituídos por hidrocarbonetos (monoterpenos e sesquiterpenos) e compostos oxigenados (alcoóis, ésteres, aldeídos, cetonas, lactonas e derivados fenólicos) (Guenther 1948).

Esses óleos são muito utilizados na fabricação de produtos de uso diário, tais como perfumes, sabonetes, desinfetantes, conservantes, dentre outros (Serafini *et al.* 2002). Embora os óleos essenciais sejam bastante utilizados na vida cotidiana, as atividades referentes à ação

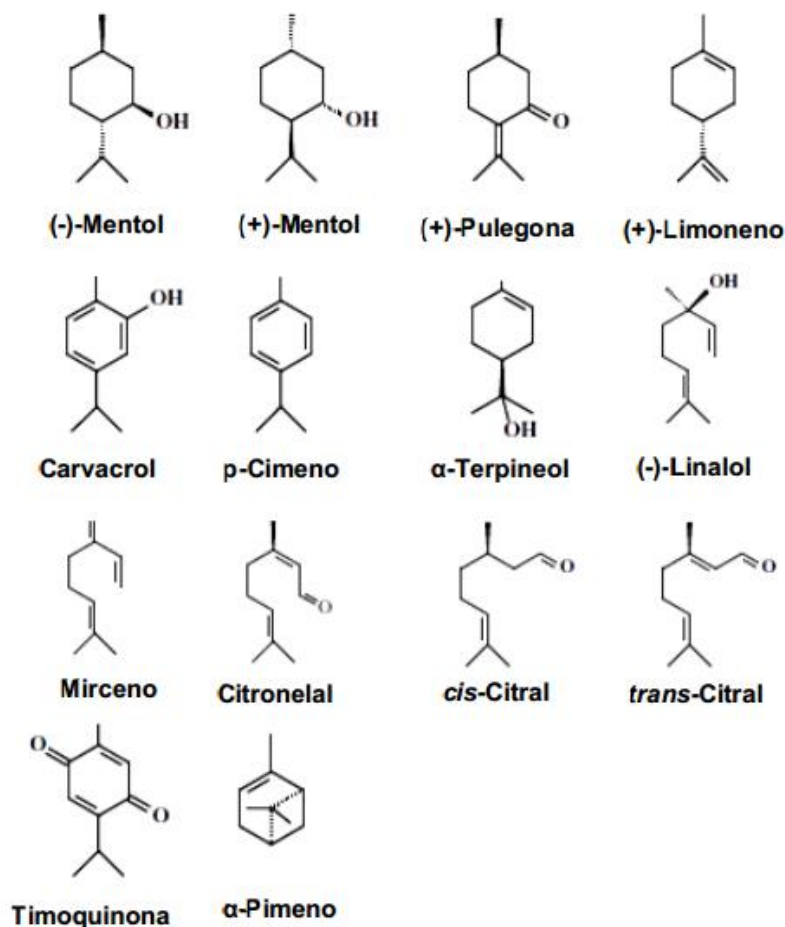
destes compostos na saúde ainda é relativamente pouco abordada. Uma das grandes dificuldades para o estudo das atividades biológicas desempenhadas por estes óleos, muitas vezes, se deve ao fato da atividade biológica não depender necessariamente da ação de apenas um composto ativo. Dessa forma, não se pode atribuir explicações acerca de atividades a apenas uma molécula disposta em uma mistura, uma vez que a mesma apresenta composição bastante variada (Nakatsu *et al.* 2000).

Os monoterpenos são substâncias isoladas que pertencem ao grupo dos terpenóides, cuja estrutura corresponde a duas unidades de isopreno formadas por uma base de cinco carbonos (C5) (Fig. 7) cada uma, ligadas entre si.



**Figura 7.** Estrutura molecular plana do isopreno

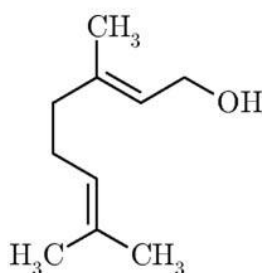
Dos óleos essenciais estudados, cerca de 90% são compostos por monoterpenos (figura 8), os quais são moléculas relativamente pequenas que apresentam em sua constituição duas unidades isoprênicas, geralmente com dez átomos de carbono ligados entre si. (Matich *et al.* 2007). São classificados como metabólitos secundários porque são considerados como não essenciais para a viabilidade das plantas, no entanto, medeiam importantes interações entre as plantas e o seu ambiente (Chappell 1996). Os monoterpenos podem ser divididos em três subgrupos: acíclico (mirceno, linalol, geraniol), monocíclico ( $\alpha$ -terpineol e terpinoleno), e bicíclico ( $\alpha$ -pineno, tujona, cânfora, fenchona). Em cada um destes subgrupos, há outras classificações: hidrocarbonetos insaturados (limoneno), álcoois (mentol), aldeídos e cetonas (mirtenal, carvona), lactonas (nepetalactona) e tropolonas ( $\gamma$ -tujaplicina) (Simões 2007).



**Figura 8.** Estrutura química dos monoterpenos (Guimaraes *et al.* 2013).

Os monoterpenos representam destaque também na economia mundial, onde se enquadram na categoria de nutracêuticos, os quais corresponderam, nos EUA, a cerca de 75,5 bilhões de dólares em 2007, obtendo um crescimento para 167 bilhões de dólares em 2010 (Basu *et al.* 2007).

Dessa forma, o geraniol (2,6-dimethyl-trans-2,6-octadien-8-ol) (Fig. 9) é classificado como um monoterpene alcoólico acíclico com a fórmula química  $C_{10}H_{18}O$ . Pode ser encontrado em frutas cítricas e em óleos de ervas aromáticas (Simon *et al.* 1986). Este monoterpene exerce várias propriedades bioquímicas e farmacológicas (Clark 1996). O geraniol e o nerol apresentam a mesma estrutura química, ou seja, são isômeros no qual o geraniol apresenta conformação molecular trans e o nerol cis (Chen 2010).



**Figura 9.** Estrutura molecular plana do geraniol

O geraniol foi aprovado, em 1965, pelo “Food and Drug Administration” (FDA) para ser utilizado como um condimento e adjuvante, sendo considerada uma substância segura (Lapczynski *et al.* 2008). Além de ser usado nos alimentos para consumo humano, o geraniol apresenta atividade antiinflamatória (Choi *et al.* 2000), antimicrobiana (Bard *et al.* 1988, Viollon 1994), antineoplásica (Burke *et al.* 1997, Carnesecchi *et al.* 2001, Polo 2006). A toxicidade do geraniol foi investigada em vários organismos e demonstraram que 1000 ou 10.000 ppm de geraniol, na dieta dos ratos, não foi capaz de promover quaisquer efeitos adversos nos animais (Hagan *et al.* 1967).

O geraniol apresentou atividade antioxidante frente ao 1,1 difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), promovendo aumento significativo da viabilidade celular, aumentando em 45% e 120% a atividade da superóxido dismutase. Além disso, foi observado que o geraniol restaurou o potencial de membrana mitocondrial, diminuiu significativamente a peroxidação lipídica, inibiu a liberação de óxido nítrico em 64,61% e a geração de EROS nas células pré-tratadas, em comparação com células estressadas (Chen 2010)

O geraniol demonstrou atividade anticancerígena “*in vitro*” e “*in vivo*” em modelos de câncer humano. Exibiu atividade de quimioterápico para o câncer de pâncreas e outros tipos de câncer (Burke *et al.* 1997), com efeitos antiproliferativos em hepatoma e melanoma (Polo 2006). Os efeitos antiproliferativos de geraniol sobre o câncer de cólon humano foram relacionados com a sua capacidade de reduzir a síntese de DNA e um bloqueio das células na fase S do ciclo celular (Carnesecchi *et al.* 2001).

A atividade imunossupressora do geraniol revelou que ele pode evitar a rejeição aguda do enxerto cardíaco. Foi constatado atividade antiinflamatória de alguns óleos essenciais,

contendo geraniol, na ativação de neutrófilos por medição de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (Ji *et al.* 2002, Abe *et al.* 2003).

Outros autores têm mostrado que o geraniol é eficaz como repelente de insetos (Barnard e Xue 2004) e seu potencial como um agente antimicrobiano foi destaque em vários estudos. Estudos, “*in vitro*”, mostraram a ação antimicrobiana do geraniol contra o *Cryptococcus neoformans*, um fungo causador da infecção durante os últimos estágios da AIDS (Bard *et al.* 1988, Viollon 1994)

A investigação, desenvolvimento e uso de produtos naturais como possíveis agentes terapêuticos, especialmente aqueles derivados de plantas, têm aumentado nos últimos anos. Apesar do fato de saber que as plantas são fontes ricas de novos compostos biologicamente ativos, apenas uma pequena percentagem vem sendo farmacologicamente investigada e estudada pelo seu potencial medicinal. É muito importante caracterizar essas novas moléculas para ter uma melhor idéia de seu potencial terapêutico.

A literatura mostra que os monoterpenos são moléculas que apresentam atividade sobre o sistema cardiovascular com ação sobre canais iônicos de membrana. Entretanto, não há relato na literatura mostrando os efeitos do geraniol sobre a contratilidade miocárdica, eletrofisiologia do músculo cardíaco e seu possível efeito antiarrítmico. Dessa forma, o presente trabalho propõe investigar os efeitos cardíacos do geraniol tanto em nível funcional quanto sub-celular, assim como investigar o seu potencial antiarrítmico.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Caracterizar os efeitos produzidos pelo geraniol sobre a contratilidade e a atividade elétrica do miocárdio de mamífero.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar os efeitos inotrópicos do geraniol em átrio de cobaia;
- Estudar a ação deste monoterpene sobre o influxo de cálcio na célula atrial;
- Avaliar a ação do geraniol sobre a corrente de cálcio tipo-L em cardiomiócito ventricular isolado;
- Investigar os efeitos do geraniol sobre o potencial de ação ventricular;
- Pesquisar o envolvimento de canais para potássio na resposta inotrópica do geraniol em cardiomiócito ventricular isolado;
- Caracterizar os efeitos eletrocardiográficos deste composto em coração isolado de cobaia;
- Investigar o possível efeito antiarrítmico do geraniol em modelo de arritmia induzida pela ouabaína.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Drogas

As seguintes drogas foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA): geraniol (pureza de 97%, lote 01202ME), nifedipina, reserpina, ouabaína, (-)-BAY K8644 (1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-3-piridina ácido carboxílico metil éster), K-aspartato, protease tipo XXIII, tripsina de pâncreas suína, insulina, albumina de soro de bovino, HEPES (N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-ácido etanosulfônico]), EGTA (etileno glicol bis-β-aminometilester-N,N,N',N'-ácido tetraacético), NMDG (N-metil-D-glucamina), cloreto de tetraetilamônio (TEA), cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ), cloreto de cério ( $\text{CsCl}$ ), hidróxido de cério ( $\text{CsOH}$ ) e penicilina/estreptomicina. A collagenase do tipo II foi comprada da Worthington Biochemical Co. (Freehold, NJ, EUA). Dimetilsulfóxido (DMSO), cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ), hidróxido de potássio ( $\text{KOH}$ ), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), fosfato ácido de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) e glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) foram adquiridos a partir de Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) ou Merck (Darmstadt, Alemanha). A heparina foi adquirida da Roche (São Paulo, Brasil).

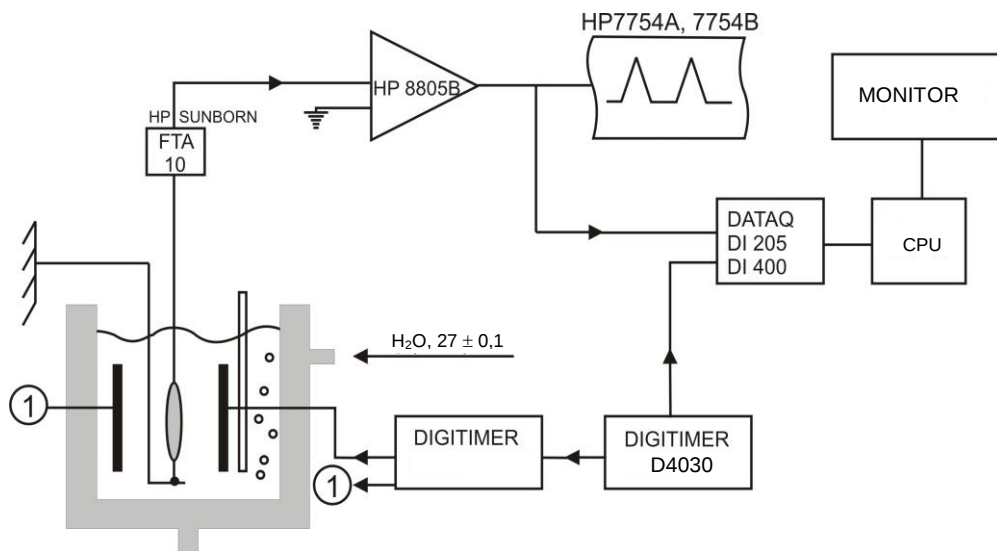
### 4.2 Animais

Para avaliar os efeitos do geraniol sobre a contratilidade cardíaca, eletrocardiograma e arritmia cardíaca foram realizados experimentos com cobaias machos (*Cavia porcellus*, 400 a 700 g). Para investigar os efeitos do geraniol sobre as correntes de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e parâmetros do potencial de ação, foram realizados experimentos em miócitos cardíacos ventriculares isolados de camundongos (*Mus musculus*) adultos machos (C57BL/6J). Os animais foram alimentados com ração comercial (Nutricobaia, Agribands do Brasil LTDA, Brasil) e submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas. Durante a execução dos experimentos, foram obedecidas as normas de manipulação dos animais propostas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Após sacrifício, os animais foram descartados segundo as recomendações do Departamento de Fisiologia/CCBS/UFS. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (Protocolo n° 49/12, Anexo I), da Universidade Federal de Sergipe, Brasil.

### 4.3 Protocolos experimentais

#### 4.3.1 Efeitos do geraniol sobre a contratilidade do átrio esquerdo de cobaia

As cobaias foram sacrificadas por decapitação, os corações foram retirados e o átrio esquerdo isolado foi montado em cuba para órgão com solução de Tyrode modificada de acordo com (Dorigo *et al.* 1990) (em mM: NaCl 120, KCl 2,7, MgCl<sub>2</sub> 0,9, NaHCO<sub>3</sub> 11,9, CaCl<sub>2</sub> 1,37, glicose 5,5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4, pH 7,2). Os átrios foram mantidos a  $29 \pm 0,1$  ° C, oxigenados com uma mistura de carbogênio (95% O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e estirados para uma tensão de repouso de 10 mN. O músculo foi submetido à estimulação do campo de 1 Hz, 70 V, durante 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 nifedipina foi utilizada como controle positivo para o efeito inotrópico negativo. A força atrial foi medida em situação-controle e também após a incubação de concentrações crescentes do geraniol (3 a 6000 µM) e da nifedipina (0,01 a 40 µM). Para cada concentração, a amplitude da força atrial foi determinada, permitindo, assim que fossem determinadas as respectivas CE<sub>50</sub> (concentração da droga capaz de reduzir em 50% a resposta máxima). O geraniol foisolubilizado em DMSO a 0,04% foram também realizadas as curvas concentração efeito para avaliar também sua resposta inotrópica.



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

#### 4.3.2 Efeitos do geraniol no influxo de $\text{Ca}^{2+}$ em átrio esquerdo de cobaia

Duas abordagens farmacológicas foram utilizadas para investigar o efeito de geraniol sobre o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  no tecido atrial. Estes experimentos foram realizados em átrios obtidos de cobaias previamente reserpinisadas (5 mg/kg, ip, 24 h antes do experimento). As curvas de concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$  (0,6 a 8 mM) e BAY K8644 (0,005 a 5  $\mu\text{M}$ ) (um agonista seletivo do canal para cálcio do tipo-L) foram obtidas antes e depois da pré-incubação dos átrios com 3 mM de geraniol, durante 15 min. Os resultados foram expressos em porcentagem da resposta contrátil atrial máxima do  $\text{CaCl}_2$  e BAY K8644.

#### 4.3.3 Avaliação do efeito do geraniol sobre as correntes de cálcio tipo-L ( $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ )

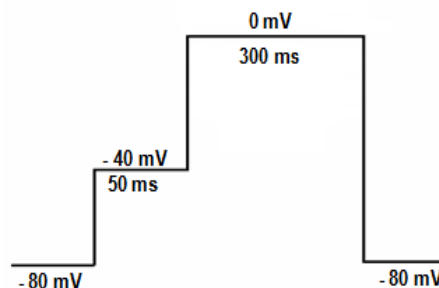
Os cardiomiócitos ventriculares de camundongos foram isolados conforme protocolo descrito anteriormente por (Shioya 2007). Os registros eletrofisiológicos foram obtidos utilizando-se a técnica de patch-clamp na modalidade whole-cell voltage-clamp para as medidas das correntes de potássio e cálcio. Para isto, foi empregado um amplificador EPC-10 (HEKA Instruments, Alemanha) controlado pelo software PULSE (HEKA Instruments). Os miócitos cardíacos foram colocados em solução externa (em mM): NaCl 140, KCl 5,4;  $\text{MgCl}_2$

1;  $\text{CaCl}_2$  1,8; HEPES 10 e glicose 10 (pH 7,4) contida em câmara de fundo transparente, que foi fixada à platina de um microscópio invertido (Axiovert 20, Zeiss, Alemanha). Para o registro das  $I_{\text{Ca,L}}$ , foram utilizadas pipetas de borossilicato preparadas com “puller” de dois estágios (PP830, Narishige, Japão), com resistência entre 1,0 a 2,0  $\text{M}\Omega$ , preenchidas com solução interna (em mM): CsCl 120, TEA 20, NaCl 5; HEPES 10 e EGTA 5 (pH foi ajustado para 7,2 utilizando CsOH).

Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (22-25 °C). Após o estabelecimento da configuração “whole-cell”, as células foram mantidas em repouso por 3 minutos, para que a solução da pipeta se equilibrasse com o meio intracelular. As células, em que após o estabelecimento da configuração “whole-cell” apresentavam resistência em série superior a 8  $\text{M}\Omega$ , foram descartadas.

#### 4.3.3.1 Avaliação do efeito do geraniol sobre o curso-temporal da $I_{\text{Ca,L}}$

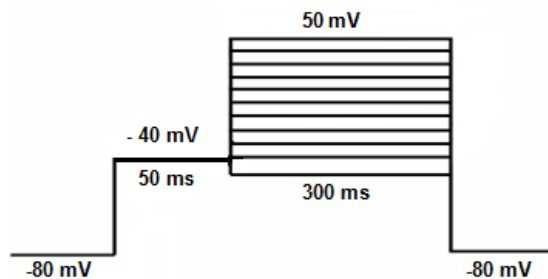
Para investigar os efeitos de 300  $\mu\text{M}$  geraniol sobre o curso temporal da  $I_{\text{Ca,L}}$ , foi utilizado o seguinte protocolo de pulsos: inicialmente a voltagem da membrana foi mantida em -80 mV “holding” e, a partir dela, foi aplicado um pré-pulso de -40 mV por 50 ms (a cada 10 s), a fim de inativar os canais rápidos de sódio e canais para  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-T. Em seguida, foi aplicado um pulsos-teste, despolarizando a membrana para 0 mV (300 ms), retornado em seguida ao potencial “holding” original (Fig. 11).



**Figura 11.** Protocolo de pulso executado para avaliar o efeito do geraniol sobre o curso-temporal da corrente de cálcio tipo-L ( $I_{\text{Ca,L}}$ ).

#### 4.3.3.2 Avaliação do efeito do geraniol sobre a relação corrente-voltagem da $I_{Ca,L}$

Para investigar os efeitos de 300  $\mu$ M de geraniol sobre a relação corrente-voltagem da  $I_{Ca,L}$  foi usado o seguinte protocolo de pulsos: inicialmente a voltagem da membrana foi mantida em -80 mV “holding” e, a partir dela, foi aplicado um pré-pulso de -40 mV por 50 ms (a cada 10 s). Em seguida, foram aplicados pulsos-teste que variaram de -50 mV a +50 mV (300 ms), em intervalos de 10 s e, após cada um deles, retornou-se ao potencial ‘holding’ original (Fig. 12). Nesse pulso-teste foram medidas as  $I_{Ca,L}$ . A curva de ativação foi ajustada pela equação de Boltzmann:  $G/G_{max}=1/1+\exp[(V-V_{0,5})/k]$  onde o  $V_{0,5}$  é a voltagem em que 50% da condutância máxima foi alcançada e  $k$  é o fator “slope”.



**Figura 12.** Protocolo de pulso executado para avaliar o efeito do geraniol sobre a relação corrente-voltagem da corrente de cálcio tipo-L ( $I_{Ca,L}$ ).

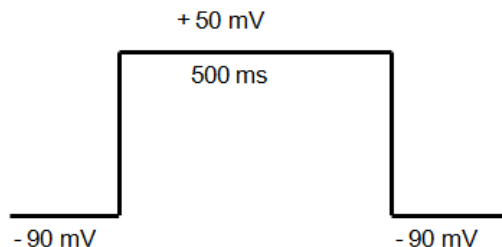
#### 4.3.4 Avaliação do efeito do geraniol sobre as correntes de potássio

Para avaliar o efeito de 300  $\mu$ M de geraniol sobre a corrente de potássio “transient outward” ( $I_{to}$ ), as células foram mantidas a um potencial de membrana de -90 mV e, então, foi aplicado um pulso despolarizante de +50 mV por 500 ms, em intervalos de 15 s. Nesses experimentos, as células foram perfundidas com solução de Tyrode modificada, no qual o NaCl foi substituído pelo NMDG, a fim de anular a corrente de sódio, e também foi acrescentado 100  $\mu$ M de  $CdCl_2$  com o objetivo de bloquear as correntes de cálcio (Fig. 13). As células que apresentaram um padrão de corrente estável, por no mínimo dois minutos, foram utilizadas nos estudos. Após 2 minutos de registro estável, as células foram perfundidas com solução

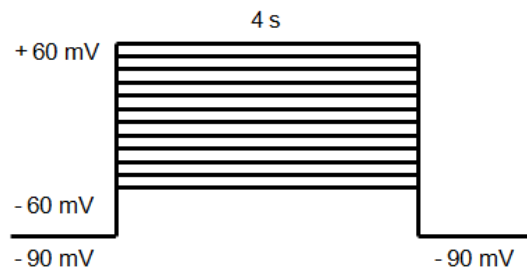
contendo geraniol (300  $\mu$ M), por no mínimo três minutos e, então, a solução controle foi perfundida novamente “washout”.

Para investigar o efeito do geraniol sobre a ativação dependente de voltagem para as correntes  $I_{to}$  e a corrente de potássio não-inativada ( $I_{ss}$ ), curvas corrente-voltagem foram obtidas na ausência e presença de geraniol. Para tanto, as células foram mantidas a um potencial de membrana de -90 mV e, então, pulsos de -60 a +50 mV (duração de 4 s e incrementos de 10 mV) foram aplicados a cada 15 s (0,066 Hz). As correntes para potássio ( $I_{to}$  and  $I_{ss}$ ) foram cineticamente isoladas como descrito previamente (Xu *et al.* 1999). Resumidamente, o pico da corrente de saída de  $K^+$  observada no início do pulso despolarizante foi assumido ser  $I_{to}$ , e a amplitude da corrente medida no final do impulso de 4 s foi considerado como  $I_{ss}$  (fig. 14) Para estudar a dependência de voltagem dessas correntes, a amplitude de corrente em cada potencial de membrana foi normalizada pela amplitude de corrente observada em +50 mV. As curvas foram normalizadas em função do potencial teste e foram ajustadas utilizando a equação de Boltzmann

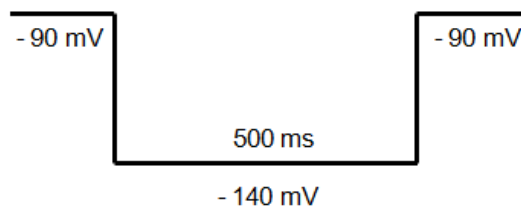
Para avaliar o efeito de 300  $\mu$ M de geraniol sobre a corrente de potássio “inward rectified” ( $I_{K1}$ ), as células foram mantidas a um potencial de membrana de -90 mV e, então, foi aplicado um pulso hiperpolarizante de -140 mV por 500 ms em intervalos de 15 s. As células foram perfundidas com solução de Tyrode contendo NMDG (Fig. 15). Foram também realizadas curvas corrente-voltagem para  $I_{K1}$  na ausência e na presença de 300  $\mu$ M de geraniol. Para tanto, as células foram mantidas a um potencial de membrana de -90 mV e, então, pulsos de -140 mV a -60 mV (duração de 500 ms e incrementos de 10 mV) foram aplicados a cada 15 s (Fig. 16). A composição da solução interna para todas as medições de corrente de  $K^+$  foi a seguinte (em mM): 130 K-aspartato, 20 de KCl, 10 HEPES, 2  $MgCl_2$ , 5 de NaCl e 5 EGTA (pH ajustado para 7,2 usando KOH).



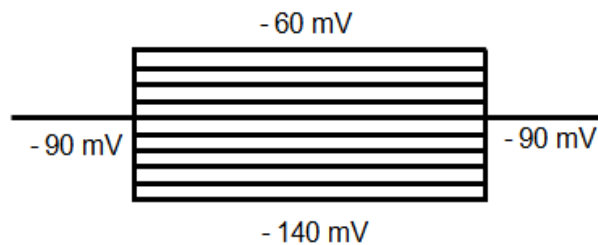
**Figura 13.** Protocolo de pulso executado para avaliar o efeito do geraniol sobre o curso-temporal da corrente de potássio ( $I_{to}$ ).



**Figura 14.** Protocolo de pulso executado para avaliar o efeito do geraniol sobre o a relação corrente-voltagem das correntes de potássio ( $I_{to}$  e  $I_{ss}$ ).



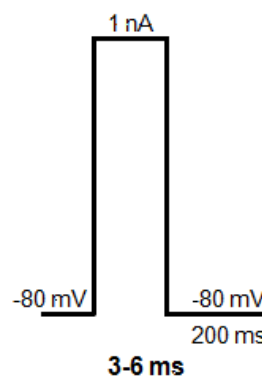
**Figura 15.** Protocolo de pulso executado para avaliar o efeito do geraniol sobre o curso-temporal da corrente de potássio ( $I_{K1}$ ).



**Figura 16.** Protocolo de pulso executado para avaliar o efeito do geraniol sobre o a relação corrente-voltagem da corrente de potássio ( $I_{K1}$ ).

#### 4.3.5 Efeitos do geraniol sobre o potencial de ação ventricular

Os registros do potencial de ação (PA) foram obtidos utilizando-se a técnica de “patch clamp” na modalidade “whole-cell current-clamp”. Para avaliar o efeito do geraniol sobre os diversos parâmetros do PA, as pipetas foram preenchidas com solução contendo (em mM): 130 K-aspartato, 20 KCl, 10 HEPES, 2  $\text{MgCl}_2$ , 5 NaCl e 5 EGTA, com pH ajustado para 7,4 com KOH. Foi utilizada solução de Tyrode como solução de banho, a qual era composta (em mM): 140 NaCl, 5,4 KCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 1,8  $\text{CaCl}_2$ , 10 HEPES e 10 glicose. As células foram mantidas a um potencial de membrana de -80 mV e, então, foram aplicados pulsos de amplitude de 1 nA, com duração entre 3 a 6 ms, a uma frequência de 1 Hz a fim de induzir a geração de PA (Fig. 17). As células que apresentaram um padrão de geração de PA estável, por no mínimo 2 minutos, foram utilizadas nos estudos. Após 2 minutos de registro estável, as células foram perfundidas com solução de Tyrode contendo 300  $\mu\text{M}$  de geraniol por no mínimo 2 minutos e, então, a solução controle foi perfundida novamente “washout”. A solução interna foi a mesma usada nas medidas de corrente para potássio. Os parâmetros do PA avaliados foram: duração do PA (DPA) medido a 10%, 50% e 90% da repolarização; taxa de despolarização ( $dV/dt$ ), e as alterações no potencial de repouso. As análises de duração do PA, bem como da taxa de despolarização foram realizadas com a ajuda do software Pulsefit (Versão 8.31, HEKA. Alemanha).



**Figura 17.** Protocolo de executado para avaliar o efeito do geraniol sobre a modulação do potencial de ação de cardiomiócitos.

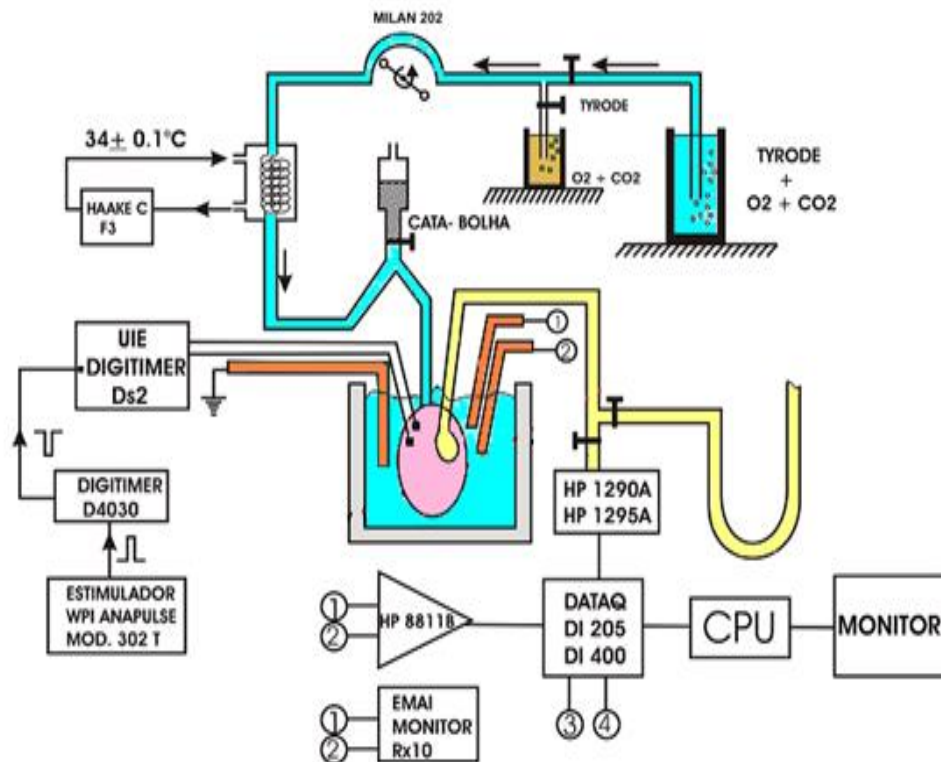
#### 4.3.6 Efeitos do geraniol sobre o perfil eletrocardiográfico e a pressão ventricular esquerda

O eletrocardiograma pode ser definido como uma sequência de grupo de ondas positivas e negativas, intercaladas por espaços, os quais são repetidos sucessivamente e correspondem a cada ciclo cardíaco. Na maioria dos sinais eletrocardiográficos adquiridos por cardioscópio é possível observar três resultantes elétricas dos eventos cardíacos: despolarização atrial (onda P), despolarização ventricular (complexo de ondas QRS) e repolarização ventricular (onda T) (Garcia 1998, Azevedo 1999). A perfusão aórtica retrógrada, do tipo Langendorff, em coração isolado representa um bom modelo para uma grande diversidade de descobertas acerca da fisiologia, patologia e farmacologia cardíaca, uma vez que grandes foram as contribuições obtidas com este modelo nos últimos cem anos, sendo considerado como um dos modelos mais populares em pesquisas com enfoque cardiovascular e farmacológico (Skrzypiec-Spring *et al.* 2007).

Após a administração subcutânea de heparina (1000 IU, ip, 30 min), o coração da cobaia foi cuidadosamente removido e montado sobre um sistema de perfusão aórtica de fluxo constante (Bomba peristáltica, Milan). O coração foi perfundido com uma solução de Tyrode, que havia sido previamente filtrado através de uma membrana de acetado celulose (0,45 µm) para evitar a microembolia (Harrison e Raymond 1951) oxigenada (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) e aquecida a  $34 \pm 0,1^\circ \text{C}$  (Haake F3, Berlim, Alemanha). O coração foi estimulado eletricamente com um par de eletrodos de aço inoxidável ligados ao átrio direito (Unidade Isoladora de Estímulo, SIU5, GRASS, Warwick, EUA). Para captar o sinal eletrocardiográfico (ECG), três eletrodos (Ag/AgCl/NaCl, 1 M) foram colocados mergulhados na solução de Tyrode onde o coração estava imerso. Esses sinais foram amplificados (HP7754A, HP7754B, Hewlett-Packard, Chicago, Illinois, EUA), digitalizados (DI- 710, Windaq Pro, DATAQ, 241 Springside Drive Suite 200, Akron, Ohio 44 333, EUA) e armazenados em um computador para processamento “off-line”. A preparação biológica foi deixada a estabilizar durante 30 min.

Para medir os parâmetros do ECG, tais como os intervalos PR, intervalos QT, e a duração do complexo QRS, o coração foi estimulado eletricamente. Para medir a frequência cardíaca (batimentos por minuto), o coração permaneceu com batimento espontâneo. A pressão intraventricular (PVE) foi determinada, em coração estimulado eletricamente e medida usando um balonete cheio de água introduzido na cavidade do ventrículo esquerdo

insuflado com água até uma pressão de 15 cmHg. Este dispositivo foi acoplado a um transdutor de pressão (HP 1290A). Os sinais foram amplificados (HP7754A, HP7754B, Hewlett-Packard, Chicago, Illinois, EUA), enviado a um conversor AD (DI- 710, Windaq Pro, DATAQ, 241 Springside Drive Suite 200, Akron, Ohio 44 333, EUA) e armazenados em um computador (Fig. 18).

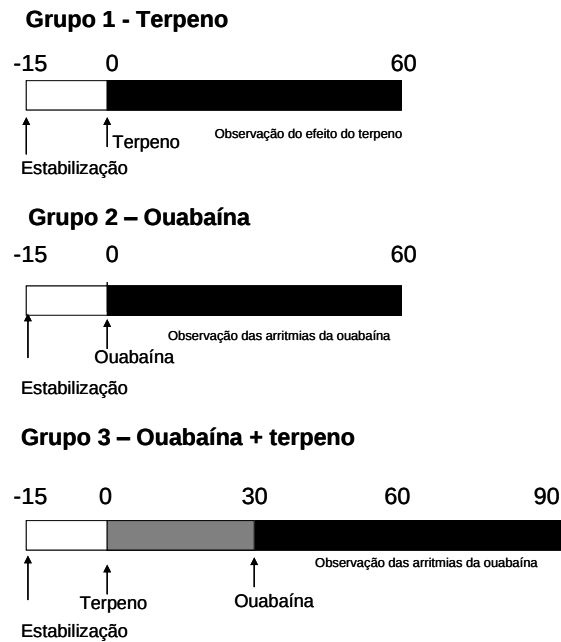


**Figura 18.** Representação esquemática do sistema de perfusão aórtica de fluxo constante do tipo Langendorff usado para obter os sinais eletrocardiográficos e a frequência espontânea do marcapasso dominante. UIE, unidade isoladora de estímulo (Vasconceslos 2005).

#### 4.3.7 Efeitos de geraniol sobre a arritmia induzida por ouabaína em átrio esquerdo de cobaia

Após a estabilização do átrio esquerdo de cerca de 30 minutos, substituindo a solução de Tyrode a cada 15 min, a ouabaína (1  $\mu$ M) foi adicionada ao banho de órgão isolado. Para avaliar o efeito do geraniol sobre a arritmia induzida pela ouabaína foi feita a pré-incubação (15 minutos) de geraniol (1,5 mM) e, após a estabilização, foi adicionado ouabaína ao banho

(Fig. 19). Foram avaliados os efeitos de geraniol sobre o inotropismo máximo (expresso em %), tonotropismo máximo (expresso em %) e sobre o tempo de aparecimento de arritmias induzidas pela ouabaína. Dois antiarrítmicos, nifedipina (1  $\mu$ M) e tetraetilamônio (20 mM), bloqueadores dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^{+}$ , respectivamente, foram utilizados como controle positivo.



**Figura 19.** Diagrama do protocolo experimental que será usado para avaliar o possível efeito antiarrítmico do geraniol sobre a arritmia induzida pela ouabaína.

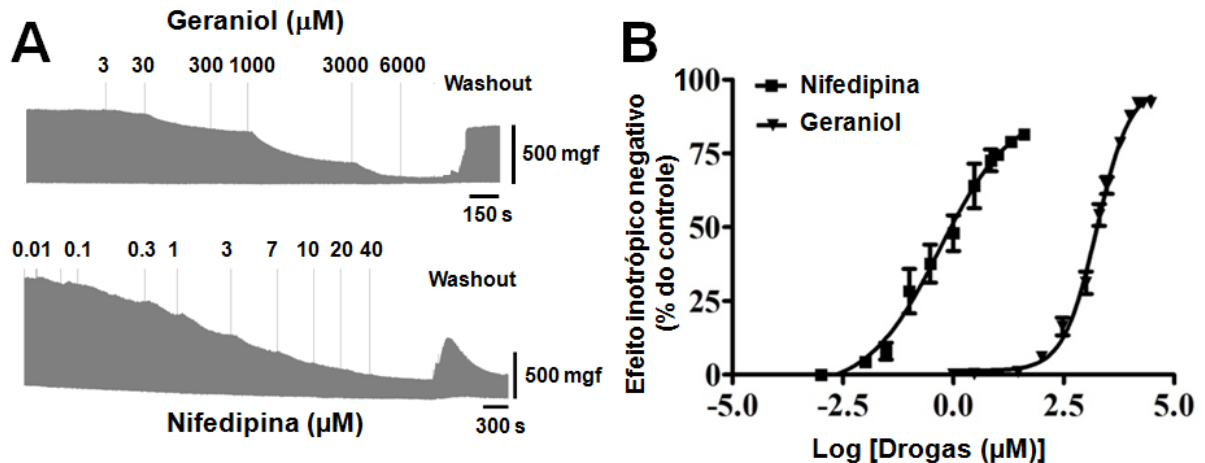
#### 4.4 Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como médias  $\pm$  S.E.M. O GraphPad Prism (GraphPad Software 5.0, CA, EUA) foi utilizado para análise estatística. Os valores médios foram comparados utilizando a análise de variância one-way ou two-way (ANOVA), a depender do caso, seguido do teste de Tukey,  $p < 0,05$  foi utilizado como o critério para significância estatística.

## 5 RESULTADOS

### 5.1. Efeito do geraniol sobre a força contrátil do átrio esquerdo de cobaia

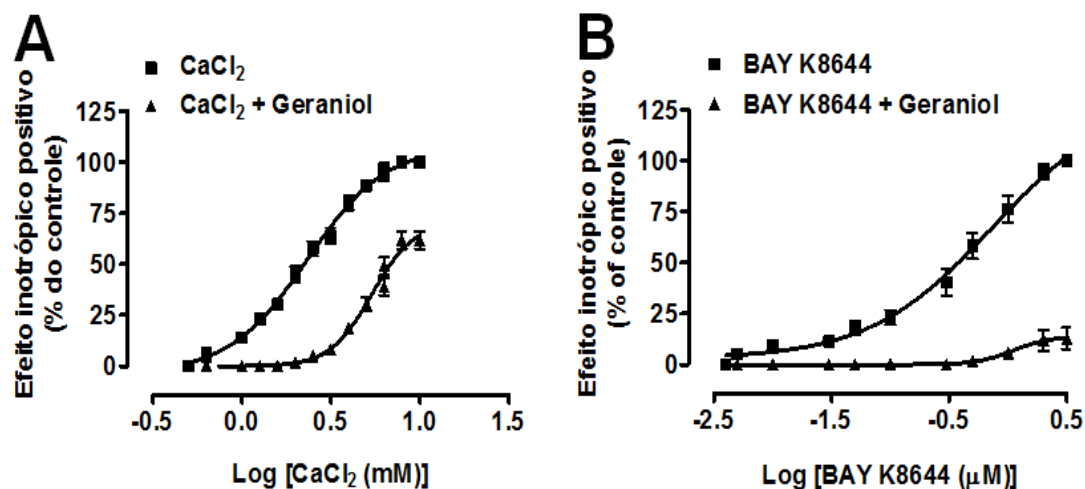
Em átrio esquerdo, estimulado eletricamente, o geraniol diminui a força contrátil de maneira dependente da concentração, e este efeito foi parcialmente restaurado após a retirada da droga ao banho. Nifedipina, um bloqueador de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L foi usado como controle positivo. Traçados representativos que ilustram o efeito inotrópico negativo do geraniol (painel superior) e nifedipina (painel inferior) são mostrados na Fig. 20 A. Em concentrações superiores a 3 mM, a diminuição da contratilidade do miocárdio promovida pelo geraniol foi de aproximadamente 98 %. A nifedipina reduziu a amplitude da contração em 75 % em concentrações iguais ou superiores a 20  $\mu\text{M}$ . A Fig. 20 B mostra as curvas de concentração-resposta do inotropismo negativo provocado por geraniol ( $n = 6$ , triângulos) ou nifedipina ( $n = 4$ , quadrados). Os valores de  $\text{CE}_{50}$  calculados foram  $1510 \pm 160 \mu\text{M}$  e  $0,90 \pm 0,66 \mu\text{M}$  para geraniol e nifedipina, respectivamente. O DMSO a 0,04% utilizado como veículo não alterou a contratilidade do atrio.



**Figura 20.** Efeito do geraniol sobre a força contrátil do átrio esquerdo de cobaia. (A) Traçados representativos mostrando a redução da força atrial em resposta ao geraniol (painel superior) e nifedipina (painel inferior). (B) Curvas de concentração-efeito do efeito inotrópico negativo do geraniol ( $\text{CE}_{50} = 1510 \pm 160 \mu\text{M}$ ,  $n = 6$ ) e nifedipina ( $\text{CE}_{50} = 0,90 \pm 0,66 \mu\text{M}$ ,  $n = 4$ ).

## 5.2 Efeito do geraniol sobre o influxo de $\text{Ca}^{2+}$ no átrio esquerdo de cobaia

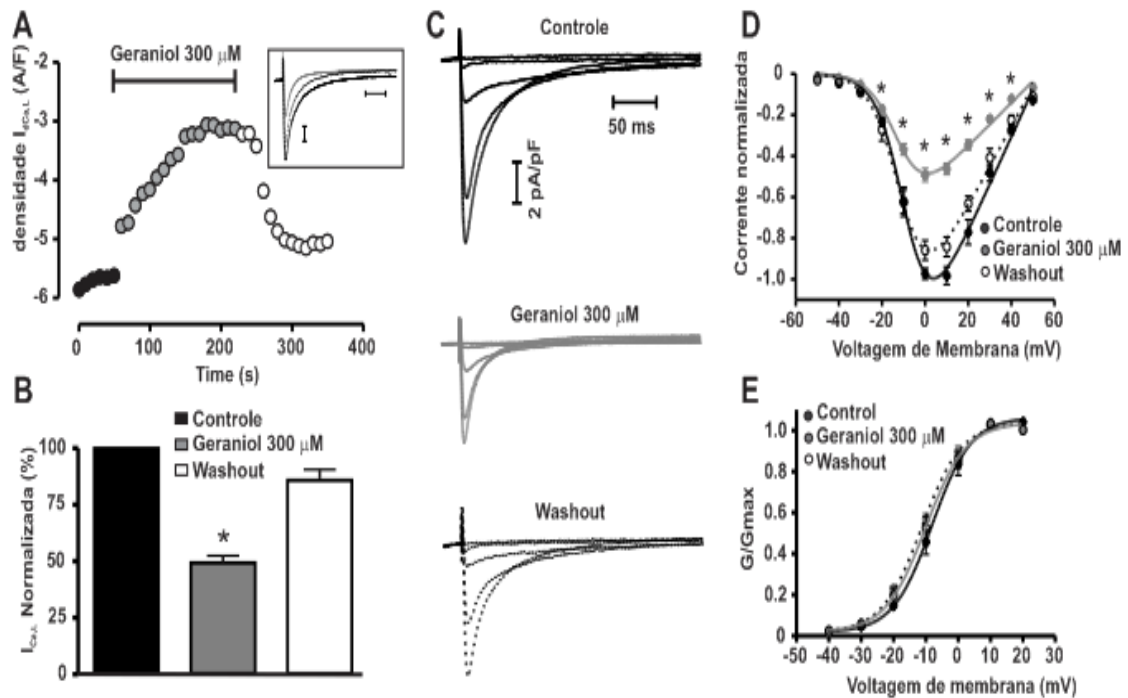
Para investigar se o efeito cardiodepressor evocado pelo geraniol estava relacionada a mudanças no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , o  $\text{CaCl}_2$  foi adicionado cumulativamente ao banho. Em resposta ao aumento crescente do cálcio extracelular, um novo estado inotrópico cardíaco foi alcançado uma vez que ocorre aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  quando a concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  é elevada. Assim, as drogas que modificam a curva de concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$ , provavelmente, estão agindo através de Cav. O geraniol (3 mM) deslocou a curva do  $\text{CaCl}_2$  para a direita, aumentando o valor  $\text{CE}_{50}$  de  $2,49 \pm 0,39$  mM pra  $5,37 \pm 0,47$  mM (Fig. 21 A,  $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ). Estes resultados sugerem que o geraniol diminui o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células cardíacas. Para dar suporte a essa hipótese, foi avaliado o efeito de geraniol sobre a resposta inotrópica positiva evocada por BAY K8644, um agonista seletivo para o canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L. O geraniol também deslocou a curva do BAY K8644 para a direita aumentando a  $\text{CE}_{50}$  de  $0,72 \pm 0,44$   $\mu\text{M}$  para  $1,10 \pm 0,38$   $\mu\text{M}$  (Fig. 21 B,  $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ).



**Figura 21.** Efeitos do geraniol sobre a curva concentração-resposta do  $\text{CaCl}_2$  (A) e do BAY K8644 (B). O geraniol (3 mM) reduziu o efeito inotrópico positivo tanto do  $\text{CaCl}_2$  quanto do BAY K8664 ( $n = 6$ ).

### 5.3 Efeito do geraniol sobre a corrente de $\text{Ca}^{2+}$ tipo-L em cardiomiócito ventricular

Para testar se o geraniol bloqueia diretamente os  $\text{Ca}_v$ , medimos a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) em cardiomiócitos ventriculares isolados utilizando a técnica de “patch-clamp”. A Fig. 22 A demonstra o efeito de geraniol (300  $\mu\text{M}$ ) sobre a  $I_{\text{Ca,L}}$  em função do tempo. O geraniol diminuiu o pico da  $I_{\text{Ca,L}}$  de -5,68 A/F para -3,05 A/F, após 2 min de perfusão, e este efeito foi quase completamente revertido após remoção do geraniol (-5,14 A/F). A Fig. 13 A mostra traçados representativos do efeito de geraniol sobre a  $I_{\text{Ca,L}}$ . Os resultados mostraram que o geraniol (300  $\mu\text{M}$ ) reduziu o  $I_{\text{Ca,L}}$  em  $50,70 \pm 3,18\%$  (Fig. 22 B,  $n = 5$ ,  $P < 0,0001$ ). Foi observado também que o geraniol não alterou a curva corrente-voltagem do canal para  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L. A Fig. 22 C ilustra traçados típicos de  $I_{\text{Ca,L}}$  em diferentes voltagens de membrana (-40 mV a 0 mV), antes (painel superior), durante a perfusão com 300  $\mu\text{M}$  de geraniol (painel do meio), e após a remoção do geraniol (painel inferior). Como representado na Fig. 13 D, o geraniol reduziu significativamente a  $I_{\text{Ca,L}}$  nas voltagens de -10 mV a 40 mV ( $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ). A curva de condutância (Fig. 13 E) revelou que o geraniol não alterou o  $V_{0,5}$  ( $-8,06 \pm 0,85$  mV vs  $-11,27 \pm 0,54$  mV,  $n = 5$ ,  $p > 0,05$ ) nem alterou o fator de inclinação da curva ( $6,05 \pm 0,79$  vs  $6,19 \pm 0,51$ ,  $n = 5$ ,  $p > 0,05$ ). Estes dados sugerem que geraniol não altera a ativação dependente de voltagem dos canais para cálcio tipo-L.

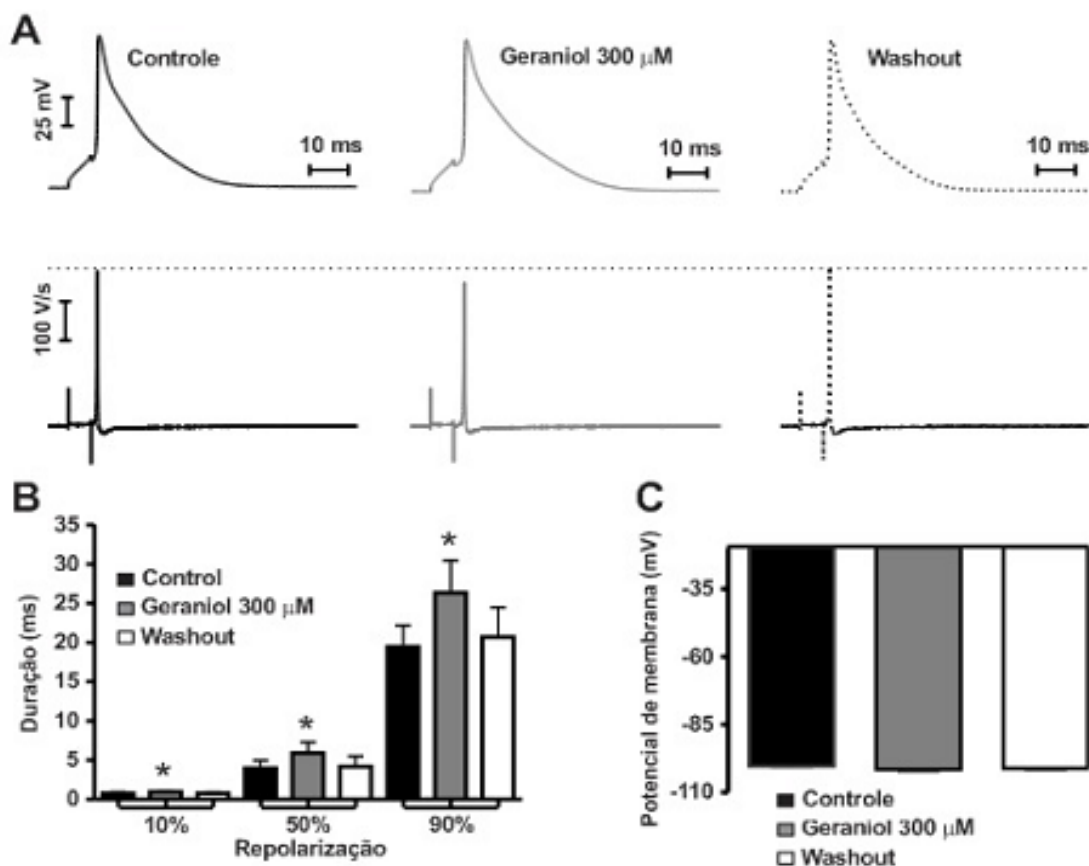


**Figura 22.** Efeito do geraniol sobre as correntes de cálcio tipo-L ( $I_{Ca,L}$ ) em cardiomiócitos ventriculares de camundongos. (A) Curso-temporal do efeito do geraniol (300  $\mu$ M) sobre a densidade da  $I_{Ca,L}$ . A inserção mostra registros da  $I_{Ca,L}$  antes, durante e depois da exposição ao geraniol. As barras de tempo e densidade de corrente correspondem a 50 ms e 1 A/F, respectivamente. (B) Efeito médio do geraniol sobre as  $I_{Ca,L}$ . (C) Traçados típicos das  $I_{Ca,L}$  de -40 mV a 0 mV (em incrementos de 10 mV) em condições controle, com 300  $\mu$ M de geraniol, e após “washout” (n = 5 células, \* p < 0,05). (D) Curva da relação corrente-voltagem para  $I_{Ca,L}$  na ausência, presença, e após o “washout”. (E) Curva de ativação dependente de voltagem da  $I_{Ca,L}$  em miócitos ventriculares (n = 5 células).

#### 5.4 Ação do geraniol sobre a configuração do potencial de ação ventricular

Uma vez identificado que o geraniol inibiu canais de  $Ca^{2+}$  do tipo-L, resolveu-se avaliar se este monoterpene também era capaz de modular a configuração do potencial de ação (PA) ventricular. A Fig. 23 A mostra registros de PA obtidos a partir de cardiomiócitos ventriculares (painel superior) na situação de controle (painel esquerdo), durante a perfusão com 300  $\mu$ M de geraniol (painel central) e depois do “washout” (painel direito). O respectivo  $dV/dt$  de cada PA é mostrado abaixo de cada PA. Como podemos observar o geraniol aumentou a duração do PA (DPA) e diminuiu a  $dV/dt$  de 376,7 V/s de 345,8 V/s (8,2%, n = 5,

$p < 0,05$ ). A Fig. 23 B mostra os aumentos da DPA medidos em 10 % ( $0,77 \pm 0,12$  ms para  $0,93 \pm 0,11$  ms, 20,78 %,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ), a 50% ( $3,94 \pm 0,99$  ms para  $5,90 \pm 1,38$  ms, 49,75%,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ) e a 90% da repolarização ( $19,43 \pm 2,76$  ms para  $26,35 \pm 4,1$  ms, 35,61 %,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ) induzida por 300  $\mu$ M de geraniol. É importante ressaltar que estes efeitos foram completamente revertidos após a remoção do geraniol da solução externa. Por outro lado, o geraniol foi incapaz de alterar o potencial de membrana (Fig. 23 C) ou o “overshoot” do PA.

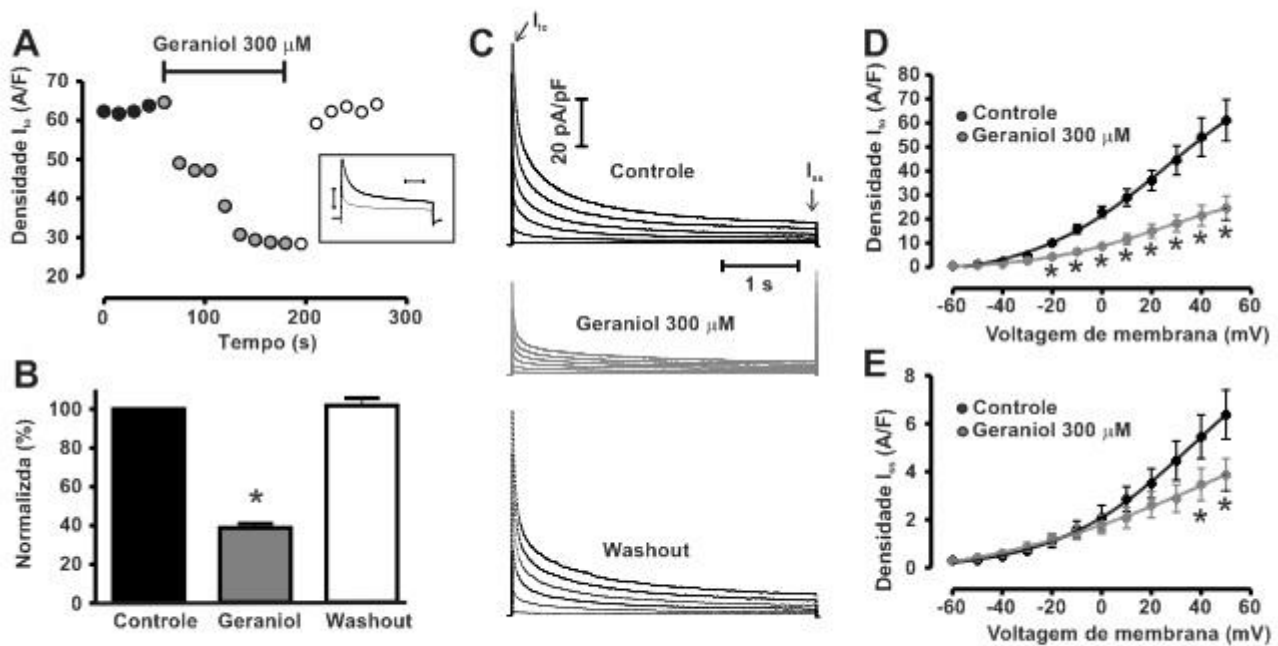


**Figura 23.** Modulação da configuração do potencial de ação (PA) e potencial de repouso da membrana pelo geraniol em cardiomiócitos ventriculares de camundongos. (A) Traçados representativos do PA cardíaco (painel superior) e a taxa de despolarização (fase 0) ( $dV/dt$ ) de cada PA (painel inferior) na ausência, presença e após lavagem de 300  $\mu$ M de geraniol. (B) Efeito de 300  $\mu$ M de geraniol na duração do PA medido a 10%, 50% e 90% da repolarização ( $n = 5$  células,  $*p < 0,05$ ) e (C) sobre o potencial de membrana ( $n = 5$  células).

### 5.5 Efeitos do geraniol sobre as correntes para potássio em cardiomiócito ventricular

Muitos tipos de correntes para  $K^+$  estão envolvidos no processo de repolarização do músculo cardíaco. Já que o geraniol prolongou significativamente a DPA em cardiomiócitos ventriculares, investigamos se ele afetaria as correntes para  $K^+$ . A Fig. 24 A ilustra o efeito de 300  $\mu$ M de geraniol sobre a  $I_{to}$  em função do tempo. O geraniol inibiu significativamente a densidade da  $I_{to}$  na voltagem teste de 50 mV (de 64,65 para 28,38 A/F). Este efeito foi completamente reversível após a retirada do geraniol.

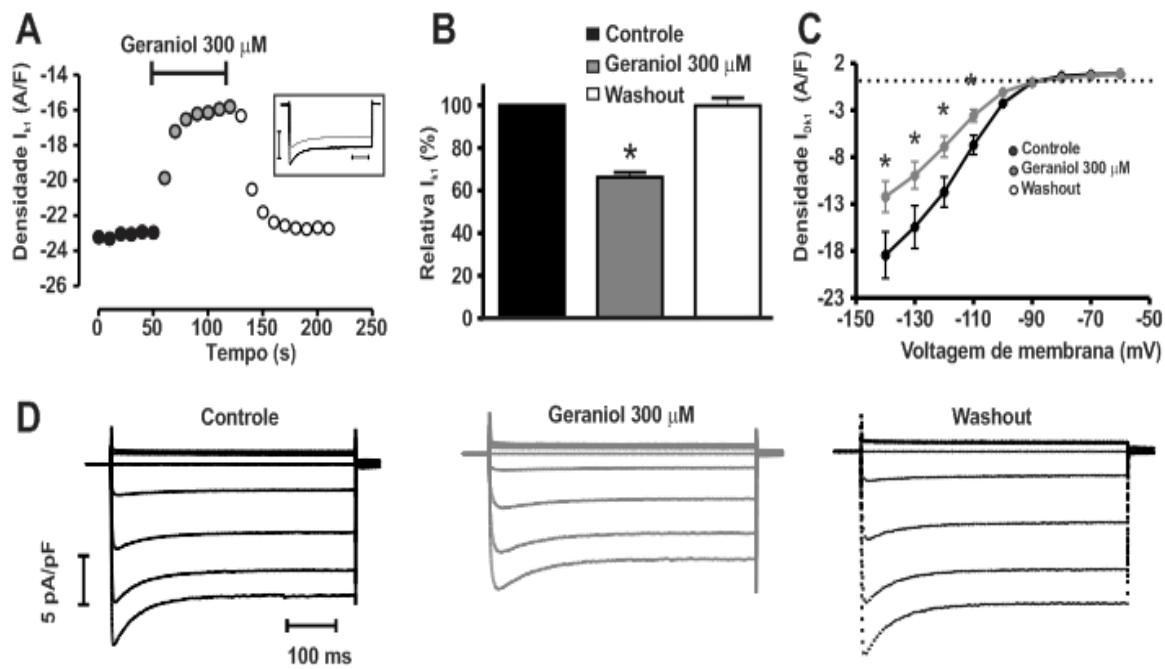
A Fig. 24 A exibe traçados representativos sobrepostos da  $I_{to}$  registrados na ausência ou na presença de geraniol e, após o “washout”. Após normalização da amplitude da  $I_{to}$  (Fig. 24 B), observou-se que 300  $\mu$ M de geraniol reduziu a  $I_{to}$  de  $61,11 \pm 17,90$  A/F para  $24,59 \pm 9,95$  A/F (59,76 %,  $n = 4$ ,  $p < 0,001$ ). A Fig. 24 C mostra as correntes de potássio  $I_{to}$  e  $I_{ss}$  que foram medidas antes (painel superior), durante (painel central) e depois do “washout” do geraniol (painel inferior). Os resultados mostraram que 300  $\mu$ M de geraniol inibiu significativamente ambas as correntes  $I_{to}$  e  $I_{ss}$  (mostradas pelas setas no painel superior da Fig. 24 C). A relação corrente-voltagem indicou que o geraniol diminuiu a densidade da corrente de  $I_{to}$  (Fig. 24 D) nas voltagens de -20 a +50 mV ( $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ) e reduziu a amplitude de  $I_{ss}$  (Fig. 24 E), nas voltagens de 40 a 50 mV ( $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ). A dependência de voltagem para ativação da  $I_{to}$  não foi alterada por 300  $\mu$ M de geraniol. Em contraste, o geraniol deslocou a curva de ativação dependente de voltagem da  $I_{ss}$  para a esquerda, diminuindo o  $V_{0.5}$  de  $12,80 \pm 0,8$  para  $2,73 \pm 1,31$  mV ( $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ).



**Figura 24.** Efeito de 300  $\mu$ M de geraniol na corrente de saída de  $K^+$  ( $I_{to}$ ) em cardiomiócitos ventriculares de camundongos. (A) Curso-temporal do efeito do geraniol (300  $\mu$ M) na densidade da  $I_{to}$ . A inserção mostra traçados característicos de  $I_{to}$  antes, durante e depois da exposição ao geraniol. As barras de densidade do tempo e corrente correspondem a 50 ms e 20 A/F, respectivamente. As células foram mantidas num potencial de repouso de -90 mV, então despolarizadas para 50 mV (por 300 ms) em um intervalo de 15 s. (B) O efeito médio do geraniol na amplitude da  $I_{to}$  (n = 4 células, \*p < 0,05). (C) Traçados de correntes de  $K^+$  em miócitos ventriculares no controle (painel superior), com geraniol (painel médio), e “washout” (painel inferior). Os registros representam correntes obtidas de -50 até 50 mV (por 4 s) em incrementos de 20 mV (potencial de repouso de -90 mV). As setas mostram onde as correntes de  $I_{to}$  e  $I_{ss}$  foram medidas. A relação de corrente-voltagem para  $I_{to}$  (D) e  $I_{ss}$  (E) sob condições de controle e durante a exposição de 300  $\mu$ M de geraniol (n = 4 células, \* p < 0,05).

A Fig. 25 A mostra o efeito do geraniol sobre a  $I_{K1}$  em função do tempo. O geraniol diminuiu significativamente, e de maneira reversível, a densidade da  $I_{K1}$ . A Fig. 25 A mostra traçados sobrepostos da  $I_{K1}$  no controle e durante a exposição do geraniol (300  $\mu$ M). Os valores médios da  $I_{K1}$  são mostrados na Fig. 25 B no qual foi observado que o geraniol reduziu a amplitude da  $I_{K1}$  de  $-18,43 \pm 2,45$  A/F para  $12,21 \pm 1,65$  A/F (33,76%, n = 4, p < 0,0001). A Fig. 25 C mostra também a relação corrente-voltagem (-140 a -60 mV) para  $I_{K1}$ . Os traçados representativos da  $I_{K1}$  no controle (painel esquerdo), durante a perfusão com o

geraniol (painel central) e, após “washout” da droga (painel direito) são mostradas na Fig. 25 D. Os dados indicam que o geraniol inibiu a  $I_{K1}$  em potenciais de membrana que variaram de -140 a -110 mV ( $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ). Não foram observadas alterações no potencial de equilíbrio de  $K^+$  na presença de geraniol.



**Figura 25.** Efeito do geraniol sobre a corrente de  $K^+$  “inward rectifier current” ( $I_{K1}$ ) em cardiomiócito ventricular. (A) Curso temporal do efeito de 300  $\mu$ M de geraniol sobre a densidade de corrente  $I_{K1}$ . A figura inserida mostra traçados representativos da  $I_{K1}$  antes, durante, e após o “washout”. As barras de tempo e densidade de corrente correspondem a 50 ms e 10 A/F, respectivamente. As células foram mantidas em potencial holding de -90 mV e, então, hiperpolarizadas para -140 mV (300 ms) em intervalos de 15 s. (B) Valores médios da corrente  $I_{K1}$  relativa ( $n = 4$  células, \*  $p < 0,0001$ ). (C) A relação corrente-voltagem para  $I_{K1}$  sobre condição controle e durante a exposição a 300  $\mu$ M de geraniol ( $n = 4$  células, \* $p < 0,05$ ). (D) Traçados da  $I_{K1}$  registrados em miócitos ventriculares antes (esquerda), durante (central), e na presença de geraniol (direita). Os registros representam correntes evocadas por pulsos de -140 to -60 mV (por 300 ms) em incrementos de 10 mV (potencial holding foi de -90 mV).

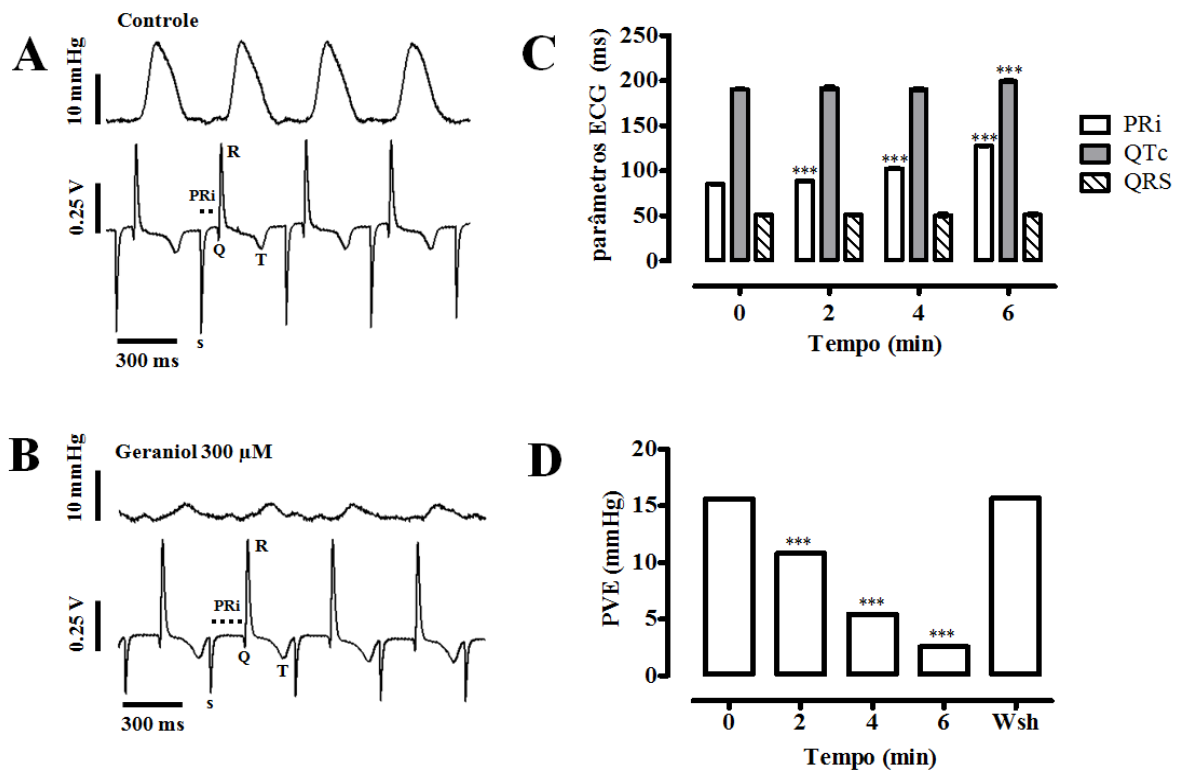
## 5.6 Efeitos do geraniol sobre parâmetros eletrocardiográficos e pressão ventricular esquerda (PVE)

Para avaliar os efeitos do geraniol sobre as propriedades mecânicas e elétricas no do coração inteiro, foram feitas medidas simultâneas da PVE e do ECG. A Fig. 26 A e B exibem traçados típicos da PVE (painel superior) e do ECG (painel inferior) do coração durante a perfusão com solução de Tyrode (controle) e 300  $\mu$ M de geraniol, respectivamente. No coração estimulado eletricamente, o geraniol reduziu significativamente a PVE em 80% e aumentou o PRi (linha tracejada). A Fig. 26 C mostra que o geraniol aumentou o PRi de  $84,4 \pm 0,93$  ms para  $127,9 \pm 0,43$  ms ( $n = 6$ ,  $p < 0,001$ ) e o QT<sub>i</sub> de  $190,9 \pm 0,32$  ms para  $199,6 \pm 0,57$  ms ( $n = 6$ ,  $p < 0,001$ ) após 6 min de perfusão. A duração do complexo QRS não foi alterada por 300  $\mu$ M de geraniol. Semelhante à redução observada na força atrial, o geraniol marcadamente reduziu a PVE (Fig. 26 D) em 83% ( $15,62 \pm 0,03$  mmHg para  $2,57 \pm 0,05$  mmHg,  $n = 6$ ,  $p < 0,001$ ). Em corações batendo espontaneamente, o geraniol reduziu a frequência cardíaca em 16,5% ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ).

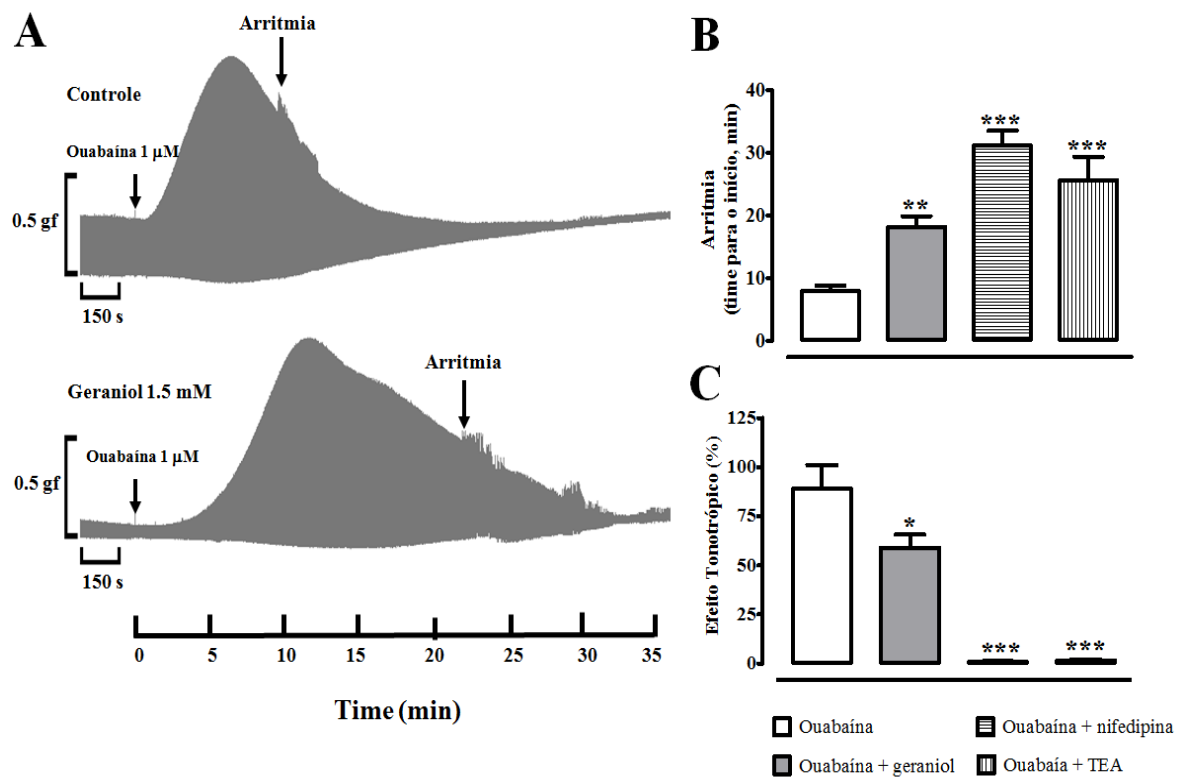
## 5.7 Efeitos do geraniol sobre a arritmia induzida pela ouabaína

Os resultados mostraram que o geraniol bloqueou algumas correntes de membrana ( $I_{Ca,L}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{K1}$  e  $I_{ss}$ ) e, portanto, resolveu-se investigar o possível efeito antiarrítmico do geraniol. Para este fim, foi usado um modelo experimental, em átrio isolado, no qual a arritmia foi induzida pela ouabaína, um inibidor da bomba de  $Na^+/K^+$ . A Fig. 27 A mostra registros típicos da força contrátil do átrio. O painel superior mostra que 1  $\mu$ M de ouabaína induziu um efeito inotrópico positivo e transitório, seguido pelo aparecimento de batimentos extras sistólicos (início da arritmia está representado pelas setas). Na situação controle, as arritmias foram inicialmente observadas aproximadamente 10 min após a incubação da ouabaína. A ouabaína também aumentou a tensão diastólica (efeito tonotrópico) do miocárdio atrial. O painel A inferior mostra que a pré-incubação do tecido atrial com geraniol (1,5 mM) aumentou o tempo para o início das arritmias induzidas pela ouabaína para aproximadamente 22 min. Além disso, é importante destacar que a pré-incubação com o geraniol também diminuiu o efeito tonotrópico induzido pela ouabaína. A Fig. 27 B sumariza o tempo para o início das arritmias induzido por ouabaína em várias condições experimentais. A pré-

incubação com geraniol aumentou o tempo de aparecimento de arritmias de  $7,94 \pm 0,86$  min a  $18,14 \pm 1,77$  min ( $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ). A nifedipina ( $1 \mu\text{M}$ ) e o TEA ( $20 \text{ mM}$ ) foram usados como controle positivo para a atividade antiarrítmica. Ambas as drogas prolongaram o tempo de início de arritmia (Fig. 27 B). Além disso, foi verificado que o geraniol, nifedipina e TEA não interferiram com a resposta inotrópica positiva de ouabaína. No entanto, o aumento na tensão diastólica induzida pela ouabaína ( $88,80 \pm 12,13\%$ ) foi reduzido na presença de geraniol ( $59,0 \pm 6,59\%$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) e quase abolida pela nifedipina ( $0,83 \pm 0,47\%$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0,001$ ) ou TEA ( $1,50 \pm 0,72 \%$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0,001$ ).



**Figura 26.** Efeito do geraniol sobre parâmetros do ECG e pressão ventricular esquerda (PVE). (A) Traçados representativos de PVE (painel superior) e ECG (painel inferior) em coração de cobaia em condição controle e (B) durante a exposição a  $300 \mu\text{M}$  de geraniol. (C) Curso-temporal do efeito do geraniol sobre o intervalo PR (PRi), intervalo QT (QTc) e duração do complexo QRS. (D) Curso-temporal do efeito do geraniol sobre a PVE ( $n = 6$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).



**Figura 27.** Traçados experimentais da contratilidade do átrio esquerdo de cobaia mostrando os efeitos inotrópico e arritmogênico de 1  $\mu$ M de ouabaína sob condição controle (A, painel superior) e após a pré-incubação com 1,5 mM de geraniol (A, painel inferior). Efeito de 1,5 mM de geraniol, 1  $\mu$ M de nifedipina e 20 mM de TEA sobre o tempo de início das arritmias (B) e (C) efeito tonotrópico induzido pela ouabaína (n = 6, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001).

## 6 DISCUSSÃO

Dentre as atividades biológicas verificadas, nesse estudo para o geraniol, destacamos a redução da força contrátil do coração de forma dependente da concentração e reversível parcialmente após o “washout”. A reversibilidade da força contrátil atrial, após a remoção do geraniol do banho de órgãos, é um parâmetro importante pois indica que ele não exerceu qualquer efeito tóxico sobre as células cardíacas na faixa de concentração estudada.

Sabe-se que a força contrátil do miocárdio depende da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático livre e do seu influxo pelos canais tipo-L. Dentro de uma faixa de voltagem definida, eles permitem o influxo de cálcio através da membrana plasmática. Subsequentemente, o influxo de cálcio gera liberação de cálcio de fontes intracelulares levando ao aumento geral na concentração de cálcio citosólico (Karaki *et al.* 1997, Smith *et al.* 2003).

Como esse mecanismo é importante na regulação da força contrátil do miocárdio, resolvemos investigar se existia uma correlação entre a diminuição da força contrátil do miocárdio promovido pelo geraniol e a diminuição na entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através do sarcolema. Como foi verificado que o geraniol deslocou para a direita as respostas inotrópicos positivas induzidas tanto pelo  $\text{CaCl}_2$  quanto pelo BAY K8644, podemos inferir que esse monoterpene diminui o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células miocárdicas levando, conseqüentemente, a diminuição da força contrátil. Para confirmar essa hipótese, foram feitas medidas da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L utilizando a técnica de “patch-clamp”. Como era de se esperar, o geraniol bloqueou os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo-L sem alterar sua ativação dependente de voltagem, ou seja, sem alteração na condutância do canal. Essa diminuição da corrente cálcio já é suficiente para promover o decréscimo de força atrial e ventricular promovida pelo geraniol em coração de cobaia.

Drogas que bloqueiam a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pertencem a um grupo quimicamente heterogêneo de substâncias que oferecem um potencial benefício terapêutico para o tratamento de doenças cardiovasculares, tais como o tratamento da hipertensão arterial e as arritmias cardíacas (Luft *et al.* 1999). Embora o perfil farmacológico e o local exato de ação possam ser diferentes, estes compostos partilham a capacidade de inibir o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , o qual ocorre principalmente durante a despolarização da membrana.

Os monoterpeneos são compostos que exibem grande atividade farmacológica (Alwan 2011) com capacidade de modular várias correntes iônicas de membrana, incluindo as correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  (de Araújo *et al.* 2011). O bloqueio de correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  foi verificado por

vários outros terpenos em células cardíacas, tais como a R(+)-pulegona em cardiomiócito ventricular de camundongo (de Cerqueira *et al.* 2011), (-)-mentol em cardiomiócito ventricular de coelho (Kastor 1996), o timol agindo tanto em células canina e ventricular humana (Baylie *et al.* 2010), e a rotundifolona (Silva *et al.* 2011) e farnesol em ratos miócitos (Roullet *et al.* 1997, Magyar *et al.* 2004).

Além de reduzir as correntes de  $\text{Ca}^{2+}$ , o geraniol também prolongou significativamente a DPA a 90%, 50% e 10% da repolarização do cardiomiócito ventricular, sem alterar o potencial de repouso. Sabemos que as correntes de  $\text{K}^+$  são responsáveis, pelo menos em parte, pela fase de repolarização do PA cardíaco, de forma que estes dados fornecem fortes evidências para o envolvimento de canais de  $\text{K}^+$ , dependentes de voltagem, no mecanismo de ação do geraniol. As correntes de  $\text{K}^+$  através dos canais  $I_{\text{to}}$ ,  $I_{\text{K1}}$  e  $I_{\text{Ks}}$  são correntes críticas que controlam o movimento de  $\text{K}^+$  através da membrana do cardiomiócito (Tamargo *et al.* 2004). Nesse estudo, foram avaliadas as contribuições de  $I_{\text{to}}$ ,  $I_{\text{K1}}$  e  $I_{\text{ss}}$  no prolongamento da DPA induzida pelo geraniol. Os resultados mostraram que o geraniol foi capaz de inibir as três correntes:  $I_{\text{to}}$ ,  $I_{\text{K1}}$  e  $I_{\text{ss}}$ , de maneira reversível. A literatura mostra que as correntes de  $\text{K}^+$  também foram suprimidas por outros compostos naturais, tais como a zingerona (Castle 1992, Baylie *et al.* 2010), eugenol (Sensch *et al.* 2000), de R(+)-pulegona (de Cerqueira *et al.* 2011) e timol (Baylie *et al.* 2010), em vários tipos de cardiomiócitos de mamíferos.

A corrente  $I_{\text{Ks}}$  pode ser classificada em muitos subtipos, e entre eles, a  $I_{\text{ss}}$  investigada no nosso estudo, desempenha um importante papel na eletrofisiologia cardíaca (Nerbonne 2005). A  $I_{\text{to}}$  é uma corrente que está ativa durante a fase inicial da repolarização do PA cardíaco, e que desempenha um papel crucial na modulação do PA (Wang *et al.* 2013). Tem sido relatado que a  $I_{\text{to}}$  rápida ( $I_{\text{to,fast}}$ ) pode ser atribuída a  $\text{Kv}4.2/4.3$ , e  $I_{\text{to}}$  lenta ( $I_{\text{to,slow}}$ ) é mediada por  $\text{Kv}1.4/1.7/3.4$  (Xu *et al.* 1999, Nerbonne 2000, Grant 2009). Essas duas correntes são ativadas rapidamente, mas a  $I_{\text{to,fast}}$  é inativada mais rapidamente. A maioria dos mamíferos apresentam  $I_{\text{to,fast}}$  e  $I_{\text{to,slow}}$  em miócitos ventriculares (Nerbonne *et al.* 2001). A redução em  $I_{\text{to}}$  controla a duração do PA, de maneira dependente de espécie. Em roedores, a redução da  $I_{\text{to}}$  prolonga a duração do PA (Grant 2009). Linz & Meyer (2000) constataram que o músculo ventricular de cobaia não expressa a corrente  $I_{\text{to}}$ , e como consequência, o PA cardíaco desses animais apresenta a fase 1 (repolarização incompleta) diminuída e elevação da fase de platô do PA (Greenstein *et al.* 2000). Em grande mamíferos, a redução em  $I_{\text{to}}$  desloca a fase de platô para potenciais mais positivos, aumenta a ativação de  $I_{\text{ss}}$  (promotor de

uma repolarização mais rápida) e diminui a força do gradiente eletroquímico que conduz o  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular, levando a uma redução da  $I_{\text{Ca,L}}$  (Grant 2009).

Em potenciais hiperpolarizados, o canal  $I_{\text{K1}}$  apresenta uma condutividade maior do que qualquer outra corrente, dessa forma, esta corrente determina o potencial de membrana em repouso (eletronegativo) e contribui também para a fase 3 de repolarização (Lopatin 2001). Esta corrente diminui quando a célula cardíaca inicia o seu processo de despolarização, permanecendo com baixa condutância nas fases 1 e 2 do PA.

O geraniol modulou várias correntes iônicas em cardiomiócitos ventricular isolado, sugerindo que ele promove alterações eletrofisiológicas significativas em todo o coração. Dessa forma, decidiu-se investigar as alterações eletrocardiográficas promovidas pelo geraniol. Os resultados mostraram que as alterações no ECG induzidas pelo geraniol foram consistentes com os efeitos observados ao nível celular. Foi verificado um aumento do intervalo PR ou bloqueio atrioventricular de 1º (BAV 1º) em resposta ao geraniol, indicando que este monoterpene prejudica a condução pelo nódulo AV. Sabe-se que drogas bloqueadoras de canal para  $\text{Ca}^{2+}$  afetam o potencial de ação de tecidos de resposta lenta, tais como o nódulo sinusal e o nódulo AV levando a redução da frequência cardíaca e BAV, respectivamente. O BAV se faz por uma diminuição da velocidade de propagação da onda pelo nódulo AV e/ou por um aumento da refratariedade desse tecido. Este último efeito forma a base da ação antiarrítmica dos bloqueadores dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$ , que também são comumente utilizados para o tratamento da angina de peito e hipertensão arterial.

Além de aumentar o PRi, o geraniol também induziu bradicardia o que mostra sua ação depressora sobre o nódulo sinusal que pode ser decorrente, como dito anteriormente, ao bloqueio de corrente de cálcio.

Também foi observado que o geraniol aumentou ligeiramente o QT<sub>i</sub>, que representa o tempo necessário para que ocorra a despolarização e repolarização ventricular, sendo um parâmetro indireto para estimar a DPA ventricular. O pequeno aumento no QT<sub>i</sub>, observado em nossos resultados, pode ser explicado pela ausência de  $I_{\text{to}}$  em miócitos ventriculares de cobaias (Sipido *et al.* 1995), uma corrente que foi marcadamente inibida pelo geraniol em cardiomiócito ventricular de camundongo.

Além disso, o geraniol não teve nenhum efeito significativo sobre a duração do complexo QRS, o que mostra que este monoterpene não alterou a velocidade de propagação do impulso elétrico através dos ventrículos.

A fase de despolarização da célula ventricular cardíaca é causada pelo influxo de íons  $\text{Na}^+$  através de canais seletivos (Kleber 2005). Expresso em termos de modelo biofísico simples, a taxa máxima de despolarização durante o movimento ascendente do PA ( $dV/dt$  máximo) é proporcional à densidade de corrente de  $\text{Na}^+$  (Berecki *et al.* 2010). Assim, com base nos resultados aqui observados, pode-se afirmar que o geraniol também modulou canais para  $\text{Na}^+$ , uma vez que diminuiu a taxa máxima de despolarização (fase 0), no entanto, esta hipótese requer um estudo mais aprofundado.

A ação simultânea do geraniol em canais iônicos de membrana, incluindo  $\text{K}_V$  e  $\text{Cav}$ , levanta a hipótese que ele poderia atuar como um agente antiarrítmico da classe III e/ou da classe IV, respectivamente. Neste sentido, foram investigados os possíveis efeitos antiarrítmicos do geraniol em modelo de arritmia induzida por ouabaína.

A ouabaína é um digitálico cardiotônico que inibe a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase na membrana plasmática, levando a um aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Na}^+$ . O aumento do  $\text{Na}^+$  intracelular ativa o NCX na configuração “outward”, que passa a transportar três íons  $\text{Na}^+$  para o meio extracelular e um íon cálcio para o meio intracelular. Esse mecanismo provoca um aumento na concentração interna de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo NCX (Khatter *et al.* 1989) e, conseqüentemente, um aumento da força de contração. Esta sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumenta a recaptação e o estoque de cálcio dentro do retículo sarcoplasmático (RS) através da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA). Após a saturação de cálcio no RS, o cálcio passa a ser liberado de forma oscilatória pelos canais liberadores de cálcio do RS, os canais receptores de rianodina (RyR). Essa oscilação de cálcio induz um influxo de  $\text{Na}^+$  através do NCX na sua configuração “inward” e também através de canais catiônicos não-seletivos. Esse influxo de sódio forma uma corrente iônica identificada como corrente transiente de entrada ( $I_{Ti}$ ) (Lederer e Tsien 1976, Kimura *et al.* 1987). Essa corrente induz uma despolarização oscilatória e, quando a despolarização alcança o limiar, os canais de  $\text{Na}^+$  voltagem-dependentes são ativados, resultando na geração de um potencial de ação. Este potencial de ação gera batimentos irregulares levando ao aparecimento de arritmias cardíacas (Kass *et al.* 1978, Wier 1984).

Os resultados aqui apresentados mostraram que o geraniol aumentou o tempo para o início das arritmias induzidas pela ouabaína. Provavelmente, o geraniol retardou início das arritmias por diminuir a sobrecarga intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  através do bloqueio de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo-L e/ou por prolongar o período refratário do PA, através da inibição dos canais de  $\text{K}^+$ . Além disso, este monoterpeno diminuiu a contratatura diastólica (efeito tonotrópico) induzida

pela ouabaína sem afetar o seu efeito inotrópico positivo. Como o geraniol não afetou o efeito inotrópico positivo da ouabaína, conclui-se que ele não interferiu na atividade do NCX.

O tratamento da insuficiência cardíaca pode ser feito com a utilização de glicosídeos cardiotônicos, tais como digitoxina e digoxina, que possuem o mesmo mecanismo de ação da ouabaína (Allen *et al.* 1984, Wier 1984). Esses digitálicos melhoram a força de contração do miocárdio por aumentar o influxo de cálcio via NCX (Eisner e Lederer 1979). Entretanto, esses digitálicos podem produzir um efeito tóxico (a dose terapêutica efetiva é muito próxima da dose tóxica) que é o desenvolvimento de arritmias cardíacas. O interessante foi que o geraniol aumentou o tempo para o aparecimento das arritmias cardíacas sem afetar o efeito inotrópico positivo da ouabaína.

Este trabalho buscou contribuir para aprofundar a compreensão sobre efeitos contráteis e elétricos produzidos pelo geraniol em coração de mamífero. Os resultados evidenciaram que as correntes de cálcio, que são transportadas pelos canais do tipo-L, participam como agentes fundamentais do mecanismo de ação desse monoterpene. Houve ainda forte evidencia que o geraniol bloqueia alguns subtipos de canais para potássio. Assim, moléculas que deprimem a corrente de cálcio têm sido útil no tratamento de arritmias cardíacas, angina de peito e hipertensão arterial e, isso pode, entre outras razões, servir como uma justificativa suficiente para que os esforços neste campo continuem a ser realizados.

## 7 CONCLUSÃO

O geraniol promove em músculo cardíaco de mamífero:

- Diminuição da contratilidade atrial e ventricular;
- Redução da corrente de cálcio tipo-L em miócito ventricular sem alterar a condutância do canal;
- Aumento significativo da duração do potencial de ação ventricular associado à inibição de correntes para potássio  $I_{to}$ ,  $I_{ks}$  e  $I_K$ ;
- Aumento do intervalo PR, intervalo QT, sem alterar o complexo QRS em coração isolado de cobaia;
- Diminuição da frequência cardíaca;
- Aumento do tempo de início das arritmias e diminuição contratura diastólica induzida pela ouabaína;

## 8 REFERÊNCIAS

- Abe, S., N. Maruyama, K. Hayama, H. Ishibashi, S. Inoue, H. Oshima and H. Yamaguchi (2003). "Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential oils." Mediators of Inflammation **12**(6): 323-328.
- Al Nomaani, R. S. S., M. A. Hossain, A. M. Weli, Q. Al-Riyami, J. N. Al-Sabahi and S. M. M. Rahman (2013). Chemical composition of essential oils and in vitro antioxidant activity of fresh and dry leaves crude extracts of medicinal plant of Lactuca Sativa L. native to Sultanate of Oman.
- Allen, D. G., D. A. Eisner and C. H. Orchard (1984). "Factors influencing free intracellular calcium concentration in quiescent ferret ventricular muscle." J Physiol **350**: 615-630.
- Alwan, A. W. H. O. (2011). Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, Switzerland, World Health Organization.
- Amir, R., C. E. Argoff, G. J. Bennett, T. R. Cummins, M. E. Durieux, P. Gerner, M. S. Gold, F. Porreca and G. R. Strichartz (2006). "The role of sodium channels in chronic inflammatory and neuropathic pain." J Pain **7**(5 Suppl 3): S1-29.
- Anumonwo, J. M. and A. N. Lopatin (2010). "Cardiac strong inward rectifier potassium channels." J Mol Cell Cardiol **48**(1): 45-54.
- Azevedo, D. F. (1999). Iniciação a eletrocardiografia. Porto Alegre.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck and M. Idaomar (2008). "Biological effects of essential oils--a review." Food Chem Toxicol **46**(2): 446-475.
- Bard, M., M. R. Albrecht, N. Gupta, C. J. Guynn and W. Stillwell (1988). "Geraniol interferes with membrane functions in strains of Candida and Saccharomyces." Lipids **23**(6): 534-538.
- Barnard, D. R. and R. D. Xue (2004). "Laboratory evaluation of mosquito repellents against Aedes albopictus, Culex nigripalpus, and Ochlerotatus triseriatus (Diptera: Culicidae)." J Med Entomol **41**(4): 726-730.
- Bastos, J. F., I. J. Moreira, T. P. Ribeiro, I. A. Medeiros, A. R. Antonioli, D. P. De Sousa and M. R. Santos (2010). "Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats." Basic Clin Pharmacol Toxicol **106**(4): 331-337.
- Basu, S. K., J. E. Thomas and S. N. Acharya (2007). "Prospects for growth in global nutraceutical and functional food markets: a Canadian perspective." Aust. J. Basic Appl. Sci **1**(4): 637-649.
- Baylie, R. L., H. Cheng, P. D. Langton and A. F. James (2010). "Inhibition of the cardiac L-type calcium channel current by the TRPM8 agonist, (-)-menthol." J Physiol Pharmacol **61**(5): 543-550.

- Benitah, J. P., J. L. Alvarez and A. M. Gomez (2010). "L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in ventricular cardiomyocytes." J Mol Cell Cardiol **48**(1): 26-36.
- Berecki, G., R. Wilders, B. de Jonge, A. C. van Ginneken and A. O. Verkerk (2010). "Re-evaluation of the action potential upstroke velocity as a measure of the  $\text{Na}^+$  current in cardiac myocytes at physiological conditions." PLoS One **5**(12): e15772.
- Berne, R. M. L., M.N. (2004). Fisiologia, Elsevier.
- Bers, D. M. (1991). "Ca regulation in cardiac muscle." Med Sci Sports Exerc **23**(10): 1157-1162.
- Bers, D. M. (2000). "Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction." Circ Res **87**(4): 275-281.
- Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." Nature **415**(6868): 198-205.
- Bers, D. M. (2006). "Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure." Physiology (Bethesda) **21**: 380-387.
- Bers, D. M., K. D. Philipson and A. Peskoff (1985). "Calcium at the surface of cardiac plasma membrane vesicles: cation binding, surface charge screening, and Na-Ca exchange." J Membr Biol **85**(3): 251-261.
- Bers, D. M. and M. T. Ziolo (2001). "When is cAMP not cAMP? Effects of compartmentalization." Circ Res **89**(5): 373-375.
- Bhatt, L. K., K. Nandakumar and S. L. Bodhankar (2005). "Experimental animal models to induce cardiac arrhythmias." Indian J of Pharmacology **37**(6): 10.
- Blatter, L. A., J. Kockskamper, K. A. Sheehan, A. V. Zima, J. Huser and S. L. Lipsius (2003). "Local calcium gradients during excitation-contraction coupling and alternans in atrial myocytes." J Physiol **546**(Pt 1): 19-31.
- Blaustein, M. P. L., W. J. (1999). "Sodium/calcium exchange: its physiological implications." Physiol Rev **79**(3): 763-854.
- Burke, Y. D., M. J. Stark, S. L. Roach, S. E. Sen and P. L. Crowell (1997). "Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol." Lipids **32**(2): 151-156.
- Carnesecchi, S., Y. Schneider, J. Ceraline, B. Duranton, F. Gosse, N. Seiler and F. Raul (2001). "Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells." J Pharmacol Exp Ther **298**(1): 197-200.
- Castle, N. A. (1992). "Differential inhibition of potassium currents in rat ventricular myocytes by capsaicin." Cardiovasc Res **26**(11): 1137-1144.
- Chappell, R. (1996). "Re: Caplan et al. IJROBP 29:1183-1186; 1994, and Bentzen et al. IJROBP 32:1531-1534; 1995." Int J Radiat Oncol Biol Phys **36**(4): 988-989.

- Chemla, D., C. Coirault, J. L. Hebert and Y. Lecarpentier (2000). "Mechanics of Relaxation of the Human Heart." News Physiol Sci **15**: 78-83.
- Chen, W. V., A. M. (2010). "Geraniol - A review of a commercially important fragrance material." South African Journal of Botany **76**(4): 643-651.
- Choi, H. S., H. S. Song, H. Ukeda and M. Sawamura (2000). "Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl." J Agric Food Chem **48**(9): 4156-4161.
- Clapham, D. E., A. Shrier and R. L. Dehaan (1980). "Junctional Resistance and Action-Potential Delay between Embryonic Heart Cell Aggregates." Journal of General Physiology **75**(6): 633-654.
- Clark, A. M. (1996). "Natural products as a resource for new drugs." Pharm Res **13**(8): 1133-1144.
- Correa Júnior, C. M., L. C., Scheffer, M. C. (1994). Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares.
- de Araújo, D. A. M., C. Freitas and J. S. Cruz (2011). "Essential oils components as a new path to understand ion channel molecular pharmacology." Life Sciences **89**(15-16): 540-544.
- de Cerqueira, S. V., A. N. Gondim, D. Roman-Campos, J. S. Cruz, A. G. Passos, S. Lauton-Santos, A. Lara, S. Guatimosim, E. A. Conde-Garcia, E. D. de Oliveira and C. M. de Vasconcelos (2011). "R(+)-pulegone impairs Ca(2)+ homeostasis and causes negative inotropism in mammalian myocardium." Eur J Pharmacol **672**(1-3): 135-142.
- De Paoli, P., E. Cerbai, B. Koidl, M. Kirchengast, L. Sartiani and A. Mugelli (2002). "Selectivity of different calcium antagonists on T- and L-type calcium currents in guinea-pig ventricular myocytes." Pharmacol Res **46**(6): 491-497.
- de Tombe, P. P. (2003). "Cardiac myofilaments: mechanics and regulation." J Biomech **36**(5): 721-730.
- Demello, W. C. (1982). "Cell-to-Cell Communication in Heart and Other Tissues." Progress in Biophysics & Molecular Biology **39**(3): 147-182.
- Dorigo, P., R. M. Gaion, M. Bergamin, A. Giacometti, E. Valentini and I. Maragno (1990). "Comparison between the cardiac effects induced by muzolimine and furosemide in guinea-pig atria." Cardiovasc Drugs Ther **4**(6): 1477-1485.
- Eisner, D. A. and W. J. Lederer (1979). "The role of the sodium pump in the effects of potassium-depleted solutions on mammalian cardiac muscle." J Physiol **294**: 279-301.
- Fabiato, A. (1983). "Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum." Am J Physiol **245**(1): C1-14.

Franzini-Armstrong, C., F. Protasi and V. Ramesh (1999). "Shape, size, and distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  release units and couplons in skeletal and cardiac muscles." Biophys J 77(3): 1528-1539.

Fuster V, Alexander RW, O'Rourke R, Roberts R, King SB, Prystowsky EN, Nash I (1998). Hurst's the heart, 9th edition, Hardcover.

Garcia, E. A. C. (1998). Biofísica, Sarvier.

Gathercole, D. V., D. J. Colling, J. N. Skepper, Y. Takagishi, A. J. Levi and N. J. Severs (2000). "Immunogold-labeled L-type calcium channels are clustered in the surface plasma membrane overlying junctional sarcoplasmic reticulum in guinea-pig myocytes-implications for excitation-contraction coupling in cardiac muscle." J Mol Cell Cardiol 32(11): 1981-1994.

Gondim, A. N. S., V. R. d. Oliveira, S. D. d. Santos, B. A. d. Silva, C. M. L. d. Vasconcelos and E. A. Conde-Garcia (2009). "Extract from leaf of *Psidium guajava* L depresses the guinea pig atrial contractility by interfering with potassium and calcium channels." 2009 45(3).

Graier, W. F., M. Frieden and R. Malli (2007). "Mitochondria and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling: old guests, new functions." Pflugers Arch 455(3): 375-396.

Grant, A. O. (2009). "Cardiac ion channels." Circ Arrhythm Electrophysiol 2(2): 185-194.

Greenstein, J. L., R. Wu, S. Po, G. F. Tomaselli and R. L. Winslow (2000). "Role of the calcium-independent transient outward current  $I_{\text{to1}}$  in shaping action potential morphology and duration." Circ Res 87(11): 1026-1033.

Guatimosim, S., K. Dilly, L. F. Santana, M. Saleet Jafri, E. A. Sobie and W. J. Lederer (2002). "Local  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and EC coupling in heart:  $\text{Ca}^{2+}$  sparks and the regulation of the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$  transient." J Mol Cell Cardiol 34(8): 941-950.

Guenther, E. (1948). The essential oils, D. Van Nostrand Co.

Guimaraes, A. G., J. S. Quintans and L. J. Quintans, Jr. (2013). "Monoterpenes with analgesic activity--a systematic review." Phytother Res 27(1): 1-15.

Hagan, E. C., W. H. Hansen, O. G. Fitzhugh, P. M. Jenner, W. I. Jones, J. M. Taylor, E. L. Long, A. A. Nelson and J. B. Brouwer (1967). "Food flavourings and compounds of related structure. II. Subacute and chronic toxicity." Food Cosmet Toxicol 5(2): 141-157.

Harrison, G. E. and W. H. Raymond (1951). "Preparation of clean chemical solutions, with special reference to radioactive phosphorus solutions for clinical use." Br Med J 2(4737): 930-932.

Hille, B. (2001). Ionic Channels of Excitable Membranes, Sinauer Associates, Incorporated.

Hobai, I. A. and A. J. Levi (1999). "Coming full circle: membrane potential, sarcolemmal calcium influx and excitation-contraction coupling in heart muscle." Cardiovasc Res 44(3): 477-487.

Ji, P., M. Si, Y. Podnos and D. K. Imagawa (2002). "Monoterpene geraniol prevents acute allograft rejection." Transplant Proc **34**(5): 1418-1419.

Joca, H. C., Y. Cruz-Mendes, K. Oliveira-Abreu, R. P. Maia-Joca, R. Barbosa, T. L. Lemos, P. S. Lacerda Beirao and J. H. Leal-Cardoso (2012). "Carvacrol decreases neuronal excitability by inhibition of voltage-gated sodium channels." J Nat Prod **75**(9): 1511-1517.

Karaki, H., H. Ozaki, M. Hori, M. Mitsui-Saito, K. Amano, K. Harada, S. Miyamoto, H. Nakazawa, K. J. Won and K. Sato (1997). "Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle." Pharmacol Rev **49**(2): 157-230.

Kass, R. S., W. J. Lederer, R. W. Tsien and R. Weingart (1978). "Role of calcium ions in transient inward currents and aftercontractions induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres." J Physiol **281**: 187-208.

Kastor, J. A. (1996). "Atrial fibrillation." Adv Intern Med **41**: 365-397.

Katz, A. M. (1992). "Heart failure in 2001: a prophecy." Am J Cardiol **70**(10): 126C-131C.

Khatter, J. C., M. Agbanyo, S. Navaratnam and R. J. Hoeschen (1989). "Mechanisms of developmental increase in the sensitivity to ouabain." Dev Pharmacol Ther **12**(3): 128-136.

Kimura, J., S. Miyamae and A. Noma (1987). "Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig." J Physiol **384**: 199-222.

Kleber, A. G. (2005). "The shape of the electrical action-potential upstroke: a new aspect from optical measurements on the surface of the heart." Circ Res **97**(3): 204-206.

Lapczynski, A., S. P. Bhatia, R. J. Foxenberg, C. S. Letizia and A. M. Api (2008). "Fragrance material review on geraniol." Food and Chemical Toxicology **46**(11, Supplement): S160-S170.

Laporte, R., A. Hui and I. Laher (2004). "Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle." Pharmacol Rev **56**(4): 439-513.

Lederer, W. J., S. S. Sheu, R. D. Vaughan-Jones and D. A. Eisner (1984). "The effects of Na-Ca exchange on membrane currents in sheep cardiac Purkinje fibers." Soc Gen Physiol Ser **38**: 373-380.

Lederer, W. J. and R. W. Tsien (1976). "Transient inward current underlying arrhythmogenic effects of cardiotonic steroids in Purkinje fibres." J Physiol **263**(2): 73-100.

Lopatin, A. N. N., C. G. (2001). "Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1)." J Mol Cell Cardiol **33**(4): 625-638.

Luft, U. C., R. Bychkov, M. Gollasch, V. Gross, J. B. Roullet, D. A. McCarron, C. Ried, F. Hofmann, Y. Yagil, C. Yagil, H. Haller and F. C. Luft (1999). "Farnesol blocks the L-type Ca<sup>2+</sup> channel by targeting the alpha 1C subunit." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(4): 959-966.

- Maack, C. O. R., B. (2007). "Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics." Basic Res Cardiol **102**(5): 369-392.
- Maciel, M. A. M., A. C. Pinto, V. F. Veiga Jr., N. F. Grynberg and A. Echevarria (2002). "Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares." Química Nova **25**: 429-438.
- Magyar, J., N. Szentandrassy, T. Banyasz, L. Fulop, A. Varro and P. P. Nanasi (2004). "Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes." Eur J Pharmacol **487**(1-3): 29-36.
- Maier, L. S. B., D. M. (2002). "Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond." J Mol Cell Cardiol **34**(8): 919-939.
- Matich, A. J., B. J. Bunn, D. J. Comeskey, M. B. Hunt and D. D. Rowan (2007). "Chirality and biosynthesis of lilac compounds in *Actinidia arguta* flowers." Phytochemistry **68**(13): 1746-1751.
- McNutt, N. S. (1975). "Ultrastructure of the myocardial sarcolemma." Circ Res **37**(1): 1-13.
- Melo, M. S., L. C. Sena, F. J. Barreto, L. R. Bonjardim, J. R. Almeida, J. T. Lima, D. P. De Sousa and L. J. Quintans-Junior (2010). "Antinociceptive effect of citronellal in mice." Pharm Biol **48**(4): 411-416.
- Nakatsu, T., A. T. Lupo Jr, J. W. Chinn Jr and R. K. L. Kang (2000). Biological activity of essential oils and their constituents. Studies in Natural Products Chemistry. R. Atta ur, Elsevier. **Volume 21, Part B**: 571-631.
- Nerbonne, J. M. (2000). "Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium." Journal of Physiology-London **525**(2): 285-298.
- Nerbonne, J. M., C. G. Nichols, T. L. Schwarz and D. Escande (2001). "Genetic manipulation of cardiac K(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here?" Circ Res **89**(11): 944-956.
- Nerbonne, J. M. K., R. S. (2005). "Molecular physiology of cardiac repolarization." Physiol Rev **85**(4): 1205-1253.
- Niggli, E. (1999). "Ca(2+) Sparks in Cardiac Muscle: Is There Life Without Them?" News Physiol Sci **14**: 129-134.
- Nowycky, M. C., A. P. Fox and R. W. Tsien (1985). "Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity." Nature **316**(6027): 440-443.
- Ogawa, Y. (1994). "Role of ryanodine receptors." Crit Rev Biochem Mol Biol **29**(4): 229-274.
- Orchard, C. B., F. (2008). "t-Tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes." Cardiovasc Res **77**(2): 237-244.

Palade, P. T. and W. Almers (1985). "Slow calcium and potassium currents in frog skeletal muscle: their relationship and pharmacologic properties." Pflugers Arch **405**(2): 91-101.

Peixoto Neto, P. (2005). Plantas medicinais: do popular ao científico, EdUFAL.

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

Polo, M. P. d. B., M. G. (2006). "Effect of geraniol on fatty-acid and mevalonate metabolism in the human hepatoma cell line Hep G2." Biochem Cell Biol **84**(1): 102-111.

Roden, D. M., J. R. Balser, A. L. George, Jr. and M. E. Anderson (2002). "Cardiac ion channels." Annu Rev Physiol **64**: 431-475.

Roulet, J. B., U. C. Luft, H. Xue, J. Chapman, R. Bychkov, C. M. Roulet, F. C. Luft, H. Haller and D. A. McCarron (1997). "Farnesol inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> channels in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **272**(51): 32240-32246.

Sakmann, B. F., A. J. Spindler, S. M. Bryant, K. W. Linz and D. Noble (2000). "Distribution of a persistent sodium current across the ventricular wall in guinea pigs." Circ Res **87**(10): 910-914.

Samso, M. W., T. (1998). "Contributions of electron microscopy and single-particle techniques to the determination of the ryanodine receptor three-dimensional structure." J Struct Biol **121**(2): 172-180.

Santos, M. R. V., F. V. Moreira, B. P. Fraga, D. P. d. Souza, L. R. Bonjardim and L. J. Quintans-Junior (2011). "Cardiovascular effects of monoterpenes: a review." Revista Brasileira de Farmacognosia **21**: 764-771.

Schroeter, A., S. Walzik, S. Blechschmidt, V. Haufe, K. Benndorf and T. Zimmer (2010). "Structure and function of splice variants of the cardiac voltage-gated sodium channel Na(v)1.5." J Mol Cell Cardiol **49**(1): 16-24.

Sensch, O., W. Vierling, W. Brandt and M. Reiter (2000). "Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: comparison of beta-caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine." Br J Pharmacol **131**(6): 1089-1096.

Serafini, L. A., A. N. A. C. A. Do Santos, L. A. Touguinha, G. Agostini and V. Dalfavo (2002). Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais, EDUCS.

Shioya, T. (2007). "A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models." J Physiol Sci **57**(6): 327-335.

Silva, D. F., I. G. Araujo, J. G. Albuquerque, D. L. Porto, K. L. Dias, K. V. Cavalcante, R. C. Veras, X. P. Nunes, J. M. Barbosa-Filho, D. A. Araujo, J. S. Cruz, N. A. Correia and I. A. De Medeiros (2011). "Rotundifolone-induced relaxation is mediated by BK(Ca) channel activation and Ca(v) channel inactivation." Basic Clin Pharmacol Toxicol **109**(6): 465-475.

Simões, C. M. O. et. al. (2007). Farmacognosia: da planta ao medicamento, Editora da UFSC.

Simon, D. Z., J. Beliveau and C. Aube (1986). "Extraction by Hydrodiffusion of the Essential Oil of *Monarda fistulosa* Grown in the Province of Quebec: Assay of Geraniol in the Hydrodiffused Oil." Pharmaceutical Biology **24**(3): 120-122.

Sipido, K. R., G. Callewaert, F. Porciatti, J. Vereecke and E. Carmeliet (1995). "[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-dependent membrane currents in guinea-pig ventricular cells in the absence of Na/Ca exchange." Pflugers Arch **430**(5): 871-878.

Skrzypiec-Spring, M., B. Grotthus, A. Szelag and R. Schulz (2007). "Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium." J Pharmacol Toxicol Methods **55**(2): 113-126.

Smith, T. K., S. H. Kang and P. Vanden Berghe (2003). "Calcium channels in enteric neurons." Curr Opin Pharmacol **3**(6): 588-593.

Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (1994). "Signal transduction and regulation in smooth muscle." Nature **372**(6503): 231-236.

Sun, X. H., F. Protasi, M. Takahashi, H. Takeshima, D. G. Ferguson and C. Franzini-Armstrong (1995). "Molecular architecture of membranes involved in excitation-contraction coupling of cardiac muscle." J Cell Biol **129**(3): 659-671.

Tamargo, J., R. Caballero, R. Gomez, C. Valenzuela and E. Delpon (2004). "Pharmacology of cardiac potassium channels." Cardiovasc Res **62**(1): 9-33.

Tanaka, H., T. Kawanishi and K. Shigenobu (2003). "Optical bioimaging: from living tissue to a single molecule: atrio-ventricular difference in myocardial excitation-contraction coupling--sequential versus simultaneous activation of SR Ca<sup>2+</sup> release units." J Pharmacol Sci **93**(3): 248-252.

Tanaka, H., H. Masumiya, T. Sekine, J. Kase, T. Kawanishi, T. Hayakawa, S. Miyata, Y. Sato, R. Nakamura and K. Shigenobu (2001). "Involvement of Ca<sup>2+</sup> waves in excitation-contraction coupling of rat atrial cardiomyocytes." Life Sci **70**(6): 715-726.

Viollon, C. C., J. P. (1994). "Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*." Mycopathologia **128**(3): 151-153.

Voet, D., J. G. Voet and C. W. Pratt (2008). Fundamentos de bioquímica: A Vida em Nível Molecular, ArtMed.

Vora, T., B. Corry and S. H. Chung (2005). "A model of sodium channels." Biochim Biophys Acta **1668**(1): 106-116.

Wang, Q., H. Kuang, Y. Su, Y. Sun, J. Feng, R. Guo and K. Chan (2013). "Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants." J Ethnopharmacol **146**(1): 9-39.

Watterson, K. R., P. H. Ratz and S. Spiegel (2005). "The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction." Cell Signal **17**(3): 289-298.

Wier, W. G. H., P. (1984). "Excitation-contraction coupling in cardiac Purkinje fibers. Effects of cardiotonic steroids on the intracellular  $[Ca^{2+}]$  transient, membrane potential, and contraction." J Gen Physiol **83**(3): 395-415.

Xu, H., W. Guo and J. M. Nerbonne (1999). "Four kinetically distinct depolarization-activated  $K^+$  currents in adult mouse ventricular myocytes." J Gen Physiol **113**(5): 661-678.

Yang, N. and R. Horn (1995). "Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels." Neuron **15**(1): 213-218.

# **Anexo**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

### **DECLARAÇÃO**

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado **“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CONTRÁTEIS E ELETROFISIOLÓGICOS DO GERANIOL SOBRE CORAÇÃO DE MAMÍFERO”**, sob coordenação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **CARLA MARIA LINS DE VASCONCELOS** (protocolo **CEPA 49/2012**) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 18/09/2012.

São Cristóvão, 19 de setembro de 2012.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Teixeira Silva  
Presidente do CEPA/UFS