



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FISIOLÓGICAS**

**DIEGO SANTOS DE SOUZA**

**ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA CÁLCIO TIPO-L NA**  
**RESPOSTA CARDIODEPRESSORA DO FARNESOL EM**  
**CORAÇÃO DE RATO**

**SÃO CRISTOVÃO**

**2016**

**DIEGO SANTOS DE SOUZA**

**ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA CÁLCIO TIPO-  
L NA RESPOSTA CARDIODEPRESSORA DO  
FARNESOL EM CORAÇÃO DE RATO**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Carla Maria Lins de Vasconcelos

**SÃO CRISTOVÃO**

**2016**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S729e Souza, Diego Santos de  
Envolvimento dos canais para cálcio tipo-L na resposta  
cardiodepressora do farnesol em coração de rato / Diego Santos de  
Souza ; orientador Carla Maria Lins de Vasconcelos. – São Cristovão,  
2016.  
63 f.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade  
Federal de Sergipe, 2016.

1. Coração - Contração. 2. Eletrocardiografia. 3. Terpenos. I.  
Vasconcelos, Carla Maria Lins de, orient. II. Título.

CDU 612.172:615.322

**DIEGO SANTOS DE SOUZA**

**ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA CÁLCIO TIPO-  
L NA RESPOSTA CARDIODEPRESSORA DO  
FARNESOL EM CORAÇÃO DE RATO**

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

---

Orientadora: Profa. Dra. Carla Maria Lins de Vasconcelos

---

Profa. Dra. Adriana Karla de Lima

---

Profa. Dra. Giulianna da Rocha Borges

**SÃO CRISTOVÃO**

**2016**

Dedico este Mestrado a minha esposa Aimée Obolari Durço, e a minha mãe Alana Maria Pereira Santos, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões. **Vocês são os alicerces da minha vida.**

## Agradecimentos

A **Jeová** por ter me dado força para superar as adversidades que apareceram durante meu percurso.

A minha mãe **Alana Maria Pereira Santos**, minha maior heroína, você consegue ser todas as pessoas numa só, sempre foi meu vetor espacial, me guiando, me dando conselhos, corrigindo meus erros, me levantou de meus tombos, disse não na hora certa, por vezes esquecendo ou negligenciando os seus próprios interesses em prol de seus filhos, pela sua luta, sua coragem, sua persistência te levando sempre em frente, não lhe permitindo desistir ou se cansar. Devo a você tudo que sou hoje, te amo!

E a minha esposa, **Aimée Obolari Durço**, não existem palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer a você com justiça, com o devido merecimento. Sua ajuda e seu apoio nessa jornada foram para mim de valor inestimável. Apenas posso me expressar através da limitação de meras palavras. Muito obrigado! Com todo o carinho e de coração eu lhe agradeço, e pelo resto da minha vida lhe agradecerei, te amo!

A minha querida Orientadora **Dra. Carla Maria Lins Vasconcelos**, pela persistência, vontade de querer nos fazer pessoas melhores, pela transmissão do conhecimento, dedicação, pelo profissionalismo, pelos puxões de orelha, pelo divertimento, educação, respeito, competência, pelas tentativas incansáveis de nos fazer refletir, que aceitou a árdua tarefa em me orientar, pelo seu apoio, confiança e oportunidade de desenvolver esse trabalho. Obrigado!

Aos meus **familiares**, pelo constante apoio.

A **família da minha esposa**, que se tornou minha e sempre confiaram em mim.

A os **amigos** que sempre tive a sorte de ir encontrando pela vida, são a família que podemos escolher, mas que apenas alguns privilegiados como eu, podem construir com pessoas tão extraordinárias. E por esse fato eu agradeço!

Agradeço a todos os **professores**, por me guiarem na estrada do conhecimento, não apenas racional, mas na manifestação de caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional.

Agradeço aos servidores **administrativos**, pelo excelente trabalho, dedicação, comprometimento, colaboração, e pelo apoio que recebi durante minha jornada.

A todos os **animais** que nos auxiliaram no desenvolvimento do projeto.

A **Capes** pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

SOUZA, Diego Santos. **ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA CÁLCIO TIPO-L NA RESPOSTA CARDIODEPRESSORA DO FARNESOL EM CORAÇÃO DE RATO.**

Dissertação de mestrado em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2016.

O farnesol ( $C_{15}H_{26}O$ ) é um álcool sesquiterpênico encontrado em óleos essenciais e ervas aromáticas. Pesquisas evidenciam algumas propriedades benéficas do farnesol como: propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e quimiopreventivas. Entretanto, o farnesol promoveu inibição dos canais de cálcio tipo-L em músculo liso. Neste trabalho procurou-se analisar os efeitos do farnesol sobre os mecanismos contráteis e eletrofisiológicos sobre o coração de rato. Para esse fim, os estudos contráteis foram realizados em átrios esquerdo estirados a para uma tensão de repouso de 5mN (0,5gf) e submetidos a estimulação de campo com pulsos de corrente supralimiar de 1 Hz, mantido em cuba para órgão isolado, submerso em solução de Krebs-Henseleit (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 obtidos em coração isolado, sob perfusão aórtica de fluxo constante (10 mL/min), em sistema de Langendorff. Os corações foram mantidos com batimento espontâneo, para determinar a frequência cardíaca, e em corações estimulados foram determinados os intervalos PR (PRi), QT (QTi) e complexo QRS. A pressão ventricular esquerda foi determinada, em coração estimulado eletricamente, por meio de um balonete insuflado com água até uma pressão de 15 cmHg. Em átrio esquerdo de rato, a resposta do farnesol sobre a força de contração apresentou efeito inotrópico negativo, diminuindo a força de contração em 41,63% na concentração máxima usada, apresentando uma  $CE_{50}$  de  $2,843 \pm 0,19$  mM. Ao avaliar o efeito do farnesol sobre a resposta inotrópica positiva do  $CaCl_2$  e ( $\pm$ )-BAY K8644 foi observado que o farnesol deslocou para direita a curva concentração-resposta do  $CaCl_2$  e diminuiu a eficácia máxima (100% para 23%) e aboliu a curva do ( $\pm$ )-BAY K8644. Para avaliar a participação dos canais para potássio na resposta inotrópica negativa foi utilizado TEA tendo aumento da eficácia máxima do farnesol de 41,63 para 63,02%. Em coração isolado, foi observado aumento do PRi, QTi e complexo QRS, e redução da pressão ventricular esquerda (37,38%) e frequência cardíaca (25,22%). Assim sendo, o farnesol exerce respostas inotrópicas e cronotrópicas negativas no coração, por redução das correntes para  $Ca^{2+}$  tipo-L.

**PALAVRAS-CHAVE:** Farnesol; Sesquiterpeno; Contratilidade Miocárdica; Eletrocardiografia; Canais para Cálcio tipo-L

## ABSTRACT

SOUZA, Diego Santos. **L-TYPE CALCIUM CHANNELS INVOLVEMENT IN RAT CARDIODEPRESSANT RESPONSE BY FARNESOL.**

Master's degree dissertation in Physiological Sciences, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2016.

The farnesol (C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O) is a sesquiterpene alcohol found in herbs and essential oils. Research show some beneficial properties of farnesol as: antioxidant, anti-inflammatory and chemopreventive properties. However, the farnesol futher inhibition of activity of L-type calcium channels in smooth muscle. This study sought to analyze the involvement of calcium channels L-type in the cardiodepressant farnesol response in the rat heart. To this, contractile studies were conducted on left atria drawn to rest tension 5mN (0,5gf) and subjected to field stimulation with above-threshold current pulses of the 1 Hz, kept in isolated organ vessel, submerged in Krebs-Henseleit solution (8 mL) and aerated with carbogênica mixture (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). The atrial contraction force was capture by an isometric transducer. Electrocardiographic recordings were performe on isolated heart, aortic perfusion under a constant flow (10 ml / min) Langendorff type system. The hearts were keep spontaneously beating, to determine the heart rate, and in heart stimulated were determined PR interval (PRI), QT (QT<sub>i</sub>) and complex QRS. Left ventricular pressure was determined in the heart stimulated electrically by means of a balloon inflated with water at a pressure of 15 cmHg. In rat left atrium, the farnesol response to the contraction strength showed a negative inotropic effect, reducing the contraction force at 41.63% at the maximum concentration used, with an EC<sub>50</sub> of 2.84 ± 0.19 mM. To evaluate the effect of farnesol of the positive inotropic response of CaCl<sub>2</sub> and (±)-Bay K8644 was observed that the farnesol shifted to the right CaCl<sub>2</sub> concentration-response curve and decreased maximum efficiency (100% to 23%) and abolished curve of (±)-Bay K8644. TEA was use to evaluate the role of K<sup>+</sup> channels in the negative inotropic response and the maximum effect by farnesol (41.63 to 63.02%) was increased. In isolated heart, there was an increase of PRI, QT<sub>i</sub> and QRS complex, and reduced left ventricular pressure (37, 38%) and heart rate (25.22%). Thus, farnesol exerts inotropic and negative chronotropic responses in the heart by reducing current to the L-type Ca<sup>2+</sup>.

**KEYWORDS:** Farnesol; Sesquiterpene; Myocardial Contractility; Electrocardiogram; L-Type Calcium Channels

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos intracelulares de regulação do Acoplamento Excitação-Contração do Coração.....	8
<b>Figura 2.</b> Potencial de ação cardíaco de célula nodal e as correntes envolvidas, assim como as fases do potencial de ação em que elas atuam.....	10
<b>Figura 3.</b> Potencial de ação cardíaco ventricular e as correntes envolvidas em seu formato, assim como as fases do PA em que elas atuam.....	12
<b>Figura 4.</b> Eletrocardiograma normal, mostrando as ondas de despolarização e repolarização e os principais intervalos e segmentos .....	13
<b>Figura 5.</b> Biossíntese dos terpenos e pela via mevalonato.....	16
<b>Figura 6.</b> Representação da estrutura química do 2,6- <i>trans</i> -farnesil-pirofosfato.....	17
<b>Figura 7.</b> Representação da estrutura química do farnesol.....	18
<b>Figura 8.</b> Esquema da montagem experimental usada para determinar a força de contração atrial.....	22
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática do sistema de perfusão aórtica de fluxo constante do tipo Langendorff.....	25
<b>Figura 10.</b> Traçado eletrocardiográfico representativo mostrando os parâmetros PR <sub>i</sub> , QT <sub>i</sub> e QRS.....	26
<b>Figura 11.</b> Resposta do farnesol sobre a força de contração do átrio esquerdo de rato.....	28
<b>Figura 12.</b> Efeito do farnesol sobre a duração da sístole e sobre dT/dt (+) .....	29

<b>Figura 13.</b> Efeito do farnesol sobre a duração da diástole e sobre a $dT/dt$ (-) .....	30
<b>Figura 14.</b> Efeito do farnesol sobre duração total do ciclo da contração.....	30
<b>Figura 15.</b> Resposta do farnesol sobre a curva concentração-resposta do $CaCl_2$ .....	31
<b>Figura 16.</b> Resposta do farnesol sobre a curva concentração-resposta do ( $\pm$ ) BAYK 8644.....	32
<b>Figura 17.</b> Resposta inotrópica negativa na ausência e presença do TEA na curva concentração-resposta do farnesol.....	33
<b>Figura 18.</b> Alterações promovidas pelo farnesol no perfil eletrocardiográfico.....	34
<b>Figura 19.</b> Resposta do farnesol sobre a pressão do ventrículo esquerdo em coração isolado de rato e na frequência cardíaca.....	35

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP –	Difosfato de adenosina
AEC –	Acoplamento excitação-contração
AMPC –	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP –	Trifosfato de adenosina
AV –	Atrioventricular
BAV –	Bloqueio atrioventricular
bpm –	Batimentos por minuto
CaMK II –	Proteína quinase dependente de $Ca^{2+}$ /calmodulina
Cav –	Canal para cálcio dependente de voltagem
CE <sub>50</sub> –	Concentração que produz 50% do seu efeito máximo
CICR –	Calcium-induced calcium release Liberação de cálcio induzida por cálcio
DDL –	Despolarização diastólica lenta
E <sub>Ca</sub> –	Potencial de equilíbrio do cálcio
ECG –	Eletrocardiograma
E <sub>K</sub> –	Potencial de equilíbrio do potássio
E <sub>max</sub> –	Efeito máximo
E <sub>Na</sub> –	Potencial de equilíbrio do sódio
G/G <sub>max</sub> –	Condutância a uma dada voltagem/Condutância máxima
G <sub>Ca</sub> –	condutância ao cálcio
G <sub>K</sub> –	condutância ao potássio
G <sub>Na</sub> –	condutância ao sódio
FNS –	Farnesol
I <sub>Ca,L</sub> –	Corrente de cálcio tipo-L
I <sub>K,ACh</sub> –	Corrente de potássio sensível a acetilcolina
I <sub>K1</sub> –	Corrente para potássio com retificação de entrada
I <sub>K</sub> , I <sub>Kr</sub> , I <sub>Ks</sub> , I <sub>Kur</sub> –	Corrente para potássio com retificação retardada
I <sub>to, fast</sub> –	Corrente rápida para potássio transiente de saída
I <sub>to, slow</sub> –	Corrente lenta para potássio transiente de saída
Kv –	Canal de potássio dependente de voltagem

LPO –	Peroxidação lipídica
Nav –	Canal para sódio dependente de voltagem
NAV –	Nodo atrioventricular
NCX –	Trocador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
NS –	Nodo sinoatrial
PA –	Potencial de ação
PVE –	Pressão ventricular esquerda
PBL –	Fosfolambam
PKA –	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC –	Proteína quinase C
PRi –	Intervalo PR do eletrocardiograma
P, QRS, T –	Ondas do Eletrocardiograma
QTi –	Intervalo QT do eletrocardiograma
QRS –	Complexo QRS do eletrocardiograma
RS –	Retículo Sarcoplasmático
RyR –	Receptor da Rianodina
SERCA -	ATPase de Ca <sup>2+</sup> do reticulo sarcoplasmático
SOD –	Superóxido dismutase
TEA –	Tetraetilamônio
ULC -	Unidade liberadora de cálcio
V <sub>m</sub> –	Potencial de membrana
VOCs –	Canais operados por voltagem

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
2.1 Canais para cálcio.....	3
2.2 Fisiologia do coração .....	4
2.3 Potencial de repouso e ação .....	8
2.3.1 Potencial de ação lento .....	9
2.3.2 Potencial de ação rápido.....	11
2.4 Bases do eletrocardiograma .....	13
2.4.1 Registro de despolarização atrial, geração da onda P.....	14
2.4.2 Condução atrioventricular e seguimento PR.....	14
2.4.3 Geração do complexo QRS a ativação dos Ventrículos.....	14
2.4.4 Onda T e a repolarização dos ventrículos .....	15
2.5 Terpenos.....	15
2.5.1 Farnesol.....	17
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 Animais .....	21
4.2 Substâncias e Sais .....	21
4.3 Avaliações das respostas do farnesol sobre a contratilidade do miocárdio atrial.....	21
4.3.1 Montagem experimental do átrio esquerdo.....	21
4.3.2 Determinação de parâmetros contráteis .....	22
4.3.3 Determinação da CE50.....	23
4.3.4 Ação do farnesol sobre a curva concentração-efeito do CaCl <sub>2</sub> .....	23
4.3.5 Ação do farnesol sobre a curva concentração-efeito do BAY K8644.....	23
4.3.6 Avaliação da participação de canais de potássio de membrana na resposta inotrópica do farnesol em miocárdio atrial de ratos .....	23
4.4 Avaliação da resposta eletrocardiográfica do farnesol em coração isolado .....	24

4.4.1 Montagem experimental do coração isolado.....	24
4.4.2 Avaliação da resposta do farnesol sobre a frequência espontânea do coração isolado de ratos....	25
4.4.3 Avaliação da resposta do farnesol sobre a pressão intraventricular esquerda (PVE) .....	25
4.4.4 Determinação dos parâmetros eletrocardiográficos .....	26
4.5 Tratamento estatístico dos dados.....	27
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
5.1 Resposta do farnesol sobre a força contrátil do átrio esquerdo de rato .....	28
5.2 Efeito do farnesol sobre a duração do tempo de contração e relaxamento e sobre as derivadas máximas da contração (+dT/dt) e do relaxamento (-dT/dt) .....	29
5.3 Resposta do farnesol sobre o influxo de Ca <sup>2+</sup> no átrio esquerdo de rato.....	30
5.4 Resposta do farnesol sobre a curva concentração-resposta do (+/-)-BAY K8644 no átrio esquerdo de rato.....	32
5.5 Resposta do farnesol sobre os canais para potássio no átrio esquerdo de rato .....	32
5.6 Resposta do farnesol sobre parâmetros eletrocardiográficos e pressão ventricular esquerda (PVE).....	33
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As utilizações de fitocomplexo oriundas de plantas utilizadas na medicina popular a muitos anos vêm sendo estudadas, devido a necessidade de encontrar novos compostos que possam ser utilizados como fármacos, devido a uma vasta gama de propriedades biológicas que incluem atividades anticancerígena, anti-infecciosa, antioxidante, analgésica, anti-inflamatória e anticolinesterase (de Menezes-Filho et al., 2014a; de Siqueira et al., 2014; Kamatou and Viljoen, 2010; Rocha et al., 2011a).

A Organização Mundial de Saúde no início da década de 1990 divulgou que 65-80% da população de países subdesenvolvidos utilizam as plantas medicinais como forma de acesso à saúde, e desde a década de 70 que tal organização incentiva a elaboração e execução de políticas públicas para o uso coerente das plantas medicinais e estudos científicos (Veiga Junior et al., 2005).

A evidência de constituintes operantes nas plantas, componentes que apresentam diversificadas atividades biológicas, nos traz estímulos para elucidar tais mecanismos de ação, conduzindo à pesquisas na área de farmacologia, química, bioquímica, fisiologia e biofísica (Maciel et al., 2002)

Os terpenoides constituem uma classe de derivado lipofílico oriundo do mevalonato que ocorrem amplamente na natureza, tendo como principais representantes os monoterpenos e sesquiterpenos, representando o grupo mais antigo de produtos de pequenas moléculas sintetizadas por plantas e cupins do gênero *Nasutitermes* (la Cruz et al., 2014). Esta classe (terpenos) denota propriedades farmacológicas que engloba atividades antioxidante, antifúngica e antimicrobiana (Rocha et al., 2014), anti-inflamatória, gastroprotetora (Rocha et al., 2011b), pró-apoptose (Chen et al., 2010), vasodilatadora (de Siqueira et al., 2014) e analgésica (Guimaraes et al., 2013). Algumas pesquisas demonstram que os terpenos exercem interação com os canais iônicos de membrana, alterando suas propriedades biofísicas (Chen et al., 2010; de Cerqueira et al., 2011; de Menezes-Filho et al., 2014b; de Siqueira et al., 2014).

Monoterpenos e sesquiterpenos são compostos geralmente encontrados em óleos essenciais de várias plantas aromáticas, enquanto os outros terpenoides são componentes de bálsamos, resinas, ceras e borrachas (Kamatou and Viljoen, 2010).

Nesse contexto, o farnesol é um álcool sesquiterpênico encontrado em óleos essenciais extraído do capim-limão, citronela, neroli, rosa, tuberosa e principalmente espécies do gênero *Vachellia farnesiana*, presente em folhas utilizadas como fitoterápicos e em diversos utensílios decorativos, produtos de higiene e perfumaria (Lapczynski et al., 2008; Trimble, 1885).

Pesquisas realizadas com o farnesol evidenciaram que essa substância foi capaz de aumentar o nível de todas as enzimas antioxidantes no tecido do cólon em ratos pré-tratados, atenuando a ação do 1,2-dimetil-hidrazina e diminuiu significativamente a atividade da caspase-3 no tecido do cólon que são induzidas por estresse oxidativo em câncer de cólon em ratos Wistar. (Khan and Sultana, 2011).

O farnesol foi capaz de diminuir a expressão do interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e a citocina indutora de Th1, IL-12 em ratos, melhorando a inflamação da lesão pulmonar induzida por instilação intratraqueal de extrato da fumaça do cigarro. (Qamar and Sultana, 2008).

O farnesol também evitou a ativação da proteína quinase C por forbol-12-miristato-13-acetato, mostrando que o farnesol inibe a proteína quinase C de células de origem neoplásica (Yazlovitskaya and Melnykovich, 1995).

Szűcs (2013) evidenciou que o farnesol apresenta efeito cardioprotetor reduzindo o tamanho do infarto no coração de ratos após isquemia/reperfusão aumentando a geranilgeranilação de proteínas cardíacas. (Szucs et al., 2013).

O farnesol inibiu a atividade dos canais de cálcio tipo-L em músculo liso sem modificar a liberação dos estoques intracelulares. (Luft et al., 1999; Rouillet et al., 1997).

É cónito que os principais mecanismos patológicos do coração envolvem alguma relação com a mudanças na atividade dos canais iônicos presentes na membrana do cardiomiócito, como também é sabido que a principal causa de morte no mundo se dá por doenças cardiovasculares. Dessa forma, faz-se necessário estudar o mecanismo de ação de tal substância no músculo cardíaco, uma vez que não há pesquisas demonstrando essa interação, que pode ser de grande valia no tratamento de várias patologias cardíacas (Bansilal and Fayad, 2014).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Canais para cálcio

No coração, existem dois tipos de canais para cálcio: canal para cálcio tipo-L e tipo-T. O canal para cálcio 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 cálcio tipo-T (“Tiny conductance”) caracteriza-se por possuir uma baixa condutância (8 pS), abertura transitória do canal e ativação em voltagens mais negativas (Bers, 2001).

A corrente do canal para cálcio tipo-L ( $I_{Ca-L}$ ) é a corrente de maior magnitude no miocárdio, e está envolvida em dois importantes eventos que acontecem no coração: o primeiro evento se caracteriza pela sua contribuição na manutenção do platô do potencial de ação cardíaco e o segundo evento quando a corrente de entrada de cálcio forma a unidade liberadora de cálcio (ULC), complexo estrutural e funcional do acoplamento excitação-contração (Balke and Goldman, 2003a).

O influxo de  $Ca^{+2}$  nos cardiomiócitos provoca vários processos fazendo parte da regulação da contração da célula e também participa do processo de regulação da expressão gênica celular (Resende et al., 2012). Os canais de cálcio 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 de cálcio ( $Cav\alpha 1$ ,  $Cav\alpha 2$  e  $Cav\alpha 3$ ). Dentro da subfamília  $Cav\alpha 1$ , existem 4 tipos de proteínas que podem ser expressas ( $Cav1.1$ ,  $Cav1.2$ ,  $Cav1.3$  e  $Cav1.4$ ). No cardiomiócito, a principal família que gera corrente de cálcio tipo-L é a que tem o fenótipo correspondente a  $Cav1.2 \alpha 1C$ . A proteína responsável pela expressão da corrente de cálcio tipo-T é a  $Cav3.1$  e  $Cav3.2$ . Na literatura, ainda há divergências em relação a essa subdivisão (Catterall, 2011).

A maior parte do  $Ca^{+2}$  que entra no cardiomiócito durante a contração, ocorre através da  $I_{Ca-L}$ . A inativação da  $I_{Ca}$  depende do aumento de  $Ca^{+2}$  intracelular, que pode ocorrer pelo influxo deste e pela sua liberação no citosol através do retículo sarcoplasmático pelos canais presentes nos receptores de rianodina. Como a inativação do canal depende da concentração de cálcio, é provável, que com a entrada desse íon haja uma sinalização direta no canal. Essa inativação dependente de  $Ca^{+2}$  gera um mecanismo de feedback que limita o influxo de  $Ca^{+2}$  na célula (Bers, 2001).

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 para íons, na contração celular, no metabolismo celular, na expressão gênica, na expressão de proteínas quinases e na proliferação celular. A CaM se liga a 4 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 deste íon aumentam e como consequência, a CaM muda o seu estado conformacional se ligando ao  $\text{Ca}^{+2}$  e se torna ativa ligando-se a proteínas alvo com alta afinidade (Bers, 2002).

## 2.2. Fisiologia do Coração

O coração pode ser descrito como sendo um órgão que atua como uma bomba dupla. O coração direito que impulsiona o sangue para a circulação pulmonar, e o coração esquerdo responsável por ofertar sangue aos tecidos, munindo-lhes de nutrientes e oxigênio essenciais ao metabolismo celular. Ao todo o coração é formado por quatro câmaras, duas atriais e duas ventriculares (Kronenberg et al., 2008).

Os átrios atuam como câmaras de ponderação, equilibrando a pressão venosa pulmonar durante variações do retorno venoso e da demanda ventricular, e funcionam como bomba de escova para os ventrículos (*primer pump*) ajudando no enchimento completo das câmaras ventriculares (Hall, 2012). O ventrículo direito ejeta o sangue pobre em oxigênio e rico em gás carbônico para os pulmões, o ventrículo esquerdo ejeta o sangue rico em oxigênio para todo o corpo. Para tanto, o coração exercerá uma pressão elevada para bombear esse sangue, isso é possível devido a uma espessura maior da parede do ventrículo esquerdo. Para que ocorra o perfeito funcionamento da bomba, existem quatro valvas, duas localizadas entre os átrios e ventrículos, denominadas valvas atrioventriculares, e duas na entrada das grandes artérias, denominadas valvas aórtica e pulmonar. Tais estruturas são de extrema importância durante as fases de relaxamento (diástole) e contração (sístole), pois permitem o fluxo de sangue em um único sentido não permitindo que este retorne, fechando-se quando o gradiente pressórico se inverte.

O que regula a abertura e fechamento das valvas são as pressões dentro das câmaras cardíacas, nas valvas atrioventriculares há um alto grau de superposição dos folhetos quando a válvula está fechada. As cordas tendinosas, que se originam dos músculos papilares, se prendem

às bordas livres das válvulas e impedem sua eversão durante a sístole ventricular. As válvulas semilunares impedem a regurgitação do sangue para os ventrículos após a sístole ventricular, porque num breve período de inversão de fluxo as cúspides são abruptamente aproximadas pelo sangue. (Stradins et al., 2004)

O sistema de condução cardíaco é composto pelo nodo sinusal ou sinoatrial, pelas vias internodais, nodo atrioventricular, feixe de His e suas ramificações, e pelo sistema de Purkinje. O potencial elétrico se inicia no nodo sinusal, sendo que todas as outras estruturas são responsáveis pela condução uniforme do estímulo para todo o órgão (Guyton, 2008).

O coração é formado por dois sincícios: atrial e ventricular. Esses sincícios são formados por células musculares estriadas que estão acopladas entre si por junções comunicantes, com um núcleo menor que a do músculo esquelético, possuindo muitas mitocôndrias que fornecem a energia necessária para a contração (DE MELLO AIRES, 2008).

Uma característica do músculo cardíaco é a presença de faixas escuras espaçadas entre miócitos, conhecidos como discos intercalares. Estes são formados por áreas onde as membranas dos miócitos adjacentes estão muito próximas entre si (3 nm). Trata-se de complexos juncionais dotados de regiões especializadas, para fixação mecânica, transmissão de corrente elétrica e para a comunicação química. Classicamente, os discos intercalares são descritos como contendo três "zonas" funcionais: *fascia adherens*, *desmosomos* ou *macula adherens* e *nexus*. Porém, uma nova região chamada de *transitional junction*, situada no perímetro da *fascia adherens*, é considerada como sendo um local onde os sarcômeros podem ser adicionados durante o crescimento e desenvolvimento das miofibrilas, a exemplo da hipertrofia (Bennett et al., 2006).

As regiões da *fascia adherens* transmitem a contração entre as células acopladas, proporcionando um apoio entre as miofibrilas, onde os filamentos espessos da miosina e os filamentos finos de actina se conectam com as proteínas da *fáscia adherens*, que, por sua vez, se fixam à membrana do disco intercalar. A *fáscia adherens* contém uma proteína transmembrana chamada catenina que se liga às caderinas nos sarcômeros, formando um contato intercelular (Peters et al., 1994).

As *maculas adherens* são estruturas das células especializadas na adesão de célula-a-célula, trabalhando como um complexo juncional, dispostas aleatoriamente nas laterais da membrana plasmática, ajudando a resistir a forças de cisalhamento (Cooper, 2000).

Os *nexus* são junções que fornece continuidade elétrica, por possuírem proteínas denominadas conexinas, tais proteínas permitem ao potencial de ação propagar-se rapidamente para vários cardiomiócitos adjacentes, comportando-se como um sincício funcional por

possuírem junções de baixa resistência elétrica, as junções do tipo *gap* (junções comunicantes) (Wilson et al., 2011).

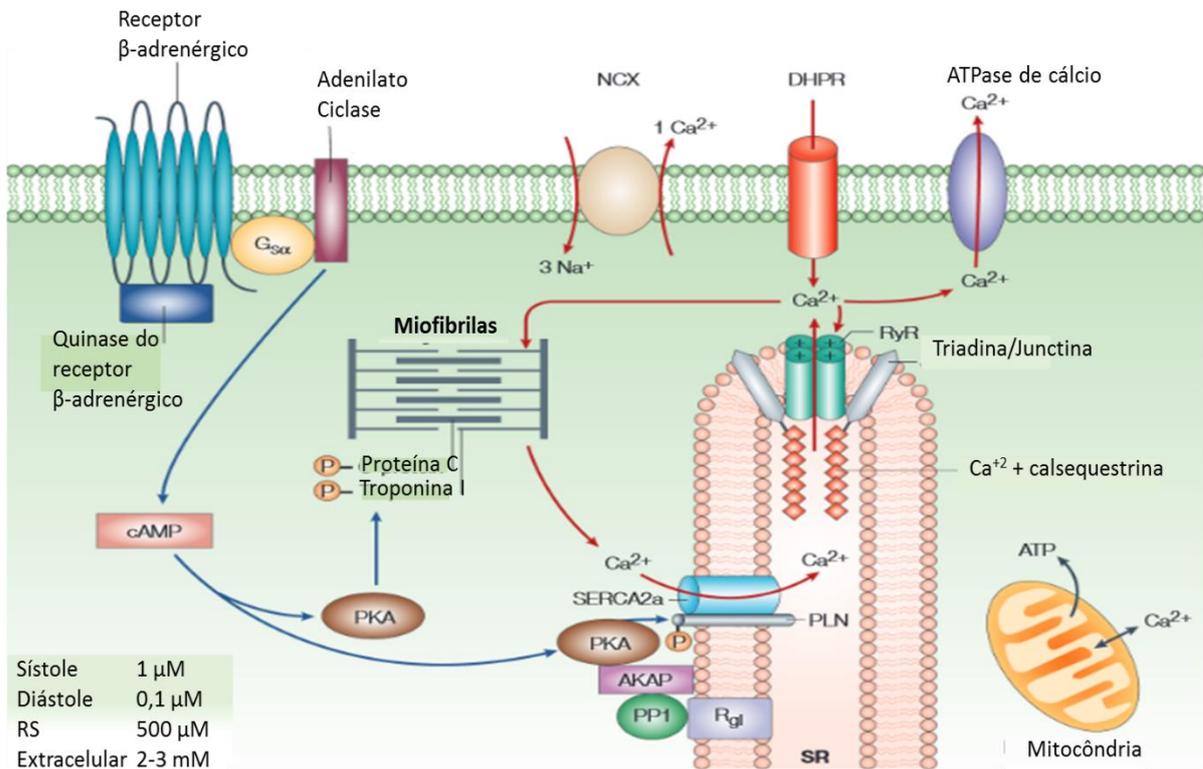
No sarcômero pode ser visto duas bandas: banda A e banda I. A força gerada pela miosina presente na banda A, sendo esta mais escura e de maior densidade (cerca de 2,5  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro) por possuir filamentos de miosina e actina, é transmitida ao longo dos filamentos de actina (presentes na banda I) para os discos Z nas extremidades do sarcômero, e portanto, ao longo de miofibrilas adjacentes até que a força atinja as membranas dos discos intercalares nas extremidades da célula (DE MELLO AIRES, 2008).

A capacidade contrátil da célula cardíaca está diretamente associada à homeostasia do  $\text{Ca}^{+2}$  no processo que vai da excitação elétrica do cardiomiócito até a contração do coração, fenômeno denominado acoplamento excitação-contração (AEC) (Bers, 2001). O  $\text{Ca}^{+2}$  está envolvido tanto na excitabilidade dos cardiomiócitos, quanto na ativação final dos filamentos contráteis, causando a contração (Bers, 2002).

A despolarização do sarcolema durante o potencial de ação cardíaco faz com que haja um influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  para o interior da célula (Fabiato and Fabiato, 1975). O influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  para o interior do cardiomiócito ocorre por meio da abertura de duas classes de canais dependentes de voltagem (Fig. 1), os canais para  $\text{Ca}^{+2}$  do tipo-L e do tipo-T (Bers, 2001). Tal movimentação de  $\text{Ca}^{+2}$  gera uma corrente de entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ) (Mitra and Morad, 1986), que nos cardiomiócitos de ratos representa principalmente a  $I_{\text{Ca}}$  do tipo-L (Bers, 2002). Os canais para  $\text{Ca}^{+2}$  do tipo-L, também chamados de receptores de dihidropiridina (DHPR), estão expressos em sua maior parte nos túbulos transversos da membrana plasmática, com sua porção intracelular voltada para o retículo sarcoplasmático (RS) (Scriven et al., 2000). O espaço entre a membrana plasmática e a membrana do RS é chamado de subespaço (Cheng and Lederer, 2008). Estes arranjos funcionais de colocação e formação de microdomínios de  $\text{Ca}^{+2}$  são fundamentais para o processo de AEC (Berridge, 2006). Na membrana do RS está a unidade liberadora de  $\text{Ca}^{+2}$ , que compreende um grupo específico de receptores chamados de rianodina (RyR). Atualmente, foram identificados três tipos de genes (*ryr1*, *ryr2* e *ryr3*) que expressam diferentes isoformas de RyR, sendo que a isoforma RyR2 localiza-se principalmente no músculo cardíaco. Tal arranjo funcional entre os DHPR e os RyR2, juntamente com o subespaço entre eles formam a unidade liberadora de cálcio (ULC), complexo estrutural e funcional do AEC (Cheng and Lederer, 2008; Franzini-Armstrong et al., 1999). O influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  através do DHPR para o subespaço promove a liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  pelo RS, processo conhecido como liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  induzida por  $\text{Ca}^{+2}$ , do inglês *calcium-induced calcium release* – CICR (Fabiato, 1985).

A ativação dos RyR2 provoca aumentos transitórios na concentração citoplasmática do  $\text{Ca}^{+2}$ . Estes eventos elementares, representados por aumentos transitórios de  $\text{Ca}^{+2}$ , podem variar desde eventos mais discretos, como, por exemplo, as *sparks* de  $\text{Ca}^{+2}$ , que ocorre em apenas uma ULC (Cheng and Lederer, 2008), como em toda a unidade celular, transiente intracelular global de  $\text{Ca}^{+2}$  (Bers, 2001). Neste último, a ativação dos RyR2 pelo  $\text{Ca}^{+2}$  é suficiente para aumentar as concentrações deste íon, fazendo-o variar de 100 nM a 1  $\mu\text{M}$  na fase sistólica. O cálcio livre liga-se a troponina-C que é parte do complexo de regulação ligado aos filamentos finos. Quando o cálcio se liga a troponina-C, este induz uma alteração conformacional no complexo de regulação de tal forma que a troponina I expõe um local na molécula de actina, que é capaz de se ligar a miosina ATPase localizada na cabeça da miosina. Esta ligação provoca a hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP) que está ligado à cabeça leve da miosina, em difosfato de adenosina (ADP), esta hidrólise fornece energia para que ocorra mudança conformacional no complexo actina-miosina. Estas mudanças promovem um movimento tipo "catraca" entre as cabeças de miosina e actina, de tal forma que os filamentos de actina e miosina deslizam umas sobre as outras encurtando assim o comprimento do sarcômero (de Tombe, 2003).

Por outro lado, para que o músculo cardíaco relaxe é necessário a dissociação do  $\text{Ca}^{+2}$  dos sítios de ligação com a troponina C e sua remoção do citoplasma (Khan et al., 2004). A remoção do  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico ocorre por meio de quatro processos: pela ATPase de cálcio do RS (*sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase* - SERCA2a), ativação da  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase do sarcolema (*plasma-membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases* - PMCA), do trocador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$  ( *$\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$  exchangers* - NCXs) e recaptção do  $\text{Ca}^{+2}$  para mitocôndria. A atividade da SERCA2a é o principal destes mecanismos (Tada and Katz, 1982), correspondendo por aproximadamente 92 % da recaptção do  $\text{Ca}^{+2}$  em cardiomiócitos de ratos (Bassani et al., 1994). A atividade da SERCA2a é regulada pela fosfolambam (PLB), o qual, em estado desfosforilado, inibe a SERCA2a. Assim, a fosforilação do PLB acelera a captação de  $\text{Ca}^{+2}$  pelo RS. A concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular é impotante para determinar a afinidade da atividade da SERCA2a. Em concentrações de  $\text{Ca}^{+2}$  de 100 nM a 1  $\mu\text{M}$ , ocorre diminuição da atividade da SERCA2a. No entanto, a atividade pode ser aumentada pela fosforilação da PLB por qualquer PKA (como ocorre por estimulação  $\beta_2$ -adrenérgica), PKC (estimulação  $\alpha_1$ - adrenérgica) ou proteína quinase dependente de  $\text{Ca}^{+2}$ /calmodulina (CaMK II) (Bassani et al., 1995; MacLennan and Kranias, 2003). Assim sendo, a diminuição da concentração citosólica do cálcio para valores inferiores a 100 nM, promove a dissociação do cálcio que está ligado a troponina C. Os locais ativos da actina com a miosina se inativam, ADP é substituído por outra molécula de ATP na cabeça da miosina, até que um novo evento aconteça (Grimm et al., 2015).



**Figura 1.** Mecanismos intracelulares de regulação do Acoplamento Excitação-Contração do Coração (AEC) mostrando a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais tipo-L e o receptores de rianodina (RyR) da membrana do RS (Retículo sarcoplasmático) tal fenômeno acarreta a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR) (MacLennan and Kranias, 2003).

### 2.3. Potencial de repouso e ação

O potencial de membrana de uma célula depende, basicamente, da diferença entre as concentrações dos vários íons entre os meios intra e extracelular, formando um potencial elétrico (voltagem) entre as duas faces da membrana plasmática. Assim, todos os íons presentes nos diferentes meios (intra e extracelular) podem contribuir para formação do potencial transmembranar (Wilson et al., 2011).

Tal valor pode ser expresso pela equação de Goldman-Hodgkin-Katz, onde  $V_m$  representa o potencial elétrico da membrana;  $G_{\text{Na}}$ ,  $G_{\text{K}}$  e  $G_{\text{Ca}}$ , representam as condutâncias respectivamente do sódio, potássio e cálcio; e  $E_{\text{Na}}$ ,  $E_{\text{K}}$  e  $E_{\text{Ca}}$  representam os potenciais de equilíbrio desses íons (Bowman and Baglioni, 1984; Garcia, 1998).

$$V_m = \frac{E_{\text{Na}}G_{\text{Na}} + E_{\text{K}}G_{\text{K}} + E_{\text{Ca}}G_{\text{Ca}} + \dots}{G_{\text{Na}} + G_{\text{K}} + G_{\text{Ca}} + \dots}$$

Para determinar qual o íon mais importante para manter o potencial de repouso da membrana do miocárdio, foi demonstrado em átrio de coelho, que no miocárdio o íon mais importante para determinar o potencial de repouso é o potássio (de Carvalho et al., 1969). Considerando apenas os dois íons com maior concentração na composição do meio intracelular (potássio) e extracelular (sódio) poderemos descrever que:

$$G_{Na} (Vm - E_{Na}) = - G_K (Vm - E_K)$$

Portanto, dessa igualdade poderemos obter que:

$$Vm = Vr = \frac{E_{Na}G_{Na} + E_KG_K}{G_{Na} + G_K}$$

Sendo que, Vr corresponde ao potencial de repouso.

No miocárdio, durante o repouso, a condutância para o potássio é cerca de 50 vezes maior que a condutância para o sódio. Isto implica que, na equação de Goldman-Hodgkin-Katz, nos termos que contêm  $G_K$  serão maiores do que os que contêm  $G_{Na}$  (Wilson et al., 2011). É por esta razão, que o potencial de repouso depende muito mais do  $K^+$  do que do  $Na^+$  tendo um valor mais próximo ao potencial de equilíbrio do potássio (-92 mV) (DE MELLO AIRES, 2008).

O potencial de ação corresponde ao sinal elétrico que se propaga para transmitir informação ou para iniciar uma contração, podendo, em algumas células haver a ultrapassagem da voltagem 0 mV, chamado assim de *overshoot*. Os potenciais de ação são gerados com a participação de canais iônicos dependentes de voltagem localizados na membrana plasmática da célula (Rudy, 2008).

Paes de Carvalho, Hoffman e Langan, em 1966, demonstraram que o potencial de ação cardíaco poderia ser separado em dois componentes (rápido e lento), levando em conta o nível do potencial de repouso e a velocidade de despolarização da fase 0. O componente rápido apresenta cinco fases durante o potencial de ação, já o componente lento apresenta três fases (de Carvalho et al., 1969).

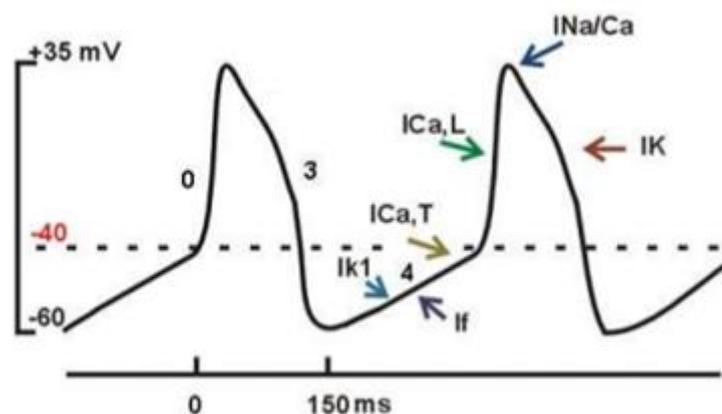
### 2.3.1 Potencial de ação lento

O potencial de ação (PA) lento ocorre nas células marcapasso, células com propriedade de automatismo. Essas células se encontram em maior quantidade no nodo sinusal e no nodo

atrioventricular, mas podem ser encontradas em qualquer ponto do tecido cardíaco. As três fases correspondentes desse tipo de PA são: fase 4, fase 0 e fase 3 (Boyett and Dobrzynski, 2007).

A fase 4 caracteriza-se pela variação contínua do potencial de membrana, chamado de despolarização diastólica lenta (DDL) do PA. A DDL ocorre devido a progressiva redução à permeabilidade da membrana aos íons potássio, abertura do canal de  $\text{Na}^+$  denominado *Funny* ( $I_F$ ), abertura dos canais para cálcio do tipo-L e tipo-T e a corrente do trocador  $\text{Na}/\text{Ca}^{+2}$  (Catterall, 2011; DiFrancesco, 2006; Rudy, 2008).

A fase 0 corresponde a abertura dos canais para cálcio do tipo L – *high-threshold transiente current* ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) uma vez que não há participação dos canais para sódio na gênese do PA nodal (Grant, 2009). Os  $I_{\text{Ca,L}}$  são ativados em potenciais de -30 a -20 mV e se inativam mais lentamente, a inativação não depende de voltagem mas ocorre pela própria cinética do canal (Catterall, 2011). Os PAs dessas regiões não apresenta fase 1, nem propriamente um platô (fase 2) (Verkerk et al., 2009). Após a fase 0, ocorre uma repolarização mais lenta e contínua que corresponde a fase 3, sendo mais rápida ao final, já que nessas células não foram encontradas evidências da ocorrência da corrente transiente de efluxo ( $I_{\text{to1}}$ ), sendo então os canais retificadores retardados ( $I_K$ ) do tipo  $I_{K_r}$  e  $I_{K_s}$  que constituem as principais vias de repolarização. Estes canais são denominados retardados por sua ativação tardia, comparada com as outras correntes de  $\text{K}^+$  (Schmitt et al., 2014).



**Figura 2.** Potencial de ação cardíaco de célula nodal e as correntes envolvidas, assim como as fases do PA em que elas atuam.  $I_{K1}$  – corrente retificadora de entrada;  $I_f$  – corrente de  $\text{Na}^+$  tipo *funny*;  $I_{\text{Ca,T}}$  – corrente de cálcio pelos canais tipo-T;  $I_{\text{Ca,L}}$  – corrente de cálcio pelos canais tipo-L;  $I_{\text{Na}/\text{Ca}}$  corrente de sódio e cálcio;  $I_K$  – corrente de potássio.

### 2.3.2 Potencial de ação rápido

O potencial de ação rápido é característico de miocárdio atrial, ventricular, feixe de His e fibras de Purkinje, correspondem a cinco fases: fases 0, 1, 2, 3, e 4 (Fig. 2) (Grant, 2009). A fase 0 corresponde a corrente de despolarização, sendo a corrente de sódio dependente de voltagem ( $I_{Na}$ ) responsável por essa fase. Este tipo de canal possui 3 estados conformacionais: fechado (quando o canal está apto a se abrir após o estímulo atingir o limiar de despolarização), aberto (quando ocorre o influxo de íons pelo canal) e inativado (não responde a estímulo). A fase 0 é ativada quando a membrana celular recebe uma estimulação e ocorre a despolarização, promovendo a abertura do poro do canal e o influxo de  $Na^+$ . Uma característica dessa fase é a alta condutância ao  $Na^+$ , levando o potencial da membrana próximo ao  $E_{Na}$  (Chen-Izu et al., 2015). Nesta fase o canal para potássio retificador de influxo ( $I_{K1}$ , *inward rectifier channel*) se fecha quase que instantaneamente após a despolarização permanecendo assim durante todo o platô. Esse canal se abre no final da fase 3 e permanece aberto durante todo o repouso contribuindo para a manutenção do potencial de repouso do cardiomiócito próximo ao  $E_K$  (fase 4), (Grant, 2009).

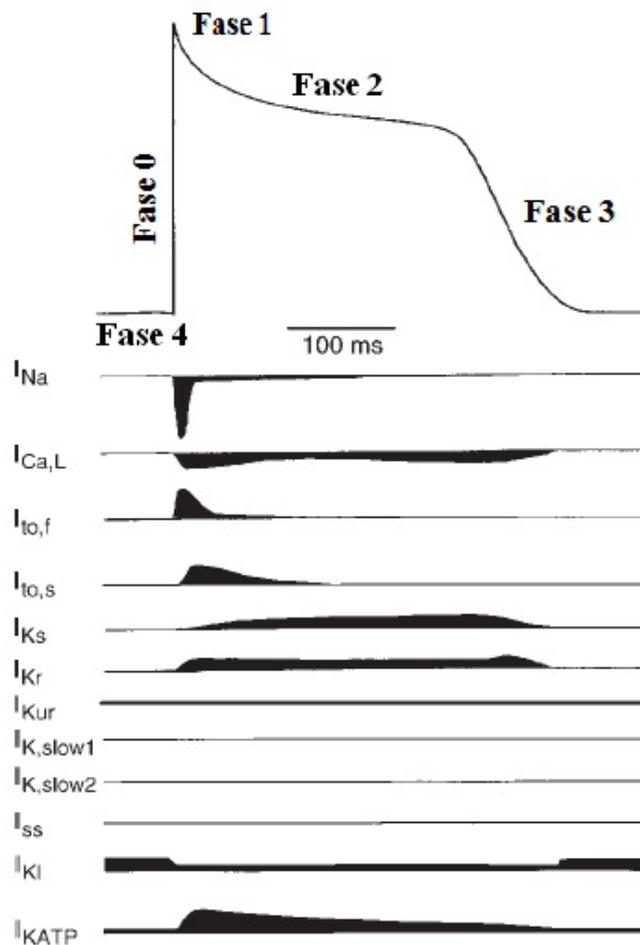
Na fase 1 ocorre uma rápida e transitória repolarização, que está associada a inativação da  $I_{Na}$  e abertura do canal para potássio transiente de efluxo ( $I_{to1}$ ) que é ativado por despolarização (Duan, 2013). A fase 1 também conta com uma corrente repolarizante através de um canal para cloreto ( $I_{to2}$ ). Devido ao seu potencial de equilíbrio estar próximo de -50 mV, o  $Cl^-$  tende a entrar na célula por gradiente eletroquímico durante quase toda a fase de repolarização (Hiraoka et al., 1998).

Durante a fase de platô (fase 2), ocorre a abertura dos canais para cálcio do tipo-L ( $I_{Ca,L}$ ). Esses canais são lentos para abrir e atingir sua condutância máxima, porém se inativam mais lentamente ainda, sendo que esta corrente de influxo, juntamente com a redução da  $I_{K1}$ , são as principais responsáveis por manter o platô da fase 2. A  $I_{Ca,L}$  também é responsável por liberar o  $Ca^{+2}$  do RS, aumentando o transiente de  $Ca^{+2}$  intracelular, resultando na ativação dos miofilamentos, promovendo a contração cardíaca (Balke and Goldman, 2003b).

No final da fase 0 e início da fase 3 (repolarização completa) ocorre a abertura dos canais retificadores retardados (*delayer rectifier channel* -  $I_K$ ) São 3 subtipos desses canais: de ativação ultra rápida ( $I_{Kur}$ ), rápida ( $I_{Kr}$ ) e lenta ( $I_{Ks}$ ) (Tamargo et al., 2004). A corrente  $I_{Ks}$ , que não responde ao sotalol, se ativa no final da fase 2 sendo responsável por iniciar a fase 3 do PA, permanecendo aberto durante toda esta fase. O  $I_{Kr}$ , que responde ao sotalol, tem uma condutância baixa no final da fase 2, porém alcança sua condutância máxima durante a fase 3

(Garcia, 1998). O  $I_{Kur}$  foi encontrado em células atriais, não estando presentes em tecido ventricular de humano. São correntes ativadas no início do platô, acarretando na redução temporal do platô das células atriais. Eles são inativados muito lentamente durante o PA, sendo também responsável pela fase de repolarização atrial (Tamargo et al., 2004).

Durante o final da fase 03 ocorre a abertura da corrente retificadora de influxo ( $I_{K1}$ ), responsável por atuar na fase tardia da repolarização e manter o potencial de repouso (fase 4) (Schmitt et al., 2014).



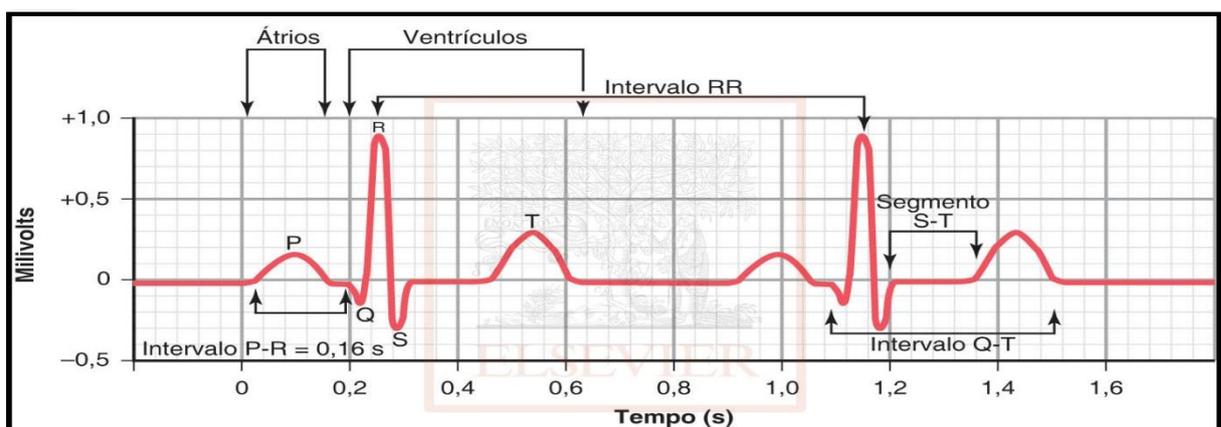
**Figura 3.** Potencial de ação cardíaco ventricular e as correntes envolvidas em seu formato, assim como as fases do PA em que elas atuam (Nerbonne and Kass, 2005). Corrente de sódio -  $I_{Na}$ ; Corrente de cálcio pelos canais do tipo-L ( $I_{Ca-L}$ ); Corrente transiente de efluxo de inativação rápida ( $I_{to,f}$ ), inativação lenta ( $I_{to,s}$ ); Corrente de potássio retificador retardado lento ( $I_{Ks}$ ), rápido ( $I_{Kr}$ ), ultrarrápido ( $I_{Kur}$ ); Corrente de potássio de baixa condutância ( $I_{K,slow1}$ ;  $I_{K,slow2}$ ;  $I_{ss}$ ); Corrente transiente de influxo ( $I_{K1}$ ); Corrente de potássio dependentes de ATP ( $I_{KATP}$ ).

## 2.4 Bases do eletrocardiograma (ECG)

Anteriormente à gravação do ECG, usando o eletrômetro de Lippmann feita por Augustus Waller em 1887, já se sabia que o funcionamento do coração produzia flutuações periódicas no potencial elétrico da superfície corporal. Porém graças aos trabalhos desenvolvidos por Willem Einthoven em 1901, obteve-se o desenvolvimento de um sistema capaz de registrar tais flutuações do campo elétrico cardíaco, as quais eram transformadas pelo galvanômetro de corda, em ondas eletrocardiográficas (Cooper, 1986).

Durante cada batimento cardíaco, observa-se que o ciclo cardíaco origina-se com uma progressão ordenada de despolarização, que se inicia com as células marcapasso do nodo sinusal. Tal despolarização é conduzida pelas vias inter nodais, através do átrio direito e depois o esquerdo, passando através do nodo atrioventricular para o feixe de His e fibras de Purkinje, espalhando para baixo e para a esquerda ao longo dos ventrículos. Este padrão ordenado de despolarização e, posteriormente, a repolarização origina o traçado de ECG característico (Hollman, 1996)

O ECG (Fig. 4) é o registro gráfico da projeção dos vetores de ativação elétrica (PA) do coração nas diferentes linhas de derivações durante um período de tempo, utilizando eletrodos colocados no corpo. Esses eletrodos detectam pequenas correntes elétricas que surgem a partir da despolarização e repolarização do músculo cardíaco durante cada ciclo cardíaco (Walker et al., 1990).



**Figura 04.** Eletrocardiograma normal, mostrando as ondas de despolarização (P, QRS) e repolarização (T), e os principais intervalos (PR, QT e RR) e segmentos (ST) (Hall, 2010).

### **2.4.1 Registro de despolarização atrial, geração da onda P**

Em um ritmo normal, o PA é gerado pelo nodo sinusal, que fica localizado na parede pósterolateral do átrio direito, na conexão das veias cavas com o átrio, tal nodo tem as células com maior grau de automatismo cardíaco, por isso denominado marcapasso cardíaco (Hall, 2010).

A atividade gerada pelo nodo sinusal se propaga pelo átrio direito, através das *cristas terminalis*, despolarizando o septo atrial e posteriormente o átrio esquerdo. As ativações das câmaras cardíacas atriais podem ser representadas por dois vetores: o primeiro ligeiramente voltado para esquerda, para baixo e para frente, e o segundo para esquerda, para trás e com uma pequena inclinação para o baixo. Esses dois vetores geram um vetor resultante chamado *vetor P* que se orienta, para esquerda e para baixo no plano frontal, e para trás no plano horizontal. Sendo assim, o vetor P é a resultante da ativação dos dois átrios e, portanto, responsável por gerar a inscrição da onda P, que reflete o tempo gasto da despolarização dos átrios (Gacek and Pedrycz, 2011).

### **2.4.2. Condução atrioventricular e intervalo PR**

Separando os átrios dos ventrículos, existe uma estrutura conjuntiva que funciona como um isolante elétrico, impedindo a condução do estímulo dos átrios para os ventrículos. Deste modo, existe apenas uma pequena e única região que realiza a conexão elétrica entre as câmaras atriais das ventriculares, denominada nodo atrioventricular (NAV). A passagem da onda elétrica pelo NAV gera uma linha isoeletrica no ECG denominada seguimento PR, onde ocorre o retardo fisiológico no NAV. O intervalo PR se inicia, no começo da onda P ao início do QRS e varia de acordo com a frequência cardíaca e a idade (Pedley et al., 2002).

### **2.4.3. Geração do complexo QRS e a ativação dos ventrículos**

Ao passar pela região do NAV, a propagação elétrica chega ao feixe de His, uma área em que o estímulo se divide para os ramos direito e esquerdo, atingindo as fibras de Purkinje. As fibras de Purkinje possuem maior diâmetro e elevado grau de acoplamento intercelular no

sentido longitudinal, levando a propagação do PA nessas fibras com grande velocidade (Hall, 2010).

A ativação do ventrículo se inicia pelo septo interventricular, segue em direção ao ápice do coração propagando-se para baixo e para frente. Terminando com a excitação das regiões posterobasais de ambos os ventrículos, gerando um vetor que normalmente está voltado para trás, responsável por gerar a última inscrição do QRS (Gacek and Pedrycz, 2011).

#### **2.4.4 Onda T e a repolarização dos ventrículos**

A onda T é gerada pela repolarização dos ventrículos. Como as fibras do epicárdio ventricular têm uma duração de PA ligeiramente menor, essas começam a se repolarizar primeiro do que as fibras do endocárdio, gerando um vetor de repolarização que se dirige do epicárdio para o endocárdio. Dessa maneira, os vetores de despolarização e repolarização ventricular têm o mesmo sentido elétrico, tornando a onda T positiva (Haarmark et al., 2010).

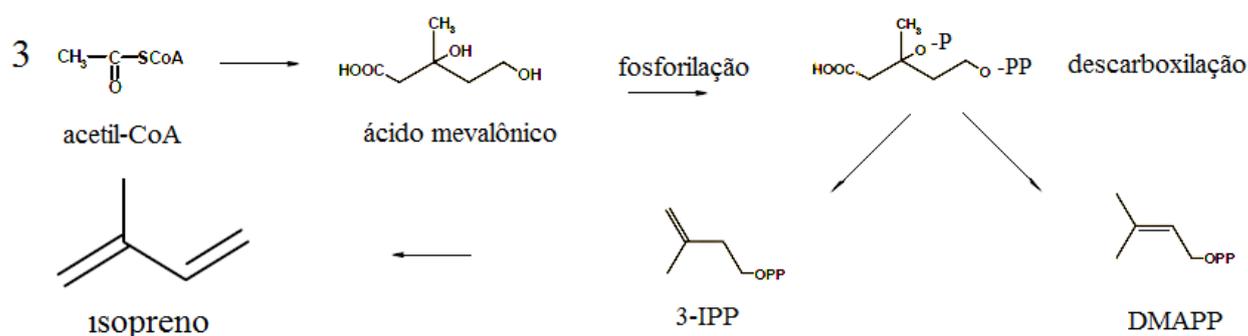
O intervalo QT é um parâmetro eletrocardiográfico que representa a duração da despolarização e repolarização ventricular, marcado do início do complexo QRS até o final da onda T. O intervalo QT varia com a frequência cardíaca e com o aporte do sistema nervoso autônomo, sendo na bradicardia, mais longo, enquanto que na taquicardia é curto. Desse modo, a duração do QT deve ser corrigido pela fórmula de Bazett, se expressando como QTc. Onde o valor do QT é dividido pela raiz quadrada do intervalo entre duas ondas R (RR). Portanto, QTc nada mais é que o ajuste do QT para a frequência de 1Hz, ou 60 batimentos por minuto (Hasnain and Vieweg, 2014).

#### **2.5. Terpenos**

Os terpenoides também chamados de terpenos ou isoprenoides constituem uma classe de derivados lipofílicos do ácido mevalônico e são moléculas que advêm da interação de unidades de isoprenos, que ocorrem amplamente na natureza (Fig. 5). Representam o grupo mais antigo de produtos de pequenas moléculas sintetizadas por plantas e cupins do gênero *Nasutitermes* (*Isoptera*, *Termitidae*, *Nasutitermitinae*). Vários terpenos têm sido aplicados como matriz para elaboração de complexos sintéticos e novos fármacos através da simplificação molecular. Estes são compostos derivados de precursores sintetizados pela rota do ácido

mevalônico, contendo um arcabouço básico com unidades isoprênicas (la Cruz et al., 2014; Lapczynski et al., 2008; Simoes, 2007).

Os esqueletos carbonados dos terpenóides são formados por um número variável de unidades isoprênicas, sendo que o pirofosfato de isopentilalila (IPP) e o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) são os precursores terpênicos (Fig. 5). Os terpenos são agrupados quanto ao número de unidades isoprênicas e podem apresentar esqueleto acíclico ou com diferentes ciclizações (la Cruz et al., 2014; Simoes, 2007).



**Figura 5** – Biossíntese dos terpenos pela via mevalonato. O mevalônico proveniente da união de unidades de acetil coenzima A (acetil-CoA). Ocorrendo a desfosforilação e descarboxilação do ácido mevalônico originando o pirofosfato de isopentenila (3-IPP) e pirofosfato de dimetilalila (DMAPP). Em muitos casos o pirofosfato de isopentenila e o pirofosfato de dimetilalila ligam-se entre si para formar unidades de isopreno (C5) (Simoes, 2007).

Os monoterpenos são as moléculas mais encontradas nos óleos essenciais, representando 90% da sua composição. São moléculas constituídas por 10 átomos de carbono formados pela justaposição de duas unidades isoprênicas. O complexo mais comum para composição dos monoterpenos é o pirofosfato de geranila, contendo uma ligação dupla, o que concede reações com formação de isômeros, elaborando inúmeros tipos monoterpos, apresentando cadeias abertas, cíclicas ou bicíclicas, oxigenadas ou não (Maßberg et al., 2015).

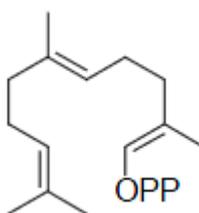
Os diterpenos são formados de 4 unidades de isoprenos. Seu antecessor comum é o geranilgeranilpirofosfato, uma estrutura formada pela adição de uma unidade isoprênica (C5) ao farnesil (C15) formando um diterpeno acíclico com 20 carbonos em sua estrutura, frequentemente de cadeia acíclica.

Já foram descritos mais de 1000 tipos de sesquiterpenos em óleos essenciais. Sendo essa classe destacada pela complexidade de suas estruturas, e tem como unidade básica de origem o

pirofosfato de farnesila, que por sua vez é originado por 3 unidades isoprenas. O pirofosfato de farnesila expõe uma estrutura carbônica maior e a presença de três duplas ligações, concebendo uma variedade de estruturas diferenciadas, com cadeias lineares, monocíclicas, bicíclicas e tricíclicas.

A natureza dos sesquiterpenos podem ser acíclicos, com átomos de carbono estruturais em cadeias abertas (farnesol, nerolidol); monocíclicos, com um anel benzênico (ácido abscísico); bicíclicos, com dois anéis benzênicos (gama-bisaboleno, beta-selineno, cariofileno) ou lactonas sesquiterpênicas, compostos que após o processo de biossíntese apresentam uma lactona em seu esqueleto carbônico (Simoes, 2007).

Os sesquiterpenos são originários do 2,6-*trans*-farnesil pirofosfato (Fig. 6) que através de uma defluência de ciclizações, e alguns arranjos mediados por enzimas expõem um esqueleto carbônico com presença de três duplas ligações. Isso concebe uma gama de estruturas distintas, com cadeias lineares, monocíclicas, bicíclicas e tricíclicas. Tece assim todo o conjunto de esqueletos carbônicos conhecidos para esta classe de compostos (Filippo D'Antuono et al., 2016).



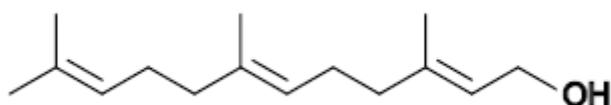
**Figura 06.** Representação da estrutura química do 2,6-*trans*-farnesil-pirofosfato (Cunha Neto, 2006).

Os sesquiterpenos são utilizados como ingrediente de perfumaria em cosméticos, como perfumes, *shampoos*, sabonetes e outros produtos de higiene pessoal, e em produtos não cosméticos, tais como produtos de limpeza e detergentes (de Siqueira et al., 2014)

### 2.5.1. Farnesol

O farnesol (Fig. 7) é um álcool sesquiterpênico encontrado em óleos essenciais extraídos do capim-limão (*Cymbopogon citratus*), citronela (*Cymbopogon nardus*), neroli (*Citrus*

*aurantium*), rosa (*Rosa centifolia*) e tuberosa (*Polianthes tuberosa*). O farnesol foi assim nomeado devido a farnese acácia (*Vachellia farnesiana*), já que as flores desta árvore eram a fonte comercial da essência floral em que foi identificada esta substância química, a adição do *ol* foi devido a tal substância ser quimicamente um álcool (Trimble, 1885). O farnesol é um líquido incolor, oleoso com um suave e delicado odor doce, utilizado como ingrediente de perfumaria, cosméticos decorativos, perfumes finos, shampoos, sabonetes e outros produtos de higiene pessoal (Lapczynski et al., 2008).



**Figura 07** – Representação da estrutura química da estrutura química do farnesol

Pesquisas evidenciam algumas propriedades benéficas do farnesol como: propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e quimiopreventiva (Khan and Sultana, 2011; Qamar and Sultana, 2008; Yazlovitskaya and Melnykovych, 1995).

Estudos realizados com o farnesol mostraram que tal substância atenua a ação do 1,2-dimetil-hidrazina que é induzida por estresse oxidativo em câncer de cólon em ratos Wistar. As consequências do câncer de cólon são as lesões celulares causadas pelo estresse oxidativo devido a inflamação persistente e o dano tecidual por apoptose. O farnesol foi capaz de aumentar o nível de todas as enzimas antioxidantes no tecido do cólon em ratos pré-tratados com farnesol. Os efeitos do farnesol, foram avaliados por meio da atividade das caspase-3 e a peroxidação lipídica do tecido. No tratamento profilático houve aumento das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase e quinona reductase. Os resultados mostraram que o farnesol diminuiu significativamente a atividade da caspase-3 no tecido do cólon (Khan and Sultana, 2011).

O farnesol também foi capaz de melhorar a inflamação da lesão pulmonar induzida por instilação intratraqueal de extrato da fumaça do cigarro em ratos. Foi observado que o farnesol diminuiu a expressão do interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e a citocina indutora de Th1, IL-12 em ratos, restaurando os níveis do potencial de oxidação aumentando as glutathione reductase e a glutathione peroxidase. Houve também a restauração dos níveis da enzima catalase, responsável pela quebra do peróxido de oxigênio em água e oxigênio. Pode-se dizer que o farnesol potencializa

as enzimas de defesa endógena em pulmões de ratos contra o estresse oxidativo induzido por extrato da fumaça do cigarro (Qamar and Sultana, 2008).

O farnesol também foi capaz de causar a translocação da proteína quinase C (PKC) a partir da fração microssômica do citosol inibindo assim a sua atividade, evitando também a ativação do PKC por PMA (forbol-12-miristato-13-acetato), o qual é utilizado como uma ferramenta de pesquisa biomédica em modelos de carcinogênese que também pode ser usado para estimular a ativação de células T, proliferação e produção de citocinas. Também é utilizado em protocolos para coloração intracelular destas citocinas. Estes dados são relevantes pois mostram que o farnesol inibe a PKC apenas nas células de origem neoplásica (Yazlovitskaya and Melnykovich, 1995).

Szűcs (2013) evidenciou que o tratamento oral com 1 mg/kg/dia de farnesol reduziu o tamanho do infarto no coração de ratos após isquemia/reperfusão aumentando a geranilgeranilação de proteínas cardíacas, no entanto, isso não afetou outros derivados do mevalonato (colesterol cardíaca, coenzima Q, *dolichol*). Isto mostra que o efeito cardioprotetor de farnesol é independente do seu efeito antioxidante, mas pode envolver alterações geranilgeranilação. Ocorrendo a farnesilação/prenilação (é a adição de moléculas hidrofóbicas a uma proteína) envolvendo ligações covalentes quer de farnesil (15 carbonos) ou geranilgeranil (20 carbonos) para conservar os resíduos de cisteína, evitando que a cisteína seja oxidada pelas espécies reativas de oxigênio formando cistina. As cisteínas têm um papel fundamental na manutenção da estrutura terciária de proteínas. O farnesol promove ligações dissulfureto/dissulfeto entre os seus grupos tiol, aumentando a estabilidade molecular e a resistência à proteólise. É um processo importante para mediar as interações proteína-proteína e proteína-membrana (Szucs et al., 2013).

O farnesol também foi capaz de inibir a atividade dos canais de cálcio tipo-L em músculo liso. Sabendo que a contração muscular lisa decorre da concentração do  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático livre e do influxo de cálcio pelos canais do tipo-L, o farnesol bloqueia tal caminho sem modificar a liberação dos estoques intracelulares. Tal descoberta foi realizada através da técnica de “patch-clamp” com medição direta da atividade dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  voltagem-dependentes. Como sabemos bloqueadores dos canais para cálcio, tais como a nifedipina, induz hipotensão por causar vasodilatação, assim a ação de redução da pressão arterial, pode ser relevante in vivo. (Luft et al., 1999; Roullet et al., 1997). O coração também expressa os canais para cálcio tipo-L, entretanto, esses canais apresentam suas particularidades em cada tecido. Apesar do estudo ter sido feito em músculo liso, não existe na literatura estudos que mostrem a ação do farnesol em músculo cardíaco.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos contráteis e eletrofisiológicos do farnesol em coração de rato

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar os efeitos contráteis do farnesol sobre o músculo cardíaco de rato;
- Descrever o efeito do farnesol sobre o influxo de cálcio em átrio isolado de rato;
- Avaliar o efeito do farnesol sobre os canais para potássio no átrio esquerdo de rato;
- Definir o efeito do farnesol sobre a automaticidade do coração de rato;
- Descrever os efeitos eletrocardiográficos do farnesol em coração isolado de rato;

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Nos procedimentos experimentais foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 250 e 300 g, reproduzidos, criados e mantidos pelo Biotério setorial da Universidade Federal de Sergipe e, posteriormente alojados no Biotério do Laboratório de Biofísica do Coração. Os animais, mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas à temperatura ambiente (20 - 25 °C), tiveram acesso à água e ração livremente. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (Protocolo nº 06/15) da Universidade Federal de Sergipe. Sua execução foi feita sob a normativa do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e após a morte os animais foram descartados segundo as recomendações do Departamento de Fisiologia/CCBS/UFS.

### **4.2 Substâncias e sais**

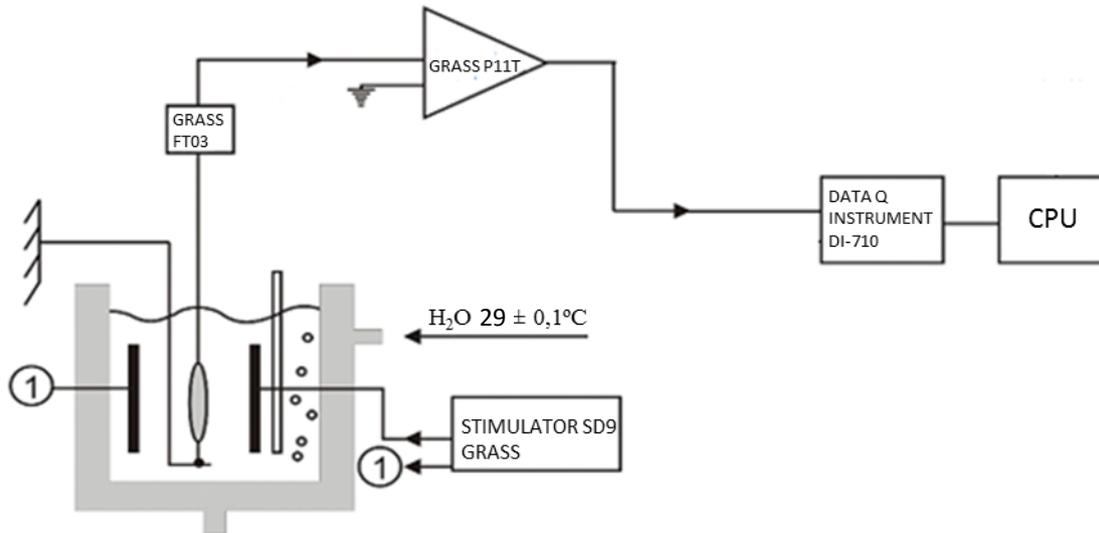
O farnesol, (±)-BAYK 8644 e o tetraetilamônio (TEA) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). O cloreto de sódio P.A. (NaCl), cloreto de cálcio diidratado P.A. (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O), glicose, cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A. (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) e o bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) foram adquiridos da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O cloreto de potássio (KCl) foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e a heparina da Roche (São Paulo, Brasil).

### **4.3. Avaliações das respostas do farnesol sobre a contratilidade do miocárdio atrial**

#### **4.3.1. Montagem experimental do átrio esquerdo**

A força de contração foi determinada em átrio esquerdo isolado de rato. Os animais foram mortos por decapitação por guilhotina. O átrio esquerdo foi retirado e montado em cuba para órgão isolado (8 mL, 29 ± 0,1 °C), onde permaneceu em solução de Krebs Henseleit descrita e modificada por Vassalo (1998) (em mM: NaCl 120, KCl 5,4, MgCl<sub>2</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 27, CaCl<sub>2</sub> 1,25, Glicose 11, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0, pH 7,4). A solução foi aerada por uma mistura

carbogênica (95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>). Os átrios foram estirados para uma tensão de repouso de 5 mN (0,5 gf) e submetidos a uma estimulação de campo de 1 Hz, 100 V e 0,5 ms (STIMULATOR SD9 GRASS da Astro-Med, Inc). A força foi registrada isometricamente (transdutor GRASS FT03) e os sinais do transdutor foram enviados a um amplificador (GRASS P11T), sendo, em seguida, digitalizados (DATAQ DI710, WINDAQ PRO) e armazenados em computador para processamento “*off-line*” (Fig. 8).



**Figura 08** - Esquema da montagem experimental usada para determinar a força de contração atrial. O átrio foi estimulado a 1 Hz, 100 V e 0,5 ms (STIMULATOR SD9 GRASS) e a força foi medida com um transdutor isométrico (GRASS FT03) acoplado a um amplificador (GRASS P11T), sendo os sinais digitalizados (DATAQ DI-710) e, em seguida, armazenados em computador.

#### 4.3.2 Determinação de parâmetros contráteis

Após um período de estabilização de 30 minutos, foram adicionadas ao banho concentrações crescentes do farnesol a fim de determinar os seus efeitos sobre a força de contração atrial. Além disso, também foram determinados, em situação controle e teste, a duração da sístole, duração da diástole, duração total do ciclo de contração, derivada máxima da contração (+dT/dt) e do relaxamento (-dT/dt) Para determinar as variáveis citadas acima, foram selecionadas 50 contrações sucessivas em situação controle e no efeito máximo do farnesol. Essas contrações atriais foram processadas pelo software LabChart 8 (ADInstruments).

### **4.3.3 Determinação da CE<sub>50</sub>**

A CE<sub>50</sub> (concentração capaz de produzir 50 % do efeito máximo) do farnesol foi determinada a fim de estimar a sua potência. Para isso, os dados experimentais referentes ao efeito inotrópico foram ajustados por curvas obtidas a partir da equação de Hill-Langmuir (Voet et al., 2014).

### **4.3.4 Ação do farnesol sobre a curva concentração-efeito do CaCl<sub>2</sub>**

Para avaliar a resposta do farnesol sobre a entrada de cálcio nas células do miocárdio atrial, foram levantadas curvas concentração-resposta adicionando-se o CaCl<sub>2</sub> ao banho de forma cumulativa para que fossem obtidas as seguintes concentrações de cálcio: 0,5 a 7,0 mM. Para aumentar o efeito inotrópico positivo do Ca<sup>+2</sup>, a concentração de CaCl<sub>2</sub> na solução de Krebs-Henseleit foi reduzida para 0,5 mM. As curvas de CaCl<sub>2</sub> foram obtidas na ausência e na presença do farnesol. Para cada situação, foi levantada a curva da resposta inotrópica em função do logaritmo da concentração extracelular de CaCl<sub>2</sub>.

### **4.3.5 Ação do farnesol sobre a curva concentração-efeito do (±)-BAY K8644**

Para avaliar a resposta do farnesol foi por meio do bloqueio dos canais para cálcio tipo-L, foi utilizado o (±)-BAY K8644, que é um agonista deste canal. O agonista foi adicionado ao banho de forma cumulativa (5, 10, 30, 50, 100, 300 e 500 nM) tanto na ausência, quanto na presença do farnesol. A partir das amplitudes das forças atriais, foram construídas curvas da resposta inotrópica em função do logaritmo da concentração do (±)-BAY K8644 no meio extracelular.

### **4.3.6. Avaliação da participação de canais para potássio presentes na membrana plasmática sobre a resposta inotrópica do farnesol**

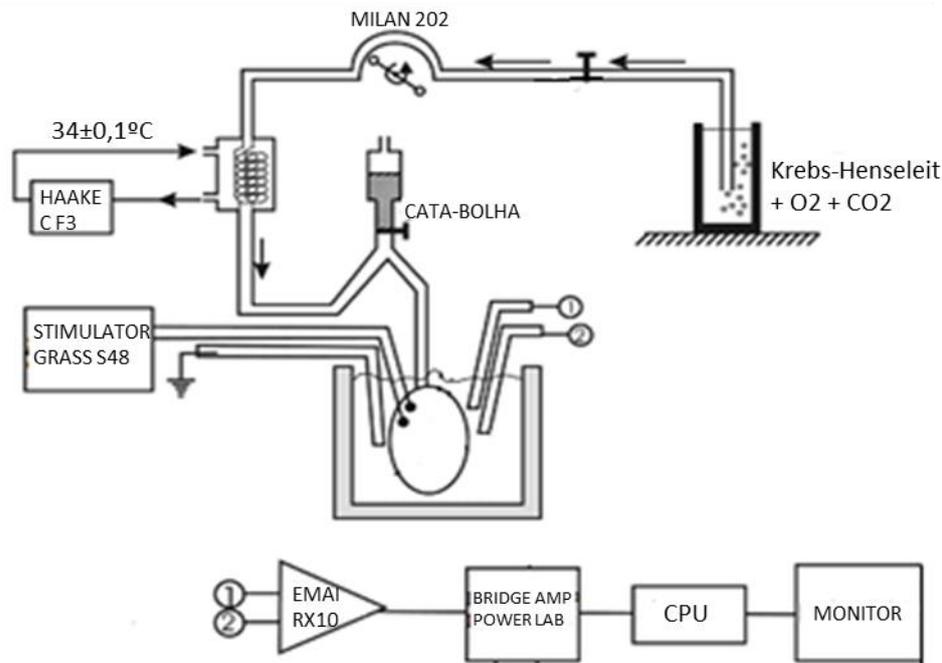
Para estudar se o efeito inotrópico do farnesol foi mediado por ativação de canais de potássio, foi testada a resposta inotrópica do farnesol mediante ou não ao bloqueio desses

canais. O bloqueio desses canais foi realizado com tetraetilamônio (TEA, 20 mM), um antagonista inespecífico desses canais.

#### **4.4 Avaliação da resposta eletrocardiográfica do farnesol em coração isolado de rato**

##### **4.4.1 Montagem experimental do coração isolado**

Os ratos foram previamente heparinizados (1000 U.I./kg, via subcutânea) e mortos (decapitação por guilhotina) 30 minutos após a administração. O tórax foi aberto e o coração removido e montado em sistema de perfusão aórtica do tipo Langendorff de fluxo constante (10 mL/min, Bomba peristáltica, Milan) de Krebs-Henseleit modificado por Vassallo (Vassallo et al., 1997), aerado por mistura carbogênica (95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>) e aquecido a  $34 \pm 0,1$  °C (Bomba HAAKE C/F3). Para isso, a solução de Krebs-Henseleit foi previamente filtrada em millipore (0,45 µm) a fim de prevenir a microembolia coronariana (Harrison and Raymond, 1951). Dois eletrodos de aço inoxidável, inseridos na aurícula do átrio direito, foram usados para estimular o coração. Para isso, foi usado pulso retangular de corrente gerados pelo S48 Stimulator (GRASS). A frequência de estimulação foi regulada para cada coração de modo a ser cerca de 20 % mais elevada do que a frequência espontânea do nodo sinusal (GRASS S48 Stimulator). O coração foi mantido submerso em solução de Krebs-Henseleit contida em Becker (50 mL). Os potenciais elétricos foram captados por meio de três eletrodos (AgCl/NaCl 1 M) imersos na solução e seus sinais foram monitorados e pré-amplificados por um cardioscópio (EMAI RX10) e, posteriormente amplificados e digitalizados (PowerLab 4/35 ADInstrument). Os sinais foram armazenados em microcomputador para processamento *off-line* (Fig. 9).



**Figura 09** - 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.

#### 4.4.2 Avaliação da resposta do farnesol sobre a frequência espontânea do coração isolado de ratos

Para avaliar o efeito do farnesol sobre a frequência cardíaca espontânea em corações isolados de ratos, os corações foram mantidos com batimento espontâneo. Utilizando o software LabChart 8 foi possível determinar os intervalos RR (Fig. 4) e convertê-los em frequência cardíaca. Essa análise foi realizada em situação controle, durante o teste com o farnesol e, por fim, após o *washout*.

#### 4.4.3 Avaliação da resposta do farnesol sobre a pressão intraventricular esquerda (PVE)

A pressão no interior do ventrículo esquerdo (PVE) foi determinada, em coração estimulado eletricamente, por meio de um balonete insuflado com água até uma pressão de 15 cmHg. O átrio esquerdo foi retirado e o balonete introduzido no ventrículo esquerdo do coração isolado. Esta tubulação estava acoplada a um transdutor de pressão (MLT0699/A), cujos sinais foram amplificados (Bridge Amp FE221 ADInstrument), digitalizados (PowerLab 4/35

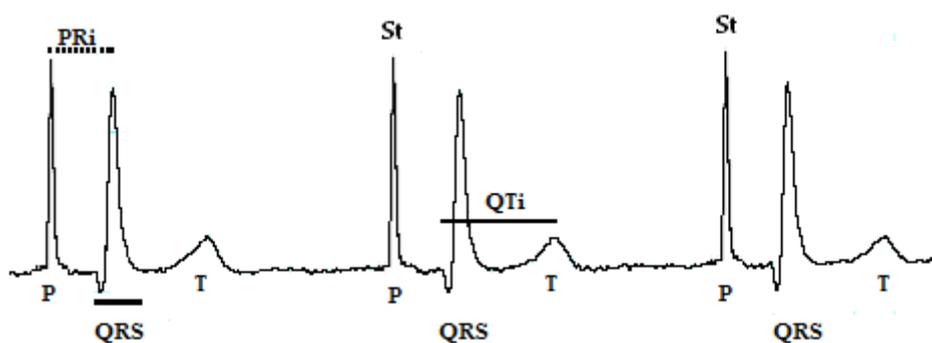
ADInstrument) e gravados em computador. Todo o sistema hidráulico usado para determinar a pressão intraventricular estava preenchido com água destilada e foi calibrado com a ajuda de um manômetro de mercúrio.

#### 4.4.4 Determinação dos parâmetros eletrocardiográficos

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

- 1- intervalo PR (medido do pico da onda P até o pico da onda R), pois ele representa o tempo gasto pela onda despolarizante para trafegar do nodo sinusal até as massas ventriculares;
- 2- intervalo QT (medido do início do complexo QRS até o pico da onda T), porque ele representa as fases de despolarização e repolarização ventricular, ou seja, sua duração equivale à duração do potencial de ação ventricular (Hasnain and Vieweg, 2014).

Esses parâmetros foram determinados em corações estimulados artificialmente com frequência constante (Fig. 10). As determinações foram feitas inicialmente com coração perfundido com solução Krebs-Hanseleit (controle), em seguida com a solução teste (Krebs-Hanseleit + farnesol) e, então, novamente perfundido com solução Krebs-Hanseleit (*washout*).



**Figura 10** - Traçado eletrocardiográfico representativo mostrando os parâmetros PRi, QTt e QRS que foram determinados na ausência e na presença do farnesol. P, onda p; St, estímulo elétrico; T, onda T.

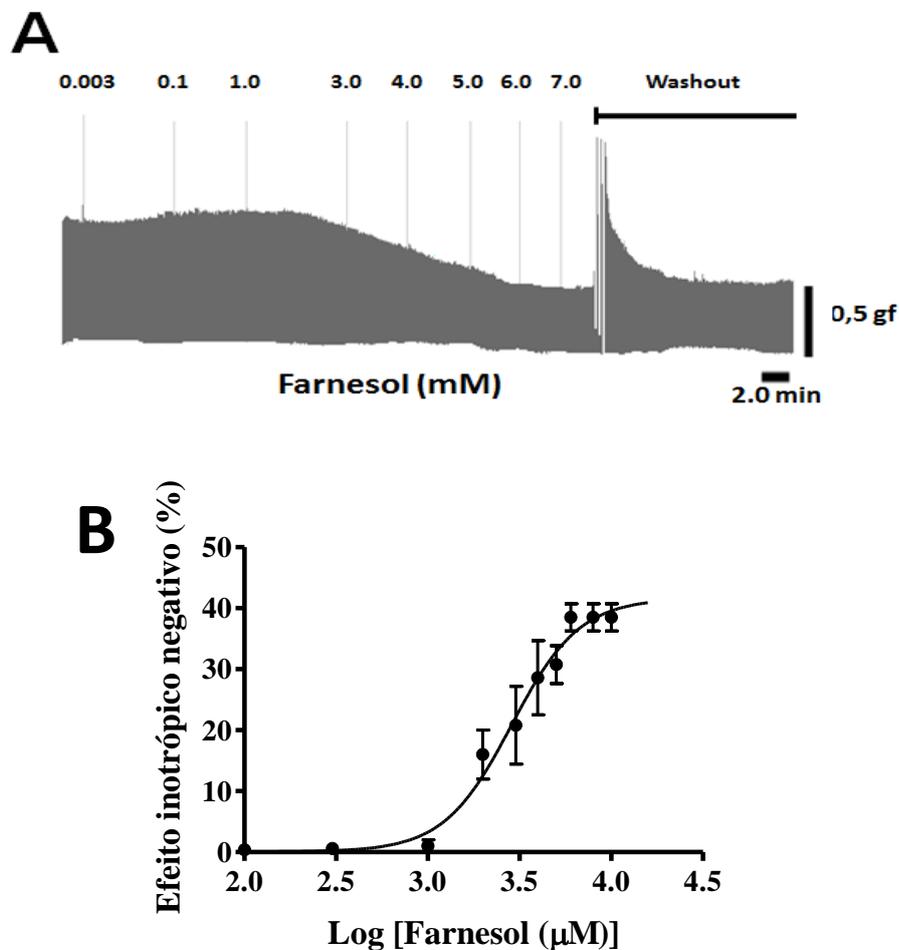
#### 4.5 Tratamento estatístico dos dados

Para a sistematização e observação dos resultados, os dados foram tabulados e com eles feitos os gráficos (Excel, GraphPad Prism). Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão médio (EPM), e o número de animais é mostrado como n. Para a decisão estatística, foi usado a análise de variância de uma via ou duas via (ANOVA *one-way*, *two-way*) seguido de teste de Tukey ou o teste t-student, a depender do caso. Valores de probabilidade de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efeito do farnesol sobre a força contrátil do átrio esquerdo de rato

Nesse estudo foram avaliados os efeitos do sesquiterpeno farnesol em átrio esquerdo isolado de rato submetido a estimulação elétrica. Ao avaliar a resposta contrátil do farnesol em átrio, foi observado que o mesmo induziu leve aumento da força contrátil em baixas concentrações e, em concentrações acima de 1 mM promoveu diminuição da força contrátil (Fig. 11A). Essa resposta foi dependente da concentração. A redução da força contrátil foi de 41,63% na concentração máxima usada (7 mM). A Fig. 11B mostra a curva-concentração-resposta do efeito inotrópico negativo do farnesol no qual foi possível estimar a  $CE_{50}$  de  $2,84 \pm 0,19$  mM (n = 5).



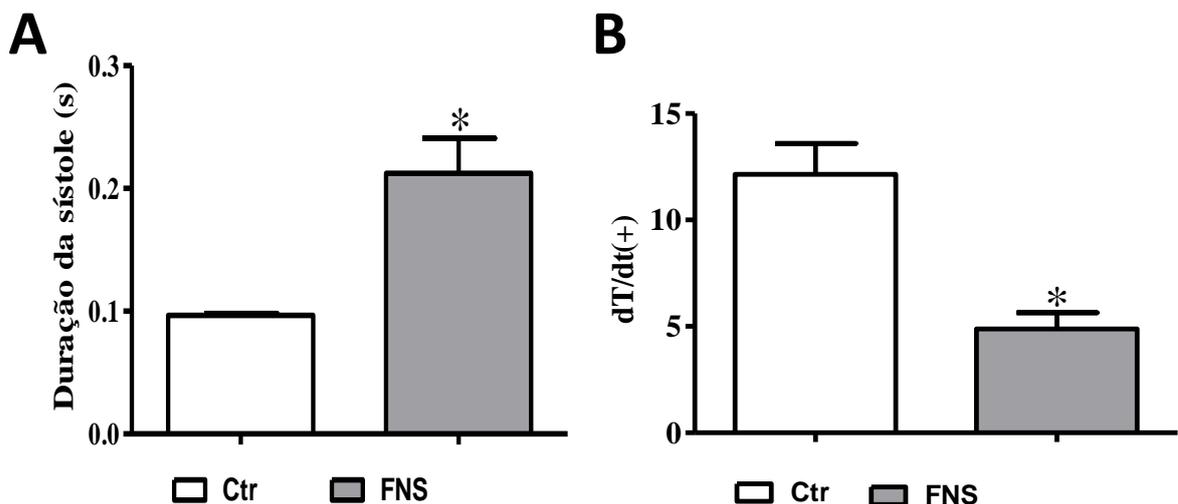
**Figura 11.** Efeito inotrópico negativo do farnesol em átrio esquerdo de rato. Resposta do farnesol sobre a força de contração do átrio esquerdo de rato (A). Curva concentração-resposta do efeito inotrópico negativo do farnesol (B) ( $CE_{50} = 2,84 \pm 0,19$  mM, n = 5).

## 5.2. Efeito do farnesol sobre a duração do tempo de contração e relaxamento e sobre as derivadas máximas da contração (+dT/dt) e do relaxamento (-dT/dt)

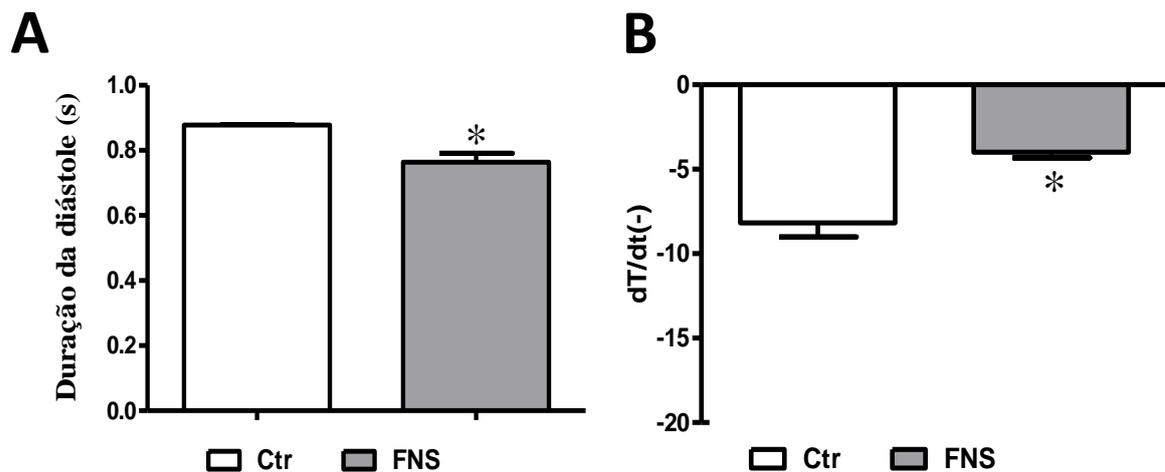
Ao analisar o curso temporal das fases de contração e relaxamento atrial, observou-se que o farnesol (7 mM) aumentou a duração da sístole de  $0,09 \pm 0,001$  s para  $0,21 \pm 0,028$  s ( $p = 0,0037$ ) (Fig. 12 A). Contudo, a duração da diástole foi reduzida de  $0,88 \pm 0,001$  s para  $0,76 \pm 0,027$  s ( $p = 0,0034$ ) (Fig. 13A).

A dT/dt representa a variação da taxa de tensão em função do tempo, podendo ser positiva relacionada a fase de contração (dT/dt+) ou negativa referente a fase de relaxamento (dT/dt-). Consiste em um dos índices utilizados para avaliar a velocidade da contração e do relaxamento cardíaco, respectivamente (Imanishi et al., 1994). Na concentração de 7 mM de farnesol, a dT/dt (+) foi reduzida de  $12,15 \pm 1,44$  gf/s para  $4,886 \pm 0,75$  gf/s ( $t=9.194$ ;  $p = 0,0008$ ) (Fig. 12 B). A primeira derivada negativa (dT/dt-) foi observado também que o farnesol promoveu redução de  $|-8,18| \pm 0,83$  gf/s para  $|-3,99| \pm 0,33$  gf/s ( $t = 4.668$ ;  $p = 0,0016$ ) (Fig. 13 B).

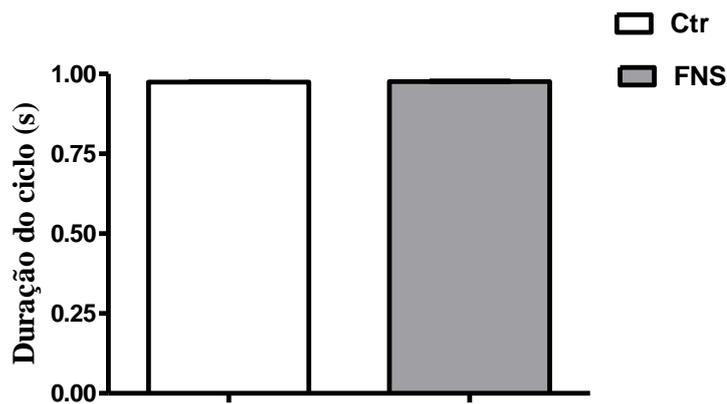
Por outro lado, não houve alteração significativa na duração total do ciclo da contração atrial ( $p = 0,36$ ) (Fig. 14).



**Figura 12.** Efeito do farnesol (FNS, 7 mM) sobre a duração da sístole (aumento de  $0,09 \pm 0,001$  s para  $0,21 \pm 0,028$  s) e sobre dT/dt (+) (redução de  $12,15 \pm 1,44$  gf/s para  $4,886 \pm 0,75$  gf/s (Anova one-way e teste t \* $p < 0,05$ , n = 5).



**Figura 13.** Efeito do farnesol (FNS, 7 mM) sobre a duração da diástole (redução de  $0,88 \pm 0,001$  s para  $0,76 \pm 0,027$  s) (A) e sobre a  $dT/dt$  (-) (redução de  $|-8,18| \pm 0,83$  gf/s para  $|-3,99| \pm 0,33$  gf/s) (B) em átrio esquerdo de rato (Anova *one-way* e teste t \* $p < 0,05$  n = 5).

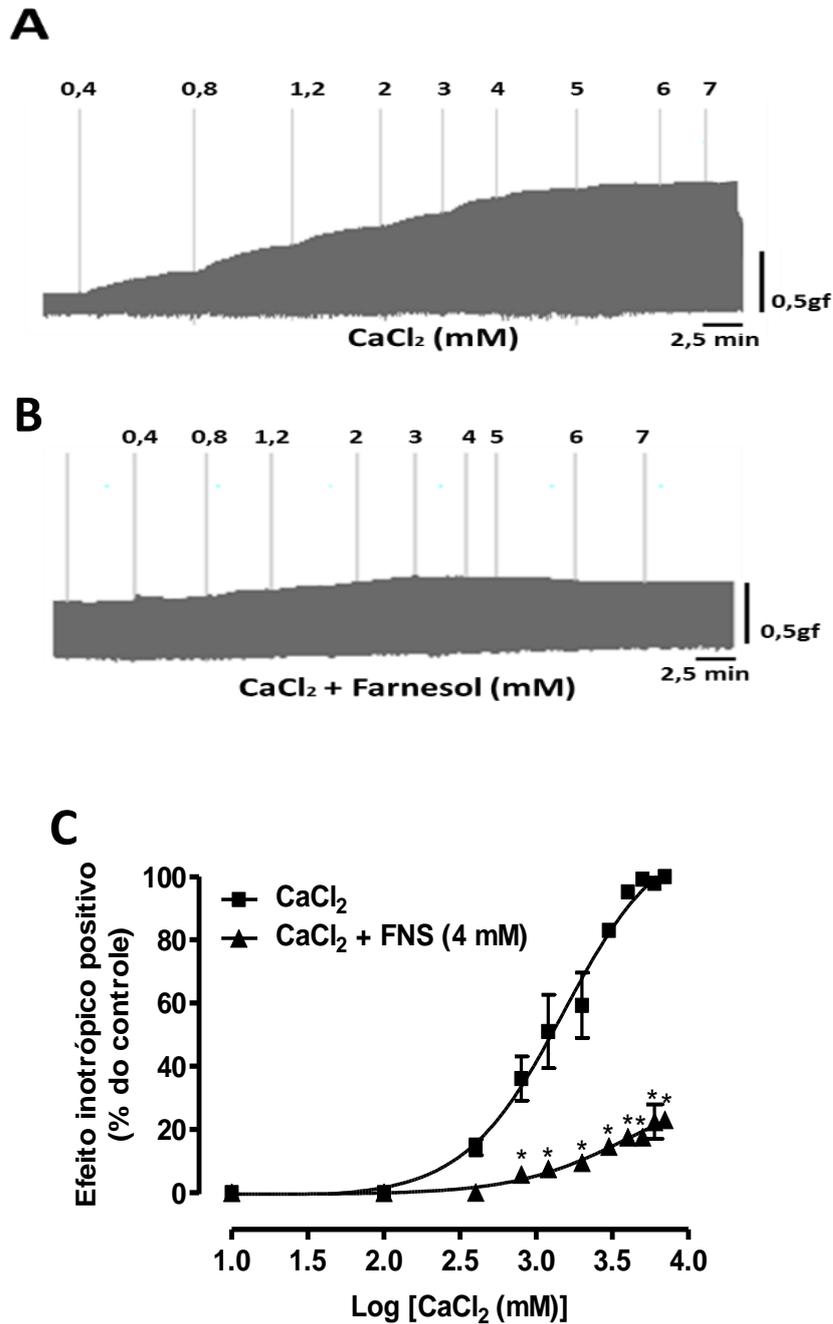


**Figura 14.** Efeito do farnesol (FNS, 7 mM) sobre duração total do ciclo da contração em átrio esquerdo de rato (n = 5).

### 5.3 Resposta do farnesol sobre o influxo de $Ca^{+2}$ no átrio esquerdo de rato

Como sabemos o cálcio tem papel central na modulação da contratilidade cardíaca (Miller, 2004). Dessa forma, resolvemos investigar se a resposta inotrópica negativa do farnesol envolvia a capacidade do terpeno em alterar o influxo de  $Ca^{+2}$ . Para isso, foram realizadas curvas concentração-resposta do  $CaCl_2$  na ausência e presença do farnesol. A Fig. 15 exemplifica traçados experimentais mostrando a resposta inotrópica positiva do  $CaCl_2$  em situação controle (painel A) e na presença do farnesol (painel B). Pode-se notar que a resposta inotrópica positiva do  $CaCl_2$  foi diminuída na presença do farnesol. A Fig. 15 C mostra que o

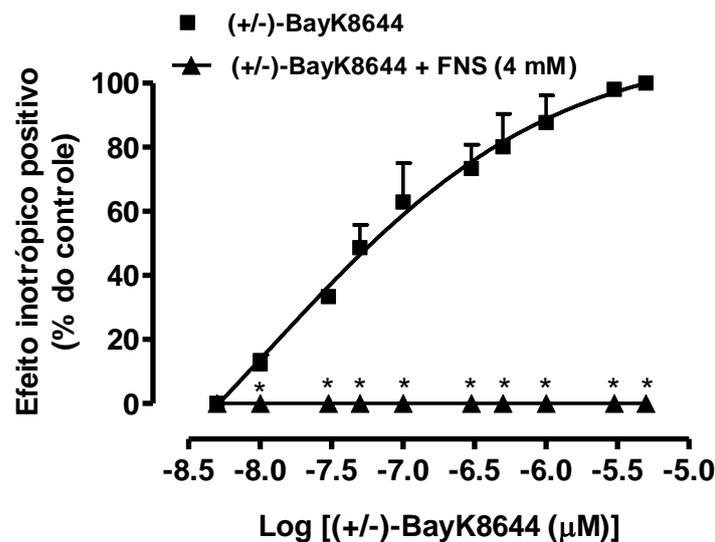
farnesol (4 mM) deslocou para direita a curva concentração-resposta do  $\text{CaCl}_2$  aumentando a sua  $\text{CE}_{50}$  de  $1,51 \pm 0,26$  mM para  $3,93 \pm 0,33$  mM ( $n = 5$ ,  $p < 0,0001$ ) e diminuindo a eficácia máxima de 100% para 23%.



**Figura 15.** Resposta do farnesol (FNS) sobre a curva concentração-resposta do  $\text{CaCl}_2$ . Traçado experimental da curva de  $\text{CaCl}_2$  em situação controle (A) e na presença do FNS (4 mM) (B). Curvas concentração-resposta (C) mostrando a resposta inotrópica positiva do  $\text{CaCl}_2$  na ausência e presença de FNS, onde foi possível verificar que o FNS alterou a  $\text{CE}_{50}$  do  $\text{CaCl}_2$  de  $1,51 \pm 0,26$  mM para  $3,93 \pm 0,33$  mM e diminuindo a eficácia máxima para 23% (Anova *two-way* para medidas repetidas,  $n = 5$ ,  $p < 0,0001$ ).

#### 5.4 Resposta do farnesol sobre a curva concentração-resposta do (+/-)-BAY K8644 no átrio esquerdo de rato

Para reforçar a hipótese que a resposta cardiodepressora do farnesol foi decorrente da diminuição do influxo de cálcio pelos canais tipo-L, avaliou-se a resposta do farnesol sobre a curva concentração-resposta inotrópica positiva do (+/-)-BAY K8644, um agonista seletivo para o canal de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo-L (Thomas et al., 1985). Em situação controle, o (+/-)-BAY K8644 apresentou uma  $\text{CE}_{50} = 0,012 \pm 0,93 \mu\text{M}$ . Os resultados mostraram que o farnesol impediu o aumento de força contrátil evocado pelo (+/-)-BAY K8644 (Fig. 16). Em virtude da ausência de resposta inotrópica do (+/-)-BAY K8644 na presença do farnesol, não foi possível calcular a  $\text{CE}_{50}$  do (+/-)-BAY K8644 na situação teste.

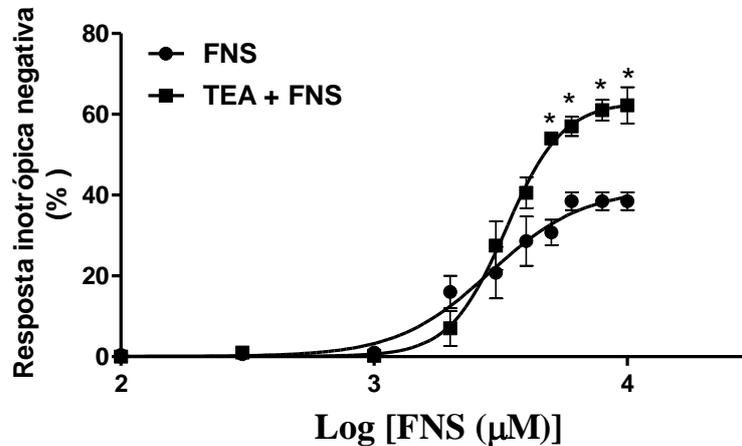


**Figura 16.** Resposta do farnesol (FNS, 4 mM) sobre a curva concentração-resposta do (+/-)-BAYK 8644 ( $\text{CE}_{50} = 0,012 \pm 0,93 \mu\text{M}$ ) (n = 5).

#### 5.5 Efeito do farnesol sobre os canais para potássio no átrio esquerdo de rato

É sabido que a abertura de canais para potássio no coração leva a diminuição da contratilidade cardíaca (Sellitto et al., 2010). Dessa forma, com a finalidade de avaliar a participação desses canais na resposta inotrópica negativa do farnesol foi utilizado 20 mM de tetraetilamônio (TEA), um bloqueador inespecífico dos canais para potássio. Para tanto, curvas concentração-efeito do farnesol foram obtidas após 20 minutos de incubação com o TEA (Fig.

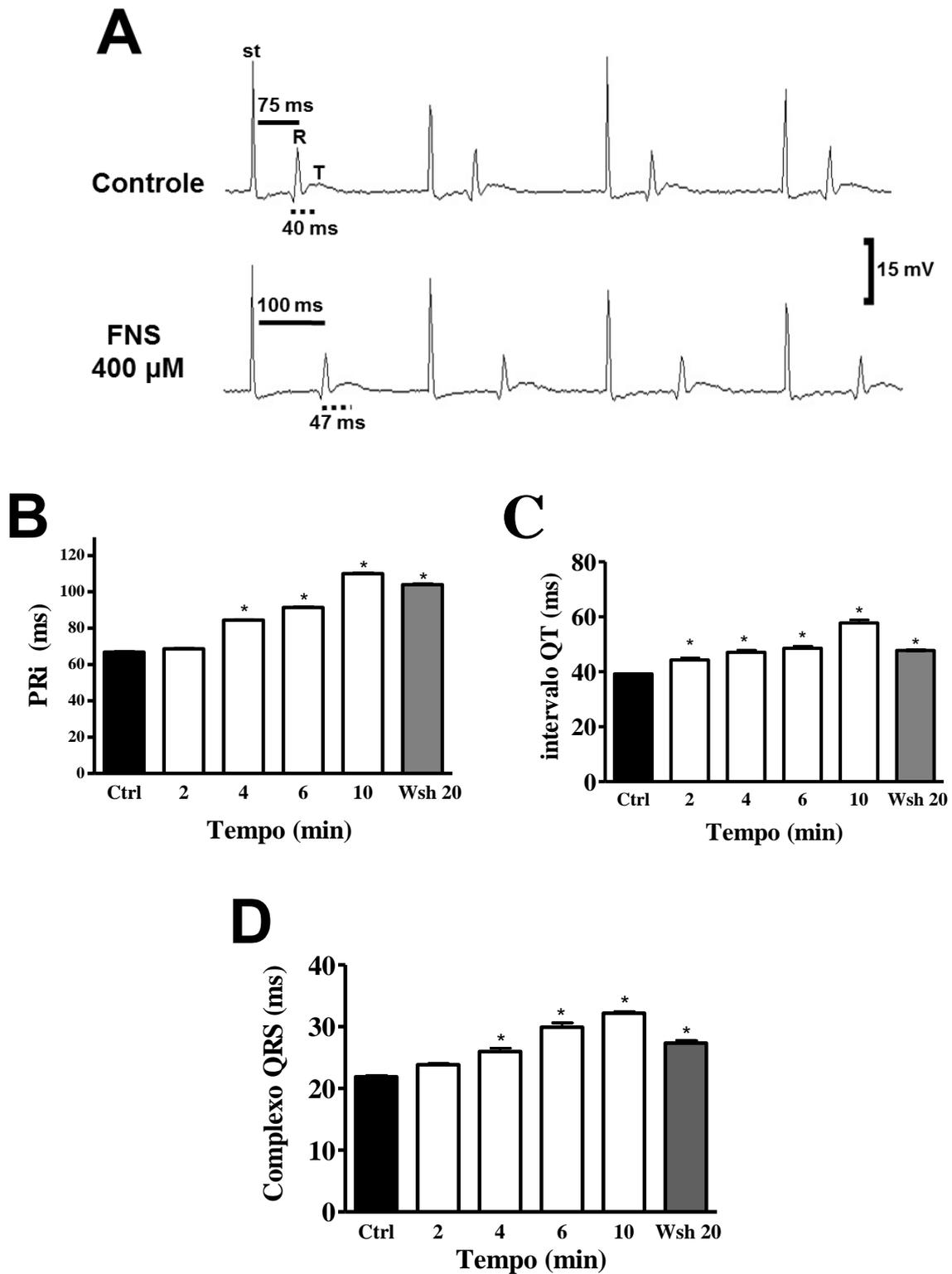
17). As análises estatísticas mostraram que o TEA não alterou a  $CE_{50}$  do farnesol mas aumentou a eficácia máxima do farnesol de 41,63% para 63,02%.



**Figura 17.** Curvas concentração-efeito do farnesol (FNS) na ausência e presença de 20 mM de tetraetilamônio (TEA) em átrio esquerdo de rato. O TEA aumentou a eficácia máxima do farnesol de 41,63% para 63,02%. (Anova *two-way* para medidas repetidas,  $n = 5$ ,  $p < 0,0001$ ).

### 5.6 Resposta do farnesol sobre parâmetros eletrocardiográficos e pressão ventricular esquerda (PVE)

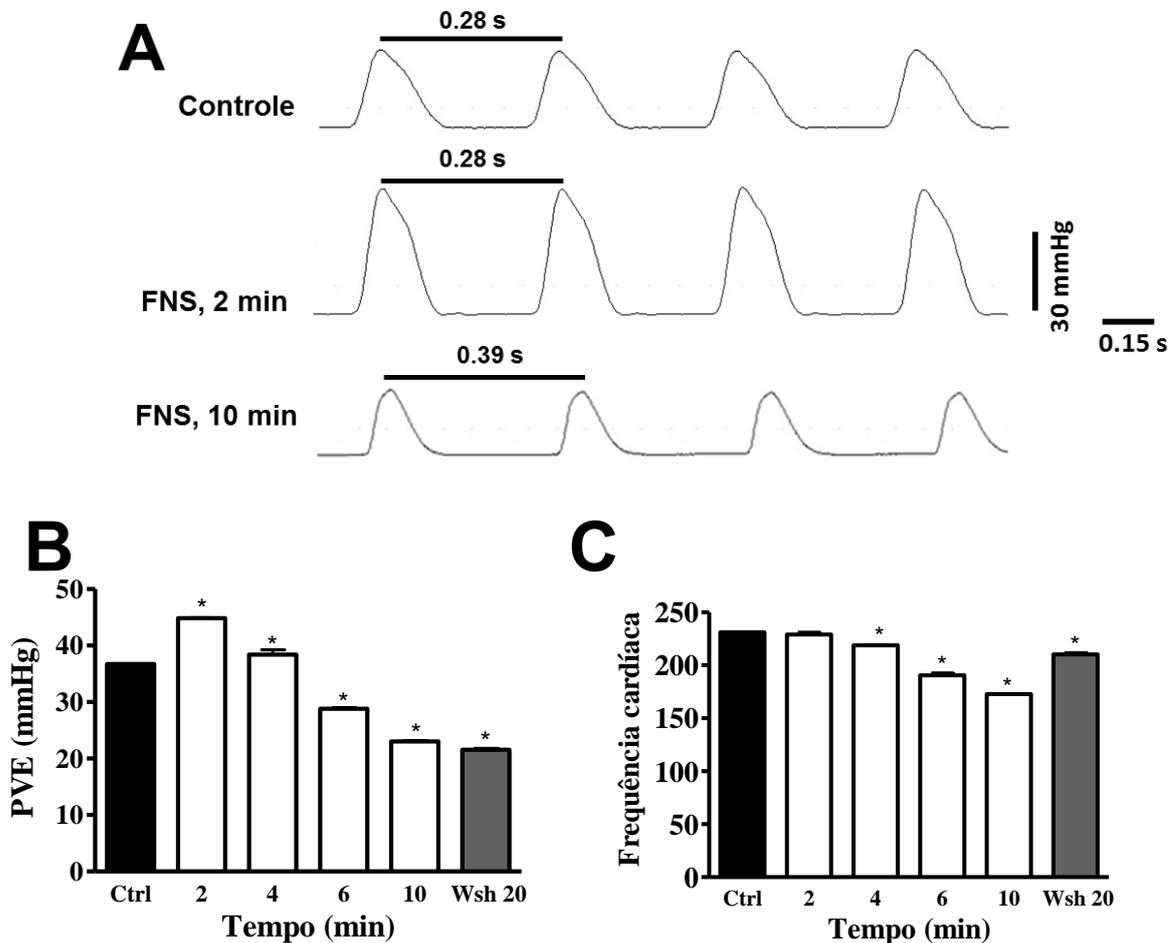
No coração isolado de rato, o farnesol promoveu alterações no perfil eletrocardiográfico. A Fig. 18A mostra traçados eletrocardiográficos representativos em situação controle (painel A) e após os 10 primeiros minutos de perfusão com 0,4 mM de farnesol (painel B). No traçado A, pode-se observar que o farnesol aumentou o intervalo PR (PRi, linha contínua) de 75 ms para 100 ms e aumentou o intervalo QT (QTi) de 40 ms para 47 ms (linha tracejada). A Fig. 18B sumariza os efeitos eletrocardiográficos do farnesol, em função do tempo (10 min), em 5 corações. Foi observado que 4 minutos após a perfusão do farnesol (0,4 mM) os parâmetros eletrocardiográficos já estavam com alteração significativa em relação ao controle. Em 10 minutos, o PRi aumentou de  $67,4 \pm 0,5$  ms para  $105,3 \pm 0,9$  ms ( $p = 0,036$ ,  $n = 5$ ). Além disso, o farnesol aumentou o QTi de  $40,83 \pm 0,21$  ms para  $56,39 \pm 0,93$  ms ( $p < 0,001$ ,  $n = 5$ ). O QTi é um parâmetro que reflete a duração do potencial de ação do ventrículo. Com relação a duração do complexo QRS, o farnesol aumentou esse parâmetro de  $20,58 \pm 0,17$  ms para  $32,64 \pm 0,72$  ms ( $p < 0,004$ ,  $n = 5$ ).



**Figura 18** – Alterações no perfil eletrocardiográfico promovido pelo farnesol (FNS, 400  $\mu$ M) em coração isolado de rato. Traçados eletrocardiográficos representativos (A) em situação controle (painel superior) e após a perfusão do farnesol (painel inferior). Resposta do farnesol sobre os intervalos PR (B), intervalo QT (C), e do complexo QRS (D) em situação controle e na presença de 0,4 mM de FNS em função do tempo; foi observado aumento do intervalo PR de  $67,4 \pm 0,5$  ms para  $105,3 \pm 0,9$  ms, o intervalo QT de  $40,83 \pm 0,21$  ms para  $56,39 \pm 0,93$  ms

e da duração do complexo QRS (C) de  $20,58 \pm 0,17$  ms para  $32,64 \pm 0,72$  ms, no tempo de 10min. (Anova *one-way* seguido de teste de Tukey  $n = 5$ ,  $*p < 0,05$ ).

A Fig. 19A mostra traçados representativos da PVE em situação controle (painel superior), após 2 mim (painel central) e 10 min de perfusão (painel inferior) com 0,4mM de farnesol. Foi possível observar que com 2 minutos de perfusão com o farnesol ocorreu um aumento da PVE ( $p < 0,001$ ) e com 10 minutos observou-se uma diminuição significativa da PVE. A Fig 19B sumariza os efeitos do farnesol sobre a PVE em situação controle e na presença de 0,4mM em função do tempo. O farnesol induziu efeito bifásico promovendo aumento da PVE em 2 e 4 min, e diminuição da PVE após os 6 minutos de perfusão. Em 10 minutos, houve redução média da PVE diminuiu de  $36,73 \pm 0,04$  mmHg para  $23,0 \pm 0,15$  mmHg ( $p < 0,001$ ,  $n = 5$ ). Além de reduzir a PVE, a Fig. 19A, mostra que o farnesol também diminuiu a frequência cardíaca, como pode ser verificado pelo aumento do período entre os batimentos de 0,28 s para 0,39 s, após 10 minutos de perfusão. A redução média da frequência cardíaca em 5 corações pode ser visto na Fig. 19C. Em 10 minutos, a frequência cardíaca reduziu de  $231,1 \pm 0,48$  bpm para  $172,8 \pm 0,23$  bpm ( $p = 0,01$ ,  $n = 5$ ).



**Figura 19** –Efeito do farnesol (FNS) sobre a pressão do ventrículo esquerdo (PVE) e frequência cardíaca em coração isolado de rato. Painel **A** mostra traçados representativos da PVE em situação controle (traçado superior) e após 2 (traçado médio) e 10 minutos de perfusão (traçado inferior) com 400  $\mu$ M de farnesol. Painel **B** e **C** mostram, respectivamente, os efeitos do farnesol sobre a PVE e frequência cardíaca (n = 5, \*p < 0,05).

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou as atividades biológicas do farnesol em coração de rato, tendo sido avaliado os seus efeitos sobre a contração atrial e ventricular, canais para potássio e cálcio. Os efeitos do farnesol sobre as propriedades elétricas foram avaliadas através do perfil eletrocardiográfico.

Neste estudo, destaca-se o efeito inotrópico negativo do farnesol, que foi dependente da concentração. Além de reduzir a força contrátil, o farnesol alterou o curso temporal das fases de contração e de relaxamento, ou seja, promoveu aumento na duração da sístole associado a uma diminuição da derivada máxima da contração ( $+dT/dt$ ). Esses resultados mostram que o farnesol tornou o processo de contração atrial mais lento. É sabido que o acoplamento excitação-contração (AEC) é o fenômeno desde da excitação elétrica do miócito até a contração do coração. E o segundo mensageiro, o cálcio, é essencial para a atividade elétrica cardíaca e é um ativador direto dos miofilamentos que promovem a contração muscular (Bers, 2002). Uma hipótese para explicar o aumento da duração da sístole é uma ação do farnesol impedindo o processo de AEC seja por alterar a dinâmica do cálcio intracelular seja por diminuir a afinidade da troponina-C ao íon cálcio (Hamlin and del Rio, 2012).

Em contrapartida, diferente da sístole houve redução da duração da diástole. Entretanto, não se pode afirmar que o processo de relaxamento tornou-se mais rápido pois houve redução da derivada máxima do relaxamento ( $-dT/dt$ ). A redução a  $-dT/dt$  é indicativo de que a velocidade do relaxamento está mais lenta. Porém, esse resultado pode ser explicado através da fórmula de velocidade média, onde velocidade relaciona a variação da posição no espaço (neste caso temos a tensão) em relação ao tempo. Sendo então possível dizer, que para haver diminuição da velocidade, ou o espaço (tensão) tem que diminuir ou o tempo aumentar. Para o farnesol ter diminuído a velocidade de relaxamento ( $-dT/dt$ ), a derivada da tensão (contração) teve que apresentar uma diminuição maior que a diminuição da derivada do tempo, conforme ocorreu com a diminuição da duração da diástole. Esses dados mostram que o farnesol dificultou os mecanismos que promovem a diminuição do cálcio intracelular, ou seja, que promovem o relaxamento muscular. Sabemos que para que ocorra o relaxamento muscular, a concentração do cálcio citosólico deve diminuir de  $10^{-5}$  M para  $10^{-7}$  M a  $10^{-9}$  M (Chemla et al., 2000). São 4 vias envolvidas nesses processo: SERCA, trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  sarcolemal, ATPase de cálcio sarcolemal e transportador de cálcio mitocondrial (Bers, 2002). A contribuição de cada uma dessas vias varia entre as espécies (Bassani et al., 1994). Em coração de rato, a SERCA e trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  contribuem, respectivamente, com 92% e 7% para a remoção do cálcio citosólico. Dessa forma, a diminuição da velocidade do relaxamento muscular pode ter

sido decorrente da diminuição da atividade da SERCA, que é a principal via envolvida no esvaziamento do cálcio citosólico. Apesar de ter prolongado o tempo de contração e encurtado o relaxamento atrial, o farnesol não promoveu alteração significativa na duração total do ciclo da contração.

Entende-se que, a força de contração do músculo cardíaco é dependente da concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático livre, e que seu influxo ocorre principalmente pelos canais do tipo-L (Miller, 2004). O influxo de cálcio por esses canais dispara a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (CICR) através dos receptores da rianodina (RyR2) aumentando a concentração de cálcio citoplasmático, promovendo a contração muscular. Dessa forma, uma diminuição da entrada de cálcio sarcolemal pode diminuir a força contrátil do miocárdio. Assim sendo, resolvemos investigar a relação da resposta inotrópica negativa do farnesol e a redução do influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  no músculo atrial. Para tal, foram realizadas curvas concentração-resposta do  $\text{CaCl}_2$  tanto na ausência (controle) quanto na presença do farnesol. Foi observado que o farnesol, a 4 mM, deslocou para a direita a curva concentração-efeito do  $\text{CaCl}_2$  aumentando a sua  $\text{CE}_{50}$  de  $1,51 \pm 0,26$  mM para  $3,93 \pm 0,33$  mM. Além disso, houve redução significativa da eficácia máxima do  $\text{CaCl}_2$  indicando que o farnesol exerce um antagonismo não-competitivo ao cálcio. Esses resultados indicam que o farnesol diminui a entrada de cálcio no miócito átrial. Para reforçar essa hipótese, avaliamos o efeito do farnesol sobre a resposta inotrópica positiva induzida pelo BAYK 8644, que é um agonista dos canais para  $\text{Ca}^{+2}$  tipo-L por aumentar a probabilidade de abertura desses canais (Thomas et al., 1985). Os resultados mostraram que na presença do farnesol o BAYK 8644 teve sua resposta inotrópica totalmente inibida. Dessa forma, temos fortes evidências de que a redução da força contrátil induzida pelo farnesol se deve a uma redução significativa do influxo de cálcio no coração. Corroborando com os nossos resultados, Rouillet et al (1997) verificaram em músculo liso, através da técnica de patch-clamp, que o farnesol bloqueou canais para  $\text{Ca}^{+2}$  tipo-L.

A capacidade dos terpenos de bloquear canais para  $\text{Ca}^{+2}$  tipo-L tem sido observado tanto em músculo liso quanto em músculo cardíaco (Santos et al., 2011). Os monoterpênos podem modular as propriedades funcionais dos canais iônicos tanto voltagem-dependentes quanto ligando-dependentes (Oz et al., 2015). Foi verificado em cardiomiócito isolado que monoterpênos, tais como a R(+)-pulegona (de Cerqueira et al., 2011), geraniol (de Menezes-Filho et al., 2014a), (-)-mentol (Baylie et al., 2010) bloqueiam canais para  $\text{Ca}^{+2}$  tipo-L. Estudos realizados com os terpenos carvacrol, eugenol e timol evidenciaram que tais substâncias inibem a corrente de cálcio em cardiomiócito canino (Magyar et al., 2004). Existem poucos estudos mostrando os efeitos dos sesquiterpenos em coração e, especificamente, sobre canais para

cálcio. Siqueira et al. (2014) verificaram em músculo liso que o (-)- $\alpha$ -bisabolol age inibindo canais para cálcio voltagem-dependente. Outros trabalhos mostraram que o sesquiterpeno s-petasina, isolado de *Petasites formosanus*, também inibiu corrente para cálcio tipo-L tanto em músculo liso (Wang et al., 2001) quanto em músculo cardíaco de rato (Wang et al., 2004). O sesquiterpeno trans-cariofileno também inibiu influxo de cálcio por bloquear canais para  $\text{Ca}^{+2}$  tipo-L em músculo liso de traqueia de rato (Pinho-da-Silva et al., 2012) e óxido  $\beta$ -cariofileno também exerceu esse efeito em músculo ventricular de cobaia (Sensch et al., 2000).

Outra via que promove diminuição da força de contração atrial acontece por abertura de canais para potássio. O aumento do efluxo de potássio acarreta na hiperpolarização da célula, o que leva à redução do influxo de cálcio e, conseqüentemente, diminuição da força de contração (Sellitto et al., 2010). Para avaliar se a resposta do farnesol envolvia a abertura dos canais para potássio presentes na membrana do cardiomiócito, utilizamos o TEA (antagonista não seletivo dos canais para potássio). Os resultados mostraram que o TEA não alterou a  $\text{CE}_{50}$  do farnesol (2,84mM), entretanto, aumentou a eficácia máxima do farnesol de 41,63% para 63,02%. O aumento da eficácia máxima pode ser explicado pela ação sinérgica entre as duas drogas, pois o TEA interage com os receptores da RyR diminuindo a condutância desse canal, e como consequência dessa alteração, ocorre a redução da liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, promovendo ainda mais redução do cálcio citoplasmático (Tanna et al., 2001).

O bloqueio de corrente de cálcio pode induzir alterações eletrofisiológicas importantes, tais como bloqueios de condução da onda elétrica no coração e diminuição da frequência cardíaca. Dessa forma, investigamos se o farnesol poderia induzir alterações eletrofisiológicas significativas. Assim sendo, foram feitos experimentos em coração isolado em sistema de fluxo constante, onde foram realizadas medidas simultâneas da pressão do ventrículo esquerdo (PVE) e do ECG. O farnesol promoveu diminuição significativa da PVE, o que corrobora os achados em átrio esquerdo isolado mostrado anteriormente.

Além desta resposta, houve alterações no perfil eletrocardiográfico, tais como aumento do intervalo PR, indicativo de bloqueio atrioventricular de primeiro grau (BAV 1°). Este bloqueio é decorrente da dificuldade na passagem da onda elétrica pelo nodo atrioventricular e/ou por aumentar o período refratário do miocárdio, estes são efeitos característicos de drogas bloqueadoras dos canais para cálcio, que influenciam os potenciais de ação de resposta lenta, tais como o nodo sinusal e o nodo AV. Outras substâncias que promovem esse bloqueio são os  $\beta$ -bloqueadores, glicosídeos cardíacos, e drogas que aumentam a atividade colinérgica (Zhou et al., 2009).

Foi observado que o farnesol também aumentou o intervalo QT (QT<sub>i</sub>), que reflete o período necessário para que aconteça a despolarização e a repolarização ventricular, ou seja, um parâmetro indireto para estimar a duração do potencial de ação ventricular. Esse efeito é típico de drogas que bloqueiam canais para potássio. Fármacos antiarrítmicos da classe III, tal como a amiodarona e o sotalol, promovem seus efeitos bloqueando os canais para potássio, aumentando o tempo da repolarização e, conseqüentemente, prolongando o intervalo QT (Grimm et al., 1997).

Outro efeito eletrocardiográfico observado foi aumento da duração do complexo QRS, indicando possível bloqueio do canal para sódio, pois a fase de despolarização da célula ventricular cardíaca é gerado pelo influxo de íons Na<sup>+</sup> através de canais seletivos. Este complexo resulta da soma dos vetores de despolarização dos ventrículos direito e esquerdo, que corresponde a fase 0 do potencial de ação ventricular (Fermini and Fossa, 2003).

O farnesol também promoveu redução significativa da frequência cardíaca. Como se sabe, a frequência cardíaca é normalmente controlada pelo marcapasso primário do coração, que é o nodo sinusal. As células marcapasso do coração exibem a propriedade de automaticidade como resultado de uma gradual despolarização durante a diástole elétrica (despolarização diastólica lenta, DDL). A DDL e a fase de despolarização do potencial de ação marcapasso, são processos essenciais para a formação do impulso elétrico do nodo sinoatrial. Estes fenômenos estão intimamente ligados ao influxo de cálcio através do sarcolema. Quando essa corrente está severamente reduzida, ocorre o desacoplamento eletromecânico do miocárdio e os marcapassos do coração são silenciados (Lipsius et al., 2001). De acordo com Lipsius et al. (2001) muitas correntes iônicas contribuem para a DDL: 1) surgimento da corrente “funny” transportadora de Na<sup>+</sup> (I<sub>f</sub>) e que é ativada pela hiperpolarização; 2) redução da corrente de efluxo de K<sup>+</sup>; 3) aumento da corrente do trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> e, 4) aumento das correntes de influxo de Ca<sup>+2</sup> tipo-L e tipo-T. A contribuição individual destas correntes para a atividade marcapasso é, no entanto, ainda controversa. Para diminuir a frequência cardíaca, como de fato o farnesol fez, uma ou mais dessas correntes devem estar alteradas. A corrente iônica que provavelmente foi afetada para diminuição da frequência cardíaca deve ter sido a corrente de cálcio tipo-L. O efeito do farnesol sobre a frequência cardíaca, não parece ser mediado pelo aumento da corrente de efluxo de K<sup>+</sup> que, por si, leva à hiperpolarização celular, tal como faz a acetilcolina. Para reforçar esta suposição, foi observado, em coração isolado de rato, que o farnesol aumentou o QT<sub>i</sub>. O aumento do QT<sub>i</sub> promovido pelo farnesol parece ser decorrente do bloqueio de canais de K, justamente um efeito contrário ao produzido pela acetilcolina. O trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> é uma proteína antiporte que atua de modo reversível, com uma

estequiometria de 3 íons  $\text{Na}^+$  para 1 íon  $\text{Ca}^{+2}$ . Ele move  $\text{Ca}^{+2}$  para fora da célula (corrente de influxo  $I_{\text{Na/Ca}}$ ) ou pode trazê-lo para dentro dela (corrente de efluxo  $I_{\text{Na/Ca}}$ ) (Bers, 2002). A corrente do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  é um evento importante durante a formação do potencial de ação marcapasso. Entretanto, nós não temos dados para concluir sobre o envolvimento dessas correntes com o mecanismo de ação do farnesol.

O maior efeito eletrofisiológico dos bloqueadores de canal de  $\text{Ca}^{+2}$  resulta de sua ação sobre os tecidos de resposta lenta, tais como os nodos sinusal e atrioventricular. Os bloqueadores do canal de  $\text{Ca}^{+2}$  no tecido cardíaco promovem a redução da frequência cardíaca e o bloqueio atrioventricular. Este bloqueio se faz por uma diminuição da velocidade de propagação da onda pelo nodo atrioventricular e por um aumento da refratariedade desse tecido. Este último efeito forma a base da ação antiarrítmica dos bloqueadores dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$ . Esses bloqueadores são ainda comumente usados para o tratamento da angina do peito e da hipertensão arterial (Ertel and Godfraind, 2012). 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 (Roullet et al., 1997). 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 bloqueadores de canais para cálcio são fármacos usados na medicina no tratamento da hipertensão arterial, angina do peito e como antiarrítmico. Os fármacos antiarrítmicos podem ser classificados de acordo com o proposto por Vaughan Williams (1970) que categoriza as drogas antiarrítmicas de acordo com suas propriedades eletrofarmacológicas e eletrofisiológicas. Dentro dessa classificação, os bloqueadores de canais para cálcio pertencem a classe IV dos antiarrítmicos, e são fármacos largamente utilizados na clínica médica a exemplo dos bloqueadores dos receptores das diidropiridinas, tais como nifedipina e anlodipina (Singh and Vaughan Williams, 1970). Como o farnesol bloqueou os canais para  $\text{Ca}^{+2}$  tipo-L no coração ele se enquadra na classe IV dos antiarrítmicos. Ou seja, nossos resultados mostram que esse sesquiterpeno tem grande potencial para ser usado como antiarrítmico em estudos pré-clínicos e, subsequentemente, uma vez confirmado essa propriedade, poderá ser investigado em estudos clínicos. Podemos citar como exemplo o geraniol que é um terpeno que inibiu os canais para  $\text{Ca}^{+2}$  tipo-L, e apresentou atividade antiarrítmica demonstrada em modelo de arritmia induzida pela ouabaína (de Menezes-Filho et al., 2014a).

## 7. CONCLUSÃO

Como foi demonstrado em nosso estudo, o farnesol diminuiu a contratilidade tanto do miocárdio atrial quanto ventricular. Os resultados mostraram que, realmente, o farnesol diminuiu o influxo de cálcio no miocárdio, pois foi capaz de deslocar para direita a curva concentração efeito do  $\text{CaCl}_2$  e aboliu a resposta inotrópica positiva do  $(\pm)$ -BAYK 8644. Em coração isolado, o farnesol promoveu diminuição da frequência cardíaca, reduziu a pressão intraventricular e promoveu aumento do intervalo PR, estas respostas se devem a diminuição do influxo de cálcio induzido pelo farnesol.

Foi observado também que o farnesol aumentou o intervalo QT, efeito característico de drogas que bloqueiam canais para potássio. Houve ainda o aumento do complexo QRS, que denota bloqueio dos canais para sódio. Porém tais efeitos precisam ser melhor investigados.

## 8. REFERÊNCIA

Balke, C.W., Goldman, L., 2003a. Excitation Contraction Coupling in Cardiac Muscle: Is there a Purely Voltage-dependent Component? *The Journal of General Physiology* 121, 349-352.

Bansilal, S., Fayad, Z.A., 2014. Coronary artery disease: appropriate testing for stable ischaemic heart disease. *Nat Rev Cardiol* 11, 137-138.

Bassani, J.W., Bassani, R.A., Bers, D.M., 1994. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* 476, 279-293.

Bassani, R.A., Mattiazzi, A., Bers, D.M., 1995. CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 268, H703-H712.

Baylie, R.L., Cheng, H., Langton, P.D., James, A.F., 2010. Inhibition of the cardiac L-type calcium channel current by the TRPM8 agonist, (-)-menthol. *J Physiol Pharmacol* 61, 543-550.

Bennett, P.M., Maggs, A.M., Baines, A.J., Pinder, J.C., 2006. The transitional junction: a new functional subcellular domain at the intercalated disc. *Mol Biol Cell* 17, 2091-2100.

Berridge, M.J., 2006. Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* 40, 405-412.

Bers, D.M., 2001. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Springer Netherlands.

Bers, D.M., 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205.

Bowman, C.L., Baglioni, A., 1984. Application of the Goldman-Hodgkin-Katz current equation to membrane current-voltage data. *J Theor Biol* 108, 1-29.

Boyett, M.R., Dobrzynski, H., 2007. The Sinoatrial Node Is Still Setting the Pace 100 Years After its Discovery. *Circulation Research* 100, 1543-1545.

Catterall, W.A., 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, a003947.

Chemla, D., Coirault, C., Hebert, J.L., Lecarpentier, Y., 2000. Mechanics of Relaxation of the Human Heart. *News Physiol Sci* 15, 78-83.

Chen-Izu, Y., Shaw, R.M., Pitt, G.S., Yarov-Yarovoy, V., Sack, J.T., Abriel, H., Aldrich, R.W., Belardinelli, L., Cannell, M.B., Catterall, W.A., Chazin, W.J., Chiamvimonvat, N., Deschenes, I., Grandi, E., Hund, T.J., Izu, L.T., Maier, L.S., Maltsev, V.A., Marionneau, C., Mohler, P.J., Rajamani, S., Rasmusson, R.L., Sobie, E.A., Clancy, C.E., Bers, D.M., 2015. Na<sup>+</sup> channel function, regulation, structure, trafficking and sequestration. *J Physiol* 593, 1347-1360.

Chen, W., Hou, J., Yin, Y., Jang, J., Zheng, Z., Fan, H., Zou, G., 2010. alpha-Bisabolol induces dose- and time-dependent apoptosis in HepG2 cells via a Fas- and mitochondrial-related pathway, involves p53 and NFkappaB. *Biochem Pharmacol* 80, 247-254.

Cheng, H., Lederer, W.J., 2008. Calcium sparks. *Physiol Rev* 88, 1491-1545.

Cooper, G.M., 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. ASM Press.

Cooper, J.K., 1986. Electrocardiography 100 years ago. Origins, pioneers, and contributors. *N Engl J Med* 315, 461-464.

de Carvalho, A.P., Hoffman, B.F., de Paula Carvalho, M., 1969. Two Components of the Cardiac Action Potential : I. Voltage-time course and the effect of acetylcholine on atrial and nodal cells of the rabbit heart. *The Journal of General Physiology* 54, 607-635.

de Cerqueira, S.V., Gondim, A.N., Roman-Campos, D., Cruz, J.S., Passos, A.G., Lauton-Santos, S., Lara, A., Guatimosim, S., Conde-Garcia, E.A., de Oliveira, E.D., de Vasconcelos, C.M., 2011. R(+)-pulegone impairs Ca(2)+ homeostasis and causes negative inotropism in mammalian myocardium. *Eur J Pharmacol* 672, 135-142.

DE MELLO AIRES, M., 2008. *Fisiologia*. Guanabara-Koogan.

de Menezes-Filho, J.E.R., Gondim, A.N.S., Cruz, J.S., de Souza, A.A., Santos, J.N.A.d., Conde-Garcia, E.A., de Sousa, D.P., Santos, M.S., de Oliveira, E.D., de Vasconcelos, C.M.L., 2014b. Geraniol Blocks Calcium and Potassium Channels in the Mammalian Myocardium: Useful Effects to Treat Arrhythmias. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 115, 534-544.

de Siqueira, R.J., Ribeiro-Filho, H.V., Freire, R.S., Cosker, F., Freire, W.B., Vasconcelos-Silva, A.A., Soares, M.A., Lahlou, S., Magalhaes, P.J., 2014. (-)-alpha-Bisabolol inhibits preferentially electromechanical coupling on rat isolated arteries. *Vascul Pharmacol* 63, 37-45.

de Tombe, P.P., 2003. Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. *J Biomech* 36, 721-730.

DiFrancesco, D., 2006. Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. *Pharmacol Res* 53, 399-406.

Duan, D.D., 2013. Phenomics of cardiac chloride channels. *Compr Physiol* 3, 667-692.

Ertel, E., Godfraind, T., 2012. *Calcium Channel Blockers*. Birkhäuser Basel.

Fabiato, A., 1985. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 85, 247-289.

Fabiato, A., Fabiato, F., 1975. Dependence of the contractile activation of skinned cardiac cells on the sarcomere length. *Nature* 256, 54-56.

Fermini, B., Fossa, A.A., 2003. The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2, 439-447.

Filippo D'Antuono, L., Ferioli, F., Manco, M.A., 2016. The impact of sesquiterpene lactones and phenolics on sensory attributes: An investigation of a curly endive and escarole germplasm collection. *Food Chemistry* 199, 238-245.

Franzini-Armstrong, C., Protasi, F., Ramesh, V., 1999. Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophysical Journal* 77, 1528-1539.

Gacek, A., Pedrycz, W., 2011. *ECG Signal Processing, Classification and Interpretation: A Comprehensive Framework of Computational Intelligence*. Springer London.

Garcia, E.A.C., 1998. *Biofísica*. Sarvier.

Grant, A.O., 2009. Cardiac ion channels. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2, 185-194.

Grimm, M., Ling, H., Willeford, A., Pereira, L., Gray, C.B.B., Erickson, J.R., Sarma, S., Respress, J.L., Wehrens, X.H.T., Bers, D.M., Brown, J.H., 2015. CaMKII $\delta$  mediates  $\beta$ -adrenergic effects on RyR2 phosphorylation and SR Ca<sup>2+</sup> + leak and the pathophysiological response to chronic  $\beta$ -adrenergic stimulation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 85, 282-291.

Grimm, W., Steder, U., Menz, V., Hoffmann, J., Maisch, B., 1997. Effect of amiodarone on qt dispersion in the 12-lead standard electrocardiogram and its significance for subsequent arrhythmic events. *Clinical Cardiology* 20, 107-110.

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

Guyton, A.C., 2008. *Fisiologia humana*. Guanabara Koogan.

Haarmark, C., Graff, C., Andersen, M.P., Hardahl, T., Struijk, J.J., Toft, E., Xue, J., Rowlandson, G.I., Hansen, P.R., Kanters, J.K., 2010. Reference values of electrocardiogram repolarization variables in a healthy population. *J Electrocardiol* 43, 31-39.

Hall, J.E., 2010. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. Elsevier Health Sciences.

Hall, J.E., 2012. *Guyton e Hall, Fisiologia Medica*. Elsevier Health Sciences Italy.

Hamlin, R.L., del Rio, C., 2012. dP/dt(max)--a measure of 'baroinometry'. *J Pharmacol Toxicol Methods* 66, 63-65.

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

Hasnain, M., Vieweg, W.V., 2014. QTc interval prolongation and torsade de pointes associated with second-generation antipsychotics and antidepressants: a comprehensive review. *CNS Drugs* 28, 887-920.

Hiraoka, M., Kawano, S., Hirano, Y., Furukawa, T., 1998. Role of cardiac chloride currents in changes in action potential characteristics and arrhythmias. *Cardiovasc Res* 40, 23-33.

Hollman, A., 1996. Willem Einthoven (1860–1927): father of electrocardiography: life and work, ancestors and contemporaries. *Medical History* 40, 516-517.

Imanishi, T., Nakatani, S., Yamada, S., Nakanishi, N., Beppu, S., Nagata, S., Miyatake, K., 1994. Validation of continuous wave Doppler-determined right ventricular peak positive and negative dP/dt: effect of right atrial pressure on measurement. *J Am Coll Cardiol* 23, 1638-1643.

Kamatou, G.P.P., Viljoen, A.M., 2010. A Review of the Application and Pharmacological Properties of alpha-Bisabolol and alpha-Bisabolol-Rich Oils. *Journal of the American Oil Chemists Society* 87, 1-7.

Khan, R., Sultana, S., 2011. Farnesol attenuates 1,2-dimethylhydrazine induced oxidative stress, inflammation and apoptotic responses in the colon of Wistar rats. *Chem Biol Interact* 192, 193-200.

Khan, S.A., Lee, K., Minhas, K.M., Gonzalez, D.R., Raju, S.V.Y., Tejani, A.D., Li, D., Berkowitz, D.E., Hare, J.M., 2004. Neuronal nitric oxide synthase negatively regulates xanthine oxidoreductase inhibition of cardiac excitation-contraction coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15944-15948.

Kronenberg, H., Berne, R.M., Williams, R.H., Koepfen, B.M., Stanton, B.A., 2008. *Berne & Levy Physiology*. Mosby/Elsevier.

la Cruz, M.N.S.d., Santos Júnior, H.M.d., Rezende, C.M., Alves, R.J.V., Canello, E.M., Rocha, M.M.d., 2014. Terpenos em cupins do gênero *Nasutitermes* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae). *Química Nova* 37, 95-103.

Lantieri, L.C., Bertoletti, J.C., 2009. *Interpretação Eletrocardiográfica Adulta e Pediátrica*. Artmed Editora.

Lapczynski, A., Bhatia, S.P., Letizia, C.S., Api, A.M., 2008. Fragrance material review on farnesol. *Food Chem Toxicol* 46 Suppl 11, S149-156.

Lipsius, S.L., Huser, J., Blatter, L.A., 2001. Intracellular Ca<sup>2+</sup> release sparks atrial pacemaker activity. *News Physiol Sci* 16, 101-106.

Luft, U.C., Bychkov, R., Gollasch, M., Gross, V., Rouillet, J.B., McCarron, D.A., Ried, C., Hofmann, F., Yagil, Y., Yagil, C., Haller, H., Luft, F.C., 1999. Farnesol blocks the L-type Ca<sup>2+</sup> channel by targeting the alpha 1C subunit. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 959-966.

Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Veiga Jr., V.F., Grynberg, N.F., Echevarria, A., 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 25, 429-438.

MacLennan, D.H., Kranias, E.G., 2003. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 566-577.

Magyar, J., Szentandrassy, N., Bányász, T., Fülöp, L., Varró, A., Nánási, P.P., 2004. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *European Journal of Pharmacology* 487, 29-36.

Maßberg, D., Simon, A., Häussinger, D., Keitel, V., Gisselmann, G., Conrad, H., Hatt, H., 2015. Monoterpene (-)-citronellal affects hepatocarcinoma cell signaling via an olfactory receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 566, 100-109.

Miller, D.J., 2004. Sydney Ringer; physiological saline, calcium and the contraction of the heart. *J Physiol* 555, 585-587.

Mitra, R., Morad, M., 1986. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83, 5340-5344.

Nerbonne, J.M., Kass, R.S., 2005. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 85, 1205-1253.

Oz, M., Lozon, Y., Sultan, A., Yang, K.-H.S., Galadari, S., 2015. Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. *Pharmacology & Therapeutics* 152, 83-97.

Pedley, D.K., Brett, C., Nichol, N., 2002. P-R segment depression: an early diagnostic feature in acute pericarditis: a telephone survey of UK accident and emergency departments. *Eur J Emerg Med* 9, 43-45.

Peters, N.S., Severs, N.J., Rothery, S.M., Lincoln, C., Yacoub, M.H., Green, C.R., 1994. Spatiotemporal Relation between Gap-Junctions and Fascia Adherens Junctions during Postnatal-Development of Human Ventricular Myocardium. *Circulation* 90, 713-725.

Pinho-da-Silva, L., Mendes-Maia, P.V., Teofilo, T.M., Barbosa, R., Ceccatto, V.M., Coelho-de-Souza, A.N., Santos Cruz, J., Leal-Cardoso, J.H., 2012. trans-Caryophyllene, a natural sesquiterpene, causes tracheal smooth muscle relaxation through blockade of voltage-dependent Ca(2)(+) channels. *Molecules* 17, 11965-11977.

Qamar, W., Sultana, S., 2008. Farnesol ameliorates massive inflammation, oxidative stress and lung injury induced by intratracheal instillation of cigarette smoke extract in rats: an initial step in lung chemoprevention. *Chem Biol Interact* 176, 79-87.

Resende, R.R., Guatimosim, S., De Fatima Leite, M., 2012. Sinalização De Calcio: BIOQUIMICA E FISILOGIA CELULARES. SARVIER.

Rocha, N.F., Oliveira, G.V., Araujo, F.Y., Rios, E.R., Carvalho, A.M., Vasconcelos, L.F., Macedo, D.S., Soares, P.M., Sousa, D.P., Sousa, F.C., 2011a. (-)-alpha-Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. *Eur J Pharm Sci* 44, 455-461.

Rocha, N.F.M., de Oliveira, G.V., de Araujo, F.Y.R., Rios, E.R.V., Carvalho, A.M.R., Vasconcelos, L.F., Macedo, D.S., Soares, P.M.G., De Sousa, D.P., de Sousa, F.C.F., 2011b. (-)-alpha-Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. *Eur J Pharm Sci* 44, 455-461.

Rocha, T.J.M., Freitas, R.C., Azevedo, R.R.d.S., Souza, L.I.O., Santos, A.F., 2014. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante das espécies *Plectranthus amboinicus* (Lour.) e *Mentha x villosa* (Huds.).

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

Rudy, Y., 2008. Molecular basis of cardiac action potential repolarization. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1123, 113-118.

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

Schmitt, N., Grunnet, M., Olesen, S.P., 2014. Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia. *Physiol Rev* 94, 609-653.

Scriven, D.R., Dan, P., Moore, E.D., 2000. Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 79, 2682-2691.

Sellitto, A.D., Maffit, S.K., Al-Dadah, A.S., Zhang, H., Schuessler, R.B., Nichols, C.G., Lawton, J.S., 2010. Diazoxide maintenance of myocyte volume and contractility during stress: evidence for a non-sarcolemmal K(ATP) channel location. *J Thorac Cardiovasc Surg* 140, 1153-1159.

Sensch, O., Vierling, W., Brandt, W., Reiter, M., 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, 1089-1096.

Simoes, C.M.O., 2007. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da UFSC.

Singh, B.N., Vaughan Williams, E.M., 1970. The effect of amiodarone, a new anti-anginal drug, on cardiac muscle. *Br J Pharmacol* 39, 657-667.

Stradins, P., Lacis, R., Ozolanta, I., Purina, B., Ose, V., Feldmane, L., Kasyanov, V., 2004. Comparison of biomechanical and structural properties between human aortic and pulmonary valve. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 26, 634-639.

Szucs, G., Murlasits, Z., Torok, S., Kocsis, G.F., Paloczi, J., Gorbe, A., Csont, T., Csonka, C., Ferdinandy, P., 2013. Cardioprotection by farnesol: role of the mevalonate pathway. *Cardiovasc Drugs Ther* 27, 269-277.

Tada, M., Katz, A.M., 1982. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu Rev Physiol* 44, 401-423.

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

Tanna, B., Welch, W., Ruest, L., Sutko, J.L., Williams, A.J., 2001. Ryanoid Modification of the Cardiac Muscle Ryanodine Receptor Channel Results in Relocation of the Tetraethylammonium Binding Site. *The Journal of General Physiology* 117, 385-394.

Thomas, G., Chung, M., Cohen, C.J., 1985. A dihydropyridine (Bay k 8644) that enhances calcium currents in guinea pig and calf myocardial cells. A new type of positive inotropic agent. *Circulation research* 56, 87-96.

Trimble, H., 1885. *Practical and analytical chemistry*. P. Blakiston, son & co., Philadelphia,.  
Vassallo, D.V., Songu-Mize, E., Rossoni, L.V., Amaral, S.M., 1997. Effects of ouabain on vascular reactivity. *Braz J Med Biol Res* 30, 545-552.

Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C., Maciel, M.A.M., 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova* 28, 519-528.

Verkerk, A.O., van Ginneken, A.C., Wilders, R., 2009. Pacemaker activity of the human sinoatrial node: role of the hyperpolarization-activated current, I<sub>f</sub>. *Int J Cardiol* 132, 318-336.

Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W., 2014. *Fundamentos de Bioquímica - 4.ed.: A Vida em Nível Molecular*. Artmed Editora.

Walker, H.K., Hall, W.D., Hurst, J.W., 1990. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. Butterworths.

Wang, G.-J., Liao, J.-F., Hintz, K.K., Chen, W.-P., Su, M.-J., Lin, Y.-L., Shi, C.-C., Chen, C.-F., Ren, J., 2004. Calcium-antagonizing activity of S-petasin, a hypotensive sesquiterpene from *Petasites formosanus*, on inotropic and chronotropic responses in isolated rat atria and cardiac myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 369, 322-329.

Wang, G.-J., Shum, A.Y.-C., Lin, Y.-L., Liao, J.-F., Wu, X.-C., Ren, J., Chen, C.-F., 2001. Calcium channel blockade in vascular smooth muscle cells: major hypotensive mechanism of S-petasin, a hypotensive sesquiterpene from *Petasites formosanus*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297, 240-246.

Wilson, J.R., Clark, R.B., Banderali, U., Giles, W.R., 2011. Measurement of the membrane potential in small cells using patch clamp methods. *Channels* 5, 530-537.

Yazlovitskaya, E.M., Melnykovich, G., 1995. Selective farnesol toxicity and translocation of protein kinase C in neoplastic HeLa-S3K and non-neoplastic CF-3 cells. *Cancer Lett* 88, 179-183.

Zhou, P., Zhao, Y.-T., Guo, Y.-B., Xu, S.-M., Bai, S.-H., Lakatta, E.G., Cheng, H., Hao, X.-M., Wang, S.-Q., 2009.  $\beta$ -Adrenergic signaling accelerates and synchronizes cardiac ryanodine receptor response to a single L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 18028-18033.