



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PPGFARMA

PAULA IDMA CHAVES NUNES

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIARRÍTMICO DO EUGENOL EM
MODELO DE ARRITMIA INDUZIDA POR CORRENTE DE SÓDIO
TARDIA

Salvador

2021

PAULA IDMA CHAVES NUNES

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIARRÍTMICO DO EUGENOL EM
MODELO DE ARRITMIA INDUZIDA POR CORRENTE DE SÓDIO
TARDIA**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação *Stricto Sensu* Em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Nei Santana Gondim

Co-Orientador: Prof. Dr. Artur Santos Miranda

Linha de Pesquisa: Linha I – Prospecção de Fármacos e Recursos Naturais

Salvador

2021

FICHA CATALOGRÁFICA
Sistema de Bibliotecas da UNEB

N972i

Nunes, Paula Idma Chaves

Investigação do efeito antiarrítmico do eugenol em modelo de arritmia induzida por corrente de sódio tardia / Paula Idma Chaves Nunes. - Salvador, 2021.

80 fls : il.

Orientador(a): Prof^o Dr. Antonio Nei Santana Gondim.

Coorientador(a): Prof^o Dr. Artur Santos Miranda.

Inclui Referências

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGFARMA, Campus I. 2021.

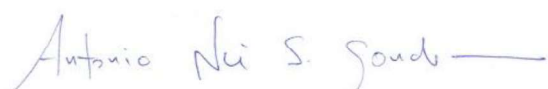
1.Arritmia - Tratamento. 2.Antiarrítmico - Efeito do eugenol. 3.Morte súbita. 4.Coração - Cuidado e tratamento. 5.Cardiomíocitos.

CDD: 615

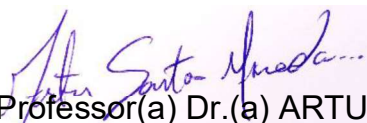
FOLHA DE APROVAÇÃO
"INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIARRÍTMICO DO EUGENOL EM MODELO DE
ARRITMIA INDUZIDA POR CORRENTE DE SÓDIO TARDIA"

PAULA IDMA CHAVES NUNES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 29 de outubro de 2021, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:



Professor(a) Dr.(a) ANTONIO NEI SANTANA GONDIM
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Bioquímica e Imunologia
Universidade Federal de Minas Gerais



Professor(a) Dr.(a) ARTUR SANTOS MIRANDA
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP
Doutorado em Bioquímica e Imunologia
Universidade Federal de Minas Gerais



Professor(a) Dr.(a) ANDRE LACERDA BRAGA TELES
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Universidade Estadual de Feira de Santana



Professor(a) Dr.(a) CARLA MARIA LINS DE VASCONCELOS
Universidade Federal de Sergipe - UFS
Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba

Dedicatória

À minha mãe, pelo exemplo de força.

Ao Sr. Mário, meu avô querido (*in memoriam*), pelo amor e carinho tão singulares.

Ao Fernando, pelo companheirismo.

Aos colegas e amigos, pelo apoio em todos os momentos.

Ao professor Antonio Nei, pela dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Antonio Nei, meu orientador, pela oportunidade tão importante em minha formação, por todas as contribuições e, principalmente, pela paciência e parceria.

Aos colegas do Laboratório de Biofísica e Farmacologia da UNEB, campus XII, que tanto contribuíram para a execução deste trabalho.

À Leisiane Pereira Marques que foi uma segunda orientadora e uma grande amiga durante a minha estadia e em toda a coleta de dados na UNIFESP.

Ao professor Aníbal e à Léia pelo suporte oferecido ao longo do curso no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA.

À Universidade do Estado da Bahia (UNEB), que faz parte da minha história de vida e formação.

À Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), especialmente aos professores Artur Santos Miranda e Danilo Roman Campos, pelas contribuições e disponibilidade.

À minha família pelo apoio incondicional.

RESUMO

As arritmias são a principal causa de morte súbita cardíaca em pacientes com disfunções no coração sendo, portanto, um importante problema epidemiológico e de saúde pública. O eugenol (4-Alil-2-Metoxifenol) é um composto fenólico encontrado em algumas plantas medicinais que, de acordo com estudos prévios, é capaz de modular as atividades mecânica e elétrica do coração principalmente devido à sua interação com os canais de Ca^{2+} regulados por voltagem. No entanto, o efeito antiarrítmico do eugenol e sua ação sobre os canais de Na^+ dependentes de voltagem (Nav) cardíacos é ainda pouco explorado. Deste modo, o presente trabalho objetivou investigar o efeito antiarrítmico do eugenol em um modelo de arritmia cardíaca induzida por *Anemonia Viridis Toxin II* (ATX-II), uma toxina extraída da espécie *Anemonia sulcata* que aumenta a corrente de sódio tardia ($I_{\text{Na,L}}$) nas células do miocárdio, bem como avaliar o efeito direto dessa substância sobre a $I_{\text{Na,L}}$ em células de cultura (HEK-293). Inicialmente foram utilizadas concentrações crescentes do eugenol (1 a $5.000\mu\text{M}$) para avaliar os efeitos inotrópico e cronotrópico negativo relatados na literatura. Para avaliar o efeito do eugenol sobre a arritmogênese cardíaca, o átrio esquerdo, mantido em cuba para órgão isolado e submetido à estimulação elétrica, foi exposto à 10 nM de ATX-II para evocar os eventos arrítmicos, seguido da adição do eugenol ($300\mu\text{M}$) à solução de banho para avaliar o seu efeito sobre os eventos arrítmicos induzidos por ATX-II. O efeito do eugenol ($300\mu\text{M}$) sobre a amplitude da $I_{\text{Na,L}}$ em células HEK-293 foi verificado utilizando-se a técnica de patch-clamp, com células mantidas em um potencial de “holding” de -120 mV e estimuladas com pulsos-testes de 300 ms de duração que despolarizam as células para -20 mV , em intervalos de 5s. O surgimento da $I_{\text{Na,L}}$ foi estimulado por 3 nM de ATX-II. Lidocaína e Tetrodotoxina (TTX) foram usadas como um controle positivo. Os resultados desta pesquisa demonstraram que o eugenol apresenta efeitos inotrópico negativo sobre o tecido atrial esquerdo e cronotrópico negativo sobre o átrio direito, atuando de modo concentração-dependente. Além disso, esse composto apresentou efeito antiarrítmico em tecido atrial em uma concentração de $300\mu\text{M}$, provavelmente por inibir a $I_{\text{Na,L}}$. Essa mesma concentração foi utilizada para os experimentos de eletrofisiologia, e promoveu uma redução na amplitude da $I_{\text{Na,L}}$ induzida por ATX-II em células HEK-293 que expressavam transitoriamente o $\text{Nav}1.5$ humano, demonstrando uma ação direta do eugenol sobre o $\text{Nav}1.5$. Tais evidências corroboram com a hipótese de que o eugenol tem potencial antiarrítmico podendo ser usado para o controle de condições fisiopatológicas associadas a Síndrome do QT longo do tipo 3 (SQTL3), por exemplo. Estudos complementares, em modelos *in vivo*, deverão ser realizados para verificar essa possibilidade.

Palavras-chave: arritmias cardíacas; ATX-II; cardiomiócitos; corrente de sódio tardia; efeito antiarrítmico; eugenol.

ABSTRACT

Arrhythmias are the main cause of sudden cardiac death in patients with heart dysfunction and, therefore, an important epidemiological and public health problem. Eugenol (4-Allyl-2-Methoxyphenol) is a phenolic compound found in some medicinal plants that, according to previous studies, is able to modulate the mechanical and electrical activities of the heart mainly due to its interaction with Ca^{2+} channels regulated by voltage. However, the antiarrhythmic effect of eugenol and its action on cardiac voltage-dependent Na^+ channels (Nav) is still poorly explored. Thus, the present work aimed to investigate the antiarrhythmic effect of eugenol in a model of cardiac arrhythmia induced by ATX-II, a toxin that increases the late sodium current ($\text{I}_{\text{Na,L}}$) in myocardial cells, as well as to evaluate the direct effect of this substance on $\text{I}_{\text{Na,L}}$ in cultured cells (HEK-293). Initially, increasing concentrations of eugenol (1 to 5,000 μM) were used to assess the inotropic and negative chronotropic effects reported in the literature. To assess the effect of eugenol on cardiac arrhythmogenesis, the left atrium, kept in a tub for an isolated organ and subjected to electrical stimulation, was exposed to 10 nM of ATX-II to evoke arrhythmic events, followed by the addition of eugenol (300 μM) to the bath solution to assess its effect on ATX-II induced arrhythmic events. The effect of eugenol (300 μM) on the amplitude of $\text{I}_{\text{Na,L}}$ in HEK-293 cells was verified using the patch-clamp technique, with cells maintained at a holding potential of -120 mV and stimulated with pulses -tests of 300 ms duration that depolarize cells to -20 mV, at intervals of 5s. The appearance of $\text{I}_{\text{Na,L}}$ was stimulated by 3 nM of ATX-II. Lidocaine and Tetrodotoxin (TTX) was used as a positive control. The results of this research demonstrated that eugenol has negative inotropic effects on the left atrial tissue and negative chronotropic effects on the right atrium, acting in a concentration-dependent manner. Furthermore, this compound had an antiarrhythmic effect in atrial tissue at a concentration of 300 μM , probably because it inhibits $\text{I}_{\text{Na,L}}$. This same concentration was used for the electrophysiology experiments, and promoted a reduction in the amplitude of $\text{I}_{\text{Na,L}}$ induced by ATX-II in HEK293 cells that transiently expressed human $\text{Nav}1.5$, demonstrating a direct action of eugenol on $\text{Nav}1.5$. Such evidence supports the hypothesis that eugenol has antiarrhythmic potential and can be used to control pathophysiological conditions associated with long QT syndrome type 3 (LQTL3), for example. Complementary studies, in in vivo models, should be carried out to verify this possibility.

Keywords: cardiac arrhythmias; ATX-II; cardiomyocytes; late sodium current; antiarrhythmic effect; eugenol.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AEC	Acoplamento excitação-contração
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ATX-II	Anemonia viridis toxin II – toxina extraída de <i>Anemonia sulcata</i>
Ca ²⁺	Íon cálcio
[Ca ²⁺] _i	Concentração de Ca ²⁺ livre no citosol
CAMKII	Proteína cinase dependente de Ca ²⁺ /calmodulina
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CSQ	Calsequestrina
DAD	Pós-despolarização tardia
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAD	Pós-despolarização precoce
ELC	Cadeia leve essencial
E _m	Potencial de membrana
E _K	Potencial de equilíbrio do K ⁺
ECG	Eletrocardiograma
FDA	Food and Drug Administration
FV	Fibrilação ventricular
fRS	Retículo sarcoplasmático não-juncional ou livre
G _{Na}	Condutância ao Na ⁺
HMM	Meromiosina pesada
Hz	Hertz
IC50	Concentração da droga que leva a 50 % do seu efeito máximo
I _{Ca,L}	Corrente de Ca ²⁺ do tipo lenta
I _{Ca,T}	Corrente de Ca ²⁺ transitória
I _f	Canais <i>funny</i>
IFM	Isoleucina-fenilalanina-metionina
I _K	Corrente de K ⁺
I _{K1}	Corrente K ⁺ retificadora de entrada
I _{Kr}	Corrente de K ⁺ rápida
I _{Ks}	Corrente de K ⁺ lenta

I_{Kur}	Corrente de K^+ retificadora ultrarrápida
I_{Na}	Corrente de Na^+
$I_{Na/Ca}$	Corrente de 3 Na^+ : 1 Ca^{2+}
$I_{Na,L}$	Corrente de Na^+ tardia
$I_{Na,R}$	Corrente de Na^+ rápida
I_{to}	Corrente de K^+ transitória de saída
$I_{to,f}$	I_{to} rápida
$I_{to,s}$	I_{to} lenta
jRS	Retículo sarcoplasmático juncional
kDa	Quilodawton
K_{ir}	Canal de K^+ retificador de influxo
K_v	Canal de K^+ dependente de voltagem
LMM	Meromiosina leve
ms	Milissegundos
Na^+	Íon sódio
$[Na^+]_i$	Concentração de Na^+ intracelular
Na^+/K^+ -ATPase	Na^+ , K^+ -adenosina trifosfatase
Nav	Canal de Na^+ dependente de voltagem
NAV	Nó atrioventricular
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
μ M	Micromolar
MLC1	Cadeia leve de miosina 1
MLC2	Cadeia leve de miosina 2
MSC	Morte súbita cardíaca
NCX	Trocador Na^+/Ca^{2+}
NOS	Óxido nítrico sintase
NSA	Nó sinusal
OEs	Óleos essenciais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Potencial de ação
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Fosfato inorgânico
PLB	Fosfolambano

PKA	Proteino cinase dependente de cAMP
PM	Peso molecular
PRA	Período refratário absoluto
PRR	Período refratário relativo
QTc	Intervalo QT corrigido
RLC	Cadeia leve regulatória
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptor de rianodina
RyR2	RyR do tipo 2
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SERCA	Ca ²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático
SOBRAC	Sociedade Brasileira de Arritmias Cardíacas
SQTL	Síndrome do QT longo
S1	Subfragmento 1
S2	Subfragmento 2
Tm	Tropomiosina
TnC	Troponina C
TnI	Troponina I
TnT	Troponina T
TTX	Tetrotoxina
V	Voltz

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 01. Estrutura do coração, com destaque para as câmaras cardíacas	05
Figura 02. Representação gráfica de um ECG típico	07
Figura 03. Figura ilustrativa dos túbulos T nos cardiomiócitos	09
Figura 04. Estrutura das miofibrilas e sistema Túbulos T - Retículo Sarcoplasmático (RS)	10
Figura 05. Modelo representativo de um sarcômero.	11
Figura 06. : Modelo representativo dos miofilamentos finos	12
Figura 07. Modelo representativo da estrutura da miosina	13
Figura 08. O transporte de Ca^{2+} durante o acoplamento excitação-contração	14
Figura 09. Esquema do ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase	16
Figura 10. A atividade elétrica do coração (painel inferior) e as diferentes formas de potencial de ação (painel superior direito) registrados em diferentes regiões do coração	18
Figura 11. Representação esquemática da subunidade α de Nav1.5 e das principais mutações em SCN5A	21

Figura 12. Diagrama representativo da transição de estados do canal de Na ⁺ dependente de voltagem	22
.....	
Figura 13. Relação entre os picos das correntes rápida e tardia de Na ⁺ . Os gráficos apresentam a transição dos estados biofísicos do Nav1.5 ao longo do PA cardíaco normal (A) e um PA na presença da I _{Na,L} prolongada (B)	22
.....	
Figura 14. Modelo representativo dos estados conformacionais das comportas de um canal de sódio. Onde C1-C4 corresponde aos estados fechados (do inglês closed); O representa o estado aberto (do inglês open); I indica a inativação rápida (do inglês inactivation) e CI1-CI3 expressão o estado fechado com a partícula de inativação ligada	23
.....	
Figura 15. Mecanismo de reentrada anatômica	24
.....	
Figura 16. Estrutura química do eugenol (C ₁₀ H ₁₂ O ₂ ; 4-alil-2-metóxi-fenol)	29
.....	
Figura 17. Efeito do eugenol sobre a contratilidade atrial cardíaca. (A) Traçados representativos das contrações em diferentes concentrações de eugenol. (B) Traçados representativos das contrações em diferentes concentrações de lidocaína. (C) Curva concentração-efeito do eugenol (esferas pretas) e lidocaína (esferas cinzas). (D) Valores médios da EC ₅₀ do eugenol e da lidocaína	36
.....	
Figura 18. Curva concentração-resposta do efeito do eugenol e lidocaína sobre a frequência cardíaca no átrio direito de cobaia	37
.....	
Figura 19. Efeito do ATX-II sobre a contratilidade cardíaca. (A) Traçados representativos das contrações no controle e a 10 nM de ATX-II. (B) Efeito do ATX-II sobre a força de contração. (C) Efeito do ATX-II sobre a tensão diastólica. (D) TC ₅₀ e (E) TR ₅₀ . (F) dv/dt máximo. (G) dv/dt mínimo	38
.....	
Figura 20. Modelo de arritmia induzida por ATX-II em tecido atrial esquerdo. (A) Traçados representativos das contrações no controle, quando exposto a 10 nM de ATX-II e tratado com 2 µM de tetrodotoxina (TTX). (B) Traçados representativos das contrações no controle, quando exposto a 10 nM de ATX-II e tratado com 300 µM de eugenol	40
.....	

Figura 21. Percentual de extra-sístoles em tecido atrial esquerdo quando submetido a 10 nM de ATX-II, 10 nM de ATX+DMSO, 10 nM de ATX-II+eugenol e 10 nM de ATX-II+TTX. “b” significa que houve diferença estatisticamente significativa quando comparado com “a” ($p < 0,05$) 41

Figura 22. Modelo de arritmia induzida por ATX-II em tecido atrial esquerdo células HEK que expressão transitoriamente o NaV1.5 humano. (A) Traçados representativos das contrações no controle, quando exposto a 310 nM de ATX-II e tratado com 2300 μ M de tetrodotoxina (TTX)eugenol. (B) Traçados representativos das contrações no Gráfico do curso temporal do efeito controle, quando exposto a 10 nM de ATX-II e tratado com do eugenol, na concentração de 300 μ M, sobre o pico da INa,L de eugenol. (B) Valores médios da densidade da INa,L corrente no controle, na presença de 3 nM de ATX-II e tratado com 300 μ M de eugenol 42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. JUSTIFICATIVA.....	03
3. OBJETIVOS.....	04
3.1 GERAL.....	04
3.2 ESPECÍFICOS.....	04
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	05
4.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA CARDÍACA.....	05
4.2 BASES CELULARES E MOLECULARES PARA A CONTRATILIDADE CARDÍACA.....	08
4.3 ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO.....	13
4.4 O POTENCIAL DE AÇÃO CARDÍACO E SUAS BASES IÔNICAS.....	16
4.5 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO NaV1.5.....	20
4.6 ARRITMIAS CARDÍACAS.....	23
4.6.1 SÍNDROME DO QT LONGO DO TIPO 3 (SQTL3)	26
4.7 EUGENOL	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
7. CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXOS.....	55
Anexo A. ARTIGO: EUGENOL INTERACTS WITH CARDIAC SODIUM CHANNEL AND REDUCES HEART EXCITABILITY AND ARRHYTHMIAS PUBLICADO NA REVISTA LIFE SCIENCES EM 24 JUNHO 2021	53

1. INTRODUÇÃO

As arritmias são caracterizadas por uma modificação no ritmo cardíaco normal, sem justificativa fisiológica, as quais podem ser causadas por: 1) um aumento na excitabilidade da membrana celular, levando ao surgimento de taquicardias induzidas por ganho de automaticidade ou atividade de gatilho; 2) um defeito na formação do impulso elétrico no nó sinoatrial (NSA), o que geralmente causa a bradicardia sinoatrial, pausa sinoatrial ou a síndrome bradi-taquicárdica e 3) uma redução na condução normal célula-célula levando, com isso, a um bloqueio do sistema de condução cardíaco ou a uma redução da propagação do sinal elétrico em determinadas regiões do miocárdio (ROKITA E ANDERSON, 2012).

Nesse sentido, segundo Rubart e Zipes (2005), a principal causa de morte súbita cardíaca é decorrente de degeneração por taquicardia ventricular (aceleração anormal da frequência ventricular) com fibrilação ventricular (FV), durante a qual as contrações desorganizadas dos ventrículos não ejetam sangue de forma eficaz, muitas vezes seguida de assistolia ou atividade elétrica sem pulso. À exceção de células marca-passo do nó sinoatrial e atrioventricular, durante o potencial de ação (PA) cardíaco típico, a despolarização (ou fase 0) da membrana celular é guiada por canais seletivos ao Na^+ sensíveis à voltagem (Nav), majoritariamente os $\text{Nav}1.5$, isoforma mais abundante no coração. A abertura desses canais leva a uma corrente de influxo de Na^+ em função de seu gradiente eletroquímico. Em condições fisiológicas, os $\text{Nav}1.5$ são ativados e inativados rapidamente (em cerca de 5 milissegundos), gerando um fluxo de Na^+ para o citoplasma, conhecido como corrente rápida de Na^+ ($I_{\text{Na,R}}$). Algumas mutações no gene que codifica o $\text{Nav}1.5$, bem como toxinas, pesticidas, e certas condições patológicas adquiridas (como por exemplo a isquemia cardíaca), podem levar a um funcionamento atípico desses canais, impedindo sua rápida inativação e gerando uma corrente de entrada de Na^+ mais duradoura (na ordem de dezenas a centenas de milissegundos) conhecida como corrente de Na^+ tardia ($I_{\text{Na,L}}$). O aumento da $I_{\text{Na,L}}$ nessas condições patológicas acarreta numa elevação da duração do PA, o que predispõe o coração à arritmias (CHADDA *et al.*, 2017).

Atualmente existem diversos tipos de tratamento para as arritmias cardíacas, tais como a ablação do foco arritmogênico, o uso de implantes que respondem a eventos de bradi ou taquicardia e os medicamentos antiarrítmicos. Esses últimos podem ser classificados de acordo com os seus mecanismos de ação. Os fármacos antiarrítmicos de classe I, por exemplo, compreendem as drogas que bloqueiam a $I_{\text{Na,R}}$, diminuindo assim a condução de impulsos

elétricos do coração e a ocorrência de atividade de gatilho, reduzindo, com isso, a automaticidade cardíaca (BHATT *et al.*, 2005; KAVERINA E CHICHKANOV, 2003; YU *et al.*, 2018).

O eugenol é um composto fenólico encontrado em algumas plantas medicinais que também vem sendo aplicado para o tratamento local da dor (Pramod *et al.*, 2010). Alguns estudos vêm mostrando que esse composto é capaz de modular as atividades mecânica e elétrica do coração. Sensch e colaboradores (2000) demonstraram que o eugenol diminui o inotropismo cardíaco por reduzir o influxo de Ca^{2+} nos cardiomiócitos, o que também foi observado por Damiani *et al.* (2004). Além disso, como demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa, o eugenol é um inibidor da I_{Na} em células cardíacas e células de cultura com grande potencial antiarrítmico (TEIXEIRA-FONSECA, 2018; TEIXEIRA-FONSECA *et al.*, 2021). Assim, o presente trabalho objetivou investigar o efeito antiarrítmico do eugenol em modelos *in vitro* de arritmia cardíaca induzida por um aumento da $I_{\text{Na,L}}$. Nesse modelo, uma toxina extraída da anêmona, *Anemonia sulcata*, conhecida como ATX-II, é utilizada para aumentar, seletivamente, a $I_{\text{Na,L}}$, o que leva a um aumento intenso na duração do PA cardíaco, levando ao surgimento de arritmia no miocárdio ventricular ou atrial (Liang *et al.*, 2016). Além disso, almejou-se também investigar o efeito direto do eugenol sobre a $I_{\text{Na,L}}$.

2. JUSTIFICATIVA

As arritmias são um importante problema epidemiológico e de saúde pública, tendo em vista que estão associadas a condições fisiopatológicas graves e a morte súbita cardíaca (MSC). Apesar dos avanços no diagnóstico e no tratamento dos diversos tipos de arritmias cardíacas, o custo para o manejo dos pacientes e o número de mortes causadas por essas disfunções continuam elevados, tanto em países desenvolvidos, quanto naqueles em desenvolvimento (ROKITA E ANDERSON, 2012, HEIJMAN *et al.*, 2017).

Dados da Sociedade Brasileira de Arritmias Cardíacas (SOBRAC, 2018) destacam que as arritmias cardíacas atingem um número de mais de vinte milhões de brasileiros todos os anos, levando a mais de 320 mil casos de MSC. Muitas formas congênitas e adquiridas de doenças cardíacas estão associadas a defeitos em canais iônicos que são as unidades fundamentais da excitabilidade da membrana celular, a exemplo disso tem-se o prolongamento da $I_{Na,L}$ que é alvo terapêutico em condições de arritmia como a síndrome do QT longo do tipo 3 (SQTL3), insuficiência cardíaca e angina. Diante disso, o presente estudo revela-se importante por investigar o efeito do eugenol (4-alil-2-metoxifenol) em um modelo de arritmia induzida por aumento da $I_{Na,L}$.

É importante salientar que o eugenol é considerado seguro, não cancerígeno e não mutagênico pela Food and Drug Administration (FDA), com uso humano aceito pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e apresenta diversas atividades farmacológicas e biológicas sobre o músculo cardíaco, a exemplo, a sua ação cardioprotetora em diversos modelos, devido ao seu potencial antioxidante, tal como a capacidade de reduzir a apoptose de cardiomiócitos em ratos neonatos por diminuir os níveis intracelulares de Ca^{2+} e o estresse oxidativo nessas células e a reversão parcial da hipertrofia cardíaca induzida pela administração de isoproterenol conforme verificado por Choudhary, *et al.*, 2006; e a redução da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina e pelo trióxido de arsênio, utilizados para o tratamento de neoplasias (FOUAD e YACOUBI, 2011) (BINU, *et al.*, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do eugenol sobre a contratilidade cardíaca, bem como o efeito antiarrítmico desse composto em modelo de arritmia cardíaca induzida pelo aumento da $I_{Na,L}$ e a sua ação direta sobre a $I_{Na,L}$ em células de cultura HEK-293.

3.2 ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito inotrópico do eugenol sobre o músculo atrial esquerdo;
- Estudar o efeito cronotrópico do eugenol em tecido atrial direito;
- Verificar o efeito da ATX-II sobre a contratilidade cardíaca em tecido atrial isolado;
- Investigar a atividade antiarrítmica do eugenol em modelo de arritmia induzida por ATX-II em átrio esquerdo;
- Averiguar a ação do eugenol sobre a corrente de sódio tardia ($I_{Na,L}$) em células HEK-293.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA CARDÍACA

O coração de mamíferos é composto por quatro câmaras: átrio direito, ventrículo direito, átrio esquerdo e ventrículo esquerdo. Entre os átrios e ventrículos estão as valvas atrioventriculares e entre os ventrículos e as artérias estão as valvas pulmonares e aórtica, cuja função é impedir o refluxo do sangue e contribuir para o gradiente de pressão necessário à sua propulsão (Figura 1). Compondo o aparato subvalvar nos ventrículos estão as cordas tendíneas, constituídas principalmente de elastina e fibras de colágeno que também contribuem para o fechamento valvar e desenvolvimento de força para ejeção sanguínea durante a sístole (VACA e BORDONI, 2019).

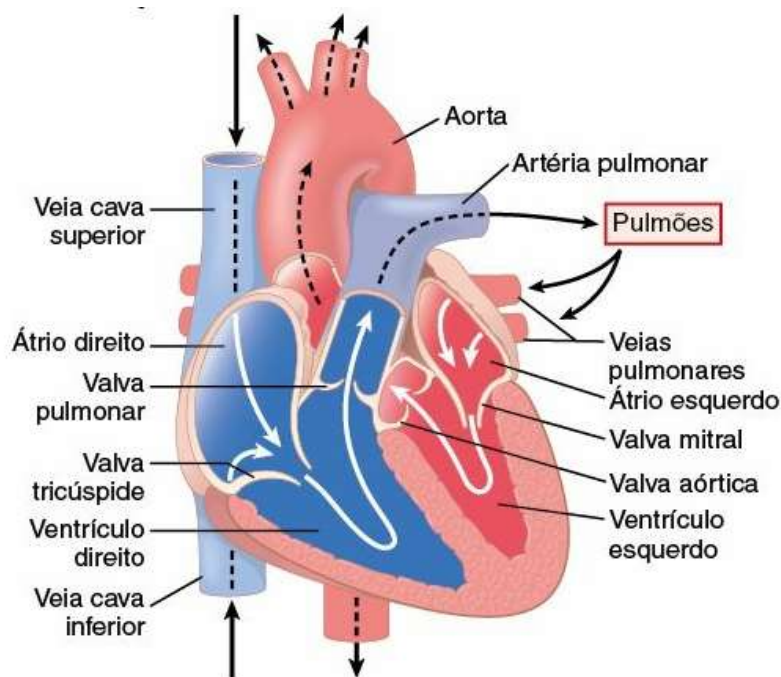


Figura 1. Estrutura do coração, com destaque para as câmaras cardíacas. Fonte: Modificado de Guyton e Hall, 2017.

Os lados direito e esquerdo do coração são separados por septos fibrosos formando dois circuitos de fluxo sanguíneo: o sangue rico em CO_2 chega ao coração, no átrio direito, através de duas grandes veias, veia cava superior e veia cava inferior, move-se para o ventrículo direito durante a diástole através da válvula tricúspide que se fecha durante a sístole possibilitando o direcionamento do fluxo para a circulação pulmonar. Nos alvéolos o sangue é oxigenado e retorna ao coração pelo átrio esquerdo de onde é conduzido para o

ventrículo esquerdo através da válvula bicúspide (mitral) e deste é bombeado para a circulação sistêmica, após passar pela válvula aórtica (Figura 1) (SILVERTHORN, 2017).

As paredes das câmaras cardíacas são divididas em três camadas: endocárdio, miocárdio e epicárdio. O endocárdio representa uma fina camada contínua à túnica interna dos grandes vasos, o miocárdio é a camada intermediária do coração, formada por tecido muscular e o epicárdio apresenta-se na camada mais externa e é constituído pela lâmina visceral do pericárdio (MOORE, 2014).

O pericárdio funciona como uma barreira de proteção contra patógenos e empecilho para a dilatação excessiva do coração. O mesmo aparece como um saco fibroso seroso, sendo sua superfície fibrosa composta por muitas camadas de tecido conjuntivo e as suas camadas serosas divididas em pericárdio parietal, ligado ao pericárdio fibroso, e pericárdio visceral, ligado diretamente ao coração. Este tecido tem, ainda, a função de envolver o líquido pericárdico, reduzindo o atrito durante a sístole e diástole (VOLPE e MAKARYUS, 2019).

Comumente associada a gordura epicárdica, na região mais externa do coração, estão, também, as artérias coronárias, responsáveis pela perfusão do coração para o suprimento de oxigênio e nutrientes. Estes vasos têm origem na aorta e se ramificam principalmente para o lado direito do coração, formando, dentre outros, o ramo nodal (no nó sinoatrial), o ramo marginal direito e o ramo interventricular posterior (SAXTON e MANNA, 2019).

A geração e condução do sinal elétrico que precede a atividade mecânica do coração é devida a propriedade do automatismo cardíaco. O nó sinoatrial (NSA) é o local do coração onde normalmente se forma o impulso elétrico cardíaco, visto que as células dessa região apresentam maior atividade marca-passo intrínseca. Os dois tipos principais de células que compõem o NSA são: células pequenas e redondas auto excitáveis e células alongadas que conduzem o impulso gerado da região mais central do nó para as margens onde encontram os miócitos atriais direitos e também feixes de Bachmann que conduzem o sinal para a ativação elétrica do átrio esquerdo. Após a despolarização atrial, o impulso chega ao nó atrioventricular (NAV) onde ocorre um atraso da sua condução, que permite o completo enchimento de sangue da câmara ventricular. Logo depois o impulso passa pelas fibras de condução: feixes de His e suas ramificações e fibras de Purkinje, que permitem a despolarização ventricular (CHENG *et al.*, 2019).

Para o registro do impulso elétrico que percorre diferentes regiões do coração é utilizado um equipamento chamado eletrocardiograma (ECG), o qual possui, normalmente, doze eletrodos que devem ser dispostos sobre a superfície corporal para o registro das variações de potenciais elétricos que se propagam em tecidos localizados no entorno do coração. O traçado gráfico do ECG típico apresenta: a onda P que representa a despolarização atrial; o segmento isoelétrico PR, que consiste no período de condução do impulso elétrico pelo NAV, feixe de His e fibras de Purkinje, os quais são estruturas que apresentam massa muito pequena quando comparada ao músculo atrial, de modo que o campo elétrico não pode ser registrado pelos eletrodos dispostos na superfície corporal; o complexo QRS que retrata a sístole ventricular; o segmento ST que representa a contração isovolumétrica dos ventrículos e a onda T que corresponde a repolarização ventricular – a repolarização atrial não aparece na representação por coincidir com o momento da despolarização ventricular (Figura 2). Com posse do registro de ECG é possível realizar diversas medidas, entre elas os intervalos, que correspondem ao tempo entre ondas do traçado eletrocardiográfico. O intervalo “RR”, por exemplo, permite verificar se o ritmo dos batimentos cardíacos encontra-se em condições fisiológicas (geralmente 75bpm). Já o intervalo QT corresponde ao tempo entre o início do complexo QRS e o final da onda T e marca o período entre a sístole e diástole ventricular. O intervalo QT é muito influenciado pela frequência cardíaca, deste modo utiliza-se o intervalo QT corrigido (QTc) que pode ser calculado pela fórmula de Bazett: $QTc = \frac{QT}{\sqrt{R-R}}$, onde o intervalo R-R representa o período da despolarização ventricular (em segundos), de modo que o intervalo QTc trata do ajuste do intervalo QT para as mais diversas frequências cardíacas. O prolongamento do intervalo QT, está associado a condições patológicas como a Síndrome do QT Longo do tipo 3 (SQT3), na qual observa-se maior duração do potencial de ação no miocárdio ventricular (FELDMAN e GOLDWASSER, 2004).

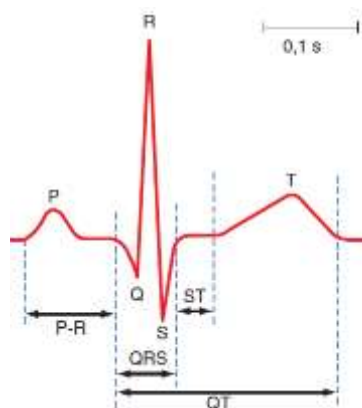


Figura 2. Representação gráfica de um ECG típico. Fonte: Berne e Levy, 2009.

4.2 BASES CELULARES E MOLECULARES PARA A CONTRATILIDADE CARDÍACA

O miocárdio é constituído por diferentes tipos celulares, tais como cardiomiócitos, fibroblastos, células musculares lisas vasculares e células endoteliais, além de macrófagos teciduais. Para que se possa compreender o funcionamento contrátil e elétrico do coração é necessário observar com mais profundidade os aspectos estruturais e moleculares dos cardiomiócitos que representam cerca de 75% do volume do miocárdio (OLIVEIRA, 2019).

A membrana plasmática dos cardiomiócitos é denominada sarcolema e, além de garantir proteção e defesa para os componentes intracelulares, integra um conjunto de estruturas funcionais que incluem os túbulos transversos (túbulos T) e os discos intercalados. O sarcolema apresenta uma estrutura com componentes moleculares específicos, tais como lipídeos e proteínas, que lhe permite regular uma série de processos celulares, como é o caso do acoplamento excitação-contração (AEC), que será discutido mais detalhadamente adiante (KITMITTO, BAUDOIN e CARTWRIGHT, 2019).

Os túbulos T são estruturas formadas por invaginações do sarcolema em direção ao interior do miócito, encontram-se muito próximos as linhas Z dos sarcômeros e suas ramificações formam uma rede complexa em torno dos miofilamentos. Essas estruturas apresentam microdomínios com grande densidade de canais de cálcio do tipo L que formam a díade cardíaca junto ao retículo sarcoplasmático (RS), e, por isso, auxiliam na regulação da sinalização de Ca^{2+} e conseqüentemente na contratilidade cardíaca. Sua forma e estrutura é garantida por proteínas que interconectam o sarcolema e o citoesqueleto celular (figura 3) (HONG e SHAW, 2017).

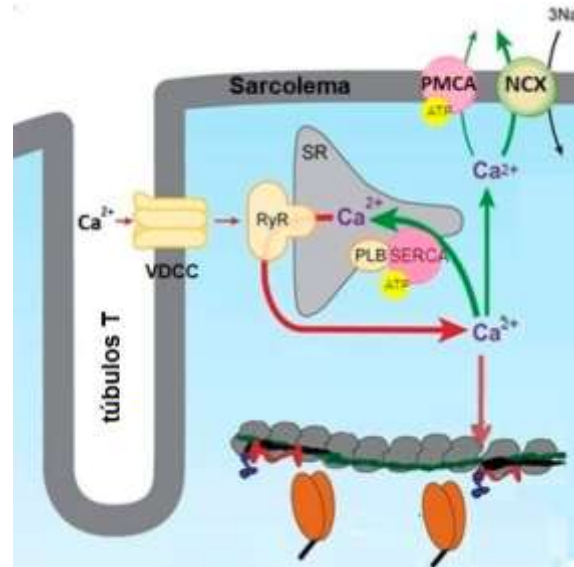


Figura 3. Figura ilustrativa dos túbulos T nos cardiomiócitos. Adaptado de: Bers, 2008.

Os discos intercalares são responsáveis pelo acoplamento entre células adjacentes, sendo regiões especializadas do sarcolema que contém três tipos de junções celulares: 1) desmossomas (ou mácula aderente); 2) junções aderentes e 3) junções *gap* (ou junções comunicantes). Os desmossomas ancoram o sarcolema aos filamentos intermediários, as junções aderentes conectam o citoesqueleto de actina de duas células adjacentes e as junções *gap* conectam o citoplasma de células adjacentes permitindo a passagem não seletiva de íons e metabólitos de até 1KDa, o que faz do miocárdio um sincício mecânico e elétrico (PINALI *et al.*, 2015).

O retículo sarcoplasmático (RS) é uma organela intracelular presente nos cardiomiócitos que consiste em uma forma especializada de retículo endoplasmático com função crucial de captação e liberação de Ca^{2+} durante os ciclos de contração através de proteínas transportadoras da membrana. O RS pode ser dividido em duas estruturas: 1) o retículo sarcoplasmático juncional (jRS), também descrito como cisternas terminais ou subsarcolemais que representam estruturas semelhantes a panquecas próximas aos túbulos T e provavelmente preenchida com calsequestrina (CSQ); e 2) o retículo sarcoplasmático não-juncional ou livre (fRS), consistindo em uma rede compoendo a maior parte da membrana do RS que circunda as miofibrilas (e também mitocôndrias), onde estão presentes as bombas de Ca^{2+} que transportam o Ca^{2+} de volta para o interior do RS, conforme demonstrado na Figura 4 (LIBBY, 2018).

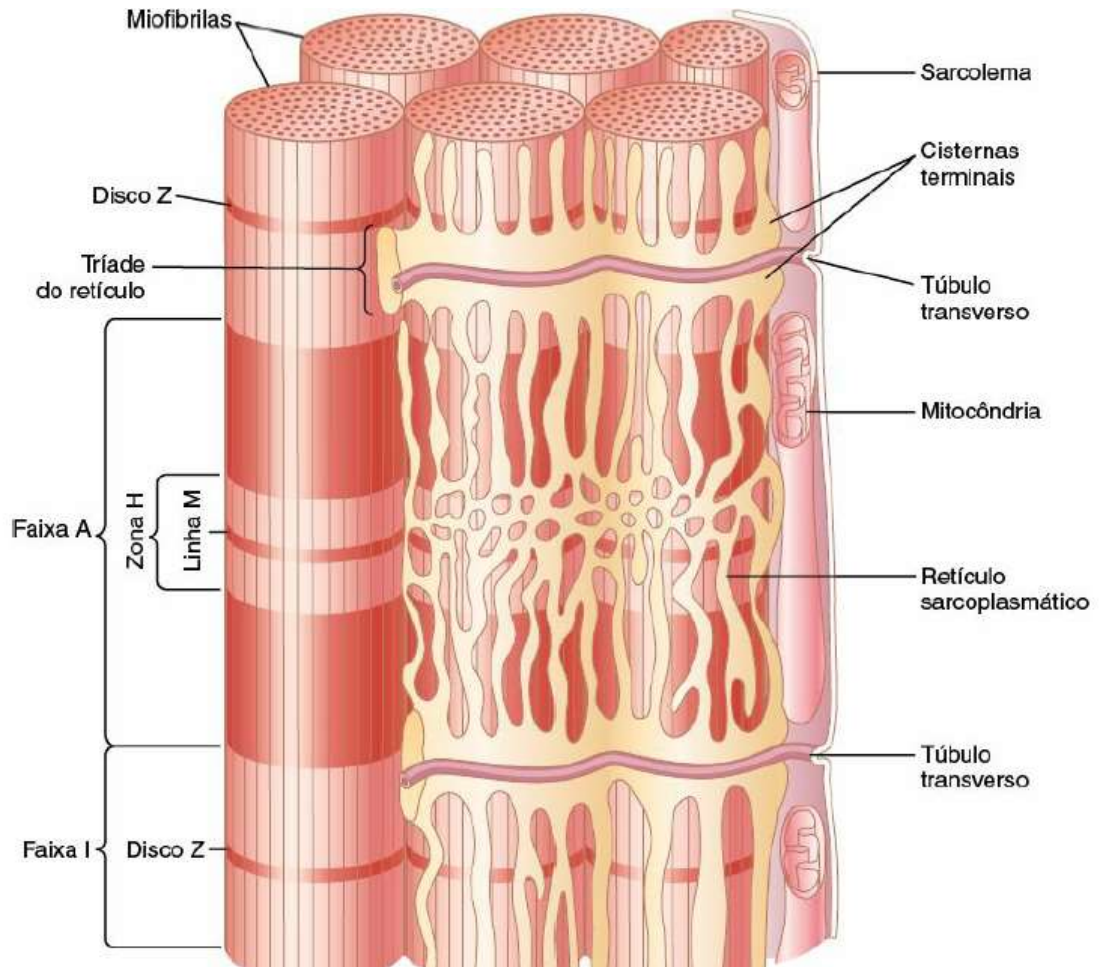


Figura 4. Estrutura das miofibrilas e sistema Túbulos T - Retículo Sarcoplasmático (RS). Fonte: Guyton e Hall, 2017.

O local de justaposição entre a membrana do RS, especificamente do jRS ou cisternas terminais, e a membrana do sarcolema, particularmente onde encontram-se os túbulos T, constitui a díade cardíaca, na qual ambas as estruturas estão postas frente-à-frente com um pequeno espaço (de aproximadamente 15 nm) entre elas, o qual é denominado fenda diádica. Nesta região, ocorrem as interações funcionais entre as duas membranas justapostas com a liberação de íons Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem, presentes no sarcolema e os receptores de ryanodina (RyRs) no jRS. Os RyRs presentes no coração são compostos por quatro subunidades codificadas pelo gene RyR2. Estes canais são ativados pelo Ca^{2+} que flui a partir de canais de Ca^{2+} do tipo L e promovem a liberação maciça de Ca^{2+} para o citoplasma. Ambos os canais, então, geram corrente de influxo de Ca^{2+} e aumentam a concentração deste íon no citoplasma, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (EISNER, 2018).

Nos miócitos cardíacos encontram-se, ainda, os miofilamentos compostos por filamentos finos (actina) e grossos (miosina), assim como estruturas contráteis e

citoesqueléticas associadas. Os miofilamentos constituem a maquinaria contrátil destas células, convertendo estímulos químicos e elétricos em trabalho (atividade mecânica do coração). São formados por unidades repetidas denominadas sarcômeros que, quando observados em microscópio de polarização, formam a banda clara (I), região isotrópica composta por filamentos finos, a banda escura (A), anisotrópica, composta por filamentos grossos, e a banda H contida na banda A, que incorpora uma região mais densa central denominada banda M onde os filamentos grossos estão entrelaçados e conectados. Os sarcômeros são delimitados pelos discos Z que funcionam como ponto de ancoramento para os filamentos finos (Figura 5). O conjunto de miofilamentos, por sua vez, irá compor, as miofibrilas (AIRES, 2017).

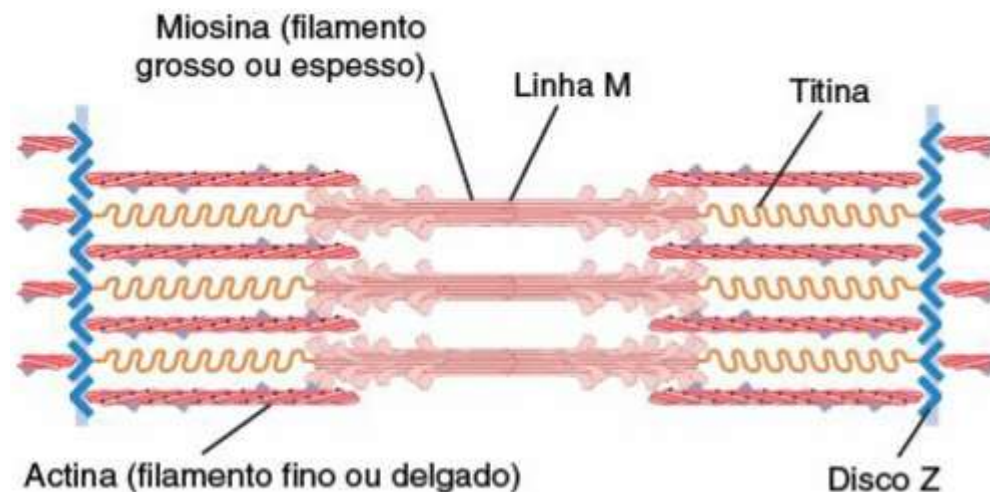


Figura 5: Modelo representativo de um sarcômero. Adaptado de: Guyton e Hall, 2017.

Os filamentos finos são compostos por actina globular (actina G) que se polimerizam para formar longos filamentos de actina (actina F) em forma de hélice. Estes conectam-se aos discos Z pela α -actina e estendem-se por cerca de $1\mu\text{m}$ em direção ao centro do sarcômero. Na porção final encontra-se a tropomodulina que atua junto a nebulina na regulação do comprimento dos filamentos finos. Nestes filamentos estão presentes ainda as proteínas tropomiosina (Tm) e troponina (Tn) que interage com o Ca^{2+} para a contração do músculo cardíaco. A Tm é uma proteína helicoidal longa e fina com duas vertentes que se estendem ao longo dos sulcos dos filamentos de actina. A Tn é um complexo composto por três subunidades: a subunidade C (TnC), sensível ao Ca^{2+} , a subunidade T (TnT) que é alongada e interage com a tropomiosina e a subunidade I (TnI) que liga a subunidade TnT à actina (Figura 6) (SWEENEY e HAMMERS, 2018).

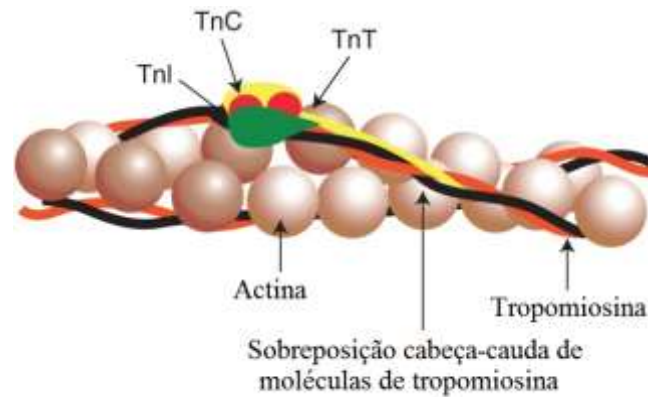


Figura 6: Modelo representativo dos miofilamentos finos. Adaptado de: Sweeney e Hammers, 2018.

Os filamentos grossos são compostos por aproximadamente 300 moléculas de miosina (PM = 450 kDa), proteínas motoras com uma região globular e uma haste (ou cauda) helicoidal que interagem com moléculas de miosina contíguas para formar as porções do filamento grosso partindo da linha M no centro do sarcômero em uma disposição bidirecional cauda-cauda (Figura 5). Conectando o filamento grosso à linha Z encontra-se a titina – se estende da linha Z até um pouco antes da linha M –, uma grande proteína constituída por um segmento inextensível de ancoragem e um segmento elástico que permite o estiramento quando o sarcômero aumenta. A molécula de miosina é formada por duas cadeias pesadas cujas caudas entrelaçam-se terminando em duas cabeças globulares e duas cadeias leves por cadeia pesada (Figura 7). Ao sofrer hidrólise enzimática por ação da tripsina, a molécula de miosina divide-se em um fragmento de meromiosina leve (LMM) com peso molecular de aproximadamente 140 kDa formando a cauda e um fragmento de meromiosina pesada (HMM) com cerca de 340 kDa que, por sua vez, pode ser dividido em duas porções: subfragmento 2 (S2) que contém um resíduo de 50nm da cauda e o subfragmento 1 (S1) constituído pelo pescoço e cabeça globular que contém o local ativo para a hidrólise de ATP, onde são formadas as pontes cruzadas com a actina nos filamentos finos. As duas cadeias leves de miosina (MLC1 e MLC2) ligam-se a cadeia pesada na base do S1 ou no pescoço. MLC1 é também denominada cadeia leve alcalina ou essencial (ELC) e MLC2 cadeia leve fosforilável ou regulatória (RLC), ambas contribuem para a estabilização do filamento grosso (BERS, 2001).

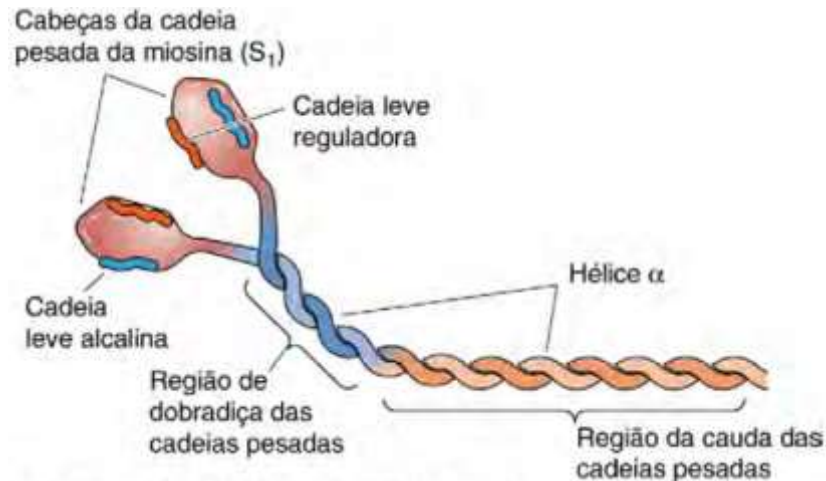


Figura 7: Modelo representativo da estrutura da miosina. Fonte: Boron, 2015.

4.3 ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO

O acoplamento excitação-contracção (AEC) é o processo pelo qual a excitação elétrica dos miócitos cardíacos leva a contracção do coração e promove a propulsão do sangue. O principal íon envolvido neste processo é o Ca^{2+} , de modo que o fluxo deste íon por organelas intracelulares e através do sarcolema, bem como a sua localização em microdomínios funcionais, pode explicar a ativação dos miofilamentos, que constituem a maquinaria contrátil fundamental para este processo. Assim, o Ca^{2+} que entra na célula durante o platô do potencial de ação através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L, também denominados receptores de dihidropiridinas (DHPR), gera a corrente de influxo de Ca^{2+} (I_{Ca}) através da membrana capaz de ativar os receptores de rianodina (RyRs). Os RyRs são canais para Ca^{2+} ativados em sua porção N-terminal pelo Ca^{2+} , encontrados e agrupamentos no jRS. Essa unidade funcional de acoplamento entre o sarcolema e o jRS, chamada de *couplon*, garante a rápida liberação de Ca^{2+} do lúmen do RS para o citosol, evento designado como CICR (do inglês, liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+}). Além disso, o espalhamento eletrotônico garante a ocorrência do PA, e com isso da CICR por toda a extensão da célula cardíaca de forma sincronizada. Dessa forma, a liberação maciça de Ca^{2+} do RS, é responsável por aumentar a concentração de Ca^{2+} livre no citosol, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, de modo que este pode passar do seu nível de repouso (menos de 10^{-7} M) para mais de 10^{-5} M, possibilitando a ligação das cabeças da miosina à actina para formar as pontes cruzadas e gerar a contracção do músculo cardíaco (Figura 8) (BORON, 2015).

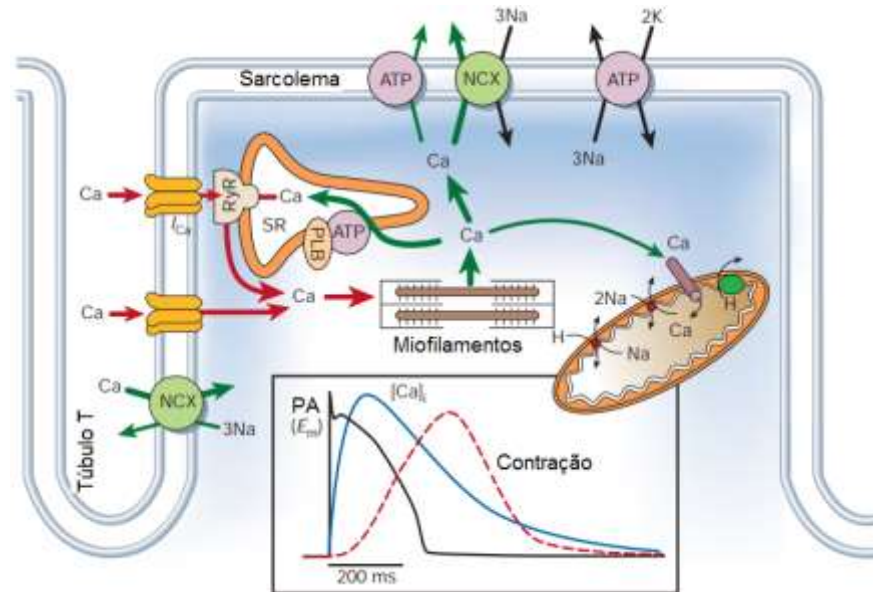


Figura 8: O transporte de Ca^{2+} durante o acoplamento excitação-contracção. Modificado de: Bers, 2002.

Quando a concentração de Ca^{2+} no citoplasma, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, é baixa o complexo Tn-Tm impede às interações entre a actina e a miosina, de modo que esta interação só é possível quando o Ca^{2+} é liberado do lúmen do RS através dos RyRs elevando a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e permitindo a interação deste íon aos terminais amino da subunidade TnC da troponina, que desloca o filamento de Tm, a partir de mudanças conformacionais geradas na subunidade TnI e transmitidas para a subunidade TnT. Este deslocamento da Tm expõe os sítios de ligação da actina e permitem a forte ligação desta com a miosina para formar as pontes cruzadas, gerando a força que desloca a cabeça da miosina em direção ao centro do sarcômero na denominada ação de catraca (por cerca de 10 nm) o que puxa os filamentos finos resultando no encurtamento do sarcômero durante a contracção muscular. Esta interação deve ocorrer no estado de alta energia após a hidrólise do ATP em ADP e P_i , formando o complexo miosina-ADP- P_i com alta afinidade para a actina. Do mesmo modo, a fosforilação da subunidade TnI e a ligação de uma molécula de ATP à miosina leva a rápida dissociação da actina (SWEENEY e HAMMERS, 2018).

Neste sentido, duas situações podem alterar a força de contracção do coração: alterações no transiente citosólico de Ca^{2+} , que representa as modificações transitórias locais da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, e alterações na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , que, em parte, é regulada pelo estiramento dos miofilamentos durante o enchimento diastólico, que leva a uma interação mais robusta entre os filamentos de actina e miosina, conforme sugere a lei de regulação intrínseca do coração conhecida como Lei de Frank-Starling. A sensibilidade dos

miofilamentos ao Ca^{2+} é, ainda, reduzida por acidose, aumento das concentrações de íons fosfato e Mg^{2+} , sendo aumentada por cafeína e drogas inotrópicas (BERS, 2002).

Para que o relaxamento do músculo cardíaco ocorra é necessário que a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seja reduzida, fazendo com que o Ca^{2+} se dissocie da troponina, impedindo a ocorrência das pontes cruzadas. Diversas proteínas transportadoras estão envolvidas na redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a saber: Ca^{2+} -ATPase do RS (SERCA), trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ do sarcolema, Ca^{2+} -ATPase do sarcolema e o transportador de Ca^{2+} mitocondrial, sendo os dois primeiros os mais relevantes e por isso os únicos abordados com mais profundidade neste referencial teórico (BORON, 2015).

A Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) é uma P2-ATPase que transporta o Ca^{2+} do citoplasma para o interior do RS. Característico das P-ATPases, esta proteína é composta por quatro domínios principais: um core composto por segmentos transmembrana (M) e três domínios citosólicos, que incluem um domínio de fosforilação (P) e um domínio fosfatase (A) que se conectam ao M e um domínio de ligação ao nucleotídeo (N). Para a atividade da SERCA, inicialmente deve ocorrer a ligação de dois íons Ca^{2+} em locais específicos de alta afinidade na proteína, num momento denominado estado conformacional E1. Posteriormente deve haver a ligação de ATP-Mg ao domínio N que gera mudança conformacional e aproxima N de P, o que possibilita a transferência de um grupo fosfato para o resíduo aspartil, que forma um intermediário de alta energia responsável por mudar a conformação da bomba para um estado E2 no qual os locais de ligação do Ca^{2+} estão voltados para o interior do RS e apresenta baixa afinidade para o Ca^{2+} permitindo que este seja liberado para o lúmen do RS. A seguir íons H^+ ligam-se à SERCA e o grupo fosfato se desassocia. A seguir, os H^+ são liberados no citoplasma e a Ca^{2+} -ATPase retorna para o estado E1 (Figura 9). Um importante mecanismo para a regulação desta Ca^{2+} -ATPase é o controle mediado pelo inibidor endógeno fosfolambam (PLB), uma proteína altamente expressa no coração e presente na superfície da membrana do RS, que é capaz de reduzir a afinidade da SERCA para o Ca^{2+} , de modo que a sua atividade catalítica deve ocorrer somente quando o PLB é fosforilado pelas proteínas cinases dependentes de AMPc ou calmodulina (PKA ou CAMKII, respectivamente) (AIRES, 2017).

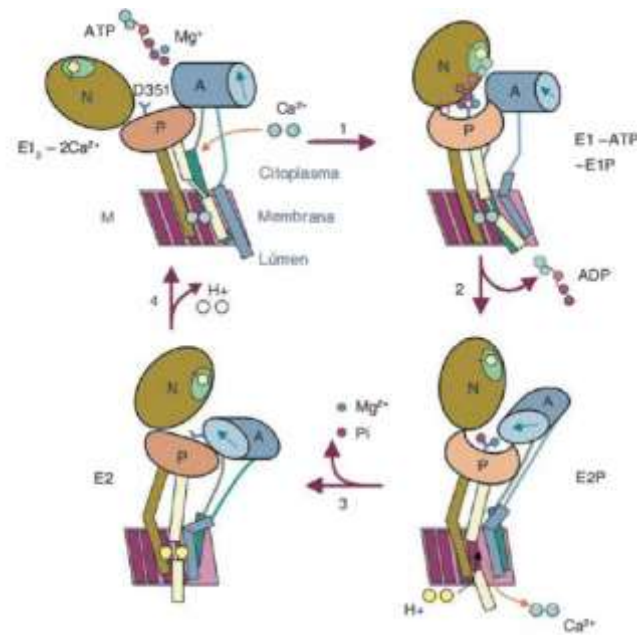


Figura 9: Esquema do ciclo catalítico da Ca^{2+} -ATPase. Fonte: AIRES, 2012.

O trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), por sua vez, está localizado no sarcolema e é um antiportador de íons Na^+ e Ca^{2+} , na proporção de 3:1 respectivamente. A atividade desta proteína transportadora é importante para a redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante o relaxamento do músculo cardíaco utilizando a energia do gradiente eletroquímico do Na^+ para gerar força motriz para o transporte do Ca^{2+} . Assim, o NCX contribui para a repolarização da membrana dos cardiomiócitos, bem como exerce influência sobre a duração do potencial de ação. A isoforma expressa no coração de mamíferos é a NCX1.1 que se constitui por dez segmentos transmembranares. Além disso, pode funcionar de modo reverso quando a $[\text{Na}^+]_i$ é alta e favorece a entrada de Ca^{2+} , gerando uma $I_{\text{Na/Ca}}$ de saída (SHATTOCK *et al.*, 2015).

4.4 O POTENCIAL DE AÇÃO CARDÍACO E SUAS BASES IÔNICAS

A excitabilidade celular é mais atualmente compreendida como a capacidade das células de desenvolver uma resposta celular frente a um estímulo que leve à alteração da voltagem transmembrana. Algumas dessas células como neurônios, células musculares e células glandulares secretoras desencadeiam um perfil típico da alteração da voltagem da membrana que é conhecido como potencial de ação, uma vez que a sinalização elétrica leva a uma ação celular, como a contração no caso de células musculares ou à liberação de neurotransmissores como para as células nervosas. As bases celulares e iônicas que possibilitam tal padrão de resposta são derivadas das propriedades elétricas passivas e ativas da membrana plasmática:

1- Em primeiro lugar, a membrana determina uma barreira à passagem de soluto entre os meios intra e extracelulares. Essa barreira, no entanto, não é perfeita de modo que as partículas têm uma mobilidade ao longo da espessura da membrana. À capacidade da membrana de permear partículas sem alterar sua estrutura interna, dá-se o nome de permeabilidade. No caso dos íons, uma outra grandeza relaciona a permeabilidade, carga e concentração média do íon na membrana, e é denominada condutância (G). O inverso da condutância é denominado resistência (R). Essa distinção é importante para discutirmos as alterações nas condutâncias aos íons, que são a base iônica para a geração do PA.

2- A membrana funciona como um capacitor elétrico. Essa propriedade passiva da membrana diz respeito à sua capacidade de armazenar cargas elétricas, e é denominada capacitância. De forma equivalente, a capacitância (C) pode ser entendida como a capacidade de resistir à mudança da diferença de potencial transmembrana (ΔV) frente a um acúmulo de cargas (ΔQ), de modo que $C = \Delta Q / \Delta V$. A capacidade da membrana armazenar carga é proporcional à área da membrana e inversamente proporcional à sua espessura. Além disso, ela depende do grau de polarizabilidade do meio isolante, uma constante que é conhecida como constante dielétrica.

3- A membrana possui estruturas que garantem condutância aos íons. Essas estruturas são os poros, canais iônicos e proteínas transportadoras. Além disso, o fluxo de íons (corrente iônica) através dessas estruturas é termodinamicamente favorável (ou seja, ocorre no sentido de maior estabilidade termodinâmica, ou de redução da energia livre do sistema), a favor do gradiente eletroquímico para cada íon. Um gradiente eletroquímico reflete um par de gradientes químico (representado pela diferença de concentração para um determinado íon através da membrana) bem como um gradiente elétrico (dada a propensão de movimentação de uma carga frente ao campo elétrico da membrana). É importante observar que estamos discutindo um gradiente de energia ao longo da espessura da membrana, e dessa forma, equivalentemente, estamos discutindo a atuação de duas forças, elétrica e química. No estado de equilíbrio, o fluxo iônico resultante é zero, e nesse caso, os vetores de força, elétrica e química, se anulam. Nesse ponto, tem-se o potencial de membrana para o qual o fluxo iônico é zero, denominado potencial de equilíbrio do íon (E_{ion}), que é dado pela equação de Nernst: $E_{ion} = (RT/zF) \ln C_i/C_o$. Nessa equação, C_i e C_o são as concentrações do íon dentro e fora da célula, R é a constante molar dos gases ideais, T é a temperatura (em Kelvin), z é a carga líquida do íon e F é constante de Faraday, a carga molar em Coulomb/mol. Em eletrofisiologia é comum representar a força movente de um íon em unidades de voltagem

($E_m - E_{ion}$). Ainda que fisicamente impreciso, isso permite relacionar o potencial de membrana e/ou corrente iônica medidos, com o potencial de equilíbrio do íon e a condutância da membrana por meio de uma relação linear, a lei de Ohm, na forma: $(E_m - E_{ion}) \cdot G_{ion} = I_{ion}$. Finalmente, considerando que a membrana possui uma condutância aos íons, é necessário um mecanismo para garantir a manutenção do gradiente de concentração. Esse papel é cumprido pela pelas bombas da membrana plasmática, notoriamente a $Na^+/K^+-ATPase$ (CURI e PROCÓPIO, 2017) (AIRES, 2018).

Tendo em vista o exposto acima, fica evidente que o PA é determinado por oscilações nas G_{ions} , que geram correntes iônicas, principalmente de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , a favor do seu gradiente eletroquímico. Entretanto, variações de isoforma de canais e sua magnitude relativa determinam morfologias diferentes do PA, dependendo da região do coração. Desse modo, no coração, o miocárdio atrial e ventricular e fibras de Purkinje apresentam um PA “rápido” com cinco fases: fase 0 (despolarização), fase 1 (repolarização inicial), fase 2 (platô), fase 3 (repolarização rápida final) e fase 4 (potencial de repouso). Enquanto um PA “lento” pode ser observado no NSA e NAV, onde é possível verificar uma fase 0 (despolarização), fase 3 (repolarização) e fase 4 (repouso) (AIRES, 2018), figura 10. A somação espacial e temporal dos PAs de diferentes regiões confere o perfil elétrico da excitabilidade cardíaca, representada pelo eletrocardiograma, também apresentado na figura 10.

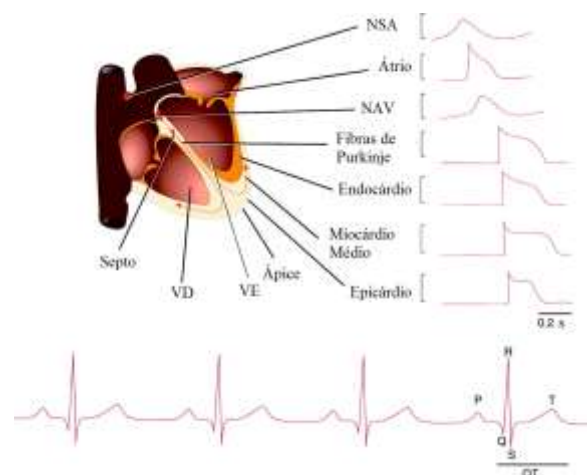


Figura 10: A atividade elétrica do coração (painel inferior) e as diferentes formas de potencial de ação (painel superior direito) registrados em diferentes regiões do coração. Adaptada de: Nerbonne, 2005.

Considerando o PA, durante a fase 0 do PA rápido a principal corrente despolarizante é a corrente rápida de Na^+ ($I_{Na,R}$) que flui através de canais de Na^+ dependentes de voltagem (Nav), os quais são ativados quando o potencial de membrana atinge um limiar de voltagem,

em torno de -55 mV. O influxo de Na^+ causado pela abertura destes canais despolariza a membrana levando a ativação de mais canais de Na^+ em um processo de feedback positivo, que culmina em uma rápida despolarização (1-2 ms). A despolarização também determina a inativação dos Nav. A partir do pico do PA, quando a taxa de alteração da V_m é zero, inicia-se a fase 1 (da repolarização inicial), guiada pela inativação dos Nav concomitante com a abertura dos canais para K^+ , que tem cinética mais lenta que os Nav. Uma repolarização inicial rápida e transitória ocorre devido à ativação de uma corrente transitória de saída de K^+ (I_{to}). Em seguida observa-se a fase 2 (platô), na qual a repolarização é freada devido à baixa condutância à corrente de potássio retificadora de entrada (K_{ir}) e pela presença da corrente de cálcio do tipo L ($I_{Ca,L}$) que é ativada durante a despolarização e é o principal responsável pelo acoplamento excitação-contração. Vale ressaltar que embora pequena (~1% do pico da $I_{Na,R}$) a $I_{Na,L}$, também pode contribuir para a fase de platô.

A repolarização prossegue à medida que os canais de Cav se inativam, e o efluxo de K^+ leva a repolarização final da célula, ou fase 3. Vários tipos de correntes de K^+ contribuem para a repolarização do potencial de ação cardíaco, as quais incluem correntes de K^+ dependentes de voltagem (K_v) e retificadoras de entrada (K_{ir}). Esta última tem grande contribuição, na fase 4, por fim, para estabelecer o potencial repouso da célula. (NERBONNE, 2005).

É importante destacar as propriedades gerais do PA: primeiramente, ele é uma resposta com amplitude pouco variável para uma mesma célula frente à estímulos repetidos. Essa resposta, dita tudo ou nada, é determinada pelas alterações canônicas das condutâncias aos íons descritas. Segundo, o PA só é desencadeado frente a um estímulo suficientemente forte para atingir o limiar. Terceiro, como mencionado vários canais, possuem inativação. Dessa forma, a célula fica refratária a desencadear um novo PA até que esses canais se recuperem da inativação. Essa refratariedade é absoluta logo após a ocorrência de um PA, mas com a recuperação progressiva da dos canais em sair do estado inativado, ela se torna relativa à ocorrência de um novo estímulo suficientemente forte para atingir um novo limiar, mais despolarizado.

Nas células nodais, no entanto, como não há uma expressão significativa de canais Nav funcionais, o que torna esses potenciais de ação mais lentos que nos miócitos atriais e ventriculares e nas fibras de Purkinje. Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, Cav, são os responsáveis pela despolarização na fase 0 do potencial de ação. Esses canais de Cav no

coração apresentam dois componentes que formam a corrente de Ca^{2+} do tipo T ($I_{\text{Ca,T}}$) ativada em potenciais mais hiperpolarizados que se inativam rapidamente e a corrente do tipo L ($I_{\text{Ca,L}}$) que contribui de modo mais significativo para a despolarização do PA nos NSA e NAV. $I_{\text{Ca,L}}$ ativa-se e inativa-se muito lentamente. Os canais Kv e Kir também atuam na repolarização das células nodais, nas quais não é possível distinguir uma fase de platô, além disso a corrente I_{K1} atua na despolarização diastólica, visto que estas células também não apresentam uma fase de repouso constante como o observado no PA rápido (AIRES, 2017).

4.5 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO Nav1.5

O início do PA nos cardiomiócitos e Fibras de Purkinje, como visto anteriormente, decorre principalmente pela abertura de canais de Na^+ dependentes de voltagem (Nav) o que gera uma corrente de entrada rápida de Na^+ ($I_{\text{Na,R}}$), a qual tem um papel crucial para a fase de despolarização no PA e a propagação do impulso elétrico. Além disso, a abertura de uma pequena fração dos Nav contribui para a manutenção do platô do PA. A isoforma predominante de canais de Na^+ nos cardiomiócitos é o Nav1.5. Estes canais são compostos por uma subunidade α e uma ou duas subunidades β auxiliares. A subunidade α é constituída por quatro domínios homólogos (DI-IV), cada um formado por seis segmentos transmembranares (S1-S6), conforme representado na Figura 11 (AROMOLARAN, CHAHINE e BOUTJDIR, 2017).

Nas células musculares do coração, a subunidade α dos Nav é codificada pelo gene *SCN5A*. A ativação dependente de voltagem ocorre quando o segmento S4, que contém aminoácidos carregados positivamente, é ativado por despolarização e move-se em relação a outros segmentos, fazendo girar a região S1-S4, o que viabiliza o influxo da corrente de Na^+ , através do poro do canal formado pelos segmentos S5 e S6 e alça P. Essa corrente deve, então, propagar-se despolarizando as regiões subsequentes da membrana, resultando em rápida e intensa despolarização da célula. A alta seletividade deste canal para íons Na^+ deve-se à presença de resíduos de ácido aspártico, glutâmico, lisina e alanina nas alças P dos quatro domínios. As subunidades β , por sua vez, têm um papel importante na regulação da ativação e inativação rápidas, bem como da recuperação para o estado ativado destes canais (DETTA, FRISSO e SALVATORE, 2015).

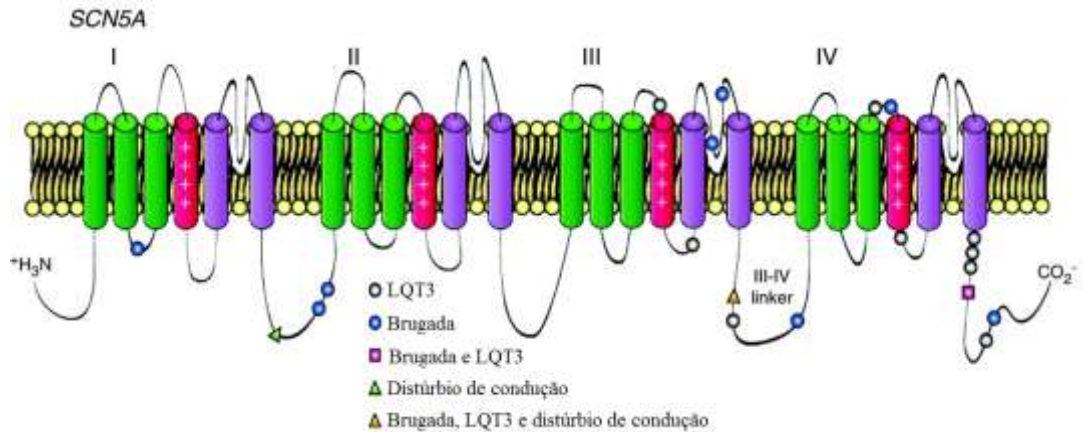


Figura 11: Representação esquemática da subunidade α de Nav1.5 e das principais mutações em SCN5A. Adaptado de: Nerbonne e Kass, 2005.

A inativação do Nav1.5 está relacionada com dois componentes cinéticos distintos, um rápido e um lento. A inativação ocorre quando o ligante, constituído pelos aminoácidos isoleucina-fenilalanina-metionina (IFM), localizado na face interna da membrana, entre os domínios DIII e DIV, ancora-se ao poro aberto para ocluir o canal impedindo a passagem de corrente. A inativação lenta, por outro lado, deve-se a mudanças na conformação do canal proteico (CHADDA *et al.*, 2017).

Assim, Chadda *et al.* (2017), apresentaram um modelo de transição dos estados biofísicos do Nav1.5, como apresentado na figura 12, o qual deve passar pelos estados fechados (C_0 - C_3) para o estado aberto (O) de modo dependente de voltagem. O início da abertura desses canais despolariza as regiões subsequentes da membrana, levando a abertura de mais canais, aumentando ainda mais a G_{Na} até que se atinja a máxima despolarização, na fase 0 do potencial de ação. A maior parte desses canais transitam rapidamente, em 1 a 2 ms, para o estado inativado devido à mudança na voltagem da membrana para valores mais positivos, fazendo com que os canais transitem para um estado inativado (I_1 - I_2). A presença do componente de inativação lenta, com mecanismos de inativação distintos, conforme supramencionado, faz com que seja possível observar uma corrente de mais duradoura com aproximadamente 1% do pico de $I_{Na,R}$. Essa relação entre a transição dos estados e a presença dos componentes de inativação rápida e lenta ao longo do PA cardíaco pode ser observada na Figura 13A.

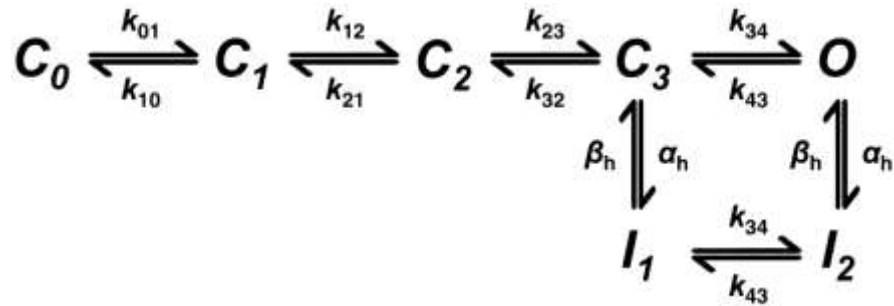


Figura 12: Diagrama representativo da transição de estados do canal de Na^+ dependente de voltagem.

Fonte: Chadda *et al.*, 2017.

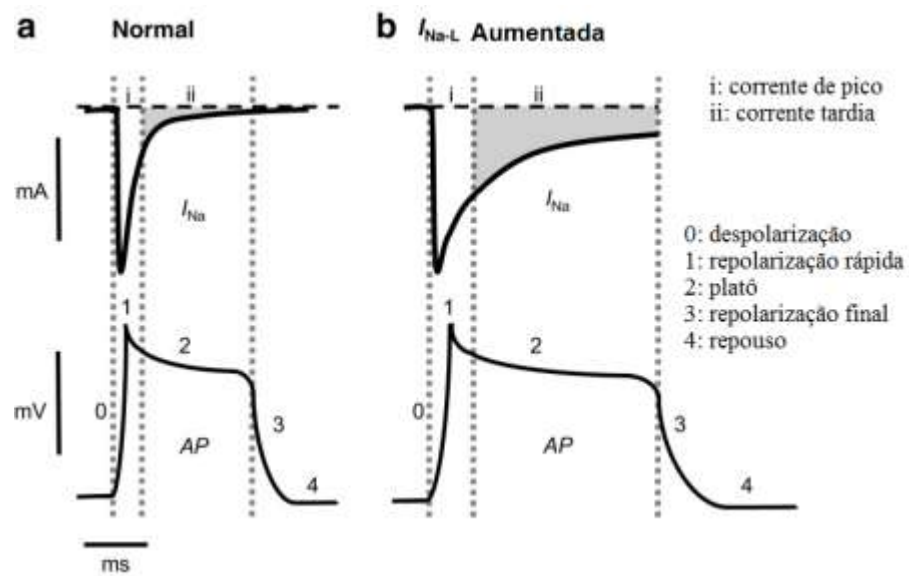


Figura 13: Relação entre os picos das correntes rápida e tardia de Na^+ . Os gráficos apresentam a transição dos estados biofísicos do $\text{Nav}1.5$ ao longo do PA cardíaco normal (A) e um PA na presença da $I_{\text{Na-L}}$ prolongada. Adaptado: Chadda *et al.*, 2017.

Thull *et al.* (2020) apresenta o modelo de estados conformacionais do $\text{Nav}1.5$, Figura 14, pelo qual as comportas de ativação devem transitar dos estados fechado (C_1 , C_2 , C_3 e C_4) para o estado aberto (O) e para o estado inativado (I). O modelo apresentado na imagem demonstra que durante a transição de C_1 para C_4 ocorre um movimento de DI a DIII que se ativam e permitem a passagem de corrente através do canal. Com a ativação de DIV o canal é completamente ativado, passando para o estado aberto (O). Do estado ativado, O , os canais passam para o estado inativado (I) devido ao movimento da partícula de inativação (IFM), que oclui o poro do canal. Após a inativação pela oclusão do poro, os domínios DI , DII e DIII retornam para a sua forma inativa (o que pode ser observado entre CI_3 e CI_1) até que DIV é

inativado e o canal retorna para o estado C1 onde a partícula de inativação IFM desobstrui o poro do canal, durante o potencial de repouso da membrana, na diástole cardíaca. O modelo mostra ainda que existem caminhos intermediários da transição de estados desses canais (THULL *et al.*, 2020).

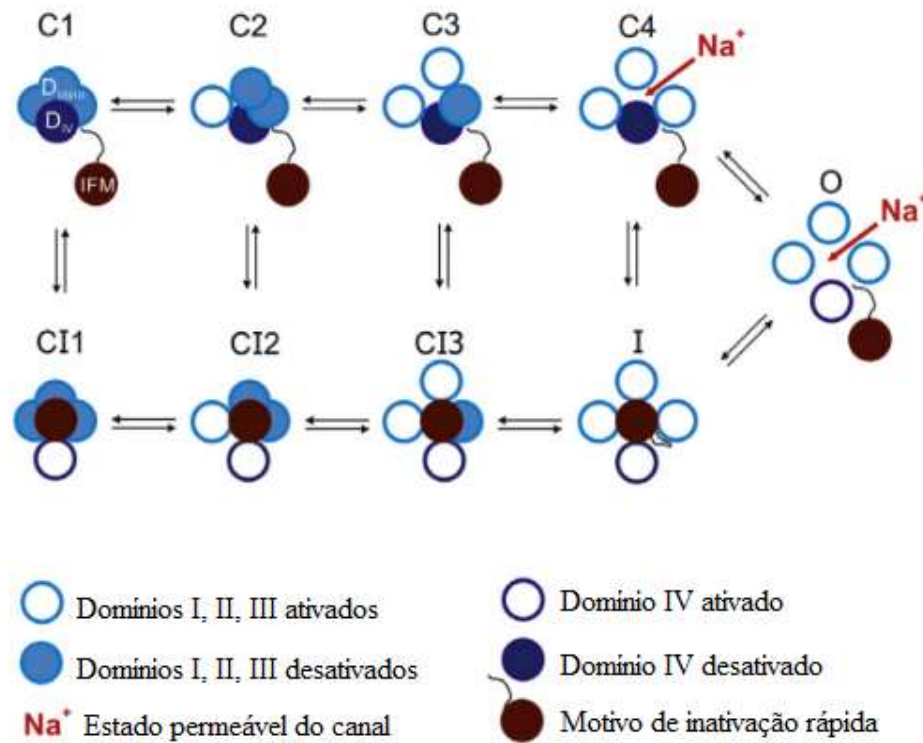


Figura 14: Modelo representativo dos estados conformacionais das comportas de um canal de sódio. Onde C1-C4 corresponde aos estados fechados (do inglês *closed*); O representa o estado aberto (do inglês *open*); I indica a inativação rápida (do inglês *inactivation*) e CI1-CI3 expressão o estado fechado com a partícula de inativação ligada. Fonte: Thull *et al.*, 2020.

Apesar da grande maioria dos Nav1.5 apresentar uma rápida transição do estado aberto para o estado inativado, uma pequena fração desses canais pode apresentar uma menor frequência de inativação, o que origina a corrente de Na^+ tardia ($I_{\text{Na,L}}$) durante a fase de platô do PA. Em condições fisiológicas a $I_{\text{Na,L}}$ é muito pequena quando comparada ao pico da $I_{\text{Na,R}}$ observada durante a despolarização (entre 0,5-1% da $I_{\text{Na,R}}$), mas representa um elemento importante para a ocorrência de arritmias com ganho de função, por exemplo a SQT3. Como a fase de platô é regulada por um estreito balanço entre as correntes de entrada e saída de íons, uma pequena alteração nesse equilíbrio pode ser marcante para a morfologia e duração do PA (AIRES, 2018).

4.6 ARRITMIAS CARDÍACAS

As arritmias cardíacas podem ser causadas por: distúrbios da formação do impulso; condução anormal do impulso ou por uma combinação de ambos. Os distúrbios na formação do impulso caracterizam-se por uma formação inapropriada do impulso no NSA, marcada por disparos rápidos ou lentos; ou disparo de marca-passos ectópicos quando o NSA é impedido de alcançar o potencial limiar para a despolarização ou quando um marca-passo ectópico acelera a sua frequência de disparo assumindo o controle do ritmo cardíaco. Esta categoria de distúrbio integra o automatismo normal e anormal e a atividade deflagrada (EADs e DADs), que serão descritos com maior aprofundamento adiante. Os distúrbios da condução do impulso, por sua vez, incluem o retardo e o bloqueio da condução desencadeando bradiarritmias, quando o impulso é bloqueado (por exemplo bloqueios atrioventriculares – BAV) e taquiarritmias, quando o retardo ou bloqueio levam à excitação reentrante. Os distúrbios combinados, por sua vez, incluem interações entre focos automáticos e entre automaticidade e condução (KRIEGER, 2008).

Assim, a condução anormal do impulso abarca as diferentes formas de bloqueio da condução, com e sem reentrada. Sabe-se que, em um ciclo cardíaco normal o impulso gerado no NSA deve seguir pelos tecidos de condução e junções intercelulares até que todo o coração seja ativado. Além disso, tendo em vista que após a despolarização as células encontram-se em um PRA, não pode haver um caminho retrógrado e o impulso deve cessar. No entanto, em um circuito reentrante fibras que não haviam sido despolarizadas durante a condução inicial recuperam a excitabilidade e disparam antes que o impulso cesse no final de um ciclo, reexcitando áreas adjacentes que acabaram de recuperar-se da refratariedade. Várias formas de reentrada podem ser observadas no coração. A título de exemplo a reentrada anatômica, observada na Figura 15, é um modelo que apresenta vias separadas anatomicamente onde ocorre uma área de bloqueio unidirecional e uma via onde o impulso retorna para o seu ponto original (BERNE e LEVY, 2009).

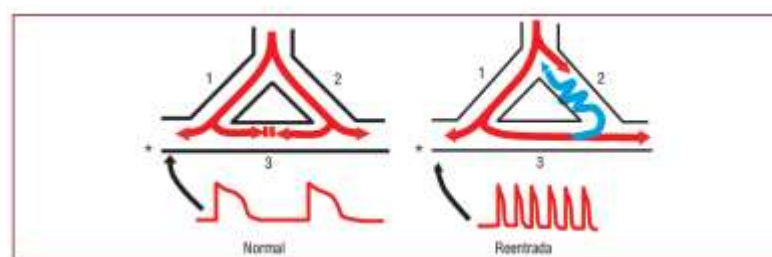


Figura 15: Mecanismo de reentrada anatômica. Fonte: Krieger, 2008.

O automatismo cardíaco normal, como descrito anteriormente, é mais proeminente no NSA devido a sua maior frequência de disparo em relação a outras estruturas com potencial para assumir a função de marca-passo cardíaco. (Padeletti e Bagliani, 2017). A despolarização diastólica ocorre durante a fase 4 do PA, quando o potencial de membrana encontra-se em torno de -65 mV. Assim, o automatismo anormal deve originar-se quando os potenciais diastólicos máximos encontrarem-se reduzidos, em aproximadamente -50mV, quando I_K e $I_{Ca,L}$ podem ser ativadas, estando relacionadas, por exemplo, com certos tipos de taquicardias atriais (como a produzida por digitálicos) (ROBINSON e NATTEL, 2017).

A atividade deflagrada é caracterizada por pós-despolarizações, que consiste em impulsos despolarizantes, desencadeados por potenciais de ação precedentes, impedindo a quiescência elétrica da célula e resultando em uma maior excitabilidade da membrana causada por corrente interna líquida positiva, superior à encontrada em condições fisiológicas, que disparam PA inapropriados. Como visto anteriormente, estas podem ocorrer após a completa repolarização do PA (fase 4), nas chamadas pós-depolarizações tardias (DADs) ou durante a fase 2 (platô) e fase 3 (repolarização final), as quais são denominadas pós-despolarizações precoces (EAD). As EADs ocorrem durante fase 2 ou fase 3 do PA, decorrente de eventos que aumentam as cargas positivas no interior da célula mantendo a membrana despolarizada, podendo estar relacionadas a condições genéticas ou adquiridas como na síndrome do QT longo e a insuficiência cardíaca, respectivamente. As DADs ocorrem após a repolarização da membrana devido à sobrecarga de Ca^{2+} , que resulta no surgimento de correntes despolarizantes transitórias, aumentando a $[Na^+]_i$ que faz com que efluxo de Ca^{2+} pelo trocador Na^+/Ca^{2+} seja reduzido (LIBBY *et al.*, 2018) (THULL *et al.*, 2020).

As DADs são decorrentes da ativação espontânea de correntes de influxo de Ca^{2+} , que podem estar associadas a mutações nos canais liberadores de Ca^{2+} do RS, os RyRs, ou proteínas ligantes de Ca^{2+} , como a calsequestrina. Conforme descrito anteriormente, os RyRs representam a via de liberação de Ca^{2+} do RS mediado pelo Ca^{2+} que flui para o interior da célula através dos canais de Ca^{2+} do tipo L presentes no sarcolema. Do mesmo modo, estes receptores devem fechar-se durante a diástole para permitir que o Ca^{2+} seja recaptado para o lúmen do RS através da Ca^{2+} -ATPase. Deste modo, mutações nos genes que codificam RyR2 ou a calsequestrina tendem a levar à liberação espontânea de Ca^{2+} para o citoplasma durante a diástole que resulta em taquiarritmias desencadeadas por DADs. Pode ser ainda que estas arritmias estejam relacionadas a menor afinidade entre RyR2 mutado e FKBP-12.6, uma proteína que tem a função de estabilizar estes receptores. Outro mecanismo relacionado as

DADs é a regulação para cima da sinalização de Ca^{2+} dependente de IP_3 em processos como isquemia, danos de reperfusão e falência cardíaca. Em síntese, o aumento focal da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ leva a propagação de uma onda de Ca^{2+} que despolariza a membrana numa DADs, regulando para cima também a $I_{\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}}$, pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, bem como regulando para baixo a corrente retificadora interna, I_{K1} , principal responsável pela repolarização diastólica (fase 3) do PA rápido (LIBBY *et al.*, 2018).

As EADs estão relacionadas a maior duração do PA com retardo na repolarização e prolongamento da fase 2 (platô) associada a taquiarritmias ventriculares observadas em diversos tipos de arritmias congênitas e adquiridas, como é o caso da síndrome do QT longo do tipo 3 (SQTL3) a qual está relacionada ao risco potencial de morte súbita cardíaca. Neste caso o prolongamento PA leva também a abertura de canais Ca^{2+} do tipo L, causando a liberação espontânea de Ca^{2+} do RS, que resulta no aumento do Ca^{2+} livre no citoplasma despolariza o potencial de membrana por correntes de Ca^{2+} e correntes resultantes do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, o que resulta em uma EADs que pode propagar-se iniciando uma taquicardia (WIT, 2018).

Circunstâncias que levam a um aumento da $I_{\text{Na,L}}$, conforme demonstrado pela curva da corrente de Na^+ na Figura 13B, promovem um prolongamento da fase de platô do PA. Esses mecanismos podem ser gatilho para diversos eventos pró-arrítmicos, os quais incluem pós-despolarizações precoces (EADs) e pós-despolarizações tardias (DADs). A $I_{\text{Na,L}}$ persistente pode, por exemplo, estar relacionada a mutações no gene *SCN5A* associada a Síndrome do QT longo do tipo 3 (SQTL3), Síndrome de Brugada (SBr) e a defeitos de condução. Diversos estudos têm sido direcionados para a identificação de mutações em diferentes regiões do $\text{Nav}1.5$. Um modelo representativo da relação entre essas mutações no gene que codifica a subunidade α do $\text{Nav}1.5$ e as arritmias congênitas SQTL3, SBr e distúrbios da condução é apresentado na figura 11 (NERBONNE e KASS, 2005).

Na SQTL3 a corrente de sódio tardia ($I_{\text{Na,L}}$) está relacionada a falha na inativação do canal de Na^+ levando ao prolongamento do potencial de ação que pode desencadear taquicardia ventricular polimórfica. Os eventos cardíacos associados a essas arritmias ocorrem, geralmente, em repouso ou durante o sono e independente de estresse emocional. O tratamento considera o uso de bloqueadores de canais de sódio da classe I, tal como a lidocaína (Pérez-Riera *et al.*, 2018). Assim também, o prolongamento da $I_{\text{Na,L}}$ (ganho de função) está associado à formação de corrente despolarizante durante o platô do PA na

insuficiência cardíaca, que resulta em atividade desencadeada (EADs) e pode, também, ser gatilho para reentrada, pois prolonga a refratariedade e produz bloqueio unidirecional, levando, de outro modo a “perda de função” do pico da $I_{Na,R}$. Deste modo, o prolongamento da $I_{Na,L}$ em condições patológicas aumenta a quantidade de Na^+ no meio intracelular, fazendo com que o $[Ca^{2+}]_i$ também aumente, durante o platô, pela ação trocador Na^+/Ca^{2+} , o que resulta em arritmias pelo mecanismo de DADs e redução da função diastólica, visto que o músculo é impedido de relaxar. Assim, o prolongamento da $I_{Na,L}$ na isquemia e carga de Ca^{2+} adicional eleva a pressão diastólica no ventrículo esquerdo e causa angina devido a incompatibilidade da oferta e demanda de oxigênio (MAKIELSKI, 2015).

4.6.1 SÍNDROME DO QT LONGO DO TIPO 3 (SQTL3)

A nível molecular, como visto anteriormente, as diferenças do potencial elétrico através das membranas celulares decorrem da abertura e fechamento de diferentes canais iônicos, de modo que alterações funcionais nesses canais são fatores relevantes em muitas doenças cardíacas. A corrente de sódio rápida ($I_{Na,R}$) é essencial para a despolarização inicial durante os potenciais de ação nos cardiomiócitos. Essa corrente é gerada principalmente pela abertura dos $Nav1.5$ é predominante no coração. O gene que codifica a subunidade α desse canal é o *SCN5A*. Essa subunidade interage de modo importante com subunidades β acessórias (*SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B* e *SCN4B*). Assim, modificações na regulação, seja por diferentes mecanismos de fosforilação ou por meio de mutações nos genes que codificam as subunidades α e β auxiliares do $Nav1.5$ determinam mudanças nas características biofísicas do canal e estão associadas à arritmias cardíacas congênitas, como a Síndrome do QT longo do tipo 3 (SQTL3) (TFELT-HANSEN *et al.*, 2010).

Nesse sentido, o prolongamento da $I_{Na,L}$ leva a um maior influxo de Na^+ , aumentando a $[Na^+]_i$ e, conseqüentemente, o conteúdo de Ca^{2+} no citosol pela ação do NCX (atuando de modo reverso) e, posteriormente, a liberação de Ca^{2+} espontaneamente do RS, que eleva ainda mais a $[Ca^{2+}]_i$, interferindo na ativação das vias de transdução de sinal reguladas por Ca^{2+} e mecanismos de fosforilação de $Nav1.5$ em um ciclo de retroalimentação positiva. Essa cadeia de eventos pode ser promotora de arritmias mesmo em corações normais, mas uma SQTL3 causada pela $I_{Na,L}$ sustentada deve ter conseqüências mais pronunciadas na bradicardia, onde os PA já são mais prolongados, levando a uma maior probabilidade dos $Nav1.5$ serem ativados durante o PA e, portanto, das $I_{Na,R}$ e $I_{Na,L}$ serem mais pronunciadas. O aumento na

densidade de $I_{Na,L}$ pode resultar na ocorrência de EADs e/ou DADs, elevando o risco de arritmias ventriculares fatais (HORVÁT *et al.*, 2020).

No eletrocardiograma típico, este efeito pode ser visto pelo aumento do intervalo entre as ondas Q e T do traçado. Segundo Tfelt-Hansen *et al.* (2010), a SQT3 é preponderante entre os tipos de SQT, respondendo por ~95% das patologias associadas a mutações no gene SCN5A, seguida pelas SQT dos tipos 1 e 2 que estariam associadas principalmente a mutações em genes que expressam canais de K^+ responsáveis pela repolarização dos cardiomiócitos, e na maioria dos casos apresentando-se como herança autossômica dominante. A manifestação da SQT do tipo 3 ocorre principalmente durante o sono ou repouso e pode desencadear morte súbita cardíaca (MSC) (TFELT-HANSEN *et al.*, 2010).

Técnicas modernas permitiram a identificação de diversos genes responsáveis por mutações de ganho de função associados a alterações na amplitude, mudanças na dependência de voltagem e maior velocidade de recuperação da inativação da $I_{Na,R}$ e inativação mais lenta e mudança na dependência de voltagem do $Na_v1.5$ com aumento da $I_{Na,L}$, que se manifestam na SQT3 (HAN *et al.*, 2018).

Em termos farmacológicos, a ferramenta predominante em estudos eletrofisiológicos e na prática clínica para o controle de arritmias associadas a disfunções do Na_v , são os bloqueadores de canais de Na^+ , como a lidocaína e ranolazina, essa última foi considerada segura e eficaz pela agência de regulação americana, FDA, desde 2006, para tratamento de angina. A maioria desses fármacos são voltagem e uso dependentes, podendo atuar sobre a $I_{Na,L}$, mas parecem agir preferencialmente sobre a $I_{Na,L}$ o que torna promissora a busca por novos fármacos antiarrítmicos, seletivos para esse componente, que pode estar associado à SQT3. Além disso, são igualmente promissores os estudos para antiarrítmicos que atuem sobre outras isoformas de Na_v presentes no músculo cardíaco, como $Na_v1.8$ (HORVÁT *et al.*, 2020).

4.7 EUGENOL

O eugenol ou 4-alil-2-metoxifenol (Figura 16) pertence à classe dos fenilpropanóides, comumente obtido por hidrodestilação, destilação a vapor ou extração de Soxhlet (Kaufman, 2015). Apresenta consistência líquida e oleosa, coloração amarelo claro, sabor e aroma picante, pouco solúvel em água, mas solúvel em álcool, frequentemente usado como ingrediente em cosméticos e perfumes (Kamatou, Yermaak e Viljoen, 2012).

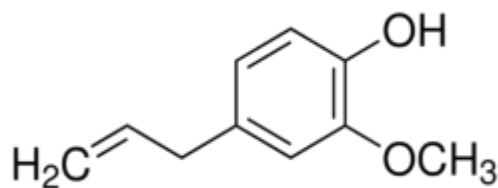


Figura 16 - Estrutura química do eugenol (C₁₀H₁₂O₂; 4-álil-2-metóxi-fenol). Fonte: (Geng *et al.*, 2007).

O eugenol é encontrado na composição de óleos essenciais (OE) obtido de diversas plantas, a saber: folha de louro (*Laurus nobilis* L.), pimenta-da-jamaica (*Pimenta dioica* (L.) Merr.), manjerição (*Ocimum sanctum* L.) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry). O cravo-da-índia, principal fonte comercial para extração de eugenol, é nativo das Ilhas Maluku, leste da Indonésia. Esta planta que pertence à família Mirtaceae é uma árvore de tamanho médio que atinge de 8 a 12 metros de altura. No Brasil, o cravo-da-índia é cultivado na região nordeste, principalmente no estado da Bahia, nas cidades de Valença, Ituberá, Taperoá, Camamu e Nilo Peçanha. O eugenol é o constituinte majoritário encontrado no OE extraído das folhas e botões florais secos (Cortés-Rojas *et al.*, 2014).

O eugenol é conhecido por apresentar diversas atividades farmacológicas, a saber: anestésico, atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antifúngica, antiparasitária e propriedades repelentes. Neste sentido, a ação antioxidante foi demonstrada por inibição do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e hidroxila de modo concentração dependente, a atividade antibacteriana foi detectada em várias cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas, a exemplo de *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae* e *Salmonella choleraesuis*. Quanto a atividade antifúngica o óleo essencial de cravo mostrou potencial em alterar a morfogênese de *Candida albicans*. Como antiviral apresenta atividade contra herpes. E como antiparasitário foi demonstrada ação *in vitro* sobre *Giardia lamblia*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonenses*, além do potencial antimalárico. O efeito anticarcinogênico estar relacionado às propriedades antiproliferativa e proapoptótica em alguns tipos câncer como câncer de mama humano, além disso, atua na prevenção de metástase e reduz o estresse oxidativo. A ação anti-inflamatória está relacionada a síntese de prostaglandinas e quimiotaxia de neutrófilos/macrófagos (RAJA *et al.*, 2015).

Em relação ao efeito do eugenol sobre o sistema cardiovascular, Sensch *et al.* (2000) investigaram o efeito deste composto em músculo papilar (de ventrículo esquerdo) e em

miócitos ventriculares de cobaia. Foi demonstrado que o eugenol apresenta efeito inotrópico negativo por inibir canais de Ca^{2+} do tipo L. Esses mesmos autores observaram que o eugenol reduz a duração do potencial de ação cardíaco. De modo muito semelhante Damiani e colaboradores (2004) investigaram os possíveis efeitos inotrópicos do eugenol no músculo papilar de ventrículo esquerdo de ratos. O eugenol comportou-se como um agente inotrópico negativo, uma vez que foi capaz de reduzir a corrente de Ca^{2+} do tipo L ($I_{\text{Ca,L}}$), a principal via de entrada de Ca^{2+} nas células cardíacas. Teixeira-Fonseca (2018) também demonstrou que o eugenol bloqueia a corrente rápida de Na^+ ($I_{\text{Na,R}}$) em cardiomiócitos atriais.

Além dos estudos do efeito do eugenol sobre o AEC ventricular, diversos trabalhos têm demonstrado que essa droga atua como um excelente cardioprotetor, muito provavelmente devido à sua excelente propriedade antioxidante e seus efeitos como antagonista do Ca^{2+} . Choudhary *et al.* (2006) mostraram que o eugenol foi capaz de reduzir a apoptose de cardiomiócitos de ratos neonatos por diminuir os níveis intracelulares de Ca^{2+} e por reduzir o estresse oxidativo nessas células. O mesmo grupo observou que o tratamento com eugenol (i.p.) reverteu parcialmente a hipertrofia cardíaca induzida pela administração de isoproterenol, um agonista β -adrenérgico também por melhorar o estresse oxidativo cardíaco (Choudhary *et al.*, 2006b). Outros dois estudos pré-clínicos observaram que o eugenol reduziu de modo significativo a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina (Fouad e Yacoubi, 2011) e pelo trióxido de arsênio (Binu *et al.*, 2017), ambas substâncias cardiotoxícas empregadas para o tratamento de neoplasias.

Deste modo, devido ao fato do eugenol atuar como antagonista do Na^+ e do Ca^{2+} , como cardioprotetor do tecido cardíaco, a investigação da atividade antiarrítmica dessa substância torna-se bastante promissora.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. ANIMAIS

Foram utilizadas cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos, pesando entre 400-600g. O ciclo claro-escuro de 12 h foi respeitado. Água e ração específica foi fornecida *ad libitum*. Todos os procedimentos relacionados ao manejo dos animais foram submetidos à Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Estado da Bahia (número da licença: 03/2017) e foram realizados em concordância com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA, 2013).

5.2. ISOLAMENTO E MONTAGEM EXPERIMENTAL DOS ÁTRIOS

Após indução de anestesia profunda, através da administração de uma elevada dose de tiopental (100 mg/kg, i.p.), confirmada pela perda de reflexo córneo e pela redução da frequência de respiração diafragmática, o tórax dos animais foram abertos e os corações rapidamente removidos.

Os átrios foram isolados dos corações e tiveram uma das suas extremidades fixadas no fundo de uma cuba para órgão isolado (5 mL, $36 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e a outra estará acoplada a um transdutor de força isométrica (FT-03D, Grass, EUA), por meio de um fino fio de aço inoxidável. Neste ambiente, os tecidos permaneceram imersos em solução de Tyrode modificada contendo (em μM): 140 NaCl, 5.4 KCl, 0.5 MgCl_2 , 0.33 NaH_2PO_4 , 1.8 CaCl_2 , 11 glucose, 5 HEPES ($36,5^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,4$), aerada por oxigênio (99,9%). Os tecidos foram então estirados para uma tensão de repouso de 9,8 mN (1 gF) e os átrios esquerdos foram submetidos a uma estimulação de campo de 1Hz (experimentos de contratilidade) ou 0,5 Hz (experimentos de arritmia) através de pulsos elétricos com intensidade de 100 V e duração de 15 ms (Student stimulator, Phipps and Bird, EUA), aplicados por um par de eletrodos de Ag/AgCl dispostos ao longo da preparação biológica. Os átrios direitos não foram eletricamente estimulados e foram mantidos à temperatura ambiente. O período para estabilização do tecido foi de, no mínimo, 50 minutos.

5.3. REGISTRO DA FORÇA DE CONTRAÇÃO ATRIAL

A força gerada pelos tecidos foi captada por um transdutor de força isométrica (FT-03D, Grass, EUA), que enviou seus sinais a um amplificador (TBM4-G, World Precision Instruments, EUA). Com a ajuda de um conversor analógico/digital (DI-700, DATAq, EUA),

o sinal foi registrado em computador, utilizando-se, para isto, uma frequência de amostragem de 512 amostras/s/canal.

5.5. ELETROFISIOLOGIA

5.5.1 CULTURA DE CÉLULAS

Para os experimentos de patch-clamp, células embrionárias de rim humano que não apresentam corrente de sódio macroscópicas (HEK293) foram utilizadas. As células HEK293 foram cultivadas em meio Dulbecco's modificado (DMEM) adicionado (g/L): 4.5 D-Glucose, 2 HCO₃, 2.38 HEPES, 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina (37°C, pH=7,4 e 5% CO₂).

Para a transfecção, o gene humano que codifica a subunidade alfa do canal Nav1.5 foi utilizado (*SCN5A*), o qual foi clonado nos sítios de restrição BamH1 e HindIII do vetor pcDNA3.1 (Invitrogen), comprado de GenScript Limitada (Hong Kong). Durante a transfecção as células HEK293 (com confluência de 60-80% cultivadas em dishes) foram incubadas por 5h (37°C e 5% CO₂) em 800µL do meio Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) contendo 4 µl de lipofectamina 2000, 1 µl de reagente PLUS (Invitrogen) e 1 µg do cDNA. Depois de 5h de incubação o meio Opti-MEM foi substituído para DMEM. Os experimentos de patch clamp foram realizados depois de 48h da transfecção.

5.5.2 MEDIDAS NO PATCH CLAMP

As células transfectadas foram replaqueadas e montadas para registros de patch-clamp em um microscópio invertido (Olympus IMT-2, Japão). O conjunto foi fixado sobre uma mesa pneumática anti-vibração (TMC, EUA). Um micro micromanipulador hidráulico foi usado para a movimentação do eletrodo responsável pelo registro das correntes da membrana celular. Um outro micro manipulador mecânico foi usado para a perfusão da solução externa com ou sem as drogas a serem investigadas. A solução de banho foi composta por (em mM): 130 NaCl₂, 1.8 CaCl₂, 5 CsCl, 1.2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 glicose (pH=7,4) a qual foi adicionado concentração correspondente de DMSO (0,3%).

Foram confeccionadas pipetas com resistência entre 2,5 e 3 MΩ, que foram preenchidas com uma solução interna com a seguinte composição (em mM): 50 de ácido aspártico, 60 CICs, 2 Na₂ATP, 10 HEPES, 11 EGTA, 4.27 CaCl₂, 1 MgCl₂ (pH=7,2). Depois de alcançada a configuração de *Whole-cell*, esperou-se 2 min antes de iniciar o protocolo experimental para alcançar o equilíbrio entre os meios intracelular e a solução pipetada. Os registros foram

feitos com a ajuda de um amplificador (HEKA, EPC10, EUA) e filtradas para um filtro passa-baixa (frequência de corte 2 KHz), convertidas em sinais digitais a uma frequência de 20 KHz. Apenas células com resistência total $< 5M\Omega$ foram consideradas na análise para prevenir erros de fixação de voltagem. Todos os registros foram feitos a uma temperatura entre 22-25°C. Os dados foram armazenados em computador para análise posterior. As correntes foram adquiridas e analisadas em um computador usando-se o software Pulse-Fit (HEKA, EUA). Para o processamento dos dados, também foi usado o Excel (Microsoft, EUA) e SigmaPlot v.5.0 (Jandel Inc., EUA).

5.6. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Para realização dos procedimentos experimentais, o eugenol foi solubilizado em DMSO (0,3%).

- Avaliação do efeito inotrópico das drogas sobre o átrio esquerdo.

Neste protocolo, os átrios esquerdos, mantidos em cuba para órgão isolado, foram expostos a concentrações crescentes do eugenol (1 a 5000 μM) ou da lidocaína (1 a 1000 μM). O objetivo deste protocolo foi observar o efeito dessas drogas sobre a força de contração cardíaca a fim de se obter resultados experimentais que permitissem a construção de curvas concentração-efeito, para que fosse determinada a potência das drogas investigadas.

- Avaliação do efeito cronotrópico das drogas no átrio direito.

Neste protocolo, os átrios direitos, mantidos em cuba para órgão isolado, foram expostos a concentrações crescentes do eugenol (1 a 5000 μM) ou da lidocaína (1 a 1000 μM). O objetivo deste protocolo foi observar o efeito dessas drogas sobre a frequência de contração cardíaca a fim de se obter resultados experimentais que permitissem a construção de curvas concentração-efeito, para que fossem determinadas a eficácia e a potência das drogas investigadas.

- Avaliação do efeito antiarrítmico do eugenol em o átrio esquerdo.

Para avaliar o efeito do eugenol (300 μM) sobre a arritmogênese cardíaca, o átrio esquerdo, mantido em cuba para órgão isolado e submetido à estimulação elétrica, foi exposto à 10 μM de ATX-II por 20 minutos, para que a arritmia cardíaca seja evocada. Após esse tempo, o eugenol foi adicionado ao banho para órgão isolado, com o objetivo de avaliar o seu efeito sobre os eventos arrítmicos induzidos por ATX-II.

- Avaliação do efeito do eugenol sobre a corrente de sódio tardia

Para avaliar os efeitos do eugenol (300 μM) sobre a amplitude das $I_{\text{Na,L}}$, células HEK-293 foram mantidas em um potencial de “holding” de -120 mV e estimuladas com pulsos-testes de 300 ms de duração que despolarizam as células para -20 mV, em intervalos de 5s. O Surgimento da $I_{\text{Na,L}}$ foi estimulado por 3 nM de ATX-II. A $I_{\text{Na,L}}$ será medida na situação controle (na presença de 3 nM de ATX-II), com a célula perfundida por solução extracelular e na situação teste, perfundindo-se a célula com solução extracelular, a qual se adicionará o eugenol a fim de se obter um valor de concentração final de 300 μM .

Lidocaína e Tetrodotoxina (TTX) foram usadas como um controle positivo.

5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

As comparações entre os grupos experimentais foram analisadas estatisticamente empregando-se o teste “t” de Student na sua forma pareada. Para comparações entre três ou mais grupos foi utilizado Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas todas as comparações que resultarem em um valor de $p < 0,05$. A análise dos dados foi feita com a ajuda do programa GraphPadPrism versão 5.0.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foi investigado o efeito do eugenol sobre a força de contração do átrio esquerdo eletricamente estimulado. Como pode ser visto pelos traçados representativos na Figura 17A, o eugenol apresentou um efeito cardiodepressor sobre a força de contração atrial. Nesta figura também pode-se observar a dependência de concentração do efeito inotrópico do eugenol, tendo em vista que a concentração de 700 μM reduziu com mais intensidade o pico da contração, quando comparado com 300 μM . Na Figura 17C, pode-se observar a curva concentração efeito do eugenol, o qual apresentou uma CE_{50} igual a $666,5 \pm 108,7 \mu\text{M}$ ($n = 5$). O objetivo dessa série de experimentos foi avaliar se o lote eugenol utilizado comportava-se de modo semelhante aos estudos previamente descritos dessa droga. O efeito cardiodepressor observado no presente trabalho apresentou uma CE_{50} de aproximadamente 660 μM , que é maior do que a CE_{50} (127 μM) previamente descrita por Sench *et al.* (2000). Todavia, a CE_{50} no presente trabalho apresentou valor muito próximo aos dados previamente publicados por Texeira-Fonseca (2018), o qual observou uma CE_{50} de aproximadamente 690 μM , o que indica uma boa reprodutibilidade experimental do efeito do eugenol sobre a contratilidade cardíaca. O efeito cardiodepressor do eugenol pode ser explicado, pelo menos parcialmente, à sua capacidade de bloquear os canais de Ca^{2+} do tipo L como descrito previamente por Sench *et al.* (2000) e Magyar *et al.* (2004), uma vez que a entrada de Ca^{2+} na célula por esses canais está diretamente relacionada à força de contração do coração. Para fins comparativos, a lidocaína foi utilizada como uma droga controle, por bloquear os canais de sódio presentes no músculo cardíaco (Pu *et al.*, 1998), tal como o eugenol (Texeira, 2018). Como descrito nas Figuras 17B e C, a lidocaína apresentou efeito inotrópico negativo dependente de concentração, com uma CE_{50} igual a $232,5 \pm 52,6 \mu\text{M}$ ($n=6$). Sendo assim a lidocaína é mais potente em inibir a força de contração cardíaca do que o eugenol, uma vez que a mesma possui uma CE_{50} menor (Figura 17D, $p < 0,05$).

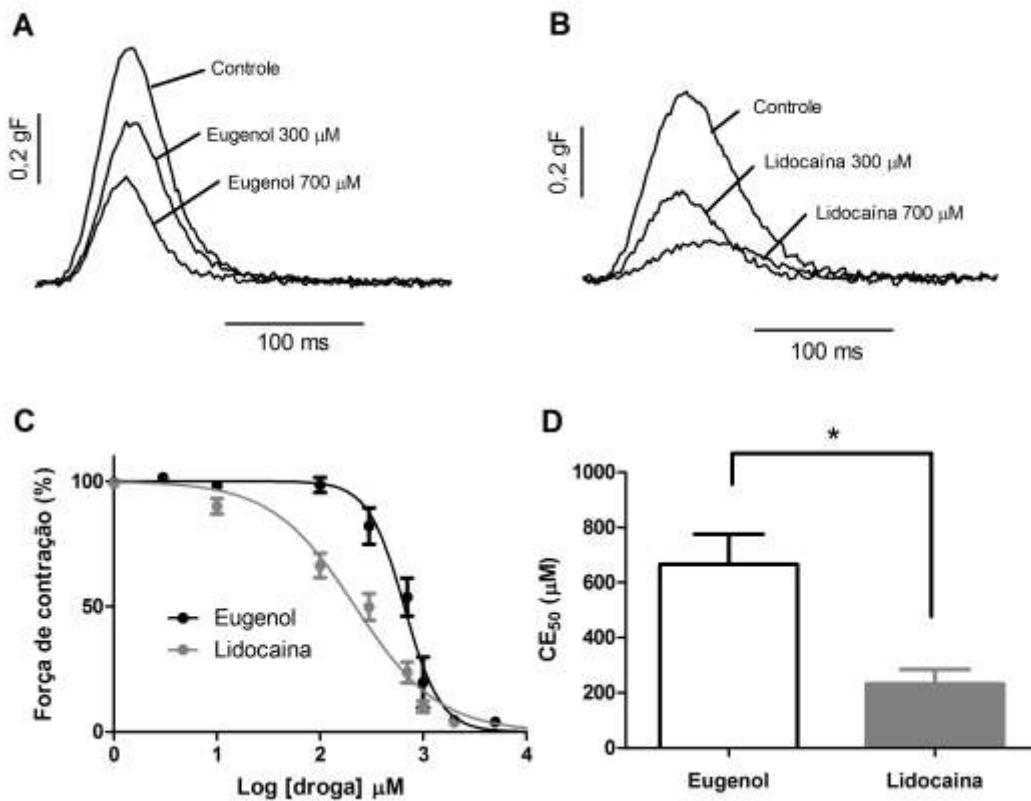


Figura 17 – Efeito do eugenol sobre a contratilidade atrial cardíaca. (A) Traçados representativos das contrações em diferentes concentrações de eugenol. (B) Traçados representativos das contrações em diferentes concentrações de lidocaína. (C) Curva concentração-efeito do eugenol (esferas pretas) e lidocaína (esferas cinzas). (D) Valores médios da EC₅₀ do eugenol e da lidocaína. * p < 0,05.

É importante ressaltar que o eugenol também foi capaz de reduzir a frequência cardíaca em átrio direito contraindo-se espontaneamente (Figura 18). Nesses experimentos o eugenol apresentou uma CE₅₀ de $795,0 \pm 87,3 \mu\text{M}$, valor menor do que a CE₅₀ da lidocaína para reduzir a frequência cardíaca, sugerindo que a lidocaína (controle positivo) é mais potente em diminuir o cronotropismo atrial. A capacidade tanto da lidocaína, quanto do eugenol, de induzir bradicardia também pode ser explicada pela capacidade de ambas as drogas inibirem os canais de Ca²⁺, além dos canais de Na⁺, presentes no músculo cardíaco (Pu *et al.*, 1998; Josephson, 1988 Magyar *et al.*, 2004; Sench *et al.*, 2000). Os dados aqui apresentados mostram que o eugenol possui efeito cardiodepressor, sendo aparentemente mais potente em reduzir a força de contração do que a frequência cardíaca. É importante ressaltar que o DMSO utilizado para solubilizar o eugenol não possui efeito nas concentrações testadas (Texeira, 2018).

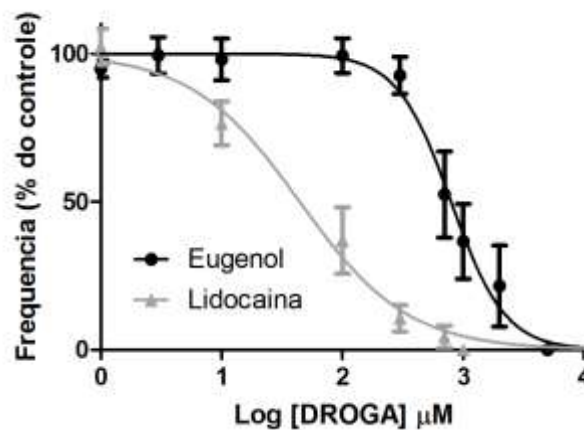


Figura 18 – Curva concentração-resposta do efeito do eugenol e lidocaína sobre a frequência cardíaca no átrio direito de cobaia.

Teixeira (2018) demonstrou previamente que o eugenol é capaz de inibir $I_{\text{Na,R}}$ e, por isso, o mesmo se comporta como uma droga antiarrítmica do tipo I (bloqueadores de canais de Na^+). No trabalho desenvolvido por Teixeira (2018) foi observado que o eugenol atuou como droga antiarrítmica em pelo menos dois modelos distintos de arritmia atrial, onde o autor sugeriu que esse efeito se deve em parte ao bloqueio da $I_{\text{Na,R}}$. Aqui foi hipotetizado que o eugenol também inibe a $I_{\text{Na,L}}$. O aumento da $I_{\text{Na,L}}$ tardia parece estar envolvido em diversas condições patológicas do coração, a saber: arritmias, insuficiência cardíaca e distúrbios isquêmicos (Makielski, 2015).

Para testar hipótese de que o eugenol inibe a $I_{\text{Na,L}}$, utilizamos uma ferramenta farmacológica que induz um aumento da $I_{\text{Na,L}}$ por retardar a inativação dos $\text{Nav}1.5$. Tal ferramenta, a ATX-II, é uma substância peptídica produzida pela *Anemonia sulcata*, uma espécie de anêmona do mar, que quando exposta ao coração retarda a inativação do $\text{Nav}1.5$, aumentando a $I_{\text{Na,L}}$ e prolongando, portanto, o PA cardíaco (Song *et al.*, 2009). Sendo assim, quando desafiado com a ATX-II, ocorre um prolongamento do PA, o que faz com que mais Na^+ e Ca^{2+} entrem na célula a cada ciclo cardíaco. O aumento do influxo de Ca^{2+} somado à sobrecarga intracelular de Na^+ faz com que o tecido cardíaco fique mais propenso a desenvolver a arritmias.

Antes de testar a atividade antiarrítmica do eugenol no modelo de arritmia induzido pelo aumento da $I_{\text{Na,L}}$, foi avaliado o efeito da ATX-II nos parâmetros contráteis. Como esta toxina prolonga o PA, espera-se um aumento de força de contração associado à sua exposição. A Figura 19A mostra os traçados representativos da contração do átrio

esquerdo na ausência (painel da esquerdo) e na presença de 10 nM de ATX-II (painel do meio). Como esperado, é possível observar que a ATX-II aumentou a contratilidade cardíaca de 1,08 para 1,53 gF (um aumento de 41,7%). Dados descritos na literatura corroboram com os achados do presente estudo, uma vez que a ATX-II induz um aumento na força de contração no miocárdio (Beress *et al.*, 1982). O painel direito da Figura 19A mostra os traçados normalizados e sobrepostos na situação controle e na presença de 10 nM de ATX-II. A Figura 19B mostra o aumento na força de contração induzido por ATX-II em 5 experimentos individuais. Com posse desses dados foi possível observar um aumento médio na força de contração de $19,3 \pm 6,3\%$ ($n=5$, $p<0,05$). Além disso outros parâmetros contráteis foram avaliados. Pode-se concluir que a 10 nM de ATX-II reduziu tanto o TR₅₀ quanto o TC₅₀, indicando que a mesma acelera tanto a contração quanto o relaxamento do músculo cardíaco (Figuras 19D e E, $n=5$, $p<0,05$), todavia nenhum efeito associado à exposição da ATX-II foi observado na tensão diastólica e nas taxas máxima e mínima para a contração e relaxamento, respectivamente (Figuras 19C, F e G, $p>0,05$).

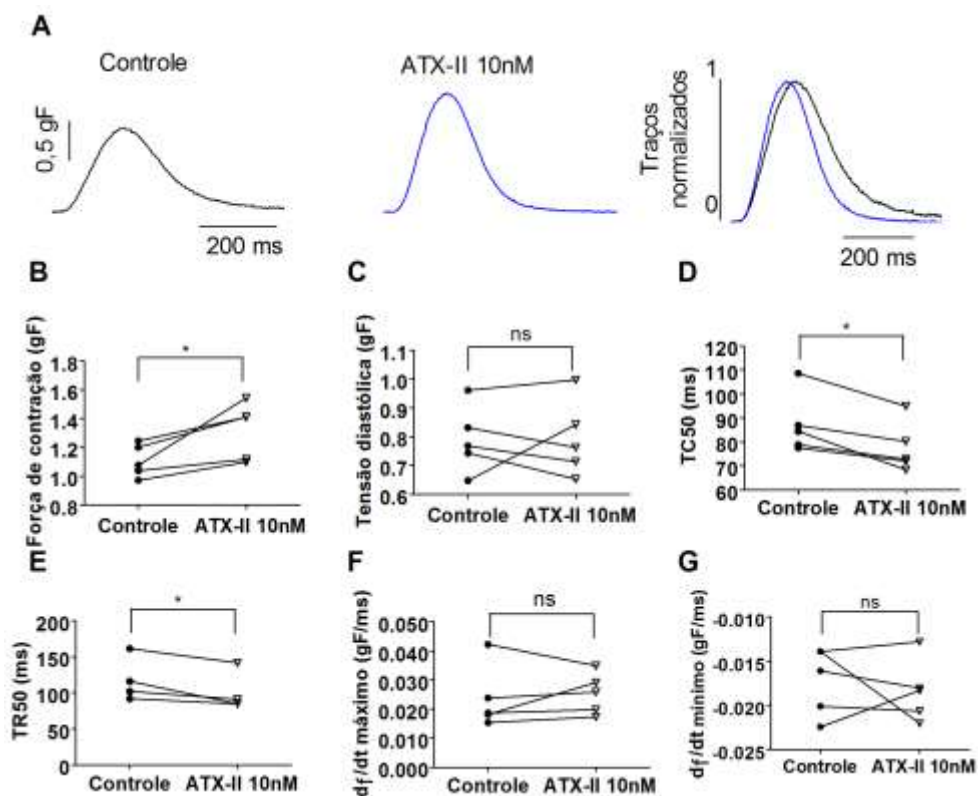


Figura 19 – Efeito do ATX-II sobre a contratilidade cardíaca. (A) Traçados representativos das contrações no controle e a 10 nM de ATX-II. (B) Efeito do ATX-II sobre a força de contração. (C) Efeito do ATX-II sobre a tensão diastólica. (D) TC₅₀ e (E) TR₅₀. (F) df/dt máximo. (G) df/dt mínimo.

Diversos dados da literatura sugerem que o eugenol inibe a $I_{Na,R}$ em diferentes tecidos, tais como o neuronal e o cardíaco (Pramod, *et al.*, 2010). Apesar desse conjunto de informações sobre a ação do eugenol na corrente rápida de Na^+ , até o momento, não existem estudos que mostram o efeito desta substância na corrente tardia de Na^+ . Aqui, com base em outras evidências obtidas pelo nosso grupo de pesquisa, concluiu-se que o eugenol também inibe a $I_{Na,L}$ e, por isso, o mesmo teria ação antiarrítmica em modelo de arritmia induzido por ATX-II. Primeiramente, para testar se o modelo de arritmia induzido por aumento na $I_{Na,L}$ estava funcionando, os átrios foram expostos à 10 nM de ATX-II. Como pode observado na Figura 20A, a adição de ATX-II à preparação biológica induziu o surgimento de diversas contrações extrassistólicas ou espontâneas entre as contrações eletricamente estimuladas. Isso sugere que o modelo de arritmia utilizado nesse estudo é funcional. Para reforçar que de fato o distúrbio rítmico foi induzido pelo aumento da $I_{Na,L}$, utilizamos a tetrodotoxina (TTX). A TTX é, em elevadas concentrações, um inibidor seletivo da $I_{Na,R}$, na ordem de dezenas a centenas de μM , todavia em relativamente baixas concentração, é conhecido que a mesma tem pouco ou nenhum efeito inibitório sobre a $I_{Na,R}$, sendo um potente inibidor da $I_{Na,L}$ (Song *et al.*, 2009). Por esse motivo foi utilizada a TTX na concentração de 2 μM , pois sabe-se que nesta concentração ocorre uma inibição quase completa da $I_{Na,L}$. Na Figura 20A pode-se observar a exposição à TTX (2 μM) que inibiu completamente os eventos arrítmicos induzidos pela ATX-II, o que leva a sugerir que de fato a arritmia foi causada pelo aumento da $I_{Na,L}$ induzido pela ATX-II.

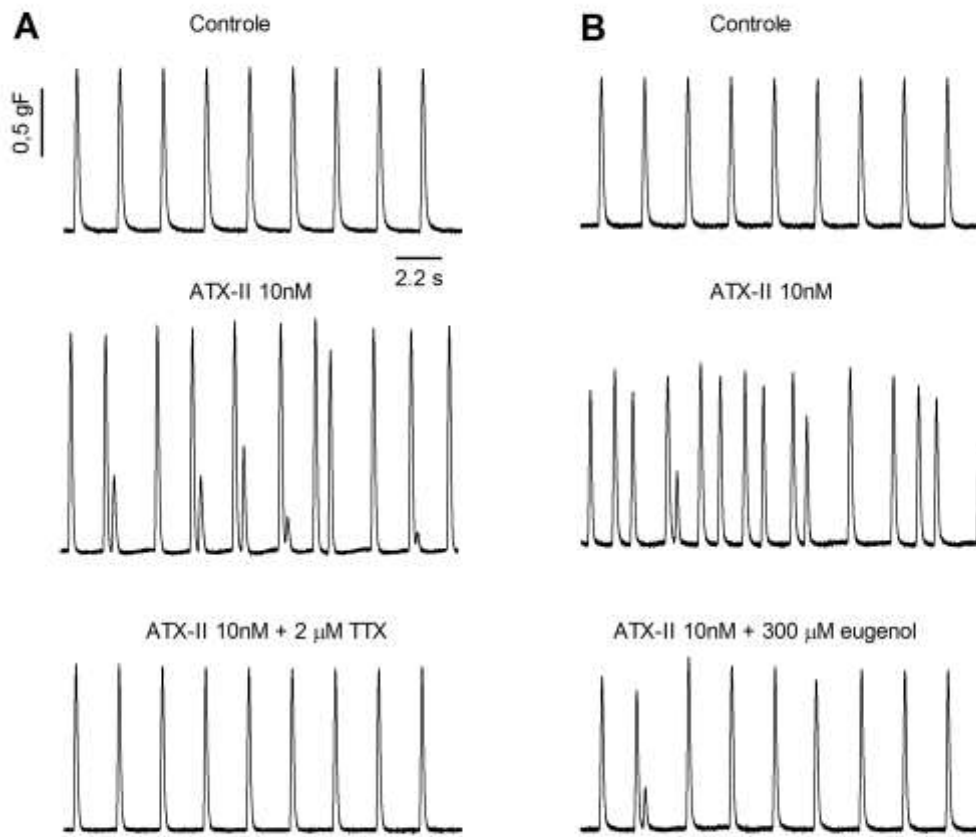


Figura 20 – Modelo de arritmia induzida por ATX-II em tecido atrial esquerdo. (A) Traçados representativos das contrações no controle, quando exposto a 10 nM de ATX-II e tratado com 2 μ M de tetrodotoxina (TTX). (B) Traçados representativos das contrações no controle, quando exposto a 10 nM de ATX-II e tratado com 300 μ M de eugenol.

Sabendo-se que o modelo de arritmia estava funcionando, foi investigado o efeito antiarrítmico do eugenol. A concentração de eugenol escolhida foi de 300 μ M por dois motivos. Primeiro, nesta concentração não foi observada uma redução significativa na força nem na frequência cardíaca, sendo assim sugerimos que 300 μ M não bloqueia significativamente os canais de Ca^{2+} presentes no coração. Caso houvesse um bloqueio significativo dos canais de Ca^{2+} esperava-se observar uma importante redução nesses dois parâmetros. Além disso, em um outro estudo do nosso grupo de pesquisa, Teixeira-Fonseca (2018) demonstrou que o eugenol na concentração de 300 μ M inibe significativamente a $I_{\text{Na,R}}$ e também apresenta atividade antiarrítmica em outros modelos de arritmia. Na Figura 20B pode-se observar os traçados representativos na situação controle; na presença de 10 nM de ATX-II, onde pode ser visualizado o distúrbio rítmico através do surgimento de extrassístoles; e na presença de ATX-II (10 nM) mais eugenol (300 μ M). Nesta figura se observa que o

eugenol reduz o aparecimento de extrassístoles, indicando, portanto, uma atividade antiarrítmica. O eugenol foi capaz de reduzir em $75,1 \pm 16,3\%$ o número de extrassístoles induzidas pela ATX-II. Como o eugenol foi solubilizado em uma solução a 0,3 % de DMSO, foi testado se esse solvente (controle negativo) possui algum efeito intrínseco, o que poderia mascarar ou até mesmo potenciar o efeito do eugenol. Como pode ser visto na Figura 21, o DMSO não possui atividade antiarrítmica intrínseca. A TTX, usada como controle positivo, aboliu completamente as extrassístoles induzidas pela ATX-II.

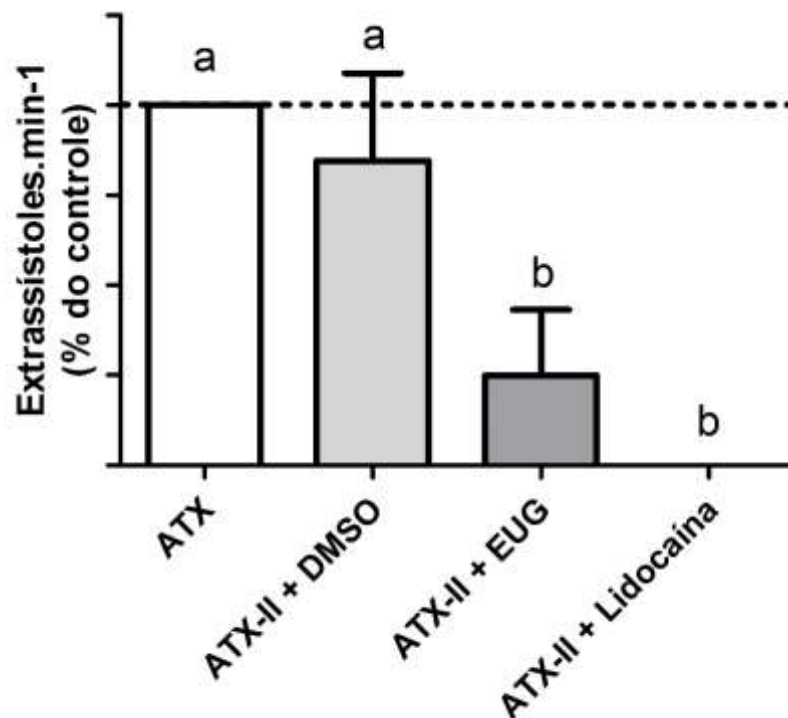


Figura 21 – Percentual de extra-sístoles em tecido atrial esquerdo quando submetido a 10 nM de ATX-II, 10 nM de ATX+DMSO, 10 nM de ATX-II+eugenol e 10 nM de ATX-II+TTX. “b “ significa que houve diferença estatisticamente significativa quando comparado com “a” ($p < 0,05$).

Para investigar a ação do eugenol sobre a $I_{Na,L}$ foram utilizadas células HEK293 que expressam transitoriamente o $Na_v1.5$ humano. A ATX-II (3 nM) foi utilizada para induzir a $I_{Na,L}$, conforme pode ser observado nos traçados representativos apresentados na Figura 22A. Conforme o esperado, esses traçados mostram uma maior amplitude e densidade da $I_{Na,L}$ na presença da ATX-II, quando comparado ao controle. Os traçados também demonstram que a amplitude da $I_{Na,L}$ é reduzida na presença do eugenol (300 μ M). Além disso, a Figura 22B demonstra que o efeito máximo do eugenol sobre o pico da $I_{Na,L}$ na concentração utilizada (300 μ M), ocorre muito rapidamente, o que sugere uma ação direta desse composto sobre o $Nav1.5$. Também pode ser visto o efeito da ATX-II e do eugenol sobre a densidade da $I_{Na,L}$.

em relação ao controle na figura 22C. Esses experimentos permitiram verificar a ação inibitória do eugenol sobre a $I_{Na,L}$ a qual é um componente altamente arritmogênico. Além disso, traz evidências consistentes quanto a interação direta do eugenol com o Nav1.5, a principal isoforma dos Nav expressa no coração de mamíferos, o que pode explicar em parte o seu potencial efeito antiarrítmico. Embora os efeitos cronotrópicos e inotrópicos sobre os tecidos atriais demonstrados e discutidos acima possam ter contribuições dos canais de Ca^{2+} cardíacos, os experimentos aqui elencados e outros levantamentos do nosso grupo de pesquisa, bem como estudos em canais de Na^+ neuronais presentes na literatura (Cho, *et al.*, 2008; Park, *et al.*, 2006), reforçam a contribuição do eugenol como bloqueador de Nav.

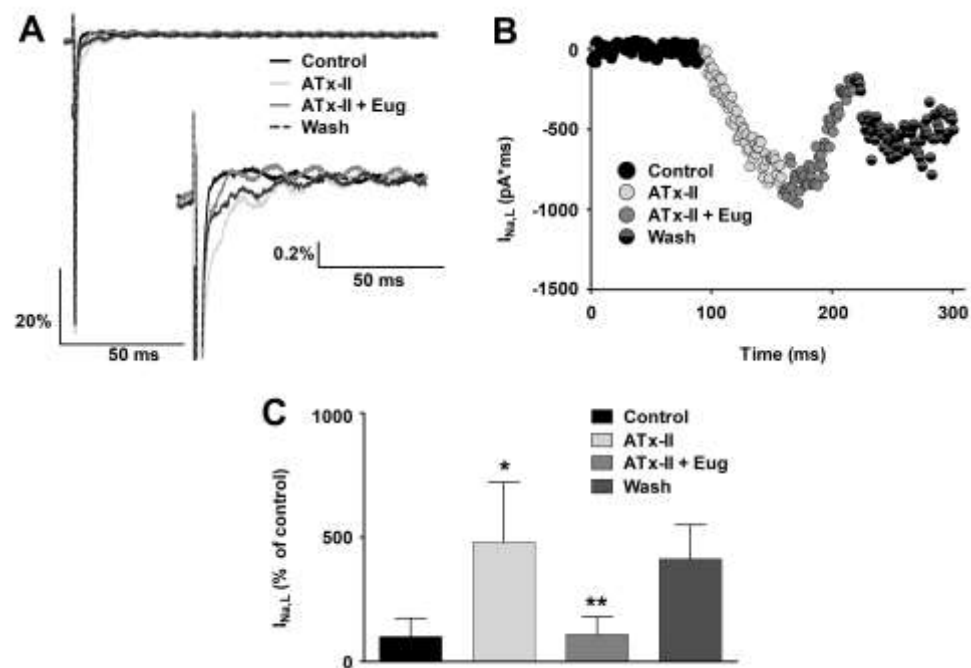


Figura 22 – Modelo de arritmia induzida por ATX-II em células HEK que expressam transitoriamente o Nav1.5 humano. **(A)** Traçados representativos das contrações no controle, quando exposto a 3 nM de ATX-II e tratado com 300 μ M de eugenol. **(B)** Gráfico do curso temporal do efeito do eugenol, na concentração de 300 μ M, sobre o pico da $I_{Na,L}$. **(C)** Valores médios da densidade da $I_{Na,L}$ corrente no controle, na presença de 3 nM de ATX-II e tratado com 300 μ M de eugenol (VH = -120mV; n=6).

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados através deste estudo, foi possível observar o efeito inotrópico negativo do eugenol sobre o tecido atrial esquerdo, o qual atua de modo concentração-dependente e o efeito cronotrópico negativo desse composto sobre o átrio direito, ambos condizentes com os modelos descritos previamente na literatura. Além disso, observou-se um efeito antiarrítmico do eugenol em um modelo de arritmia induzida pelo aumento da corrente de sódio tardia ($I_{Na,L}$) em tecido atrial e uma redução no pico dessa $I_{Na,L}$ induzida por ATX-II em células HEK293 que expressam transitoriamente o $Nav1.5$ humano, demonstrando uma ação direta do eugenol sobre o $Nav1.5$, que constitui a principal isoforma cardíaca dos canais de Na^+ . Desse modo, espera-se que o eugenol possa atuar como fármaco antiarrítmico para o tratamento da Síndrome do QT longo do tipo 3 (SQT3) a qual está associada a desfechos como a morte súbita cardíaca (MSC). Para tanto, fazem-se necessários estudos *in vivo* que possam confirmar essa possibilidade.

REFERÊNCIAS

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2017.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 5 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2018.

ALBERTS, B., BRAY, D., HOPKIN, K., JOHSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular**. 4 ed., Art med Editora, 2002.

ALDERS, M.; BIKKER, H., CHRISTIAANS, I. Long QT syndrome. **Gene Reviews**. University of Washington, Seattle, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1129/?report=printable>. Acesso em: 14 mai. 2020.

AROMOLARAN, A. S.; CHAHINE, M.; BOUTJDIR, M. Regulation of Cardiac Voltage-Gated Sodium Channel by Kinases: Roles of Protein Kinases A and C. **Handbook of Experimental Pharmacology**, 2018. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/29032483> Acesso em: 11 mai. 2020.

ÅSTRAND, P.; RODAHL, K.; DAHL, H. A.; STROMME, S. B. **Textbook of work physiology: physiological bases of exercise**, ed. Human Kinetics, 2003. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=BC9SiAsUPqsC&oi=fnd&pg=PP9&dq=Textbook+of+work+physiology:+physiological+bases+of+exercise&ots=8X3OY4ppYo&sig=7hNTNs1K9iPozfsFOo3mWfTAqsA#v=onepage&q=Textbook%20of%20work%20physiology%3A%20physiological%20bases%20of%20exercise&f=false>. Acesso em: 14 jul. 2019.

BAMALAN, O. A.; SOOS, M. P. Anatomy, Thorax, Heart Great Vessels. **StatPearls [Internet]**. Treasure Island, 4 de outubro de 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547680/>. Acesso em: 10 jun. 2020.

BERESS, Laszlo; RITTER, Reni; RAVENS, Ursula. The influence of the rate of electrical stimulation on the effects of the Anemonia sulcata toxin ATX II in guinea pig papillary muscle. **European journal of pharmacology**, v. 79, n. 3-4, p. 265-272, 1982. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/001429998290632X>. Acesso em: 12 ago 2020.

BINU, P.; PRIYA, N.; ABHILASH, S.; VINEETHA, R. C.; NAIR, R. H. Studies on curative efficacy of monoterpene eugenol on anti- leukemic drug arsenic trioxide induced

cardiotoxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 91, p. 559-566. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332217305760>. Acesso em: 15 mai. 2019.

BORON, W. F.; BOULPAEP, E. L. **Fisiologia médica**. Elsevier Health Sciences, 2017.

CAI, W.; XU, S.; LI, X. Cardiac arrhythmia caused by a novel type of atrial conduction block. **Medicine**, março 2020, v. 99, ed. 13, p. 19264. Disponível em: https://cdn.journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2020/03270/Cardiac_arrhythmia_caused_by_a_novel_type_of.3.aspx. Acesso em: 13 abr. 2020.

CHADDA, K. R.; JEEVARATNAM, K.; LEI, M.; HUANG, C. L. H. Sodium channel biophysics, late sodium current and genetic arrhythmic syndromes. **Pflugers Arch**. European Journal of Physiology, p. 629–641, jun. 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00424-017-1959-1>. Acesso em: 22 jun. 2020.

CHAHINE, M. Role of Late Sodium Current During Repolarization and Its Pathophysiology. **Springer Nature Switzerland**, El-Sherif, Cardiac Repolarization, 2019. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-22672-5_5. Acesso em: 21 jun. 2020.

CHENG, L. T.; ZHANG, J. M.; WANG, Z. F.; GAO, H. K.; WU Y. Q. Recent approaches to His-Purkinje system pacing. **Chinese Medical Journal**, England, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6365279/>. Acesso em: 14 abr de 2020.

CHO, J. S.; KIM, T. H.; LIM, J-M.; SONG, J-H. Effects of eugenol on Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons, **Brain Research**, v. 1243, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006899308022634?via%3Dihub>. Acesso em: 18 out 2021.

CHOUDHARY, R.; MISHRA, K. P.; SUBRAMANYAM, C. Prevention of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by eugenol, an antioxidant. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 107, 2006. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02912923>. Acesso em: 15 mai 2019.

CHOUDHARY, R.; MISHRA, K. P.; SUBRAMANYAM, C. Interrelations between oxidative stress and calcineurin in the attenuation of cardiac apoptosis by eugenol. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 283, n. 1-2, p. 115-122, 2006. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-006-2386-3>. Acesso em: 15 mai 2019.

CORTÉS-ROJAS D. F.; SOUZA C. R. F.; OLIVEIRA W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, v. 4, n. 2, p. 90-96, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169115301763>. Acesso em: 17 mai 2019.

CURI, R. e PROCOPIO, J. **Fisiologia básica**. 2 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2017.

DAMIANI C. E. N.; MOREIRA, C. M.; ZHANG, H. T.; CREAZZO, T. L.; VASSALLO, D. V. Effects of eugenol, an essential oil, on the mechanical and electrical activities of cardiac muscle. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 44, n. 6, p. 688-695, 2004. Disponível em:

https://journals.lww.com/cardiovascularpharm/Fulltext/2004/12000/Effects_of_Eugenol,_an_Essential_Oil,_on_the.11.aspx. Acesso em: 12 jun 2019.

DETTA, N.; FRISSE, G.; SALVATORE, F. The multi-faceted aspects of the complex cardiac Nav1.5 protein in membrane function and pathophysiology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1854, n. 10, p. 1502-1509, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570963915002022>. Acesso em: 22 jun. 2020.

EISNER, D. A. Ups and downs of calcium in the heart. **The Journal of Physiology**, v. 596, n. 1, p. 19-30, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5746526/>. Acesso em: 14 abr de 2020.

FELDMAN, J.; GOLDWASSER, G. P. Eletrocardiograma: recomendações para a sua interpretação. **Revista da SOCERJ**, v. 17, n. 4, p. 251-256, 2004.

FOUAD A. A., YACOUBI M. T. Mechanisms underlying the protective effect of eugenol in rats with acute doxorubicin cardiotoxicity. **Archives of pharmacal research**, v. 34, n. 5, p. 821, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12272-011-0516-2>. Acesso em: 24 jun 2019.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international*, v. 96, n. 3, p. 183-195, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25294644>. Acesso em: 24 jul 2020.

GENG, Y.; LIU, J.; LV, R.; YUAN, J.; LIN, Y.; WANG, X. An efficient method for extraction, separation and purification of eugenol from *Eugenia caryophyllata* by supercritical

fluid extraction and high-speed countercurrent chromatography. *Separation and Purification Technology*, v. 57, n. 2, p. 237-241, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138358660700189X>. Acesso em: 14 jun 2019.

GIACOMELLI, E.; MUMMERY, C. L.; BELLIN, M. Human heart disease: lessons from human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 20, p. 3711-3739, 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28573431/>. Acesso em: 16 jul 2020.

GOYAL, A.; SENST, B.; ZELTSER, R. Reentry Arrhythmia. **StatPearls [Internet]**, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537089/>. Acesso em: 7 abr 2019.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 13 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

GUO, A.; ZHANG, C.; WEI, S.; CHEN, B.; SONG, L. S. Emerging mechanisms of T-tubule remodelling in heart failure. *Cardiovascular research*, v. 98, n. 2, p. 204-215, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23393229/>. Acesso em: 24 jul 2020.

HEIJMAN, J.; GHEZELBASH, S.; DOBREV, D. Investigational antiarrhythmic agents: promising drugs in early clinical development. *Expert opinion on investigational drugs*, v. 26, n. 8, p. 897-907, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13543784.2017.1353601>. Acesso em: 8 ago 2019.

HONG, T. T.; SHAW, R. M. Cardiac T-tubule microanatomy and function. **Physiological reviews**, v. 97, n. 1, p. 227-252, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6151489/>. Acesso em: 22 mai 2020.

HORVÁTH, N.; *et al.* Late Sodium Current Inhibitors as Potential Antiarrhythmic Agents. **Journal Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.00413/full>. Acesso em: 14 set 2021.

KAUFMAN, T. S. The multiple faces of eugenol. A versatile starting material and building block for organic and bio-organic synthesis and a convenient precursor toward bio-based fine chemicals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 6, p. 1055-1085, 2015. Disponível em: Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-50532015000601055&script=sci_arttext. Acesso em: 24 jul 2020.

JOSEPHSON, I. R. Lidocaine blocks Na, Ca and K currents of chick ventricular myocytes. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 20, n. 7, p. 593-604, 1988. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022282888801172>. Acesso em: 23 jul 2020.

KAVERINA, N. V.; CHICHKANOV, G. G. Pharmacology of antiarrhythmia agents: the new aspects. *Eksperimental'naiia i klinicheskaia farmakologiiia*, v. 66, n. 2, p. 46, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12962048/>. Acesso em: 22 jul 2020.

KELLER, M.; KAO, J. P.; EGGER, M.; NIGGLI, E. Calcium waves driven by “sensitization” wave-fronts. *Cardiovascular research*, v. 74, n. 1, p. 39-45, 2007. Disponível em: <https://academic.oup.com/cardiovasces/article/74/1/39/300777>. Acesso em: 14 ago 2019.

KITMITTO, A.; BAUDOIN, F.; CARTWRIGHT, E. J. Cardiomyocyte damage control in heart failure and the role of the sarcolemma. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 40, n. 3-4, p. 319-333, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6831538/#CR92>. Acesso em: 20 jun 2020.

KLABUNDE, R. E. Cardiac electrophysiology: normal and ischemic ionic currents and the ECG. **Advances in physiology education**, v. 41, n. 1, p. 29-37, 2017. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/advan.00105.2016>. Acesso em: 12 jul 2020.

KUMAR, K.; ZIMETBAUM, P. J. Antiarrhythmic drugs 2013: state of the art. *Current cardiology reports*, v. 15, n. 10, p. 410, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11886-013-0410-2>. Acesso em: 13 jul 2019.

LACOMBE, P.; BASIT, H.; LAPPIN, S. L. Physiology, Starling Relationships. **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459390/>. Acesso em: 12 abr 2020.

LIANG, F.; FAN, P.; JIA, J.; YANG, S.; JIANG, Z.; KARPINSKI, S.; YAO, L. Inhibitions of late INa and CaMKII act synergistically to prevent ATX-II-induced atrial fibrillation in isolated rat right atria. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 94, p. 122-130, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022282816300670>. Acesso em: 13 mai 2020.

LIBBY, P. Braunwald: **Tratado de doenças cardiovasculares**. Rio de Janeiro, 10 ed., Elsevier Health Sciences, 2018.

LORELL, B. H.; CARABELLO, B. A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. **Circulation**, v. 102, n. 4, p. 470-479, 2000. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.cir.102.4.470>. Acesso em: 12 jun 2019.

MAKIELSKI, J. C. Late sodium current: a mechanism for angina, heart failure, and arrhythmia. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 26, n. 2, p. 115-122, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5603905/>. Acesso em: 15 jun 2020.

MURPHY, C.; LAZZARA, R. Current concepts of anatomy and electrophysiology of the sinus node. **Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology**, v. 46, n. 1, p. 9-18, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10840-016-0137-2>. Acesso em: 19 abr 2020.

NERBONNE, J. M. e KASS, R. S. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. **Physiological Reviews**, v. 85 p. 1205-1253, 2005. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00002.2005>. Acesso em: 20 set 2021.

NORMAN, R.; FULLER, W.; CALAGHAN, S. Caveolae and the cardiac myocyte. **Current Opinion in Physiology**, v. 1, p. 59-67, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2468867317300093>. Acesso: 14 jun 2020.

NOTO, R. E.; EDENS, M. A. Physiology, Muscle. **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532258/>. Acesso em: 13 jun 2020.

PADELETTI, L.; BAGLIANI, G. General introduction, classification, and electrocardiographic diagnosis of cardiac arrhythmias. **Cardiac electrophysiology clinics**, v. 9, n. 3, p. 345-363, 2017. Disponível em: [https://www.cardiacep.theclinics.com/article/S1877-9182\(17\)30072-2/abstract](https://www.cardiacep.theclinics.com/article/S1877-9182(17)30072-2/abstract). Acesso em: 23 jun 2020.

PARK, C-K.; LI, H. Y.; YEON, K-Y; *et al.* Eugenol Inhibits Sodium Currents in Dental Afferent Neurons. **Journal of Business and Technical Communication**. 2006. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/154405910608501005>. Acesso em: 10 out 2021.

PÉREZ-RIERA, A. R.; BARBOSA-BARROS, R.; RAIMUNDO, R. D.; REZENDE, M. P. D. C.; SORPRESO, I. C. E.; ABREU, L. C. The congenital long QT syndrome Type 3: An update. **Indian pacing and electrophysiology journal**, v. 18, n. 1, p. 25-35, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S097262921730178X#sec1>. Acesso: 8 abr 2020.

PFENNIGER, A.; ARORA, R. Cardiac regulation by the autonomic nervous system: A fine balance. **Journal of cardiovascular electrophysiology**, v. 30, n. 5, p. 747, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6958996/>. Acesso em: 28 mai 2020.

PINALI, C.; BENNETT, H. J.; DAVENPORT, J. B.; CALDWELL, J. L.; STARBORG, T.; TRAFFORD, A. W.; KITMITTO, A. Three-dimensional structure of the intercalated disc reveals plicate domain and gap junction remodeling in heart failure. **Biophysical journal**, v. 108, n. 3, p. 498-507, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4317535/>. Acesso em: 21 jun 2020.

PRAMOD, K.; ANSARI, S.H.; ALI, J. Eugenol: a natural compound with versatile pharmacological actions. **Natural product communications**, v. 5, p.1999-2006, 2010. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1934578X1000501236>. Acesso em: 19 abr 2019.

PRIEST, B. T.; MCDERMOTT, J. S. Cardiac ion channels. **Channels**, v. 9, n. 6, p. 352-359, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4850049/>. Acesso em: 21 jun 2020.

QIU, M.; LV, B.; LIN, W.; MA, J.; DONG, H. Sudden cardiac death due to the Wolff–Parkinson–White syndrome: A case report with genetic analysis. **Medicine**, v. 97, n. 51, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6320009/>. Acesso em: 7 jun 2020.

RAJA, M. C.; SRINIVASAN, V.; SELVARAJ, S.; MAHAPATRA, S. K. Versatile and Synergistic Potential of eugenol: A Review. *Pharm Anal Acta*. v. 6, n. 5. 2015.

KOWEY, P.; PICCINI, J. P.; NACCARELLI, G.; REIFFEL, J. A. **Cardiac Arrhythmias, Pacing and Sudden Death**. Springer, 2017.

ROKITA, A.G. E ANDERSON, M.E. New Therapeutic Targets in Cardiology Arrhythmias and Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase II (CaMKII). **Circulation**, v. 126, p. 2125-2139, 2012. Disponível em:

<https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.124990>. Acesso: 5 jun 2019.

RUBART, M.; ZIPES, D. P. Mechanisms of sudden cardiac death. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 9, p. 2305-2315, 2005. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/26381>. Acesso em: 7 jun 2019.

SAXTON, A.; BORDONI, B. Anatomy, Thorax, Cardiac Muscle. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535355/>. Acesso em: 10 jun 2020.

SAXTON, A; MANNA, B. Anatomy, Thorax, Heart Right Coronary Arteries. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537357/>. Acesso em: 8 jul 2020.

SCHULTZ, S. G. **Basic principles of membrane transport**. CUP Archive, 1980.

SENSCH, O.; VIERLING, W.; BRANDT, W.; REITER, M. **Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: comparison of b-caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine**. British Journal of Pharmacology, 131: 1089 – 1096, 2000.

SHATTOCK, M. J.; OTTOLIA, M.; BERS, D. M.; BLAUSTEIN, M. P.; BOGUSLAVSKYI, A.; BOSSUYT, J.; GOLDHABER, J. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and Na^+/K^+ -ATPase in the heart. **The Journal of physiology**, v. 593, n. 6, p. 1361-1382, 2015. Disponível em: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/jphysiol.2014.282319>. Acesso em: 12 mar 2020.

SHIELS, H. A.; GALLI, G. L. J. The sarcoplasmic reticulum and the evolution of the vertebrate heart. **Physiology**, v. 29, n. 6, p. 456-469, 2014. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physiol.00015.2014>. Acesso em: 22 mai 2020.

SHIOYA, T. A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 57, p. 327-35, 2007. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/physiolsci/advpub/0/advpub_0_0711050011/_article/-char/ja/. Acesso: 4 abr 2019.

SIQUEIRA, A. S. E.; SIQUEIRA-FILHO, A. G.; LAND, M. G. P. Análise do impacto econômico das doenças cardiovasculares nos últimos cinco anos no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 1, p. 39-46, 2017. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0066-782X2017000700039&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 12 mar 2019.

SONG, Y.; SHRYOCK, J. C.; BELARDINELLI, L. A slowly inactivating sodium current contributes to spontaneous diastolic depolarization of atrial myocytes. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, n. 4, p. H1254-H1262, 2009. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpheart.00444.2009>. Acesso em: 21 jul 2020.

SWEENEY, H. L.; HAMMERS, D. W. Muscle contraction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 2, p. a023200, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5793755/>. Acesso em: 12 jun 2020.

TEIXEIRA-FONSECA, J. L. **Investigação do efeito antiarrítmico do eugenol em coração de cobaia**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Bahia, 2018. Disponível em: http://www.cpgnrsa.univasf.edu.br/uploads/7/8/9/0/7890742/disserta%C3%A7%C3%A3o_jorge_lucas_teixeira_da_fonseca_univasf_pgrnsa_2018.pdf. Acesso em: 12 jan 2020.

TEIXEIRA-FONSECA, J. L.; SANTOS_MIRANDA, A.; SILVA, J. B.; MARQUES, L. P.; SANTOS-JOVIANO, J. V.; NUNES, P. I. C.; ROMAM-CAMPOS, D., GONDIM, A. N. S. Eugenol interacts with cardiac sodium channel and reduces heart excitability and arrhythmias. **Life Sciences**, v. 282. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320521007475?via%3Dihub>. Acesso em: 10 out 2021.

TÉTREAULT, M. P.; BOURDIN, B.; BRIOT, J.; SEGURA, E.; LESAGE, S.; FISET, C.; PARENT, L. Identification of glycosylation sites essential for surface expression of the CaV α 2 δ 1 subunit and modulation of the cardiac CaV1.2 channel activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 9, p. 4826-4843, 2016. Disponível em: <https://www.jbc.org/content/291/9/4826.full>. Acesso em: 19 jun 2020.

TFELT-HANSEN, J.; WINKEL, B. G.; GRUNNET, M. e JESPERSEN, T. Inherited Cardiac Diseases Caused by Mutations in the Nav1.5 Sodium Channel. **Molecular Perspectives**, 2009. Disponível em: <https://mail.google.com/mail/u/0/#search/leisiane/FMfcgzGlkFqWwkFsxGSrkKwJsHjFfdNq?projector=1&messagePartId=0.1>. Acesso em: 08 set 2021.

THOMSEN, M. B. Potassium Channels in the Heart. **Cardiac and Vascular Biology**, v. 6, p. 47–75, 2018. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-77812-9_3. Acesso em: 13 jun 2019.

THONG, E.; AHMED, A.; MACLEOD, K. T. An Introduction to the Cardiac Action Potentials. **Heart of the Matter**. Springer, Cham, p. 49-59, 2019. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-24219-0_5. Acesso em: 21 jun 2020.

THULL, S. *et al.* Mechanism underlying hooked resurgent-like tail currents induced by an insecticide in human cardiac Nav1.5. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 2020. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/110ePEK39yJXvxBpcKowbwOtWGIPqTaEC/view>. Acesso em: 28 ago 2021.

TRAN, D. B.; MAHABADI, N. Anatomy, Thorax, Heart Muscles. **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545195/>. Acesso em: 14 jun 2019.

VACA, S.F.; BORDONI, B. Anatomy, Thorax, Mitral Valve. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549884/#>. Acesso em: 11 jun 2020.

VOLPE, J. K.; MAKARYUS, A. N. Anatomy, Thorax, Heart and Pericardial Cavity. **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482452/>. Acesso em: 13 mar 2020.

WACHTELL, K.; DEVEREUX, R.B.; LYLE, P.A.; OKIN, P.M. E GERDTS E. The left atrium, atrial fibrillation, and the risk of stroke in hypertensive patients with left ventricular. **Therapeutic advances in cardiovascular disease**, v. 2, n. 6, p. 507-513, 2008. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1753944708093846>. Acesso em: 13 abr 2019.

WEI, X.; RICHARDS, J. R. Physiology, Cardiac Repolarization Dispersion and Reserve. **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537194/>. Acesso em: 6 abr 2020.

WIT, A. L. Afterdepolarizations and triggered activity as a mechanism for clinical arrhythmias. **Pacing and Clinical Electrophysiology**, v. 41, n. 8, p. 883-896, 2018.

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pace.13419>. Acesso em: 8 abr 2020.

YU, S.; LI, G.; HUANG, C. L. H.; LEI, M.; WU, L. Late sodium current associated cardiac electrophysiological and mechanical dysfunction. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, v. 470, n. 3, p. 461-469, 2018. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00424-017-2079-7>. Acesso em: 15 jul 2020.

ZOT, A. S.; POTTER, J. D. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, v. 16, n. 1, p. 535-559, 1987. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bb.16.060187.002535?journalCode=biophys.2>. Acesso em: 12 abr 2019.

ANEXOS

Anexo A. ARTIGO: *EUGENOL INTERACTS WITH CARDIAC SODIUM CHANNEL AND REDUCES HEART EXCITABILITY AND ARRHYTHMIAS* PUBLICADO NA REVISTA LIFE SCIENCES EM 24 JUNHO 2021



Eugenol interacts with cardiac sodium channel and reduces heart excitability and arrhythmias

Jorge Lucas Teixeira-Fonseca^{a, b, 1}, Artur Santos-Miranda^{b, 1}, Joab Barbosa da Silva^a,
Leisiane Pereira Marques^{a, b}, Julliane Vasconcelos Joviano-Santos^b, Paula Idma Chaves Nunes^a,
Danilo Roman-Campos^{b, *}, Antonio Nei Santana Gondim^{a, b, **}

^a Laboratório de Biofísica e Farmacologia do Coração, Departamento de Educação (Campus XII), Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Guanambi, Bahia, Brazil

^b Laboratório de Cardiobiologia, Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Eugenol
Sodium channel
Na_v1.5
Arrhythmia
Heart

ABSTRACT

Aims: Eugenol is a natural compound found in the essential oils of many aromatic plants. The compound is used as a local anesthetic because of its inhibitory effect on the voltage-gated Na⁺ channels (Na_v), which are expressed in the nociceptive neurons. Eugenol has shown wide range of activities in the cardiovascular system; most of these activities are attributed to the modulation of voltage-sensitive Ca²⁺ channels. However, its action on Na_v1.5, the main subtype of Na_v expressed in the mammalian myocardium, is unknown. The interaction of eugenol with Na_v1.5 could also contribute to its antiarrhythmic properties in vitro and ex vivo. We investigated the compound's effect on sodium current (I_{Na}) and its possible cardiac antiarrhythmic activity.

Methods: The effect of eugenol on cardiac contractility was investigated using isolated atrium from guinea pig (for isometric force measurements). The compound's effect on I_{Na} was evaluated using human embryonic cell transiently expressing human Nav1.5 and patch-clamp technique.

Key findings: Eugenol caused negative inotropic and chronotropic effects in the atria. In the ex vivo arrhythmia model, eugenol decreased atrial pacing disturbance induced by ouabain. Eugenol reduced the I_{Na} in a concentration-dependent manner. Furthermore, the compound left-shifted the stationary inactivation curve, delayed recovery from inactivation of the I_{Na}, and preferentially blocked the channel in the inactivated state. Importantly, eugenol was able to attenuate the late sodium current. All these aspects are considered to be antiarrhythmic.

Significance: Overall, our findings demonstrate that eugenol has antiarrhythmic activity due, at least in part, to its interaction with Na_v1.5.

1. Introduction

Eugenol is a phenylpropanoid found in the essential oil of aromatic plants, including *Myristica fragrans* Houtt., *Cinnamomum verum* J. Presl, *Ocimum basilicum* L., and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (clove tree) [1]. Several pharmacological activities of eugenol have been reported. The compound exerted vasodilator effects in the rabbit thoracic aorta smooth muscles [2], and ex vivo mesenteric vascular bed [3]. These effects could be attributed to the blockade of voltage-

sensitive Ca²⁺ channels [4]. In normotensive rats, eugenol induced a hypotensive response, which could be related to vascular smooth muscle relaxation [5–6]. In the mammalian ventricular myocardium, eugenol caused a negative inotropic effect [7–9], possibly through inhibition of the L-type Ca²⁺ current [8–9]. Studies have reported the cardioprotective effects of eugenol, likely attributed to its antioxidant and Ca²⁺-antagonist properties [10–13].

Importantly, eugenol is used as a local anesthetic due to its inhibitory effects on voltage-gated Na⁺ channels (Na_v), which are ex-

Abbreviations: DAD, delayed after depolarization; DMSO, dimethyl sulfoxide; SR, sarcoplasmic reticulum; I_{Na}, sodium current; NCX, Na⁺/Ca²⁺ exchanger; Na_v, voltage-gated Na⁺ channels; Ca_v, voltage-gated Ca²⁺ channels

* Corresponding author.

** Correspondence to: A.N.S. Gondim, Laboratório de Biofísica e Farmacologia do Coração, Departamento de Educação (Campus XII), Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Guanambi, Bahia, Brazil.

E-mail addresses: drcampos@unifesp.br (D. Roman-Campos), ansgondim@uneb.br (A.N.S. Gondim).

¹ Contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119761>

Received 11 March 2021; Received in revised form 14 June 2021; Accepted 24 June 2021

0024-3205/© 2021

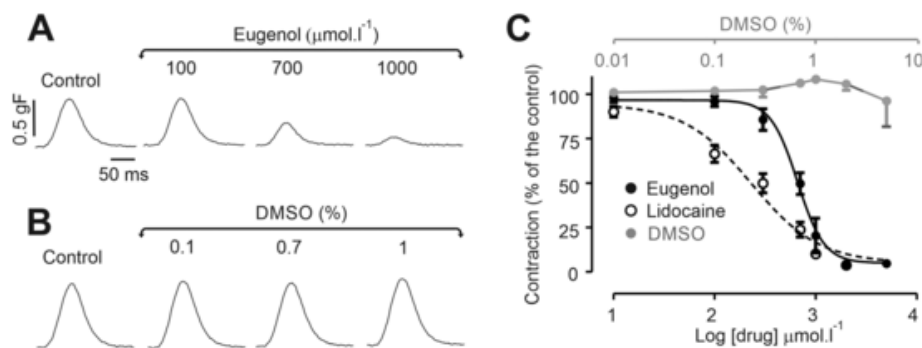


Fig. 1. Effect of eugenol on left atrial contractility. Representative traces of electrically stimulated contractions of atrium exposed to different concentrations of eugenol (A) or DMSO (B). Concentration-response curve (C) of the inotropic effect of the tested drugs (eugenol, N = 6; lidocaine, N = 6; DMSO, N = 5).

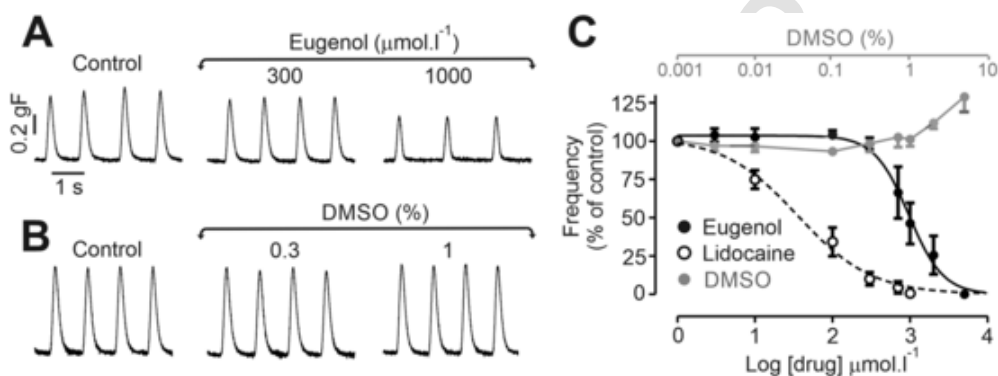


Fig. 2. Effect of eugenol on right atrial frequency. Representative traces of sinus atrial contractions exposed to different concentrations of eugenol (A) or DMSO (B). Concentration-response curve (C) of the chronotropic effect of the tested drugs (eugenol, N = 6; lidocaine, N = 8; DMSO, N = 6).

pressed in nociceptive neurons. Some studies have also reported the effect of eugenol on different subtypes of neuronal Na_v [14–17], but its action on $\text{Na}_v1.5$, the main subtype of Na_v expressed in the mammalian myocardium, remains unclear. In addition, $\text{Na}_v1.5$ displays biophysical and pharmacological properties distinct from other Na_v isoforms [18], which can influence its modulation by eugenol. Here, we tested the hypothesis that eugenol interacts with $\text{Na}_v1.5$ and exerts antiarrhythmic action in the cardiac tissue.

2. Methods

2.1. Animals

Adult male and female guinea pigs, each weighing 400–600 g, were used. Experimental protocols were approved by the animal ethics committee of Bahia State University (number of the license 03/2017).

2.2. Atria experiments

The guinea pigs were euthanized by cervical dislocation and the hearts were isolated. Next, the right and left atria were kept in an isolated organ bath with a modified Tyrode's solution (containing [in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]: 140 NaCl, 5.4 KCl, 0.5 MgCl_2 , 0.33 NaH_2PO_4 , 1.8 CaCl_2 , 11 glucose, 5 HEPES) and continuously gasified with 100% O_2 (pH = 7.4), as previously described [19]. The atrial ends were horizontally suspended by stainless steel rods and stretched to a resting tension of 9.8 mN (1 gF). Only the left atrium was subjected to field electrical stimulation (1 Hz, 100 V, 15 ms). The left atrium was maintained at 36 °C, and the right atrium was kept at room temperature.

To evaluate the action of eugenol on cardiac inotropic and chronotropic effects, the left and the right atria, respectively, were exposed to cumulative concentrations of eugenol (1–5000 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) or vehicle (DMSO, 0.001%–10%). Lidocaine was used as a positive control.

To investigate the effect of eugenol under stimuli, the ouabain-induced arrhythmia protocol was performed (50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), and the time to onset of visible extrasystoles elicited by ouabain was measured in the presence or absence of eugenol in the left atria.

2.3. Cell culture

For patch-clamp experiments, human embryonic kidney (HEK293) cells that do not display macroscopic sodium currents were used. HEK293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium solution (DMEM) (Invitrogen, Burlington, ON) added with 4.5 g/l of D (+)-glucose, 2 g/l of NaHCO_3 , 2.38 g/l of HEPES, 10% fetal bovine serum, and 1% penicillin and streptomycin (pH = 7.4). Cells were then incubated at 37 °C and 5% CO_2 atmosphere. For transfection, Human wild-type $\text{Nav}1.5$ and ΔKPQ cDNAs were used. They were cloned into the BamHI and HindIII restriction sites of the pcDNA3.1 vector (Invitrogen), which was purchased from GenScript (Hong Kong) Limited. During transfection, HEK293 cells (at 60%–80% confluence, cultured in 60-mm cell culture dishes) were incubated for 5 h (at 37 °C and 5% CO_2) in 800 ml Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) containing 4 μl Lipofectamine 2000, 1 μl PLUS™ reagent (Invitrogen), and 1 μg plasmid cDNA. After 5 h of incubation, Opti-MEM was replaced by DMEM. Patch-clamp experiments were carried out after 48 h transfection. The backbone for all SCN5A variants used in our study was the National Center for Biotechnology Information Reference Sequence: XM_006713282.2.

2.4. Patch-clamp measurements

Whole cell patch-clamp was carried out using heterologous expression of human $\text{Na}_v1.5$ channels in HEK293 cells. Membrane currents were recorded using an EPC-10.2 patch-clamp amplifier and PACTH-MASTER acquisition software (HEKA Elektronik, Germany). Trans-

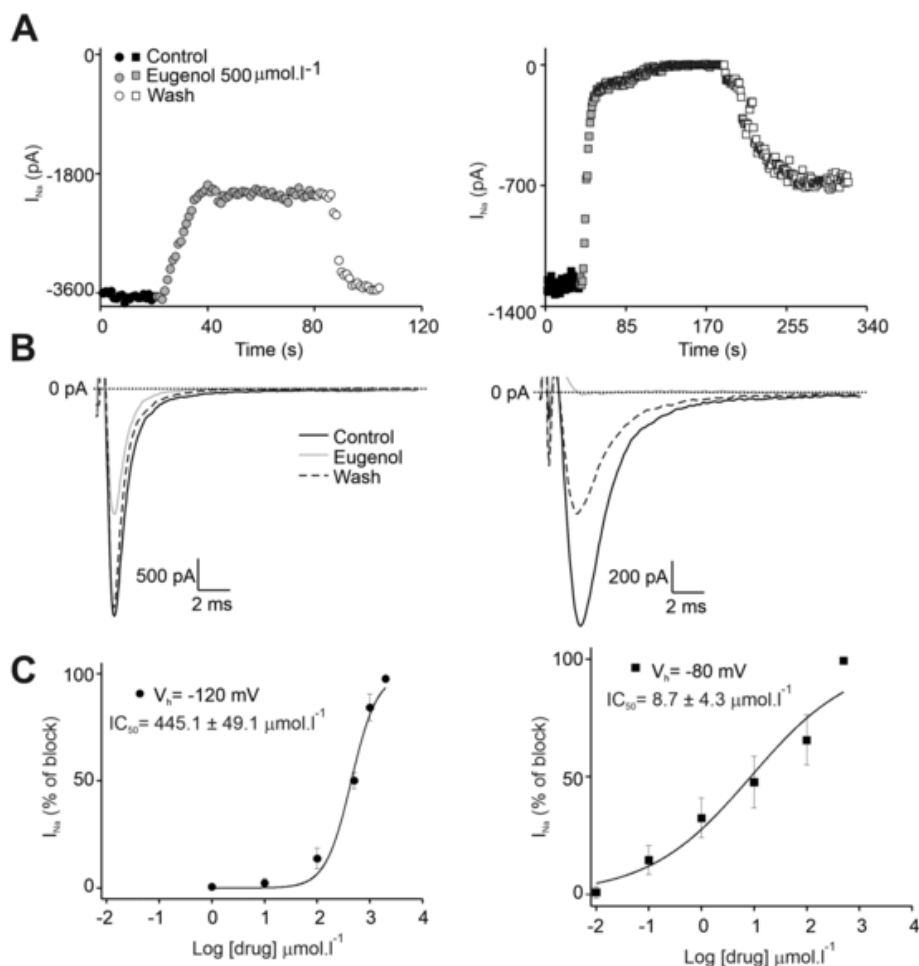


Fig. 3. Effect of eugenol on the peak sodium current (I_{Na}) amplitude. Time course effect of $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ eugenol on the peak I_{Na} at $V_H = -120 \text{ mV}$, left traces, and for $V_H = -80 \text{ mV}$, right traces (A). Representative I_{Na} traces in the control environment (black) and in the presence of $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (light gray) of eugenol at a holding potential (V_H) = -120 mV (B) (left traces) and $V_H = -80 \text{ mV}$ (right traces) (B). (C) Dose-response curve of eugenol on the I_{Na} amplitude when cells were maintained at $V_H = -120 \text{ mV}$ (left), and at $V_H = -80 \text{ mV}$ (right). $n = 5-7$ cells.

fect cells were replated on glass coverslips and mounted on a recording chamber. The bath control solution consisted of (in mM): 130 NaCl_2 ; 1.8 CaCl_2 ; 5 CsCl ; 1.2 MgCl_2 ; 10 HEPES; 5 Glucose; $\text{pH} = 7.4$ added of the corresponding DMSO concentration. Patch pipettes were pulled with a tip resistance of 2.5–3.0 $\text{M}\Omega$ and filled with intracellular solution, containing (in mM): 50 aspartic acid; 60 CsCl ; 2 Na_2ATP ; 11 EGTA; 10 HEPES; 4.27 CaCl_2 ; 1 MgCl_2 ; $\text{pH} = 7.2$. After reaching the whole-cell configuration, we waited 2 min before beginning the experimental protocols, to enforce equilibrium between the intracellular media and pipette solution. Records were low-pass filtered (cut-off frequency 2 kHz) and digitalized at 20 kHz frequency. Only cells with total resistance $< 5 \text{ M}\Omega$ were considered in the analysis to prevent for voltage-clamp errors. All records were performed at room temperature of $22^\circ\text{C}-25^\circ\text{C}$.

Voltage dependency for sodium current activation was recorded by 50 ms square pulses ranging from -80 to $+40 \text{ mV}$, with 3 mV increment and applied at 1 Hz and from a holding potential of -120 mV . Data were fitted with a Boltzmann equation $I = (E_m - E_{rev}) \frac{G_{max}}{1 + e^{\left(\frac{V_a - E_m}{k_a}\right)}}$, where E_{rev} is the calculated reversal potential of the current. The maximum conductance (G_{MAX}) was then used to generate normalized G/G_{MAX} plots, to access the voltage-dependency for current activation activation-voltage relationship, using the modified Boltzmann function $G = \frac{G_{max}}{1 + e^{\left(\frac{E_m - V_a}{k_a}\right)}}$. In these aforementioned equations, (V_a) is the voltage

in which half of the current is activated. (E_m) is the membrane potential and (k_a) is the slope factor.

Voltage-dependent steady-state inactivation was measured in a 50 ms duration test pulse to -20 mV amplitude immediately after a long (2000 ms) conditioning pulse that ranged from -120 to -20 mV , with 5 mV increment at 1 Hz stimulation, with a holding potential of -120 mV . Peak currents from the test pulse were normalized by maximum current (I/I_{MAX}) and fitted using a Boltzmann equation $\frac{I}{I_{max}} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{E_m - V_h}{k_h}\right)}}$, to determine the membrane potential corresponding to half of current inactivation (V_h) and slope factor (k_h), reflecting the steepness of the curve. During voltage dependency for current activation and inactivation protocol, a pN4 protocol was used for leak subtraction, with a leak size of 0.25 from a holding potential of -120 mV , which gives a minimum and maximum leak pulses of -120 mV and -80 mV to ensure no I_{Na} activation during leak calculation.

Recovery from inactivation was recorded as a function of the interval between double-squared pulses (50 and 100 ms) to -20 mV from a holding potential of -120 mV . The interval between pulses varied from 0.1 to 10 ms, with 1 ms increment and; 12 to 94 ms with 2 ms increment, and 100 to 1000 ms with 100 ms increment. Recovery from inactivation was fitted into a monoexponential equation, in the form: $I(t) = A0 + A \exp(-t / \tau)$, where A is the amplitude and τ is the time constant, t is the interval between the I is the current, and t is the time double-squared pulses. $I(t)$ is shown normalized by its respective pre-pulse.

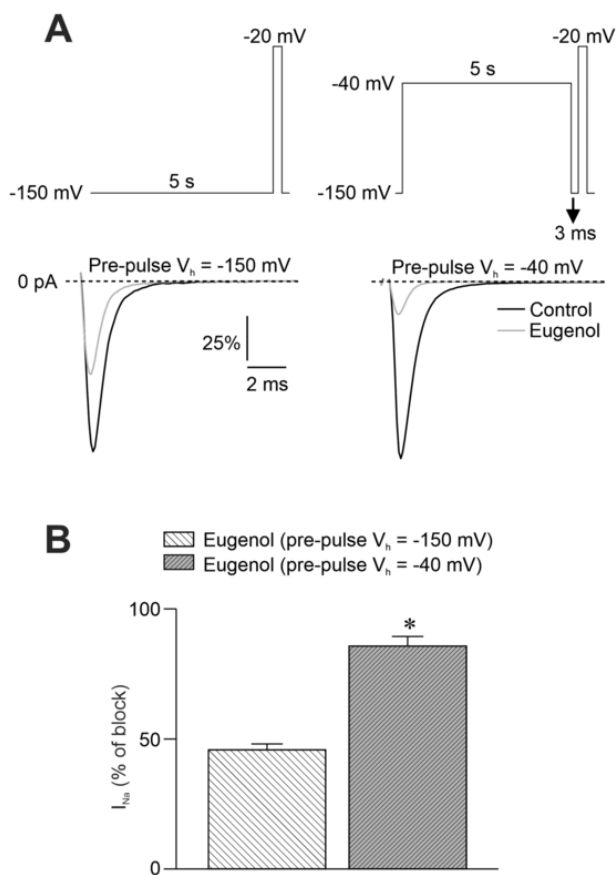


Fig. 4. Affinity of resting and inactivated states of NaV1.5 channels for eugenol. (A) Upper figure is the protocol used to perform the experiment. Below, in the left and the right, are the representative traces for pre-pulse for membrane potential at -150 mV and -40 mV, respectively. (B) Bar graph representing mean \pm S.E.M. percentage block I_{Na} blockage before and after exposure to eugenol. For pre pulse at -40 mV (gray bar, $n = 9$). For pre pulse at -150 mV (white bar, $n = 5$).

Closed-state inactivation of I_{Na} was evaluated through a 50 ms duration test pulse to -20 mV amplitude immediately after a conditioning pulse to -90 mV with variable time (2–600 ms), applied every 2 s from a holding potential of -150 mV.

The affinity of eugenol in blocking I_{Na} at the resting and inactivated states of Na_v1.5 channel was investigated by a test pulse (-20 mV, 50 ms, from a holding potential of -150 mV). Test pulse was applied after a long conditioning pulse (5000 ms) to -40 mV to inactivate most channels followed by a fast, 3 ms return to the holding potential, to allow drug-free channels to recover from inactivation. Blockage at inactivated state was compared with the closed state, in which cells were kept at -150 mV during the conditioning pulse.

The late sodium current ($I_{Na-Late}$) was averaged from the area corresponding to the area between 280 and 300 ms of the step pulse to -20 mV from a holding potential of -120 mV, at 1 Hz stimulation. $I_{Na-Late}$ was the plotted variation of the area before (control, drug free) and after eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) or eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) + TTX ($30 \mu\text{M}$) application.

Importantly, all experimental protocols were recorded before and after reaching a stable effect of eugenol, and eugenol effects were compared with control condition using repetitive measurements from the same cells.

Eugenol (99% of purity) was purchased from Biodinamica (Brazil).

2.5. Statistics

Data are presented as mean \pm standard error of the mean. GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software, USA) was used for statistical analysis. Comparisons between two experimental groups were done using paired and unpaired Student's "t" tests, depending on the case. For comparisons of more than two groups, one-way or two-way analysis of variance followed by Tukey's post-test was used. The significance level to reject the null hypothesis was $p < 0.05$. N represents the number of animals, and n the number of cells.

3. Results

3.1. Ex vivo action of eugenol on the heart tissue

To better understand how eugenol acts on the heart tissue, we first evaluated its effects on the isolated left atrium. To measure the inotropic effect, the left atrium was exposed to eugenol (1 – $5000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). As observed in the contractility tracings (Fig. 1A and B), eugenol promoted a reduction in the atrial force compared with the control. Fig. 1C presents the concentration-effect curve of eugenol on the left atrium. From the figure, it is clear that the compound induced a concentration-dependent negative inotropic effect, with an IC_{50} of $741.8 \pm 74.3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ and a maximum effect of $96.9\% \pm 1.2\%$ ($N = 6$). Next, the effect of the vehicle (DMSO) on cardiac contractility was evaluated. The left atrium was challenged with increasing concentrations of DMSO (0.001% – 4.8%), which corresponded to DMSO concentrations achieved during the contraction experiments with eugenol. DMSO had no significant effect on atrial contractility ($N = 5$) at any tested concentrations (Fig. 1B and C). Lidocaine (positive control) reduced the atrial contractility, with an IC_{50} of $230.7 \pm 30.4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($N = 6$), statistically different from that of eugenol ($p < 0.05$).

To investigate the chronotropic effect, the right atrium in the sinus rhythm was treated with increasing concentrations of eugenol (1 – $5000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). As is shown by the representative traces of the right atrium contraction curves in Fig. 2A and B, eugenol reduced the fire rate at $\geq 1000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. The concentration-effect curve of eugenol on atrial chronotropic effect can be observed in Fig. 2C. Eugenol had a concentration-dependent negative chronotropic effect, with an IC_{50} of $1455.6 \pm 365.1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ and a maximal effect of 100% ($N = 6$), in reducing the frequency of right atrial spontaneous contraction. DMSO did not statistically alter the atrial contraction rate compared with the control (Fig. 2C). Lidocaine (positive control) had greater potency ($\text{IC}_{50} = 35.6 \pm 13.1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $N = 8$, $p < 0.05$) to reduce atrial frequency than eugenol.

3.2. Eugenol interaction with human Na_v1.5 transiently expressed in HEK cells

As evidenced by our ex vivo experiments, eugenol is able to attenuate atrial contraction. Previous studies demonstrate that eugenol reduces calcium current in cardiomyocytes. Also, earlier studies reported that eugenol could block several subtypes of neuronal Na_v isoforms [14–15]. However, Na_v1.5, which is the major isoform of Na_v in the mammalian heart, displays significant differences in the primary structure and biophysical and pharmacological properties from other neuronal Na_v [18]. Thus, we hypothesize that eugenol is also able to attenuate I_{Na} and it may contribute to reduced atrial function. Thus, using HEK cells transiently expressing human Nav1.5 we evaluated the interaction of the compound with Na_v1.5.

Eugenol was found to reduce the I_{Na} peak amplitude in a concentration-dependent manner (Fig. 3A–C). In addition, the maximum effect for each tested concentration was reached quickly, as is displayed in the time course effect of eugenol (Fig. 3B). When cells were exposed to increasing concentrations of eugenol (from 0.01 to $2.000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), a con-

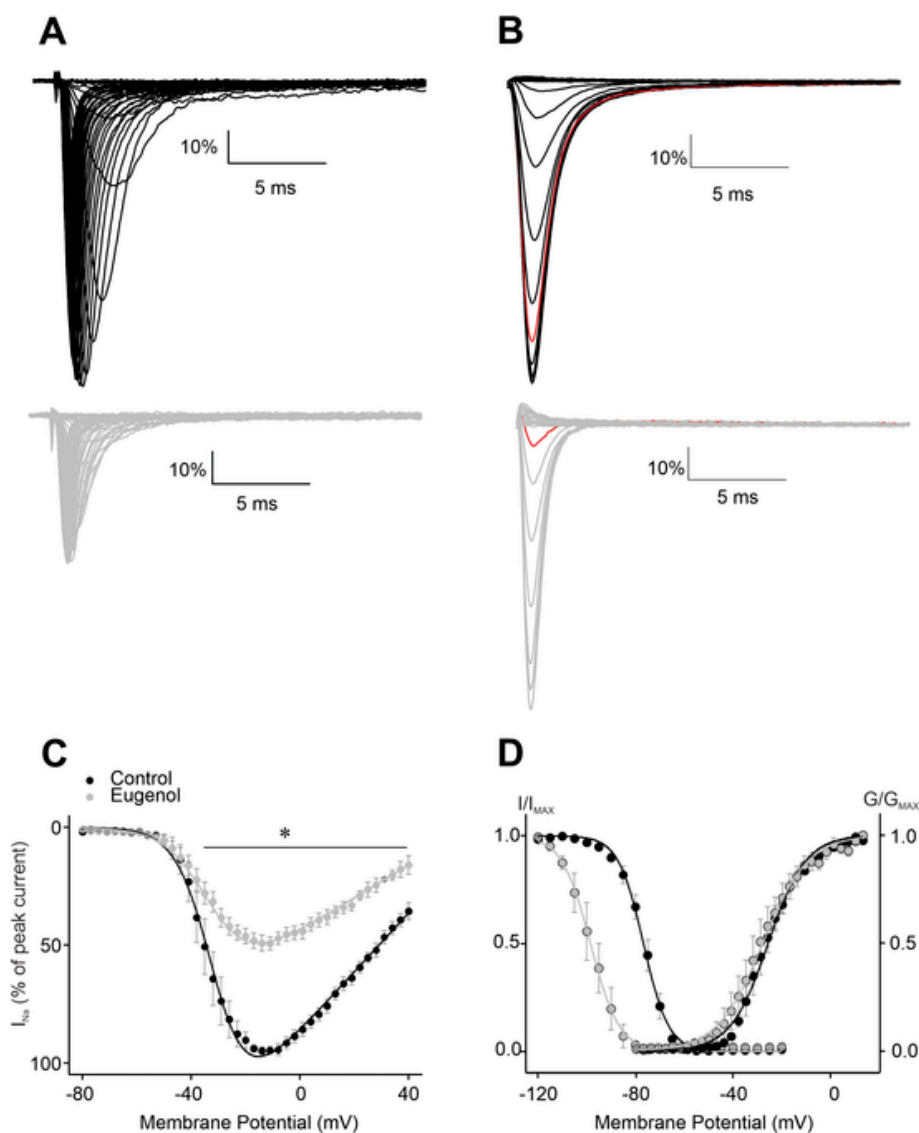


Fig. 5. Effect of eugenol on voltage-dependent sodium current (I_{Na}) activation and inactivation. (A) Representative traces of I_{Na} activation normalized by peak sodium current before (black, upper traces) and after eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) superfusion (gray, lower traces). (B) Voltage dependent for I_{Na} inactivation normalized by peak sodium current before (black, upper traces) and after eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) superfusion (gray, lower traces). The red traces represents normalized I_{Na} evoked with a pulse at -90 mV from a holding potential of -120 mV (C) Current-voltage relationship in the absence (black circles) or presence of eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), normalized by peak I_{Na} prior eugenol (gray circles, $n = 6$). (D) Voltage-dependent activation (G/G_{MAX}) and inactivation (I/I_{MAX}) of the I_{Na} in the absence (black circles) or presence (gray circles, $n = 6$) of eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

concentration-response curve of I_{Na} peak inhibition was obtained. Interaction of drugs with sodium channel depends on the channel state, i.e., closed, open, and inactivated. Thus, we composed a concentration-response curve of eugenol in HEK cells expressing human Nav1.5 at a holding potential (V_H) of -120 and -80 mV , which favor a closed and partially inactivated state, respectively. We found that there is an evident dependency of resting membrane potential in the potency of eugenol to block I_{Na} . Once cell membrane was holding at a V_H of -120 mV , eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) reduced approximately 50.1% of the I_{Na} amplitude (Fig. 3A). This effect was partially reversible since after washout peak I_{Na} was $93.7\% \pm 5.9\%$ ($n = 4$, $p < 0.05$). Interestingly, when V_H was set at -80 mV , eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) attenuated almost 100% of the I_{Na} amplitude (Fig. 3B). The eugenol IC_{50} for I_{Na} inhibition at V_H of -120 mV was $445.1 \pm 49.2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Fig. 3C, filled circles). Meanwhile, at V_H of -80 mV , the potency of eugenol in inhibiting the I_{Na} was $8.7 \pm 4.3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Fig. 3C, filled squares). These findings indicate that eugenol-dependent inhibition of the I_{Na} preferentially targets

the inactivated state of $\text{Na}_v1.5$ and may partially explain its antiarrhythmic activity in the guinea-pig myocardium.

We next determined whether eugenol indeed has a higher affinity for the inactivated rather than the resting state of $\text{Na}_v1.5$ and illustrated the results of these experiments in Fig. 4. A voltage protocol was used to inactivate (5-s pulse to -40 mV), but not open, most channels in the absence and presence of drug. A test pulse to -20 mV , preceded by a 3-ms return to the negative (-150 mV) holding potential to allow drug-free, but not drug-bound, channels to recover from inactivation was applied to assay available channels. The effect of $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ of eugenol to block of channels during this test pulse with and without conditioning pulses provides an estimate of rested state (no conditioning pulse, $V_m = -150 \text{ mV}$, Fig. 4A, top left) and inactivated state (with conditioning pulse, $V_m = -40 \text{ mV}$, Fig. 4A, top right) channel block (Fig. 4A, top panel show the protocol). Fig. 4A, left and right traces are representative I_{Na} recordings, using pre-conditioning pulse at $V_m = -150 \text{ mV}$ (left traces) and at $V_m = -40 \text{ mV}$ (right traces). $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ of

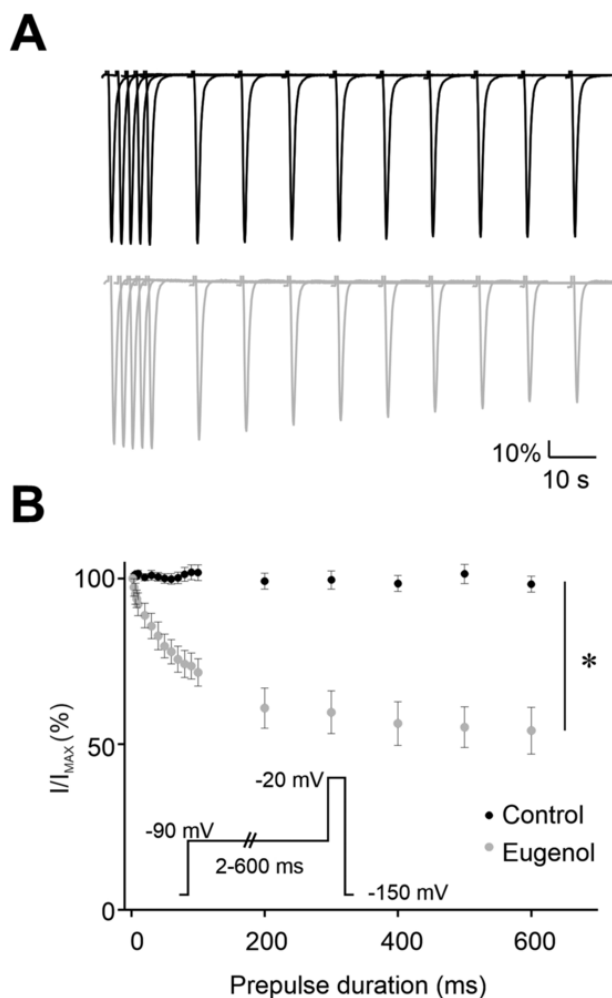


Fig. 6. Closed-state inactivation of sodium current (I_{Na}). A: Representative traces of the first 14 pulses, from the control I_{Na} (upper panel) and in the presence of $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ of eugenol (lower panel), obtained by the protocol displayed in the inset of B. B: Closed-state inactivation of $\text{CTR}\text{-}I_{Na}$ (black filled circles, $n = 6$), and in the presence of Eugenol (gray filled circles, $n = 6$, * $p < 0.05$), assessed using prepulses of -90 mV for variable durations (2–600 ms).

eugenol has a higher affinity for the inactivated form of Na^+ channel than in the resting state of the channel (Fig. 4B).

Next, to provide additional mechanistic insights into the effects of eugenol on the biophysical properties of the I_{Na} , we investigated the voltage-dependent activation of the I_{Na} in the absence (Fig. 5A, top-left panel) or presence of eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (lower-left panel). Although the peak I_{Na} was reduced in several tested membrane potentials (Fig. 5C), eugenol did not alter the voltage-dependency for I_{Na} activation (Fig. 5D). Fig. 5D presents the comparable activation curves (G/G_{MAX} , $V_{50} = -30.7 \pm 2.8 \text{ mV}$ in control vs $-31.1 \pm 2.9 \text{ mV}$ in the presence of eugenol, $n = 6$, $p > 0.05$). In line with this idea, time to peak of I_{Na} was not altered (Supplementary Fig. 1A). However, the steady-state inactivation curve (Fig. 5D) was left-shifted in the presence of the eugenol (I/I_{MAX} , $V_{50} = -76.3 \pm 1.4 \text{ mV}$ in control vs $-97.9 \pm 2.8 \text{ mV}$ in the presence of eugenol, $n = 6$, $p < 0.05$). Interestingly, time to 50% of I_{Na} decay was accelerated in a range of tested membrane potential (Supplementary Fig. 1B), which further support modulation of the inactivation process of the $\text{Na}_v1.5$ by eugenol. Due to severe left shift in the inactivation curve, we decided to investigate whether or not the closed state inactivation of sodium channel was enhanced after cell exposure to eugenol. The residual sodium current, assessed after prepulses of -90 mV for increased time from 2 to 600 ms,

was markedly attenuated after exposure cell to eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) when compared with to that of I_{Na} without the drug. The results are illustrated by the representative traces (Fig. 6A), and composed data (Fig. 6B). Thus, the degree of closed state inactivation in the presence of eugenol was markedly enhanced in comparison to absence of the drug.

To further understand the biophysical mechanisms involved in the action of eugenol on the I_{Na} , the recovery from I_{Na} inactivation was determined in the absence or presence of the compound. Eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) delayed I_{Na} recovery from inactivation, as demonstrated in the representative traces (Fig. 7A) and by the interpulse interval traces (Fig. 7B). The relative I_{Na} recovery over a range of test pulses was fitted with a monoexponential equation and time constants were $3.6 \pm 0.4 \text{ ms}$ and $12.1 \pm 2.9 \text{ ms}$ ($n = 6$, $p < 0.05$) (Fig. 7C) before and after eugenol exposure, respectively, suggesting that eugenol slows the I_{Na} recovery from inactivation. Importantly, eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) displayed a small, but significant, use-dependency effect once cells are paced at 5 Hz, but not at 2 Hz (see Supplementary Fig. 2).

3.3. Antiarrhythmic effect of eugenol on the heart tissue

The patch-clamp experiments revealed that eugenol is able to interact with $\text{Na}_v1.5$. Hence, we investigated the antiarrhythmic properties of eugenol in preventing or reverting arrhythmias in an arrhythmic model elicited by ouabain, a classical Na^+/K^+ ATPase blocker.

Fig. 8A is a representative full recording of left atrial contractility in the presence of ouabain ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), and Fig. 8C in the presence of ouabain ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) + eugenol ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Both recordings show a positive inotropic effect, reaching its maximum effect in about 160 s (Fig. 8B upper panel, zoomed for ouabain). Ouabain-induced atrial tachyarrhythmia after 230 s, with the appearance of several extrasystoles (Fig. 8B, lower panel [zoomed]), which were not observed in ouabain + eugenol (Fig. 8D, lower panel [zoomed]). An increased atrial diastolic tension, as visualized at the end of the trace of Fig. 8A and C, was also observed, and it was significant when compared to control (Fig. 8E).

As expected, ouabain-induced atrial tachycardia in 9 out of 10 tested atria (Fig. 8B, lower panel), with a mean time to onset of $120.2 \pm 19.6 \text{ s}$. When atria were pretreated for 10 min with eugenol ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $N = 5$) or lidocaine ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $N = 6$), ouabain did not induce tachycardia in all the investigated atria, suggesting that eugenol has an antiarrhythmic activity. Although, maximal force increment caused by ouabain was not prevented by eugenol (Fig. 8F). Moreover, DMSO did not have a significant antiarrhythmic activity, because 6 of 7 atria tested displayed tachycardia in the presence of 0.3% DMSO (same concentration reached in the experiments with $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ eugenol). The time to onset of tachycardia in the presence of 0.3% DMSO was $168.9 \pm 49.5 \text{ s}$ ($N = 6$), which was not significantly different from the control ($120.2 \pm 19.6 \text{ s}$, $N = 8$, $p > 0.05$). These findings suggest that DMSO did not change ouabain-induced arrhythmia and, therefore, did not interfere with eugenol-induced antiarrhythmic effect.

3.4. Eugenol blocks late sodium current

Ouabain-induced arrhythmia is attributed to several mechanisms and enhancing sustained component of sodium current, the $I_{\text{Na-Late}}$, is involved [16–18]. To explore the hypothesis we used the prototype mutant that displays clinically relevant sustained $I_{\text{Na-Late}}$, the ΔKPQ mutation [19]. Fig. 9 summarizes our findings.

To better visualize the presence of $I_{\text{Na-Late}}$, it is important to show currents at a high gain. Moreover, $I_{\text{Na-Late}}$ is plotted by normalizing with peak I_{Na} to better visualize its contribution over total I_{Na} . Fig. 9A (left traces) displays the representative superimposed I_{Na} traces recorded at -20 mV during 400 ms, from a holding potential of -120 mV , of HEK293 cells and normalized by peak Na^+ current in WT sodium channel and (right traces) for ΔKPQ sodium channel. The inset for both

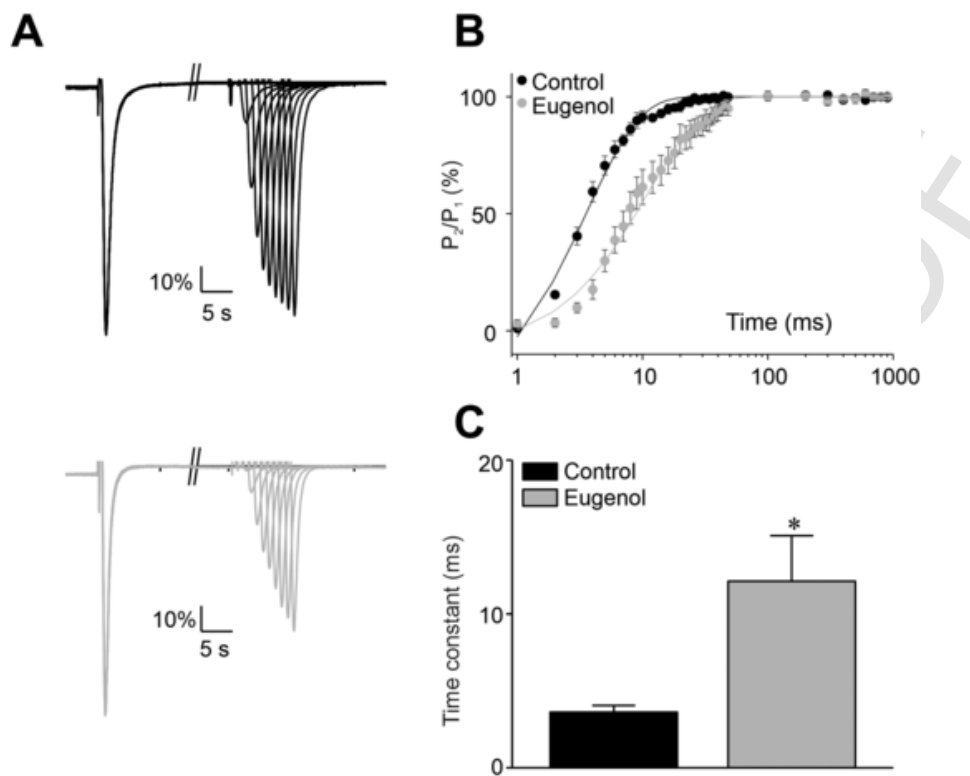


Fig. 7. Recovery from inactivation for Na^+ channels. (A) Time course of recovery from inactivation for sodium current (I_{Na}) was examined using a two-pulse protocol and representative traces prior (upper trace) and after (down trace) challenge cells with $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ of eugenol. (B) Normalized current is plotted as a function of the time corresponding to the interval between the test and conditioning pulses. Lines are best fitted to single-exponential equations. Black circles, before eugenol, and Gray circles, after $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ of eugenol. (C) Time constant of I_{Na} recovery before and after exposure to eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). $n = 6$ cells ($*p < 0.05$).

traces showed a high gain visualization of the sustained component of sodium current. As shown by the traces, WT sodium current showed neither eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nor TTX ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) + eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) sensitive $I_{\text{Na-Late}}$. TTX is a toxin able to block $I_{\text{Na-Late}}$. However, ΔKPQ sodium current was sensitive to eugenol and eugenol + TTX $I_{\text{Na-Late}}$. Fig. 9B shows the time course effect of eugenol and eugenol + TTX on $I_{\text{Na-Late}}$ in WT (left trace) and ΔKPQ (right trace) sodium current. Fig. 10C summarizes our findings. We measured the area over 280 to 300 ms of the square pulse to measure the $I_{\text{Na-Late}}$. Next, we calculated the difference between sodium current traces without eugenol and with eugenol or eugenol + TTX. Thus, we can conclude that eugenol is able to block $I_{\text{Na-Late}}$.

4. Discussion

In this study, we investigated biophysical and pharmacological effects of eugenol on cardiac I_{Na} and its potential antiarrhythmic properties. Eugenol induced negative inotropic and chronotropic effects in isolated atrial preparations. HEK cells transiently expressing human $\text{Nav}_v1.5$ were also used to investigate the pharmacological and biophysical aspects of eugenol interaction with $\text{Nav}_v1.5$. Notably, eugenol induced a concentration-dependent reduction in peak I_{Na} , with a negative shift of the steady-state inactivation curve, blocks with higher potency the inactivated and closed state inactivation states of the channel, delayed recovery from inactivation, displayed antiarrhythmic activity in isolated atria, and blocked $I_{\text{Na-Late}}$, a highly arrhythmogenic component of sodium current. Overall, our experiments provide evidence that eugenol interacts with $\text{Nav}_v1.5$, which may partially explain its antiarrhythmic properties.

Eugenol is a multichannel blocker and acts as a Ca^{2+} channel blocker in ventricular cardiomyocytes, with IC_{50} values ranging from 187 to $226 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [9,20]. The reduction of Ca^{2+} current could explain the negative inotropic effect observed in the isolated atria. However, in

our study, the IC_{50} for the negative inotropic effect of eugenol was about 6 times higher than that described in a previous study ($\text{IC}_{50} = 741.8$ vs $127 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) [9]. Several factors may account for such discrepancy: 1) differences in excitation-contraction coupling between the atria and the ventricles. 2) The experimental conditions, such as temperature, bath solution, resting tension, stimulating frequency, and vehicle, used for solubilization.

As a nonspecific channel blocker, in addition to its ability to block Ca^{2+} current, eugenol reduced peak I_{Na} in neuronal isoforms of Nav [14,21]. We, therefore, decided to investigate the compound's effects on the cardiac $\text{Nav}_v1.5$ isoform.

The compound's effect on peak I_{Na} was dependent on the resting membrane potential. At more negative holding potentials ($V_{\text{H}} = -120$ mV), the IC_{50} for peak I_{Na} inhibition was about $445 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, almost 2 times higher than the concentration required to provide antiarrhythmic activity on isolated left atria ($100\text{--}300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Thus, the antiarrhythmic activity of eugenol seems to be more potent in more depolarized heart tissues. Indeed, when HEK cells expressing $\text{Nav}_v1.5$ were kept at a more depolarized state ($V_{\text{H}} = -80$ mV), mimicking the membrane potential of atrial cells, an increase of about 49 times in eugenol potency was observed in reducing the I_{Na} peak when compared with $V_{\text{H}} = -120$ mV. Also, eugenol blocks the channel in the closed state inactivation state, reinforcing the idea that eugenol is likely to have a differential effect throughout the heart, depending on the membrane potential of cardiomyocytes.

Considering the biophysical aspects of eugenol's action on I_{Na} , we did not observe any clear effect on the voltage-dependent activation. Nonetheless, eugenol slowed the recovery of I_{Na} inactivation, which would increase, at least theoretically, the refractory period in the heart tissue, contributing to the potential antiarrhythmic activity of the compound. Similar results were found in neuronal Nav [15]. Combining our results, it is reasonable to assume that eugenol-induced antiarrhythmic activity is, in part, due to its effects on $\text{Nav}_v1.5$.

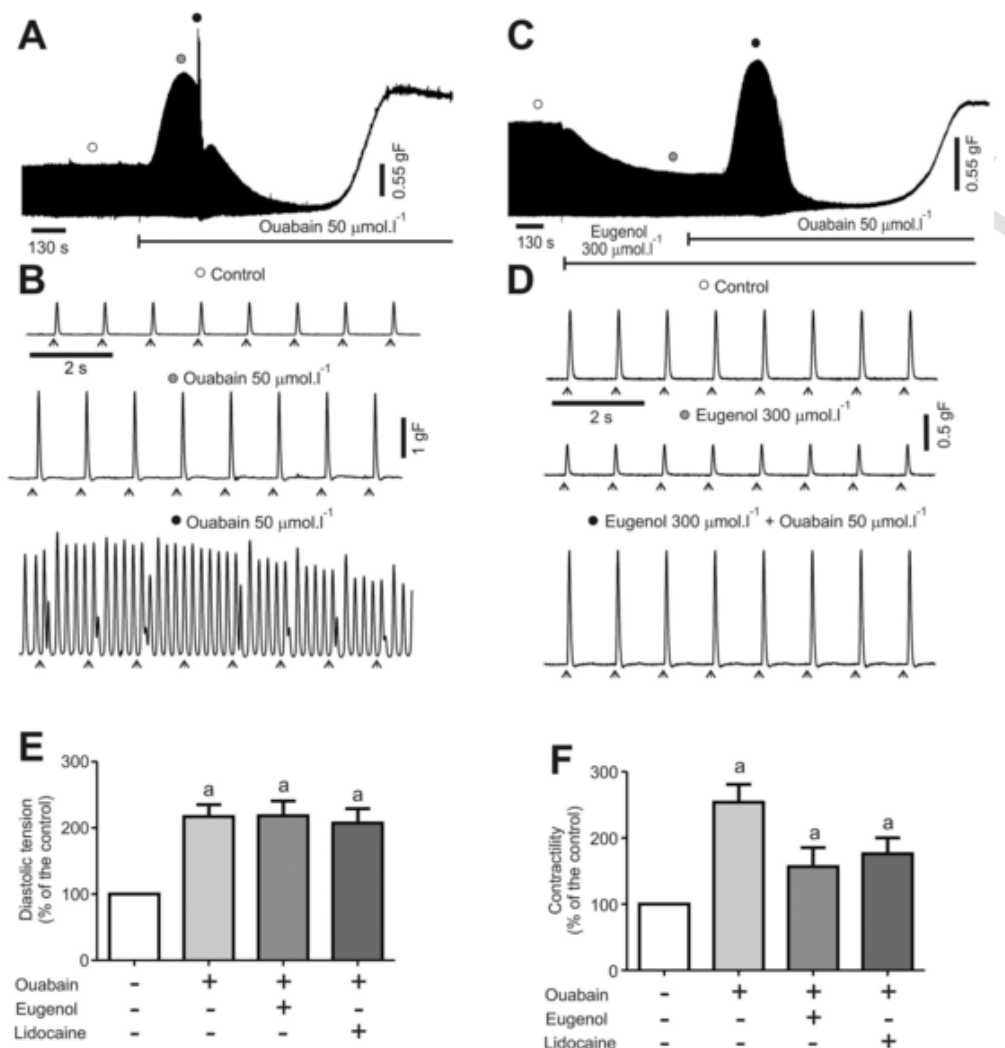


Fig. 8. Effect of eugenol on the ouabain-induced left atrial arrhythmia. (A) Representative time course of atrial contraction prior and after ouabain exposure ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). (B) Expanded sections from panel (A). (C) Representative time course of atrial contraction prior and after ouabain ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) + eugenol exposure ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). (D) Expanded sections from panel (C). The arrows indicate time when the electrical stimuli were delivered. (E) Effect of eugenol and lidocaine on the increased diastolic tension induced by ouabain. “a” indicates that there was a statistically significant difference ($p < 0.05$) when compared to the control, but not when compared to each other. (F) Effect of eugenol and lidocaine on the positive inotropic activity of ouabain. “a” indicates that there was a statistically significant difference ($p < 0.05$) when compared to the control, but not when compared to each other. (Eugenol $N = 6$, lidocaine $N = 6$, ouabain $N = 10$.)

Cardioprotective effects of eugenol were already reported in a model of isoproterenol-induced myocardium infarction in rats [22]. Pretreatment with eugenol (50 mg/kg) prevented isoproterenol-induced ST elevation. In our study, we explored the potential antiarrhythmic properties of eugenol using the ouabain-induced arrhythmia model. Ouabain-induced arrhythmias are based on the well-described inhibitory effect of the drug on the Na^+/K^+ pump, leading to primary cytoplasmic Na^+ accumulation and a secondary Ca^{2+} overload that is followed by rhythmic disturbances [23]. Na^+ overload disrupts the electrochemical gradient, which induces the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) to work in a reverse mode, transporting Ca^{2+} from the extracellular to the intracellular medium. The arrhythmogenic effects of ouabain occur mostly due to a Ca^{2+} overload in the sarcoplasmic reticulum (SR) [24,25]. The accumulation of Ca^{2+} in the SR increases the probability of the spontaneous release of Ca^{2+} to the cytosol, facilitating the generation of arrhythmogenic delayed after depolarizations [26–29]. Ouabain induces $I_{\text{Na-Late}}$ in cardiomyocytes due to calcium overload, and $I_{\text{Na-Late}}$ also contributes to the arrhythmogenic phenomena induced by ouabain [16–18].

In the isolated atria, eugenol delayed the onset of arrhythmias and the time required to induce fibrillation. Importantly, eugenol

($300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) abolished tachycardia in all atria that developed the phenomena after exposure to ouabain, although $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ of eugenol did not prevent the positive inotropic effect of ouabain. Also, when we evaluate the effect of eugenol on $I_{\text{Na-Late}}$ induced by a prototype sodium channel mutation able to induce $I_{\text{Na-Late}}$, and associated with Long QT type 3 syndrome [19], we observed that eugenol ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) completely abolished $I_{\text{Na-Late}}$. Thus, these findings support the hypothesis that eugenol has antiarrhythmic activity due to blockage of peak and late component of sodium current. However, we may not rule out possible antiarrhythmic activity due to simultaneous blockage of Ca_v .

5. Conclusion

Altogether, our findings provide evidence that eugenol reduces overall heart excitability, and prevents ouabain-induced arrhythmias. These findings are partially attributed to the interaction of eugenol with $\text{Na}_v1.5$ and blockage of peak I_{Na} and $I_{\text{Na-Late}}$. Our study will contribute to potentially expanding the clinical use of eugenol from a local anesthetic, for example, to an agent for treating arrhythmic syndromes, although additional *in vivo* studies are needed to determine this possibility.

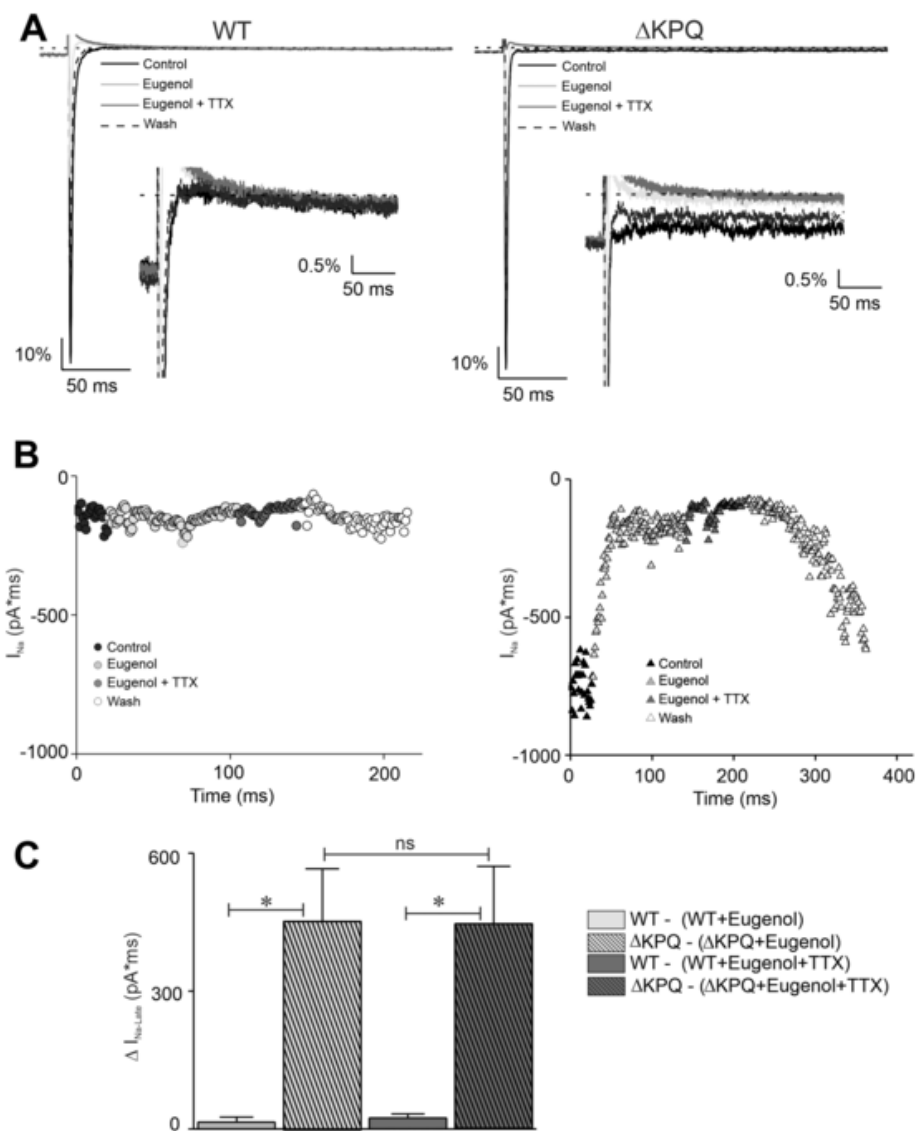


Fig. 9. Whole-cell wild type (WT, A, left traces) and mutant (ΔKPQ , A, right traces) sodium current (I_{Na}) at -20 mV (300 ms pulse applied from a holding potential of -120 mV potential at 1 Hz). Current traces were normalized by peak I_{Na} prior exposure to eugenol. Current superimposed at low (left) and high (inset) gain is shown. (B) Time course effect of eugenol on mean late sodium current area ($I_{Na-Late}$) area for the last 20 ms of the test pulse for wild type (WT, B, left traces) and mutant (ΔKPQ , B, right traces). (D) Bar graph representing mean \pm S.E.M. late sodium current area for the last 20 ms of the test pulse for WT ($n = 5$) and ΔKPQ ($n = 6$) (* $p < 0.05$).

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119761>.

Funding

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP project #2019/21304-4), Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and Internal Program of Initiation in sciences (PICIN) of Universidade do Estado da Bahia. A. Santos-Miranda holds a grant from São Paulo Research Foundation (FAPESP #2018/22830-9). J.V. Joviano-Santos holds a grant from São Paulo Research Foundation (FAPESP #2018/20777-3). Roman-Campos is CNPq fellow (#304257/2020-6).

Declaration of competing interest

The authors declare no competing interests.

References

- [1] G.P. Kamatou, I. Vermaak, A.M. Viljoen, Eugenol—from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule, *Molecules* 17 (2012) 6953–6981, <https://doi.org/10.3390/molecules17066953>.
- [2] H. Nishijima, R. Uchida, K. Kameyama, N. Kawakami, T. Ohkubo, K. Kitamura, Mechanisms mediating the vasorelaxing action of eugenol, a pungent oil, on rabbit arterial tissue, *Jpn. J. Pharmacol.* 79 (1999) 327–334, <https://doi.org/10.1254/jjp.79.327>.
- [3] D.N. Criddle, S.V.F. Madeira, R. Soares de Moura, Endothelium-dependent and -independent vasodilator effects of eugenol in the rat mesenteric vascular bed, *J. Pharm. Pharmacol.* 55 (2003) 359–365, <https://doi.org/10.1211/002235702694>.
- [4] C.E.N. Damiani, L.V. Rossoni, D.V. Vassallo, Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta, *Vasc. Pharmacol.* 40 (2003) 59–66, [https://doi.org/10.1016/s1537-1891\(02\)00311-7](https://doi.org/10.1016/s1537-1891(02)00311-7).
- [5] S. Lahlou, L.F.L. Interaminense, P.J.C. Magalhães, J.H. Leal-Cardoso, G.P. Duarte, Cardiovascular effects of eugenol, a phenolic compound present in many plant essential oils, in normotensive rats, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 43 (2004) 250–257, <https://doi.org/10.1097/00005344-200402000-00013>.
- [6] D. Peixoto-Neves, Q. Wang, J.H. Leal-Cardoso, L.V. Rossoni, J.H. Jaggar, Eugenol dilates mesenteric arteries and reduces systemic BP by activating endothelial cell TRPV4 channels, *Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 3484–3494, <https://doi.org/10.1111/bph.13156>.
- [7] F.D. Sticht, R.M. Smith, Eugenol: some pharmacologic observations, *J. Dent. Res.* 50 (1971) 1531–1535, <https://doi.org/10.1177/00220345710500062801>.

- [8] C.E.N. Damiani, C.M. Moreira, H.T. Zhang, T.L. Creazzo, D.V. Vassallo, Effects of eugenol, an essential oil, on the mechanical and electrical activities of cardiac muscle, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 44 (2004) 688–695, <https://doi.org/10.1097/00005344-200412000-00011>.
- [9] O. Sensch, W. Vierling, W. Brandt, M. Reiter, Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: comparison of β -caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine, *Br. J. Pharmacol.* 131 (2000) 1089–1096, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703673>.
- [10] R. Choudhary, K.P. Mishra, C. Subramanyam, Interrelations between oxidative stress and calcineurin in the attenuation of cardiac apoptosis by eugenol, *Mol. Cell. Biochem.* 283 (2006) 115–122, <https://doi.org/10.1007/s11010-006-2386-3>.
- [11] R. Choudhary, K.P. Mishra, C. Subramanyam, Prevention of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by eugenol, an antioxidant, *Indian J. Clin. Biochem.* 21 (2006) 107–113, <https://doi.org/10.1007/BF02912923>.
- [12] A.A. Fouad, M.T. Yacoubi, Mechanisms underlying the protective effect of eugenol in rats with acute doxorubicin cardiotoxicity, *Arch. Pharm. Res.* 34 (2011) 821–828, <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0516-2>.
- [13] P. Binu, N. Priya, S. Abhilash, R.C. Vineetha, R.H. Nair, Studies on curative efficacy of monoterpene eugenol on anti-leukemic drug arsenic trioxide induced cardiotoxicity, *Biomed. Pharmacother.* 91 (2017) 559–566, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.087>.
- [14] C.-K. Park, H.Y. Li, K.-Y. Yeon, S.J. Jung, S.-Y. Choi, S.J. Lee, S. Lee, K. Park, J.S. Kim, S.B. Oh, Eugenol inhibits sodium currents in dental afferent neurons, *J. Dent. Res.* 85 (2006) 900–904, <https://doi.org/10.1177/154405910608501005>.
- [15] J.S. Cho, T.H. Kim, J.M. Lim, J.-H. Song, Effects of eugenol on Na currents in rat dorsal root ganglion neurons, *Brain Res.* 1243 (2008) 53–62, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.030>.
- [16] K. Hoyer, Y. Song Y, J. Balschi, J.S. Ingwall, L. Belardinelli, J.C. Shryock, D. Wang, D. Phan, Reducing the late sodium current improves cardiac function during sodium pump inhibition by ouabain, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 337 (2) (2011 May) 513–523.
- [17] D. Soliman, L. Wang, K.S.C. Hamming, W. Yang, M. Fatehi, C.C. Carter, A.S. Clanachan, P.E. Light, Late sodium current inhibition alone with ranolazine is sufficient to reduce ischemia- and cardiac glycoside-induced calcium overload and contractile dysfunction mediated by reverse-mode sodium/calcium exchange, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343 (2) (2012 Nov) 325–332.
- [18] Y. Wu, L. Wang, J. Ma, Y. Song, P. Zhang, A. Luo, C. Fu, X. Wang, J.C. Shryock, L. Belardinelli, Z. Cao, Protein kinase C and Ca(2+) -calmodulin-dependent protein kinase II mediate the enlarged reverse INCX induced by ouabain-increased late sodium current in rabbit ventricular myocytes, *Exp. Physiol.* 100 (4) (2015 Apr 1) 399–409.
- [19] P.B. Bennett, K. Yazawa, N. Makita, A.L. Jr George, Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia, *Nature* 376 (1995) 683–685, <https://doi.org/10.1038/376683a0>.
- [20] J. Magyar, N. Szentandrásy, T. Bányász, L. Fülöp, A. Varró, P.P. Nánási, Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes, *Eur. J. Pharmacol.* 487 (2004) 29–36, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.01.011>.
- [21] C.-K. Park, K. Kim, S.J. Jung, M.J. Kim, D.K. Ahn, S.-D. Hong, J.S. Kim, S.B. Oh, Molecular mechanism for local anesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system, *Pain* 144 (2009) 84–94, <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.03.016>.
- [22] K. Mnafigui, R. Hajji, F. Derbali, A. Gammoudi, G. Khabbabi, H. Ellefi, N. Allouche, A. Kadri, N. Gharsallah, Anti-inflammatory, antithrombotic and cardiac remodeling preventive effects of eugenol in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rat, *Cardiovasc. Toxicol.* 16 (2016) 336–344, <https://doi.org/10.1007/s12012-015-9343-x>.
- [23] L.A. Gonano, M. Sepúlveda, Y. Rico, M. Kaetzel, C.A. Valverde, J. Dedman, A. Mattiazzi, M. Vila Petroff, Calcium-calmodulin kinase II mediates digitalis-induced arrhythmias, *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 4 (2011) 947–957, <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.111.964908>.
- [24] J.A. Wasserstrom, G.L. Aistrup, Digitalis: new actions for an old drug, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289 (2005) H1781–H1793, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00707.2004>.
- [25] H. Fuerstenwerth, On the differences between ouabain and digitalis glycosides, *Am. J. Ther.* 21 (2014) 35–42, <https://doi.org/10.1097/MJT.0b013e318217a609>.
- [26] R.S. Kass, W.J. Lederer, R.W. Tsien, R. Weingart, Role of calcium ions in transient inward currents and aftercontractions induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres, *J. Physiol.* 281 (1978) 187–208, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1978.sp012416>.
- [27] D. Colquhoun, E. Neher, H. Reuter, C.F. Stevens, Inward current channels activated by intracellular ca in cultured cardiac cells, *Nature* 294 (1981) 752–754, <https://doi.org/10.1038/294752a0>.
- [28] A.C. Zygmunt, W.R. Gibbons, Properties of the calcium-activated chloride current in heart, *J. Gen. Physiol.* 99 (1992) 391–414, <https://doi.org/10.1085/jgp.99.3.391>.
- [29] A.C. Zygmunt, R.J. Goodrow, C.M. Weigel, INaCa and ICl(Ca) contribute to isoproterenol-induced delayed after depolarizations in midmyocardial cells, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) H1979–H1992.