

A (-)-Carvona Modula a Sinalização de Cálcio Intracelular com Ação Antiarrítmica em Corações de Ratos

(-)-Carvone Modulates Intracellular Calcium Signaling with Antiarrhythmic Action in Rat Hearts

Gilmara Beatriz Andrade da Silva,¹  Diego Santos Souza,¹  José Evaldo Rodrigues Menezes-Filho,¹ Júlio Alves da Silva-Neto,¹ Jader dos Santos Cruz,² Danilo R. Roman-Campos,³  Lucindo José Quintans-Júnior,¹ Carla Maria Lins de Vasconcelos¹ 

Universidade Federal de Sergipe,¹ São Cristóvão, SE – Brasil

Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de Ciências Biológicas,² Belo Horizonte, MG – Brasil

Universidade Federal de São Paulo,³ São Paulo, SP – Brasil

Resumo

Fundamento: A (-)-carvona é um monoterpeno encontrado em óleos essenciais com atividade antioxidante e anti-inflamatória.

Objetivos: O objetivo deste estudo foi analisar a propriedade antiarrítmica da (-)-carvona no coração de rato e seus efeitos sobre a sinalização de Ca^{+2} intracelular.

Métodos: Os efeitos da (-)-carvona foram avaliados sobre a contratilidade atrial (0,01 – 4 mM) e ventricular (0,5 mM), e no eletrocardiograma (0,5mM). A fração de encurtamento, a corrente de cálcio do tipo L ($I_{Ca,L}$) e a sinalização de Ca^{+2} foram medidas no cardiomiócito isolado (0,5 mM). O efeito antiarrítmico foi avaliado no modelo de arritmia induzida por sobrecarga de cálcio (0,5 mM) (n = 5). Um $p < 0,05$ foi adotado como nível de significância estatística.

Resultados: No átrio, a (-)-carvona causou inotropismo negativo de maneira concentração-dependente (EC_{50} 0,44 ± 0,11 mM) e diminuiu o inotropismo positivo induzido pelo $CaCl_2$ (0,1 – 8,0 mM) e BAY K8644 (5 - 500 nM), um agonista de canal de cálcio do tipo L. Em coração isolado, a (-)-carvona (0,5mM) reduziu a contratilidade ventricular em 73% e a frequência cardíaca (em 46%), aumentou o Pri (30,7%, tempo desde o início da onda P até a onda R) e o QTc (9,2%, uma medida de despolarização e repolarização dos ventrículos), sem mudar a duração do complexo QRS. A (-)-carvona diminuiu a fração de encurtamento (61%), a ($I_{Ca,L}$) (79%) e o transiente intracelular de Ca^{+2} (38%). Além disso, a (-)-carvona apresentou ação antiarrítmica, identificada pela redução do escore de arritmia (85%) e ocorrência de fibrilação ventricular.

Conclusão: A (-)-carvona reduz a entrada de Ca^{+2} através de canais de Ca^{+2} do tipo L e, assim, diminui a contratilidade cardíaca e o Ca^{+2} intracelular e apresenta promissora atividade antiarrítmica no coração de ratos.

Palavras-chave: Arritmias Cardíacas; Monoterpenos; Ratos.

Abstract

Background: (-)-Carvone is a monoterpene found in essential oils with antioxidant and anti-inflammatory activity.

Objective: The aim of this paper was to analyze the antiarrhythmic property of (-)-carvone in the rat heart and its effects on the intracellular Ca^{2+} signaling.

Methods: The effects of (-)-carvone were evaluated on the ventricular (0.5 mM) and atrial contractility (0.01 – 4 mM) and on electrocardiogram (0.5 mM). Fractional shortening, L-type calcium current ($I_{Ca,L}$) and Ca^{2+} signaling were measured in the isolated cardiomyocyte (0.5 mM). Antiarrhythmic effect was evaluated in arrhythmia model induced by calcium overload (0.5 mM) (n = 5). $P < 0.05$ was used as the significance level.

Results: In the atrium, (-)-carvone evoked negative inotropism that was concentration-dependent (EC_{50} 0.44 ± 0.11 mM) and decreased the positive inotropism evoked by $CaCl_2$ (0.1 to 8.0 mM) or BAY K8644 (5 to 500 nM), an agonist of L-type Ca^{2+} channel. In isolated heart, (-)-carvone (0.5 mM) promoted reduction of ventricular contractility (73%) and heart rate (46%), increased PRI (30.7%, time from the onset of the P wave until the R wave) and QTc (9.2%, a measure of the depolarization and repolarization of the ventricles) without changing the QRS complex duration. (-)-Carvone decreased the fractional shortening (61%), $I_{Ca,L}$ (79%) and Ca^{2+} intracellular transient (38%). Furthermore, (-)-carvone showed antiarrhythmic action, verified by decrease of the arrhythmia score (85%) and occurrence of ventricular fibrillation.

Correspondência: Carla Maria Lins de Vasconcelos •

Universidade Federal de Sergipe – Fisiologia – Av. Marechal Rondon, s/n. CEP 49000-100, Rosa Elze, São Cristóvão, SE – Brasil

E-mail: carlamlv@hotmail.com

Artigo recebido em 08/06/2021, revisado em 24/10/2021, aceito em 08/12/2021

DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20210499>

Conclusion: (-)-Carvone decreases Ca^{2+} entry through L-type Ca^{2+} channels, reducing the cardiac contractility and intracellular Ca^{2+} , and, therefore, presenting promising antiarrhythmic activity in the rat hearts.

Keywords: Arrhythmias, Cardiac; Monoterpenes; Rats.

Full texts in English - <https://abccardiol.org/en/>

Introdução

As arritmias são consideradas um problema sério de saúde pública e são uma importante causa de morbidade e mortalidade no mundo.¹ Entre as principais, batimentos ventriculares prematuros (BVP), taquicardia ventricular sustentada, e fibrilação ventricular são comuns em pacientes com miocardiopatia isquêmica ou não isquêmica.¹ No entanto, os tratamentos com drogas antiarrítmicas geralmente causam respostas pró-arrítmicas adversas ou ausência de melhora na qualidade de vida de indivíduos com arritmias.²

Desde 1970, quando Vaughan-Williams classificou as drogas antiarrítmicas com base em seus mecanismos farmacológicos para bloquear canais iônicos ou receptores específicos, pesquisadores investiram muito tempo e esforço para descobrir novas terapias com um risco mais baixo de efeitos adversos para o paciente.³⁻⁵

Entre as novas terapias, compostos de origem natural têm demonstrado sua capacidade de inibir arritmias cardíacas ventriculares, gerando interesse na comunidade científica. Os terpenos mostraram-se como os principais compostos com atividade antiarrítmica comprovada.⁶⁻⁹ Entre eles, a carvona (*p*-mentha-6,8-dien-2-one) é de particular interesse, dadas suas propriedades já estabelecidas. A carvona é uma cetona pertencente ao grupo dos monoterpenos, e conhecida por sua atividade antioxidante, antimicrobiana, e antifúngica.^{10,11} Parece atuar também sobre canais de sódio dependentes de voltagem nos neurônios, levando a um efeito anticonvulsivante.^{12,13} Ainda, a carvona demonstrou um efeito antiespasmódico pela inibição dos canais de cálcio dependentes de voltagem, e uma ação anticâncer sinérgica com a doxorubicina sobre células MCF7, reduzindo sua cardiotoxicidade.¹⁴ Como já foi descrito na literatura, a carvona bloqueia canais de sódio e cálcio, e medicamentos dessa classe têm propriedades antiarrítmicas e cardioprotetoras. Assim, decidimos estudar os efeitos da carvona sobre a regulação do cálcio na célula e sua possível ação antiarrítmica nos corações de ratos.⁹

Embora existam vários estudos sobre a (-)-carvona na literatura científica, em nosso conhecimento, não existem explicações ou hipóteses sobre o mecanismo de ação desse monoterpeno no músculo cardíaco. Portanto, nosso objetivo foi avaliar os possíveis efeitos cardíacos da (-)-carvona, e apresentar uma melhor explicação científica de suas ações no tecido cardíaco que possa servir como base para o desenvolvimento de novos medicamentos de origem natural para o tratamento de arritmias.

Materiais e métodos

Animais

Os experimentos foram conduzidos com ratos machos Wistar (250-300 g) obtidos do biotério da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Em cada procedimento, foram usados cinco

animais.¹⁵ Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa com animais da UFS (protocolo 61/16, 20 de fevereiro de 2017). O manejo dos ratos foi realizado em acordo com os princípios éticos na experimentação animal (NIH publication 86-23, revised 1985; <http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>).

Avaliação do efeito inotrópico da (-)-carvona

O efeito inotrópico da (-)-carvona foi avaliado no átrio esquerdo dos corações dos ratos imersos em uma câmara contendo solução de Krebs-Henseleit (K-H) (em mM): NaCl 120, KCl 5,4, MgCl₂ 1,2, NaHCO₃ 27, CaCl₂ 1,25, Glicose 10, NaH₂PO₄ 2,0 (pH 7,4). O átrio foi mantido a 29° ± 0,1°C, oxigenado (95% O₂ e 5% CO₂), estirado a uma tensão de 5mM e submetido à estimulação de campo (1 Hz, 100 V, 0,5 ms) (Stimulator SD9 GRASS). A força atrial foi registrada utilizando um transdutor de força isométrica (GRASS FT03), e os sinais foram digitalizados (DATAQ DI710, WINDAQ PRO Acquisition). As curvas de dose-resposta da (-)-carvona (0,001 – 4,0 mM) e nifedipina (0,03 - 100 μM, bloqueador de canal de Ca⁺²) foram obtidas para determinar a resposta contrátil e calcular o EC50. Dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5% foi usado como diluente para a (-)-carvona.

Efeitos da (-)-carvona sobre a entrada de cálcio no miocárdio atrial

Para analisar a ação da (-)-carvona sobre a entrada de Ca⁺², foram obtidas curvas de dose-resposta de CaCl₂ (0,1 a 8,0 mM) e (±)-Bay K8644 (5 a 500 nM) no átrio esquerdo no controle e após pré-incubação com (-)-carvona (1 mM) por 15 minutos. Os resultados foram expressos em porcentagens da resposta contrátil máxima do átrio ao CaCl₂ no controle. Em ambos os protocolos, a concentração inicial de CaCl₂ na solução de K-H foi 0,5mM.^{7,16}

Efeitos da (-)-carvona sobre o perfil eletrocardiográfico e pressão do ventrículo esquerdo (PVE)

Após a administração intraperitoneal de heparina (1000 UI) por 15 minutos, os corações foram removidos e preparados em um sistema de perfusão aórtica de fluxo constante (10mL/min). O coração foi perfundido com solução de K-H previamente filtrada (0,45 μm), oxigenado (95% O₂ + 5% CO₂) e mantido a 34 ± 0,1°C (Haake F3). Para registrar o eletrocardiograma (ECG), três eletrodos (Ag/AgCl/NaCl 1 M) foram colocados sobre o coração para detectar sinais elétricos. Os sinais foram amplificados e digitalizados (PowerLab 4/35 ADInstrument, EUA). A medida da PVE foi realizada utilizando-se um balão com água (15cm/Hg) introduzido na cavidade do ventrículo esquerdo. Esse aparelho foi acoplado a um transdutor de pressão (MLT0699/A). Os sinais foram amplificados e enviados para um conversor AD (PowerLab 4/35 26

ADInstrument, EUA). O sistema foi calibrado usando uma coluna de mercúrio. Os parâmetros de contração (PVE, tempo para o pico e tempo de relaxamento) foram avaliados em 30 batimentos consecutivos pelo programa LabChart 8.0 Pro Software (ADInstruments, USA) em situação controle e após cinco, 10 e 15 minutos após o início da perfusão com carvona (0,5 mM). O ECG mediu o intervalo PR (PRI – período entre o início da onda P até a onda R), duração do complexo QRS (QRS – período que se estende da onda Q até a onda S), e o intervalo QT (QT_i - período entre o início da onda Q até a onda final da onda T). O QT_i foi convertido a QT_c usando a fórmula de Bazett normalizada para roedores (QT_c-B = QT_i/RR/f), onde f é a duração média do intervalo RR no controle (f = 271 ms).

Efeitos da (-)-carvona sobre a fração de encurtamento

Os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo e direito foram isolados dos ratos de acordo com o protocolo de Shioya (2007),¹⁷ com algumas modificações. A fração de encurtamento foi avaliada medindo-se a mudança no comprimento celular com um microscópio invertido acoplado a um sistema de detecção de bordas (Ionoptix, EUA). Os cardiomiócitos foram colocados em uma câmara experimental (temperatura ambiente) contendo solução de Tyrode (em mM: NaCl 150, KCl 5,4, MgCl₂ 0,5, HEPES 10, Glicose 10, CaCl₂ 1,8, pH 7,4). Os cardiomiócitos foram visualizados usando uma câmara (Ionoptix Myocam at 240 Hz) acoplada a um microscópio e um programa de detecção de imagem foi utilizado (Ionoptix Ionwizard 6,3). As mudanças longitudinais nas bordas dos cardiomiócitos foram capturadas pelo sistema de detecção, e os dados gerados foram armazenados e analisados. A fração de encurtamento foi avaliada nas células controles e após incubação com (-)-carvona 0,5mM.

Efeitos da (-)-carvona sobre a corrente de cálcio do tipo L (I_{Ca,L})

Os registros de 'voltage-clamp' do grampeamento de voltagem foram obtidos usando um EPC 10.2 (HEK Elektronik, Alemanha). Na configuração de célula inteira, aguardou-se um período de 3-5 minutos para se estabelecer o equilíbrio iônico entre a pipeta e o meio intracelular. Os eletrodos de registro possuíam resistência de 2-3 MΩ. Os cardiomiócitos ventriculares com resistência de série acima de 8 MΩ foram descartados. A composição da solução interna era (em mM): 120 CsCl, 20 TEACl, 5 NaCl, 10 HEPES e 10 EGTA, 1 MgCl₂ (pH foi estabelecido em 7,2 usando CsOH), e a solução externa foi composta de (em mM): 150 TEACl, 0,5 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 10 HEPES e 11 glicose (pH 7,4, com TEAOH). Para avaliar os efeitos agudos de 0,3 e 0,5 mM de (-)-carvona sobre I_{Ca,L}, registrou-se um curso temporal do pico da corrente I_{Ca,L} tanto na ausência como após exposição a uma dada concentração de (-)-carvona. Foram aplicados pulsos com potenciais entre -80 mV to -40 mV por 50 ms para inativar quaisquer canais de Na⁺ ou do tipo Ca⁺² remanescentes. Em seguida, foi aplicado um pulso de teste a 0mV por 300ms para medir I_{Ca,L}.

Efeitos da (-)-carvona sobre o transiente global de Ca⁺² intracelular

Os cardiomiócitos do ventrículo direito e esquerdo foram incubados com 10 μM de FLUO4-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) diluídos com DMSO por 30 minutos. As células em seguida foram lavadas com solução de Tyrode (1,8 mM Ca⁺²) para retirar o excesso de FLUO4-AM. Um sistema confocal (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha) com uma objetiva de imersão em óleo (63x) foi usado para análise de imagens fluorescentes confocais. O FLUO4-AM foi excitado a 488nm (laser de argônio) e a intensidade da emissão foi medida a 510 nm. Os cardiomiócitos foram escaneados com uma linha de 512 pixel posicionada ao longo do eixo longitudinal da célula, a cada 1,54 ms. O processamento da imagem digital foi realizada usando uma linguagem de programação IDL (Research Systems, Boulder, CO, EUA).⁹ Os níveis de Ca⁺² intracelular foram expressos em F/F₀, onde F₀ indica a fluorescência de repouso. O transiente global de Ca⁺² intracelular foi registrado no controle e após três minutos de incubação com (-)-carvona 0,5mM à temperatura ambiente.

Efeitos antiarrítmicos da (-)-carvona

Arritmia *ex-vivo* foi determinada em corações isolados como descrito previamente.¹⁸ Primeiramente, os corações foram perfundidos com solução K-H contendo 1,25 mM de cálcio (grupo controle). Após 20 minutos, os corações foram perfundidos com solução K-H contendo 3,3 mM de cálcio (grupo com cálcio elevado) ou com cálcio +0,5 mM (-)-carvona durante 15 minutos (grupo cálcio elevado + carvona). O ECG foi monitorado por 15 minutos para avaliar a ocorrência de arritmias. As arritmias encontradas foram BVP, taquicardia ventricular (TV) e fibrilação ventricular (FV). O período de 15 minutos de experimento foi dividido em intervalos de três minutos e os escores de arritmia foram adicionados no final, como descrito por Curtis e Walker (1988).^{9,19} Episódios de BVP < 3 eventos/3 minutos foram classificados como escore 0 e > 10 eventos/3 minutos receberam escore 1; 1-5 episódios de TV < 40 s receberam escore 2, e > 5 episódios de TV ou um episódio de FV com duração < 40 s receberam escore 3; 2 - 5 episódios de TV ou FV com duração < 80 s receberam escore 4; > 5 episódios de FV, TV e/ou FV com duração < 160 s receberam escore de 5; TV e/ou FV com duração < 300 s receberam escore de 6, e duração > 300 s escore 5.

Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados em média ± desvio padrão (DP). O programa GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Software, CA, USA) foi usado para as análises. A normalidade dos dados foi testada usando o teste de Shapiro-Wilk. Os valores médios foram comparados usando a análise de variância (ANOVA) seguida do teste post hoc de Tukey ou teste t não pareado. Um p<0,05 foi usado como nível de significância.

Resultados

A (-)-carvona (0,003 a 4 mM) reduziu a força atrial de maneira concentração-dependente. A Figura 1A

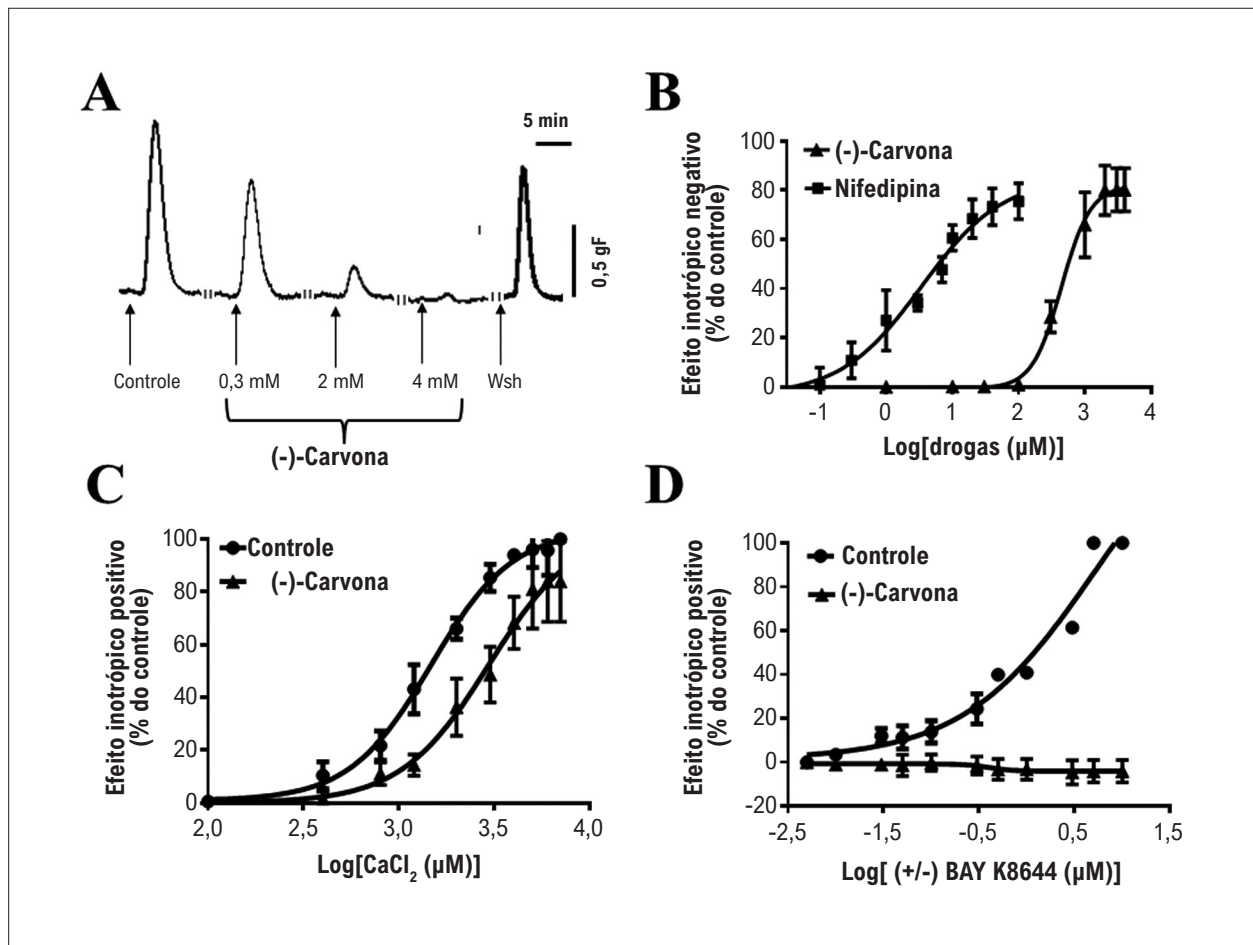


Figura 1 – A (-)-carvona exibiu efeito inotrópico negativo e diminuiu a entrada de cálcio no átrio esquerdo de rato. (A) Traçados experimentais da contração atrial isolada no controle, após incubação com (-)-carvona (0,3, 2 e 4 mM) e washout (Wsh); (B) Curvas de concentração-resposta do inotropismo negativo da (-)-carvona e nifedipina (bloqueador de canal de cálcio); (C) e (D) curvas de concentração-resposta do CaCl₂ e (±)-BAY K8644 na ausência e presença de 1 mM de (-)-carvona, respectivamente (n = 5).

mostra traçados de curvas da concentração atrial isolada em situação controle, com (-) carvona 0,3, 2 e 4 mM, e no washout. Como pode ser visto, 4mM de (-)-carvona reduziram a contratilidade do miocárdio em aproximadamente 96%, e a reversibilidade após o washout foi de aproximadamente 65%. A Figura 1 B mostra uma curva de concentração-resposta do efeito inotrópico negativo da (-)-carvona que apresentou um EC₅₀ de 0,44 ± 0,11 mM (n = 5). A nifedipina, usada como controle positivo, apresentou valores de EC₅₀ de 0,0034 ± 0,0011 mM (n = 5). O DMSO a 0,5%, usado como diluente, não apresentou efeito sobre a força atrial (dados não apresentados).

Uma vez que a (-)-carvona provocou um efeito inotrópico negativo, decidimos investigar se o canal de cálcio está envolvido em seu mecanismo de ação. Os resultados revelaram que a (-)-carvona (1mM) deslocou a curva de concentração-resposta para a direita, aumentando o EC50 do CaCl₂ de 1,46 ± 0,14 mM (controle) para 3,17 ± 0,22 mM (CaCl₂ + carvona) (Figura 1C, n = 5, p < 0,05). Um dado interessante foi a inibição do inotropismo induzido

pelo (±)-BAY K8644, um agonista do canal de cálcio do tipo L (Figura 1 D).

Nos corações isolados, 0,5mM de (-)-carvona também induziu uma redução na PVE, como pode ser observado nos traçados da Figura 2A (n=5). Uma redução de 73% na PVE foi observada após 15 minutos de perfusão do coração com 0,5mM de (-)-carvona (Figura 2B). A (-)-carvona não alterou o tempo para o pico (Figura 2C), mas reduziu significativamente o tempo de relaxamento (24%) após 15 minutos de perfusão com (-)-carvona (Figura 2D).

A Figura 3A apresenta traçados ecocardiográficos representativos da situação controle após 15 minutos de perfusão com 0,5mM de (-)-carvona e washout. Como pode ser observado, a (-)-carvona diminuiu a frequência cardíaca (n=5, Figura 3B) e aumentou tanto o PRi como o QTi (n=5, Figura 3C e D), sem mudar a duração do complexo QRS (Figura 3E).

A Figura 4A apresenta registros da contratilidade celular na situação controle (painel superior) e após perfusão com 0,5mM de (-)-carvona (painel inferior), mostrando a redução

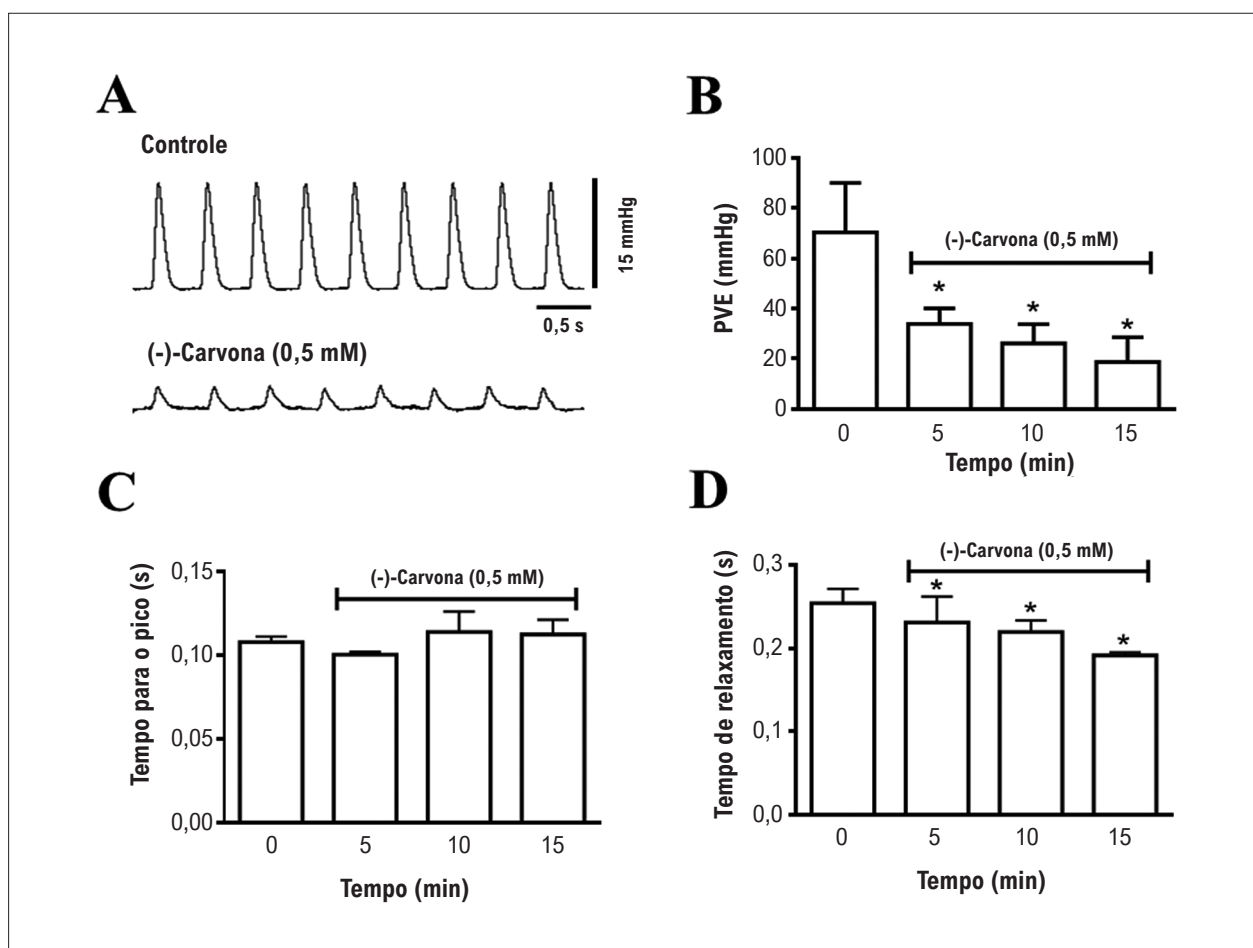


Figura 2 – Efeitos da (-)-carvona sobre a contratilidade no coração de rato isolado. (A) registros da pressão do ventrículo esquerdo (PVE) no controle (painel superior) e com 0,5 mM de (-)-carvona (painel inferior); (B) PVE; (C) tempo para o pico; e (D) tempo de relaxamento (n = 5, *p < 0,05).

na fração de encurtamento nos cardiomiócitos. As médias dos resultados mostraram redução da fração de encurtamento após incubação com (-)-carvona (n=5, Figura 4B). Ainda, a (-)-carvona reduziu tanto o tempo para o pico como o tempo de relaxamento em 50% (Figuras 4C e D).

Considerando o papel principal dos canais de Ca^{+2} do tipo L no controle da contração cardíaca, usamos o teste de grameamento de voltagem (técnica de *patch-clamp*) para testar se a (-)-carvona afetaria a $I_{Ca,L}$ nos cardiomiócitos dos ventrículos. A Figura 5A mostra registros de $I_{Ca,L}$ das fases de despolarização (300ms) de -40 a 0mV na situação controle e com 0,5mM de (-)-carvona. A Figura 5B ilustra a progressão da $I_{Ca,L}$ ao longo do tempo, mostrando redução da $I_{Ca,L}$ após incubação com (-)-carvona. A média de redução do pico de $I_{Ca,L}$ induzida pela (-)-carvona foi de 79% (n=4, 10 células, Figura 5C). O efeito de 0,3mM de (-)-carvona sobre a $I_{Ca,L}$ também foi avaliado, e se observou uma redução de 43% na $I_{Ca,L}$ (dados não apresentados). Concluímos que a (-)-carvona inibe os canais de Ca^{+2} do tipo L, e que esse efeito pode contribuir para seu efeito inotrópico negativo evidenciado nos tecidos dos átrios e ventrículos.

Com base nesses resultados, buscamos avaliar o transiente de cálcio intracelular em cardiomiócitos ventriculares imersos com FUR4-AM. A Figura 5D (esquerda) mostra as imagens obtidas usando microscopia confocal do transiente de cálcio intracelular no controle e após pré-incubação com 0,5mM de (-)-carvona. Observou-se que a fluorescência do cálcio, mostrada em verde, foi reduzida com (-)-carvona. A Figura 5D (à direita) mostra traçados representativos do transiente de cálcio intracelular no controle e com (-)-carvona. A Figura 5E apresenta a fluorescência do cálcio como razão F/F_0 , a qual foi reduzida após incubação com (-)-carvona (n=5). O pré-tratamento dos cardiomiócitos com (-)-carvona acelerou o tempo de decaimento em 50% (Figura 5G), enquanto que o tempo para pico do transiente de Ca^{+2} (Figura 5F) não foi alterado.

Uma vez que os bloqueadores de canais de cálcio apresentam efeitos antiarrítmicos, decidimos investigar se a (-)-carvona apresentaria essa propriedade. O efeito antiarrítmico da (-)-carvona foi avaliado em um modelo de arritmia induzido pela sobrecarga de cálcio. Três tipos de arritmias foram observados nos corações perfundidos com alta concentração de cálcio: BVP, TC e FV (Figura 6A). Como observado na

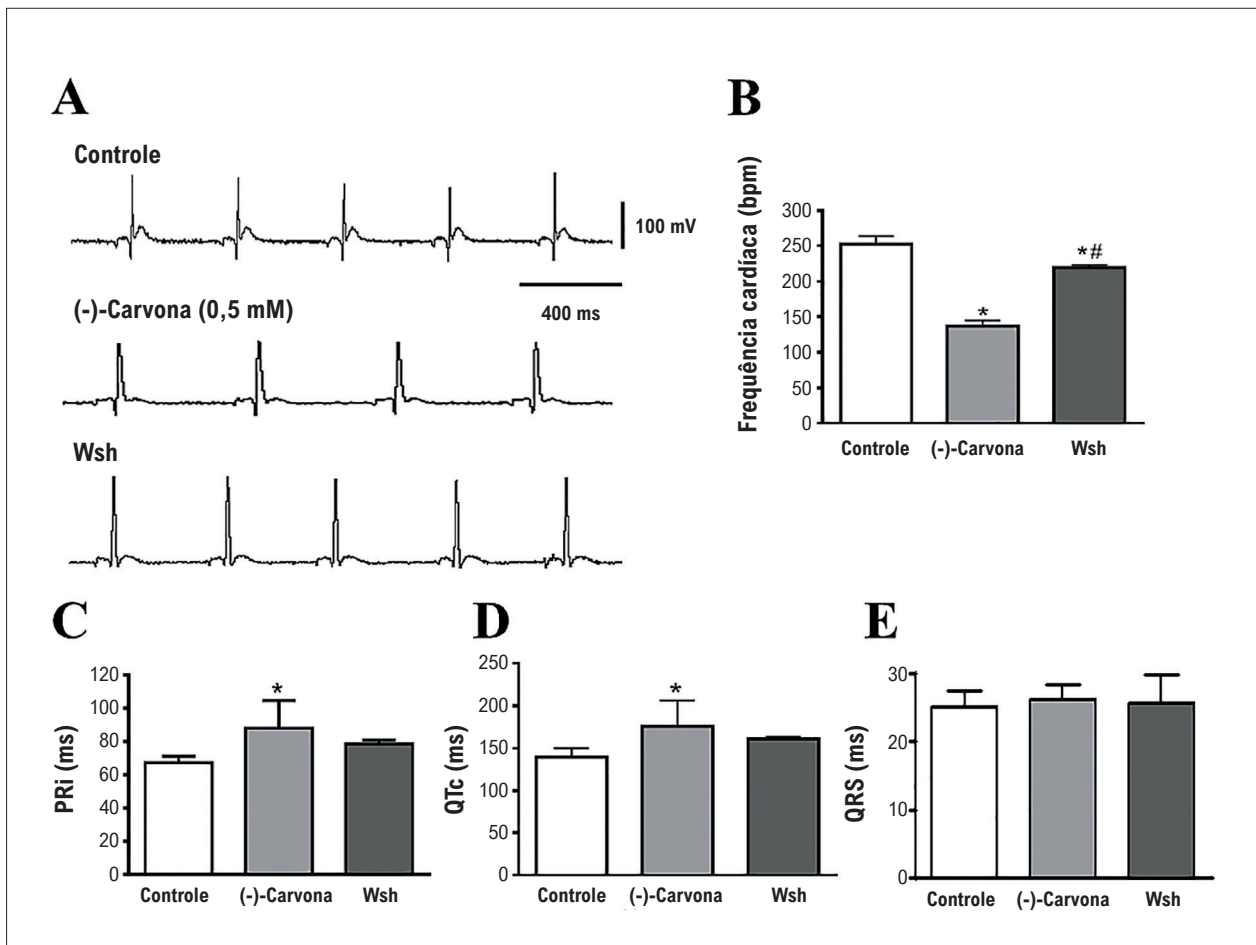


Figura 3 – Efeitos da carvona sobre o perfil eletrocardiográfico no coração de rato isolado. (A) Registros eletrocardiográficos no controle, com 0,5 mM de (-)-carvona como washout (Wsh), (B) Frequência cardíaca; (C) intervalo PR (Pri), (D) intervalo QTc e (E) duração do complexo QRS ($n = 5$, $*p < 0,05$ vs controle e $\#p < 0,05$ vs (-)-carvona).

Figura 6B, a (-)-carvona reduziu significativamente o escore de arritmia ($n=5$). Além disso, nossos resultados mostraram que nos corações submetidos à cálcio elevado e perfusão simultânea com (-)-carvona, a gravidade das arritmias foi menor, uma vez que a ocorrência de FV diminuiu de 34% (cálcio elevado) para 8%. Ainda, os corações perfundidos com (-)-carvona apresentaram principalmente BVP, considerada uma arritmia de menor gravidade.

Discussão

Nossos resultados mostraram a capacidade do monoterpeno (-)-carvona em reduzir a força atrial de corações de ratos de maneira concentração-dependente, o que foi parcialmente reversível após a lavagem. A (-)-carvona mostrou baixa potência em comparação à nifedipina, um clássico bloqueador de canal de Ca^{2+} tipo L. Sabe-se que a força contrátil é dependente da concentração de Ca^{2+} citoplasmático livre, e que a entrada de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} do tipo L é essencial para estimular a liberação de cálcio induzida pelo cálcio do retículo sarcoplasmático (RS). Esse mecanismo é muito importante por regular a força do miocárdio.

Assim, decidimos investigar se havia uma correlação entre a redução da força atrial e uma diminuição na entrada de Ca^{2+} no mecanismo de ação da (-)-carvona. Nossos resultados mostraram que a (-)-carvona reduziu a entrada de Ca^{2+} ao prejudicar a resposta inotrópica positiva tanto para Ca^{2+} como para Bay K 8644, um agonista dos canais de Ca^{2+} do tipo L. O bloqueio do canal de Ca^{2+} promovido pela (-)-carvona foi provavelmente o responsável pela diminuição da força atrial observada em nossos experimentos. Em músculos lisos, a carvona apresenta efeito antiespasmódico; ela reduziu a contração induzida por alta concentração de K^+ e foi quase 100 vezes mais potente que o verapamil, um bloqueador de canal de cálcio.^{13,20}

A capacidade dos terpenos em bloquear o canal de Ca^{2+} foi observada tanto no músculo liso como no músculo cardíaco.²¹ Os monoterpenos podem modular a função dos canais iônicos dependentes de voltagem e dependentes de ligantes.^{22,23} Assim, esses compostos são úteis em prevenir doenças cardiovasculares, tais como arritmia e hipertensão. Em relação ao sistema cardiovascular, monoterpenos tais como rotundifolona,²⁴ terpineol,²⁵ timol,²³ e carvacrol²³ atuam como bloqueadores de canal de cálcio.

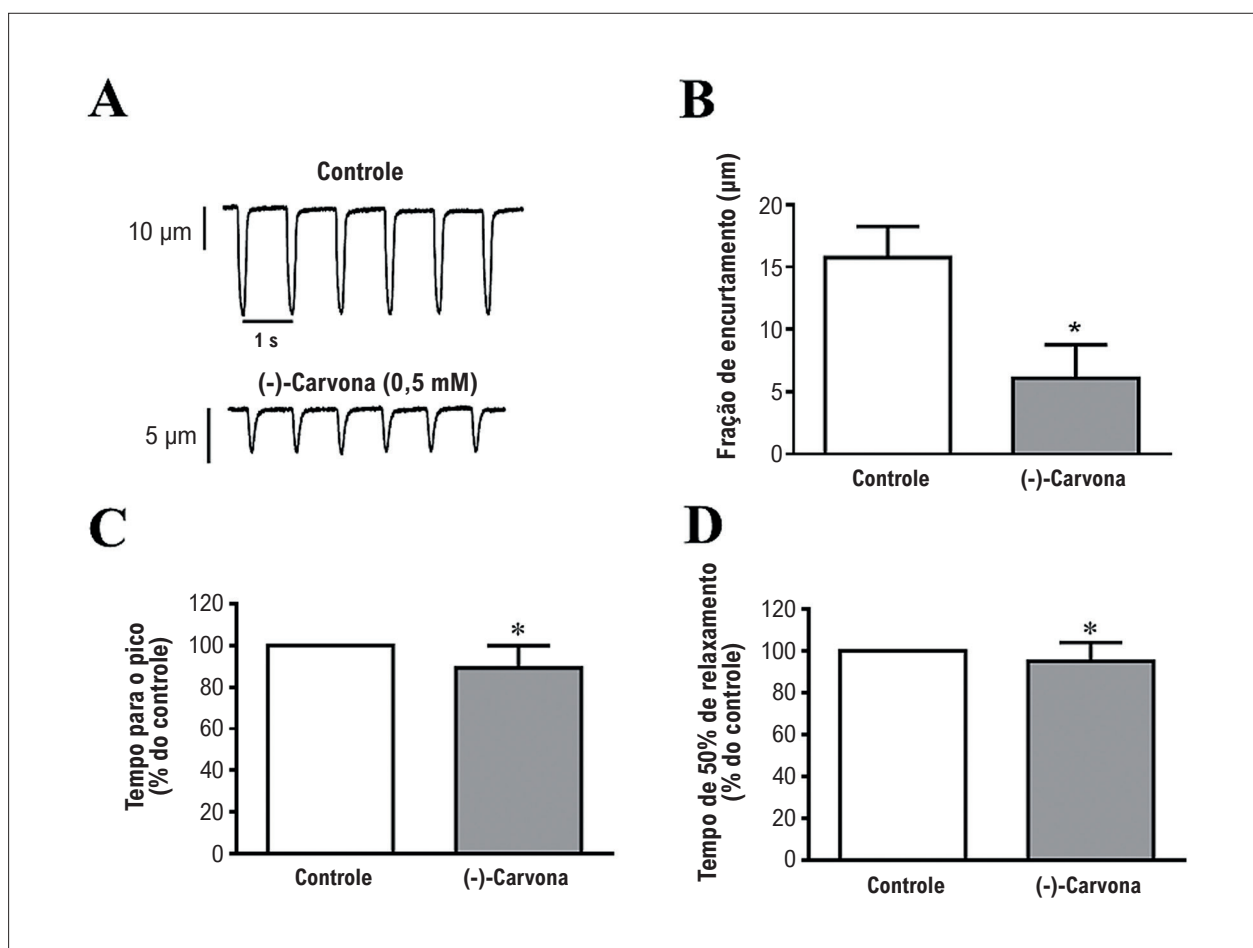


Figura 4 – Efeitos da (-)-carvona sobre a fração de encurtamento no cardiomiócito ventricular isolado. (A) registro da fração de encurtamento no controle (painel superior) e após incubação com 0,5mM de (-) carvona (painel inferior); (B) fração de encurtamento no controle e (-)-carvona; (C) tempo para o pico; (D) tempo para relaxamento de 50% (n=5, *p<0,05).

Também foi demonstrado que em cardiomiócito isolado, R(+)-pulegona,¹⁶ geraniol,⁶ nerol,⁷ farnesol⁹ e (-)-mentol²⁶ bloquearam o canal de Ca^{+2} do tipo L.

O bloqueio dos canais de Ca^{+2} pode induzir alterações eletrofisiológicas importantes, como uma diminuição da condução elétrica no coração e da frequência cardíaca. Assim, nós investigamos se a (-)-carvona poderia induzir alterações fisiológicas no coração. Realizamos experimentos com corações isolados para registrar simultaneamente a PVD e perfis eletrocardiográficos. A (-)-carvona promoveu uma diminuição na PVD, o que corrobora nossos resultados obtidos no átrio esquerdo isolado, discutido anteriormente, bem como uma redução na frequência cardíaca. Como se sabe, a frequência cardíaca é usualmente controlada pelo marcapasso primário do coração, o nó sinusal. As células do nó sinusal têm a propriedade de automaticidade como resultado de despolarização gradual durante a diástole elétrica (despolarização diastólica lenta). Uma lenta despolarização diastólica e a fase da despolarização do potencial de ação do marcapasso são processos fundamentais para a formação de impulso elétrico do nó sinusal. Esses fenômenos estão ligados à entrada de Ca^{+2} pelo sarcolema; uma redução

no influxo pode induzir a dissociação eletromecânica do miocárdio e bradicardia.²⁷ A corrente iônica provavelmente afetada, e responsável pela diminuição da frequência cardíaca, é a $\text{I}_{\text{Ca,L}}$. O efeito da (-)-carvona sobre o influxo de cálcio promoveu uma redução na frequência cardíaca e um aumento na duração do intervalo PRi, indicativo de bloqueio atrioventricular de primeiro grau. Nesse bloqueio, há um atraso na transmissão de impulso elétrico dos átrios para os ventrículos, aumentando o período refratário do miocárdio. Outras substâncias que promovem esse bloqueio são betabloqueadores, glicosídeos cardíacos, e drogas que aumentam a atividade colinérgica.²⁸

Também foi observado que a (-)-carvona aumentou o intervalo QTc, que reflete o período necessário para a despolarização e a repolarização ventricular ocorrer, *i.e.*, um parâmetro indireto para estimar a duração do potencial de ação ventricular. O prolongamento do QTc pode ocorrer devido ao bloqueio dos canais de potássio.^{6,9} Agentes antiarrítmicos da classe III são bloqueadores de canais de potássio que prolongam a duração do potencial de ação aumentando o período refratário dos tecidos atrial, nodal e ventricular. Um aumento no período refratário das células

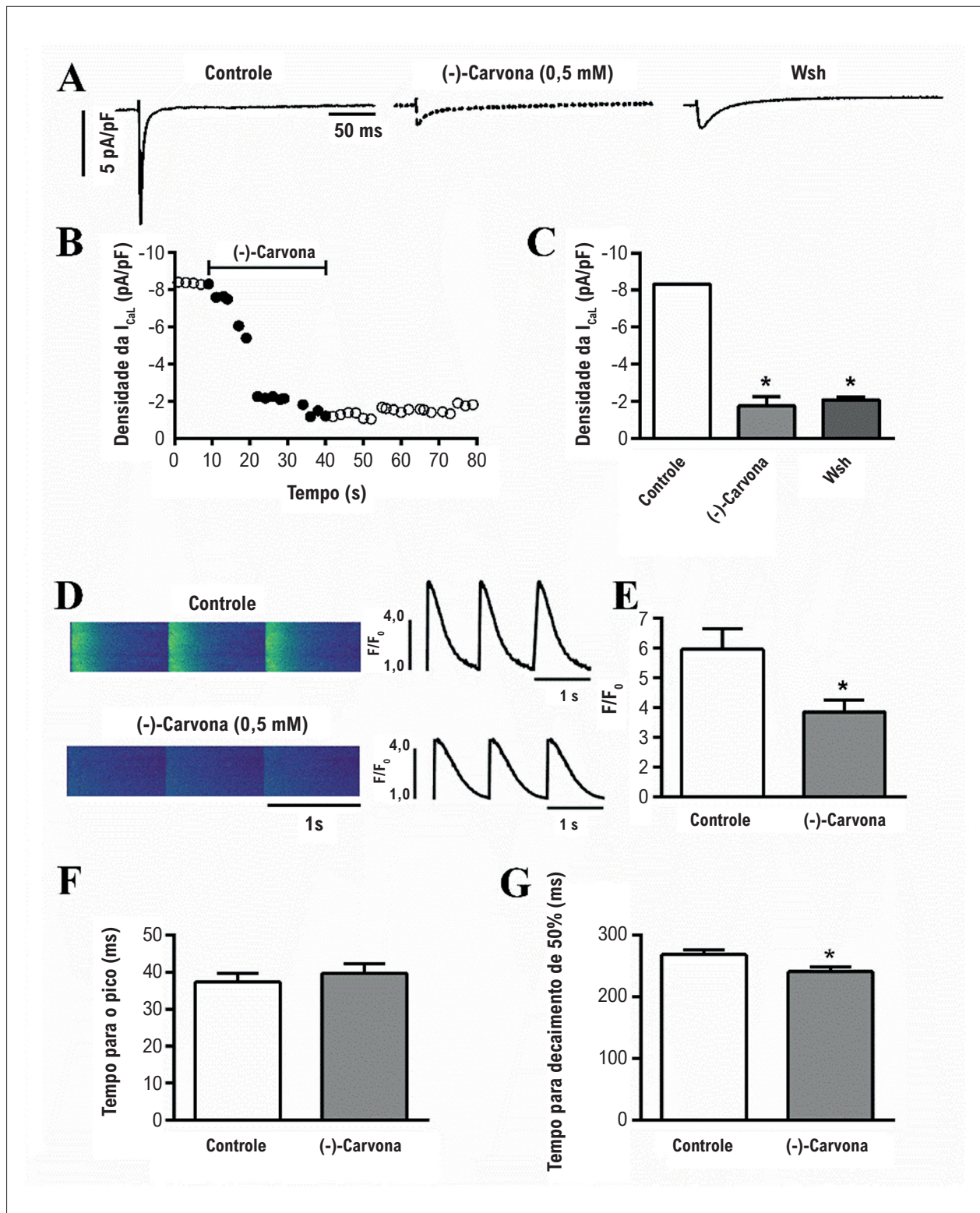


Figura 5 – Efeitos da (-)-carvona sobre a corrente de cálcio do tipo L ($I_{Ca,L}$) e transiente de cálcio intracelular no cardiomiócitos ventricular isolado. (A) registros típicos de $I_{Ca,L}$ no controle, durante a perfusão com 0,5 mM (-)-carvona e washout (Wsh) efeito da (-)-carvona sobre $I_{Ca,L}$ ao longo do tempo. Cada símbolo indica a amplitude líquida da $I_{Ca,L}$ medida a cada 10 s no potencial de membrana 0mV sob condições controle (círculos abertos), durante a exposição a 0,5mM de (-)-carvona (círculos pretos), a após Wash (círculos abertos); (C) resumo dos efeitos da (-)-carvona sobre a densidade da $I_{Ca,L}$ (pA/pF); (D) imagens (esquerda) e traçados representativos (direita) do transiente de cálcio intracelular no controle (painel superior) e após incubação com 0,5 mM de (-)-carvona (painel inferior). (E) média de pico de transiente de cálcio (F/F_0); (F) tempo para o pico do transiente e (G) tempo para decaimento de 50% de transiente de cálcio (n=4,5, *p<0,05 vs. controle; # p < 0,05 vs (-)-carvona).

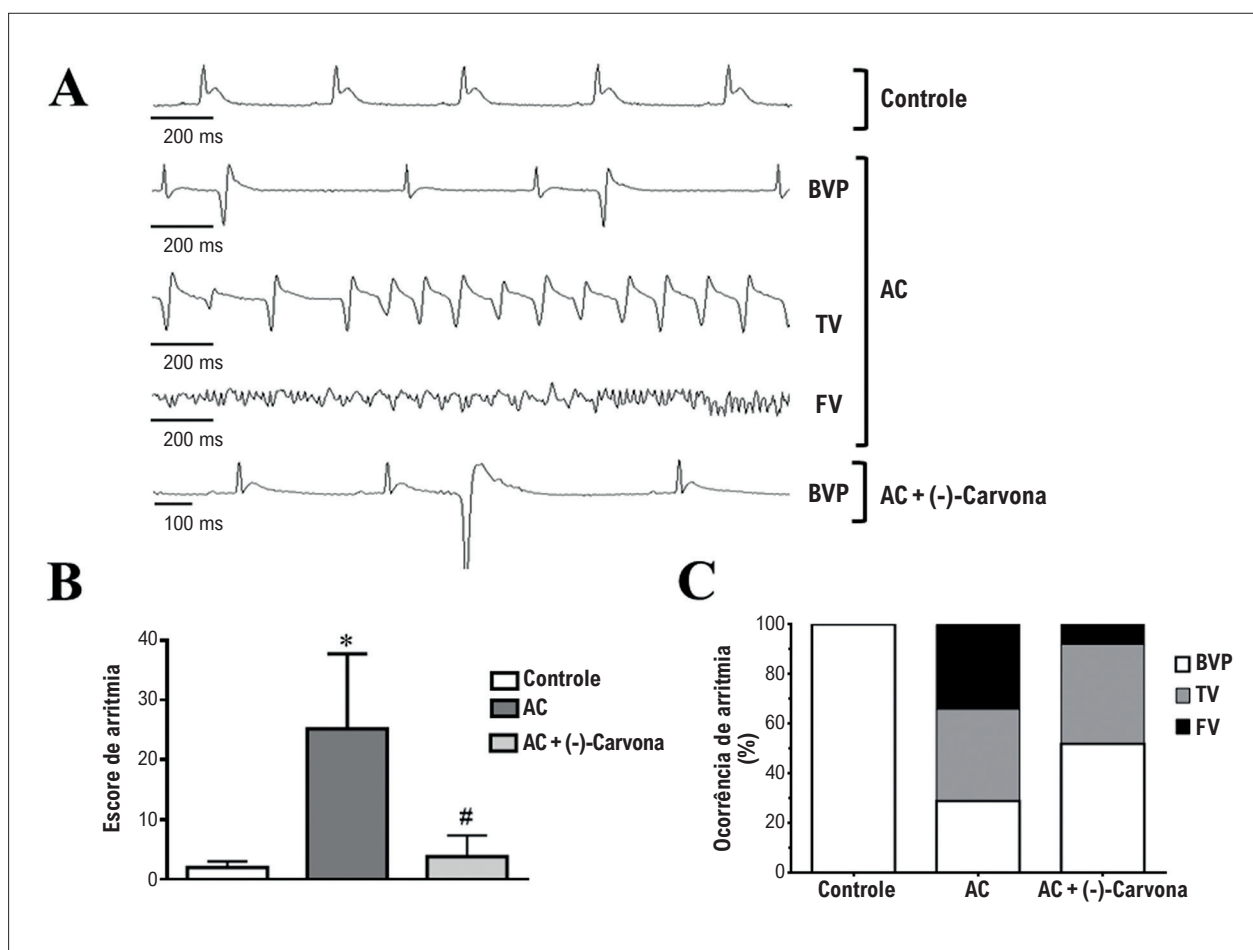


Figura 6 – Efeito antiarrítmico da (-)-carvona no modelo de arritmia induzida por sobrecarga de cálcio. (A) eletrocardiogramas representativos no controle, com alta concentração de cálcio (AC) e AC mais (-)-carvona, mostrando as seguintes arritmias: batimentos ventriculares prematuros (BVP), taquicardia ventricular (TV) e fibrilação ventricular (FV); (B) escore de arritmia e (C) ocorrência de arritmia (n=5, *p<0,05 vs. controle e #p < 0,05 vs AC).

atriais é de grande importância no tratamento de taquiarritmia atrial.²⁹ A amiodarona, um bloqueador de múltiplos canais, é considerada uma das drogas antiarrítmicas mais efetivas, sendo amplamente prescrita. Contudo, o uso desses medicamentos em longo prazo tem sido associado à ocorrência de torsades de pointes³⁰ e de efeitos adversos.²⁹

Em cardiomiócitos ventriculares isolados, 0,5mM de (-)-carvona reduziu a fração de encurtamento e acelerou o tempo de relaxamento, conforme foi também observado no coração isolado. Sabe-se que a força contrátil do músculo cardíaco depende da concentração de Ca²⁺ livre no citoplasma, e a entrada de Ca²⁺ através de canais de Ca²⁺ do tipo L é essencial para a liberação de cálcio dependente de cálcio do RS. Assim, o teste de grampeamento de voltagem foi realizado para testar se a (-)-carvona afeta a I_{Ca,L}. Os resultados mostraram que a (-)-carvona reduziu significativamente a I_{Ca,L} no cardiomiócito ventricular. Uma vez que a (-)-carvona reduz a I_{Ca,L}, é razoável pensar que esse monoterpene afetaria profundamente a liberação de Ca²⁺ do RS. Nossos resultados mostraram que a (-)-carvona também afetou a amplitude do transiente de Ca²⁺ e acelerou o tempo

de decaimento de 50%. Sabe-se que o relaxamento do músculo cardíaco é amplamente determinado pela recaptação de Ca²⁺ pelo retículo sarco(endo)plasmático Ca²⁺-ATPase (SERCA2a) e por outra proteína de transporte tais como os trocadores de Na⁺/Ca²⁺ (NCX) e membrana plasmática Ca²⁺ ATPase (PMCA).¹⁷ Assim, a diminuição do Ca²⁺ citosólico pode estar associada com a ativação de algumas dessas vias.

A nifedipina (10 μM), um bloqueador de canal de cálcio do tipo L, reduziu a amplitude do Ca²⁺ transiente em 79% em miócitos do ventrículo de rato neonatos.²⁴ O bloqueio produzido pela nifedipina (1 μM) foi totalmente reversível após o washout com solução padrão.³¹ Nossos resultados indicam que a (-)-carvona é um bloqueador de canal de Ca²⁺, similar à nifedipina, mas o efeito sobre a I_{Ca,L} foi irreversível na presença de (-)-carvona (500 μM). Segundo Vaughan-Williams (1970), os bloqueadores de canal de cálcio pertencem à classe IV de antiarrítmicos, e são amplamente utilizados na prática clínica.^{32,33}

Uma vez que a (-)-carvona reduz a entrada de cálcio sarcolemal, nós investigamos sua possível atividade

antiarrítmica e observamos uma drástica redução ao longo do tempo em eventos como FV em um modelo *ex vivo* de sobrecarga de cálcio. De fato, nossos resultados mostraram que a (-)-carvona apresentou um bom efeito antiarrítmico, confirmado por uma redução nos escores de arritmia e redução na ocorrência de fibrilação atrial, considerada um tipo mais grave de arritmia. Sabe-se que as substâncias ativas oriundas de plantas podem apresentar propriedades antiarrítmicas importantes,³⁴ com grande potencial para serem usadas como agentes antiarrítmicos em estudos clínicos e pré-clínicos. Podemos citar, por exemplo, os terpenos geraniol, nerol, D-limoneno e farnesol que inibiram canais de Ca⁺² do tipo L e apresentaram atividade antiarrítmica.⁶⁻⁹ Embora muitos estudos experimentais mostraram que os terpenos exercem efeitos antiarrítmicos, esses compostos não são ainda usados na clínica. Além do efeito antiarrítmico, a (-)-carvona também mostrou um efeito cardioprotetor contra a cardiotoxicidade induzida por doxorubicina *in vivo* e potencializou sua toxicidade anticâncer *in vitro*.¹⁴ Esses efeitos cardioprotetores fazem a carvona uma molécula promissora na prática clínica.

Limitações do estudo

Este estudo revelou que a (-)-carvona reduz a corrente de cálcio do tipo L, induz efeito inotrópico negativo, e tem efeitos antiarrítmicos no coração de ratos. Porém, podemos apontar também algumas limitações, como a falta de avaliação dos efeitos antiarrítmicos da (-)-carvona, em um modelo *in vivo* de arritmia e outros modelos *in vitro* que indiretamente geram uma sobrecarga de cálcio. Outra limitação deste estudo foi o fato de não termos avaliado os efeitos da carvona sobre outros canais importantes para a excitação cardíaca, tampouco sua ação sobre a SERCA2a. Ainda, há outras limitações, incluindo implicações toxicológicas do uso agudo e em longo prazo da carvona, sua metabolização e farmacodinâmica.

Conclusão

Podemos concluir que a (-)-carvona diminuiu a corrente de cálcio do tipo L e o transiente de cálcio intracelular no miocárdio, promovendo uma redução na contratilidade atrial e ventricular. Em corações de ratos isolados, a (-)-carvona causou uma diminuição nas taxas cardíacas e aumento em intervalos PR, característica de bloqueadores de canais de cálcio. Ainda, observou-se uma redução

significativa da gravidade das arritmias, como fibrilação ventricular em corações submetidos à perfusão com carvona. A (-)-carvona é, portanto, uma substância natural altamente promissora em relação ao desenvolvimento de novas drogas antiarrítmicas.

Agradecimentos

Este estudo recebeu apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). JSC (processo #312474/2017-2), DRC (FAPESP processo #2019/21304-4), bolsistas CNPq. DSS é bolsista da FAPESP (#2019/18918-0), JERMF é bolsista do CNPq e JASN é bolsista da CAPES.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Silva GBA, Souza DS, Silva-Neto JA, Cruz JS, Quintans-Júnior LJ, Vasconcelos CML; Obtenção de dados: Silva GBA, Souza DS, Menezes-Filho JER, Silva-Neto JA, Roman-Campos DR, Quintans-Júnior LJ; Análise e interpretação dos dados: Silva GBA, Souza DS, Menezes-Filho JER, Silva-Neto JA, Cruz JS, Roman-Campos DR, Vasconcelos CML; Análise estatística: Silva GBA, Souza DS, Menezes-Filho JER, Vasconcelos CML; Redação do manuscrito: Vasconcelos CML; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Souza DS, Silva-Neto JA, Cruz JS, Roman-Campos DR, Quintans-Júnior LJ, Vasconcelos CML.

Potencial conflito de interesse

Não há conflito com o presente artigo.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado por CNPq, CAPES, FAPEMIG e FAPESP.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Gilmar Beatriz Andrade da Silva pela Universidade Federal de Sergipe.

Referências

1. Cronin EM, Bogun FM, Maury P, Peichl P, Chen M, Namboodiri N, et al. 2019 HRS/EHRA/APHRS/LAHRs Expert Consensus Statement on Catheter Ablation of Ventricular Arrhythmias. *Heart Rhythm*. 2020;17(1):2-154. doi: 10.1016/j.hrthm.2019.03.002.
2. Fishman GI. Drug-Induced Arrhythmias, Precision Medicine, and Small Data. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2017;10(4):e005208. doi: 10.1161/CIRCEP.117.005208.
3. Benchimol A, Desser KB. New Drugs for Treating Cardiac Arrhythmias. *Postgrad Med*. 1981;69(1):77-84. doi: 10.1080/00325481.1981.11715649.
4. Chia KKM, Kanagaratnam L, Hellestrand K, Kowey P, Whalley D. Pharmacological Therapy for Ventricular Arrhythmias: A State-of-the-Art Review. *Heart Lung Circ*. 2019;28(1):49-56. doi: 10.1016/j.hlc.2018.10.002.
5. Ganjehei L, Massumi A, Nazeri A, Razavi M. Pharmacologic Management of Arrhythmias. *Tex Heart Inst J*. 2011;38(4):344-9.
6. Menezes-Filho JE, Gondim AN, Cruz JS, Souza AA, Santos JN, Conde-Garcia EA, et al. Geraniol Blocks Calcium and Potassium Channels in the Mammalian Myocardium: Useful Effects to Treat Arrhythmias. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014;115(6):534-44. doi: 10.1111/bcpt.12274.

7. Menezes-Filho JER, Souza DS, Santos-Miranda A, Cabral VM, Santos JNA, Cruz JDS, et al. Nerol Attenuates Ouabain-Induced Arrhythmias. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019;2019:5935921. doi: 10.1155/2019/5935921.
8. Nascimento GAD, Souza DS, Lima BS, Vasconcelos CML, Araújo AAS, Durço AO, et al. Bradycardic and Antiarrhythmic Effects of the D-Limonene in Rats. *Arq Bras Cardiol*. 2019;113(5):925-32. doi: 10.5935/abc.20190173.
9. Souza DS, Menezes-Filho JER, Santos-Miranda A, Jesus ICG, Silva Neto JA, Guatimosim S, et al. Calcium Overload-induced Arrhythmia is Suppressed by Farnesol in Rat Heart. *Eur J Pharmacol*. 2019;859:172488. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172488.
10. Elmastaş M, Dermirtas I, Isildak O, Aboul-Enein HY. Antioxidant Activity of S-Carvone Isolated from Spearmint (*Mentha Spicata* L. Fam Lamiaceae). *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol*. 2006;29(10):1465-75. doi: 10.1080/10826070600674893
11. Moro, I. J. et al. Evaluation of antimicrobial, cytotoxic and chemopreventive activities of carvone and its derivatives. *Braz. J. Pharm. Sci*. 2017;539(4): e00076. doi: 10.1590/s2175-97902017000400076.
12. Nogoceke FP, Barcaro IM, Sousa DP, Andreatini R. Antimanic-like Effects of (R)-(-)-carvone and (S)-(+)-carvone in Mice. *Neurosci Lett*. 2016;619:43-8. doi: 10.1016/j.neulet.2016.03.013.
13. Souza FV, Rocha MB, Souza DP, Marçal RM. (-)-Carvone: Antispasmodic Effect and Mode of Action. *Fitoterapia*. 2013;85:20-4. doi: 10.1016/j.fitote.2012.10.012.
14. Abbas MM, Kandil YI, Abbas MA. R(-)-carvone Attenuated Doxorubicin Induced Cardiotoxicity In Vivo and Potentiated Its Anticancer Toxicity In Vitro. *Balkan Med J*. 2020;37(2):98-103. doi: 10.4274/balkanmedj.galenos.2019.2019.7.117.
15. Curtis MJ, Alexander S, Cirino G, Docherty JR, George CH, Gienbycz MA, et al. Experimental Design and Analysis and their Reporting II: Updated and Simplified Guidance for Authors and Peer Reviewers. *Br J Pharmacol*. 2018;175(7):987-93. doi: 10.1111/bph.14153.
16. Cerqueira SV, Gondim AN, Roman-Campos D, Cruz JS, Passos AG, Lauton-Santos S, et al. R(+)-pulegone Impairs Ca²⁺ homeostasis and Causes Negative Inotropism in Mammalian Myocardium. *Eur J Pharmacol*. 2011;672(1-3):135-42. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.09.186.
17. Shioya T. A Simple Technique for Isolating Healthy Heart Cells from Mouse Models. *J Physiol Sci*. 2007;57(6):327-35. doi: 10.2170/physiolsci.RP010107.
18. Zhou P, Zhang SM, Wang QL, Wu Q, Chen M, Pei JM. Anti-arrhythmic Effect of Verapamil is Accompanied by Preservation of cx43 Protein in Rat Heart. *PLoS One*. 2013;8(8):e71567. doi: 10.1371/journal.pone.0071567.
19. Curtis MJ, Walker MJ. Quantification of Arrhythmias Using Scoring Systems: an Examination of Seven Scores in an In Vivo Model of Regional Myocardial Ischaemia. *Cardiovasc Res*. 1988;22(9):656-65. doi: 10.1093/cvr/22.9.656.
20. Bers DM. Cardiac Excitation-contraction Coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205. doi: 10.1038/415198a.
21. Silva-Filho JC, Oliveira NN, Arcanjo DD, Quintans-Júnior LJ, Cavalcanti SC, Santos MR, et al. Investigation of Mechanisms Involved in (-)-borneol-induced Vasorelaxant Response on Rat Thoracic Aorta. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;110(2):171-7. doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00784.x.
22. Oz M, El Nebrisi EG, Yang KS, Howarth FC, Al Kury LT. Cellular and Molecular Targets of Menthol Actions. *Front Pharmacol*. 2017;8:472. doi: 10.3389/fphar.2017.00472.
23. Peixoto-Neves D, Silva-Alves KS, Gomes MD, Lima FC, Lahlou S, Magalhães PJ, et al. Vasorelaxant Effects of the Monoterpenic Phenol Isomers, Carvacrol and Thymol, on Rat Isolated Aorta. *Fundam Clin Pharmacol*. 2010;24(3):341-50. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00768.x.
24. Guedes DN, Silva DF, Barbosa-Filho JM, Medeiros IA. Calcium Antagonism and the Vasorelaxation of the Rat Aorta Induced by Rotundifolone. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(12):1881-7. doi: 10.1590/s0100-879x2004001200014.
25. Khaleel C, Tabanca N, Buchbauer G. α -Terpineol, a Natural Monoterpene: A Review of its Biological Properties. *Open Chem*. 2018;16(1):349-61. doi: 10.1515/chem-2018-0040.
26. Baylie RL, Cheng H, Langton PD, James AF. Inhibition of the Cardiac L-type Calcium Channel Current by the TRPM8 Agonist, (-)-menthol. *J Physiol Pharmacol*. 2010;61(5):543-50.
27. Lipsius SL, Hüser J, Blatter LA. Intracellular Ca²⁺ Release Sparks Atrial Pacemaker Activity. *News Physiol Sci*. 2001;16:101-6. doi: 10.1152/physiolonline.2001.16.3.101.
28. Zhou Q, Xiao J, Jiang D, Wang R, Vembaiyan K, Wang A, et al. Carvedilol and its New Analogs Suppress Arrhythmogenic Store Overload-induced Ca²⁺ Release. *Nat Med*. 2011;17(8):1003-9. doi: 10.1038/nm.2406.
29. Mehraein, F. A Review on Amiodarone as an Antiarrhythmic Drug. *Abnorm. Heart Rhythms*. 2015; 96:1593-600. doi: 10.1136/hrt.2008.152652.
30. Tisdale JE. Drug-induced QT Interval Prolongation and Torsades de Pointes: Role of the Pharmacist in Risk Assessment, Prevention and Management. *Can Pharm J (Ott)*. 2016;149(3):139-52. doi: 10.1177/1715163516641136.
31. Wang F, Koide M, Wellman GC. Nifedipine Inhibition of High-Voltage Activated Calcium Channel Currents in Cerebral Artery Myocytes Is Influenced by Extracellular Divalent Cations. *Front Physiol*. 2017;8:210. doi: 10.3389/fphys.2017.00210.
32. Gao H, Wang F, Wang W, Makarewich CA, Zhang H, Kubo H, et al. Ca(2+) Influx through L-type Ca(2+) Channels and Transient Receptor Potential Channels Activates Pathological Hypertrophy Signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;53(5):657-67. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.08.005.
33. Williams EMV. A Classification of Antiarrhythmic Actions Reassessed After a Decade of New Drugs. *J Clin Pharmacol*. 1984;24(4):129-47. doi: 10.1002/j.1552-4604.1984.tb01822.x.
34. Bryzgalov AO, Tolstikova TG, Shults EE, Petrova KO. Natural Products as a Source of Antiarrhythmic Drugs. *Mini Rev Med Chem*. 2018;18(4):345-62. doi: 10.2174/1389557516666161104144815.

