

Efeito Cardiodepressor do Acetato de Eugenil em Coração de Roedor

Cardi depressive Effect of Eugenyl Acetate in Rodent Heart

Leisiane Pereira Marques,¹ Samuel Santos Beserra,² Danilo Roman-Campos,² Antonio Nei Santana Gondim^{1,2}

Universidade do Estado da Bahia - Departamento de Educação,¹ Salvador, BA - Brasil

Universidade Federal de São Paulo – Biofísica,² São Paulo, SP – Brasil

Resumo

No presente trabalho investigou-se o efeito inotrópico do acetato de eugenil (AE), bem como sua ação sobre a corrente de Ca^{2+} do tipo L ($I_{Ca,L}$). Os experimentos de contratilidade foram realizados em átrio esquerdo isolado de cobaia exposto às concentrações crescentes da droga (1 a $5.000\mu M$). O AE reduziu a força de contração atrial ($IC_{50} = 558 \pm 24,06\mu M$) de modo dependente de concentração. O efeito do AE sobre a $I_{Ca,L}$ também foi avaliado em cardiomiócitos ventriculares isolados de camundongos, utilizando-se a técnica de “patch-clamp”. O AE apresentou um efeito inibitório ($IC_{50} = 1.337 \pm 221\mu M$) sobre os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem ($Ca_v1.2$). Em conclusão, o AE apresenta efeito cardiodepressor que se deve, pelo menos em parte, à diminuição da entrada de Ca^{2+} nos cardiomiócitos.

Introdução

As doenças cardiovasculares são um problema de saúde pública e estão entre as principais causas de óbitos no mundo.¹ Nessa perspectiva, é crescente o interesse pela busca de novas substâncias com propriedades farmacológicas sobre o sistema cardiovascular, principalmente as de origem natural.

A planta *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry, popularmente conhecida como cravo-da-índia, é constituída por diversos compostos químicos que apresentam uma ampla gama de efeitos farmacológicos. O eugenol (Figura 1A) é o mais abundante composto bioativo encontrado no óleo essencial do cravo-da-índia, seguido pelo acetato de eugenil (AE) (Figura 1B).²

Estudos demonstraram que o eugenol apresenta atividade cardiodepressora em ratos³ e cobaias⁴ provavelmente devido à inibição da corrente de Ca^{2+} do tipo L ($I_{Ca,L}$). Além disso, o eugenol atua como cardioprotetor.⁵

Apesar de diversos estudos abordarem as propriedades farmacológicas do eugenol sobre o coração, até o momento

não existem informações sobre a ação do AE no miocárdio. Dessa forma, o presente estudo descreve, pela primeira vez, os efeitos do AE sobre a contratilidade cardíaca e sua ação inibitória sobre a $I_{Ca,L}$.

Métodos

Animais

Para os experimentos de contratilidade foram utilizadas cobaias machos e fêmeas (*Cavia porcellus*, 400-600g). Para os estudos eletrofisiológicos foram utilizados camundongos machos adultos C57Bl/6J. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Estado da Bahia (licença: 03/2017).

Protocolos Experimentais

Avaliação do Efeito Inotrópico do AE

O átrio esquerdo foi mantido em solução de Tyrode modificada (10 mL, $36,5 \pm 0,5^\circ C$) com a seguinte composição (em mM): 140 NaCl; 5,4 KCl; 0,5 $MgCl_2$; 0,33 NaH_2PO_4 ; 11 glicose; 5 HEPES e 1,8 $CaCl_2$ (pH = 7,4), aerado com oxigênio (99,9%), estirado para uma tensão de 1gF e estimulado eletricamente (2Hz, 100V, 15ms). A força contrátil foi captada por um transdutor isométrico, sendo os sinais digitalizados (512Hz) e armazenados em um computador. Os átrios esquerdos foram submetidos às concentrações crescentes de AE (1-5.000 μM , 3 a 5 minutos).

Para fazer a solução-estoque de AE (obtido da Sigma-Aldrich) foi usado dimetil sulfoxido (DMSO).

Avaliação do Efeito do AE Sobre a Corrente de Cálcio Tipo L

Cardiomiócitos ventriculares de camundongos C57Bl/6J foram enzimaticamente isolados.⁶ Para medir a corrente de Ca^{2+} do tipo L ($I_{Ca,L}$) foi utilizada a técnica de patch-clamp^{7,8} no modo whole-cell voltage-clamp. A composição da solução interna (em mM) foi: 120 CsCl, 10 HEPES, 5 EGTA, 20 TEA-Cl e 5 NaCl (pH=7,2; CsOH). O Tyrode foi usado como solução externa. As células foram mantidas em um potencial de membrana de -80 mV, e depois foram submetidas a um pré-pulso que despolarizou a membrana para -40mV (50ms). Em seguida a membrana foi despolarizada para 0 mV (300ms, 0.1Hz). A amplitude da $I_{Ca,L}$ foi medida pela diferença entre o final do pulso teste (0mV) e o pico. As células foram expostas ao AE (10-3.000 μM , 2-3minutos). Os sinais foram digitalizados (5kHz) e armazenados em computador.

Palavras-chave

Acetato de Eugenil; Contração Miocárdica; *Syzygium Aromaticum*, Ratos.

Correspondência: Antonio Nei Santana Gondim •

Universidade do Estado da Bahia - Departamento de Educação
Av. Universitária Vanessa Cardoso e Cardoso, s/n. CEP 46430-000,
Guanambi, BA – Brasil

E-mail: agondim@uneb.br, agondim@unebb.br

Artigo recebido em 21/11/2019, revisado em 18/02/2020,
aceito em 16/03/2020

DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20190823>

Análise Estatística

Os resultados são expressos com média \pm erro padrão da média e foram analisados estatisticamente empregando-se o teste "t" pareado na sua forma bicaudal (nível de significância: $p < 0,05$).

Resultados

Efeito do AE Sobre a Força de Contração Miocárdica

Os traçados da Figura 1C mostram que o AE (700 μM) reduziu em aproximadamente 60% a amplitude da contração atrial quando comparado com o controle. Tal efeito foi parcialmente revertido (aproximadamente 75%) após a remoção da droga, quando comparado com o controle. Na Figura 1D é possível observar a curva de concentração-efeito do AE sobre a contratilidade ($n=4$), o qual apresentou uma IC_{50} (concentração que induz metade do efeito máximo) de $558 \pm 24,06 \mu\text{M}$ e efeito máximo = 100%.

Efeito do AE Sobre a $I_{\text{Ca,L}}$ em Cardiomiócitos Isolados

A Figura 2A mostra o traçado representativo da $I_{\text{Ca,L}}$ medida experimentalmente. Na figura 2B pode ser observado o curso temporal do efeito do AE sobre a amplitude da $I_{\text{Ca,L}}$. Na Figura 2C é possível visualizar traçados representativos da $I_{\text{Ca,L}}$ na situação controle (ausência da droga) e na presença de 10, 700 e 3.000 μM de AE. Na Figura 2D percebe-se que a exposição ao AE reduziu a amplitude da $I_{\text{Ca,L}}$ de modo dependente de concentração ($\text{IC}_{50} = 1.337 \pm 221 \mu\text{M}$).

Discussão

Os resultados aqui apresentados demonstram que o AE reduz a força de contração do músculo atrial de cobaia de modo dependente de concentração. Também foi observado que o AE inibe os canais de Ca^{2+} do tipo L ($\text{Ca}_v1.2$) em cardiomiócitos.

O AE apresentou um efeito cardiodepressor sobre o inotropismo atrial. Apesar de não existir dados na literatura que demonstrem o efeito cardiodepressor do AE, dados de seus análogos, como o eugenol, estão disponíveis. O eugenol,

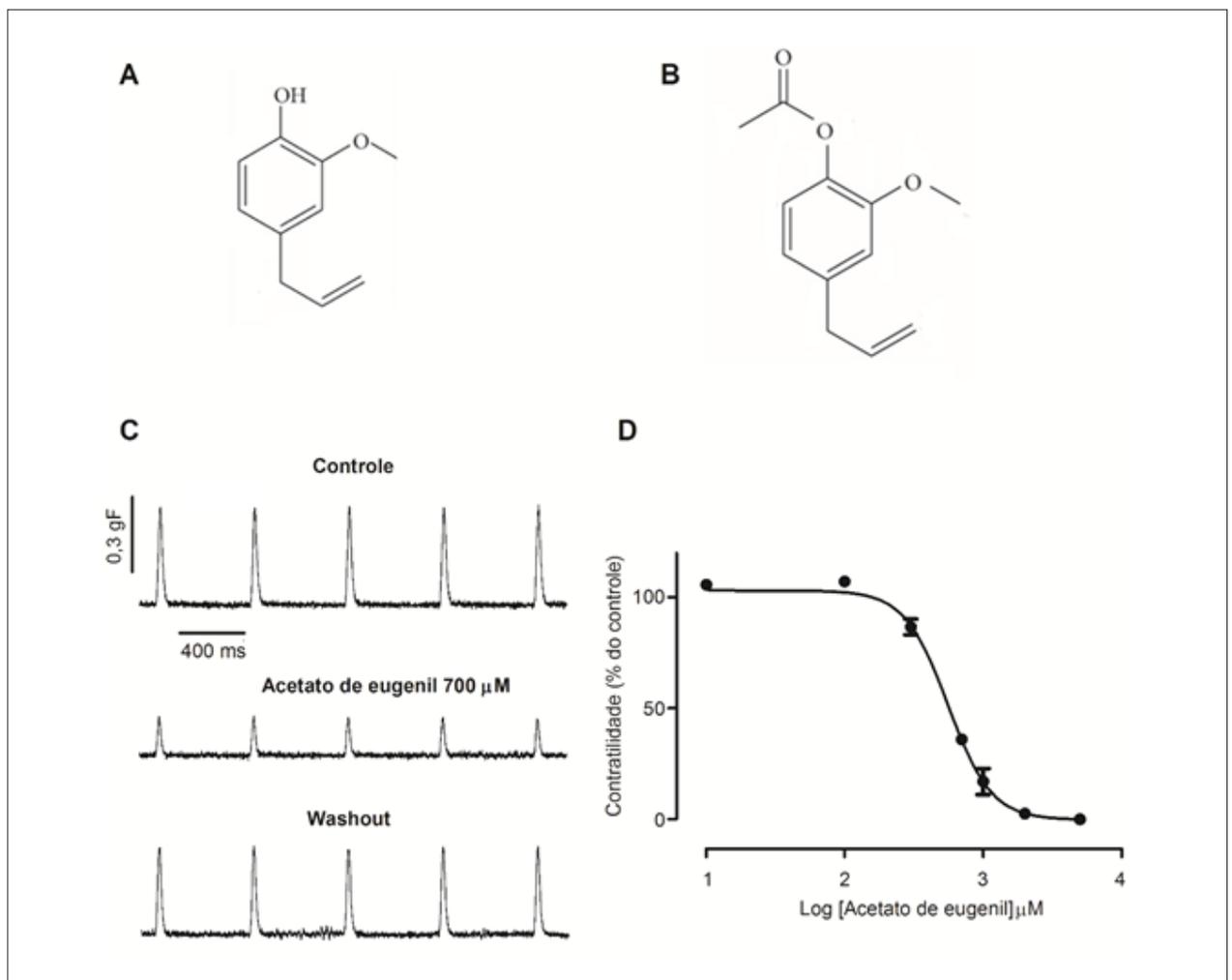


Figura 1 – Efeito do acetato de eugenil (AE) sobre a contratilidade do miocárdio atrial. A) Estrutura do eugenol. B) Estrutura do AE. C) Traçados representativos da contratilidade atrial na situação controle, na presença de 700 μM de AE, e após 10 minutos do washout. D) Curva concentração-efeito inotrópico negativo do AE ($n=4$).

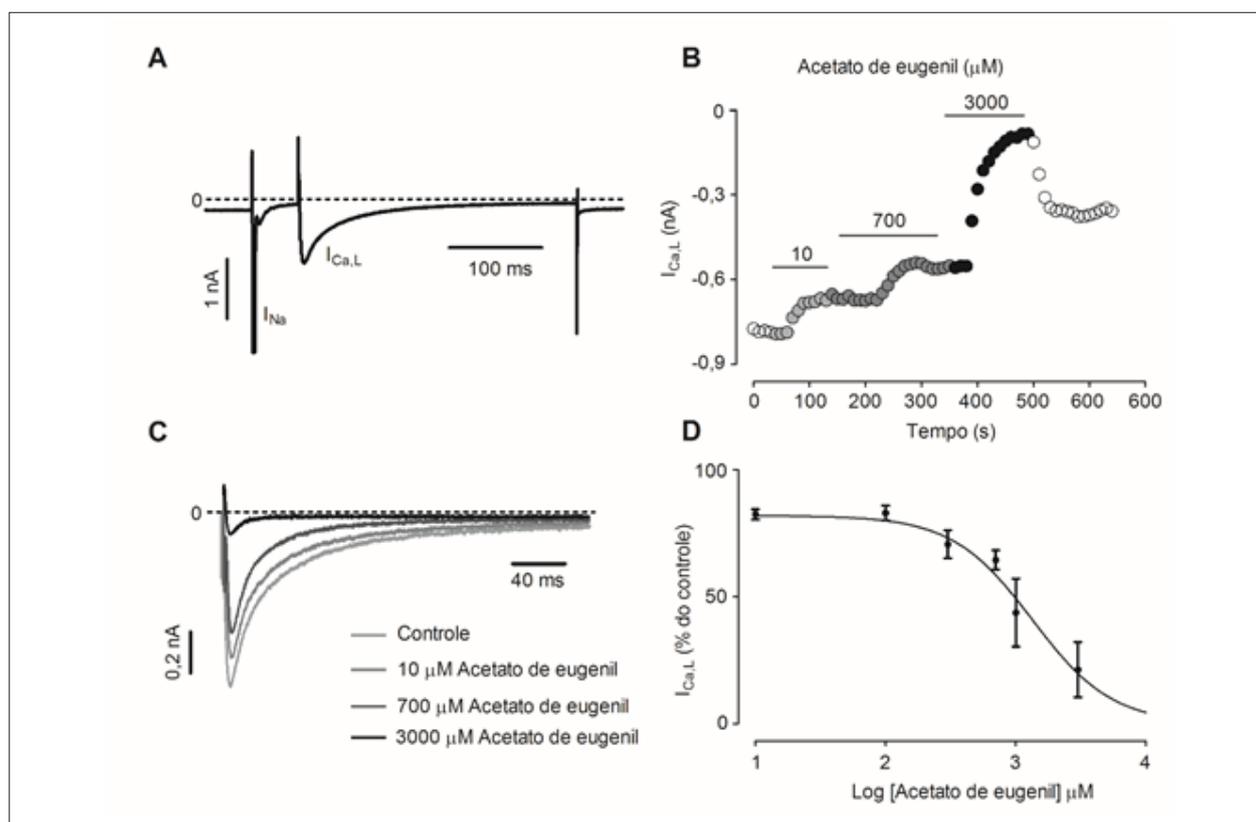


Figura 2 – Efeito do AE sobre a $I_{Ca,L}$. A) Corrente iônica obtida experimentalmente. B) Curso temporal do efeito do AE sobre a $I_{Ca,L}$. C) Traçados representativos da $I_{Ca,L}$ no controle e na presença de diferentes concentrações de AE. A linha tracejada indica zero de corrente. D) Curva concentração-efeito do AE sobre a $I_{Ca,L}$ em cardiomiócitos ($n = 4$).

de modo semelhante à droga aqui investigada reduz a força de contração do miocárdio ventricular de cobaia⁵ e rato,⁴ corroborando os dados aqui achados.

A força da contração do miocárdio correlaciona-se com alterações da amplitude do transiente de Ca^{2+} que é determinada pelo influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} presentes no sarcolema, bem como pela quantidade de Ca^{2+} liberada pelo retículo sarcoplasmático (RS) no processo denominado de acoplamento excitação-contração. A despolarização sarcolemal leva a abertura dos canais de Ca^{2+} do tipo L durante a fase do platô do potencial de ação, o que leva a uma corrente de entrada de Ca^{2+} . Esse influxo de Ca^{2+} estimula a liberação do Ca^{2+} armazenado no RS, processo conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} , que induz na contratilidade cardíaca.⁷ Dessa forma, mecanismos que alteram o manejo intracelular de Ca^{2+} estão envolvidos na regulação da contratilidade no músculo cardíaco.

Para tentar explicar o inotropismo negativo do AE sobre o músculo cardíaco foi verificada sua ação sobre a amplitude da $I_{Ca,L}$ em cardiomiócitos isolados. Os achados indicam que o AE reduz a amplitude da $I_{Ca,L}$, efeito que pode estar associado à ativação de receptores que modulam a $I_{Ca,L}$ e/ou ao bloqueio direto desses canais. Este mecanismo pode ser o responsável pela redução da força induzida pelo AE, uma vez que leva a redução da liberação de Ca^{2+} pelo RS.

Sensch et al.,⁴ ao estudar as propriedades farmacológicas do eugenol, quimicamente semelhante ao AE, demonstraram que essa substância deprime a força de contração atrial por reduzir o influxo de Ca^{2+} nos cardiomiócitos. Nesses experimentos, foi observado que o eugenol apresenta uma IC_{50} de $127\mu M$, valor menor do que a IC_{50} do AE ($1.337\mu M$). Esses dados sugerem que o eugenol é mais potente em bloquear a corrente de Ca^{2+} do que o AE.

Conclusão

O AE apresenta efeito cardiodepressor que pode ser explicado, pelo menos em parte, pela inibição do $Ca_v1.2$.

Agradecimentos

FAPESP 2014/09861-1 and PICIN/UNEB.

Contribuição dos Autores

Concepção e desenho da pesquisa e Análise estatística: Marques LP, Gondim ANS; Obtenção de dados: Marques LP, Beserra SS, Gondim ANS; Análise e interpretação dos dados: Marques LP, Roman-Campos D, Gondim ANS; Obtenção de financiamento e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Roman-Campos D; Redação do manuscrito: Roman-Campos D, Gondim ANS.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pelo Programa Interno de Iniciação Científica da UNEB (PICIN/UNEB) e Fundação de Amparo de Pesquisa de São Paulo (Fapesp).

Vinculação Acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Referências

1. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*. 2016; 388(10053):1459-544.
2. Khalil AA, urRahman U, Khan MR, Sahar A, Mehmoodac T, Khan M. Essential oil eugenol: sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives. *RSC Advances*. 2017;7(52):32669-81.
3. Damiani CEN, Moreira CM, Zhang HT, Creazzo TL, Vassall DV. Effects of eugenol, an essential oil, on the mechanical and electrical activities of cardiac muscle. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44(6):688-95.
4. Sensch O, Vierling W, Brandt W, Reiter M. Effects of inhibition of calcium di and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: comparison of β -caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine. *Br J Pharmacol*. 2000; 131(6):1089-96.
5. Choudhary R, Mishra KP, Subramanyam C. Interrelations between oxidative stress and calcineurin in the attenuation of cardiac apoptosis by eugenol. *Mol Cell Biochem*. 2006;283(1-2):115-22.
6. Shioya T. A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. *J Physiol Sci*. 2007;57(6):327-35.
7. Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW. Calcium and excitation-contraction coupling in the heart. *Circ Res*. 2017;121(2):181-95.
8. amill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell free membrane patches. *Pflugers Arch*. 1981;391(2):85-100.

