



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

ALEXANDRE BARBOSA ANDRADE

EFEITOS ANTIARRÍTMICOS DE UM PEPTÍDEO (PhK_v)
PURIFICADO DO VENENO DA ARANHA ARMADEIRA
(*PHONEUTRIA NIGRIVENTER*)

Belo Horizonte-MG

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALEXANDRE BARBOSA ANDRADE

EFEITOS ANTIARRÍTMICOS DE UM PEPTÍDEO (PhK_v)
PURIFICADO DO VENENO DA ARANHA ARMADEIRA
(*PHONEUTRIA NIGRIVENTER*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Fisiologia, para a obtenção de título de mestre.

Orientador

Prof. Dr. Alvair Pinto de Almeida

Belo Horizonte-MG

2008

Aos meus pais, João Aldo e Rosa Alice.

A todas as pessoas que estiveram envolvidas, direta e indiretamente.

À minha irmã, Vanessa.

À Graciela, pelo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por dar-me força nesta conquista.

Ao meu pai, onde quer que esteja, por iluminar o caminho a percorrer.

À minha mãe, pelo apoio e incentivo para vencer mais esta etapa.

À minha irmã Vanessa pela confiança transmitida.

À Graciela, com seu amor, que transformou os caminhos de minha vida ...

Ao orientador, Prof. Alvair, pelos ensinamentos passados, pela amizade, pela compreensão e pela brilhante orientação que me fez apaixonar pelo mundo da ciência.

A todos os amigos do laboratório de fisiologia cardiovascular Carlos, Sílvia, Denis, Luciano, Bruno, Felipe, Mariana e biologia do desenvolvimento, Fúlvia, Pedro e demais colegas, pelo convívio, palavras carinhosas de incentivo e ajuda no percorrer por essa estrada.

Aos técnicos Darcy, Betinha, Francisco e Zezé, pela prestatividade.

Aos professores Anderson, Marcus Vinícius, Sílvia e Paulo Eustáquio (“in memoriam”), pelas sugestões e correções.

Ao departamento de Fisiologia e Biofísica, que me acolheu há 8 anos.

À Universidade Federal de Minas Gerais e a todos colegas professores.

Aos meus pacientes que me permitem conhecer tanto a ciência como a arte.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu êxito profissional.

Aos meus pacientes que aqui estão ou que se foram, por permitirem-me a cada dia apaixonar-me mais pela Medicina que, apesar da ciência, continua a ser uma arte ...

Ofereço

**"O grande obstáculo ao conhecimento não é a ignorância, mas a ilusão do
conhecimento"**

Daniel Boorstein

RESUMO

EFEITOS ANTIARRÍTMICOS DE UM PEPTÍDEO (PHKV) PURIFICADO DO VENENO DA ARANHA ARMADEIRA (*PHONEUTRIA NIGRIVENTER*).

Neste estudo avaliamos os efeitos da fração neurotóxica PhKv do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (PN) sobre a reperfusão e taquiarritmias atriais em corações e átrios direitos isolados de ratos.

Os corações eram perfundidos de acordo com a técnica de Langendorff, mantidos aquecidos a ($37\pm 1^\circ\text{C}$) e continuamente borbulhados com mistura carbogênica (95% $\text{O}_2/5\%$ CO_2) em uma solução de Krebs-Ringer (K-R) a uma pressão constante (65 mmHg). Isquemia local era induzida por meio da ligação da artéria coronária esquerda (ACE) por 15 minutos. Após a isquemia, os corações eram reperfundidos por 20 minutos. Arritmias cardíacas eram definidas pela presença de taquicardia e/ou fibrilação ventriculares após a liberação da ligadura da ACE.

Átrios direitos de ratos eram submersos em um banho contendo solução K-R, mantidos aquecidos a ($37\pm 1^\circ\text{C}$) e continuamente borbulhados com mistura carbogênica (95% $\text{O}_2/5\%$ CO_2). Taquiarritmias eram evocadas por meio de trens de estímulos elétricos (250 pulsos, 66.7 Hz).

A fração PhKv (240 nM) era injetada um minuto antes da reperfusão ou presente no banho de órgão contendo solução K-R (60 nM) reduziram a duração das arritmias de reperfusão e das taquiarritmias atriais. Em átrios direitos isolados foi capaz de aumentar a tensão sistólica e diminuir a frequência cardíaca, sem alterar a tensão diastólica.

Estes resultados mostram efeitos antiarritmogênicos da fração purificada PhKv da aranha PN em ambos modelos de arritmias.

ABSTRAT

ANTIARRYTHMOGENIC EFFECTS OF PURIFICATED PEPTIDE (PhKv) FROM ARMED SPIDER (*PHONEUTRIA NIGRIVENTER*).

In this study we evaluated the effects of PhKv neurotoxic fraction of the spider *Phoneutria nigiventer* venom on arrhythmias reperfusion (R) and atrial tachyarrhythmias (AT) in isolated rat hearts and in isolated rat right atrium. Rat hearts were perfused according to Langendorff technique and maintained in heated ($37\pm 1^\circ\text{C}$) and continuously gassed (95% O₂/5% CO₂) Krebs-Ringer solution (KRS) at constant pressure (65 mm Hg). Local ischemia was induced by LCA (left coronary artery) ligation for 15 minutes. After ischemia, hearts were reperfused for 20 minutes. Cardiac arrhythmias were defined as the presence of ventricular tachycardia and/or ventricular fibrillation after the ligation of the coronary artery was released. Rat right atria were immersed in the bath KRS and maintained in heated ($37\pm 1^\circ\text{C}$) and continuously gassed (95% O₂/5% CO₂). Tachyarrhythmia was evoked by trains of electric stimuli (250 pulses, 66.7 Hz). The PhKv fraction was (240nM) injected one minute before reperfusion or presented in organ bath (60 nM). PhKv reduced the duration of reperfusion arrhythmias and atrial tachyarrhythmias. In rat right atria PhKv were increase the systolic tension and decrease the cardiac frequency, without change the diastolic tension. These results demonstrate an antiarrhythmogenic effect of the purified fraction PhKv from PN in both models of arrhythmias.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Fotografia da aranha *Phoneutria nigriventer*.
- FIGURA 2** Eletrocardiograma demonstrando um ritmo em fibrilação atrial.
- FIGURA 3** Desenho esquemático do mecanismo de reentrada.
- FIGURA 4** Desenho esquemático da purificação do peptídeo PhKv.
- FIGURA 5** Desenho esquemático do sistema de perfusão de Langendorff para corações isolados de ratos.
- FIGURA 6** Fotografia do sistema de Langendorff para preparação de corações e do banho para preparação de átrios isolados.
- FIGURA 7** O coração canulado.
- FIGURA 8** Registro padrão da tensão cardíaca de corações isolados antes (basal), durante isquemia e após reperfusão.
- FIGURA 9** Registro padrão do ECG antes (basal), durante e após isquemia (reperfusão).
- FIGURA 10** Desenho esquemático da indução da estimulação elétrica.
- FIGURA 11** Intervalo QT no eletrograma.
- FIGURA 12** Intervalo PPi em átrios isolados.
- FIGURA 13** Protocolo experimental de arritmias de reperfusão.
- FIGURA 14** Protocolo experimental de TA.
- FIGURA 15** Arritmias de reperfusão no grupo controle e no grupo submetido a infusão de PhKv.
- FIGURA 16** Duração das arritmias após a oclusão da artéria coronária esquerda em corações isolados de ratos.

- FIGURA 17** ISA de corações isolados de ratos perfundidos com solução de K-R e reperfundidos após injeção PhKv.
- FIGURA 18** Intervalos QT do eletrocardiograma.
- FIGURA 19** Indução da TA após estimulação elétrica.
- FIGURA 20** Efeito da acetilcolina na tensão sistólica e tensão diastólica em átrios isolados.
- FIGURA 21** Efeito da neostigmina na tensão sistólica e tensão diastólica em átrios isolados.
- FIGURA 22** Efeito da neostigmina e da acetilcolina, presentes na solução nutritora, na frequência cardíaca.
- FIGURA 23** Duração das TA em átrios direitos isolados de ratos.
- FIGURA 24** Efeito da PhKv na tensão sistólica e tensão diastólica em átrios isolados.
- FIGURA 25** Efeito da PhKv na frequência cardíaca em átrios isolados.
- FIGURA 26** Duração das TA em átrios direitos isolados de ratos controle.
- FIGURA 27** Duração das TA em átrios direitos isolados de ratos.
- FIGURA 28** Intervalos PPi em átrios direitos isolados de ratos.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Classificação taxonômica

TABELA 2 - Classificação de antiarrítmicos

TABELA 3 - Solução mãe utilizada no preparo da solução nutridora

TABELA 4 - Composição final , em mM, da solução de Krebs-Ringer

TABELA 5 - Relação entre o tempo de duração das arritmias e o escore utilizado

LISTA DE ABREVIATURAS

4-AP	4-aminopiridina
ACE	Artéria coronária esquerda
Ach	Acetilcolina
ADP	Adenosina difosfato
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
cm	Centímetro
DIA	Diazóxido
DNA	Acido desoxirribonucléico
ECG	Eletrocardiograma
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
EPM	Erro padrão da média
et al.	Colaboradores
FA	Fibrilação atrial
g	Gramma
h	Hora
i.p.	Intra-peritonal
ICB-UFMG	Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
ISA	Índice de severidade de arritmias
<i>Ito</i>	Corrente de transiente de saída de potássio voltagem depende:

K-R	Krebs-Ringer
m	Metro
ml	Mililitro
ms	Milissegundo
mv	Milivolt
NCX	Trocador sódio/cálcio
NEO	Neostigmina
nM	Nanomol
NO	Óxido nítrico
°C	Graus Celsius
PAF	Fator ativador de plaquetas
PhKv	Fração purificada do veneno bruto da aranha <i>Phoneutria</i> <i>Nigriventer</i>
PN	<i>Phoneutria nigriventer</i>
TA	Taquiarritmias atriais
TD	Tensão diastólica
TS	Tensão sistólica
U.I.	Unidades internacionais

	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
1. INTRODUÇÃO...	17
1.1. As aranhas.....	18
1.2. A aranha <i>Phoneutria nigriventer</i>	18
1.3. Ações das toxinas de <i>Phoneutria nigriventer</i> no aparelho cardiovascular	19
1.4. Classificação de antiarrítmicos e drogas classe III de última geração	23
5. Arritmias de reperfusão.....	24
.....1.5.1. Lesão de reperfusão.....	24
.....1.5.2. Atordoamento miocárdico.....	25
.....1.5.3. Paradoxos do cálcio e oxigênio.....	25
.....1.5.4. Radicais livres.....	26
.....1.5.5. Disfunção endotelial.....	27
.....1.5.6. O fenômeno do não-refluxo.....	28
1.6. A fibrilação atrial	29
1.6.1. Teorias.....	30
1.6.2. Eletrofisiologia e o mecanismo de reentrada.....	31
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo geral.....	36
2.2. Objetivos específicos.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Materiais.....	38
3.1.1. Animais.....	38

3.1.2 Equipamentos	38
3.1.3. Drogas e reagentes.....	39
3.1.4. Toxinas.....	40
3.2. Métodos.....	41
3.2.1. Sistema de perfusão.....	41
3.2.2 Solução nutridora	41
3.2.3. Preparação do coração isolado e canulação.....	45
3.2.3.1. Registros	47
3.2.3.2. Procedimentos para a oclusão da artéria coronária esquerda.....	49
3.2.4. Preparação do átrio direito isolado.....	49
3.2.4.1. Preparação.....	49
3.2.4.2. Estimulação elétrica.	50
3.2.4.3 Registros	51
3.3. Protocolo experimental.....	53
3.3.1. Arritmias de reperfusão.....	53
3.3.2. Taquiarritmias atriais.....	55
3.4. Análise estatística.....	56
4. RESULTADOS.....	57
4.1.Efeito da PhKv em arritmias de reperfusão em corações isolados de ratos	58
4.2.Efeito da PhKv em modelo de fibrilação atrial em átrios direitos isolados de ratos	64
5.DISSCUSSÃO.....	77
6. CONCLUSÃO.....	86

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87



1- INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1. AS ARANHAS

Existem registros fósseis de aranhas que datam de 300 milhões de anos, ou seja, do período carbonífero e já foram descritas aproximadamente 40 mil espécies, das quais, apenas trinta produzem venenos tóxicos ao homem.

Entre as aranhas de importância médica no Brasil, destacam-se a *Loxosceles*, ou aranha marrom, descrita por Lowe em 1835 e a *Phoneutria*, ou aranha armadeira, descrita por Perty em 1833 (BRAZIL & VELLARD, 1925)

1.2. A ARANHA *PHONEUTRIA NIGRIVENTER*

A aranha *Phoneutria nigriventer* (PN) (figura 1) mostra-se endêmica em algumas regiões brasileiras, especialmente no sudeste e sul do país. No Brasil, entre as aranhas, é a espécie prevalente em acidentes devido a sua agressividade (LUCAS, 1988). É conhecida popularmente como aranha armadeira devido à posição de ataque que toma ao sentir-se ameaçada.

Possui hábitos noturnos e, durante o período de acasalamento, pode chegar ao interior dos domicílios quando os machos estão à procura das fêmeas. Acidentes, então, normalmente, ocorrem na residência, ou próximo a ela, durante o manuseio de material de construção, entulhos, lenha, entre outros.

A sua classificação taxonômica encontra-se na tabela 1

É um aracnídeo que não constrói teias e possui entre 2 e 3 cm de corpo coberto de pêlos curtos e uma envergadura capaz de atingir 15 cm.

O seu sucesso como predadora explica-se pela potência das diversas toxinas presentes em seu veneno (GOMEZ, et al., 2002). Entre os sintomas apresentados pelos pacientes agredidos, encontram-se câimbras, tremores, convulsões, parestesias, paralisia espástica, distúrbios visuais, sudorese, priapismo, arritmias cardíacas, hipertensão, hipotensão, edema agudo de pulmão e insuficiência cardíaca. Em crianças, os acidentes podem até levar a morte (BRAZIL & VELLARD, 1926; BUCARETCHI et al., 2000).

1.3. AÇÕES DAS TOXINAS DA *PHONEUTRIA NIGRIVENTER* NO SISTEMA CARDIOVASCULAR

Um dos principais motivos do interesse das ações das toxinas de aranhas no sistema cardiovascular é o fato dos seus polipeptídeos interagirem com canais iônicos.

Toxinas purificadas da PN destacam-se pela ação em canais de sódio (ARAUJO et al., 1993), de potássio (KUSHMERICK et al, 1999; CARNEIRO et al.,2003), bem como em canais de cálcio (GUATIMOSIN, 1997; CASSOLA et al.,1998; LEÃO et al.,2000).

Em 1993 foi identificado um grupo de polipeptídeos do veneno bruto denominado PNV1 que gerava vasoespasmo em músculo liso vascular de coelhos (MARANGONI, et al., 1993) . No mesmo ano, foi isolado outro grupo de polipeptídeos, PNV2, que também era capaz de provocar vasoespasmo em vasos isolados de coelhos (ANTUNES, et al., 1993).

Já em 1994, Lopez-Martins et al., utilizando cromatografia de fase reversa, isolaram e caracterizaram o polipeptídeo PNV4 que, em estudos realizados “*in vitro*”, era capaz de

relaxar corpos cavernosos de coelhos. Em 2008, Nunes et al. demonstraram que a fração denominada Tx2-6 é capaz potencializar a ereção em ratos.

Já em 1996, Costa et al., utilizando ratos anestesiados, verificaram que a injeção intravenosa de altas doses do veneno bruto era capaz de gerar uma breve resposta hipotensora, inibida parcialmente com o uso de inibidores de canais de potássio, seguida de uma hipertensão persistente, que era atenuada com o uso de bloqueadores de canais de cálcio, o que sugere o envolvimento desses canais na gênese dos efeitos sistêmicos.

Já no ano de 1998, Costa et al., utilizando corações isolados de ratos, observaram que a infusão de baixas doses do veneno bruto da PN era capaz de ativar a liberação simpática de noradrenalina, que repercutia em aumentos de força de contração e da frequência cardíaca. Porém, altas doses do mesmo, levava à liberação de acetilcolina e, conseqüentemente, a bradicardia.

Em 2000, Estato et al. verificaram que, em coelhos anestesiados, a injeção intracerebro-ventricular do veneno bruto era capaz de gerar uma breve hipotensão, seguida de hipertensão arterial persistente. Contudo, somente a injeção de altas doses endovenosas eram capazes de produzir os mesmos efeitos sistêmicos. A hipertensão, em ambos os casos, podia ser inibida parcialmente com o uso de antagonistas α -adrenérgicos, o que demonstra, tanto uma ação central, bem como uma ação periférica que envolve ativação simpática sistêmica.

Em revisão recente, Gomez, et al., 2002, descreveram que as neurotoxinas da *Phoneutria nigriventer* atuam em diversos canais iônicos, portanto, devido a essa propriedade, podem apresentar um potencial efeito antiarritmogênico.



FIGURA 1 – Fotografia da aranha *Phoneutria nigriventer*.

TABELA 1- Classificação taxonômica

Super-reino	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Metazoa</i>
Filo	<i>Arthropoda</i>
Subfilo	<i>Chelicerata</i>
Classe	<i>Arachnida</i>
Ordem	<i>Araneae</i>
Subordem	<i>Labidognatha</i>
Superfamília	<i>Ctenidae</i>
Família	<i>Phoneutrinae</i>
Subfamília	<i>Plectruroidea</i>
Gênero	<i>Phoneutria</i>
Espécie	<i>Phoneutria nigriventer</i>

(KEYSERLING, 1891)

1.4. CLASSIFICAÇÃO DE ANTIARRÍTMICOS E DROGAS CLASSE III DE ÚLTIMA GERAÇÃO

A classificação modificada de fármacos antiarrítmicos encontra-se na tabela 2.

TABELA 2 – Classificação de antiarrítmicos (Vaughan Williams,1984)

Classe I	Bloqueadores de canais de sódio
Classe II	Antagonistas beta-adrenérgicos
Classe III	Bloqueadores de canais de potássio
Classe IV	Bloqueadores de canais de cálcio

Entre os agentes antiarrítmicos classe III de última geração destacam-se o AVE0118 e o AZD7009. O primeiro possui ação antiarrítmica, com efeito átrio-específico, que, ao inibir a corrente de transiente de saída de potássio voltagem dependente (*I_{to}*) via Kv4.3, prolonga o potencial de ação e conseqüentemente o período refratário absoluto (BLAAUW et al., 2004). Já o segundo, ao atuar sobre a mesma corrente, mostra-se como um potente agente conversor da fibrilação atrial (FA) (CARLSSON et al., 2006).

1.5. ARRITMIAS DE REPERFUSÃO

As arritmias de reperfusão são definidas como alterações no ritmo cardíaco que surgem em consequência da restauração parcial ou total do fluxo sanguíneo no tecido cardíaco total ou parcialmente isquêmico (MANNING, 1984).

Os eventos arrítmicos aparecem devido a uma série de alterações miocárdicas como as decorrentes da ação de radicais livres de oxigênio (MA et al.,1992), da ação do sistema renina-angiotensina, do fenômeno do não-refluxo, das alterações intracelulares de cálcio (DALY, 1984; NORDIN, 1989; MIURA & KIMURA, 1989; HARDING & DUNCAN, 1997), da necrose miocárdica (PABLA & CURTIS, 1995), entre outros (NEVES et al.,1997).

Elas podem ser induzidas em vários modelos experimentais e, entre estes, o coração isolado de rato tem se constituído em um modelo útil para estudo (LUBBE et al., 1978).

1.5.1. LESÃO DE REPERFUSÃO

A lesão de reperfusão é um termo usado para descrever as alterações funcionais e estruturais que se tornam aparentes durante o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia.

Relacionam-se à reperfusão o atordoamento miocárdico, o acentuado edema celular (*cell swelling*), a morte celular, a disfunção endotelial, o fenômeno de não-refluxo e as arritmias de reperfusão.

Quando o fluxo sanguíneo tissular é interrompido, uma série de processos metabólicos e enzimáticos são afetados. As reservas de ATP são rapidamente depletadas. Nota-se um

acúmulo de lactato com a célula tornado-se acidótica e são ativadas proteases intracelulares (HACKEL, 1988). Além disso, aumenta-se a permeabilidade capilar e gera-se edema tissular (OGAWA, 1992). Somando-se a isso, a reversibilidade desse processo relaciona-se diretamente com a duração da isquemia (STHAL et. al, 1989), porém a reintrodução do oxigênio em um meio isquêmico inicia uma complexa corrente de eventos que levam a lesões tissulares adicionais e a um acúmulo ou redistribuição intracelular de cálcio (KU, 1982; BRAUNWALD & KLONER, 1985).

Atualmente, sabe-se que o comprometimento do relaxamento vascular observado após isquemia-reperfusão afeta, primariamente, os relaxamentos vasculares dependentes do endotélio e que sequestradores (*scavengers*) de radicais livres do oxigênio são capazes delimitar a lesão de reperfusão (SECCOMBE & SCHAFF, 1994).

1.5.2. ATORDOAMENTO MIOCÁRDICO

O atordoamento miocárdico é uma manifestação da lesão de reperfusão. O fenômeno é definido como uma prolongada disfunção pós-isquêmica persistente mesmo na ausência de danos irreversíveis celulares (BRAUNWALD & KLONER, 1985).

1.5.3. PARADOXOS DO CÁLCIO E DO OXIGÊNIO

A lesão de isquemia-reperfusão, em um passado recente, fora relacionada, classicamente, a dois fenômenos: o paradoxo do cálcio e o paradoxo do oxigênio. Esses dois

fenômenos apresentam distúrbios patológicos semelhantes (lesão de reperfusão, acúmulo do cálcio intracelular e um mesmo tipo de lesão celular) e podem estar relacionados entre si.

O paradoxo do cálcio foi inicialmente observado após um período de perfusão de corações de cães com uma solução que não continha este íon. No momento da reperfusão os corações, após período isquêmico, ao restaurar o cálcio citosólico, perdiam a contratilidade, resultando uma extensa lesão miocárdica. Após a reperfusão, há um maciço influxo de cálcio para dentro da célula, provavelmente por alteração da permeabilidade de membrana. A lesão de reperfusão é proporcional ao tempo de perfusão isenta de cálcio, entretanto já é evidente após 3 min. As lesões iniciais ocorrem na mitocôndria e no sarcolema, com subsequente aparecimento de características bandas de contratura o que facilita o rompimento celular secundário à contração de cardiomiócitos adjacentes (CASE, 1989).

O paradoxo do oxigênio foi constatado quando se observou que a reperfusão com solução oxigenada, após período de hipóxia miocárdica, resultou em lesão maior, com contratura, sobrecarga de cálcio e necrose celular. A re-oxigenação causa lesão do sarcolema, da membrana basal, desorganização mitocondrial e outras alterações tissulares, indicando que a reintrodução do oxigênio inicia um rápido e grave processo de lesão celular. Consideráveis informações têm sido acumuladas mostrando que este efeito paradoxal da re-oxigenação se deva às ações de radicais livres do oxigênio (CASE, 1989).

1.5.4. RADICAIS LIVRES

Os radicais livres são lesivos através de uma variedade de mecanismos: 1) peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares; 2) oxidação de grupos sulfidríla inativando uma variedade de enzimas; 3) alterações do DNA inibindo a síntese de ATP e

consumindo as reservas de dinucleotídeos adenínicos da nicotinamida; 4) direta inativação do óxido nítrico (NO) comprometendo os relaxamentos vasculares dependentes do endotélio; 5) formação de peroxinitrito, um ânion instável e tóxico, reagindo com o NO; 6) ativação de citocinas como a interleucina-1. Dentro da luz de vasos reperfundidos os ânions superóxidos estimulam a agregação plaquetária e iniciam a liberação de variados fatores vasoconstritores, incluindo o ADP, o PAF, a serotonina e o tromboxano A2 (SECCOMBE, 1994).

1.5.5. DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

Em 1982, surgiram evidências referentes à disfunção endotelial após 90 minutos de isquemia e 2 horas de reperfusão. A disfunção endotelial é definida como perda de resposta vasodilatadora dependente de endotélio (KU et al.,1982). A disfunção inicia-se precocemente, após aproximadamente 2 minutos de reperfusão e permanece por um longo período de tempo (LEFER & LEFER, 1991; TSAO et al., 1990).

O endotélio é o tecido mais vulnerável à reperfusão e exibe disfunção mesmo antes da musculatura lisa vascular ou expressa lesão miocárdica (MCAFEE ET AL.,1990).

A disfunção endotelial pode levar a aumento do tônus vascular e vasoespasmo após isquemia e reperfusão. Sabe-se que o comprometimento da liberação do EDRF/NO, ocorre precoce e tardiamente após isquemia regional e reperfusão (PEARSON , et al., 1990).

A disfunção endotelial também ocorre durante isquemia global e reperfusão com alteração do fluxo coronariano dependente do endotélio e diminuição da produção de prostaciclina (HASHIMOTO ET AL.,1991).

Observa-se também que, na isquemia regional e reperfusão, precoce e tardiamente, o endotélio coronariano apresenta vasoconstrição hipóxica dependente do endotélio

(PEARSON , et al., 1990). Contração dependente do endotélio potenciada pela epóxi também é observada em um período precoce após isquemia global e reperfusão. Um aumento da produção de fatores constritores dependentes do endotélio ocorre, também, após lesão traumática da camada íntima vascular (CARTIER, at al., 1991). O provável mediador desta atividade vascular exacerbada é o ânion superóxido produzido pelo endotélio (LIN et al.,1991).

Após isquemia miocárdica global seguida de reperfusão, o sistema coronariano epicárdico perde a habilidade de expressar mediadores da vasodilatação dependente do endotélio, que atuam a nível de receptores, ao passo que o relaxamento dependente do endotélio mediado pelo ionóforo do cálcio (A23187), que não depende de estimulação de receptores, encontra-se inalterado (PEARSON, et al.,1990). Além disso, a vasodilatação dependente do endotélio produzida pela fosfolipase C exógena, também é normal, mas o relaxamento produzido pelo fluoreto de sódio, o qual atua através de G-proteína(s) sensível à toxina pertussis, encontra-se comprometido. Esses dados indicam que o comprometimento da produção de EDRF/NO mediado por receptores após a lesão de reperfusão possa ser devido a uma disfunção de G-proteínas que liga os receptores da célula endotelial à via da síntese de EDRF/NO (EVORA et al., 1994).

Estudos apontam que os antagonistas do cálcio, como o verapamil e o diltiazem, possam prevenir ou diminuir as conseqüências da lesão de reperfusão por diminuição do influxo celular do cálcio. A habilidade da amilodipina, outro bloqueador de canal de cálcio, em limitar a lesão da célula endotelial pode estar relacionada com a diminuição da formação do íon peroxinitrito. Além disso, a via comum da NO sintetase envolve a formação de complexos cálcio calmodulina. Assim, bloqueando-se a entrada do cálcio extracelular, a amilodipina pode diminuir a formação destes complexos, interferindo na liberação do NO que em um meio rico em ânions superóxidos pode limitar a formação do íon tóxico peroxinitrito,

limitando a lesão tissular (SOBEY , et al, 1992).

1.5.6 O FENÔMENO DO NÃO-REFLUXO

A combinação de disfunção endotelial, edema e estresse oxidativo pode gerar disfunção microvascular e esta ser responsável pela morte celular e indução de arritmias.

Uma grave disfunção microvascular pode limitar a perfusão após a reperfusão miocárdica e denominou-se este fenômeno de não-refluxo, caracterizado pelo não restabelecimento do fluxo coronariano miocárdico, apesar da reperfusão (KLONER et al., 1974).

1.6 A FIBRILAÇÃO ATRIAL

A fibrilação atrial (FA), figura 2, é a arritmia cardíaca sustentada mais prevalente na prática clínica e possui grande significado devido a sua associação à morbi-mortalidade cardiovascular, bem como por ser responsável por aproximadamente um terço das hospitalizações por distúrbios do ritmo cardíaco (KANNEL, et al.,1998). Em humanos, é caracterizada pela rápida e inefetiva ativação atrial que varia de 400 a 600 pulsos por minuto associada a contrações ventriculares irregularmente irregulares de aproximadamente 150 batimentos a cada minuto (FENELON, et al., 1996) .

Atualmente, apesar dos avanços no conhecimento e dos extensos estudos, que datam de mais de um século, os reais mecanismos envolvidos em sua fisiopatologia ainda permanecem desconhecidos (NATTEL, 1995).

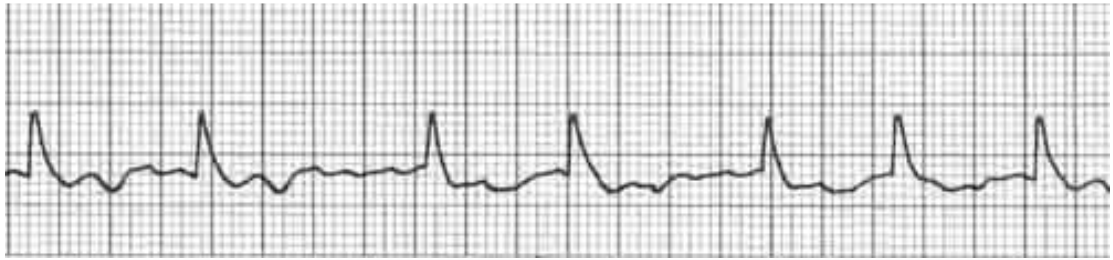


FIGURA 2 – Eletrocardiograma (arquivo pessoal) demonstrando um ritmo em fibrilação atrial. Observa-se ausência de ondas p, com espaço RR variáveis e complexo QRS normal.

1.6.1 TEORIAS

Duas teorias são aceitas para explicar os mecanismos eletrofisiológicos envolvidos na FA, a da ativação focal e a das múltiplas ondas de reentrada.

A teoria das múltiplas ondas de reentrada sugere que vários circuitos de reentrada atrial são responsáveis pela ocorrência da FA (MOE, et al.,1959). Os autores sugerem que, para a sustentação da arritmia, é preciso que uma área mínima de tecido atrial esteja envolvida, a qual é denominada massa crítica, o que explicaria a maior ocorrência da FA em doenças que provocam a distensão ou hipertrofia do tecido atrial.

A teoria da ativação focal surgiu por meio de estudos nos quais a aplicação tópica de aconitina no átrio originava taquicardia atrial rápida, que por sua vez, induzia a FA (SCHERF

et al.,1948). Recentemente, evidenciou-se que a presença de presença de tecido endomiocárdico do átrio esquerdo nos óstios das veias pulmonares favorece o surgimento de focos ectópicos rápidos capazes de deflagrar a FA. Também foi demonstrado que, além das veias pulmonares, os focos ectópicos indutores da FA podem ser encontrados no ligamento de Marshall, veias cavas e *crista terminalis* (HAISSAGUERRE et al.,1998).

Maiores conhecimentos foram recentemente agregados ao se analisar a seqüência de ativação na FA com o uso de mapeamento de múltiplos eletrodos. Demonstrou-se que estímulos prematuros com bloqueio unidirecional ocorrem pela presença de condução anisotrópica atrial ou pelas próprias características heterogêneas da refratariedade atrial (ALESSIE et al.,1984).

Sabe-se também que as características do circuito reentrante dependem dos valores do período refratário e da velocidade de condução do impulso, e que o produto desses valores define o comprimento de onda. Assim, a ativação atrial com um grande comprimento de onda poderia gerar um único circuito macro-reentrante (ex.: *flutter* atrial), enquanto que a presença de comprimento de onda mais curto favorece a ocorrência de vários e pequenos circuitos de reentrada, caso típico da FA (CHEN et. al,2006). Atualmente, acredita-se que as duas teorias se completam. A presença de focos ectópicos, únicos ou múltiplos, ocasiona, em condições especiais, alterações da refratariedade e da velocidade de condução do tecido atrial, para, por fim, favorecem a gênese dos circuitos reentrantes (KHAIRY & NATTEL, 2002).

1.6.2. ELETROFISIOLOGIA E O MECANISMO DE REENTRADA

O nó-sinoatrial apresenta-se como marcapasso cardíaco devido a sua propriedade intrínseca de formação e transmissão rápida de seu disparo rítmico. Correntes iônicas

positivas para o meio intracelular são capazes de despolarizar a membrana celular e correntes contrárias a repolarizam.

A atividade marcapasso resulta do balanço iônico observado durante o período diastólico do potencial de ação. Neste, progressivas correntes de entrada iônica induzem a uma, também, progressiva despolarização diastólica que, por fim, ao atingir um valor crítico, ou potencial de disparo, culmina com a despolarização celular. Se a velocidade dessa despolarização diastólica aumenta em um ponto ectópico, cria-se a condição para a geração de potenciais ectópicos e com frequência de disparo elevada.

Focos ectópicos também podem aparecer na presença de despolarizações tardias. Durante o período sistólico (despolarização) a concentração citoplasmática de íons cálcio livres aumenta rapidamente; porém, durante a diástole (repolarização) esse íon é transportado para o retículo sarcoplasmático, bem como para fora da célula. Este último evento, realizado pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (NCX), ocorre sob a ação de mecanismos eletrogênicos nos quais cada íon de cálcio é trocado por um íon de sódio. Assim, a entrada deste é capaz de criar um evento de despolarização tardia, que aparece, geralmente, secundário ao aumento da atividade do trocador NCX ou ao excesso intracelular de íons cálcio.

A reentrada (figura 3) surge da propagação de impulsos anormais entre diferentes áreas do tecido miocárdico atrial. Após uma despolarização inicial, canais de Na^+ permanecem inativos durante um breve período de tempo denominado período refratário no qual o tecido miocárdico não pode se despolarizar. Na reentrada, quando um complexo ectópico é gerado em uma zona secundária e atinge o ponto primário em refratariedade, este não irá se despolarizar, porém se propagará por vias alternativas que, ao retornar para o ponto primário, já capaz de se despolarizar, um novo evento de reativação aparecerá. Se o tempo de retorno ao foco secundário é longo o bastante, para este já ter ultrapassado, a sua refratariedade, perpetua-se um processo de reativação persistente denominada reentrada.

Surgem, dessa forma, circuitos simples, com rápido disparo regular ou múltiplos circuitos, nos quais se observa atividade irregular. Finalmente, quando uma zona transmissora de ondas relacionadas ao mecanismo de reentrada mostra-se com o período refratário alargado, cria-se a condição eletrofisiológica para o evento se dissipar (NATTEL, 2002)

Atualmente, todos os fármacos antiarrítmicos possuem eficácia deficiente. Geralmente, o bloqueio de canais iônicos celulares responsáveis pela propagação do impulso no tecido miocárdico possuem alguma propriedade antiarrítmica. Assim, drogas que prolongam o período refratário efetivo são portadoras de poder anti-arritmogênico. Entre essas, destacam-se os antiarrítmicos de classe III, que apresentam a capacidade de prolongar o potencial de ação por meio de bloqueio de canais de potássio, envolvidos no processo de repolarização (BACANER, et al. 1986).

Já que as subunidades Kv4.2 e Kv4.3 dos canais de potássio são as grandes responsáveis pela corrente *Ito* do potencial de ação miocárdico (ISBRANDT et al., 2000) relacionado à repolarização precoce do tecido cardíaco e que estudos com animais transgênicos que não expressam Kv4.2 e Kv4.3 (BARRY et al., 1998, HOPPE et al., 2000) demonstram um aumento da duração do potencial de ação, agentes específicos capazes de bloquear essas correntes poderiam demonstrar grande potencial antiarritmogênico.

A partir do momento que PhKv, fração purificada do veneno bruto da PN, foi capaz de inibir correntes de potássio do tipo A em células GH3 (CARNEIRO et al., 2003) e que outros estudos apontam que estas correntes são mediadas por canais do tipo Kv4.3 e Kv4.2 , que também são expressos em tecidos miocárdicos de ratos e de humanos, essa toxina poderia apresentar importante ação antiarritmogênica.

Por tudo isso, é nosso objetivo estudar o possível efeito antiarritmogênico da fração purificada PhKv da *Phoneutria nigriventer* em arritmias atriais e de reperfusão utilizando átrios e corações isolados de ratos.

A**B****C**

FIGURA 3 – Desenho esquemático do mecanismo de reentrada no qual uma onda de propagação (A), ao encontrar um bloqueio na propagação (em preto), que reflete o estímulo, adquire um caminho acessório (C) para atingir a região final (B) e retornar a A em um circuito reentrante (CHEN, et. al., 2006).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar possível efeito antiarrítmico do peptídeo PhKv purificado do veneno da *Phoneutria nigriventer* em corações isolados e átrios direitos isolados de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do peptídeo purificado PhKv administrado 1 minuto antes da reperusão em corações isolados de ratos;
 - Avaliar o efeito do peptídeo purificado PhKv em modelo de taquiarritmias em átrios direitos isolados de ratos;
 - Validar o método descrito por Bassani et al., 1999 utilizando acetilcolina, neostigmina e atropina;
 - Avaliar uma possível participação de canais de potássio em modelo de fibrilação atrial utilizando um abridor de canais para potássio, diazóxido (IK_{ATP}) e um bloqueador para canais de potássio, 4-aminopiridina (*Ito*).
 - Avaliar efeito do peptídeo purificado PhKv nas tensões sistólica e diastólica, bem como na frequência cardíaca em átrios direitos isolados de ratos.
-
-

2. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando 240-310 g, com ciclo claro-escuro (14h/10h), mantidos em gaiolas coletivas, com temperatura variando entre $25 \pm 2,0$ °C e com livre acesso a água e ração *ad libitum* . Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB-UFMG.

3.1.2. EQUIPAMENTOS

- Sistema de Langendorff para coração isolado com pressão constante;
- Banho aquecido para preparação de átrios isolados;
- Transdutor de força (modelo FT 0,03, Grass);
- Microcomputador contendo o software ACQKNOWLEDGE;
- Balança analítica PRECISION PR-100(SPEC);
- Bomba de vácuo Q-355 B (QUIMIS);
- Agitador magnético (FISATOM);
- Agitador de tubos (QUIMIS);
- Bala de carbogênio (WHITE MARTINS);

- Filtro EXPRESS – 0,22 MILLIPORE
- Material cirúrgico: tesouras, pinças anatômicas, pinça dente de rato, porta agulha e fio de sutura monoagulhado (BIODINÂMICA Seda 4.0);
- Guilhotina manual;
- Vidraria e material de laboratório: balões volumétricos, béqueres, provetas, pipetas graduadas, pipetas automáticas, placas de Petri, seringas de plástico, eppendorf, ponteiros e tubos de polietileno.

3.1.3 DROGAS E REAGENTES

- NaHCO_3 PM 84,01 (Sigma, Brasil);
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ PM 147,02 (Sigma, Brasil);
- KCL PM 74,55 (Sigma, Brasil);
- NaCl PM 58,44 (Merck, Alemanha);
- KH_2PO_4 PM 136,09 (Sigma, Brasil);
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ PM 246,47 (Sigma, Brasil)
- Dextrose anidra (glicose) PM. 180,16 (Sigma, Brasil);
- Heparina (Roche, Brasil);
- Neostigmina (Roche, Brasil);
- Atropina (Roche, Brasil);
- Acetilcolina (Roche, Brasil);
- 4-aminopiridina (Sigma, Brasil);
- Diazóxido (Sigma , Brasil);

3.1.4. TOXINAS

O peptídeo purificado PhKv do veneno bruto da PN foi cedido, gentilmente, pelo Prof. Marcus Vinícius Gomez do Departamento de Farmacologia/ICB/UFMG.

A purificação do peptídeo PhKv a partir do veneno bruto (GOMEZ et al., 2002) está representada na figura 4.

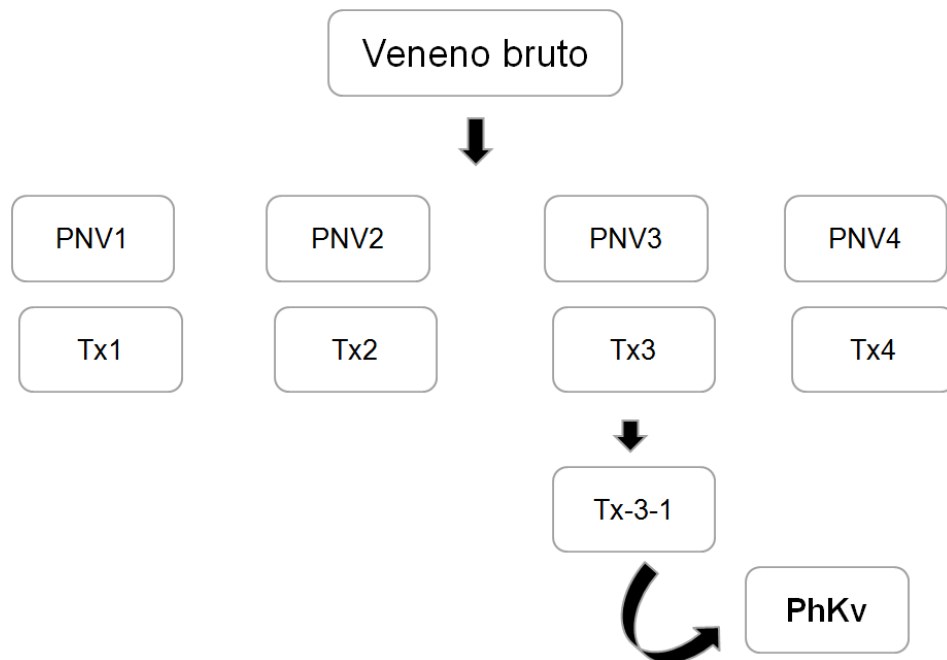


FIGURA 4 – Desenho esquemático da purificação do peptídeo PhKv a partir do veneno bruto da PN.

3.2 MÉTODOS

3.2.1. SISTEMA DE PERFUSÃO

O sistema de perfusão utilizado (figuras 5 e 6), por pressão constante, é uma adaptação do Sistema de Langendorff, primeiramente descrito por Oscar Langendorff em 1895 (DÖRING,1990). Este sistema foi constituído por um tubo de vidro de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro e 1,0 m de altura. Na extremidade inferior, o tubo foi conectado a uma pequena cânula, na qual existe uma entrada para conexão de uma seringa utilizada para injeção de drogas, bem como toxinas. Na parte superior existia uma entrada para a solução nutritora a uma pressão de perfusão constante (65 cm H₂O). O tubo de vidro foi envolto por uma jaqueta de água em circulação e aquecida a $37 \pm 0,5$ °C. A oxigenação era feita diretamente no tubo de vidro por meio do borbulhamento de uma mistura carbogênica (5% de CO₂ e 95% de O₂).

3.2.2. SOLUÇÃO NUTRIDORA

A solução nutritora usada na perfusão dos corações isolados foi a de Krebs-Ringer (K-R) (tabela 4). Cada litro dessa solução foi feito a partir de 50 ml de uma solução mãe (tabela 3),

2,2 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e 2,1 g de glicose, preparado e filtrado antes de cada experimento. O volume é completado com água deionizada.

TABELA 3 - Solução mãe utilizada no preparo da solução nutritora

COMPOSTO	QUANTIDADE
NaCl	138,4g
K Cl	7,0g
KH ₂ PO ₄	3,2g
MgSO ₄	5,8g
CaCl ₂	7,4g
H ₂ O deionizada	1000 ml

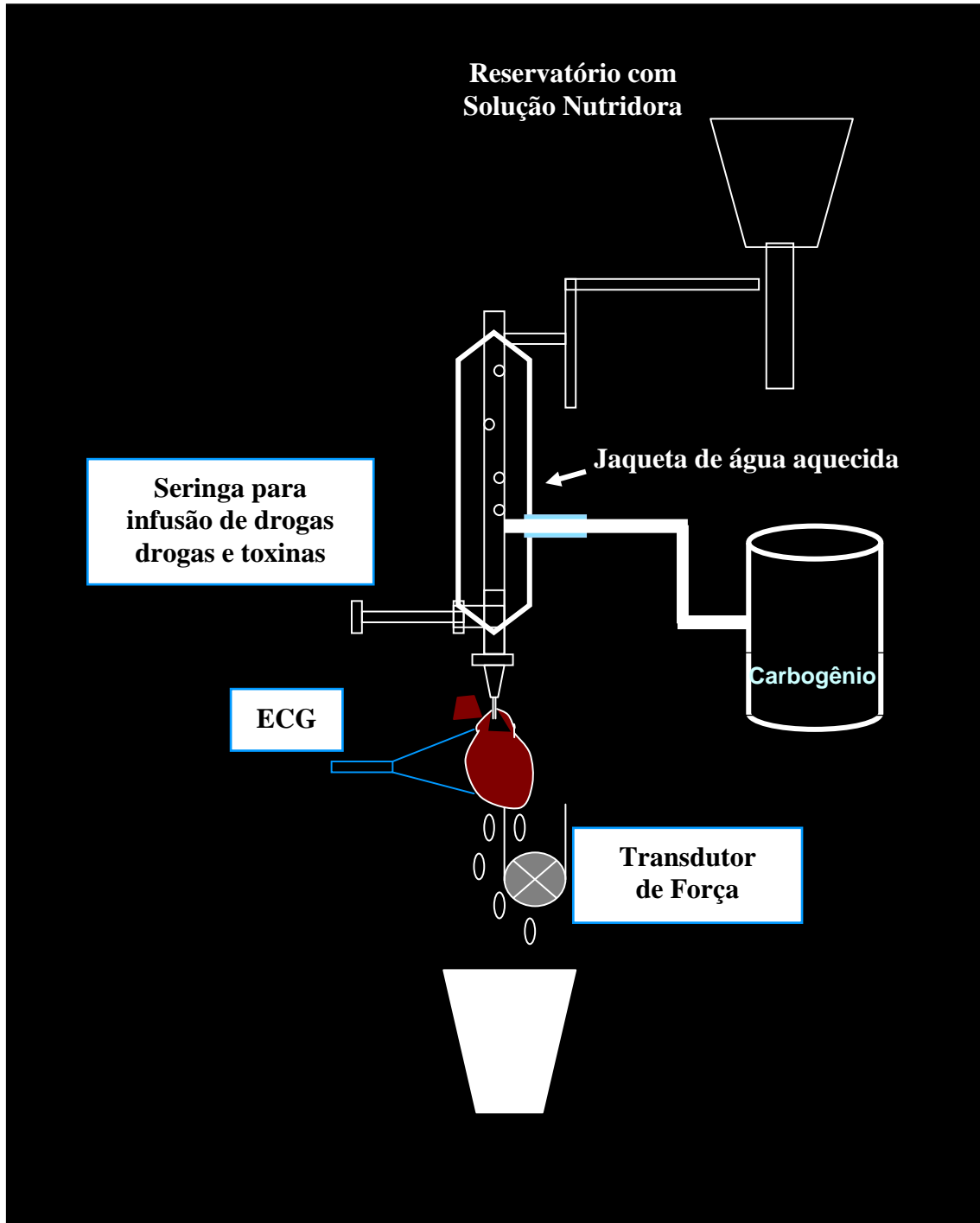


FIGURA 5 – Desenho esquemático do sistema de perfusão de Langendorff para corações isolados de ratos.

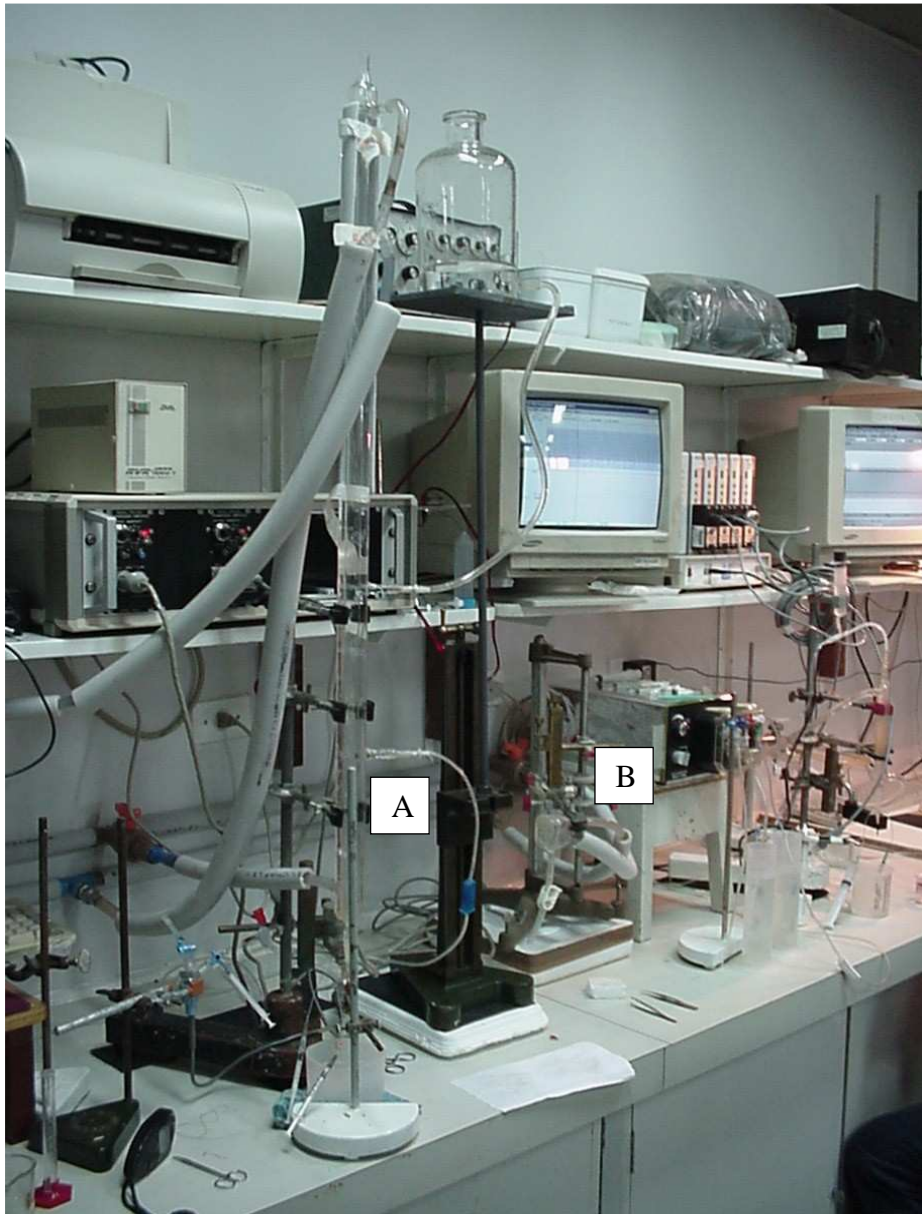


FIGURA 6 – Fotografia do sistema de Langendorff para preparação de corações (A) e do banho para preparação de átrios isolados (B).

TABELA 4 - Composição final , em mM, da solução Krebs-Ringer

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO EM mM
NaCl	118,41
KCl	4,69
KH ₂ PO ₄	1,17
MgSO ₄	1,17
CaCl ₂	2,51
Dextrose anidra (glicose)	11,65
NaHCO ₃	26,24

3.2.3 PREPARAÇÃO DO CORAÇÃO ISOLADO E CANULAÇÃO

Os animais foram heparinizados (400 U.I de Heparina, i.p.) e 10 minutos após sacrificados por decapitação. Em seguida, procedeu-se a torocotomia. As cartilagens costais foram abertas em ambos os lados e o esterno rebatido para cima. Uma vez exposta a cavidade torácica, seccionou-se sucessivamente a veia cava inferior, a veia cava superior, as artérias aorta e pulmonar, a traquéia, o esôfago, parte dos pulmões e retirou-se o coração em bloco. Depois de retirado, o coração foi colocado em um béquer contendo solução nutritiva oxigenada a 4° C na qual foi realizada leve pressão sobre o coração com os dedos para a saída do sangue contido nas câmaras cardíacas. O resfriamento tinha por objetivo diminuir o metabolismo do miocárdio e o consumo de O₂ nos instantes anteriores à canulação do coração. Depois de transferido para uma placa Petri , os restos de tecidos vascular e pulmonar, da traquéia e do esôfago que acompanhavam o coração foram removidos.

Em seguida, a aorta ascendente foi seccionada com uma tesoura cirúrgica na altura de sua primeira bifurcação (tronco braquiocefálico), confeccionando-se, assim, um coto de $0,5 \pm 0,1$ cm. A aorta foi, então, fixada por meio de um fio de sutura a uma agulha de aço inoxidável ou ponteira de vidro, que já se encontrava suspensa em conexão com o sistema de perfusão (figura 7). A seguir, procedeu-se com retirada dos fragmentos teciduais remanescentes aderidos à superfície cardíaca com uma tesoura reta de ponta fina. O tempo entre o sacrifício e a perfusão girava em torno de 3 minutos. Após o término da montagem, aguardava-se 20-30 minutos para estabilização da função cardíaca. Após este período, inicia-se o protocolo do estudo.

A injeção da PhKv foi realizada pela seringa conectada ao sistema (volume máximo de 0,2 ml). Após a infusão a concentração final da PhKv era de 240 nM.

Quando o coração apresentava-se arritmico ou com alguma área avermelhada em sua superfície, durante a montagem da preparação, o experimento era descartado.

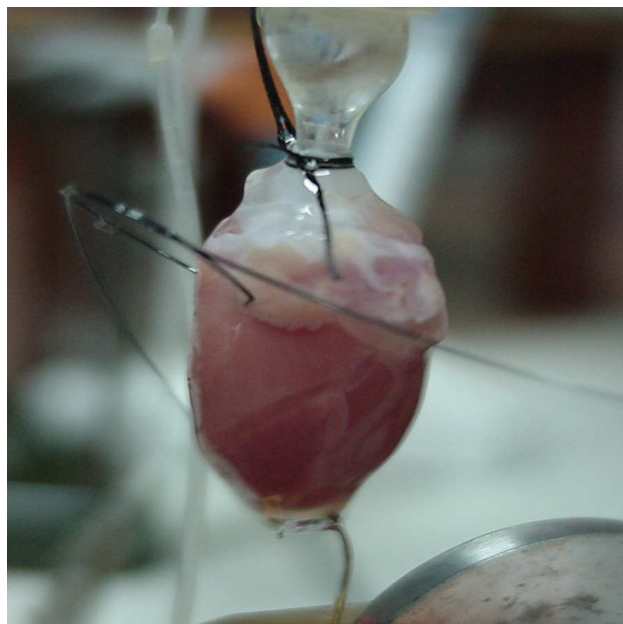


FIGURA 7 – O coração canulado conectado ao sistema de perfusão.

3.2.3.1 REGISTROS

Os seguintes registros foram realizados:

A. Força de contração

A força de contração era captada por meio de um pequeno anzol de aço inoxidável fixado ao ápice do coração que por sua vez conecta-se ao transdutor de força por meio de uma linha que passa através de uma roldana. Aplicava-se uma tensão diastólica de aproximadamente $1 \pm 0,2$ g ao coração (tensão diastólica), a qual era ajustada durante todo o período de estabilização (figura 8).

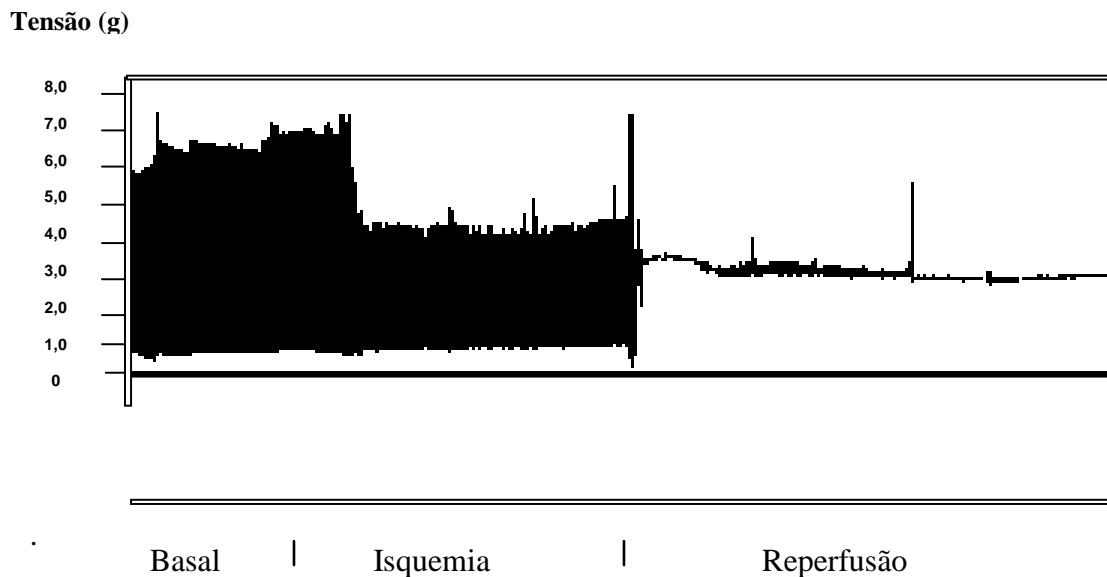


FIGURA 8 – Registro padrão da tensão cardíaca (g) de corações isolados antes (basal), durante e após isquemia.

B. Atividade elétrica

A atividade elétrica do coração (figura 9) era registrada utilizando-se dois eletrodos de superfície, onde um eletrodo era colocado no átrio direito e outro no ventrículo esquerdo.

Para a aquisição dos sinais, utilizava-se um sistema conversor análogo-digital. Os sinais a partir do transdutor de força eram enviados a um amplificador (Biopac System, Santa Bárbara, USA) e em seguida registrado em um microcomputador contendo um *software* de aquisição de dados (Acknowledge) com uma frequência de amostragem de 1000 ciclos/min.

Analisou-se o intervalo QT (figura 11) no eletrograma de corações isolados de ratos após a infusão de 240 nM de PhKv.

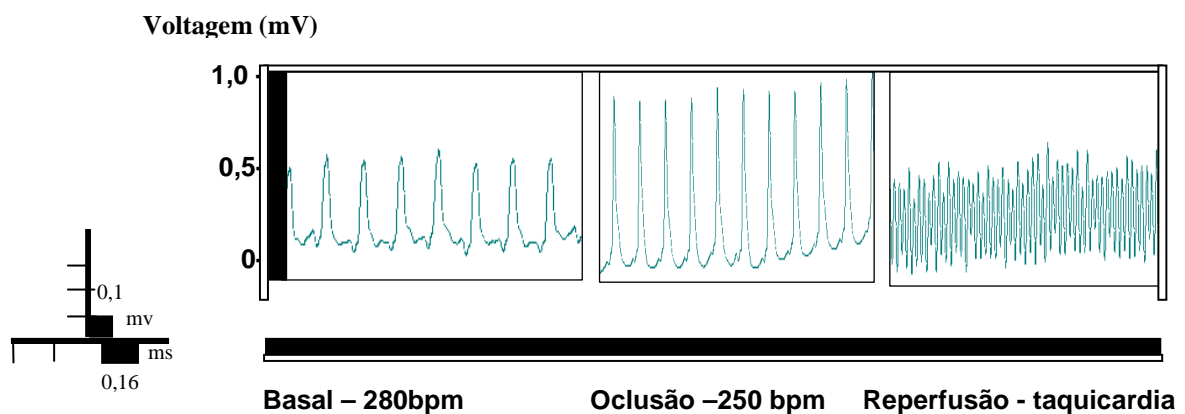


FIGURA 9 – Registro padrão do ECG antes (basal), durante (isquemia) e após (reperusão)

C. Medida do fluxo coronariano

A medida do fluxo coronariano (ml/min) foi determinada colhendo-se o perfusato durante 1 minuto e definindo o volume em mililitros, com o auxílio de uma proveta graduada (10 ml).

Esta medida foi utilizada como parâmetro de comparação para a determinação do sucesso da oclusão de artéria coronária esquerda (ACE).

3.2.3.2 PROCEDIMENTO PARA A OCLUSÃO DA ARTÉRIA CORONÁRIA ESQUERDA

A oclusão da ACE foi realizada de acordo com a técnica de Johns & Olson, 1954 e de Lubbe et al., 1978. Utilizando um porta-agulha, passa-se um fio de sutura monoagulhado em volta da ACE (figura 7).

A oclusão foi mantida por 15 minutos e a reperfusão foi feita cortando o fio com uma lâmina de bisturi o que liberava a artéria ocluída anteriormente.

3.2.4. PREPARAÇÃO DE ÁTRIO DIREITO ISOLADO

3.2.4.1 PREPARAÇÃO

Os procedimentos desde o sacrifício até a colocação do coração em placa petri com solução nutritora resfriada foram os mesmos descritos anteriormente.

A seguir, dissecou-se o átrio direito que era montado verticalmente em um banho de órgão (figura 5) contendo 10 ml de solução de K-R a $37,0^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C, sendo borbulhado com carbogênio (95% O₂/ 5%CO₂).

A porção proximal do átrio fixava-se a um anzol que era conectado a um transdutor de força (modelo FT 0,03, Grass) e a outra porção era fixada em um par de eletrodos de platina

conectados a um estimulador elétrico proveniente do sistema de aquisição de dados da *Biopac System*.

Eletrogramas eram obtidos pela captação de sinais elétricos por meio de eletrodos de platina alocados próximo ao átrio perfundido.

Após aplicação de $0,5 \pm 0,1$ g de tensão diastólica, o átrio direito era deixado por um período de estabilização (30 min), com trocas de 10 em 10 minutos da solução de K-R. A tensão diastólica era ajustada durante todo o período de estabilização.

3.2.4.2 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

As taquiarritmias atriais (TA) eram obtidas com trens de pulso, utilizando a técnica de Godoy et al., 1999, ligeiramente modificada, isto é, aplicava-se um triplo trem de 66,7 Hz, 250 pulsos, a 7-8 mv, durante 5 segundos, até a indução de TA (figura 10).

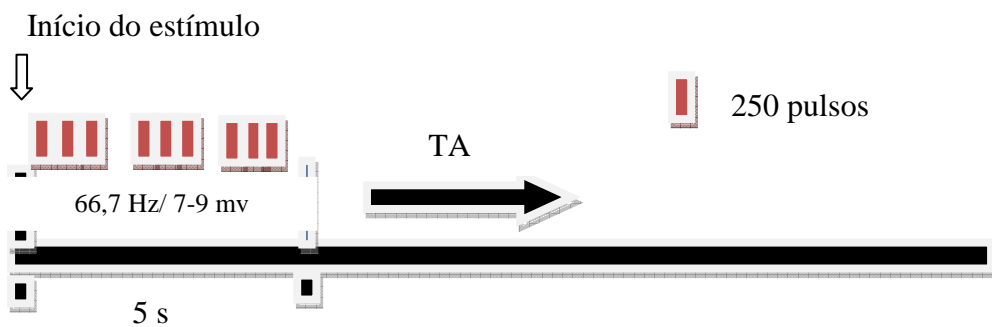


FIGURA 10 – Desenho esquemático da estimulação elétrica

As tentativas operavam-se com intervalos de 30 segundos e, caso não houvesse indução de taquiarritmias, interrompia-se na décima tentativa e descartava-se o experimento.

Episódio de taquiarritmia atrial era considerado quando o átrio direito iniciava a arritmia após o término da estimulação. Calculou-se, em segundos, a partir de então, o tempo das taquiarritmias que, quando excediam 600 segundos, eram consideradas irreversíveis.

Comparava-se, então, a duração das TA em segundos, na presença e ausência do peptídeo PhKv ou drogas como: acetilcolina (Ach), neostigmina (NEO) , atropina, diazóxido (DIA), 4-aminopiridina (4-AP).

3.2.4.3. REGISTROS

Os seguintes registros foram realizados:

A. Força de contração

A força de contração era captada por meio de um pequeno anzol de aço inoxidável fixado à porção proximal, anteriormente, ligada ao átrio esquerdo, que por sua vez conectava-se ao transdutor de força por meio de uma linha.

B. Atividade elétrica

A atividade elétrica atrial era registrada como descrito anteriormente.

Para a aquisição dos sinais, utilizava-se um sistema conversor análogo-digital. Os sinais a partir do transdutor e dos eletrodos eram enviados a um amplificador (Biopac System,

santa Bárbara, USA) e em seguida registrado em um microcomputador contendo um *software* de aquisição de dados (Acknowledge).

Analisou-se os intervalos PPI em átrios direitos isolados de ratos submetidos ao banho de órgão contendo 60 nM de PhKv.

Denominamos intervalo PPI, ou ciclo PPI, o intervalo entre duas ondas P (figura 12). Corresponde a frequência de despolarização atrial, ou simplesmente frequência atrial.

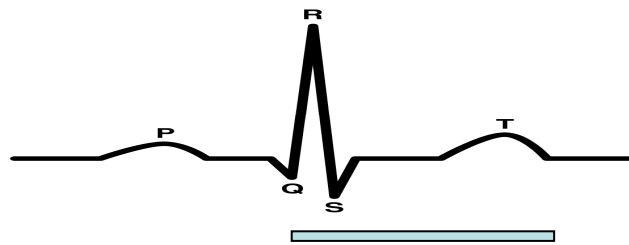


FIGURA 11 – Intervalo QT no eletrograma

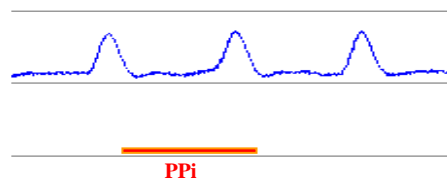


FIGURA 12 – Intervalo PPI em átrios isolados.

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.3.1. ARRITMIAS DE REPERFUSÃO

No modelo de arritmia de reperfusão, o tempo de estabilização, de oclusão da ACE e de reperfusão eram iguais para todos os grupos experimentais, ou seja, 20 minutos de estabilização, 15 minutos de oclusão da artéria coronária esquerda, injeção de PhKv 1 min antes da reperfusão, desocclusão coronariana, observação de início de fenômeno arritmogênico e 30 minutos de reperfusão do miocárdio (figuras 13).

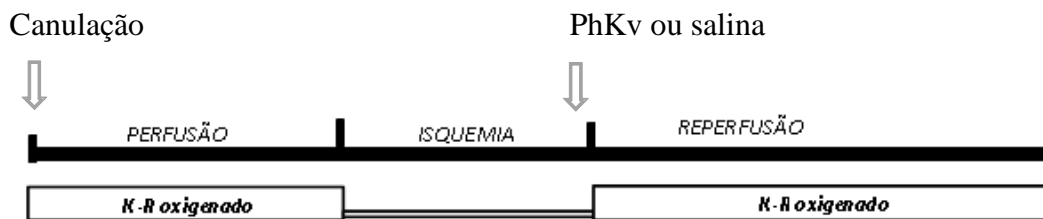


FIGURA 13 - Protocolo experimental de arritmias de reperfusão no grupo controle durante a estabilização, oclusão e reperfusão em grupos controle e submetidos a injeção de PhKv (240 nM) ou solução salina no grupo controle.

O tempo de duração das arritmias foi cronometrado assim que elas iniciam, ou seja, logo após a desocclusão da ACE. Para expressar esse tempo de duração das arritmias foi atribuído um escore correspondente ao tempo em que o coração permaneceu arritmico, quando o escore foi igual a 12 as arritmias foram consideradas irreversíveis.

A esse sistema de quantificação das arritmias, ou seja, aos escores, dá-se o nome de Índice de Severidade das Arritmias (BERNAUER & ERNENPUTSCH, 1988) (tabela 5).

TABELA 5 - Relação entre o tempo de duração das arritmias e o escore utilizado

DURAÇÃO DAS ARRITMIAS (MIN)	ESCORE
ATÉ 3	2
3 A 6	4
6 A 10	6
10 A 15	8
15 A 20	10
20 A 25	11
25 A 30	12 (irreversível)

Os grupos foram divididos da seguinte maneira:

Grupo Controle

Os corações eram submetidos ao protocolo de oclusão/desocclusão descrito anteriormente.

Grupos Experimentais

Os corações eram submetidos ao protocolo de oclusão/desoclusão descrito anteriormente, mas administrava-se 1 minuto antes da reperfusão após o início de taquiarritmias ventriculares a PhKv na concentração final de 240 nM ou solução salina no grupo controle (Figura 13).

3.3.2. TAQUIARRITMIAS ATRIAIS

Após adequado posicionamento da preparação, iniciava-se um período de 30 minutos de estabilização, com troca de solução a cada 10 minutos, no grupo controle, seguidos de 10 minutos de imersão em solução de KR contendo drogas, diazóxido (100 μM), 4-aminoperidina (4-AP) (1 μM), acetilcolina (Ach) (10^{-7}mM), neostigmina (NEO) (10^{-7}mM), atropina (10^{-7}mM) e PhKv 60nM nos outros grupos experimentais para instituir a estimulação e manter a preparação por mais 30 minutos após TA.

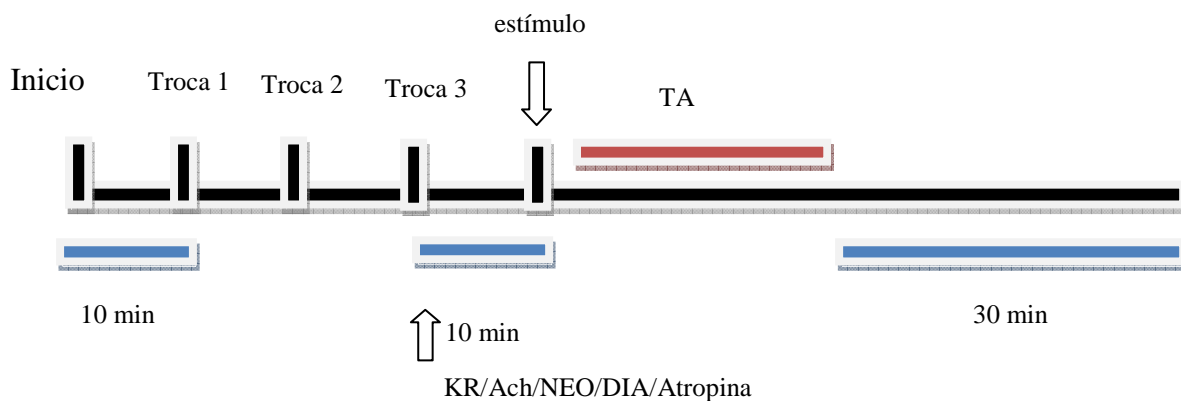


FIGURA 14 - Protocolo experimental de TA.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação das médias entre os grupos foi utilizado o Teste t de Student. O teste *One-way ANOVA* e *Two-way ANOVA* foram usados para a comparação entre médias de valores distintos de um grupo com as médias de valores de um segundo grupo. O nível de significância é de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DA PhKv EM ARRITMIAS DE REPERFUSÃO EM CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS

A incidência das arritmias de reperfusão ocorreu em 100% dos corações isolados de ratos após a desocclusão da ACE, entretanto essas arritmias taquicardia e/ou fibrilação ventricular, apresentaram variações quanto a sua duração.

A figura 15 demonstra experimentos padrões do protocolo de arritmias de reperfusão no grupo controle e no grupo submetido a injeção de PhKv (concentração final – 240nM). Observou-se uma queda da tensão sistólica após a isquemia. No grupo controle, após reperfusão, ilustrou-se com um experimento padrão de arritmias irreversíveis. No grupo submetido a infusão de PhKv (240 nM), um minuto antes da reperfusão, ilustrou-se com um experimento padrão com retorno ao ritmo sinusal.

A figura 16 mostra a duração das arritmias de reperfusão após isquemia miocárdica em corações isolados de ratos no grupo controle (n = 13) e no grupo submetido a infusão da PhKv um minuto antes da reperfusão. Como pode ser visto, o grupo controle apresentava um tempo maior de arritmias. Os valores do tempo de arritmias dos grupos controle e após injeção de PhKv foram de $16,2 \pm 1,3$ min e $4,8 \pm 0,8$ min, respectivamente.

A figura 17 mostra o ISA de corações isolados de ratos no grupo controle e no grupo submetido a infusão da PhKv um minuto antes da reperfusão. Como pode ser visto, o grupo controle apresentava um maior Índice de Severidade das Arritmias (ISA), em relação ao PhKv. Os valores do ISA dos grupos controle e após injeção de PhKv foram de $8,0 \pm 1,1$ e

3,0±1,1, respectivamente. Houve diferença estatística entre os grupos reperfundidos após infusão de PhKv em relação ao grupo controle.

A queda do fluxo coronariano durante a oclusão da ACE foi de aproximadamente 50%. Desse modo, a redução do fluxo coronariano durante a manobra de oclusão da ACE prestou-se como um indicador do sucesso da técnica.

A figura 18 demonstra que houve prolongamento dos intervalos QT no grupo submetidos à injeção de PhKv em relação ao grupo controle. Os valores desse intervalo nos grupos PhKv e controle foram $63,08 \pm 1,86$ ms e $55,80 \pm 1,53$ ms respectivamente.

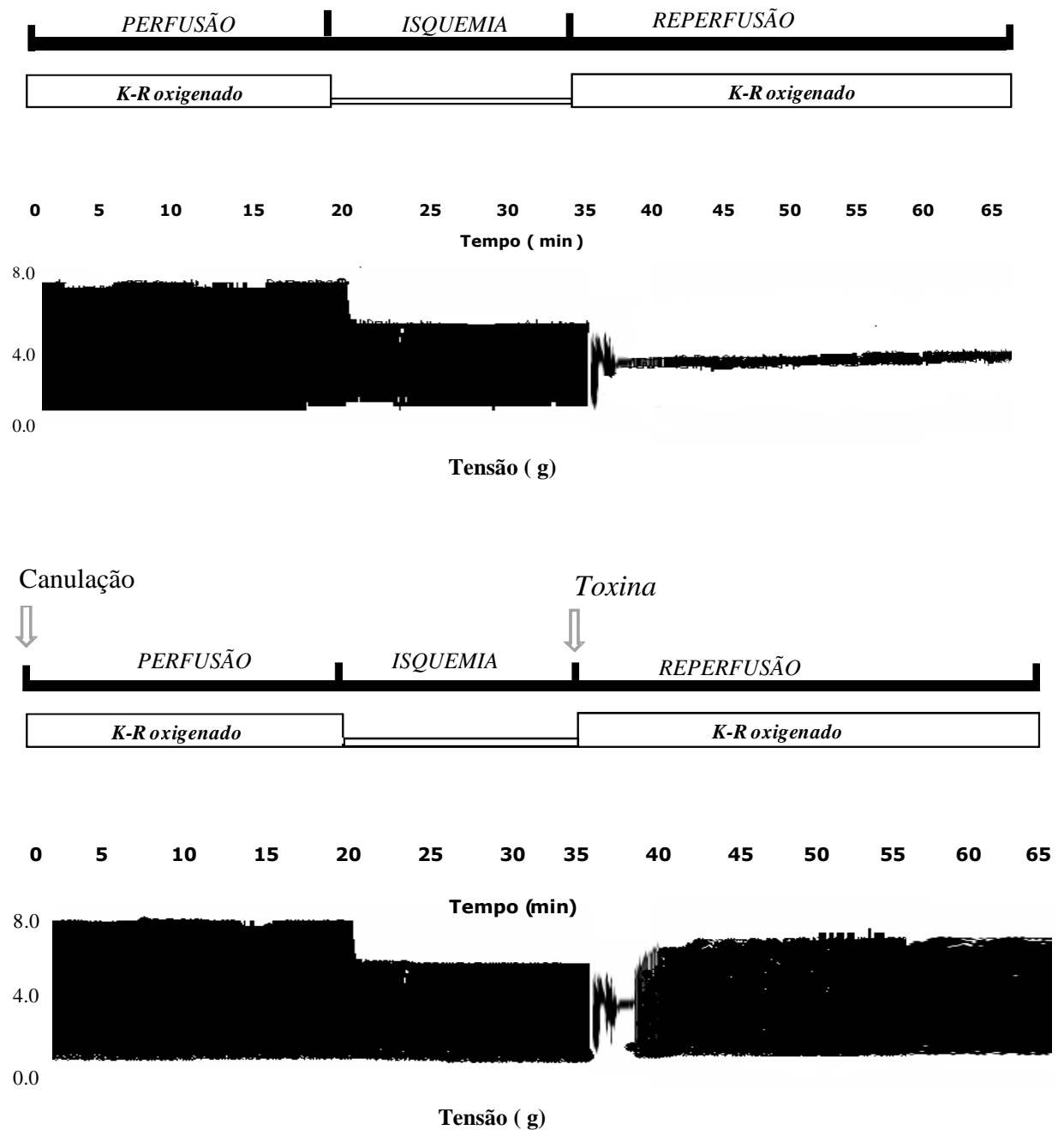


FIGURA 15 - Arritmias de reperfusão no grupo controle e no grupo submetido a injeção de PhKv (concentração final – 240nM) um minuto antes da reperfusão.

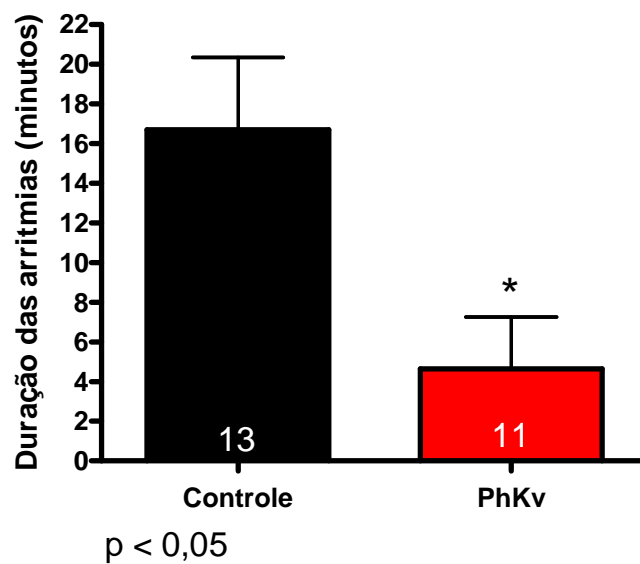


FIGURA 16 – Duração das arritmias após a oclusão da ACE em corações isolados de ratos perfundidos com solução K-R no grupo controle (n=13) e grupo reperfundido após injeção de PhKv (240nM), n = 11. Os dados estão expressos como médias \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (*Teste T de Student*).

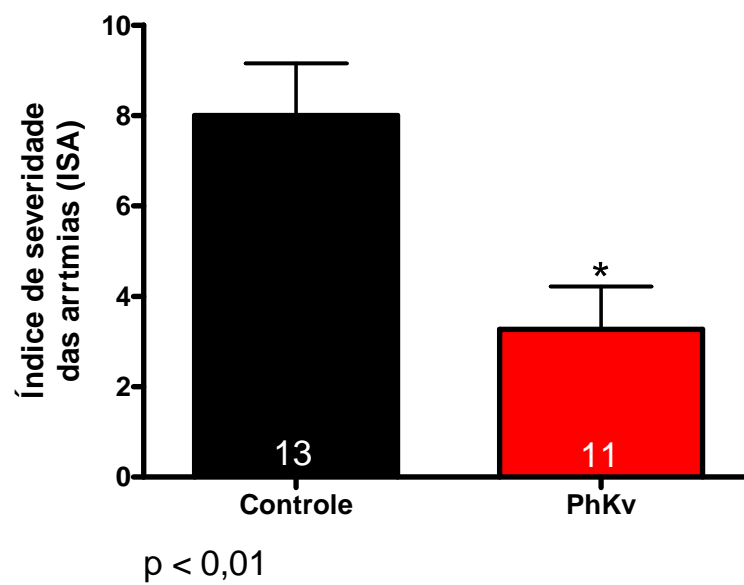


FIGURA 17 – ISA de corações isolados de ratos perfundidos com solução K-R pertencentes ao grupo controle (n=13) e grupo reperfundido após injeção de PhKv (240nM), n = 11. Os dados estão expressos como médias \pm EPM. * p< 0,01 em relação ao grupo controle (*Teste T de Student*).

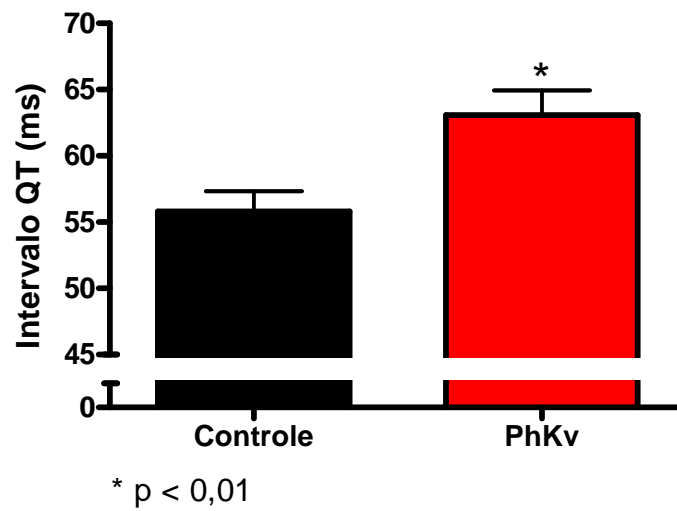


FIGURA 18 – Intervalos QT do eletrocardiograma dos corações isolados de ratos controle e infundidos com 240 nM de PhKv (n=5). Os dados estão expressos como médias \pm EPM. * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (*Teste T de Student*).

4.2 EFEITO DA PhK_v EM MODELO DE FIBRILAÇÃO ATRIAL EM ATRIOS ISOLADOS DE RATOS

A figura 19 demonstra experimentos padrões do protocolo de indução de TA em grupos controle e submetidos incubação com Ach e PhK_v. Em A observa-se um experimento padrão de TA. Já em B observa-se um prolongamento do tempo de TA após incubação com Ach em C.

A incubação com Ach (10^{-7} mM) por 10 minutos, após o período de estabilização foi capaz de aumentar a tensão sistólica (TS), ($0,80 \pm 0,10$ g), com diferença estatística em relação ao grupo controle ($0,7 \pm 0,03$ g), sem alterar a tensão diastólica (TD) ($0,50 \pm 0,01$ g) em relação ao mesmo ($0,45 \pm 0,01$ g), (figura 20).

Já neostigmina gera efeito semelhante (figura 21), ($0,83 \pm 0,12$ g) em relação ao grupo controle ($0,7 \pm 0,03$ g). Contudo, mostrava-se sustentada no período pós-TA ($1,1 \pm 0,01$ g) e ($0,9 \pm 0,02$ g) no controle, analisados no primeiro minuto.

A figura 22 demonstra que tanto a acetilcolina (300 ± 10 bpm) como a neostigmina (150 ± 20 bpm) gerava a bradicardia sustentada, porém no grupo incubado com Ach, apresentava-se com maior intensidade no primeiro minuto em relação ao grupo controle (360 ± 10 bpm).

Quando adicionamos atropina ao banho contendo solução nutritiva não observava-se indução de TA e quando adicionava-se Ach ou NEO, notava-se um prolongamento no tempo de TA, (350 ± 51 s) e (350 ± 50 s) respectivamente, em relação ao controle ($250,0 \pm 90,0$ s). Percebe-se que o tempo de duração das TA mostrava-se aumentado quando se incubava com

Ach e NEO (555 ± 50 s). O mesmo efeito era evidenciado quando a indução da TA acontecia após 30 segundos de incubação com acetilcolina (550 ± 50 s) (figura 23).

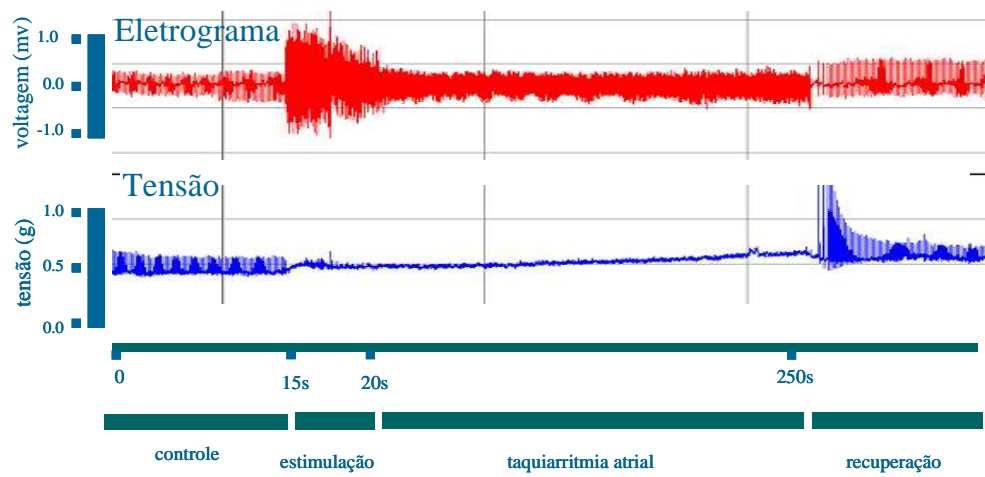
Quando incubávamos com a PhKv (60 nM), observamos que existia um aumento na TS ($0,79 \pm 0,02$ g) e ($0,82 \pm 0,03$ g) em relação ao grupo controle ($0,7 \pm 0,03$ g), que permanece significativamente diferente no período pós-TA ($1,0 \pm 0,01$ g) em relação ao mesmo ($0,9 \pm 0,02$ g), sem diferenças na TD (figura 24). Em relação à frequência cardíaca, observamos, uma diminuição após o período de incubação. A diminuição da frequência cardíaca foi dose-dependente (dados não mostrados). No entanto, no período pós-TA, observa-se um aumento em relação ao grupo controle (200 ± 22 bpm versus 100 ± 20 bpm) (figura 25).

Quando utilizamos, o diazóxido, um abridor de canais de potássio, que atua no na corrente $I_{K_{ATP}}$, não se observava alteração do tempo de TA ($280,0 \pm 70,0$ s), portanto, sem diferenças estatísticas em relação ao grupo controle. Por outro lado, um inibidor de canais de potássio, que atua na corrente I_{to} a 4-aminoperidina, diminuía significativamente o tempo de TA ($30,0 \pm 20,0$ s) em relação ao grupo controle ($250,0 \pm 90,0$ s) (figura 26).

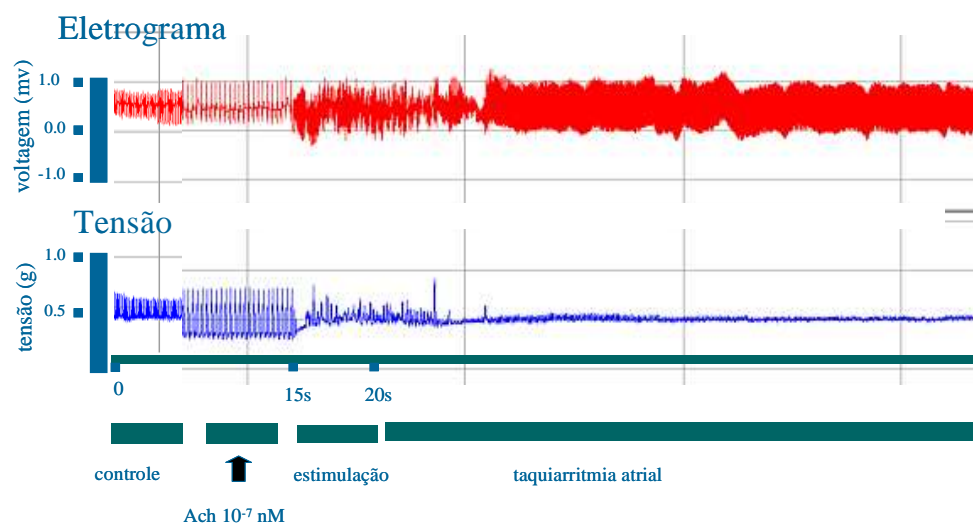
A neurotoxina da PN, PhKv, foi capaz de diminuir o tempo de TA ($6,2 \pm 1,4$ s), estatisticamente significativo, em relação ao grupo controle ($250,0 \pm 90,0$ s) (figura 27)

A figura 28 demonstra que houve prolongamento do intervalo PPI quando os átrios eram perfundidos em banho contendo PhKv 60 nM em relação ao grupo controle, com 30 s ($0,180 \pm 0,105$ ms), 1 min, pós-TA ($0,210 \pm 0,108$ ms), ($0,222 \pm 0,106$ ms) e ($0,180 \pm 0,105$ ms), respectivamente.

A



B



C

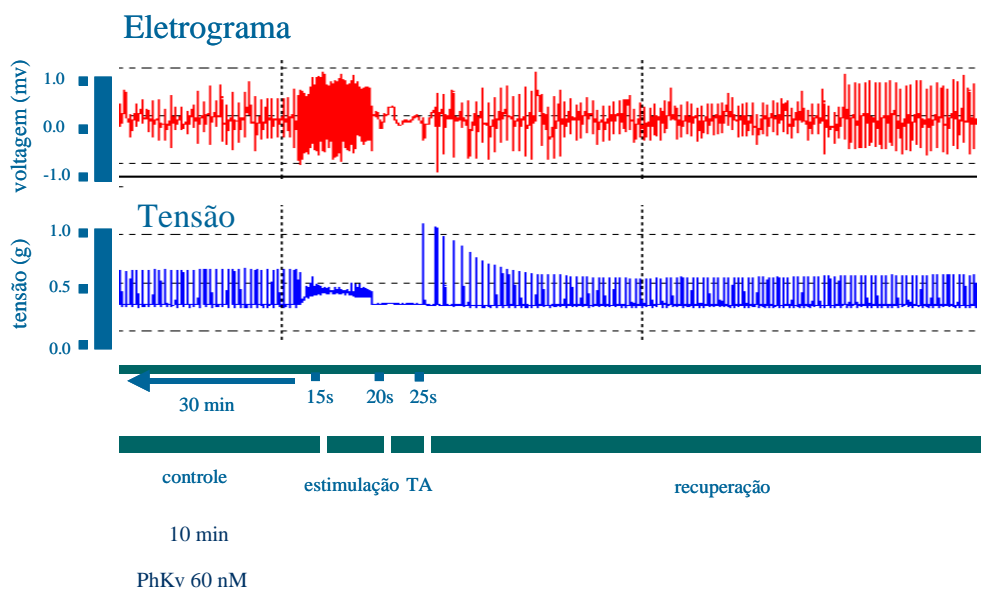


FIGURA 19 - Indução da TA em átrio direito isolado após estimulação elétrica. Traçado do eletrograma e da tensão sistólica/diastólica. A TA aparece após a aplicação do estímulo. O protocolo está apresentado no grupo controle (A), incubação por 10 min com Ach 10^{-7} mM (B) e incubação por 10 min com PhKv 60 nM (C).

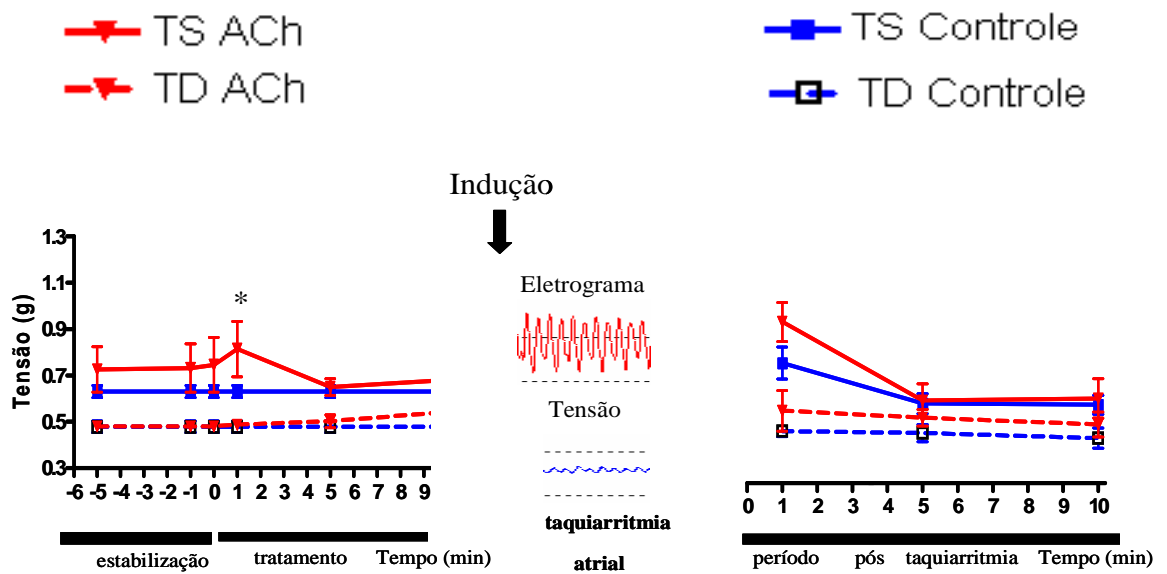


FIGURA 20 – Efeito da acetilcolina (10^{-7} mM) na tensão sistólica (g) e tensão diastólica (g) em átrios isolados durante tratamento e pós-taquiarritmia atrial. Os dados estão expressos como média \pm EPM. $P < 0.05$ quando comparado com o controle. (*Two-away ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*).

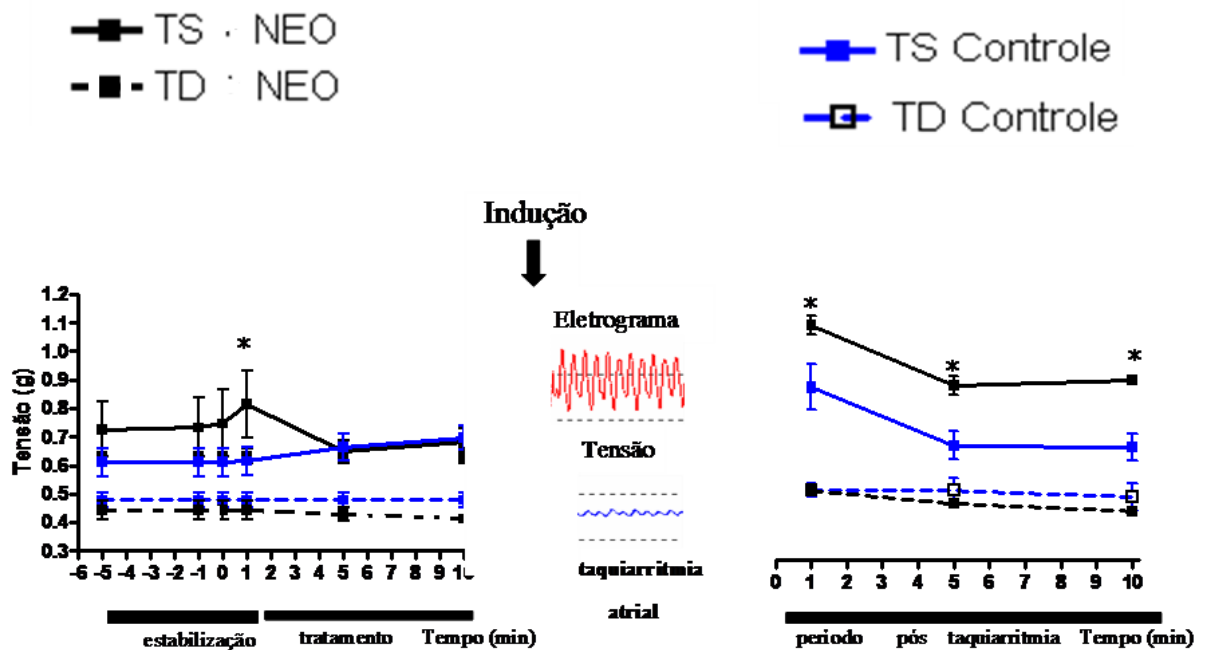


FIGURA 21 – Efeito da neostigmina (10^{-7} mM) na tensão sistólica (g) e tensão diastólica (g) em átrios isolados durante tratamento e . pós-taquiarritmia atrial. Os dados estão expressos como média \pm EPM. $P < 0.05$ quando comparado com o controle. (*Two-away ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*).

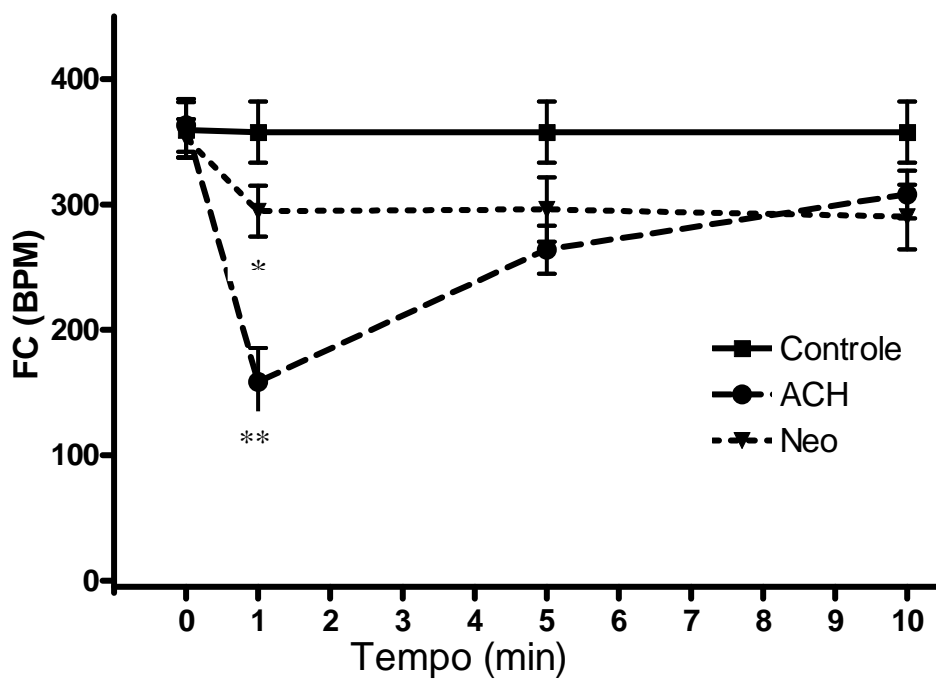


FIGURA 22 – Efeito da neostigmina (10^{-7} mM) e da acetilcolina (10^{-7} mM), presentes na solução nutritora, na frequência cardíaca durante tratamento. Os dados estão expressos como média \pm EPM. * $P < 0.05$ e ** $P < 0,001$ quando comparado com o controle. (*Two-away ANOVA* seguido do pós-teste de *Bonferroni*).

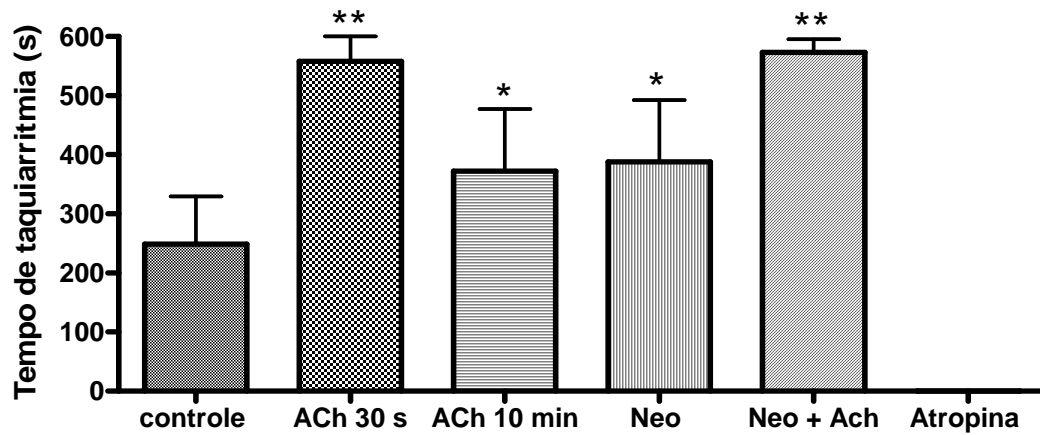


FIGURA 23 – Duração das TA em átrios direitos isolados de ratos controle (n=5), grupos incubados com Ach (n = 5) com indução após 30 s de incubação e 10 min de incubação, NEO (n=5), NEO + Ach (n=5) e atropina (n = 5). Os dados estão expressos como médias \pm EPM. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao controle (Teste *T Student*).

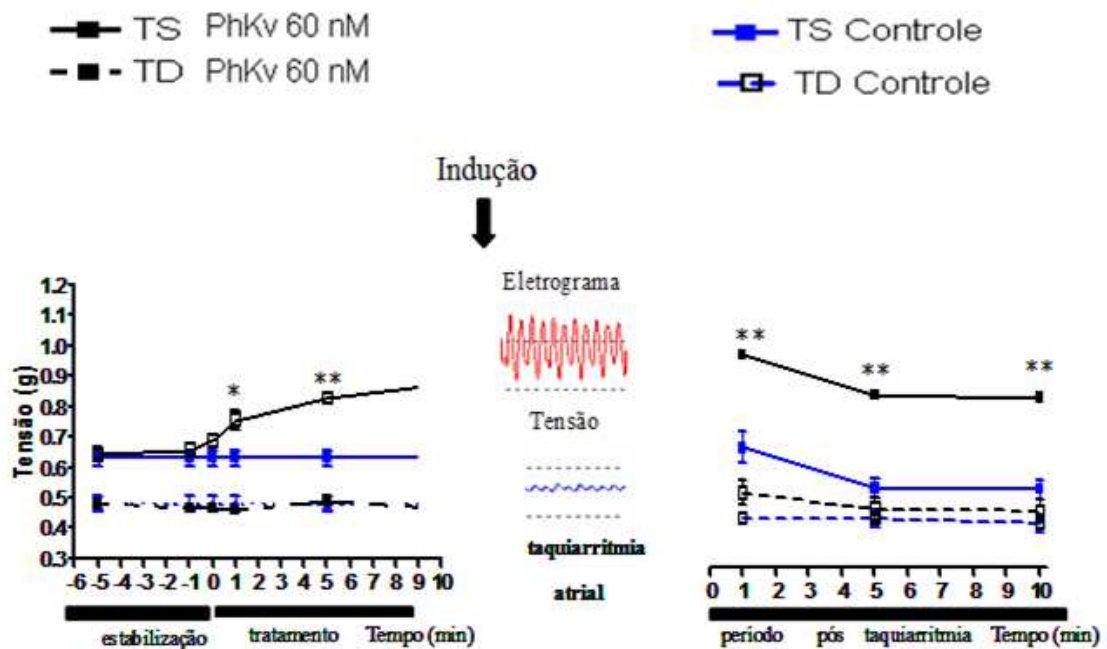


FIGURA 24 - Efeito da PhKv (60nM) ($n = 5$) na tensão sistólica (g) e tensão diastólica (g) em átrios isolados durante tratamento e pós-taquiarritmia atrial em relação ao grupo controle ($n = 5$). Os dados estão expressos como média \pm EPM. $P < 0.05$ quando comparado com o controle. (*Two-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*).

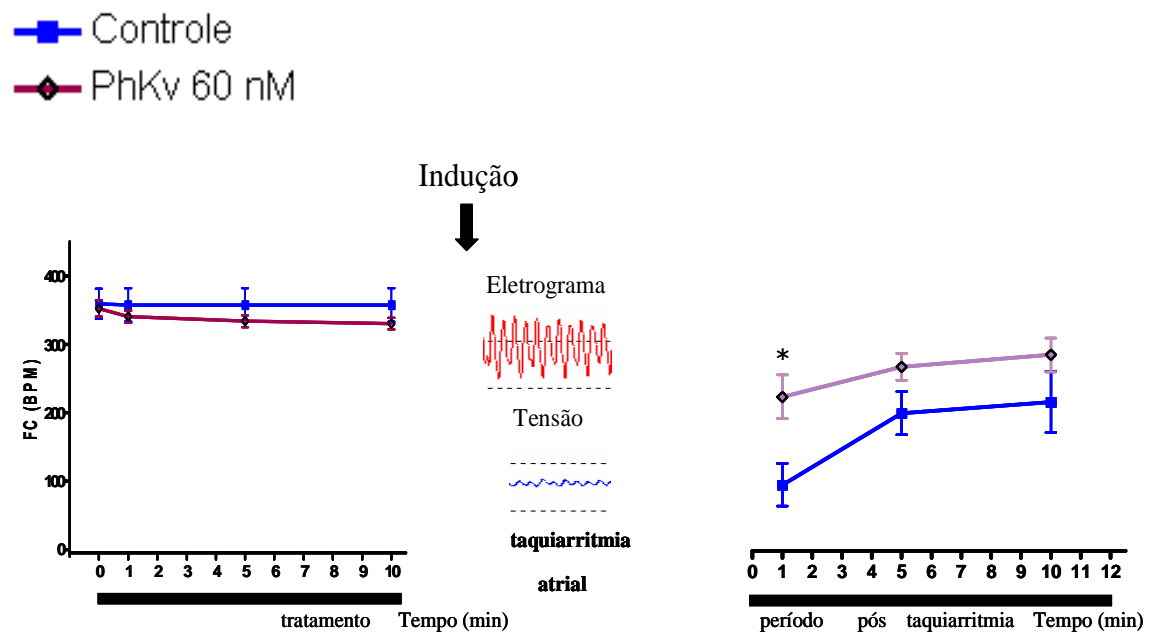


FIGURA 25 – Efeito da PhKv (60nM) na frequência cardíaca (bpm) em átrios isolados durante tratamento e pós-taquiarritmia atrial. Os dados estão expressos como média \pm EPM. $P < 0.05$ quando comparado com o controle. (*Two-away ANOVA* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*).

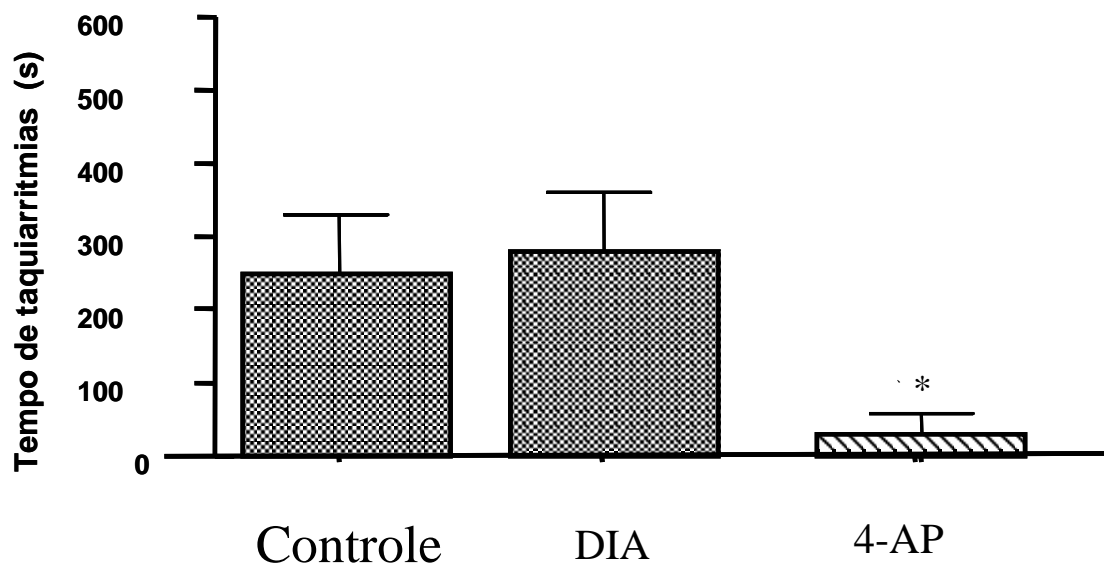


FIGURA 26 – Duração das TA em átrios direitos isolados de ratos controle (n=5), grupos incubados com DIA (100 μ M) (n = 5) e 4-AP (1 μ M) (n = 5). Os dados estão expressos como médias \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao controle (Teste *T de Student*).

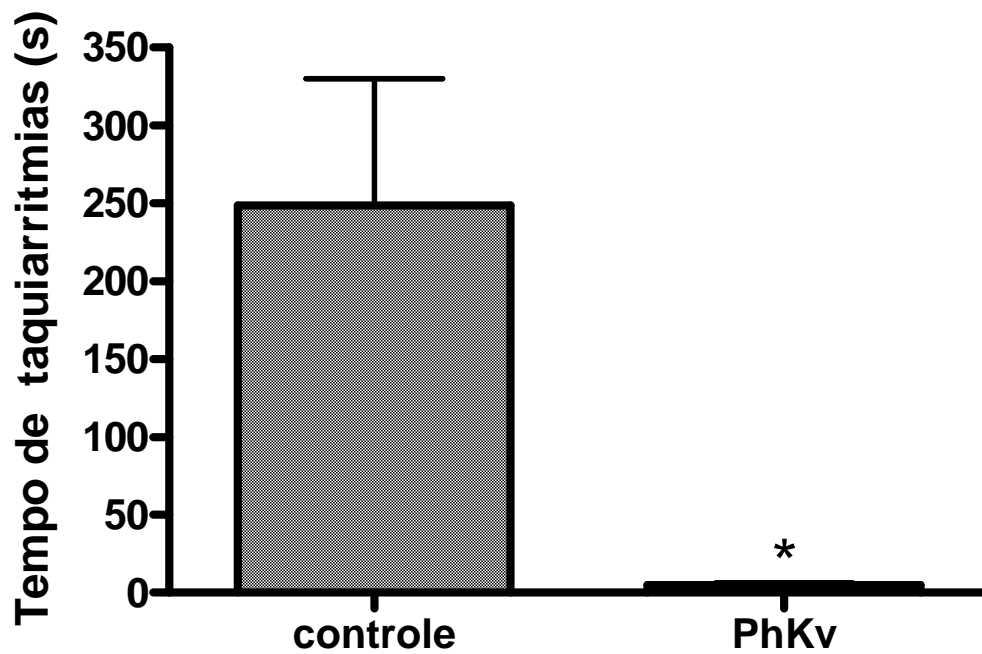


FIGURA 27 – Duração das TA em átrios direitos isolados de ratos controle (n=5) e grupo incubado com PhKv (60 nM) n = 5). Os dados estão expressos como médias ± EPM. * $p < 0,001$ em relação ao controle (Teste *T de Student*).

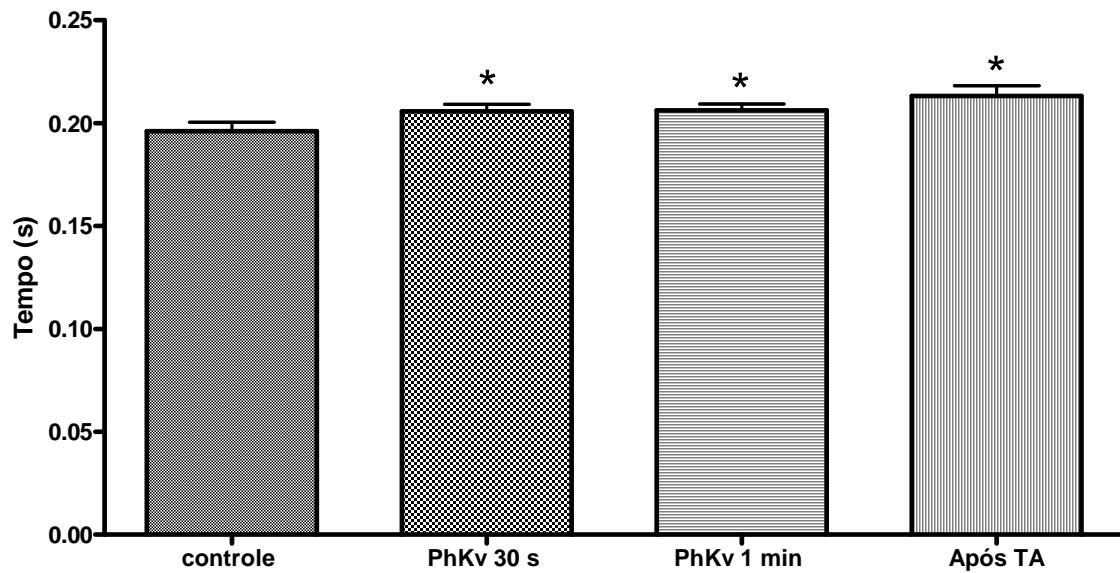


FIGURA 28 – Intervalos PPI em átrios direitos isolados de ratos controle (n = 5) e grupo incubado com PhKv (60 nM), n = 5, após 30 s, 1 min de incubação com PhKv e após TA. Os dados estão expressos \pm EPM, * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle. (Teste *T de Student*).



5. DISCUSSÃO

O veneno bruto da aranha *Phoneutria nigriventer* é composto de um grande número de peptídeos neurotóxicos capazes de atuar em canais iônicos (GOMEZ et al., 2002) e entre eles, destacam-se alguns canais presentes no tecido miocárdico.

È certo que a população mundial está envelhecendo e, somando-se isso, nota-se um aumento da sobrevivência dos pacientes vítimas de doenças cardiovasculares, porém, percebe-se um aumento do número de casos de taquiarritmias atriais. Por outro lado, associado às mudanças de estilo de vida da sociedade, mesmo com o aumento da sobrevivência, percebe-se um aumento da morte súbita de origem cardiovascular, que se associa à doença coronariana isquêmica e, conseqüentemente, às arritmias de reperfusão.

Contudo, apesar do avanço de pesquisas em busca de novos agentes antiarrítmicos, o tratamento, bem como a prevenção das taquiarritmias, ainda, permanecem como um grande desafio à prática clínica, pois a maioria dos fármacos possuem certa ineficácia, bem como um poder arritmogênico (NATTEL, 1995).

Assim, diante desse problema, no presente estudo testamos a ação da fração purificada PhKv da PN em modelos experimentais de taquiarritmias atriais induzidas por acetilcolina (modelo ligeiramente modificado de ZAFALON Jr et al., 2004) e em modelo de arritmia de reperfusão em corações isolados de rato (DORING, 1990, FERREIRA et al, 2001).

Em ambos os modelos, observamos que a fração PhKv bloqueia a geração de TA ou de reperfusão, além de possuir a capacidade de revertê-las espontaneamente ao ritmo sinusal com diminuição do tempo de arritmias (figuras 16,17,19 e 27).

A média da queda do fluxo coronariano durante a manobra de oclusão da ACE (isquemia) neste trabalho foi de aproximadamente de 50%, entretanto, houve uma variação para mais ou para menos. Apesar disso, não foi observada nenhuma correlação entre o valor da diminuição do fluxo e da incidência e duração das arritmias. Deve-se levar em conta que esses resultados foram obtidos utilizando um tempo de oclusão constante de 15 minutos para todos os corações, o que elimina o fator de duração do período isquêmico na variabilidade da severidade das arritmias. Entretanto, a duração e a severidade do período precedente de isquemia é apontado como um dos maiores determinantes da vulnerabilidade do miocárdio a arritmias de reperfusão. Em humanos relaciona-se o tempo de duração da isquemia ao tempo ocorrência de arritmias ventriculares (OPIE, 1984).

Qualquer tecido cardíaco da zona de isquemia-reperfusão é potencialmente vulnerável à lesão de reperfusão e sabe-se que um período isquêmico pode gerar arritmias cardíacas (MANNING, 1984). As arritmias de reperfusão, vistas com a restauração parcial ou total do fluxo coronariano, representam uma resposta do músculo cardíaco ao retorno dos nutrientes, e, principalmente do oxigênio, a um tecido previamente isquêmico. Durante a isquemia o suprimento de ATP diminui, a concentração de hidrogênio, de sódio e cálcio aumentam no citoplasma. Tudo isso cria um ambiente favorável ao desenvolvimento de fragilidade no sarcolema e lesão celular (GARCIA-DORADO & RUIZ MEANA, 2000). Com a reperfusão, o aporte de oxigênio é prontamente restaurado, no entanto a normalização das concentrações intracelulares de íons é mais lenta. Dessa forma cria-se um estado de hipercontratura secundária ao aumento de cálcio e oxigênio intracelulares, percebido pela lenta recuperação da tensão sistólica após o período de reperfusão. Já que informações acerca de resultados preliminares do laboratório de eletrofisiologia celular, da Professora Dra. Silvia Guatimosim, demonstram que, em modelo de cardiomiócito isolado, a mesma toxina é capaz de aumentar o transiente intracelular de cálcio, bem como a força de contração e que o veneno bruto é capaz

de abrir canais de cálcio do tipo L voltagem-dependentes (COSTA et al.,1996), podemos inferir que o aumento da força de contração no modelo de átrios isolados, justifica-se pelo acúmulo intracelular de íons cálcio. Por outro lado, uma possível inibição de corrente Ito, a ser discutido a seguir, seria capaz de prolongar o potencial de ação gerando efeito semelhante (BASSANI, et al, 2006)

Durante o período isquêmico, as alterações das propriedades da membrana do cardiomiócito, gerada pelo metabolismo anaeróbico, determinam um acúmulo extracelular de potássio que, inicialmente, gera uma diminuição na duração do potencial de ação. Essa diminuição na duração do potencial cria um ambiente favorável ao início e perpetuação de uma arritmia de reperfusão. (JANCE & WIT, 1989;HILL & GETTES, 1980). Da mesma forma, qualquer evento capaz de diminuir a duração do potencial de ação, também é capaz determinar uma TA.

Assim, na busca de um modelo de TA, padronizamos um protocolo experimental de estimulação elétrica (figura 14), levemente modificado e já utilizado anteriormente (EULER & SCANLON, 1987;WATANABLE et al., 1996).

Apesar da dificuldade para a geração de TA em preparações isoladas (WATNABLE et al., 1996), no modelo utilizado, obtivemos-se um método eficaz, com protocolo simples e de fácil reprodutibilidade, sem a necessidade de utilização de agentes arritmogênicos.

Agonistas endógenos ou exógenos de receptores muscarínicos possuem propriedades facilitadoras ou perpetuadoras de TA (EULER & SCANLON, 1987; ALESSIE et al., 1984; WATANABE et al., 1996; LOOMIS & KROP, 1955, GEDDES et al., 1996; HIROSE et al., 1997) e o provável mecanismo envolve o aparecimento de múltiplos circuitos de reentrada de origem no tecido atrial (ALESSIE et al., 1984) e à diminuição do período refratário absoluto (ZHANG, et al., 2002).

Estudos prévios demonstram que a inervação vagal predomina em densidade no átrio direito, comparativamente, em relação ao esquerdo (LÖFFELHOLZ & PAPPANO,1985). Assim, na preparação atrial esquerda, não foi possível induzir eventos arrítmicos.

Já que a indução depende da inervação vagal, sugere-se uma participação da acetilcolina, confirmada pela ausência de TA nos átrios direitos incubados com atropina e pelo prolongamento do tempo de TA na presença de neostigmina (inibidor da colinesterase) (figura 23).

Como a Ach atua na abertura de canais de potássio (WATANABE et al., 1996; SAKMANN et al., 1993) e que a mesma é liberada sob estimulação elétrica em alta frequência, sugere-se encurtamento do período refratário absoluto do cardiomiócito atrial.

Já que um período refratário encurtado reduz o comprimento de onda dos impulsos cardíacos e que o mesmo associa-se a uma re-excitação celular prematura, relacionada à heterogeneidade de refratariedade na massa tecidual, cria-se o substrato para o evento arritmogênico (HOFFMAN & ROSEN, 1981). Por conseguinte, no modelo em estudo, uma liberação de Ach sob estímulo de alta frequência (HIROSE et al.,1997) relacionada à estimulação variável de receptores muscarínicos, em diferentes partes do tecido, gera de circuitos de reentrada atrial. A partir do momento que a incubação isolada com ACh gera bradicardia sem gerar TA, demonstra-se que o modelo é dependente de estimulação elétrica, capaz de estimular a liberação de Ach (LITOVSKY & ANTZELEVITCH, 1990).

Quando utilizamos um abridor de canal de potássio, o diazóxido (NOMA,1983), nota-se que não existe alteração no tempo TA (figura 26).

Na figura 22 demonstramos a diferença de ação da presença de Ach e NEO no banho, onde a primeira perde ação no decorrer do tempo, sugere-se a participação da acetilcolinesterase atrial que fica corroborado com o dado que o tempo de taquiarritmia mostra-se prolongado na presença de uma indução de TA, após um breve período de

incubação com Ach (30s). Além do mais, evidenciamos que o acrescimento de NEO ao banho, acentua o período de TA (Figura 23).

Outro possível mecanismo arritmogênico gerado pela presença de Ach foi descrito anteriormente por Wang et al.(1997), que demonstraram que pós-despolarizações tardias causadas por ativação de uma quinase dependente de adenosina monofosfato cíclico (AMP_c), que é mediado pelo influxo celular de Ca^{++} (MARBAN et al., 1986; BASSANI, et al., 1997), também ocorre sob a estimulação vagal.

Dessa forma, fica evidente o papel da Ach e do modelo de átrios direitos isolados para o estudo de TA (HOFFMAN & ROSEN, 1981).

Uma vez que informações acerca de resultados preliminares do laboratório de eletrofisiologia celular, da Professora Dra. Silvia Guatimosim, demonstram que, em modelo de cardiomiócito isolado, a mesma toxina é capaz de aumentar o transiente intracelular de cálcio, bem como a força de contração e que o veneno bruto é capaz de abrir canais de cálcio do tipo L voltagem-dependentes (COSTA et al.,1996), podemos inferir que o aumento da força de contração no modelo de átrios isolados, justifica-se pelo acúmulo intracelular de íons cálcio, bem como ao efeito Bowditch (efeito escada) que correlaciona-se com a diminuição da frequência cardíaca (figura 25).

Já que nos dois modelos em estudo sugerem um encurtamento do período refratário e que o mesmo é um dos fatores determinantes das arritmias, qualquer agente capaz de prolongar o mesmo período e concomitantemente, o potencial de ação, poderão possuir propriedades antiarritmogênicas.

Na atualidade, entre esses agentes, destacam-se os bloqueadores de canais de sódio, cálcio, antagonistas beta-adrenérgicos e os bloqueadores de canais de potássio. Em relação a estes últimos, recentemente, surgiram pesquisas com promissoras drogas capazes de exercer

um efeito anti-arritmogênico e com poucas propriedades pró-arritmicas ao atuar no transiente de saída de potássio (*I_{to}*) (CARLSSON et al., 2006).

Várias correntes estão envolvidas no mecanismo de repolarização miocárdica e entre elas encontra-se a corrente *I_{to}* (NERBONNE & KASS, 2005).

I_{to} é uma importante corrente repolarizante no coração que aparece na fase (1) precoce de repolarização (OUDIT et al, 2001).

Anormalidades nessa corrente são detectadas em uma variedade de cardiopatias como insuficiência ventricular (NABAUER & KAAB, 1993) e fibrilação atrial crônica (VAN WAGONER et al., 1997). Também, diferenças regionais na expressão de *I_{to}* mostram-se importantes na geração da onda T e explica a resposta eletrofisiológica à isquemia miocárdica em reações pró-arritmicas de drogas antiarritmogênicas, bem como a resposta eletrocardiográfica fisiológica à hipotermia (NERBONNE & GUO, 2002)

A corrente *I_A* expressa por células GH3 é gerada pelos canais Kv1.4/Kv1.5 (LEVITAN et al., 1995) surge como um possível alvo para a PnTx3-1 (PhKv), uma nova classe de inibidores de canais de K⁺, com provável poder antiarritmogênico.

Correntes de potássio no tecido cardíaco são de grande variabilidade dependendo da espécie ou região do coração (NERBONNE et al., 2005). Uma delas é denominada *I_{to}* ou transiente de saída de potássio que surge na fase 2 de repolarização precoce do tecido cardíaco (SANGUINETTI & JURKIEWICZ 1991). Várias espécies de mamíferos possuem *I_{to}*, entre eles o homem e o rato. *I_{to}* tem sido dividida em dois distintos transientes de saída de potássio, *I_{to,f}* e *I_{to,s}* que se distribuem por todo o tecido miocárdico. *I_{to,s}* aparece devido à abertura de canais Kv1.4 (PETERSEN & NERBONNE, 1999). Já a *I_{to,f}* tem sido caracterizada pela abertura de canais da família Kv4.x (DIXON et Al, 1996) e que os mesmos estão presentes em tecidos cardíacos humanos e de cães.

Qualquer droga, capaz de gerar um bloqueio de $I_{to,f}$, será capaz de prolongar o período refratário e, por conseguinte, o potencial de ação que se associa a um poder antiarritmogênico (BACANER et al., 1986). No modelo de átrios direitos isolados, o 4-AP, um inibidor da *Ito* (KENYON, et al., 1979; BAIARDI, et al., 2002), mostrou-se efetivo como agente antiarrítmogênico (figura 23).

Já que PhTx 3-1 (PhKv) bloqueou previamente correntes de K^+ , via bloqueio de canais Kv1.4, com características semelhantes aos canais Kv4.2 e Kv4.3 (Carneiro et al., 2003), presentes no cardiomiócito, sugere-se que a neurotoxina Phkv, provavelmente, apresenta a propriedade de bloquear as mesmas correntes iônicas.

Em vista dos dados apresentados, infere-se que, tanto no modelo de arritmias de reperfusão, como no modelo de TA em átrios isolados, um possível bloqueio da corrente *Ito*, pela PhKv, estaria relacionado a prolongamento do potencial de ação por meio do prolongamento do intervalo QT em corações isolados de ratos e PP_i em átrios direitos isolados de ratos (figuras 18 e 28). Possivelmente, também poderá atuar no bloqueio de canais de potássio Ach dependentes, ativos no mecanismo de reentrada, a partir do momento que observamos uma frequência cardíaca maior no período pós-TA em átrios incubados com PhKv (figura 25).

Por tudo isso, de acordo com nossos dados, a neurotoxina PhKv da *Phoneutria nigriventer* apresenta um provável efeito antiarritmogênico por meio de bloqueio de canais iônicos de potássio. Novos experimentos eletrofisiológicos e de biologia molecular deverão ser realizados para comprovar completamente esses mecanismos referidos no nosso trabalho; porém, a PhKv da *P. nigriventer* estará incluídas no arsenal terapêutico das arritmias em um futuro não muito distante.

6 - CONCLUSÃO



6. CONCLUSÃO

A fração purificada PhKv da *Phoneutria nigriventer* possui efeito antiarritmogênico tanto em arritmias de reperfusão em corações isolados de ratos , bem como em taquiarritmias de atrios direitos isolados de ratos.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLESSIE, M. A. ; LAMMERS, W. J. E. P. ; BONKE, I. M. ; HOLLEN, J. Intra-atrial reentry as a mechanism for atrial flutter induced by acetylcholine and rapid pacing in the dog. *Circulation*, 70: 123–135, 1984.
- ALLESSIE, M. A.; BONKE, F. I.; SHOPMAN, F. J. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. III. The leading circle concept: a new model of circus movement in cardiac tissue without the involvement of an anatomical obstacle. *Circulation Research*, 41: 9-18, 2004.
- ANTUNES, E. ; MARANGONI, R. A. ; BORGES, N. C. C. ; HYSLOP, S. ; FONTANA, M. D. ; DE NUCCI, G. Effect of *Phoneutria nigriventer* venom on rabbit vascular smooth muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26: 81, 1993.
- ARAÚJO, D. A. M. ; CORDEIRO, M. N. ; DINIZ, C. R. ; BEIRÃO, P. S. L. Effects of a toxic fraction, PhTx2, from spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacologie*, 347: 205-208, 1993.
- BACANER, M. B. ; CALY, J. R. ; SHRIER, A. ; BROCHU, R. M. Potassium channel blockade: A mechanism for suppressing ventricular fibrillation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 2223-2227, 1986.
- BAIARDI, G. ; CARRIÓN, A. ; PETRICH, E. R. ; ZUMINO, A. P. 4-aminopyridine: effects on electrical activity during ischemia and reperfusion in perfused rat hearts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 233: 85-90, 2002.
- BARRY, D. M. ; XU, H. ; SCHUESSLER, R. B. ; NERBONNE, J. M. Functional knockout of the transient outward current, long QT syndrome, and cardiac remodeling

- in mice expressing a dominant-negative Kv 4 α subunit. *Circulation Research*, 83:560–567,1998.
- BASSANI, R. A.; BASSANI, J. W. M.; LIPSIUS, S. L.; BERS, D. M.; DIASTOLIC, S. R. Ca efflux in atrial pacemaker cells and Ca-overloaded myocytes. *American Journal of Physiology*, 273: 886-892, 1997.
 - BASSANI, R. A. Transient potassium current and Ca⁺ homeostasis in the heart : beyond the action potencial. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39: 393-403, 2006.
 - BERNAUER, W. & ERNENPUTSCH, I. Antagonistic effects of α -adrenoceptor blocking agents on arrhythmias, enzyme released and myocardial necrosis in isolated rat hearts with coronary occlusion and reperfusion. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 338: 88–95, 1988.
 - BENTO, A. C. NOVELLO, J. C. ; MATRANGONI, S. , ANTUNES, E. ; GIGLIO, J. R. , OLIVEIRA, B. ; DE NUCCI, G. Identification of a new vascular smooth muscle contracting polypeptide in *nigriventer* spider venom. *Biological Pharmacology*,46: 1902-1095,1993.
 - BLAAUW, Y. ; GOGELIN, H.; TIELEMAN, R. G. “Early” class III drugs for the treatment of atrial fibrillation: Efficacy and atrial selectivity of AVE0118 in remodeled atria of the goat. *Circulation*, 110: 1717-1724, 2004.
 - BRAUNWALD, E. & KLONER, R.A. Myocardial reperfusion: A double-edge sword? *Journal of Clinical Investigation*, 76: 1713-1719, 1985.
 - BRAZIL, V.; VELLARD, J. Contribuição ao estudo de venenos de aranhas. *In: Memórias do Instituto Butantan*, 2:1, 1925.
 - BUCARETCHI, F.; REINALDO, C. R. D.; HYSLOP, S. ; MADUREIRA, P. R. ; CAPITANI, E. M; VIEIRA, R. J. A clinico- epidemiological study of bites by spiders

- of the genus *Phoneutria*. *Revista do Instituto de Medicina. Tropical de São Paulo*, 42:17-21, 2000.
- CARLSSON, L.; CHARTIER, D.; NATTEL, S. Characterization of the in vivo and in vitro electrophysiological effects of the novel antiarrhythmic agent AZD7009 in atrial and ventricular tissue of the dog. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 47: 123-132, 2006.
 - CARNEIRO, A. M. D.; KUSHMERICK, C.; KOENEN, J.; ARNDT, M. H. L.; CORDEIRO, M. N.; CHAVEZ-ORLORTEGUI, C.; DINIZ, C. R.; GOMEZ, M. V.; KALAPOTHAKIS, E.; PRADO, M. A. M.; PRADO, V. F. Expression of a functional recombinant *Phoneutria nigriventer* toxin active on K⁺ channels. *Toxicon*, 41, p: 305-313, 2003.
 - CARTIER, R.; PEARSON P.J.; LIN P.J.; SCHAFF; H.V. Time course and extent of recovery of endothelium-dependent contractions and relaxations after direct arterial injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 102: 371-377, 1991.
 - CASE, R. B. The ischemic myocardium: Metabolic, electrolyte and structural abnormalities. In: Carvalho VB, Macruz R, eds - *Cardiopatía Isquêmica: Aspectos de Importância Clínica*. São Paulo. p.63-72, 1989.
 - CASSOLA, A. C. ; JAFFE, H.; FALLES, H. M.; AFECHE, S. C. ; MAGNOLI, F.; CIPOLA-NETO, J. Omega-phonetoxin-IIA: a calcium channel blocker from spider *Phoneutria nigriventer*. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 436: 545-552, 1998.
 - CHEN, P. S.; CHOU, C. C.; TAN, A. Y.; ZHOU. S.; FISHBEIN, M. C.; HWANG, C.; KARAGUEUZIAN, H. S.; LIN, S. F. The mechanisms of atrial fibrillation. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 17: 2-7, 2006.

- COSTA, S. K. P.; HYSLOP, S.; NATHAN, L. P.; ZANESCO, A.; BRAIN, S. D.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Activation by *Phoneutria nigriventer* venom of autonomic nerve fibers in isolated rat heart. *European Journal of Pharmacology*, 363: 139-146, 1998.
- COSTA, S. K. P.; MORENO J. R., H., BRAIN, S. D., DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. The effect of *Phoneutria nigriventer* (armer spider) venom on arterial blood pressure of anaesthetized rats. *European Journal of Pharmacology*, 298: 113-120, 1996.
- DALY, M.J.; ELZ, J.S.; NAYLER, W.G. Sarcolemmal enzymes and Na⁺-Ca²⁺ exchange in hyposic, ischemic, and reperfused rat hearts. *The American Journal of Physiology*, 247: 237-243, 1984.
- DIXON, J. E.; SHI, W.; WANG, H.S.; MCDONALD, C.; YU, H.; WYMORE, R.S.; COHEN, I.S.; MCKINNON, D. Role of the Kv4.3 K channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circulation Research*, 79: 659–668, 1996.
- DÖRING, H. J. The isolated perfused heart according to Langendorff technique – application. *Physiologie Bohemoslovaca*, 39: 482-496, 1990.
- ESTADO, V.; ANTUNES, E.; MACHADO, B; DE NUCCI, G.; TIBIRIÇÁ, E. Investigation of hemodynamic effects of *Phoneutria nigriventer* venom in anaesthetized rabbits. *Toxicon*, 38: 841-853, 2000.
- EULER, D. E.; SCANLON, P. J. Acetylcholine release by a stimulus train lowers atrial fibrillation threshold. *The American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 253: 863–868, 1987.
- EVORA, P. R. B.; PEARSON, P.J.; SCHAFF, H.V. “Impaired endothelium-dependent relaxation to sodium fluoride following coronary reperfusion injury:

- Evidence for G-protein dysfunction". *The Annals of Thoracic Surgery*, 57: 1550-1556,1994.
- FENELON, G.; WIJNS, W.; ANDRIES, E.; BRUGADA, P. Tachycardiomyopathy: mechanisms and clinical implications. *Pacing and Clinical Electrophysiology*, 19: 95-106, 1996.
 - GARCIA-DORADO, D. & RUIZ-MEANA, M. Propagation of cell death during myocardial reperfusion. *News Physiology. Science*, 15: 326-330, 2000.
 - GEDDES, L. A.; HINDS, M.; BABBS, C. F.; TACKER, W. A.; SCHOELEIN; W. E.; ELABBADY, T. Maintenance of atrial fibrillation in anesthetized and unanesthetized sheep using cholinergic drive. *P.A.C.E.* v.19, p.65–75, 1996.
 - GODOY; C. M. G, BASSANI; R. A; BASSANI, J. W. M. Role of acetylcholine in electrical stimulation-induced arrhythmia in rat isolated atria. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 34: 475-479, 1999.
 - GOMEZ, M. V.; KALAPOTHAKIS, E.; GUATIMOSIM, C.; PRADO, M. A. M. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. *Cellular Molecular Neurobiology*, 22: 579-588, 2002.
 - HACKEL, D. B. & JENNINGS, R. B. The heart. In: Rubin E, Farber DJ, ed Pathology. Philadelphia: Lippincot p.515-25. 1998.
 - HAISSAGUERRE, M.; JAIS; P.; SHAH, D. C.; TAKAHASHI, A.; HOCINI, M.; QUINIOU, G. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *The New England. Journal of Medicine*, 339: 659-666,1998.
 - HARDING, R.J . & DUNCAN, C. J. Protection against cellular damage in the perfused rat heart by lowered pH. *European Journal of Pharmacology*, 330: 47-53,1997.

- HASHIMOTO, K.; PEARSON, P. J.; SCHAFF, H. V.; CARTIER, R. Endothelial cell dysfunction after ischemic arrest and reperfusion: A possible mechanism of myocardial injury during reflow. *Journal Thoracic Cardiovascular Surgery*, 102:688-94, 1991.
- HILL, J. L. & GETTES, L. S. Effects of acute coronary artery occlusion on local myocardial extracellular K⁺ activity in swine. *Circulation*, 61: 768-778, 1980.
- HIROSE, M.; FURUKAWA, Y.; NAGASHIMA, Y.; YAMAZAKI, K.; HOYANO, Y.; CHIBA, S. Effects of PACAP-38 on the SA nodal pacemaker activity in autonomically decentralized hearts of anesthetized dogs. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 29: 216-221, 1997.
- HOFFMAN, B. F. & ROSEN, M. R. Cellular mechanisms for cardiac arrhythmias. *Circulation Research*, 49: 1-15, 1981.
- HOPPE, U. C.; MARBAN, E.; JOHNS, D. C. Molecular dissection of cardiac repolarization by in vivo Kv4.3 gene transfer. *The Journal of Clinical Investigation*, 105:1077-1084, 2001.
- ISBRANDT, D.; LEICHER, T.; WALDSCHÜTZ, R.; XINRAN, Z.; LUHMANN, U.; MICHEL, U.; SAUTER, K.; PONGS, O. Gene structures and expression profiles of three human KCND (Kv4) potassium channels mediating A-type currents I(TO) and I(SA). *Genomics*, 64 (2): 144-54, 2000.
- JANSE, M. J. & WIT, A. L. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischaemia and infarction. *Physiological Reviews*, 69: 1049-1169, 1989.
- JOHNS, T. N. T. & OLSON, B. J. Experimental myocardial infarction: A method of coronary occlusion in small animals. *Annals of Surgery*, 140: 675-682, 1954.

- KANNEL, W.B., WOLF, P.A., BENJAMIN, E.J., LEVY, D. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: Population-based estimates. *American Journal of Cardiology*, 82: 2-9.1998.
- KENYON, J. L. & GIBBONS, W. R. 4-Aminopyridine and the early outward current in sheep cardiac Purkinje fibers. *Journal of Genetic Physiology*, 73: 139–157, 1979.
- KHAIRY, P. & NATTEL, S. New insights into mechanisms and management of atrial fibrillation. *The Canadian medical Association Journal*, 167: 1012-1020, 2002.
- KLONER, R. A.; GANOTE, C. E.; JENNINGS, R. B. The “no-reflow” phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *Journal of Clinical Investigation*, 54: 1496-1508, 1974.
- KU D. D. Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. *Science*, 218: 576-578, 1982.
- KUSHMERICK, C.; KALAPOTHAKIS, E; BEIRÃO, P. S. L.; PENAFORTE, S. L.; PRADO, V. F.; CRUZ, J. S.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; GOMEZ, M. V.; ROMANO-SILVA, M. A.; PRADO, M. A. M. Phoneutria nigriventer toxin Tx3-1 blocks a-type k^+ currents controlling Ca^{++} oscillation frequency in Gh3 cells. *Journal of Neurochemistry*, 72: 1472-1481, 1999.
- LEÃO, R. M.; CRUZ, J. S.; DINIZ, C. R.; CORDEIRO, M. N.; BEIRÃO, P. S. L. Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the ω -Phoneutria nigriventer Tx3-3 peptide toxin. *Neuropharmacology*, 39: 1756-1767, 2000.
- LEFER, A.M. & LEFER, D.J. Endothelial dysfunction in myocardial ischemia and reperfusion: role of oxygen-derived free radicals. *Basic Research in Cardiology*, 86: 109-116, 1991.

- LEVITAN, E.S.; GEALY, R., TRIMMER, J.S.; TAKIMOTO, K. Membrane depolarization inhibits Kv1.5 voltage-gated K⁺ channel gene transcription and protein expression in pituitary cells. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 6036–6041, 1995.
- LIN, P.J.; PEASRON, P.J.; CARTIER, R., SCHAFF, H.V. Superoxide anion mediates the endothelium- dependent contractions to serotonin by regenerated endothelium. *Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery*, 102: 378-385, 1991.
- LITOVSKY, S. H.; ANTZELEVITCH, C. Differences in the electrophysiological response of canine ventricular subendocardium and subepicardium to acetylcholine and isoproterenol: a direct effect of acetylcholine in ventricular myocardium. *Circulation Research*, 67: 615, 1990.
- LÖFFELHOLZ, K.; PAPPANO, A. J. The parasympathetic neuroeffector junction in the heart. *Pharmacological Reviews*, 37: 1-24, 1985.
- LOOMIS, T.A.; KROP, S. Auricular fibrillation induced and maintained in animals by acetylcholine or vagal stimulation. *Circulation Research*, 3: 390–396, 1955.
- LOPEZ-MARTINS, R. A. B.; ANTUNES, E.; OLIVA, M. L. V.; SAMPAIO, C. A. M.; BURTON, J.; DE NUCCI, G. Pharmacological characterization of rabbit corpus cavernosum relaxation mediated by the tissue kallikrein-kinin system. *British Journal of Pharmacology*, 113: 81, 1994.
- LUBBE, W. F.; DARIES, P. S. & OPIE, L. H. Ventricular arrhythmias associated with coronary artery occlusion and reperfusion in the isolated perfused rat heart: a model for assessment of antifibrillatory action of antiarrhythmic agents. *Cardiovascular Research*, 12: 212-220, 1978.
- LUBBE, W. F.; DARIES, P. S.; OPIE, L. H. Ventricular arrhythmias associated with coronary artery occlusion and reperfusion in the isolated perfused rat heart: a model

for assessment of antifibrillatory action of antiarrhythmic agents. *Cardiovascular Research*, 12: 212-220, 1978.

- LUCAS, S. Spiders in Brazil. *Toxicon* v.26, p. 759, 1988.
- MA, X. L.; LEFER, D.J.; LEFER, A.M.; ROTHLEIN, R. Coronary endothelial and cardiac protective effect of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, 86: 937-946,1992.
- MANNING, A. S. & HEARSE, D. J. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 16: 497-518, 1984.
- MANNING, A. S. & HEARSE, D. J. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 16: 497-518, 1984.
- MARANGONI, S.; BORGES, N.C.C.; MARANGONI, E.; ANTUNES, A.C.; VIEIRA, J. C.; NOVELLO, G. B.; DOMONT, J. R.; GIGLIO, B.; OLIVEIRA, B.; DENUCCI, B. Biochemical characterization of a vascular smooth muscle contracting polypeptide purified from *Phoneutria nigriventer* (armed spider) venom. *Toxicon*, 31: 377,1993.
- MARBAN, E.; ROBINSON, S. W.; WIER, W. G. Mechanisms of arrhythmogenic delayed and early depolarizations in ferret ventricular muscle. *Journal of Clinical Investigation*, 78: 1185-1192,1986.
- MCAFEE, M.; HASHIMOTO, H.; PEARSON, P.J.; SCHAFF, H.V. Endothelial dysfunction following global cardiac ischemia and reperfusion. *Surgical Forum*,41: 301-11, 1991.
- MIURA, Y. & KIMURA, J. Sodium-Calcium exchange current dependence on internal Ca and Na and competitive binding of external Na and Ca. *The Journal of general physiology*, 93: 1129-1145, 1989.

- MOE, G. K.; ABILDSKOV, J. A. Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *American Heart Journal*, 58: 59-70, 1959.
- NÄBAUER, M. & KÄÄB, S. Potassium channel down-regulation in heart failure. *Cardiovascular Research*, 37:324–334, 1998.
- NERBONNE, J.M. & GUO, W. Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels in the heart: roles in normal excitation and arrhythmias. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 13:406–409, 2002.
- NERBONNE, J. M & KASS, R. S. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization *Physiological Reviews*, 85: 1205-1283, 2005.
- NATTEL, S. Newer developments in the management of atrial fibrillation. *American Heart Journal*, 130: 1094-106., 1995.
- NEVES, L. A. A.; ALMEIDA, A. P.; KHOSLA, M. C.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SANTOS, R. A. S. Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 801-809, 1997.
- NOMA, A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature*, 305:147–148, 1983.
- NORDIN, C. Abnormal Ca⁺⁺ handling and the generation of ventricular arrhythmias in congestive heart failure. *Heart Failure*, 5: 143-154, 1989.
- NUNES, K. P.; COSTA-GONÇALVES, A.; LANZA, L. F.; COSTES, S. F.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; PIMENTA, A. M.; WEBB, R. C.; DE LIMA, M. E. Tx2-6 toxin of the Phoneutria nigriventer spider potentiates rat erectile function. *Toxicon*, 51(7): 1197-206, 2008.
- OUDIT, G.Y.; KASSIRI, Z.; SAH, R.; RAMIREZ, R. J.; ZOBEL, Z.; BACKX, P. H. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) in

- normal and diseased myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33: 851-872, 2001.
- OGAWA, S.; KOGA, S.; KUWABARA, K. Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. *American Journal of Physiology*, 262: 546-54, 1992.
 - OPIE, L. H.; Adequacy of oxygenation of isolated perfused rat heart. *Basic Research in Cardiology*, 79: 300-306, 1984.
 - PABLA, R. & CURTIS, M. J. Effects of NO modulation on cardiac arrhythmias in the rat isolated heart. *Circulation. Research*, 77: 984-992, 1995.
 - PEARSON, P.J.; SCHAFF, H.V.; VANHOUTTE, P.M. Acute impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets following reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circulation Research*, 67: 385-93, 1990.
 - PEARSON, P.J.; SCHAFF, H.V.; VANHOUTTE, P. M. Long-term impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets following reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circulation*, 81: 1921-27, 1990.
 - PETERSEN, K. R. & NERBONNE, J. M. Expression environment determines K current properties: Kv1 and Kv4 alpha-subunit-induced K currents in mammalian cell lines and cardiac myocytes. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 437: 381-392, 1999.
 - SAKMANN, B. ; NOMA, A. A.; TRAUTWEIN, W. Acetylcholine activation of single muscarinic K channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart. *Nature*, 303: 250-253, 1993.
 - SANGUINETTI, M.C. & JURKIEWICZ, N. K. Delayed rectifier outward K current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *The American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 260:393-399, 1991.

- SCHERF, M.; ROMANO, F. J.; TERRANOVA, R. Experimental studies on auricular flutter and auricular fibrillation. *American Heart Journal*, 36: 241-51, 1948.
- SECCOMBE, J.F., SCHAFF, H.V. Reperfusion injury. In: Vasoactive Factors Produced By The Endothelium: Physiology and Surgical Implications. Austin: R.G. Landes. p: 27-41, 1994.
- SOBEY, C.G.; DALIPRAM, R.A.; DUSTING, G.J.; WOODMAN, O.L. Impaired endothelium-dependent relaxation of dog coronary arteries after myocardial ischaemia and reperfusion: Prevention by amlodipine, propranolol and allopurinol. *The British Journal of Pharmacology*, 105: 557-62, 1992.
- STHAL, R.F.; DEUTSH, E., FISHER, C.A.; WARSAW, D.S.; ADDONOZIO, V.P. Cardiac ischemia and endothelial function in the isolated rabbit heart. *Journal of Surgery Research*, 47: 97-104, 1989
- TEIXEIRA, C.E.; CORRADO, A. P.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Role of Ca²⁺ in vascular smooth muscle contractions induced by *Phoneutria nigriventer* venom *Toxicon*, 43: 61-68, 2004.
- TSAO, P.S., AOKI, N., LEFER, D.J., JOHNSON, G. III, LEFER, A.M. Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation*, 82: 1402-12, 1990..
- VAN WAGONER, D.; POND, A.L.; MCCARTHY, P.M.; TRIMMER, J.S.; NERBONNE, J.M. Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circulation Research*, 80: 772-781, 1997.
- VAUGHAN -WILLIAMS, E. M. A classification of antiarrhythmic actions reassessed after a decade of new drugs. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 24(4): 129-147, 1984.

- WANG, Y. G.; HÜSER, J.; BLATTER, L. A.; LIPSIUS, S. L.; Withdrawal of acetylcholine elicits Ca^{2+} -induced delayed after depolarizations in cat atrial myocytes. *Circulation*, 96: 1275-1281, 1997.
 - WATANABE, M.; HARA, Y.; TAMAGAWA, M.; NAKAYA, H.. Inhibitory effect of amiodarone on the muscarinic acetylcholine receptor-operated potassium current in guinea-pig atrial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 279: 617–624, 1996.
 - ZAFALON, J. R. N.; BASSANI, J. W. M.; BASSANI, R. A. Cholinergic-adrenergic antagonism in the induction of tachyarrhythmia by electrical stimulation in isolated rat atria. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 37: 127-135, 2004.
 - ZHANG, H.; HOLDEN, A. V.; NOBLE, D.; BOYETT, M. R. Analysis of the chronotropic effect of acetylcholine on sinoatrial node cells. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 13: 465–474, 2002.
-
-

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)