

Ana Flávia Machado Botelho

ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS PELO EXTRATO DE *Nerium
oleander*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Área: Medicina e Cirurgia Veterinária Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Martins Melo. Coorientador: Prof. Dr. Benito Soto-Blanco. Coorientadora: Dr^a. Maira Souza de Oliveira

Belo Horizonte- MG
Escola de Veterinária - UFMG
2015

Ficha catalográfica (Biblioteca)

Folha de assinatura

“Fica decretado que todos os dias da semana, inclusive as terças-feiras mais cinzentas, têm direito a converter-se em manhãs de domingo... Fica decretado que a partir deste instante, haverá girassóis em todas as janelas, que os girassóis terão direito a abrir-se dentro da sombra e que as janelas devem permanecer o dia inteiro abertas para o verde onde cresce a esperança”.

Estatutos do Homem - Thiago de Melo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que tornaram possível a realização deste trabalho. Em especial, gostaria de lembrar:

Agradeço a Deus pelas oportunidades que tem cruzado o meu caminho e pelas pessoas incríveis em minha vida que proporcionaram a realização deste trabalho.

À Professora Marília, minha orientadora, pelo apoio e incentivo em cada etapa da realização deste trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência, pelo conhecimento compartilhado e principalmente por me proporcionar oportunidades únicas ao longo do mestrado.

Ao Professor Benito, meu coorientador, pela disponibilidade, paciência e pela elaboração da ideia que deu origem à esta dissertação. Obrigada pelos conselhos e ensinamentos.

À Maira, minha coorientadora, pelos ensinamentos na área de cardiologia, essenciais para realização deste trabalho, pela disponibilidade, paciência e conselhos que me auxiliaram na redação deste texto.

Ao Professor Jáder e a todos do LAMEX, em especial ao Artur e Humberto, cuja participação e ensinamentos foram primordiais para realização deste trabalho. Obrigada pela amizade e pela paciência.

A todos do Laboratório de Toxicologia pelo apoio em cada etapa, em especial ao Fabiano, Tati, Stephanie, Luísa, Warley, Marina, Lilian, Helô, Débora, Guilherme, Maria Elvira, Cláudio, Aristóteles e Priscila. Sem a participação de vocês nada disso teria sido possível, meu eterno obrigado.

Ao Professor Felipe e ao Laboratório de Patologia, pela disponibilidade e ensinamentos que proporcionaram as análises histológicas deste trabalho.

À Professora Fabíola pelo auxílio com as análises de quimioluminescência.

Ao Danilo Gonçalves Bastos pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG e ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB por prover os equipamentos e suporte técnico necessários para os experimentos de microscopia eletrônica.

Ao Hospital Veterinário por ceder o espaço para realização dos experimentos, às Professoras Eliane e Suzane e à Paula pelo auxílio fundamental nos procedimentos anestésicos.

Aos colegas e ao Colegiado do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal pelo auxílio ao longo do mestrado. Ao Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA, pela apreciação ética do projeto de pesquisa. Às agências de fomento que proporcionaram a realização deste trabalho, FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Lucas e família, que me acolhem em Belo Horizonte sempre que preciso. Pelas caronas aos domingos de experimento, pelo amor, carinho, paciência, dedicação e por ser companheiro em todos os aspectos da minha vida.

À minha família, meus pais e minha irmã, que sempre incentivaram os meus estudos e apoiaram as minhas decisões. Sem o exemplo e a confiança de vocês nada disso seria possível. Obrigada pelos conselhos e por incentivarem o gosto pela leitura e aprendizagem sempre.

A todos os animais que participaram da minha formação como veterinária, essa dissertação é dedicada a vocês.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</u>	<u>10</u>
<u>LISTA DE TABELAS</u>	<u>15</u>
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>16</u>
<u>RESUMO</u>	<u>20</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>21</u>
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	<u>22</u>
<u>2. OBJETIVOS</u>	<u>23</u>
<u>2.1 Geral</u>	<u>23</u>
<u>2.2 Específicos</u>	<u>23</u>
<u>3. REVISÃO DE LITERATURA</u>	<u>24</u>
<u>3.1 Plantas cardiotoxicas</u>	<u>24</u>
<u>3.2 Aspectos morfológicos da planta</u>	<u>24</u>
<u>3.3 Utilizações terapêuticas</u>	<u>24</u>
<u>3.4 Propriedades tóxicas.....</u>	<u>25</u>
<u>3.5 Espécies acometidas.....</u>	<u>25</u>
<u>3.6 Doses tóxicas</u>	<u>26</u>
<u>3.7 Alterações eletrocardiográficas</u>	<u>26</u>
<u>3.8 Sinais clínicos</u>	<u>27</u>
<u>3.9 Alterações anatomopatológicas</u>	<u>28</u>
<u>3.10 Métodos diagnósticos.....</u>	<u>30</u>
<u>3.11 Potenciais tratamentos</u>	<u>30</u>
<u>3.12 Fisiologia do coração e atuação dos glicosídeos cardioativos</u>	<u>31</u>
<u>3.12.1 Funcionamento cardíaco</u>	<u>31</u>
<u>3.12.2 Funcionamento da bomba de NKA no coração e atividade dos glicosídeos cardioativos.....</u>	<u>32</u>
<u>3.12.3 Balanço Autonômico.....</u>	<u>34</u>
<u>4. MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>36</u>
<u>4.1 Experimento 1. Efeitos in vivo do extrato de N. oleander sobre a função cardíaca de cobaias</u>	<u>36</u>
<u>4.1.1 Animais e extratos</u>	<u>36</u>
<u>4.1.2 Administração do extrato e grupos experimentais</u>	<u>36</u>
<u>4.1.3 Exame eletrocardiográfico.....</u>	<u>36</u>
<u>4.1.4 Dosagem da glicose.....</u>	<u>37</u>

4.1.5 Avaliações bioquímicas.....	37
4.1.6 Avaliação macro e microscópica	37
4.1.7 Avaliação ultraestrutural do tecido cardíaco	38
4.1.8 Quantificação da oleandrina nos tecidos	38
4.1.9 Análise estatística.....	38
4.2 Experimento 2. Avaliação do balanço autonômico cardíaco de cobaios intoxicados com N. oleander	39
4.2.1 Administração do extrato e grupos experimentais	39
4.2.2 Análise da Frequência Cardíaca Média	41
4.2.3 Análise do Índice Simpático Vagal (ISV)	41
4.2.4 Análise do Tônus Autonômico Cardíaco	41
4.2.5 Análise estatística.....	41
4.3 Experimento 3. Efeitos in vitro do extrato de N. oleander sobre cardiomiócitos isolados de camundongos	41
4.3.1 Preparação do coração isolado	41
4.3.2 Isolamento dos cardiomiócitos.....	42
4.3.3 Teste de viabilidade celular.....	42
4.3.4 Análise da contratilidade	42
4.3.5 Avaliação do potencial de ação pelo método de Whole-cell patch-clamp	43
4.3.6 Avaliação do bloqueio da bomba de NKA.....	43
4.3.7 Análise do transiente de cálcio	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Seleção dos animais	45
5.2 Preparação e dose do extrato das folhas de Nerium oleander	45
5.3 Avaliação clínica	45
5.4 Alterações eletrocardiográficas	48
5.5 Níveis de glicose	58
5.6 Avaliação de marcadores cardíacos séricos	59
5.7 Alterações histopatológicas e ultraestruturais	60
5.8 Quantificação da oleandrina no extrato e nos tecidos de cobaios intoxicados	66
5.9 Avaliação do balanço autonômico cardíaco.....	68
5.10 Efeitos da N. oleander na fisiologia dos cardiomiócitos	72
6. CONCLUSÕES.....	81

<u>7. REFERÊNCIAS</u>	<u>82</u>
<u>8. ANEXO</u>	<u>91</u>
<u>8.1 Certificado do CEUA</u>	<u>91</u>
<u>8.2 Dados cromatográficos.....</u>	<u>91</u>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- (Ca²⁺i): Corrente de cálcio intracelular
- μL: Microlitro
- μm: Micrometro
- μM: Micromolar
- Ach: Acetilcolina
- AE: Alternância Elétrica
- ANOVA: Analise de Variância
- AS: Arritmia sinusal
- ATP: Adenosina Trifosfato
- AV: Atrioventricular
- BAV 1: Bloqueio atrioventricular de primeiro grau
- BAV 2: Bloqueio atrioventricular de segundo grau
- BAV 3: Bloqueio atrioventricular de terceiro grau
- BAV: Bloqueio atrioventricular
- Bomba de Ca²⁺ ATPase: Bomba de cálcio dependente de ATP
- Bomba de Na⁺/K⁺/ATPase: Bomba de sódio e potássio dependente de ATP
- BPM: Batimentos por minuto
- BS: Bradicardia sinusal
- C18: Coluna cromatográfica contendo 18 carbonos
- C57BL6: Linhagem de camundongo selvagem
- Ca²⁺: Íon cálcio
- cAMP: Adenosina monofosfato cíclica
- CABI-ICB-UFGM: Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
- CCD: Cromatografia em camada delgada
- CEUA: Comitê de experimentação e uso de animais
- CIB: Cell ISolated Buffered
- CK-mb: Fração cardíaca da creatina quinase
- Cl⁻: Íon cloro
- cm: Centímetros
- CM-UFGM: Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais
- CON: grupo controle
- CON-AM: Grupo controle recebendo atropina primeiro e depois metoprolol
- CON-MA: Grupo controle recebendo metoprolol primeiro e depois atropina
- cTnI: Troponina tipo I
- dL/dt : Derivada do comprimento em relação à derivada do tempo
- DL50: Dose letal para 50% dos animais

dV/dt : Derivada da voltagem em relação à derivada do tempo
ECG: Eletrocardiograma
ESSV: Extrassístole supraventricular
ESV: Extrassístole ventricular
EUA: Estados Unidos da América
EV: Escola de Veterinária
F: Fluorescência
F₀: Fluorescência basal
Fab: Fração de anticorpo
FC: Frequência cardíaca
FV: Fibrilação ventricular
FIMC: Frequência intrínseca do marca-passo cardíaco
Fluor-4- AM: Sonda de flúor 4 marcada com acetoximetil
FV: Fibrilação ventricular
FXYD: Family of Small Membrane Proteins
g/kg: Gramas por quilogramas
g: Gramas
h: Horas
H⁺: Íon hidrogênio
HCO₃: Bicarbonato
HE: Hematoxilina Eosina
HEPES: Composto químico de ácido sulfônico
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC/MS: Cromatografia de Alta Eficiência Acoplada a Espectrômetro de Massas
Hz: Hertz
ICa: Corrente de cálcio
IM: Intramuscular
IP: Intraperitoneal
ISV: Índice Simpático Vagal
K⁺: Íon potássio
KCl: Cloreto de potássio
KHz: Kilo hertz
LAMEx: Laboratório de Membranas Excitáveis
M: Molar
M2: Receptor muscarínico de acetilcolina
ME: Microscopia eletrônica

mg/dL: Miligramas por decilitro
mg/kg: Miligramas por quilogramas
mg/mL: Miligramas por mililitros
mg: Miligramas
MG: Minas Gerais
MgCl₂: Cloreto de magnésio
min: Minutos
mL: Mililitros
mm/s: Milímetros por segundo
mm: Milímetros
MPM: Marca passo migratório
mseg: Milissegundos
mV: Milivolt
MΩ: Mega ohm
n: Numero de animais amostrados
Na⁺: Íon sódio
NaCl; Cloreto de sódio
NaH₂PO₄: Fosfato monossódico
NAV: Nó atrioventricular
NCX: Trocador de sódio e cálcio
NKA: Bomba de sódio e potássio ATPase
ng/ml: Nanogramas por ml
nM: Nano molar
nM: Nanomolar
NO: Noradrenalina
NSA: Nó sino atrial
°C: graus Celsius
OLE 150: Grupo que recebeu 150mg/kg de extrato de *N. oleander*
OLE 300: Grupo que recebeu 300mg/kg de extrato de *N. oleander*
OLE: Grupo que recebeu extrato de *N. oleander*
OLE-AM: Grupo tratado com extrato de *N. oleander* recebendo primeiro atropina e depois metoprolol
OLE-MA: Grupo tratado com extrato de *N. oleander* recebendo primeiro metoprolol e depois atropina
P: Onda de despolarização atrial do eletrocardiograma
pA: Picoampere
PA: Potencial de ação
Pg: Picograma

PKA: Proteína quinase A
PKC: Proteína quinase C
Pmseg: Duração da onda P
PmVolt: Amplitude da onda P
PR: Segmento entre a despolarização atrial e ventricular do eletrocardiograma
PRmseg: Duração do intervalo PR
PS: Parada Sinusal
Q: Onda de despolarização inicial ventricular do eletrocardiograma
Qprof: Onda Q profunda
QRS: Complexo de despolarização ventricular do eletrocardiograma
QRSmseg: Duração do complexo QRS
QT: Intervalo de repolarização ventricular do eletrocardiograma
QTc: Intervalo QT corrigido pela fórmula de Van der Water
QTmseg: Duração do intervalo QT
R: Onda de despolarização ventricular do eletrocardiograma
RmVolt: Amplitude da onda R
RPA: Repolarização do potencial de ação
RPM: Rotações por minuto
RR: Segmento eletrocardiográfico entre 2 ondas R consecutivas
RS: Retículo sarcoplasmático
RSN: Ritmo sinusal normal
RyR: Receptor de rianodina
S: Onda de despolarização final ventricular do eletrocardiograma
SERCA - *Sarco-Endoplasmic reticulum calcium* –Ca²⁺ATPase do retículo sarcoplasmático
SNA: Sistema Nervoso Autônomo
SNC: Sistema Nervoso Central
Sprof: Onda S profunda
ST: Segmento entre a despolarização e repolarização ventricular do eletrocardiograma
T: Onda de repolarização ventricular do eletrocardiograma
T0: Tempo zero
T1: Tempo 1
T2: Tempo 2
T3: Tempo 3
T4: Tempo 4
TA: Taquicardia atrial
TmVolt: Amplitude da onda T
TS: Taquicardia sinusal.

TSSV: Taquicardia supra ventricular

TV: taquicardia ventricular

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

V: volts

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alterações eletrocardiográficas apresentadas por animais intoxicados acidentalmente ou experimentalmente por *N. oleander*.

Tabela 2: Alterações clínicas apresentadas por animais intoxicados acidentalmente ou experimentalmente por *N. oleander*.

Tabela 3: Alterações anatomopatológicas apresentadas por animais intoxicados acidentalmente ou experimentalmente por *N. oleander*:

Tabela 4: Transportadores plasmáticos de mamíferos que dependem do gradiente transmembrana de sódio estabelecido pela atividade da bomba de NKA. Adaptado de Shattock, 2009.

Tabela 5. Evolução dos animais intoxicados após administração de diferentes doses de extrato de *N. oleander*.

Tabela 6. Achados eletrocardiográficos de cobaias intoxicados com diferentes doses de extrato de *N. oleander* ao longo do tempo do experimento.

Tabela 7: Predominância das alterações eletrocardiográficas nos grupos OLE 150 e OLE 300.

Tabela 8. Valores médios e desvio padrão da glicemia (mg/dL) de cobaias controle e intoxicados com diferentes doses de extrato de *N. oleander* nos tempos 0 e 1 (1 hora após a intoxicação).

Tabela 9. Valores médios e desvio padrão da dosagem plasmática da CK-MB (ng/mL) de cobaias controle e intoxicados com diferentes doses de extrato de *N. oleander* nos tempos 0 e 3 (3horas após a intoxicação).

Tabela 10: Valores médios e desvio-padrão da FC basal (bpm) dos grupos controle (CON-AM e CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM e OLE-MA).

Tabela 11: Valores médios e desvio-padrão da FC (bpm) após o duplo bloqueio dos ramos simpático e parassimpático dos grupos. (CON-AM, CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM, OLE- MA) submetidos ao teste de Tukey ($p>0,05$).

Tabela 12: Valores médios e desvio-padrão do tônus simpático (bpm) dos grupos controle (CON-AM) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM) submetidos ao teste de Tukey ($p>0,05$).

Tabela 13: Valores médios e desvio padrão do tônus parassimpático (bpm) dos grupos controle (CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE- MA) submetidos ao teste de Tukey ($p>0,05$).

Tabela 14: Valores médios e desvio padrão do Índice Simpático Vagal dos grupos controle (CON-AM e CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM e OLE- MA) submetidos ao teste de Tukey ($p>0,05$).

Tabela 15. Valores médios dados em porcentagem do número de células viáveis e não viáveis dos grupos de cardiomiócitos controle e tratadas com 0,3 mg/mL de extrato de *N. oleander*.

Tabela 16: Avaliação do comprimento diastólico e arritmias dos cardiomiócitos dos grupos controle, 0,1mg/mL, 0,3mg/mL e 1mg/mL de extrato de *N. oleander*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: *Nerium oleander* variedade branca adaptada de Bandara et al., 2010.

Figura 2: Atividade elétrica no tecido cardíaco (Nerbonne e Kass, 2005).

Figura 3: Dinâmica de cálcio nos cardiomiócitos ventriculares (Bers e Despa, 2006).

Figura 4: Mecanismo de ação conhecido dos digitálicos (Adaptado de Demiryurek e Demiryurek, 2005).

Figura 5. A- Imagem da identificação dos cobaios. B- Imagem do posicionamento eletrocardiográfico.

Figura 6: Imagem da coleta de sangue por punção da veia jugular de cobaios.

Figura 7: A- Esquema representativo da modulação no grupo CON-AM; B- Esquema representativo da modulação no grupo CON-MA; C- Esquema representativo da modulação no grupo OLE-AM; D- Esquema representativo da modulação no grupo OLE-MA.

Figura 8: A- Imagem do acoplamento do coração via aorta na cânula do sistema Langendorff. B- Imagem do coração em bloco com os grandes vasos e os pulmões.

Figura 9: Número de animais que apresentaram sinais clínicos após a administração de 150 e 300mg/kg de extrato de *N. oleander* ao longo das três horas de experimento.

Figura 10: Animal intoxicado com 300mg/kg de extrato de *N. oleander* cerca de uma hora após a intoxicação A- Destaque para a cianose. B- Destaque para paresia de membros posteriores e apatia.

Figura 11. Distúrbios de ritmo e condução encontrados nos cobaios dos grupos intoxicados com 150mg/kg e 300mg/kg de extrato de *N. oleander*. A- RSN - animal do grupo controle; B- ESV pareadas monomórficas e aumento de onda T (OLE 150mg/kg); C- Bloqueio AV de primeiro grau (OLE 150mg/kg); D- Taquicardia ventricular monomórfica sustentada (OLE 300mg/kg); E- Fibrilação ventricular (OLE 300mg/kg). Gravações feitas na derivação II, com amplitude de 2N e 25mm/s.

Figura 12: Valores médios e desvio padrão da FC (A), duração da onda P (B), amplitude da onda P (C), duração do intervalo PR (D), duração do complexo QRS (E) e desnivelamento do segmento ST (F) de cobaios submetidos a dose de 150mg/kg de extrato de *N. oleander*. Análises realizadas com pós-teste de Tukey ($p>0,05$), exceto a amplitude da onda P, submetida ao teste de Kruskal Wallis ($p>0,05$) e o desnivelamento do segmento ST submetido ao teste de Friedman ($p>0,05$).

Figura 13: Valores médios e desvio padrão da amplitude da onda R (A), amplitude da onda T (B), duração do segmento QT (C) e duração do intervalo QTc (D) de cobaios submetidos à dose de 150mg/kg de extrato de *N. oleander*. Análises realizadas com pós-teste de Tukey ($p<0,05$). A- * aumento em relação ao tempo 0; B- * aumento em relação aos tempos 0, 1, 2 e 3; C- aumento em relação ao tempo 0; D- *aumento em relação ao tempo 0; E-* aumento em relação ao tempo 0..

Figura 14: Valores médios e desvio padrão da FC (A), duração da onda P (B), duração do complexo QRS (C) e desnivelamento do segmento ST (D) de cobaios submetidos à dose de 300mg/kg de extrato de *N. oleander*. Análises realizadas com pós-teste de Tukey ($p>0,05$), exceto o desnivelamento do segmento ST submetido ao teste de Friedman ($p>0,05$).

Figura 15: Valores médios e desvio padrão da amplitude da onda P (A); duração do segmento PR (B); amplitude da onda R (C); duração do segmento QT (D); duração do segmento QTc (E) e amplitude da onda T (F) de cobaios submetidos á dose de 300mg/kg de extrato de *N. oleander*.

Análises realizadas com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$), exceto a amplitude da onda P, submetida ao teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$). A-# aumento em relação ao tempo 0; * aumento em relação aos tempos 0 e 1; B-* aumento em relação ao tempo 0; C-* aumento em relação ao tempo 0; # aumento em relação aos tempos 0 e 1; D-* aumento em relação ao tempo 0; E-* aumento em relação ao tempo 0; F* aumento em relação aos tempos 0 e 1; # aumento em relação ao tempo 0.

Figura 16: Valores médios e desvio padrão da duração da onda R (A), duração do complexo QRS (B), amplitude da onda R (C), duração do segmento QTc (D), duração do segmento QT (E), amplitude da onda T (F) e desnivelamento do segmento ST (G) de cobaias dos grupos CON, OLE 150 e OLE 300. Análises realizadas com pós-teste de Tukey ($p > 0,05$), exceto o desnivelamento do segmento ST submetido ao teste de Friedman ($p > 0,05$).

Figura 17: Valores médios e desvio padrão da frequência cardíaca (A), amplitude da onda P (B), duração do intervalo PR (C) e amplitude da onda T (D) de cobaias dos grupos CON, OLE 150 e OLE 300. Análises realizadas com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$), exceto a amplitude da onda R, submetido ao teste Kruskal Wallis. A-*diminuição em relação aos grupos CON e OLE 300; B-* diminuição em relação aos grupos CON e OLE 150; C- * aumento em relação aos grupos CON e OLE 300 .

Figura 18. Valores médios da dosagem da glicemia (mg/dl) de cobaias controle e intoxicados com diferentes doses de extrato de *N. oleander* nos tempos 0 e 1(1hora após a intoxicação).

Figura 19. Valores médios da CK-MB plasmática (ng/ml) de cobaias controle e intoxicados com diferentes doses de extrato de *N. oleander* nos tempos 0 e 3 (3horas após a intoxicação) (Welch-Corrected T-Test e Dunn, $p < 0,05$).

Figura 20: Amostras do encéfalo de animais tratados com 300mg/kg de extrato de *N. oleander*. A- Destaque para a congestão encefálica (setas) (aumento de 20x); B- Destaque para a hemorragia subdural discreta (seta) (aumento de 10x).

Figura 21: Amostras do tecido renal de animais intoxicados por *N. oleander*. A- OLE 150, destaque para congestão renal (setas) (aumento 10x); B- OLE 300, presença de vacúolos na região próxima à junção córtico-medular (seta) (aumento de 20x); C- OLE 300, indicando presença de glomérulos congestos (seta) (aumento 10x); D- OLE 300 destaque para os núcleos das células glomerulares discretamente basofílicos, associado á presença de hemácias no interior dos glomérulos e aglomerado celular na base dessas estruturas (setas) (aumento 40x).

Figura 22: A- Amostra do fígado do grupo OLE 150 evidenciando imagem hepática sem alterações (aumento20x). B- Amostra do pulmão do grupo OLE 150, evidenciando imagem pulmonar sem alterações dignas de nota (aumento20x).

Figura 23: Amostras do miocárdio dos animais estudados. A- Grupo CON, sem alterações (aumento de 10x). B-Grupo CON, sem alterações (aumento 20x). C- Grupo OLE 150 destaque para as fibras cardíacas mais eosinofílicas e intensa hemorragia no miocárdio (setas) (aumento 20x). D- Grupo OLE 150, destaque para a presença de hemorragia moderada no miocárdio (seta) (aumento 40x). E- Grupo OLE 300, imagem do músculo papilar do ventrículo esquerdo com destaque para a presença de vacúolos intracitoplasmáticos nos cardiomiócitos (seta) (aumento 20x). F- Grupo OLE 300 destaque indicando os vacúolos intracitoplasmáticos nos cardiomiócitos do músculo papilar do ventrículo esquerdo (setas) (aumento 40x).

Figura 24: Amostras de cortes histológicos semi-finos de animais do grupos CON, OLE 150 e OLE 300. A- Grupo CON, evidenciando imagem cardíaca sem alterações (aumento x40). B- Grupo OLE 150, evidenciando diferença de pigmentação entre fibras com destaque para a presença de formações vacuolares citoplasmáticas (estrela) (aumento 40x); C- Grupo OLE 300 com destaque para a presença de citoplasma intensamente vacuolizado (setas) (aumento x40); D- Grupo OLE 300 com destaque para a congestão intensa e presença de discreta hemorragia entre fibras (estrelas) (aumento 40x).

Figura 25: Micrografias eletrônicas de cortes longitudinais de músculo cardíaco esquerdo dos animais do grupo CON, OLE 150 e OLE 300. A- Amostra controle: destaque para as estriações (E) e a alternância entre filamentos e mitocôndrias (M) ricas em cristas e intensamente elétrondensas. É possível visualizar também o retículo sarcoplasmático (RS). B- Amostra do grupo OLE 150. Destaque para a presença de fibras descontínuadas e contraídas e para as mitocôndrias tumefeitas, sem definição de cristas e pouco elétrondensas. C- Amostra do grupo OLE 300. Destaque para as mitocôndrias, que também se encontram tumefeitas e pouco elétrondensas.

Figura 26: Valores da concentração de oleandrina (PPM/g) encontrado no cérebro, coração, fígado e rins de cobaias intoxicados com extrato de *N. oleander* nas doses de 150 e 300mg/kg ao longo das três horas de experimento, detectadas por técnica cromatográfica LC/MS-MS (Teste-T, $p>0,05$).

Figura 27: Valores médios FC basal (bpm) dos grupos controle (CON-AM, CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM, OLE- MA) submetidos ao teste de Tukey ($p>0,05$).

Figura 28: Valores médios da FC (bpm) após o bloqueio vagal dos grupos controle (CON-AM) e intoxicado com *N. oleander* (OLE-AM) (teste de Tukey, $p<0,05$).

Figura 29: Valores médios da FC (bpm) após o bloqueio β -adrenérgico feito com metoprolol dos grupos controle (CON-MA) e intoxicado com *N. oleander* (OLE-MA) (teste de Tukey, $p<0,05$).

Figura 30: Valores médios da FC (bpm) após o duplo bloqueio dos ramos simpático e parassimpático dos grupos controle (CON-AM, CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM, OLE- MA) submetidos ao teste de Tukey ($p>0,05$).

Figura 31: Valores médios do tônus simpático (bpm) dos animais dos grupos controle (CON-AM) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM) submetidos ao teste de Tukey ($p>0,05$).

Figura 32: Valores médios do tônus parassimpático (bpm) dos grupos controle (CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE- MA) submetidos ao teste de Tukey ($p>0,05$).

Figura 33: Valores médios do Índice Simpático Vagal dos grupos controle (CON AM e CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM OLE-MA) submetidos ao teste de Tukey ($p>0,05$).

Figura 34: Valores médios dados em porcentagem do número de células viáveis e não viáveis do grupo de cardiomiócitos controle e tratadas com 0,3mg/mL de extrato de *N. oleander*; teste de T ($p>0,05$).

Figura 35: A- Queda da corrente elétrica promovida pela bomba NKA dos cardiomiócitos após adição de 0,3mg/mL de extrato de *N. oleander*. Setas indicando na sequência: 1- a retirada do K^+ do meio extracelular para estabelecer o estado inicial do funcionamento da bomba NKA; 2- inserção do K^+ solução para restabelecer o funcionamento da bomba NKA; 3- adição do extrato de *N. oleander* 0,3mg/mL mostrando o decaimento da função da bomba; 4- lavagem da solução com o extrato e inserção de solução com K^+ mostrando a retomada da função da bomba após a lavagem das soluções e restabelecimento dos níveis de K^+ . B- Análise da corrente elétrica da bomba de NKA dos grupos controle, 0,3mg/mL de extrato de *N. oleander* e 50 μ M de ouabaína. * Redução da corrente da bomba em comparação com o grupo controle ($p<0,05$).

Figura 36: Transiente global de Ca^{2+} em cardiomiócitos de animais controle (A) e expostos ao extrato de *N. oleander* na dose de 0,3mg/mL (B) Imagens representativas da varredura de cardiomiócitos incubados com a sonda sensível a Ca^{2+} , estimulados com pulsos elétricos de animais previamente expostos com PBS (controle) e ao extrato de *N. oleander*. (C) Pico do transiente de cálcio ilustrando a relação entre fluorescência máxima sobre a fluorescência basal. (Os dados são expressos como média \pm EPM, * $p < 0,05$ em relação ao controle).

Figura 37: Constante de decaimento do transiente de Ca^{2+} (τ ms) cardiomiócitos de animais controle e expostos ao extrato de *N. oleander*. Constante de decaimento do transiente de Ca^{2+} é

maior nas células que receberam o extrato de *N. oleander* se comparadas às células do grupo controle. (Os dados são expressos como média \pm EPM, * $p < 0,05$ em relação ao controle).

Figura 38: Fração de encurtamento. Controle (n=55); 0,1mg/mL (n=14); 0,3mg/mL (n=15); 1mg/mL (n=8). Resultados expressos como médio e desvio (* $p < 0,05$ em relação aos grupos controle, 0,1mg/mL, 0,3mg/mL; One-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey).

Figura 39: Taxas máximas de contração (A) e relaxamento (B). Controle (n=55); 0,1mg/mL (n=14); 0,3mg/mL (n=15); 1mg/mL (n=8). Resultados expressos como médio e desvio (* $p < 0,05$ em relação aos grupos controle, 0,1mg/mL; One-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey).

Figura 40: Gráfico representativo dos traçados do potencial de ação. Redução do PA nas células tratadas; * $p < 0,05$. A: controle; B: 10mg/mL de extrato de *N. oleander*. C)- Curso temporal representativo do efeito da administração de *N. oleander* no potencial de repouso dos cardiomiócitos, evidenciando a indução de despolarização de maneira rápida e reversível induzida pelo extrato. Cada círculo aberto representa o potencial de repouso registrado para um potencial de ação, com frequência de estimulação de 1 Hz.

Figura 41: Duração máxima do potencial de repouso a 50% (Figura A) e a 90% (Figura B) em células controle e submetidas a 0,3m/ml de extrato de *N. oleander** $p < 0,05$ em relação ao controle.

Figura 42: Potencial de ação de células controle e submetidas a 0,3m/ml de extrato de *N. oleander*. A- Máxima velocidade de despolarização celular. Redução nas células tratadas * $p < 0,05$ em relação ao controle. B- Máxima velocidade de repolarização celular. Redução nas células tratadas; * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Figura 43: Potencial de repouso da membrana de células controle e submetidas a 0,3mg/mL de extrato. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

RESUMO

Nerium oleander (OLE) é uma planta ornamental, nativa da Europa e África, distribuída em áreas tropicais e subtropicais do mundo. Todas as partes da planta são tóxicas, causando graves lesões agudas no coração que podem levar à morte de humanos e animais. A intoxicação por OLE é causada por diferentes glicosídeos cardioativos (GCs), incluindo seu principal composto oleandrina. Essas substâncias podem causar alterações gastrointestinais, neurológicas e cardíacas. Estudos toxicológicos *in vivo* em espécies diferentes descreveram os efeitos de OLE no coração e outros órgãos, no entanto, os efeitos arritmogênicos da OLE e o seu mecanismo de ação são pouco compreendidos. GCs comprovadamente afetam a bomba de sódio-potássio ATPase (NKA) e causam efeito inotrópico positivo no coração, mas descobertas recentes sugerem que vários GCs tem efeitos á parte da inibição da NKA, contribuindo para sua toxicidade. Os efeitos do extrato de OLE no perfil clínico e eletrocardiográfico dos animais, assim como seus efeitos na eletrofisiologia de cardiomiócitos isolados foram avaliados. Os resultados demonstram que a OLE causa graves arritmias cardíacas que podem levar á morte, associada a discretas lesões na histologia e sem alterações nos marcadores de lesões cardíacas. Resultados *in vitro* sugerem que a OLE causa distúrbios eletromecânicos no coração por meio da inibição reversível da bomba NKA, tumefação mitocondrial e provável modulação da SERCA (bomba de cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático) sem relação com o sistema nervoso autônomo. Entretanto, mais estudos são necessários para clarear os mecanismos da OLE. O presente estudo demonstra o potencial cardiotoxíco e efeito inotrópico positivo da OLE e seu papel importante na modulação da eletrofisiologia dos cardiomiócitos.

Palavras-chave: *Nerium oleander*, glicosídeos cardioativos, arritmias, eletrofisiologia, biomarcadores cardíacos.

ABSTRACT

Nerium oleander is an ornamental plant, native in Europe and Africa, distributed in tropical and subtropical areas of the world. All parts of the plant are toxic, causing severe acute heart lesions that can lead to death in humans and animals. OLE intoxication is caused by different cardiac glycosides (GCs), including its main compound oleandrin. These substances may cause gastrointestinal, neurological and cardiac alterations. *In vivo* toxicological studies in different species have described the effects of OLE in the heart and other organs, however, OLE arrhythmogenicity and cardiac mechanisms of action are barely understood. GCs have been proven to impair sodium-potassium ATPase (NKA) pump activity and cause positive inotropic effects the heart, but recent findings suggest a contribution of varied CGs' effects apart from NKA inhibition. The effects of OLE extract in clinical and electrocardiographic profile of animals, as well as its effects on electrophysiology of isolated cardiomyocytes was evaluated. Results demonstrate that OLE causes severe cardiac arrhythmias that can lead to death, with discrete lesions on histology and no injury cardiac biomarkers alterations. *In vitro* results suggest that OLE causes electromechanical disturbances in the heart due to its reversible inhibition of NKA, mitochondrial swelling and probable modulation of the calcium reticulum ATPase (SERCA) with no relations to the autonomic nervous system. However more studies are required to clarify the mechanisms of OLE. The present study demonstrates the potential cardiotoxicity and positive inotropic effect of OLE and its important role in modulation of electrophysiology in cardiomyocytes.

Key words: *Nerium oleander*, cardiac glycoside, arrhythmias, electrophysiology, cardiac biomarkers.

1. INTRODUÇÃO

Nerium oleander (*N. oleander*) é uma planta pertencente à família Apocynacea encontrada em todo o mundo. Nativa de regiões mediterrâneas da Europa e Ásia é amplamente cultivada como planta ornamental em áreas tropicais e subtropicais do planeta (Pio Corrêa, 1975; Cruz, 1982). Popularmente é conhecida como espirradeira, oleander, adelfa, loureiro rosa, flor de São José, loendro da Índia, solan, rose laurel e kaner (Cruz, 1982).

N. oleander é uma das plantas mais tóxicas do mundo, causando lesões agudas e morte súbita em homens e animais (Vermut, 1987). Casos de intoxicação em animais foram relatados em diferentes países como Estados Unidos, Itália, Austrália e Brasil (Langford e Boor, 1996; Hughes et al., 2002; Soto-Blanco et al., 2006; Pedroso et al., 2009), enquanto os casos descritos em humanos foram relatados nos Estados Unidos, Itália, Suíça e Irã (Dorsey, 1962; Langford e Boor, 1996; Papi et al., 2002; Wojtyna e Enseleit, 2004; Peymani et al., 2011).

Todas as partes da planta são tóxicas para o homem e animais (Langford e Boor, 1996). A intoxicação relatada por veterinários ocorre geralmente de forma acidental (Oryan et al., 1996), entretanto, o consumo por animais esfomeados também é relatado, na sua maioria em decorrência da falta de forragem no período seco e pela presença residual de partes da planta no pasto (Langford e Boor, 1996; Soto-Blanco et al., 2006).

A toxicidade da *N. oleander* provém principalmente de cardenolídeos, cujo mecanismo de ação mais estudado é a inibição da bomba de sódio/potássio ATPase (NKA) dos cardiomiócitos, similar à ação digitalica (Langford e Boor, 1996). Além disso, os glicosídeos também possivelmente afetam o coração através de sua ação parassimpatomimética e simpaticomimética no nó sinoatrial e na junção atrioventricular (Haynes et al., 1985; Langford e Boor, 1996) que, segundo Pentel e Salerno (1990), é provavelmente devido a ações na área do pedúnculo cerebral. Rezakani e Maham (1992) relataram que baixas doses de *N. oleander* produzem efeitos vagais predominantes, como bradicardia sinusal, bloqueios atrioventriculares e dissociação atrioventricular; enquanto doses maiores provocaram taquicardia sinusal, extrassístoles ventriculares, taquicardia ventricular e fibrilação ventricular. Essas hipóteses merecem ser melhor estudadas para elucidar o real mecanismo de ação desses glicosídeos. Outros sinais clínicos também são observados após a ingestão da planta. A sintomatologia clínica é variável e pode ocorrer de forma rápida e grave. Alguns dos mais citados são náusea, vômito, sialorreia, dor abdominal, diarreia e arritmias cardíacas que podem levar a óbito (Haynes, et al., 1985). Devido à grande difusão da *N. oleander* pelo mundo, sua elevada toxidez e a ausência de estudos experimentais avaliando sua atividade cardiotoxica, fazem-se necessários novos estudos para investigar o potencial lesivo dessa intoxicação e suas consequências para os homens e animais.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos cardiotoxicos de diferentes doses de extrato de *N. oleander* após administração oral em cobaios e os seus efeitos sob o potencial de membrana de cardiomiócitos isolados.

2.2 Específicos

Avaliar as alterações clínicas e eletrocardiográficas de cobaios após a administração oral de diferentes doses do extrato de *N. oleander*.

Avaliar a creatina quinase fração MB (CK-MB) e troponina I (cTnI) séricas de cobaios após administração oral de diferentes doses do extrato de *N. oleander*.

Avaliar o potencial hipoglicemiante do extrato de *N. oleander* por meio da mensuração sanguínea de glicose.

Determinar a cinética de distribuição da oleandrina em órgãos de cobaios após administração oral de diferentes doses do extrato de *N. oleander* pelo método de cromatografia líquida de alto desempenho acoplado à espectrometria de massa (CLAE/MS).

Analisar alterações anatomopatológicas do coração, fígado, rins, pulmão e encéfalo após administração oral de diferentes doses do extrato de *N. oleander*.

Avaliar a ultraestrutura dos cardiomiócitos por meio de microscopia eletrônica do tecido cardíaco ventricular de cobaios submetidos à administração oral de diferentes doses do extrato de *N. oleander*.

Avaliar a atividade simpática e parassimpática de cobaios submetidos à administração de extrato de *N. oleander* por meio de monitoração eletrocardiográfica e modulação farmacológica com bloqueadores beta-adrenérgicos e colinérgicos.

Avaliar as alterações de potencial de membrana, contração celular e da bomba de NKA de cardiomiócitos isolados de camundongos submetidos a diferentes concentrações de *N. oleander* pelo método de *patch-clamp whole-cell*.

Avaliar o fluxo de cálcio intracelular dos cardiomiócitos isolados de camundongos submetidos a diferentes concentrações de extrato de *N. oleander* pelo método de transiente de cálcio.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas cardiotoxícas

Existe um grande número de espécies de plantas cardiotoxícas no mundo, com diferentes mecanismos de ação. No Brasil, algumas espécies de plantas já foram descritas como potencialmente cardiotoxícas, entre elas, *Tetrapteryx multiglandulosa* (Riet-Correa et al., 2005) e *Ateleia glazioviana* (Stigger et al., 2011). A ingestão da maioria dessas espécies causa sinais agudos e morte súbita, assim como a *N. oleander*.

Os glicosídeos cardiotoxícos encontrados na *N. oleander* também já foram descritos em outras espécies como *Digitalis purpurea*, *D. lanata*, *Uriginea maritima*, *Convallaria majalis*, *Thevetia peruviana*, *Strophanthus gratus*, *Apocynum cannabinum*, *Cheiranthus cheiri*, *Asclepias* spp., *Menziesia ferruginosa*, *Adonis* spp., *Omithogalum umbellatum*, *Carissa acokanthera*, *Cerbera manghas*, *Plumeria rubra*, *Calotropis procera* e *Cryptostegia grandiflora* (Kanji e MacLean, 2012).

3.2 Aspectos morfológicos da planta

N.oleander é um arbusto ereto resistente ou uma densa árvore, variando entre um e dez metros de altura (Figura 1). As folhas são lineares, lanceoladas, com bordas lisas, verticiladas, coriáceas, verdes acinzentadas a escuras, com distintas nervuras centrais amareladas. As flores são aromáticas com formato de funil em diferentes cores, variando entre branco, rosa e vermelho, formadas por cinco pétalas. Os frutos são cápsulas deiscuentes e alongadas como vagens, grossas, aderentes e claras (Pio Correa, 1982; Haynes et al.,1985; Lorenzi e Matos, 2002).



Figura 1: *Nerium oleander* variedade branca adaptada de Bandara et al., 2010.

Todas as partes da planta são tóxicas para o homem e animais, como raízes, galhos, folhas, flores, néctar e frutos. Deve ser ressaltado que após a combustão os produtos gerados permanecem tóxicos (Langford e Boor, 1996; Senthilkumaran et al., 2011) já que o calor não inativa os cardenolídeos (Shumaik et al., 1988). Os maiores níveis desses princípios tóxicos são encontrados em raízes e sementes, seguido dos frutos e folhas, tanto frescos quanto secos (Langford e Boor, 1996), sem distinção de toxicidade entre as variedades branca, rosa e vermelha (Pedroza et al., 2014).

3.3 Utilizações terapêuticas

Na década de 1930, a *N. oleander* foi muito usada como droga indutora de diurese em pacientes com falência cardíaca e para melhorar a função cardiovascular em casos de fibrilação ventricular, mas seu uso foi abandonado devido aos seus efeitos colaterais (Middleton et al.,

1936). Também já foi usada como planta abortiva, no tratamento de problemas dermatológicos e tumores externos (Lorenzi e Matos, 2002).

Ainda hoje é usada como medicação fitoterápica em alguns países para tratamento de diferentes afecções (Khan et al., 2013). Bas et al. (2012) relataram que o extrato pode ser benéfico no tratamento de diabetes tipo 2, no que concerne tanto o tecido adiposo quanto o metabolismo glicolítico, utilizando ratos como modelo animal. Siddiqui et al. (2012) iniciaram testes que identificaram um potencial efeito citotóxico em células humanas neoplásicas de origem mamária. Calderón-Montaña et al. (2013) sugeriram que os extratos de *N. oleander* podem levar a efeitos anticancerígenos *in vitro* em células humanas neoplásicas de origem pulmonar. Em 2013, também foi publicado um estudo *in vitro* avaliando os possíveis efeitos do extrato de *N. oleander* em sua forma comercial Anvirzel®, sobre células infectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Os resultados revelaram acentuada redução da infectividade viral, sem, no entanto alterar sua replicação (Singh et al., 2013).

Várias pesquisas mostram seu amplo potencial como antifúngico (Hadizadeh et al., 2009), antimicrobiano (Derwich et al., 2010) e inseticida (Roni et al., 2013). Também possui potencial terapêutico como antiinflamatório, antipirético (Kumar e Anand, 2010), anticonvulsivante (Kumar e Madhab, 2011) e imunomodulador (Al-Farwachi et al., 2007).

3.4 Propriedades tóxicas

O extrato da *N. oleander* possui diferentes compostos, como flavonoides, taninos, triterpenoides, triterpenos e esteroides, sendo as substâncias de maior importância tóxica conhecidas como glicosídeos cardiotóxicos (Lorenzi e Matos, 2002; Sharma et al., 2010). Essas substâncias, metabólitos secundários, são glicosídeos esteroides derivados de triterpenos, provavelmente estão relacionados com a defesa dos organismos. Existem dois grandes grupos conhecidos de glicosídeos cardiotóxicos: os cardenolídeos (mais produzidos pelas plantas) e os bufodienolídeos produzidos principalmente por animais da ordem Anura (que inclui os sapos). Os cardenolídeos possuem um grupo lactona com cinco membros, enquanto os bufodienolídeos possuem anéis lactona com seis membros. Assim, as diferenças químicas entre os compostos muito pequenas (Bandara et al., 2010).

A toxicidade da *N. oleander* resulta provavelmente de diferentes glicosídeos, incluindo digitoxigenina, folinerina, rosagenina, oleandrina e nerlina (Begum et al., 1999). Os compostos são estruturalmente muito similares à digoxina, possuindo potenciais propriedades inotrópicas positivas, cronotrópicas negativas e reação cruzada entre si (Langford e Boor, 1996). Segundo Shumaik et al. (1988), embora tenha ação semelhante aos digitálicos, a oleandrina é mais persistente no seu efeito e, portanto, mais tóxica.

3.5 Espécies acometidas

N. oleander é uma planta de crescimento rápido que necessita de podas constantes. As folhas e galhos pós-corte podem ser misturados com a forragem e causar a intoxicação (Rezakani e Maham, 1992), já que sua palatabilidade é baixa e o consumo voluntário ocorre mais comumente no período da seca (Oryan et al., 1996; Soto-Blanco et al., 2006).

Intoxicações espontâneas foram registradas em gansos (Alfonso et al., 1984), asininos (Rezakani e Maham, 1992), bovinos (Rezakani e Maham, 1992; Pedroso et al., 2009), equinos (Hughes et al., 2002; Renier et al., 2013), ovinos (Aslani et al., 2004) e animais de companhia (Milewski e Khan, 2006). Em humanos, a intoxicação é decorrente da ingestão acidental, criminosa ou tentativa de suicídio (Shumaik et al., 1988; Wasfí et al., 2008; Papi et al., 2012; Khan et al., 2013b). Em humanos também existem relatos de lesões dérmicas causadas pelo extrato da planta (Dorsey, 1962; Bakali et al., 2010) e intoxicação sistêmica pelo contato com a seiva das folhas (Wojtyna e Eneleit, 2004).

Experimentalmente, os efeitos tóxicos da *N. oleander* também foram demonstrados em macacos (Schwartz et al., 1974), aves (Alfonso et al., 1984; Omidi et al., 2012), bovinos (Rezakani e Maham, 1992; Soto-Blanco et al., 2006; Pedroso et al., 2009), ovinos (Barbosa et

al., 2008), caprinos (Aslani et al., 2007), cobaios (Chowdhury et al., 2005), cães (Mesa Socha, 2011), coelhos (Al-Farwachi et al., 2008; Taheri et al., 2012) e ratos (Saliem, 2010; Abbasi et al., 2013; Akhtar et al., 2014).

3.6 Doses tóxicas

A dose tóxica varia de acordo com diferentes fatores, alguns ligados à planta, outros ao animal, como quantidade, parte da planta ingerida, concentração das toxinas, além de idade e saúde no momento da ingestão (Bandara et al., 2010; Papi et al., 2012).

Existe uma dificuldade na determinação da dose tóxica, pois experimentalmente há diferenças na produção dos extratos, nas vias de aplicação em modelos animais e na concentração administrada (Bandara et al., 2010). Alguns autores utilizam folhas secas (Adam et al., 2001), frescas (Barbosa et al., 2008) ou extratos aquosos (Altaee, 2010), por via oral (Taheri et al., 2012) ou subcutânea (Al-Farwachi et al., 2008), em dose única (Aslani et al., 2007) ou múltipla (Barbosa et al., 2008).

A dose média letal (DL₅₀) da *N. oleander*, assim como a meia-vida dos glicosídeos cardíacos ainda foram determinadas em todas as espécies afetadas. Doses de apenas 100g de folhas podem ser letais para seres humanos adultos (Bourgeois et al., 2005).

Experimentos concluíram que a dose de 110 mg/kg de folhas secas de oleander é letal para caprinos (Aslani et al., 2004). A dose letal para 50% dos animais (DL50) estimada para coelhos é de 157 mg/kg (Al-Farwachi et al., 2008). Bovinos vem a óbito com 0.5 a 1g/kg de folhas frescas (Pedroso et al., 2009) e a máxima dose tolerada de folhas frescas por ovinos foi estimada em 0,027 g/kg (Krychak, 1997).

3.7 Alterações eletrocardiográficas

As alterações eletrocardiográficas encontradas na intoxicação por *N. oleander* variam de acordo com a espécie e patologias prévias do paciente, assim como quantidade de folhas ingeridas e concentração dos princípios tóxicos (Bandara et al., 2010).

Segundo levantamento feito por Zamani e Aslani (2010), as arritmias mais prevalentes causadas por plantas ricas em cardenólídeos em ordem de frequência são: extrassístole ventricular, ritmo juncional, bloqueio atrioventricular de primeiro (1º) grau (BAV), bradicardia sinusal, BAV de segundo (2º) grau, parada sinusal, BAV de terceiro (3º) grau, fibrilação atrial, taquicardia ventricular e fibrilação ventricular. Em alguns casos humanos, nos quais foram realizadas ecocardiografias, nenhuma alteração significativa foi detectada (Senthilkumaran et al., 2011).

Em seres humanos são relatados bradicardia (Shumaik et al., 1988; Khan et al., 2013), taquicardia (Le Couter e Fisher, 2002), ritmo idioventricular (Haynes et al., 1985), inversão da onda P, BAVs de 1º (Khan et al., 2013), 2º e 3º graus (Camphausen et al., 2005), aumento da duração do complexo QRS, bloqueio de ramo esquerdo (Wojtyna e Enseleit, 2004), depressão do segmento ST (Le Couter e Fisher, 2002), parada sinusal, diminuição do segmento QT (Peymani et al., 2011), ritmo de escape juncional (Vallé et al., 2002) e flutter atrial (Kuçukdurmaz et al., 2012).

Segundo Rezhakani e Mahan (1992b), em bovinos, baixas doses produzem efeitos vagais predominantes, como bradicardia sinusal, bloqueios atrioventriculares e dissociação atrioventricular; enquanto doses maiores provocaram taquicardia sinusal, extrassístoles ventriculares, taquicardia e fibrilação ventriculares.

As principais alterações eletrocardiográficas por espécie animal já estudadas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Alterações eletrocardiográficas apresentadas por animais intoxicados acidentalmente ou experimentalmente por *N. oleander*.

Animais	Alterações eletrocardiográficas	Referências
Bovinos	Ausência de onda P, fibrilação atrial, BAV de 1º e 2º graus, dissociação atrioventricular, extrassístole ventricular e taquicardia ventricular	Rezhakani e Mahan, 1992a
Cães	Bradicardia sinusal, BAV de 2º grau intermitentes, taquicardia sinusal, taquicardia ventricular paroxística e complexos ventriculares prematuros	Mesa-Socha, 2011
Equino	BAV de 2º e 3º grau, dissociação atrioventricular, extrassístole ventricular, e taquicardia e fibrilação ventricular precedendo o óbito do paciente	Hughes et al., 2002, Renier et al., 2013
Aves	Bradicardia sinusal, BAV de 2º grau, extrassístoles ventriculares, arritmia sinusal, taquicardia ventricular e fibrilação ventricular.	Omidi et al., 2012
Ovinos	Bradicardia sinusal, arritmia sinusal, BAV de 1º e 2º graus, taquicardia sinusal, dissociação atrioventricular, depressão do segmento ST, extrassístoles ventriculares, taquicardia ventricular e fibrilação ventricular	Aslani et al., 2004
Caprinos	Bradicardia, bloqueio atrioventricular de segundo grau, taquicardia, extrassístoles ventriculares, taquicardia ventricular e fibrilação ventricular	Aslani et al., 2007; Barbosa et al., 2008

3.8 Sinais clínicos

O tempo entre a ingestão de *N. oleander* e o início dos sinais clínicos da intoxicação é variável (Bandara et al., 2010). Os glicosídeos da *N. oleander* produzem mais efeitos gastrointestinais que os da digoxina e os sinais clínicos usualmente surgem após algumas horas da intoxicação (Shumaiket al., 1988).

As alterações causadas afetam diversos sistemas: gastrointestinal, cardiovascular, renal, respiratório e neurológico (Saravanapavananthan e Ganeshamoorthy, 1988; Bandara et al., 2010). Os sinais clínicos relatados em humanos são: fala arrastada, sensação de formigamento e queimação na língua, pulso fraco e irregular (Haynes et al., 1985), irritação da mucosa oral, aumento da salivação, náusea, vômito, diarreia, dor abdominal, cefaleia, alteração do estado mental (Middleton et al., 1936), tontura (Shumaik et al., 1988), visão turva, diplopia, câimbras, palpitação (Peymani et al., 2011), anorexia, letargia (Le Couter e Fisher, 2002) e dor no peito (Kuçukdurmaz et al., 2012).

Segundo Caloni (2012), as principais alterações descritas em animais são: vômito (40%), taquicardia (20%), diarreia (20%) e parada respiratória (20%). Em bovinos são relatados anorexia, emagrecimento, icterícia, diarreia fétida e hemorrágica, dores abdominais, cegueira,

incoordenação, taquicardia (Minardi et al., 1982), tremores musculares, atonia ruminal, morte súbita (Mahin et al., 1984), fraqueza e depressão (Rezakhani e Mahan, 1992).

Segundo Krychak (1997), os animais podem vir a óbito após quatro ou 12 horas da intoxicação, alguns persistindo por até cinco dias. Relatos de alterações neurológicas tanto no homem quanto nos animais foram elucidadas pelas ações de alguns compostos capazes de atravessarem a barreira hematoencefálica e causarem depressão nervosa central (Siddiqui et al., 1997).

A intoxicação por *N. oleander* causa alterações sanguíneas muito semelhantes entre humanos e animais. Pode ocorrer hemoconcentração, leucocitose com neutrofilia, associada ao aumento de enzimas hepáticas, ureia, creatinina, potássio, queda de albumina e proteína total e aumento de enzimas cardíacas como creatinina fosfoquinase (CK) e sua fração MB (CK-MB) são alterações observadas no perfil bioquímico sérico (Adam et al., 2001; Smith et al., 2003; Wasfi et al., 2008; Al-Farwachi et al., 2008; Pedroso et al., 2009).

As principais alterações clínicas relatadas por espécie animal estudada estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Alterações clínicas apresentadas por animais intoxicados acidentalmente ou experimentalmente por *N. oleander*.

Animais	Sinais clínicos	Referências
Bovinos	Anorexia, emagrecimento, icterícia, diarreia fétida e hemorrágica, dores abdominais, cegueira, incoordenação, taquicardia, tremores musculares, atonia ruminal, morte súbita, fraqueza, depressão.	Minardi et al., 1982, Mahin et al., 1984; Rezakhani e Mahan, 1992
Caprinos	Apatia, cólica abdominal, vocalização, poliúria, distensão ruminal moderada, ranger de dentes, inquietação, polaciúria, diarreia, fraqueza, depressão, incoordenação, taquipneia, convulsão e óbito	Aslani et al., 2007; Barbosa et al., 2008.
Aves	Perda de equilíbrio, inquietação, depressão, dispneia, prostração, tremores, vômito, diarreia, distúrbios visuais, incoordenação motora, paralisia e morte súbita	Alfonso et al., 1984 e Omidi et al., 2012
Equinos	Inapetência, letargia, depressão, perda de peso, taquipneia, taquicardia, diarreia, ataxia, febre, diminuição da motilidade intestinal, palidez e congestão de mucosas	Hughes et al., 2002; Renier et al., 2013
Cães	Vômito, sialorreia, náusea, congestão da conjuntiva ocular, desidratação, dor abdominal, tremores, diarreia, tenesmo e inapetência	Mesa-Socha, 2011

3.9 Alterações anatomopatológicas

As alterações encontradas em casos de intoxicação por *N. oleander* não são patognomônicas e incluem achados no coração, fígado, rins, pulmões e trato gastrointestinal (Krychak, 1997). As principais alterações macroscópicas encontradas são hemorragias nos pulmões e coração, hidropericárdio (Krychak, 1997), ascite, congestão hepática, renal e do trato gastrointestinal (Aslani et al., 2004), além de coração flácido (Barbosa et al., 2008).

Em humanos que vieram a óbito, são descritos resíduos vegetais no conteúdo estomacal, hemorragia e erosão da mucosa gástrica, acompanhadas de degeneração gordurosa das células cardíacas e degeneração hepática (Papi et al., 2010).

As lesões cardíacas encontradas nas diferentes espécies são causadas direta e indiretamente pelos efeitos dos glicosídeos cardiotoxicos nos cardiomiócitos. O aumento do cálcio intracelular pode produzir efeitos citotóxicos que causam degeneração e necrose celular contribuindo para as lesões histopatológicas identificadas (Langford e Boor, 1996).

Microscopicamente podem ser vistos miocardite focal não purulenta, necrose de coagulação das fibras cardíacas, infiltrado mononuclear multifocal com vacuolização e extensas áreas de necrose no coração. No fígado há congestão difusa acentuada, necrose focal e hiperplasia dos ductos biliares; nos rins, presença de nefrite intersticial não purulenta focal e necrose de túbulos contornados; no trato gastrointestinal são descritas congestão difusa leve, enterite catarral e hemorrágica; e nos pulmões, enfisema focal (Minardi et al., 1982; Pedroso et al., 2009).

As principais alterações anatomopatológicas por espécie animal estudada estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Alterações anatomopatológicas apresentadas por animais intoxicados acidentalmente ou experimentalmente por *N. oleander*:

Animais	Alterações anatomopatológicas	Referências
Bovinos	Petéquias no coração, rins friáveis e pálidos, fígado congesto, baço friável e hiperêmico, congestão da mucosa do retículo e rúmen, com grande quantidade de folhas	Minardi et al., 1982; Pedroso et al., 2009
Caprinos	Congestão generalizada, degeneração dos túbulos renais, com depósitos de hemosiderina, necrose proximal e distal dos túbulos contorcidos e degeneração inicial de cardiomiócitos, além de necrose de coagulação das fibras cardíacas, degeneração gordurosa do fígado e congestão e edema no cérebro e pulmões	Aslani et al., 2007; Barbosa et al., 2008
Ovinos	Congestão, hidrotórax, hidropericárdio, ascite, hemorragias petequeiais no endocárdio e epicárdio, congestão renal, pulmonar e hepática. Microscopicamente há degeneração do miocárdio, com infiltrado mononuclear fagocitário e hemorragias focais; necrose hepática e renal, principalmente nos túbulos proximais e distais; além de edema perineural e perivascular no encéfalo	Aslani et al., 2004
Equinos	Ascite, múltiplas áreas de hemorragia no coração, com degeneração e necrose de cardiomiócitos, congestão pulmonar, necrose e infarto renal, acompanhado de depósitos minerais	Hughes et al., 2002

Coelhos	Degeneração de cardiomiócitos, necrose coagulativa, fragmentação das fibras cardíacas e perda de estriações. A avaliação microscópica dos pulmões mostrou pneumonia intersticial, hemorragia no espaço alveolar e perda de alvéolos	Taheri et al., 2012
Aves	Congestão e hemorragia no coração, fígado e pulmões. Microscopicamente há degeneração de células do miocárdio com hiperemia e hemorragia, congestão pulmonar difusa e edema pulmonar; congestão, hemorragia e necrose dos túbulos renais e necrose de coagulação hepática. No intestino é relatada congestão moderada e necrose multifocal dos enterócitos	Omidi et al., 2012
Ratos	Edema, congestão e proliferação endotelial do pulmão; necrose de coagulação no fígado; degeneração hidrópica dos túbulos renais, dilatação do espaço de Bowman; trombose cardíaca	Akhtar et al., 2014

Além de causar lesões cardíacas, a *N. oleander* afeta o leito endotelial vascular e induz inflamação aguda em diferentes órgãos. As lesões pulmonares podem ser provocadas pelo dano vascular endotelial e pela falência cardíaca aguda (Taheri et al., 2012).

As lesões renais são manifestadas por micção frequente e necrose tubular, sendo relacionadas à falência cardíaca aguda e à ação direta dos glicosídeos na NKA dos túbulos renais (Oryan et al., 1996; Barbosa et al., 2008). A diarreia e alterações gastrointestinais estão associadas ao efeito direto das saponinas ou dos glicosídeos nos nervos parassimpáticos e/ou na NKA local (Oryan et al., 1996). As lesões de sistema nervoso central são menos comuns, relacionados com a falência cardíaca aguda e à isquemia e hipóxia que ocorrem principalmente nos momentos que antecedem a morte dos animais e possivelmente pelo efeito direto na NKA (Krychak, 1997).

3.10 Métodos diagnósticos

O diagnóstico da intoxicação por *N. oleander* é facilitado por um histórico detalhado e cuidadoso, que inclui: descrição da planta, tempo desde o consumo, parte da planta ingerida, quantidade e tempo de aparecimento dos primeiros sinais clínicos. Os dados do histórico e do exame clínico devem ser sempre associados às anormalidades eletrocardiográficas para estabelecer um diagnóstico definitivo (Bandara et al., 2010).

Segundo Mahin et al. (1984), a intoxicação pode ser diagnosticada baseando-se na presença de folhas no material ingerido, na morte aguda dos animais, também podem ser vistas hemorragias subendocárdicas e digestivas, bem como no padrão de arritmias eletrocardiográficas, típico da toxicidade dos glicosídeos cardíacos.

Uma das técnicas laboratoriais mais usadas para o diagnóstico de intoxicação por *N. oleander* é o Imunoensaio de Fluorescência Polarizada. Esse teste se baseia na reatividade cruzada entre a digoxina e os demais compostos glicosídeos cardíacos, como a oleandrina. São mensurados os níveis séricos de digitálicos e estabelecido uma correlação com o de outros compostos (Haynes et al., 1985; Cheung et al., 1988; Shumaik et al., 1988).

Atualmente estão disponíveis técnicas analíticas envolvendo a Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A CCD é capaz de detectar a oleandrina na urina, plasma e conteúdo gastrointestinal (Galley et al., 1996). Apesar de a CLAE ser um método padrão para análise de cardenólidos, ainda hoje, muitos laboratórios não utilizam essa tecnologia (Wiegrobe e Witchl, 1993; Wasfi et al., 2008).

3.11 Potenciais tratamentos

Não existe tratamento específico para a intoxicação por *N. oleander*, mas alguns procedimentos se fazem necessários. O paciente deve ser monitorado constantemente, avaliando a pressão sanguínea, a função cardíaca e a saturação de oxigênio. Alguns testes devem ser realizados para o estabelecimento do prognóstico e conduta clínica, como: hemograma, concentração sérica de eletrólitos, com destaque para o íon potássio, função renal e nível sérico de cardenólídeos. Adicionalmente, é importante realizar eletrocardiografias seriadas (Bandara et al., 2010).

Em cães e gatos, o tratamento deve objetivar a descontaminação, por indução da êmese ou lavagem gástrica, administração de carvão ativado e catártico (Bandara et al., 2010). Também é importante a correção do desequilíbrio eletrolítico, correção da bradicardia e da disritmia ventricular. Drogas como a atropina, lidocaína, propranol, amiodarona, fentanil e epinefrina são compostos usados para reduzir os efeitos cardíacos de acordo com a arritmia predominante (Langford e Boor, 1996; Asghari et al., 2011). Em casos de arritmias graves pode ser feita a implantação de um marca-passo temporário (Zamani e Aslani, 2010).

Intoxicações graves muitas vezes são refratárias a tratamentos convencionais. Devido às similaridades de estrutura e farmacologia entre digoxina e glicosídeos encontrados na *N. oleander*, fragmentos Fab de anticorpos específicos contra a digoxina podem ser utilizados no tratamento da intoxicação aguda (Clark et al., 1991; Camphausen et al., 2005). Apesar de o anticorpo reduzir a fatalidade, é pouco usado em países em desenvolvimento devido ao seu alto custo e sua limitada disponibilidade (Eddleston et al., 1999).

3.12 Fisiologia do coração e atuação dos glicosídeos cardioativos

3.12.1 Funcionamento cardíaco

O sistema circulatório transporta e distribui substâncias essenciais, bem como remove subprodutos metabólicos atuando na manutenção do balanço de fluidos e no fornecimento de oxigênio e nutrientes sob vários estados fisiológicos (Berny e Levy, 2009). O coração atua como uma bomba proporcionando o deslocamento de sangue ao longo da sequência de vasos sanguíneos, atingindo todos os tecidos do corpo (Constanzo, 2005). O funcionamento normal do coração de mamíferos depende de uma adequada função elétrica, refletida em ativação sequencial de células em regiões especializadas do coração, conhecidas como “marca-passo” e da propagação desta atividade através dos ventrículos (Nerbonne e Kass, 2005).

A atividade elétrica do miocárdio é atribuída à geração de potenciais de ação em células cardíacas individualizadas, e sua coordenação funcional elétrica normal como um todo é prontamente detectada pelo eletrocardiograma. A geração dos potenciais de ação do miocárdio é determinada pela atividade de canais iônicos que participam dos processos de despolarização e repolarização da membrana citoplasmática. Mudanças nas propriedades desses canais podem levar a alterações na forma de onda do potencial de ação (PA), sincronização e/ou propagação dos impulsos elétricos, predispondo assim o coração a arritmias potencialmente letais (Nerbonne e Kass, 2005).

A origem do impulso elétrico no coração ocorre em células com propriedades biofísicas autoexcitatórias encontradas em região específica no átrio direito, conhecida como nó sinoatrial (nó SA). O estímulo elétrico é então conduzido por todo o miocárdio (Figura 2) em sequência espacial e temporalmente definida, por meio das junções comunicantes encontradas célula a célula no tecido cardíaco, as quais são poros que comunicam a membrana lateral de dois cardiomiócitos consecutivos, permitindo de forma não seletiva a passagem de pequenas moléculas e íons (Nerbonne e Kass, 2005).

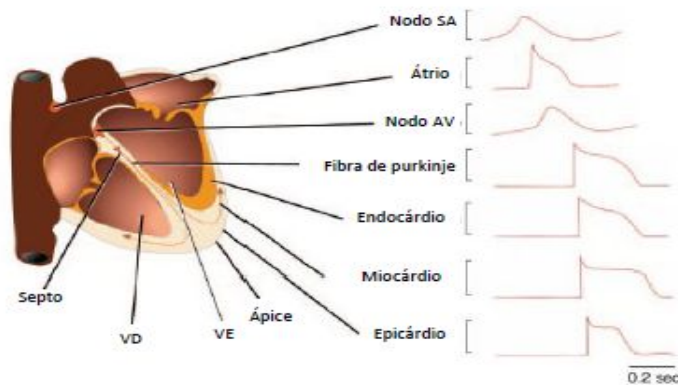


Figura 2: Atividade elétrica no tecido cardíaco (Nerbonne e Kass, 2005).

Ondas de despolarização iniciadas no nó SA propagam pelo nó atrioventricular (NAV) e quando atingem um cardiomiócito, promovem a abertura de canais de sódio voltagem dependentes, processo que resulta em rápida despolarização do potencial transmembrana. De forma inerente, esses canais assumem então uma conformação não condutora, importante fator que limita o influxo de íons sódio (Na^+). A despolarização da membrana é também determinante para a abertura dos canais para potássio e cálcio voltagem dependentes. Entretanto, os canais para potássio e cálcio tem sua ativação em potenciais mais despolarizados em relação á ativação dos canais de sódio. Concomitante ao processo de inativação dos canais de sódio ocorre a abertura dos canais de potássio dependentes de voltagem, principal componente iônico responsável pela repolarização do potencial de membrana. O potencial de ação cardíaco, entretanto, apresenta uma fase de platô durante a repolarização, atribuída ao influxo de íons cálcio (Ca^{2+}) por canais voltagem dependentes para Ca^{2+} (Bers e Despa, 2006).

Após a inativação da corrente de Na^+ , concorrente com o efluxo de íons K^+ , a repolarização do potencial de membrana é então concluída. Entretanto, a corrente de Ca^{2+} associada ao PA é um importante fator que acopla a excitabilidade celular com sua contração (Bers 2002). Os canais de cálcio estão preferencialmente localizados nos sistemas de túbulos T, os quais estão espacialmente associados ao retículo sarcoplasmático (RS). Essas estruturas contêm aglomerados de canais iônicos ativados por cálcio e seletivos ao cálcio denominados receptores de rianodina (RyRs, do inglês *ryanodine receptors*). A ativação dos RyRs pelo influxo de cálcio induz a liberação do estoque de cálcio contidos no lúmen do RS, evento conhecido como liberação de cálcio induzida por cálcio (CICR, do inglês, *calcium-induced calcium release*), o que provoca um aumento transiente na concentração citoplasmática de cálcio. A ligação do cálcio à troponina C (cTnC) finalmente possibilita a interação entre filamentos grossos e finos de actina e miosina, o que sustenta a contração celular nas células musculares cardíaca e esquelética (Fabiato, 1983; Berny e Levy, 2009; Mudd e Kass, 2008). Esse acoplamento entre a excitabilidade e a contração celular é conhecido como acoplamento excitação contração (Bers, 2002) (Figura 3).

Para que o relaxamento ocorra torna-se necessária a retirada do Ca^{2+} do citosol, com a participação da Ca^{2+} ATPase do RS (SERCA, do inglês *Sarco-Endoplasmic reticulum calcium*) que faz a recaptção de cálcio para o próprio RS, trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX, do inglês *sodium calcium exchanger*), Ca^{2+} ATPase sarcolemal e pelo transportador de cálcio mitocondrial (Figura 3). O trocador transporta um Ca^{2+} em troca de três íons Na^+ . O excesso de sódio [Na^+] intracelular é então retirado pela bomba NKA, para manutenção do gradiente eletroquímico desse íon. Quando os níveis de Na^+ estão elevados (como no bloqueio exercido pelos glicosídeos cardioativos), o influxo de cálcio pela NCX aumenta excessivamente. Esse aumento de Ca^{2+} intracelular e no SR resulta em aumento da contratilidade (inotropismo positivo) (Bers e Despa, 2006).

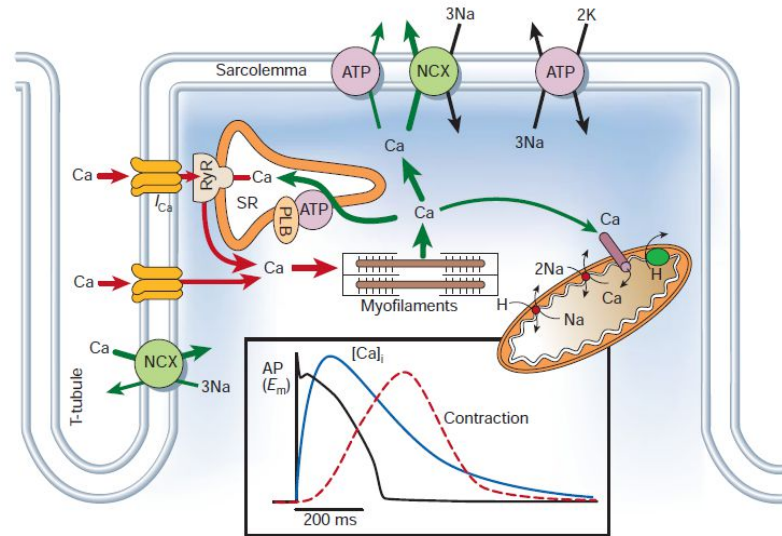


Figura 3: Dinâmica de cálcio nos cardiomiócitos ventriculares (Bers e Despa, 2006).

3.12.2 Funcionamento da bomba de NKA no coração e atividade dos glicosídeos cardioativos

Em 1957, Jens Christian Skou publicou o primeiro artigo que descrevia a descoberta da bomba NKA (Skou e Hoffman, 1957). Seu trabalho foi reconhecido em 1997 com o Prêmio Nobel de Química e abriu porta para incontáveis pesquisas. Essa enzima é uma proteína tipo T ubíqua, que por meio da hidrólise do ATP exporta três íons Na^+ e internaliza dois íons K^+ contra seu gradiente eletroquímico. Trabalhos que se seguiram determinaram que a bomba é primordial para o transporte ativo da membrana plasmática de células eucarióticas, além de ser alvo molecular dos glicosídeos cardioativos. A bomba é responsável por múltiplos mecanismos regulatórios essenciais para os tecidos onde é expressada, com destaque para o músculo cardíaco onde participa do controle da contração celular (Fuller et al., 2013).

Sua estrutura quaternária é formada por subunidades: α , β , γ e pela proteína FXYP. Existem quatro isoformas da subunidade α , três da β e sete proteínas FXYP (Geering, 1991; Sweadner e Rael, 2000; Karlsh et al., 2008), que teoricamente podem se agrupar formando cem diferentes tipos de bombas com atividades fisiopatológicas distintas (Fuller et al., 2013). No músculo cardíaco, predominam a isoforma α -1, α -2 e β -1. É a subunidade α o sítio catalítico da enzima, com locais de ligação para o Na^+ , K^+ e glicosídeos cardioativos (James et al., 1999).

Em tecidos excitáveis, a atividade da bomba é vital para manutenção da atividade elétrica e gradiente iônico. No músculo cardíaco, o gradiente de Na^+ estabelecido pela bomba não apenas gera uma rápida alteração no potencial de ação celular como também está associado a vários trocadores e transportadores essenciais para funcionamento celular normal, homeostase iônica e controle do volume celular (Tabela 4).

Tabela 4: Transportadores plasmáticos de mamíferos que dependem do gradiente transmembrana de sódio estabelecido pela atividade da bomba NKA. Adaptado de Shattock, 2009.

Transportadores Iônicos	Substratos	Aminoácidos	Outros
Canal de Na	Co-transportador Na/glicose	Co-transportador Na/Cl/taurina	Co-transportador Na/ascorbato
Trocador Na/Ca	Co-transportador Na-manose	Trocador Na/glutamato/K	Co-transportador Na/succinato
Trocador Na/H		Co-transportador Na/alanina	Co-transportador Na/citrato
Co-transportador Na/K/Cl		Co-transportador Na/Cl/GABA	Co-transportador Na/lactato
Co-transportador Na/HCO ₃		Co-transportador Na/Cl/prolina	Co-transportador Na/Cl/dopamina
Co-transportador Na/I		Co-transportador Na/arginina	Co-transportador Na/Cl/noradrenalina
		Trocador Na/glutamina/H	Trocador Na/Cl/serotonina

Alterações nessa interação entre a bomba e o NCX no coração são causas comuns de anormalidades na contração e falência cardíaca. Intervenções na bomba ou indiretamente na concentração de Na²⁺ intracelular afetam profundamente a função cardíaca (Fuller *et al.*, 2013). Nesse âmbito, os glicosídeos presentes na *N. oleander* são implicados na inibição da bomba NKA (Langford e Boor, 1996), que pode ser encontrada nos rins, endotélio, epitélio alveolar, jejuno, epitélio ciliar, encéfalo e principalmente no sarcolema de células cardíacas (Zhang et al., 2013). Em consequência do possível bloqueio, há um aumento do Na⁺ intracelular e aumento dos níveis séricos de K⁺ (Langford e Boor, 1996).

O aumento do Na⁺ intracelular afeta o NCX impedindo a saída do Ca²⁺ da célula. O acúmulo desse íon faz com que ele esteja disponível para interagir com os elementos contráteis da célula, impedindo o relaxamento do músculo cardíaco, fenômeno conhecido como efeito inotrópico positivo (Langer, 1981; Langford e Boor, 1996) (Figura 4).

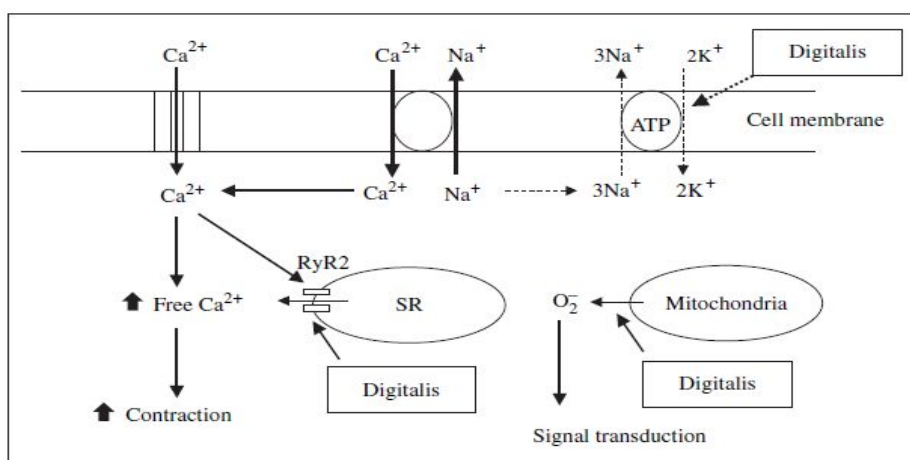


Figura 4: Mecanismo de ação conhecido dos digitálicos (Adaptado de Demiryurek e Demiryurek, 2005).

Essas alterações culminam na elevação sérica de K^+ . Em casos de intoxicação aguda, o grau de hipercalemia está diretamente correlacionado com a gravidade da intoxicação (Haynes et al., 1985). Os distúrbios iônicos causam alteração no potencial de repouso da membrana celular, com conseqüente aumento da frequência de despolarização cardíaca espontânea e automaticidade miocárdica o que pode resultar em batimentos ectópicos e/ou taquiarritmias sustentadas (Langer, 1981; Haynes et al., 1985). As lesões citotóxicas no miocárdio também podem ter participação no desenvolvimento das arritmias. Mecanismos causadores da cardiomiopatia em casos de intoxicação por *N. oleander* não são totalmente conhecidos, mas a elevação citoplasmática de Ca^{2+} pode levar à ativação de fosfolipases e proteases intracelulares que então causam degradação fosfolipídica e danos ao citoesqueleto dos cardiomiócitos (Bers e Despa, 2006).

Existem hoje vários métodos que analisam potenciais alterações da fisiologia cardiovascular. A perfusão de corações de mamíferos isolados foi estabelecida em 1897 por Oscar Langendorff e contribuiu significativamente para importantes descobertas da fisiologia cardíaca básica. Esse método foi modificado ao longo dos anos, mas seu princípio se mantém até hoje. O coração é perfundido por sangue ou solução cristalóide por meio de uma cânula inserida na aorta ascendente, com controle de fluxo e pressão. O fluxo retrógrado da aorta fecha os folhetos da válvula aórtica e mantém o fluxo para as artérias coronárias que irrigam o tecido cardíaco. A simplicidade da preparação associada às diferentes avaliações que o método permite fazer, sua alta reprodutibilidade e baixo custo relativo, o transformam em uma ferramenta útil para o estudo da fisiologia cardiovascular (Skrzypiec-Spring et al., 2007).

A técnica de *patch clamp* foi desenvolvida no fim dos anos 1970, marcando um novo período experimental para eletrofisiologia cardíaca, permitindo a mensuração de correntes iônicas em cardiomiócitos isolados até os níveis de canais iônicos. Desde então a técnica foi sensivelmente melhorada para desenvolver modificações positivas com novos dados, antes não disponíveis (Bébarová, 2012).

3.12.3 Balanço Autonômico

Além de provocarem efeito inotrópico positivo direto, os glicosídeos também podem afetar o coração através de sua ação parassimpatomimética e simpaticomimética no nó sinoatrial e na junção atrioventricular (Demiryurek e Demiryurek, 2005). Segundo Pentel e Salerno (1990), o aumento dos tônus vagal e simpático é possivelmente devido às ações dos glicosídeos na área do pedúnculo cerebral. O aumento principal do tônus vagal diminui o ritmo sinusal, a condução elétrica e a frequência cardíaca (FC), aumentando a capacidade refratária dos tecidos atrioventricular e juncional; enquanto o estímulo ao tônus simpático aumenta a automaticidade cardíaca.

As fibras parassimpáticas se originam na medula oblonga em células do núcleo motor do vago, percorrem o pescoço próximo aos grandes vasos e fazem sinapse com neurônios pós-ganglionares na superfície cardíaca ou no epicárdio, exercendo influência direta no tecido do NSA e NAV. As vias simpáticas se originam nas colunas intermediolaterais da medula torácica e nos dois últimos segmentos da medula cervical. As fibras pós-ganglionares chegam à base do coração e liberam noradrenalina (NO), que age de maneira oposta à acetilcolina (Ach) (Berne e Levy, 2009).

Condições como posicionamento, estresse e exercício estão associadas ao aumento do tônus simpático enquanto o tônus vagal está aumentado em condições de repouso. Em pacientes saudáveis, ambos os tônus flutuam ao longo do dia (Goldeberger, 1999). Na maioria das situações fisiológicas, a ativação do tônus simpático ou parassimpático é acompanhada pela inibição do outro (Malliani, 1999).

A Ach é armazenada em vesículas e liberada mediante estímulo parassimpático, ativando primariamente receptores muscarínicos pós-sinápticos e nicotínicos pré-ganglionares. Os efeitos são terminados rapidamente pelo efeito degradador da acetilcolinesterase. O aumento do estímulo parassimpático diminui a FC por meio da redução das descargas elétricas no SA e

da velocidade de condução AV. No ventrículo, o principal receptor é o M2, que está intimamente ligado à proteína Gi, inibidora da adenilato ciclase. A ativação desse receptor por acetilcolina diminui a produção de cAMP reduzindo consequentemente a contratilidade cardíaca (Vaseghi e Shivkumar, 2008; Berne e Levy, 2009).

O aumento do estímulo simpático aumenta a descarga do NSA e a condução do NAV, levando ao aumento da FC e contratilidade atrioventricular. As alterações são mediadas pelos receptores pós-sinápticos β -adrenérgicos. Esses receptores estão abundantes no coração, e exercem efeitos cronotrópicos, dromotrópicos e inotrópicos. A NO se liga aos receptores β , que estão conectados à adenilato ciclase, estimulando a proteína Gs, promovendo o aumento do mensageiro secundário cAMP. Níveis elevados de cAMP ativam a proteína quinase A (PKA), que fosforila canais de sódio tipo L, aumentando o influxo de cálcio nos cardiomiócitos, ativando o acoplamento excitação-contração descrito por Bers e Despa, 2006 (Vaseghi e Shivkumar, 2008; Berne e Levy, 2009).

A análise da FC emergiu como a técnica prevalente para avaliação das influências autonômicas no coração (Goldeberger, 1999). A utilização de antagonistas farmacológicos de ambas as vias ajudam a elucidar sua ação. A administração de atropina (antagonista muscarínico) promove o aumento da FC enquanto a administração do metoprolol (bloqueador beta-adrenérgico) diminui a FC. Quando ambos são administrados em sequência, tem-se o duplo bloqueio, ou bloqueio autonômico completo, resultando na frequência cardíaca intrínseca do marca-passo cardíaco (FIMC) (Berne e Levy, 2009). Quando prevalece o efeito vagal, a FC é inferior à FIMC; quando predomina o simpático, a FC é superior à FIMC. Logo, o efeito simpático-vagal é definido pela relação entre intervalos R-R durante os bloqueios autonômicos (ISV) (Goldeberger, 1999).

O *link* funcional entre os sistemas adrenérgico e os inibidores da bomba NKA é bem estabelecido, mas as consequências funcionais dessa conexão ainda são controversas. Nas últimas décadas tem sido reconhecido o papel do sistema nervoso autônomo na mortalidade devido a problemas cardiovasculares, mostrando associação do risco de desenvolvimento de arritmias letais ao aumento da atividade simpática e/ou diminuição da parassimpática (Vaseghi e Shivkumar, 2008).

Considerando a gravidade da intoxicação, associada à indução de arritmias letais e à grande difusão da *N. oleander* nos jardins e parques dos centros urbanos, sua alta toxidez e os vários casos de intoxicação descritos em todo o mundo e em várias espécies, faz necessário o estudo da cinética de distribuição dos seus princípios ativos em diferentes tecidos e o melhor entendimento da sua cardiotoxicidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Experimento 1. Efeitos *in vivo* do extrato de *N. oleander* sobre a função cardíaca de cobaias

4.1.1 Animais e extratos

Todos os animais utilizados nesse experimento foram conduzidos na experimentação atendendo aos princípios éticos, respeitando o bem estar e minimizando o desconforto. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso dos Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), protocolo nº216/2014 (Anexo 1).

Os cobaias, machos adultos da espécie *Cavia porcellus*, com peso entre 600 e 900g provenientes de um criatório comercial situado no município de Igarapé, MG, foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Clínica e Cirurgia da EV-UFMG recebendo água e ração *ad libitum* sob condições ambientais controladas, em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, em temperatura de 25°C.

As folhas da *N. oleander* variedade branca foram coletadas no canteiro de plantas tóxicas da EV-UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil. Folhas frescas foram limpas e secas em estufa a 60°C por 48h. Em seguida trituradas e extraídas com solução etanol: água (1:1),

permanecendo em banho-maria e banho ultrassônico por 20 minutos (Adaptado de Karawya et al., 1973; Calderon-Montaña et al., 2013). O etanol foi eliminado com evaporador rotatório a vácuo, e a solução aquosa ressuspensa foi utilizada no experimento. Essa solução foi analisada por técnica de HPLC/MS adaptada de Wiegbre e Witchl (1992), para determinação da concentração de oleandrina no extrato final.

4.1.2 Administração do extrato e grupos experimentais

Trinta e seis cobaios (*Cavia porcellus*) foram mantidos durante todo o experimento no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Clínica e Cirurgia da EV-UFGM, sendo submetidos ao jejum alimentar nas 12 horas que antecederam o experimento (Figura 5).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (G) experimentais (n=12), recebendo por gavagem os seguintes tratamentos: G1 (OLE 150) e G2 (OLE 300) 150 e 300mg/kg de extrato de *N. oleander* diluídos em 3mL de água ultrapura. O G3 (CON) recebeu apenas 3ml de água ultrapura funcionando como grupo controle. Os animais foram monitorados e a eutanásia dos sobreviventes foi feita três horas após a administração inicial do extrato.

4.1.3 Exame eletrocardiográfico

Os animais foram avaliados por eletrocardiograma (ECG) (Eletrocardiógrafo ECGPCVVET- Tecnologia Eletrônica Brasileira S.A) no tempo zero (antes da administração do extrato) e de forma ininterrupta após a intoxicação inicial até o momento do óbito ou eutanásia. Os animais foram tricotomizados e dispostos em posição supinada e eletrodos dispostos de acordo com Tilley (1992) (Figura 6). Gravações foram feitas nas derivações pré-cordiais (I, II, III, avL, avF, avR) e analisadas na derivação II (DII), na velocidade de 50 mm/s, com amplitude de 2N, nos animais conscientes.

Os tempos estudados foram divididos em tempo zero- análise prévia; tempo 1- entre 0 e 45 min após início da intoxicação; tempo 2- entre 45 e 90min; depois da intoxicação; tempo 3- entre 90 e 135 min após a intoxicação; tempo 4- entre 135 e 180min depois da intoxicação. Foram contabilizadas as alterações predominantes em cada trecho analisado.

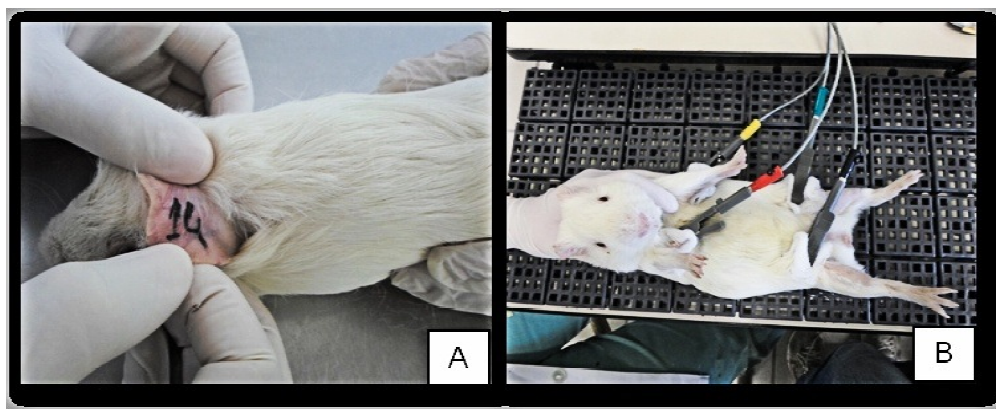


Figura 5. A- Imagem da identificação dos cobaios. B- Imagem do posicionamento eletrocardiográfico.

4.1.4 Dosagem da glicose

A dosagem sanguínea de glicose foi realizada antes da administração do extrato de *Nerium oleander* (Tempo 0), e 60 minutos após a administração do extrato (Tempo 1). O sangue foi colhido da veia marginal da orelha dos cobaios sem garroteamento. Uma única gota de sangue total foi utilizada para avaliação direta da glicose imediatamente após a coleta, por intermédio de analisador portátil (Optium™ Xceed™/Optium Xceed Diabetes Monitoring System).

4.1.5 Avaliações bioquímicas

Para as avaliações bioquímicas, o sangue obtido punção da veia jugular nos tempos 0 e 3h após a administração do extrato. Os animais que vieram a óbito durante o período de monitoração tiveram amostras coletadas imediatamente antes de apresentarem parada cardio-respiratória. O sangue foi acondicionado em tubos plásticos sem anticoagulante e centrifugado a 3.000 rpm durante cinco minutos (Figura 6). O soro obtido foi utilizado para determinações das concentrações de CK-MB e cTnI, pelo método de quimioluminescência automatizada no equipamento Immulite® 2000 XPi da Siemens. Os limites de detecção foram 0,2 a 500ng/mL para CK-MB e 0,2 a 180ng/mL para cTnI.

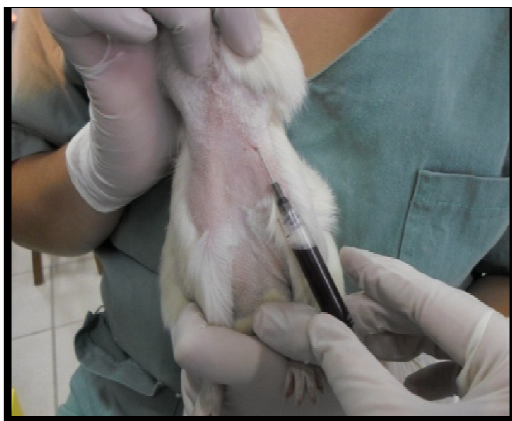


Figura 6: Imagem da coleta de sangue por punção da veia jugular de cobaias.

4.1.6 Avaliação macro e microscópica

A eutanásia foi feita com administração de tiopental na dose de 150mg/kg por via intraperitoneal três horas após a administração do extrato e então, realizada a necropsia. Foram obtidos fragmentos do coração, rins, fígado, cérebro e pulmões, fixados em formol 10% e processados por técnica rotineira de inclusão em parafina.

Os cortes e as etapas de preparação e colorações foram realizados no Laboratório de Patologia Animal da UFMG. Cortes histológicos de 4µm de espessura foram feitos nos tecidos amostrados e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). As avaliações dos cortes foram realizadas de forma seriada e randomizada sem o conhecimento do grupo de tratamento instituído.

4.1.7 Avaliação ultraestrutural do tecido cardíaco

Amostras de cerca de 1 mm de espessura do ventrículo esquerdo foram encaminhadas para avaliação de microscopia eletrônica no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI-ICB/UFMG) e no Centro de Microscopia da UFMG (CM-UFMG), fixadas em glutaraldeído a 2% mantidas em tampão fosfato 1,5M sob congelamento até o momento do uso.

4.1.8 Quantificação da oleandrina nos tecidos

Amostras de tecido obtidas do coração (ápice), fígado (lobo direito), rim (polo inferior direito) e cérebro (hemisfério direito) foram separadas para quantificação da oleandrina. As amostras de tecido foram pesadas em uma balança analítica e 5mg de cada tecido coletado foi congelado a -20°C. O material foi descongelado, homogeneizado e extraído de acordo com o método de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*).

O padrão de oleandrina da Sigma® foi diluído em 1,5 mL de acetato de etila em um frasco de vidro. A solução foi injetada em cartucho de C18 (Spe-ed SPE Cartridges Octadecyl C18/18% 500mg 6mL-1, Applied Separations, Allentown, PA, EUA). Os cartuchos foram previamente condicionados (2x2mL de metanol e 2x2mL de água). Após a passagem do sobrenadante, os cartuchos foram lavados com 2mL de água, e a extração dos compostos retidos

na resina foi realizada com metanol (2x1 mL). A análise cromatográfica da oleandrina foi realizada em sistema LC-MS/MS Triple Quad 5500 (Shimadzu, Kyoto, Japão), utilizando acetonitrila:água (50:50) como fase móvel, fluxo de 0,9ml min⁻¹, e coluna Supleco C18 (15cm x 4.6mm, 5µm). A detecção foi feita a 225nm. As análises foram realizadas no Lanagro (Laboratório Nacional Agropecuário) vinculado ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) em Pedro Leopoldo, MG.

4.1.9 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. A glicemia foi comparada pela ANOVA e teste de Tukey, e a comparação entre os tempos do mesmo grupo pelo teste T pareado. As enzimas CK-MB e cTnI foram analisadas pelo teste T não pareado, com correção pelo teste de Welch, devido à pouca quantidade de algumas amostras, impedindo o pareamento dos testes. As análises de ECG paramétricas foram realizadas através de ANOVA e comparação de médias pelo teste de Tukey. As variáveis não paramétricas do ECG (Pmvolt e ST-nível) foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Foram feitas análises estatísticas comparando todos os parâmetros encontrados: FC, Pseg, Pmvolt, PRmseg, QRSmseg, Rmvolt, QTmseg, QTc, Tmvolt. Os parâmetros FC e QTc foram considerados normais pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Os parâmetros Pseg, PRmseg, QRSmseg, Rmvolt, QTmseg, Tmvolt foram transformadas por log10 para normalização e feitas as ANOVAs com Teste de Tukey, p<0,05 de significância, para comparação de médias. As variáveis Pmvolt e STnível foram analisadas por testes não paramétricos, Kruskal-Wallis e Friedman, respectivamente. Análises histopatológicas e ultraestrutural foram descritivas e a cinética da oleandrina nos tecidos feita pelo teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas se p<0,05 (Sampaio, 1998). Os dados estão apresentados como média e respectivo desvio-padrão.

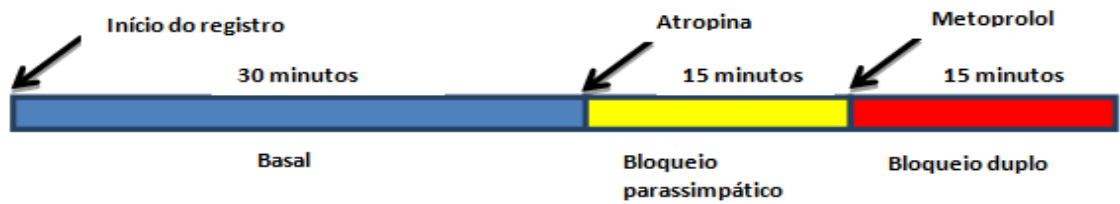
4.2 Experimento 2. Avaliação do balanço autonômico cardíaco de cobaios intoxicados com *N. oleander*

4.2.1 Administração do extrato e grupos experimentais

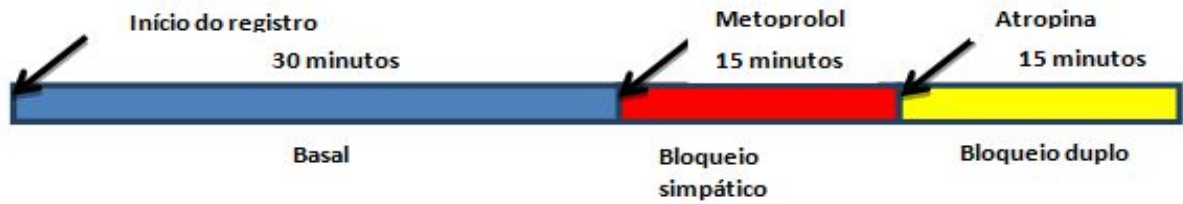
Foram utilizados 20 cobaios (*Cavia porcellus*) com peso entre 500 e 600g, provenientes criatório comercial situado no município de Igarapé, MG foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Clínica e Cirurgia da EV-UFGM recebendo água e ração *ad libitum* sob condições ambientais controladas, sendo privados de alimento nas 12 horas que antecederam o experimento.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=5). Os animais dos grupos controle (CON-AM – atropina/metoprolol e CON-MA- metoprolol/atropina) não receberam nenhum tipo de tratamento enquanto os animais dos grupos tratados (OLE-AM atropina/metoprolol e OLE-MA metoprolol/atropina) receberam 150mg/kg de extrato de *N. oleander* por via oral. Todos os animais foram pré-anestesiados com morfina 5mg/kg e mantidos sob anestesia inalatória com isoflurano a 2% para monitoração contínua com ECG (Eletrocardiógrafo ECGPCVVET- Tecnologia Eletrônica Brasileira S.A). Os animais foram inicialmente monitorizados por 30 minutos para estabelecimento dos parâmetros eletrocardiográficos basais. Os esquemas dos protocolos experimentais e da distribuição dos grupos estão apresentados na Figura 7 (A, B, C, D).

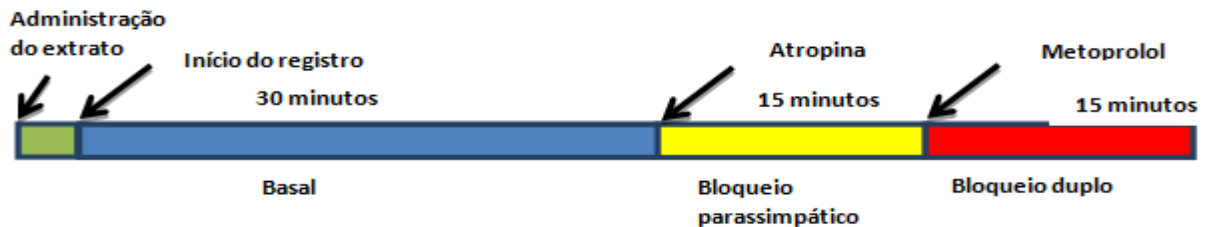
A-Grupo CON-AM



B- Grupo CON-MA



C-Grupo OLE-150-AM



D-Grupo OLE-150-MA

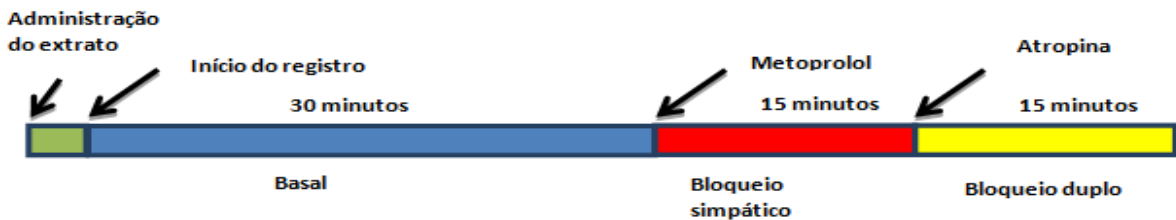


Figura 7: A- Esquema representativo da modulação no grupo CON-AM (recebeu primeiro atropina e depois metoprolol); B- Esquema representativo da modulação no grupo CON-MA (receberu primeiro metoprolol e depois atropina); C- Esquema representativo da modulação no grupo OLE-AM (grupo intoxicado com 150mg/g de extrato de *N. oleander* que recebeu primeiro atropina e depois metoprolol); D- Esquema representativo da modulação no grupo OLE-MA (grupo intoxicado com 150mg/g de extrato de *N. oleander* que recebeu primeiro metoprolol e depois atropina).

Em seguida, iniciaram-se os ensaios no intuito de avaliar a atividade tônica autonômica do extrato de *N. oleander* no coração por meio de bloqueios farmacológicos dos componentes autonômicos simpático e/ou parassimpático cardíacos de acordo com Martins (2007) e Brandólis (2009). Para tanto, parte dos animais recebeu após o período de registro basal, injeção intramuscular de atropina (0,2mg/kg) para bloqueio do ramo simpático do coração. Decorridos 15 minutos após a primeira injeção, foi administrado o metoprolol também por via intramuscular (2,0mg/kg) com o intuito de bloquear o ramo parassimpático do coração. O registro prosseguiu por mais 15 minutos onde se obteve os dados para a avaliação dos parâmetros cardiovasculares sem a interferência do sistema nervoso autonômico sobre o coração. A outra metade dos animais recebeu as mesmas drogas acima citadas, porém em ordem inversa, ou seja, primeiramente o metoprolol (2,0mg/kg IM) e 15 minutos depois a atropina (0,2 mg/kg IM). Com isso pode-se também avaliar os parâmetros cardiovasculares sob o bloqueio simpático ou parassimpático separadamente.

4.2.2 Análise da Frequência Cardíaca Média

A frequência cardíaca basal foi estabelecida a partir da média de três trechos representativos ao longo do tempo de monitoração. Para a análise do efeito parassimpático e simpático, foram avaliados três trechos representativos em intervalos de cinco minutos antes e depois da administração de cada fármaco (atropina ou metoprolol) para estabelecimento da FC média. Após a injeção da segunda droga trechos representativos em intervalos de cinco minutos também foram obtidos, onde foi determinado o valor da frequência intrínseca do marca-passo cardíaco (FIMC).

4.2.3 Análise do Índice Simpático Vagal (ISV)

O Índice Simpático Vagal foi calculado dividindo-se o valor da FC basal média pelo valor médio encontrado após o duplo bloqueio de cada grupo.

4.2.4 Análise do Tônus Autonômico Cardíaco

O tônus parassimpático foi quantificado subtraindo-se o valor da FC após o metoprolol do valor da FC intrínseca. Já o tônus simpático foi quantificado subtraindo-se o valor da FC intrínseca do valor da FC após a atropina.

4.2.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso e para cada variável foram determinados a média e o desvio-padrão. Foi realizada ANOVA e comparação das médias pelo teste de Tukey. Os dados da FC entre os diferentes momentos em cada grupo foram comparados de forma pareada, pelo teste de T. Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$ (Sampaio, 1998).

4.3 Experimento 3. Efeitos *in vitro* do extrato de *N. oleander* sobre cardiomiócitos isolados de camundongos

4.3.1 Preparação do coração isolado

Todos os experimentos *ex vivo* e *in vitro* foram realizados no Laboratório de Membranas Excitáveis (LAMEX) do ICB-UFMG. Camundongos adultos C57BL6 foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical, após injeção intraperitoneal de heparina 140UI, diluída em 100µL de solução salina. O tórax foi aberto e as cartilagens costais de ambos os lados foram rebatidas, expondo a cavidade torácica. Em seguida, foram seccionadas as veias cava inferior e superior, as artérias aorta e pulmonar, a traqueia, o esôfago e parte dos pulmões, retirando dessa forma o coração em bloco. Logo após, o coração foi colocado em uma placa de Petri com 100ml de solução tampão (ST) gelada (130mM NaCl, 1,0mM ácido láctico, 3,0mM ácido pirúvico, 25mM HEPES, 0,5mM MgCl₂, 0,33mM NaH₂PO₄, 22mM D-glicose, e 5µL de solução estoque de insulina a 100µg/ml, com pH em 7,4, com o objetivo de diminuir o metabolismo cardíaco). Na placa de Petri, todos os tecidos exceto o coração, foram removidos,

deixando à mostra o coto da aorta. O coração foi mantido em sistema Langendorff, perfundido por 3-5 minutos de solução sem cálcio contendo: 130mM NaCl, 5,4mM KCl, 0,5mM MgCl₂, 0,33mM NaH₂PO₄, 3,0mM piruvato, 22 mM glicose e 25 mM HEPES (pH mantido em 7,4) (Figura 8)

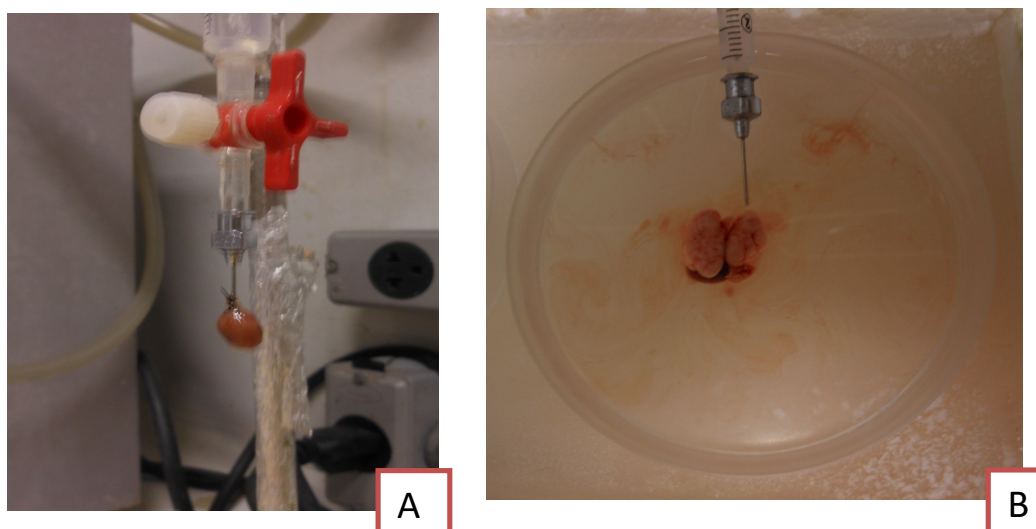


Figura 8: A- Imagem do acoplamento do coração via aorta na cânula do sistema Langendorff. B- Imagem do coração em bloco com os grandes vasos e os pulmões.

4.3.2 Isolamento dos cardiomiócitos

Para a obtenção de cardiomiócitos, foi utilizado o procedimento padrão para dissociação enzimática como descrito por Mitra e Morad (1985). O coração acoplado ao sistema Langendorff foi perfundido por 5 minutos com solução contendo 1,0mg/mL de colagenase tipo II (Worthington, NJ, USA), 0,17mg/mL protease tipo IX (Sigma®) e tripsina. O coração digerido foi removido da cânula e a região do ventrículo esquerdo foi separada e cortada em pequenos pedaços. Células isoladas por trituração mecânica foram mantidas em solução de Tyrode nutritora contendo: 140mM NaCl, 1,0mM MgCl₂, 10mM HEPES, 5,4mM KCl, 1,8mM CaCl, 10mM glicose. A solução foi ajustada para pH 7,4 com NaOH. Apenas células tolerantes ao cálcio, quiescentes, *rod-shaped* e com estriações evidentes foram estudadas. Os cardiomiócitos isolados foram usados por até 3-5 horas após a preparação.

4.3.3 Teste de viabilidade celular

Com o intuito de avaliar possível atenuação na viabilidade celular causada pelo extrato de *N. oleander*, os cardiomiócitos isolados foram submetidos ao teste de viabilidade após incubação com extrato na concentração de 0,3mg/mL. Foram utilizados 25μL da solução de células e 25μL de azul de Tripán (0,15%), que permaneceram incubados por 10 minutos. Em seguida, uma gota da suspensão foi colocada na Câmara de Neubauer e realizada a contagem percentual, sendo consideradas mortas (inviáveis) as células que incorporavam o corante e, vivas as que excluam o azul Tripán.

4.3.4 Análise da contratilidade

Após o processo de isolamento dos cardiomiócitos ventriculares, foram realizadas as técnicas de contratilidade celular por detecção de bordas, *patch clamp* e microscopia confocal. Para a análise da contratilidade celular, as células foram mantidas em placas em uma câmara acoplada a um microscópio invertido (Eclipse, TS 100, Nikon, Japão). Durante os experimentos, realizados em temperatura ambiente (25-30°C), as células foram mantidas em uma solução de Tyrode nutritora contendo: 140mM NaCl, 1,0 mM MgCl₂, 10mM HEPES, 5,4mM KCl, 1,8mM CaCl₂, 10mM glicose ajustada para pH 7,4 com NaOH. Os cardiomiócitos foram estimulados, por meio de um estimulador de campo conectado a um par de eletrodos de

platina imersos na câmara contendo as células, com pulsos de voltagem de 4ms de duração e intensidade de 80 V bifásico. A frequência de estimulação foi ajustada a 2Hz. As células foram visualizadas em um computador com uma câmera NTSC (MyoCamCCD100V, Ionoptix, Milton, MA, USA). As imagens captadas foram utilizadas para mensurar o encurtamento celular (índice de contratilidade) em resposta a um estímulo elétrico usando um sistema de vídeo detector de bordas (Ionoptix, Milton, MA, USA). A imagem foi obtida usando-se uma frequência de aquisição de 240Hz. O encurtamento celular foi calculado baseando-se na saída obtida no sistema de detecção de bordas do conversor IonWizard A/D (Ionoptix, Milton, MA, USA). Entre 8-16 contrações consecutivas foram utilizadas para realizar a média de contração de uma determinada célula. Os parâmetros avaliados foram: fração de encurtamento da célula cardíaca, presença de arritmias, velocidade máxima de contração e relaxamento, tempo para atingir a contração máxima (*time-to-peak*) e tempo a 50% do relaxamento.

4.3.5 Avaliação do potencial de ação pelo método de *Whole-cell patch-clamp*

Os registros eletrofisiológicos foram obtidos a partir de um amplificador de *patch clamp* (HEKA EPC9.2) na modalidade *whole-cell current-clamp* para obtenção dos registros de PA. Micropipetas de vidro foram utilizadas para permitir o contato das células com um eletrodo de prata inserido em seu interior. O eletrodo foi imerso em solução eletrolítica determinada e aproximado da célula de interesse com a ajuda de um micromanipulador. Após o contato entre a ponta da pipeta e a membrana plasmática dos cardiomiócitos, uma pequena sucção foi aplicada no interior da micropipeta por meio de um tubo conectado ao sistema e assim um selo elétrico foi formado entre o vidro e a membrana da célula, de modo que a resistência elétrica à passagem da corrente nesta determinada região de contato pipeta-célula atingisse valores na ordem de G Ω . Após a formação bem sucedida do selo inicial, uma segunda tensão foi aplicada a essas células para que o fragmento da membrana plasmática em contato com a abertura da pipeta (*patch*) se rompesse, mantendo, contudo o selo inicial formado entre a pipeta e a membrana, o que caracteriza o *whole-cell*. Dessa forma, foi possível aferir alterações no potencial de membrana aplicando-se pulsos elétricos de duração e amplitude controlada pelo eletrodo presente na pipeta, utilizando como referência um eletrodo imerso na solução da placa que banha a célula. Após o estabelecimento dessa configuração, as células foram mantidas em repouso por 3 minutos para que a solução da pipeta se equilibrasse com o meio intracelular. Durante esses experimentos foram utilizadas pipetas de vidro com resistências variando entre 1-2M Ω e células que apresentaram resistência em série maior que 8M Ω após o estabelecimento da configuração *Whole-cell* não foram utilizadas na análise.

Para a mensuração do PA nas células ventriculares isoladas, foi aplicado um pulso de 1000pA com duração de 3-5ms, com frequência de 1Hz, acompanhando então a variação da voltagem desenvolvida através da membrana. Após a estabilização do PA, cada célula foi perfundida com solução de Tyrode acrescida de solução de extrato de *N. oleander* nas concentrações de 0,1mg/mL, 0,3mg/mL, 1,0mg/mL e 10mg/mL estabelecidas por meio de um projeto piloto. Os PAs medidos durante esses experimentos foram adquiridos a uma frequência de amostragem de 10KHz, digitalizados e armazenados em um computador para análise das seguintes variáveis: potencial de repouso da membrana, amplitude do PA, tempo para repolarização do PA em 10%, 50% e 90% da repolarização e taxa máxima de despolarização.

4.3.6 Avaliação do bloqueio da bomba de NKA

Para esses registros foram utilizadas como soluções externas, a solução Tyrode (solução com potássio) e outra solução sem potássio na composição: 140nM NaCl, 1,0mM MgCl₂, 10mM hepes, 1,8mM CaCl₂, 10mM de glicose ajustada para pH 7,4. A composição da solução interna da pipeta foi: 20,0mM KCl (retirado na solução sem K⁺), 10,0mM HEPES, 5,0mM EGTA (ácido Bis(2-aminoetil) etilenoglicol- N,N,N',N'-tetracético), 130mM KOH, 130mM aspartate, 2,0mM MgCl, and 5,0mM NaCl; 2mM MgATP, 70nM TEA-Cl (cloreto de tetraetilamônio) ajustada para pH 7,2. Após o estabelecimento da configuração *Whole-cell* e

passado o período para o equilíbrio da solução de pipeta (3 min), as células foram mantidas no potencial inicial de -40mV durante todo o registro.

Cada célula foi perfundida com solução com e sem K^+ para avaliar a amplitude da corrente da bomba NKA (controle). Depois a mesma célula foi perfundida com solução externa com e sem K^+ acrescida do extrato de *N. oleander* na concentração de 0,3mg/mL. Como controle positivo, algumas células foram perfundidas com ouabaína na concentração de 50 μ M no lugar do extrato. Os registros foram adquiridos a uma frequência de amostragem de 5KHz e a corrente da bomba NKA (diferença da corrente entre a solução com e sem K^+) foi normalizada pela capacitância de cada célula e representada como densidade de corrente (A/F).

4.3.7 Análise do transiente de cálcio

Para medida dos transientes citoplasmáticos de cálcio evocados por estimulação de campo, as células foram marcadas com Fluo-4 em sua forma acetoximetil (AM) éster na concentração de 5,0 μ M por meio da incubação dos cardiomiócitos isolados por 30 minutos (temperatura ambiente) em solução de Tyrode protegida da exposição à luz e em leve agitação. As células foram então centrifugadas e ressuspendidas em solução de Tyrode, onde permaneceram por mais 10 minutos para desesterificação da forma AM éster. A solução estoque de 5,0mM de Fluo4 AM éster foi preparada em solução de DMSO. As mudanças no transiente de cálcio foram medidas por meio do método de microscopia confocal utilizando o sistema de microscopia confocal Zeiss LSM 510 meta (Zeiss, Alemanha). Para tanto, as células marcadas com Fluo4 AM éster e banhadas com solução de Tyrode foram depositadas em uma lamínula acoplada a uma placa contendo um par de eletrodos paralelos e imersos na solução através dos quais foi feita a excitação das células com uma frequência de 2Hz em pulsos de 4ms e 80 V bifásico. Foi incidida uma luz monocromática de 488nm obtida através de um laser de íons de argônio e a luz emitida durante a interação do fluoróforo (fluo-4 AM) com o cálcio foi transmitida para um detector do tipo tubo fotomultiplicador após passar por um filtro passa-alta de 505nm. A linha de varredura (fixada em 512 pixels) foi posicionada ao longo do eixo transversal dos cardiomiócitos evitando-se as regiões nucleares. A resolução espacial variou de 0,1 a 0,3 μ m/pixel e a resolução temporal utilizada foi de 1,92ms/linha para as medidas de $[Ca^{2+}]_i$. O tamanho do pinhole foi ajustado para 279 μ M, equivalente à uma fatia óptica < 2,0 μ m. As mudanças na fluorescência (F) foram normalizadas pela fluorescência basal (F0). Os dados foram registrados com a ajuda do *software* AIM 2009 (Zeiss, Alemanha) e analisados utilizando o *software* Image-J.

4.3.8 Análise estatística

As respostas obtidas através dos ensaios celulares foram expressos como média e erro padrão da média (E.P.M.). Após os testes de normalidade, os resultados foram analisados utilizando os testes de Wilcoxon pareado para comparar as medidas de duas amostras dependentes seguidas de Teste T, com o auxílio do programa Graph Pad Prism 5.0. Foi considerado como significativo um p com valor < 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção dos animais

A seleção dos cobaios (*Cavia porcellus*) como modelo experimental foi baseada em estudos anteriores que definem essa espécie como sensível aos glicosídeos cardioativos. Os cobaios apresentam reação a esses compostos cerca de 60 vezes mais intensa que os ratos (*Rattus norvegicus*), sendo então mais indicados para investigação desses agentes potencialmente inotrópicos (Tobin et al., 1972; Akera et al., 1979; Herzig e Mohr, 1984; Ebner et al., 1986). Os cobaios também são considerados modelos apropriados para estudos de eletrofisiologia e investigação farmacológica (Haynes et al., 1985; Hauser et al., 2005; Hansen et al., 2008; Morissette et al., 2013).

O modelo *in vivo* possui diversas vantagens, incluindo o baixo custo, o fácil manuseio, a reprodutibilidade e similaridade de expressão de diversas proteínas, incluindo canais iônicos, quando comparados a humanos (Akera et al., 1979). Estudos com outros glicosídeos, como a digoxina e ouabaina já foram realizados nessa espécie com sucesso (Lechat et al., 1984; Herzig et al., 1984).

Os animais foram uniformizados sendo utilizados apenas machos, com idade entre 4 e 5 meses e peso entre 600 e 900g, permitindo avaliação estatística adequada, reduzindo o número de variáveis que poderiam interferir nos resultados avaliados (Sampaio, 2007).

5.2 Preparação e dose do extrato das folhas de *Nerium oleander*

A utilização da *N. oleander* variedade de flor branca, se baseou em estudo anterior que determinou a semelhança no conteúdo de glicosídeos cardioativos presentes nas folhas das diferentes variedades (branca, rosa, vermelha) (Pedroza et al., 2014).

A extração realizada a partir das folhas da *N. oleander* foi descrita por outros autores com comprovada instalação de quadro clínico compatível com a intoxicação (Adam et al., 2001; Taheri et al., 2012; Calderón-Montaña et al., 2013). As folhas foram escolhidas pela sua disponibilidade para obtenção de quantidade suficiente para realização dos experimentos. Foi utilizado o método de extração descrito por Gayarhi et al. (2011) e Calderón-Montaña et al. (2013), que preservou os glicosídeos cardioativos presentes na *N. oleander*.

A escolha das doses foi baseada em estudos experimentais que utilizaram metodologia semelhante capaz de induzir lesão cardíaca importante em diferentes espécies animais (Krychak et al., 1997; Barbosa et al., 2008; Taheri et al., 2012). Um estudo piloto realizado por nossa equipe comprovou as afirmativas acima, observando-se que as doses de 150 e 300mg/kg foram adequadas para induzir o quadro clínico nos cobaios.

5.3 Avaliação clínica

Todos os animais que receberam o extrato de *N. oleander*, em ambas as doses, apresentaram sinais clínicos semelhantes que se iniciaram em média 40 minutos após a intoxicação, variando entre 20 e 60 minutos (Figuras 9 e 10). Um total de 13 animais vieram a óbito durante o decorrer do experimento devido á gravidade da intoxicação, o restante foi eutanasiado após 3 horas (Tabela 5), inclusive o grupo controle que não apresentou alterações clínicas.

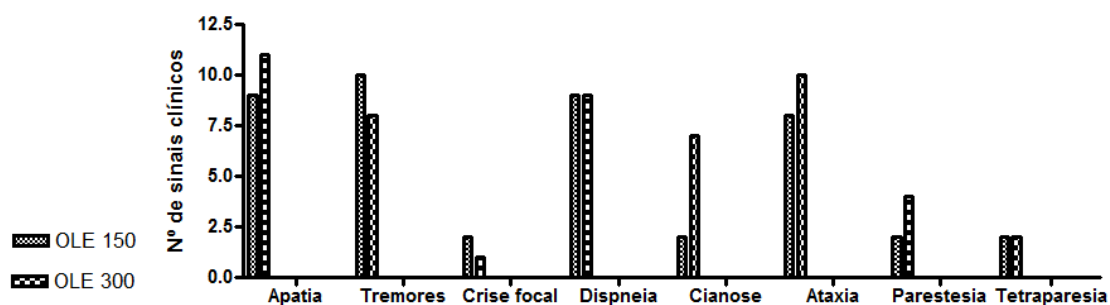


Figura 9: Número de animais que apresentaram sinais clínicos após a administração de 150 e 300mg/kg de extrato de *N. oleander* ao longo das três horas de experimento.

Tabela 5. Evolução clínica dos animais intoxicados após administração de diferentes doses de extrato de *N. oleander*.

Animais	Grupo	Tempo de evolução	Eutanásia	Óbito
1	OLE 150	3h	X	
2	OLE 150	2h e 25min		X
3	OLE 150	3h	X	
4	OLE 150	3h	X	
5	OLE 150	3h	X	
6	OLE 150	1h e 25min		X
7	OLE 150	3h	X	
8	OLE 150	3h	X	
9	OLE 150	3h	X	
10	OLE 150	2h e 10min		X
11	OLE 150	1h e 20min		X
12	OLE 150	3h	X	
1	OLE300	1h e 20min		X
2	OLE300	3h	X	
3	OLE300	3h	X	
4	OLE300	1h e 55min		X
5	OLE300	1h e 50min		X
6	OLE300	1h e 10min		X
7	OLE300	1h e 20min		X
8	OLE300	1h		X

9	OLE300	40min		X
10	OLE300	1h e 20min		X
11	OLE300	3h	X	
12	OLE300	2h e 20min		X
Subtotal	OLE 150		8	4
Subtotal	OLE 300		3	9
Total			11	13

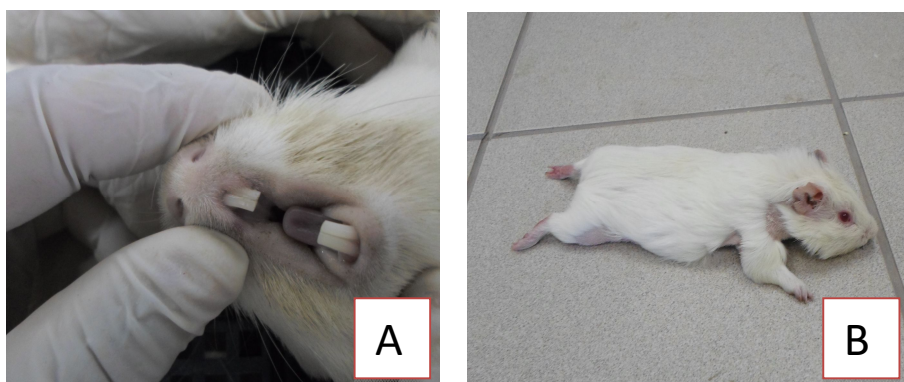


Figura 10: Animal intoxicado com 300mg/kg de extrato de *N. oleander* cerca de uma hora após a intoxicação A- Destaque para a cianose. B- Destaque para paresia de membros posteriores e apatia.

Esses resultados confirmam a evolução clínica aguda e o grande número de óbitos causados pela intoxicação por *N. oleander* encontrada por outros autores (Krychak, 1997; Pedroso et al., 2009; Omid et al., 2012). Pedroso et al., (2009) em estudo experimental com bovinos, relataram que os sinais clínicos se iniciaram após 30min da intoxicação evoluindo ao óbito em 62min, também de forma dose-dependente. Barbosa et al. (2008) estudando experimentalmente caprinos intoxicados com *N. oleander* descreveram que em média 92min após administração da sétima dose de extrato, todos os animais vem a óbito. Outros trabalhos descrevem alterações clínicas 4 horas após a ingestão da planta, culminando com óbito nas primeiras 24h (Haynes et al., 1985; Bourgeois et al., 2005; Page et al., 2014).

Sinais compatíveis com falência cardíaca como pulso fraco, alterações na frequência e ritmo cardíacos, acompanhados de dispneia e cianose podem ser vistos (Haynes et al., 1985; Bourgeois et al., 2005; Le Couter e Fisher et al., 2002). Sintomas digestivos podem ser comuns em intoxicações por plantas, inclusive pela *N. oleander* (Schwartz et al., 1974; Haynes et al., 1985; Moulssa et al., 2000; Le Couter e Fisher, 2002; Hughes et al., 2002; Bourgeois et al., 2005), mas em nossos estudos não foram encontradas alterações compatíveis com regurgitação e diarreia. A ausência desses sintomas pode ser atribuída ao tempo de jejum à qual os animais foram submetidos e ao fato de cobaias não apresentarem vômito (Wagner e Manning, 1976).

Os sinais neurológicos observados, ataxia, parestesia, depressão e tetraparesia já foram descritos anteriormente em outras espécies como consequência da intoxicação por *N. oleander*, de forma dose-dependente. Relatos descrevem sinais semelhantes aos encontrados no presente trabalho, como depressão intensa (Smith et al., 2003), inquietação, incoordenação, paralisia de membros, decúbito (Omid et al., 2012), inapetência (Hughes et al., 2002) e paresia de membros (Adam et al., 2001). Estudos farmacocinéticos em camundongos revelaram que a oleandrina pode ultrapassar a barreira hematoencefálica e se acumular no sistema nervoso central (Ni et al.,

2002). A ação da oleandrina e de outros compostos derivados da *N. oleander* no sistema nervoso dessa espécie já foram estudados, revelando depressão importante do SNC, acompanhada de diminuição da atividade locomotora, redução da resposta ao toque e ao som, ptose, perda de tônus, passividade e atividade miorelaxante (Sidiqqi et al., 1997; Rout et al., 2012).

5.4 Alterações eletrocardiográficas

Os ECGs realizados previamente à intoxicação não revelaram nenhuma alteração de ritmo e/ou condução nos animais dos grupos CON, OLE 150 e OLE 300. Foram considerados ritmos normais: ritmo sinusal normal (RSN), marca-passo migratório (MPM) com frequência cardíaca de $288,4 \pm 8,07$, como esperado para essa espécie.

Todos os animais intoxicados apresentaram sinais eletrocardiográficos da intoxicação por *N. oleander* durante o experimento. Os animais do grupo de OLE 300 apresentaram menor gama de alterações, mas maior intensidade e rapidez na evolução do quadro (Tabela 7). Todos os animais que vieram a óbito, de ambos os grupos, apresentaram na fase terminal fibrilação ventricular. As arritmias predominantes nos traçados dos grupos OLE 150 e OLE 300 são mostradas na Tabela 6 e as mais frequentes são mostradas na Figura 11.

Entre os achados eletrocardiográficos mais comuns foram encontrados: RSN= ritmo sinusal normal; MPM= marca-passo migratório; AS=arritmia sinusal; BS= bradicardia sinusal; TS= taquicardia sinusal; PS= parada sinusal; AE= alternância elétrica; BAV1= bloqueio atrioventricular de primeiro grau; BAV2= bloqueio atrioventricular de segundo grau; Supra ST= supradesnivelamento do segmento ST; ESSV= extrassístole supraventricular; TA= taquicardia atrial; ESV= extrassístole ventricular; TV= taquicardia ventricular; FV= fibrilação ventricular; Q prof= onda Q profunda; S prof= onda S profunda.

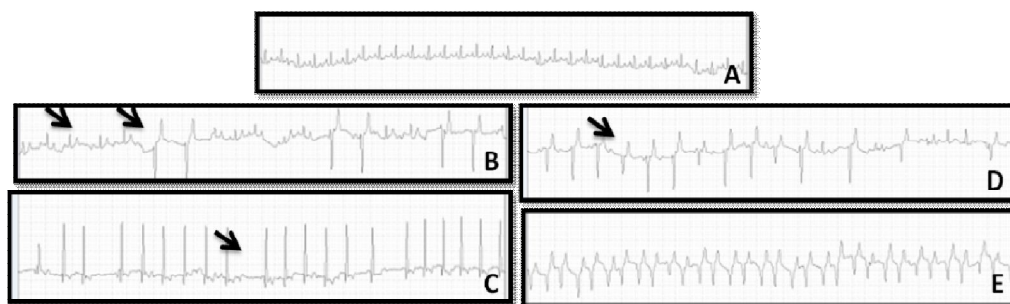


Figura 11. Distúrbios de ritmo e condução encontrados nos cobaios dos grupos intoxicados com 150mg/kg e 300mg/kg de extrato de *N. oleander*. A- RSN - animal do grupo controle; B- ESV pareadas monomórficas e aumento de onda T (OLE 150mg/kg); C- Bloqueio AV de primeiro grau (OLE 150mg/kg); D- Taquicardia ventricular monomórfica sustentada (OLE 300mg/kg); E- Fibrilação ventricular (OLE 300mg/kg). Gravações feitas na derivação II, com amplitude de 2N e 25mm/s.

Tabela 6. Alterações eletrocardiográficas de cobaias intoxicados com diferentes doses de extrato de *N. oleander* ao longo do tempo do experimento (T1, T2, T3 e T4).

Alterações	OLE 150	OLE 150	OLE150	OLE150	OLE300	OLE300	OLE300
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3
	(n=12)	(n=12)	(n=8)	(n=8)	(n=12)	(n=8)	(n=3)
RSN	9	9	4	3	6	3	2
MPM	4	4	4	2	5	0	1
AS	2	1	0	0	0	0	0
BS	6	6	2	0	1	1	1
TS	3	0	0	0	1	0	0
OS	2	2	1	1	1	2	2
AE	0	0	0	0	0	2	0
BAV1	6	8	5	1	2	2	2
BAV2	0	4	2	1	1	0	0
BAV3	0	1	0	0	0	0	0
Aumento T	6	3	4	2	1	0	0
Inversão P	1	0	0	0	0	0	0
ESSV	6	7	2	2	6	2	4
TA	0	2	1	1	1	1	0
ESV	12	9	4	1	8	4	3
TV	8	5	1	1	3	3	1
FV	0	4	4	0	4	5	0
Q prof	1	1	0	0	1	1	2
S prof	1	1	1	0	0	0	0
Total	67	67	35	15	41	26	18

(RSN= ritmo sinusal normal; MPM= marca-passo migratório; AS=arritmia sinusal; BS= bradicardia sinusal; TS= taquicardia sinusal; PS= parada sinusal; AE= alternância elétrica; BAV1= bloqueio atrioventricular de primeiro grau; BAV2= bloqueio atrioventricular de segundo grau; Supra ST= supradesnívelamento do segmento ST; ESSV= extrassístole supraventricular; TA= taquicardia atrial; ESV= extrassístole ventricular; TV= taquicardia ventricular; FV= fibrilação ventricular; Q prof= onda Q profunda; S prof= onda S profunda).

Tabela 7: Predominância das alterações eletrocardiográficas nos grupos OLE 150 mg/kg e OLE 300mg/kg em todos os tempos avaliados.

Alterações eletrocardiográficas	OLE 150 mg/kg	%	OLE 300 mg/kg	%
RSN	25	13,66	11	12,94
ESV	25	13,66	15	17,65
BAV1	20	10,93	6	7,05
ESSV	17	9,23	12	14,12
TV	15	8,12	7	8,23
Aumento T	15	8,12	1	1,17
MPM	14	7,65	6	7,05
BS	14	7,65	3	3,53
OS	6	3,27	5	2,73
FV	8	4,37	9	10,58
BAV2	7	3,82	1	1,17
TA	4	2,20	2	2,35
S prof	3	1,64	0	0
AS	3	1,64	0	0
TS	3	1,64	1	1,17
Q prof	2	1,09	4	4,70
Inversão P	1	0,55	0	0
BAV3	1	0,55	0	0
Alternância elétrica	0	0	2	2,35
Total	183	100	85	100

(RSN= ritmo sinusal normal; MPM= marca-passo migratório; AS=arritmia sinusal; BS= bradicardia sinusal; TS= taquicardia sinusal; PS= parada sinusal; AE= alternância elétrica; BAV1= bloqueio atrioventricular de primeiro grau; BAV2= bloqueio atrioventricular de segundo grau; Supra ST= supradesnivelamento do segmento ST; ESSV= extrassístole supraventricular; TA= taquicardia atrial; ESV= extrassístole ventricular; TV= taquicardia ventricular; FV= fibrilação ventricular; Q prof= onda Q profunda; S prof= onda S profunda).

No grupo OLE 150 foi possível encontrar distúrbios de ritmo e condução importantes, incluindo BAV 1º grau, aumento de onda T, ESV, TV, ESSV evoluindo para TA, BAV 2º e 3º graus. O grupo OLE 300 apresentou principalmente arritmias ventriculares (ESV, TV, FV) e alguns animais apresentaram BAV 1º grau e CAP. As arritmias dose dependentes também já foram relatadas por outros autores (Krychak, 1997; Barbosa et al., 2007). A maior variedade de arritmias no grupo com a menor dose pode ser explicada pelos mecanismos compensatórios do coração frente os distúrbios de condução elétrica que estariam menos comprometidos no grupo OLE 150. O que também justifica a maior presença de arritmias atriais (ESSV, TA) nos animais desse grupo e de mais distúrbios ventriculares no grupo OLE 300.

A presença de ESVs em quase todos os animais intoxicados, muitas vezes seguida de episódios prolongados de taquicardia ventricular monomórfica, é compatível com a intoxicação por *N. oleander* (Clark et al., 1991; Omidi et al., 2002; Aslani et al., 2007; Mesa-Socha et al., 2011) e por outros glicosídeos cardioativos incluindo a digoxina (Irons e Orgain, 1966; Kummer et al., 2006; Kassop et al., 2014). Em casos de intoxicação por digoxina, as ESVs são as manifestações arrítmicas mais comuns devido à sua atuação em focos ectópicos ventriculares (Irons e Orgain, 1966). As ESV podem ser descritas como despolarizações precoces originadas dos ventrículos em decorrência do aumento de automaticidade do miocárdio, enquanto a TV ocorre quando três ou mais ESV consecutivas são observadas no traçado (Tilley, 1992).

Essas disritmias ocorrem em casos de aumento da automaticidade do miocárdio, pelo fenômeno de reentrada ou automaticidade do tipo *triggered*, geralmente associados a distúrbios sistêmicos, autonômicos, isquêmicos e no presente trabalho distúrbios eletrolíticos e cardiotoxicos (Gaztañaga et al., 2012). O fenômeno de reentrada é uma alteração em que as ondas de excitação celular são bloqueadas em áreas circunscritas do miocárdio, se propagam ao redor desses locais e em seguida reentram no sitio original de excitação em ciclos repetitivos, sendo responsável por taquiarritmias importantes (Kléber e Rudy 2004). A automaticidade do tipo *triggered* é definida como o impulso inicial causado por despolarizações atrasadas, que ocorrem quando a célula atinge seu potencial de ação e um novo potencial é gerado, também colaborando para a presença de taquiarritmias ventriculares (Gaztañaga et al., 2012). O aumento de automaticidade pode ser explicado pelo bloqueio da bomba NKA, que será abordado no item 4.10.

As arritmias ventriculares do tipo monomórficas, nas quais a mesma configuração do QRS se mantém ao longo do traçado, como encontradas, sugerem a localização de um foco ectópico estável e representam fator de risco para apresentação de taquicardia ventricular sustentada, fibrilação ventricular e morte súbita (Sheldon et al., 2010; John et al., 2012).

Os bloqueios atrioventriculares em todos os seus graus podem ser observados na intoxicação por *N. oleander* (Wojtyna et al., 2004; Senthilkumaran et al., 2011; Valle et al., 2012; Mesa-Socha, 2011; Omidi et al., 2012 e Hugues et al., 2012). Os BAVs representam um retardo na condução atrioventricular e implicam em arritmias graves (Tilley, 1992) que podem estar associadas à ação dos compostos glicosídeos no nó sinusal e atrioventricular (Langord, 1996). Acompanhando a presença dos bloqueios, houve o progressivo aumento do intervalo PR nos animais intoxicados, corroborando para os achados de dissociação atrioventricular.

Arritmias menos frequentes nos cobaios, mas relevantes, também foram encontradas como a ESSV, a TSV, a PS e a alternância elétrica. As arritmias atriais também são comuns em casos de intoxicação por digoxina e se associam, assim como as taquiarritmias ventriculares, aos eventos de automaticidade cardíaca aumentada. A ESSV ou contração atrial prematura é caracterizada pela presença de ondas P prematuras ectópicas que interrompem o ritmo normal, enquanto a taquicardia supraventricular é um ritmo acelerado com três ou mais ESSV em sequência, associado a um foco anormal na região dos átrios (Tilley e Burtnick, 2004).

A parada sinusal (PS) é uma arritmia menos grave, que ilustra possível distúrbio no nó sinusal, representado pelo prolongamento dos intervalos RR consecutivos. Essa alteração indica provável ação dos glicosídeos no nó sinusal. Já a alternância elétrica, é definida por complexos QRS que alternam em sua altura ou direção e geralmente acompanham episódios de taquicardia supraventricular como foi o caso do presente trabalho. A alternância elétrica representa a dificuldade do impulso de se propagar dos átrios para os ventrículos (Tilley e Burtnick, 2004).

Para avaliação de possíveis diferenças estatísticas entre as ondas e segmentos, foram comparados os ECGs dos diferentes tempos estudados de cada um dos grupos (CON, OLE 150, OLE 300). Primeiramente os tempos 0, 1, 2, 3 e 4 dentro do grupo OLE 150 foram comparados. Foram encontradas diferenças ($p < 0,05$) nos parâmetros RmVolt, QT, QTc e TmVolt, enquanto os parâmetros FC, Pmseg, PmVolt, PRmseg, QRSmseg e STnível não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) (Figuras 12 e 13).

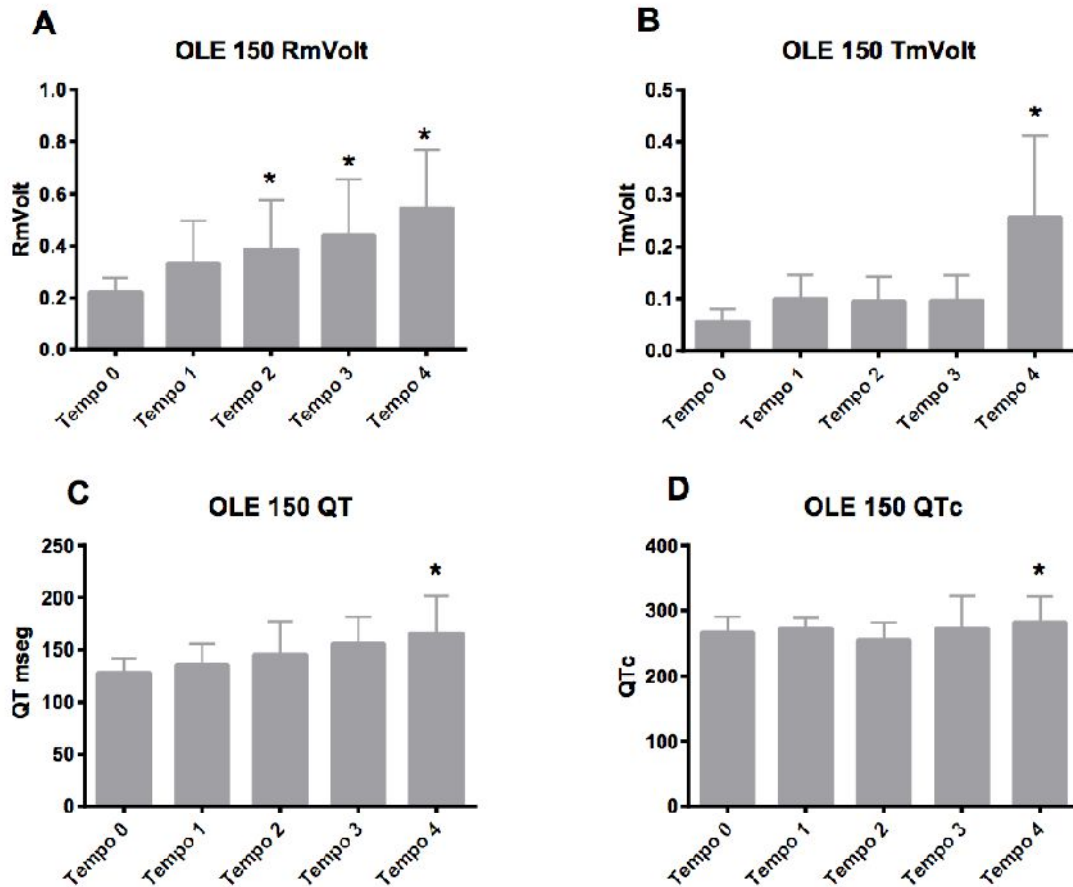


Figura 12: Valores médios e desvio padrão da amplitude da onda R (A), amplitude da onda T (B), duração do segmento QT (C) e duração do intervalo QTc (D) de cobaios submetidos á dose de 150mg/kg de extrato de *N. oleander*. Análises realizadas com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). A- * aumento em relação ao tempo 0; B- * aumento em relação aos tempos 0, 1, 2 e 3; C- aumento em relação ao tempo 0; D- * aumento em relação ao tempo 0; E- * aumento em relação ao tempo 0.

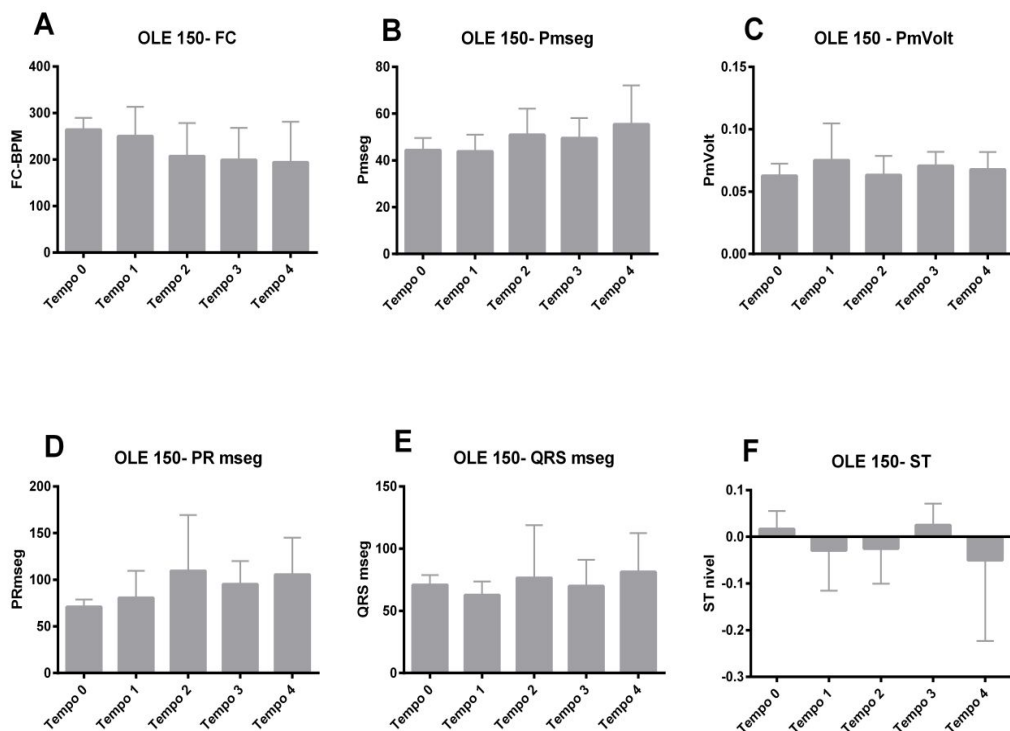


Figura 13: Valores médios e desvio padrão da FC (A), duração da onda P (B), amplitude da onda P (C), duração do intervalo PR (D), duração do complexo QRS (E) e desnivelamento do segmento ST (F) de cobaias submetidas à dose de 150mg/kg de extrato de *N. oleander*. Análises realizadas com pós-teste de Tukey ($p > 0,05$), exceto a amplitude da onda P, submetida ao teste de Kruskal Wallis ($p > 0,05$) e o desnivelamento do segmento ST submetido ao teste de Friedman ($p > 0,05$).

A comparação entre os tempos 0, 1, 2, 3 e 4 do grupo OLE 300 mostra diferença ($p < 0,05$) entre os parâmetros PmVolt, PRmseg, RmVolt, QT, QTc e TmVolt, enquanto os parâmetros FC, Pmseg, QRS mseg e STnivel não diferiram entre os tempos (Figuras 14 e 15).

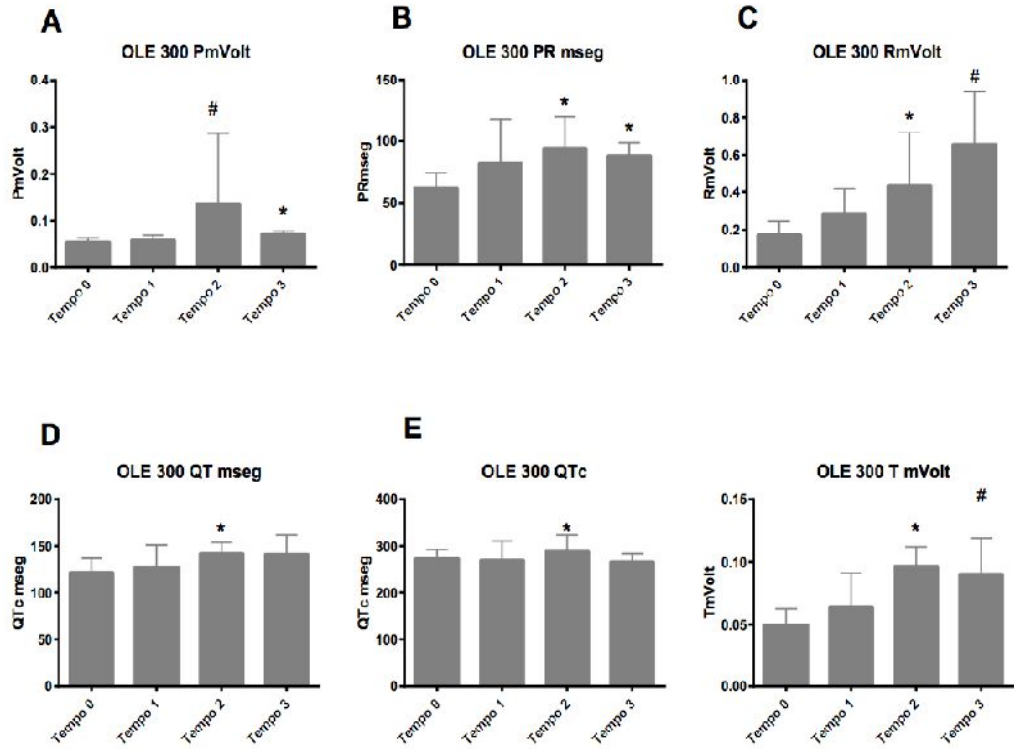


Figura 14: Valores médios e desvio padrão da amplitude da onda P (A); duração do segmento PR (B); amplitude da onda R (C); duração do segmento QT (D); duração do segmento QTc (E) e amplitude da onda T (F) de cobaias submetidos à dose de 300mg/kg de extrato de *N. oleander*. Análises realizadas com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$), exceto a amplitude da onda P, submetida ao teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$). A-# aumento em relação ao tempo 0; * aumento em relação aos tempos 0 e 1 ; B-* aumento em relação ao tempo 0; C-* aumento em relação ao tempo 0; # aumento em relação aos tempos 0 e 1 ; D-* aumento em relação ao tempo 0 ; E-* aumento em relação ao tempo 0 ; F* aumento em relação aos tempos 0 e 1; # aumento em relação ao tempo 0.

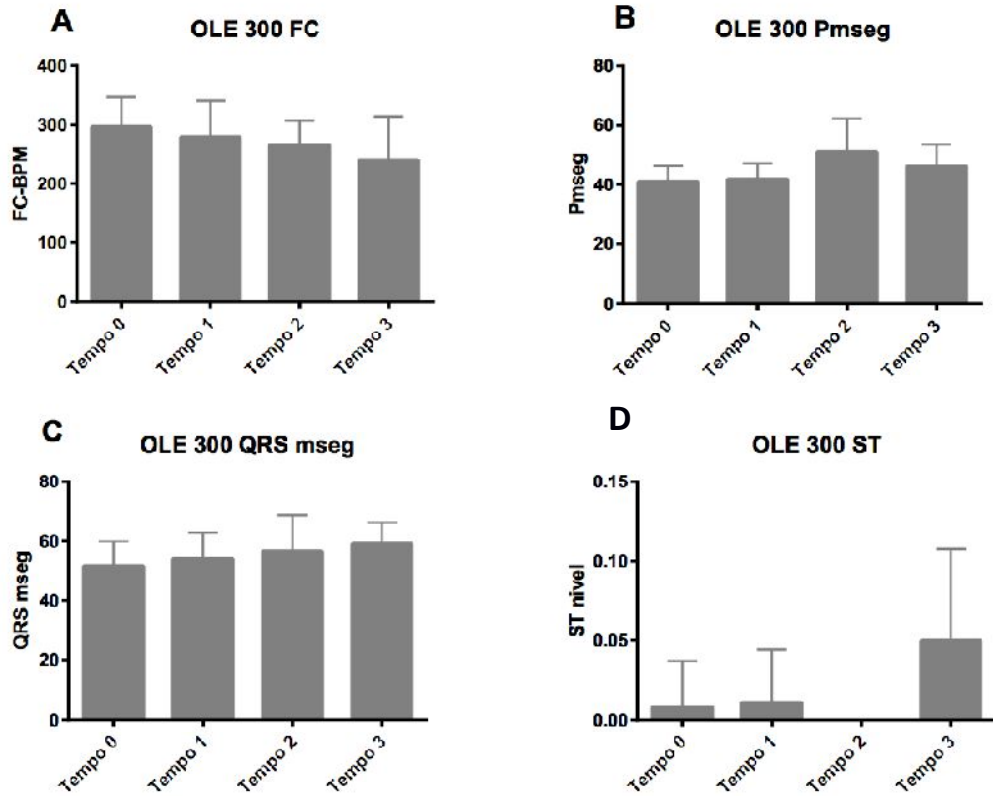


Figura 15: Valores médios e desvio padrão da FC (A), duração da onda P (B), duração do complexo QRS (C) e desnivelamento do segmento ST (D) de cobaios submetidos á dose de 300mg/kg de extrato de *N. oleander*. Análises realizadas com pós-teste de Tukey ($p > 0,05$), exceto o desnivelamento do segmento ST submetido ao teste de Friedman ($p > 0,05$).

A comparação entre os grupos controle, OLE 150 e OLE 300 revelou diferenças estatísticas ($p < 0,05$) nos parâmetros FC, PmVolt, PR e amplitude da onda T; enquanto os parâmetros Pmseg, QRS msec, R mVolt, QTmseg, QTc e ST não diferiram entre os grupos (Figuras 16 e 17).

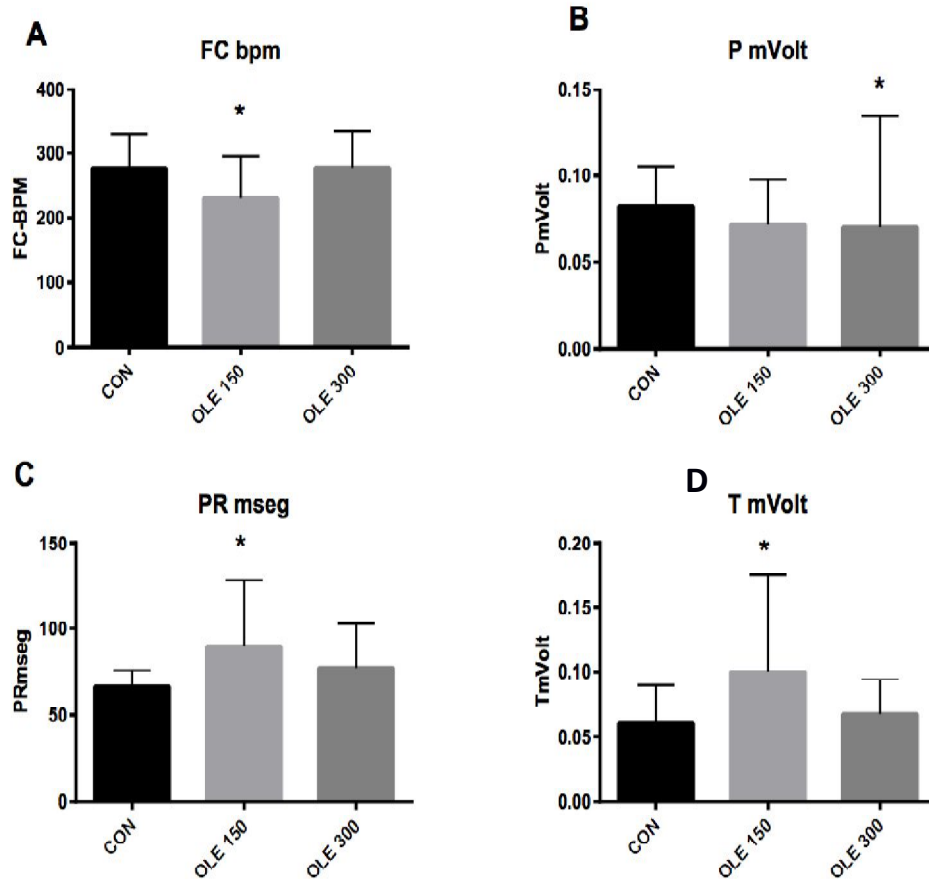


Figura 16: Valores médios e desvio padrão da frequência cardíaca (A), amplitude da onda P (B), duração do intervalo PR (C) e amplitude da onda T (D) de cobaios dos grupos CON, OLE 150 e OLE 300. Análises realizadas com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$), exceto a amplitude da onda R, submetido ao teste Kruskal Wallis. A- *diminuição em relação aos grupos CON e OLE 300; B- * diminuição em relação aos grupos CON e OLE 150; C- * aumento em relação aos grupos CON e OLE 300.

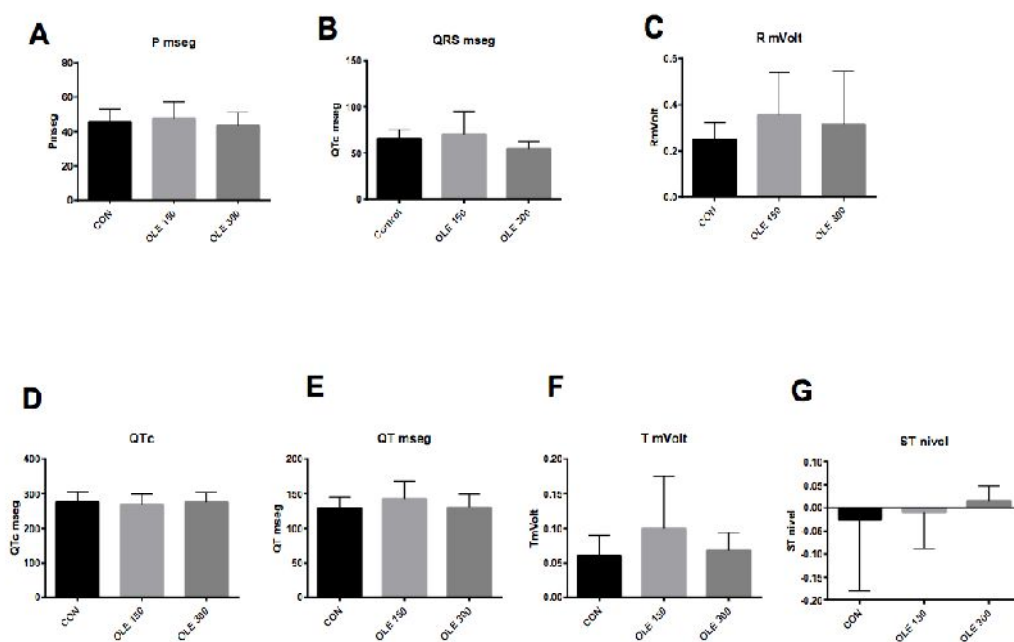


Figura 17: Valores médios e desvio padrão da duração da onda R (A), duração do complexo QRS (B), amplitude da onda R (C), duração do segmento QTc (D), duração do segmento QT (E), amplitude da onda T (F) e desnivelamento do segmento ST (G) de cobaias dos grupos CON, OLE 150 e OLE 300. Análises realizadas com pós-teste de Tukey ($p > 0,05$), exceto o desnivelamento do segmento ST submetido ao teste de Friedman ($p > 0,05$).

Estudos mostram que a intoxicação por *N. oleander* pode causar bradicardia sinusal (Omidi et al., 2002; Aslani et al., 2004; Aslani et al., 2007; Mesa-Socha et al., 2011; Senthilkumaran et al., 2011; Valle et al., 2012), corroborando os achados do grupo OLE150 que apresentou FC inferior ao grupo controle e OLE 300. A bradicardia pode estar associada à ação direta dos glicosídeos no nó sinusal e à resposta compensatória e protetora do miocárdio frente às taquiarritmias e bloqueios de condução (Langford e Boor, 1996). Pode ainda estar associada a efeitos autonômicos induzidos pelo extrato de *N. oleander* (Rezhakani e Mahan, 1992). Para melhor compreender os possíveis efeitos no sistema autonômico, foram feitos experimentos de modulação farmacológica descritos no item 4.9.

O achado de diminuição da amplitude da onda P no comparativo entre grupos não tem relevância clínica e não pode ser associado a outros resultados encontrados. Pelo contrário, nos animais do grupo OLE 300, nos tempos 2 e 3 é possível visualizar um aumento da amplitude da onda em questão, que pode estar associada a uma sobrecarga atrial, corroborando com os achados anteriores de arritmias supraventriculares.

O segmento PR está prolongado se comparado entre os tempos do grupo OLE 300 e do grupo OLE 150 e no comparativo com o grupo CON. O prolongamento desse intervalo pode ser considerado um BAV de 1º grau, como já descrito, e indica alteração na condução atrioventricular. Já o aumento da amplitude da onda T, visto nos tempos 2 e 3 do grupo OLE 300, e no comparativo geral no grupo OLE 150 é um achado comum nas intoxicações causadas por glicosídeos cardioativos. Nesses casos é sugerido que o aumento da onda T é causado pelo desbalanço eletroquímico decorrente da ação dos glicosídeos na bomba NKA, que será discutida no item 4.10. É possível que o aumento do K^+ no meio extracelular e o acúmulo de íons Ca^{2+} e Na^+ no interior dos cardiomiócitos sejam responsáveis pelo atraso na repolarização ventricular, representado no eletrocardiograma pela onda T e pelo segmento QT (Le Couter et al., 2002; Pastore et al., 2009).

O intervalo QT apresenta-se prolongado ao longo dos tempos em ambos os grupos tratados OLE 150 e OLE 300, sem, no entanto diferir do grupo CON no comparativo geral. O prolongamento do intervalo QT observado é um achado controverso. Alguns autores descreveram QT reduzido (Peymani, 2010; Senthilkumaran et al., 2011) e outros QT prolongado em casos de intoxicação por *N. oleander* (Mesa-Socha, 2011). Mas ambas as alterações tem implicações importantes e podem representar falha na repolarização ventricular. O prolongamento adquirido do QT geralmente está associado a distúrbios na condução do K⁺ como descrito anteriormente, sendo associado ao aumento da amplitude da onda T.

A onda R apresenta aumento de amplitude nos grupos OLE 150 e OLE 300 quando avaliado entre os tempos estudados a partir de 45 min após a intoxicação (T2) em ambos os grupos. O aumento tempo-dependente da onda R em ambos os grupos foi encontrado por Omidi et al., (2002) e Wojtyna et al., (2004). Essa alteração é comumente relatada em patologias cardíacas associadas ao remodelamento cardíaco e falhas graves na condução ventricular (Tilley, 1992). Esse aumento é devido a um atraso na ativação elétrica ventricular, que pode resultar em assincronia e reduzir a função bombadora do ventrículo esquerdo aumentando o risco de parada cardíaca e morte (Breidhardt, 2007).

Todos os achados eletrocardiográficos sejam eles distúrbios de ritmo ou de condução, encontrados de forma dose e tempo dependente estão associados à ação dos glicosídeos presentes nas folhas da *N. oleander* nos cardiomiócitos. Para investigar com mais detalhes os possíveis mecanismos pelos quais surgem as arritmias, estudos *in vivo* e *in vitro* foram conduzidos, sendo detalhados nos itens 4.9 e 4.10.

5.5 Níveis de glicose

A *N. oleander* tem sido apontada como um potencial agente hipoglicemiante em modelos experimentais de diabetes tipo 2 (Ishikawa et al., 2007; Sikarwar et al., 2009; Mwafay e Yassin, 2011; Bas et al., 2012;). Para avaliar possíveis alterações na glicemia dos cobaias intoxicados por *N. oleander*, a concentração de glicose sanguínea foi medida 1h após a intoxicação.

As concentrações de glicose foram menores no tempo 1 em relação ao tempo 0 em todos os grupos estudados sem apresentarem diferença estatística quando comparados entre si, de acordo com teste de Tukey ($p > 0,05$) (Tabela 8) (Figura 18).

Tabela 8. Valores médios e desvio padrão da glicemia (mg/dl) de cobaias controle e intoxicados com diferentes doses de extrato de *N. oleander* nos tempos 0 e 1 (1 hora após a intoxicação).

Concentração de glicose	Controle	OLE 150	OLE 300
Tempo 0	126,50±11,30Aa	123,83±31,56Aa	122,83±18,58Aa
Tempo 1	108,83±27,80Ab	99,42±21,19Ab	106,92±32,84Ab

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha ou letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

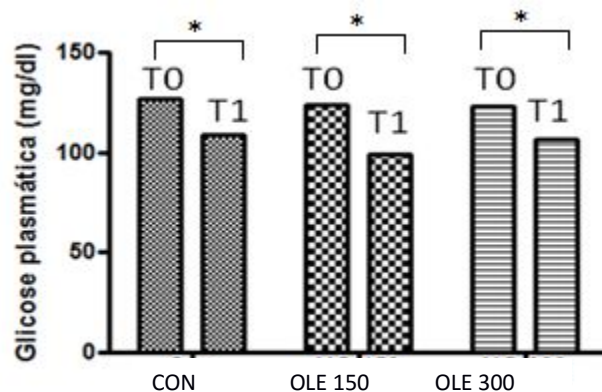


Figura 18. Valores médios da dosagem da glicemia (mg/dL) de cobaios controle e intoxicados com diferentes doses de extrato de *N. oleander* nos tempos 0 e 1 (1 hora após a intoxicação).

Os resultados encontrados mostram que os animais apresentavam hipoglicemia independentemente da administração do extrato de *N. oleander*. Todos os animais, inclusive do grupo CON, foram submetidos ao mesmo tempo de jejum, ao qual se espera diminuição da glicemia ao longo do tempo de forma fisiológica.

A alteração na glicemia pode não ter ocorrido devido à evolução aguda do quadro e o tempo em que foi realizada a coleta das amostras de sangue (uma hora após a administração do extrato). Estudos utilizando *N. oleander* por um período de quatro semanas em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina comprovam o aumento dos níveis de insulina e diminuição dos níveis de glicose, mas em valores inferiores se comparados com a droga glimiperida, sugerindo efeito potencial dessa planta para o tratamento de diabetes (Mwafway e Yassin, 2011). Há estudos relatando que a administração oral de extrato de *N. oleander* durante 12 semanas não apenas diminui a glicemia em jejum de ratos com diabetes, mas também reduz a resistência à insulina, colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade, triglicerídeos e leptina (Bas et al., 2012). Intoxicações acidentais também podem resultar em hipoglicemia (Page e Murtaugh, 2015), mas o quadro clínico (inapetência, vômito e diarreia) associado ao atraso no atendimento dos pacientes podem influenciar os níveis plasmáticos de glicose. A partir desses achados, não é possível concluir que o extrato em questão tenha capacidade hipoglicemiante na dose e modelo estudados, uma hora após a intoxicação.

5.6 Avaliação de marcadores cardíacos séricos

Intoxicações por glicosídeos cardioativos podem muitas vezes causar alterações de proteínas marcadoras cardíacas como o aumento da CK-MB e da cTnI (Camplesi et al., 2009; Kassop et al., 2014). Para avaliar se o extrato de *N. oleander* é capaz de alterar de forma aguda os níveis séricos de CK-MB e cTnI, as enzimas foram medidas como mostram a Tabela 9 e a Figura 19.

Tabela 9. Valores médios e desvio padrão da dosagem plasmática da CK-MB (ng/mL) de cobaios controle e intoxicados com diferentes doses de extrato de *N. oleander* nos tempos 0 e 3 (3horas após a intoxicação).

Concentração de CK-MB	Controle	OLE 150	OLE 300
Tempo 0	0,53±0,09Aa	0,49± 0,004 Aa	0,53± 0,08 Aa
Tempo 3	0,61±0,16Aa	0,73± 0,45 Aa	0,68±0,33 Aa

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha ou letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo Welch-Corrected T-Test e Dunn ($p < 0,05$).

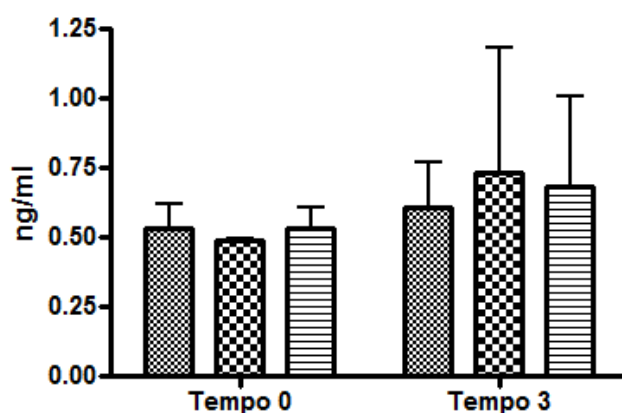


Figura 19. Valores médios da CK-MB plasmática (ng/mL) de cobaios controle e intoxicados com diferentes doses de extrato de *N. oleander* nos tempos 0 e 3 (3horas após a intoxicação) (Welch-Corrected T-Test e Dunn, $p < 0,05$).

As concentrações plasmáticas de cTnI foram iguais entre os grupos CON, OLE 150 e OLE 300 em ambos os tempos 0 e 3, sendo todos os valores encontrados menores que 0,20ng/ml. As concentrações plasmáticas de CK-MB não foram diferentes entre os tempos 0 e 3 para cada um dos grupos e também não diferiram entre si no comparativo geral ($p > 0,05$).

A CK-MB é considerada uma enzima marcadora de danos teciduais cardíacos e secretada na corrente sanguínea quando a membrana celular se torna permeável ou se rompe. Geralmente está associada à injúria grave ou morte de células miocárdicas quando há desintegração do aparato contrátil e aumento da permeabilidade de membrana. A fração cardíaca da creatina quinase se encontra principalmente no miocárdio, sendo cada vez mais usada para indicar lesões cardíacas em casos de infarto e intoxicações graves. Quando ocorre dano tecidual, a CK-MB começa a ser liberada em 3h, e seu pico de concentração plasmática ocorre entre 8 e 30h, retornando aos valores basais após 48 ou 72h (Pinto et al., 2010).

Já a cTnI é uma subunidade estrutural encontrada no miocárdio também empregada no diagnóstico de lesões cardíacas, com pico de liberação entre 4 a 6 horas após a lesão do aparato contrátil do coração (O'Bryen et al., 2006; Pinto et al., 2010).

A ausência de achados quanto à medida das enzimas marcadoras de lesão cardíaca pode ser associada ao tempo de coleta das amostras e à ausência de achados compatíveis com necrose ou apoptose celular (discutidos nos achados histopatológicos), sendo possível que as proteínas não atinjam a corrente sanguínea.

5.7 Alterações histopatológicas e ultraestruturais

Relatos de casos e estudos experimentais utilizando folhas de *N. oleander* em diferentes espécies descrevem alterações na macroscopia e microscopia dos indivíduos intoxicados (Krychak, 1997). Na avaliação dos animais do presente trabalho não foram encontradas lesões macroscópicas dignas de nota em todos os animais dos grupos controle e tratados, assim como descrito por Barbosa et al., (2008). Os animais do grupo CON não apresentaram lesões histológicas nos órgãos estudados.

As alterações histopatológicas encontradas em casos de intoxicação por *N. oleander* não são patognomônicas e incluem achados no coração, fígado, rins, pulmões e trato gastrointestinal (Krychak, 1997). Em relação às alterações microscópicas observadas após coloração com H.E., o coração e os rins foram os órgãos mais afetados.

As amostras de encéfalo dos grupos tratados foram avaliadas na busca de correlacionar lesões com os achados clínicos, mas apresentaram apenas congestão discreta à moderada, acompanhadas de hemorragias subdurais focais, sem distinção importante entre as doses de estudadas. Também não foram encontradas evidências compatíveis com degeneração, apoptose ou necrose cerebral nos animais (Figura 20).

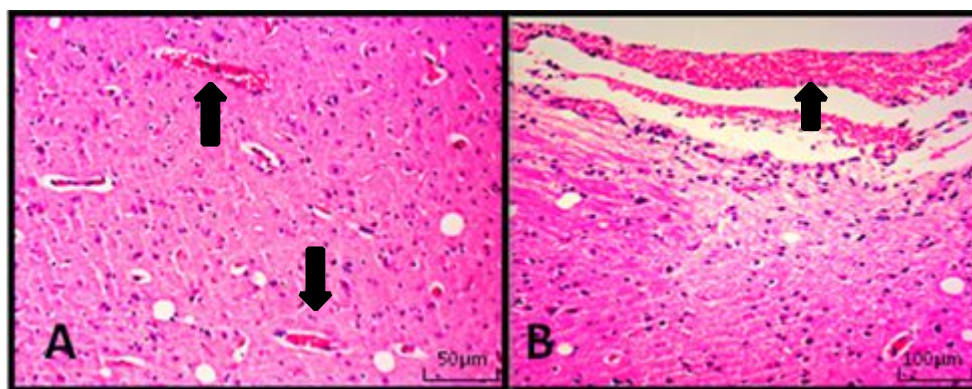


Figura 20: Amostras do encéfalo de animais tratados com 300mg/kg de extrato de *N. oleander*. A- Destaque para a congestão encefálica (setas) (aumento de 20x); B- Destaque para a hemorragia subdural discreta (seta) (aumento de 10x).

As lesões discretas no encéfalo em detrimento dos intensos sinais neurológicos encontrados nos animais intoxicados podem ser atribuídas ao tempo de evolução clínica dos animais. Alguns autores associam a congestão e hemorragia cerebral aos sinais clínicos (Adam et al., 2001). No entanto, é possível sugerir que os glicosídeos cardioativos da *N. oleander* possam ter ação direta sobre a bomba NKA cerebral que afeta potencialmente, por meio de disfunção iônica, diferentes canais e trocadores. Entre eles, o co-transportador Na/Cl/GABA, Na/Cl/Glicina e Na/Cl dopamina (Singhal e Gupta, 2011; Fuller et al., 2013) promovendo sinais como incoordenação, ataxia e convulsões focais sem lesões teciduais aparentes.

As amostras do tecido renal de ambos os grupos intoxicados apresentaram discreto acúmulo de material basofílico no interstício tubular, congestão variando de discreta a moderada, acompanhada de discretos vacúolos multifocais intracelulares nas células tubulares epiteliais da região de junção córtico-medular (Figura 21).

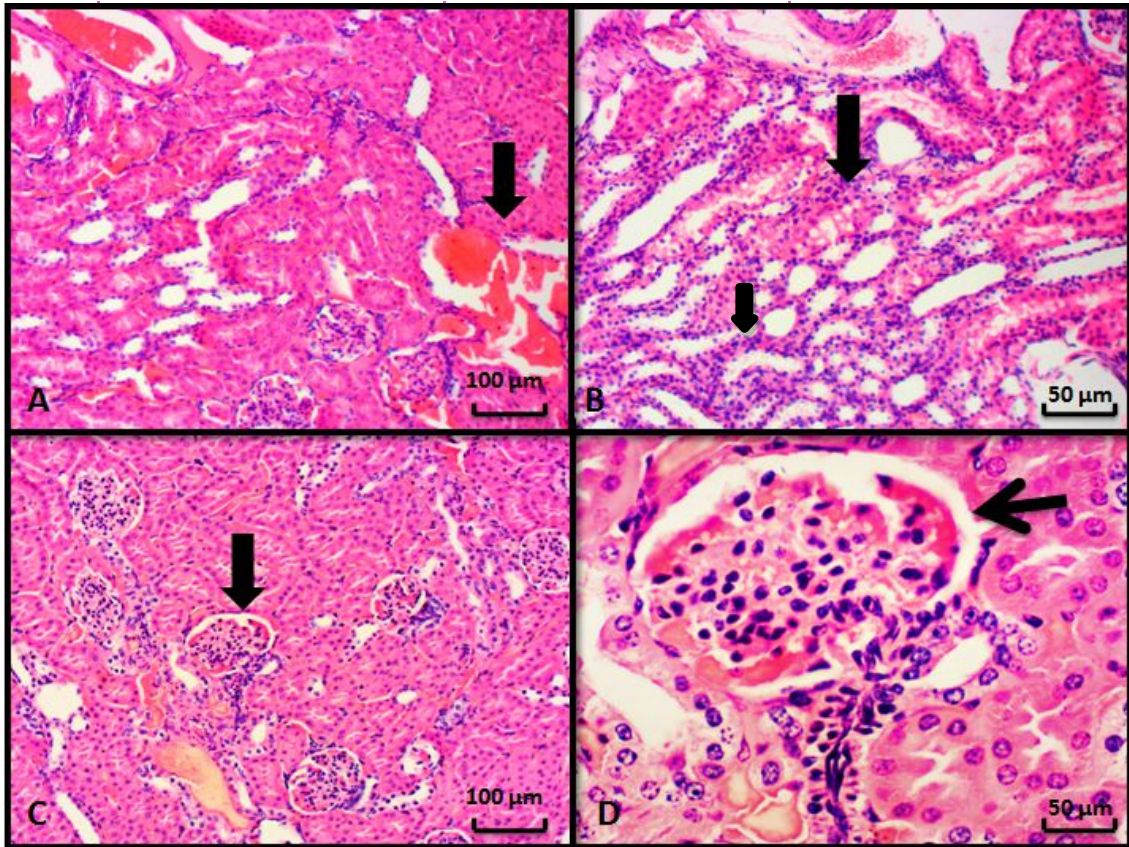


Figura 21: Amostras do tecido renal de animais intoxicados por *N. oleander*. A- OLE 150, destaque para congestão renal (setas) (aumento 10x); B- OLE 300, presença de vacúolos intracelular nas células epiteliais tubulares na região próxima à junção córtico-medular (seta) (aumento de 20x); C- OLE 300, indicando presença de glomérulos congestos (seta) (aumento 10x); D- OLE 300 destaque para a presença de hemácias no interior dos glomérulos (aumento 40x).

As alterações no parênquima renal podem estar associadas a possíveis lesões de endotélio vascular (Taheri et al., 2012) e/ou serem resultantes da ação direta dos glicosídeos na bomba NKA dos túbulos renais (Oryan et al., 1996; Barbosa et al., 2008), causando hemorragia, congestão e as alterações glomerulares observadas. A falência cardíaca também pode comprometer a função renal e contribuir para os achados. As amostras do pulmão e do fígado não apresentaram alterações dignas de nota (Figura 22).

Além de causar lesões cardíacas, a *N. oleander* pode afetar o leito endotelial vascular e induzir inflamação aguda em diferentes órgãos. Achados pulmonares e hepáticos podem ser provocados pelo dano vascular e pela falência cardíaca aguda (Taheri et al., 2012), mas não foram encontrados nos animais intoxicados no presente trabalho, possivelmente pela ação aguda e evolução clínica rápida dos animais intoxicados.

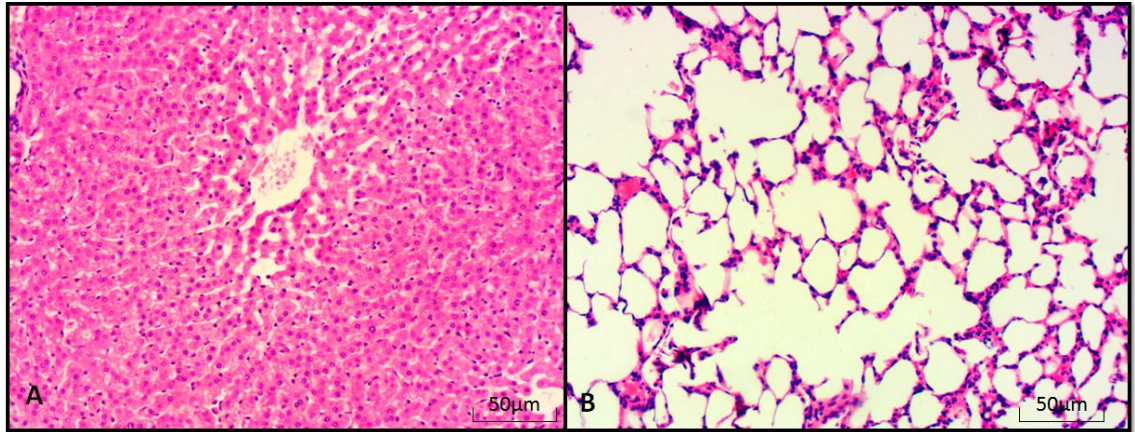


Figura 22: A- Amostra do fígado do grupo OLE 150 evidenciando imagem hepática sem alterações (aumento x20). B- Amostra do pulmão do grupo OLE 150, evidenciando imagem pulmonar sem alterações dignas de nota (aumento x20).

A análise do tecido cardíaco dos animais dos grupos tratados OLE 150 e OLE 300 não foram visivelmente diferentes entre si, apresentando vacuolização intracitoplasmática discreta focal do miocárdio, concentrada em áreas de músculo papilar; acompanhadas de hemorragia moderada e congestão. Alguns animais possuíam fibras mais eosinofílicas e pequenas áreas com fibras fragmentadas, porém sem sinais indicativos, apoptose ou necrose, com sinais compatíveis com degeneração hidrópica discreta e focal, corroborando para os achados de CK-MB e cTnI que não foram alteradas em função da intoxicação (Figura 23).

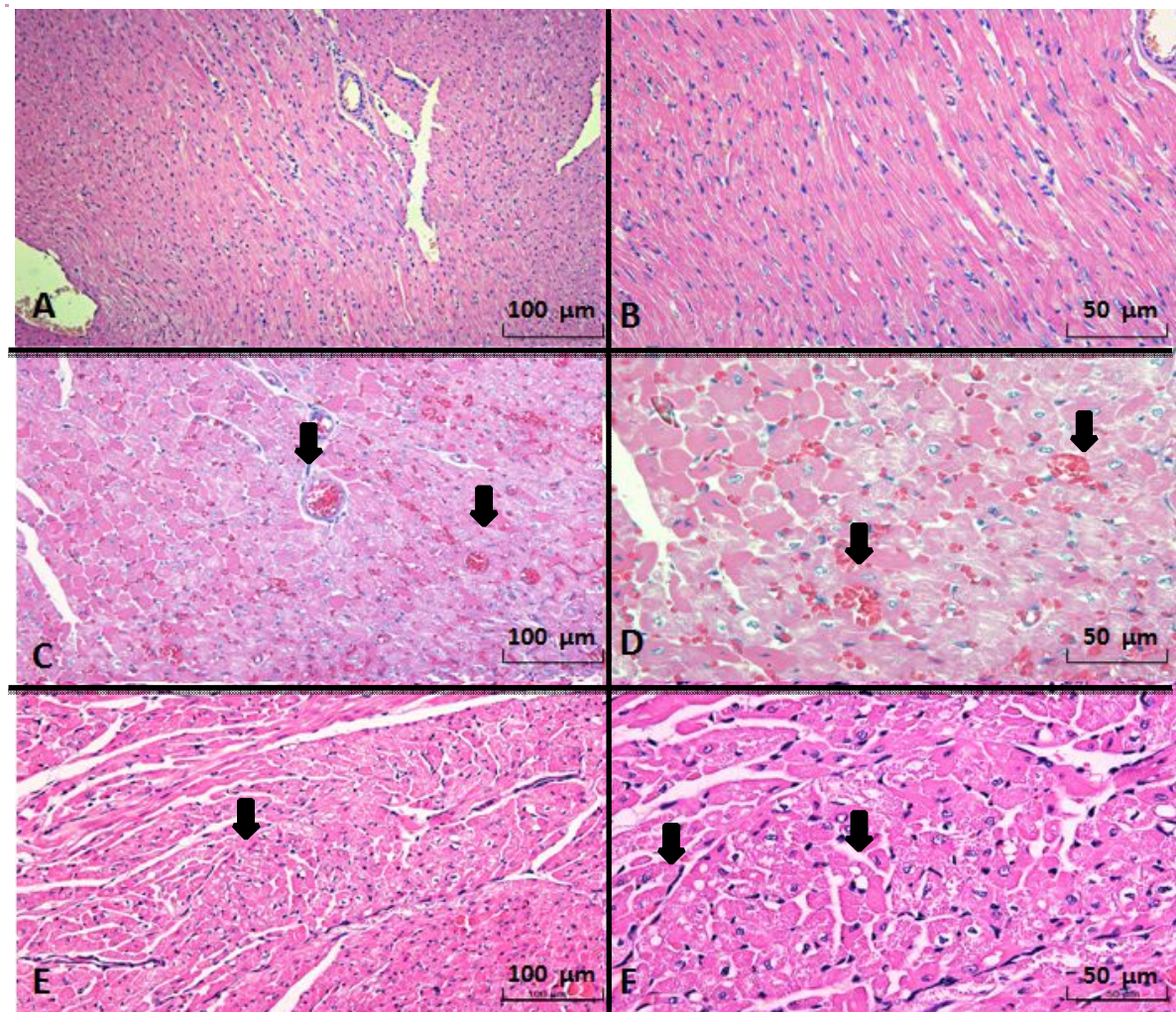


Figura 23: Amostras do miocárdio dos animais estudados. A- Grupo CON, sem alterações (aumento de 10x). B-Grupo CON, sem alterações (aumento de 20x). C- Grupo OLE 150 destaque para as fibras cardíacas mais eosinofílicas e intensa hemorragia no miocárdio (setas) (aumento 20x). D- Grupo OLE 150, destaque para a presença de hemorragia moderada no miocárdio (seta) (aumento 40x). E- Grupo OLE 300, imagem do músculo papilar do ventrículo esquerdo com destaque para a presença de vacúolos intracitoplasmáticos nos cardiomiócitos (seta) (aumento 20x). F- Grupo OLE 300 destaque indicando os vacúolos intracitoplasmáticos nos cardiomiócitos do músculo papilar do ventrículo esquerdo (setas) (aumento 40x).

Para dar continuidade á avaliação da cardiotoxicidade da *N. oleander*, foi feita a análise ultraestrutural dos cardiomiócitos com intuito de identificar os vacúolos encontrados no músculo papilar dos ventrículos esquerdos. A avaliação foi segmentada em duas etapas: análise das amostras em corte semi-fino com auxílio de microscópio de luz e ultrafino por microscópio eletrônico de transmissão. Em regiões de ventrículo esquerdo no corte semi-fino foi possível visualizar grande quantidade de vacúolos perinucleares concentrados em áreas de músculo papilar (Figura 24).

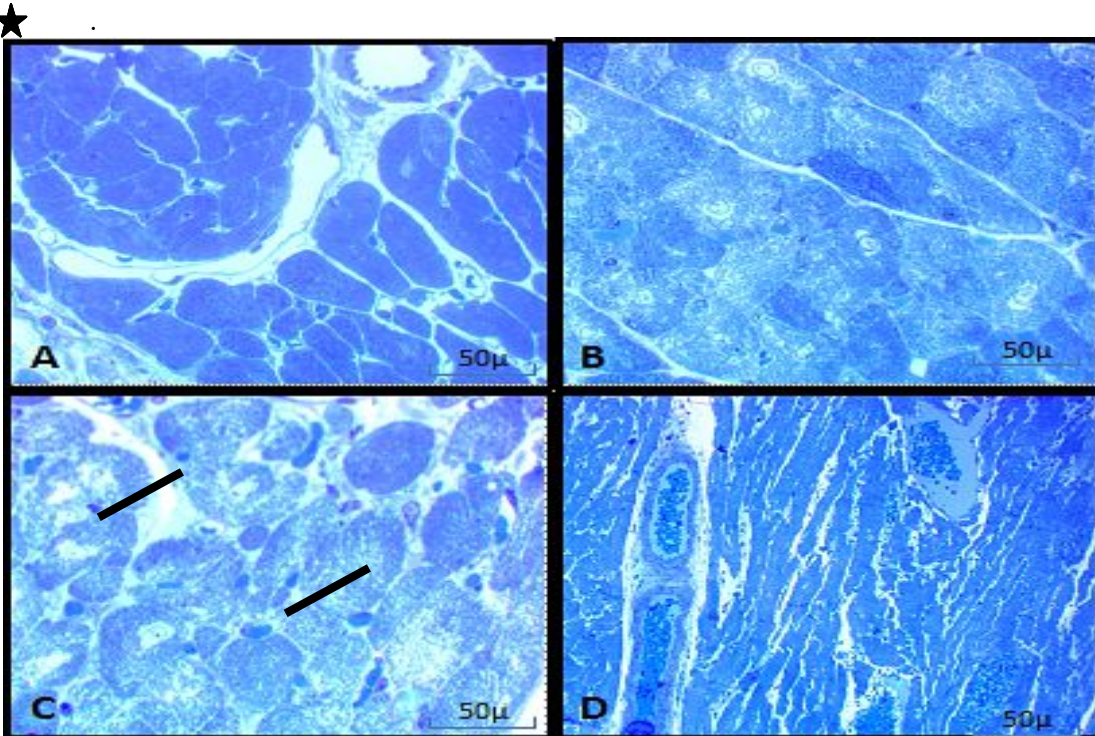


Figura 24: Amostras de cortes histológicos semi-finos de animais do grupos CON, OLE 150 e OLE 300. A- Grupo CON, evidenciando imagem cardíaca sem alterações (aumento x40). B- Grupo OLE 150, evidenciando diferença de pigmentação entre fibras com destaque para a presença de formações vacuolares citoplasmáticas (estrela) (aumento x40); C- Grupo OLE 300 com destaque para a presença de citoplasma intensamente vacuolizado (setas) (aumento x40); D- Grupo OLE 300 com destaque para a congestão intensa e presença de discreta hemorragia entre fibras (estrelas) (aumento 40x).

À microscopia eletrônica, foi possível observar mitocôndrias tumefeitas em ambos os grupos tratados, com perda de definição das cristas acompanhadas de desorganização das fibras musculares estriadas. Também é possível visualizar maior espaçamento entre as organelas e as estrias (Figura 25).

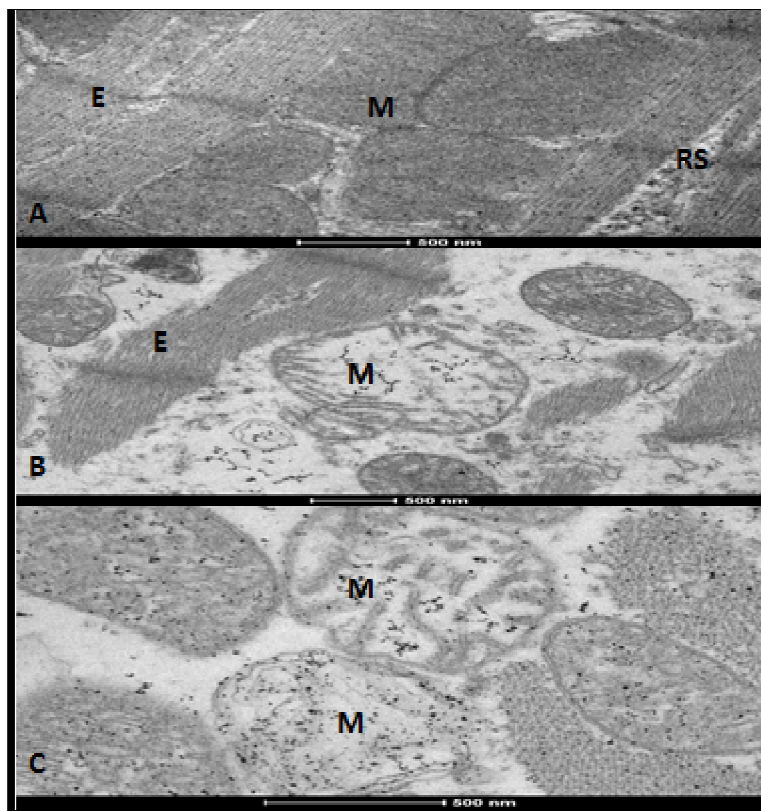


Figura 25: Micrografias eletrônicas de cortes longitudinais de músculo cardíaco esquerdo dos animais do grupo CON, OLE 150 e OLE 300. A- Amostra controle: destaque para as estriações (E) e a alternância entre filamentos e mitocôndrias (M) ricas em cristas e intensamente elétrondensas. É possível visualizar também o retículo sarcoplasmático (RS). B- Amostra do grupo OLE 150. Destaque para a presença de fibras descontínuadas e contraídas e para as mitocôndrias tumefeitas, sem definição de cristas e pouco elétrondensas. C- Amostra do grupo OLE 300. Destaque para as mitocôndrias, que também se encontram intensamente tumefeitas e pouco elétrondensas.

As áreas vacuolizadas, principalmente no músculo papilar, também foram encontradas por Pedrosa et al., (2009) e Taheri et al., (2012), acompanhadas de hemorragia, congestão, sem sinais, necrose e/ou apoptose. Os achados ultraestruturais dos cortes semi-fino e ultrafino estão intimamente conectados aos achados da histologia de rotina. No semi-fino é possível visualizar a presença de grande quantidade de vacúolos citoplasmáticos, confirmados no corte ultrafino como mitocôndrias danificadas, tumefeitas e com perda de definição das suas cristas. A avaliação ultraestrutural do coração de animais submetidos a altas doses de ouabaína, outro glicosídeo cardioativo, causou lesões muito semelhantes às encontradas no presente trabalho. As mitocôndrias dos animais tratados eram menos densas e não se apresentavam de forma paralela, possuíam cristas distorcidas e membrana aparentemente danificada (Ramirez-Ortega, et al., 2007). A lesão mitocondrial pode desencadear uma série de eventos danosos à célula, com comprometimento da produção de ATP que está associada aos achados dos experimentos *in vitro* discutidos em seguida e pode ter contribuído para os sinais neurológicos observados e descritos no item.

5.8 Quantificação da oleandrina no extrato e nos tecidos de cobaias intoxicados

A oleandrina, principal glicosídeo cardioativo encontrado nas folhas da *N. oleander*, foi quantificado por meio de técnica cromatográfica utilizando como controle amostra purificada da Sigma®. A quantificação seriada dos extratos hidroalcoólicos de *N. oleander* determinou que 1,0mg de extrato possui cerca de 4,2mg.g⁻¹ de oleandrina. Esse resultado se assemelha ao encontrado por Pedroza et al. (2014), que encontraram em média 4,89mg.g⁻¹ utilizando o mesmo método de detecção.

Nos órgãos dos animais que receberam 150 e 300mg/kg de extrato foi possível observar que apesar de não haver diferença ($p>0,05$) entre os grupos estudados, a concentração de oleandrina encontrada foi superior no grupo que recebeu a maior dose, considerando os estudos feitos nos rins, coração, fígado e encéfalo (Figura 26) (Anexo 2).

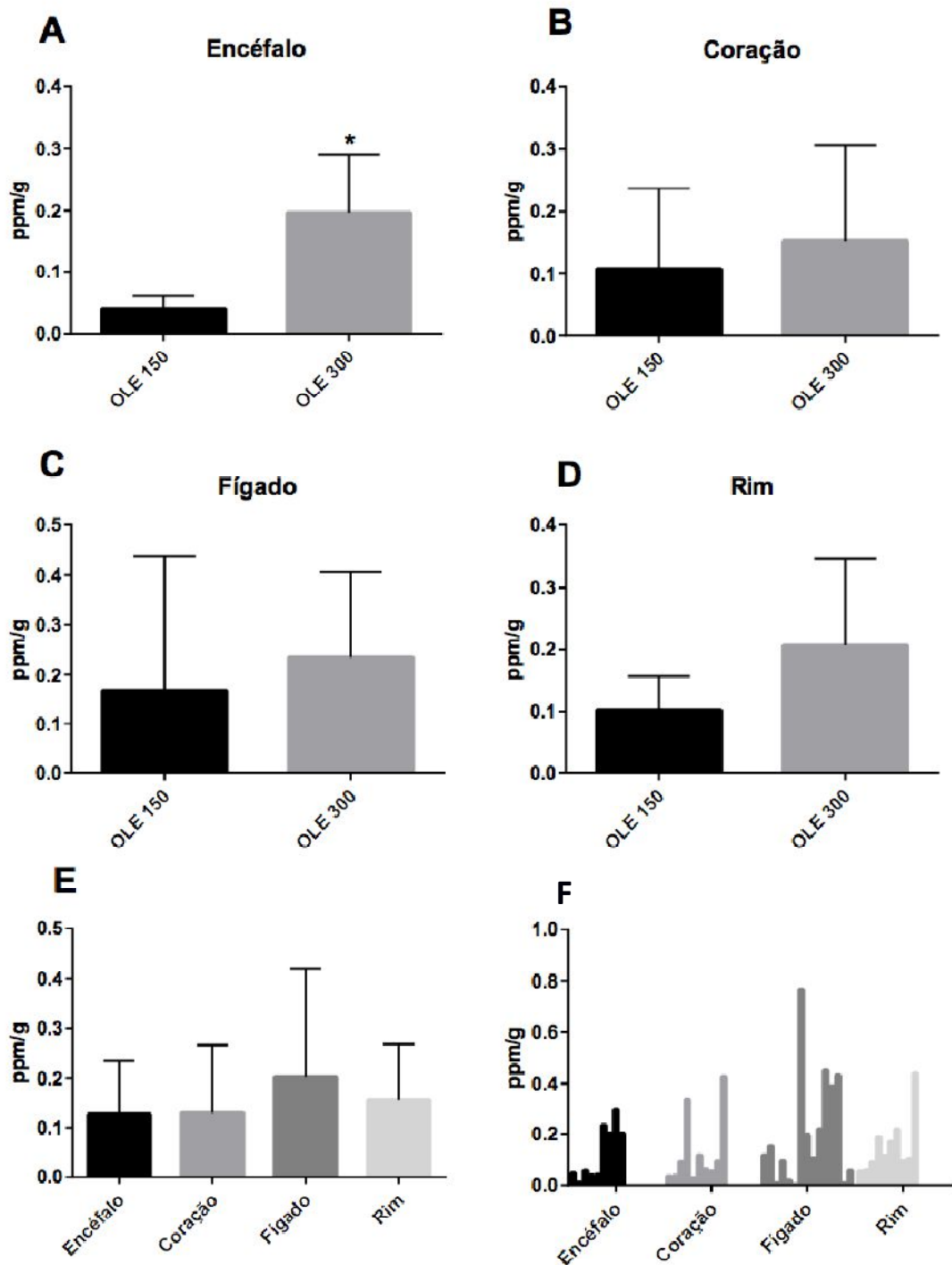


Figura 26: Valores da concentração de oleandrina (ppm/g) encontrados nos órgãos de animais intoxicados com 150 e 300mg/kg de *N. oleander* ao longo das três horas de experimento, detectadas por técnica cromatográfica LC/MS-MS (Teste-T, $p>0,05$). A- Valores encontrados no encéfalo dos dois grupos estudados, * aumento em relação ao grupo OLE 150 ; B- Valores encontrados no coração dos dois grupos estudados; C- Valores encontrados no fígado dos dois grupos estudados; D- Valores encontrados no rim dos dois grupos estudados. E- Valores comparados entre os órgãos independente dos grupos; F- Valores encontrados individualmente em cada órgão de cada animal estudado.

Esses resultados confirmam a ação do glicosídeo da *N. oleander* nos órgãos alvo corroborando assim com os sinais neurológicos apresentados, alterações cardiovasculares e lesões renais histológicas. Segundo Ni et al. (2002), a concentração de oleandrina no fígado após administração endovenosa pode chegar ao dobro dos valores encontrados nos rins e coração, sugerindo o metabolismo hepático dessa substância em ratos. No presente trabalho as concentrações de oleandrina encontradas nos diferentes órgãos foram similares, sendo os maiores valores encontrados no fígado, sem no entanto apresentar diferença em relação aos outros órgãos, sugerindo que por meio de administração oral do extrato de *N. oleander* em cobaias, a distribuição do glicosídeo pelos sistemas é semelhante.

As maiores concentrações foram encontradas no coração e encéfalo. Os animais do grupo OLE 300 apresentaram sinais neurológicos em maior número e intensidade, como atxia, incoordenação e espasticidade de membros, corroborando com os achados da cromatografia, em que as concentrações de oleandrina nesse grupo foram superiores ao grupo OLE 150. Os animais com maior concentração individual de oleandrina no coração apresentaram também alterações eletrocardiográficas importantes, como extrassístoles e taquicardia ventricular culminando em média 40min após a intoxicação. Esses resultados permitem inferir que a concentração de oleandrina nos tecidos interfere diretamente com os sinais clínicos dos animais, justificando alterações eletrocardiográficas e neurológicas, correlacionando diretamente com a gravidade do quadro e a possibilidade de óbito.

5.9 Avaliação do balanço autonômico cardíaco

Com o objetivo de avaliar a possibilidade da *N. oleander* afetar o balanço autonômico do coração e provocar, como visto no grupo OLE 150, a diminuição da FC dos animais, foram realizados experimentos com modulação farmacológica descrita por Goldeberger, 1999.

Os níveis basais da FC dos grupos OLE-AM e OLE-MA não apresentaram diferença em relação aos grupos controle CON-AM e CON-MA ($p>0,05$). Estes resultados podem ser observados na Figura 27 e Tabela10.

Tabela 10: Valores médios e desvio-padrão da FC basal (bpm) dos grupos controle (CON-AM e CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM e OLE-MA).

Grupos	FC Basal (bpm)
CON-AM	239,2 ± 14,5 A
CON-MA	242,9 ± 19,3 A
OLE-AM	231,3 ± 12,9 A
OLE-MA	218,4 ± 28,1 A

*Médias com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

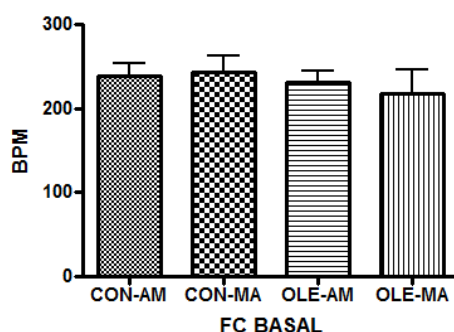


Figura 27: Valores médios FC basal (bpm) dos grupos controle (CON-AM, CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM, OLE-MA) submetidos ao teste de Tukey ($p > 0,05$).

A administração de atropina promoveu um aumento importante da FC do grupo CON-AM ($239,2 \pm 14,5$ bpm vs. $258,1 \pm 18,5$ bpm) ($p < 0,05$). Já sobre a FC do grupo OLE-AM não observamos alterações decorrentes da administração dessa droga ($231,3 \pm 12,9$ bpm vs. $210,3 \pm 20,7$ bpm), e ao contrário do grupo controle, houve uma diminuição da FC média. A FC após a atropina foi então maior nos animais do grupo CON-AM ($p < 0,05$). Esses resultados podem ser vistos na Figura 28.

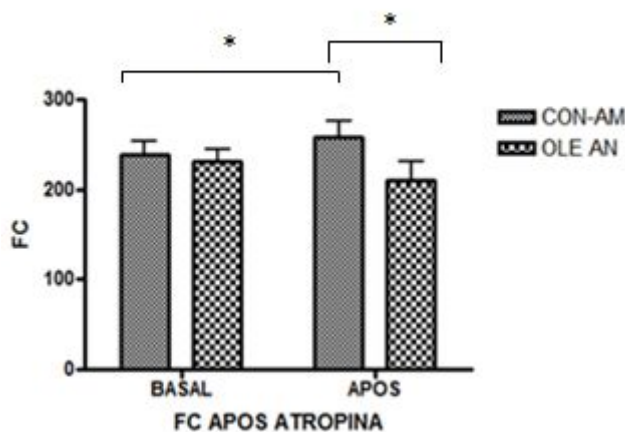


Figura 28: Valores médios da FC (bpm) após o bloqueio vagal dos grupos controle (CON-AM) e intoxicado com *N. oleander* (OLE-AM) (teste de Tukey, $p < 0,05$).

A administração de metoprolol promoveu uma diminuição da FC no grupo CON-MA ($242,9 \pm 19,3$ bpm vs. $202,7 \pm 9,16$ bpm) e no grupo OLE-MA ($218,4 \pm 8,13$ bpm vs. $161,3 \pm 24,8$ bpm) ($p < 0,05$). A diminuição da FC foi mais intensa no grupo OLE-MA. Esses resultados podem ser visualizados na Figura 29.

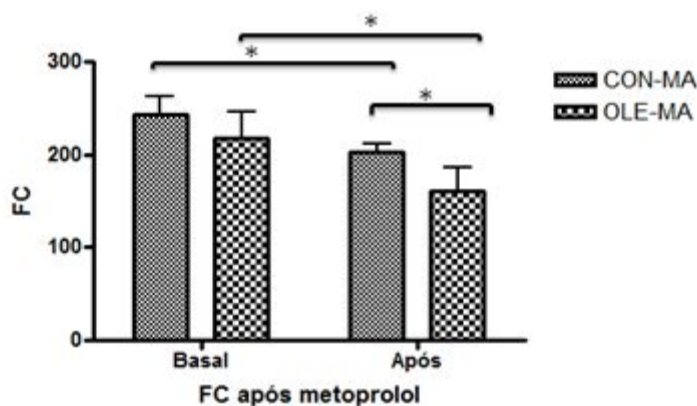


Figura 29: Valores médios da FC (bpm) após o bloqueio β -adrenérgico feito com metoprolol dos grupos controle (CON-MA) e intoxicado com *N. oleander* (OLE-MA) (teste de Tukey, $p < 0,05$).

O duplo bloqueio farmacológico, realizado após a administração sequencial de ambas as drogas, não promoveu diferenças entre os grupos estudados (teste de Tukey, $p < 0,05$). A

frequência intrínseca do marca-passo cardíaco (FIMC) foi inferior à FC basal em todos os casos. Esses dados podem ser visualizados na Figura 30 e na Tabela 11.

Tabela 11: Valores médios e desvio-padrão da FC (bpm) após o duplo bloqueio dos ramos simpático e parassimpático dos grupos. (CON-AM, CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM, OLE-MA) submetidos ao teste de Tukey ($p>0,05$).

Grupos	FC após duplo bloqueio (bpm)
CON-AM	201,4 ± 27,3 A
CON-MA	188,7 ± 13,0 A
OLE-AM	166,5 ± 20,1 A
OLE-MA	166,5 ± 17,3 A

*Médias com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

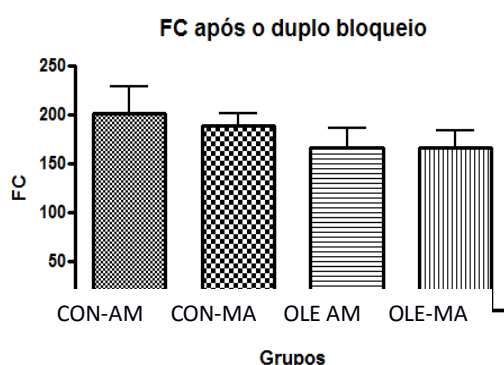


Figura 30: Valores médios da FC (bpm) após o duplo bloqueio dos ramos simpático e parassimpático dos grupos controle (CON-AM, CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM, OLE-MA) submetidos ao teste de Tukey ($p>0,05$).

A análise do tônus permite a inferência sobre a capacidade de cada um dos ramos autonômicos de determinar a FC intrínseca. O tônus simpático está diminuído nos animais que receberam *N. oleander* quando comparado ao grupo controle, mas a diferença não foi relevante pelo teste de Tukey ($p>0,05$). O tônus parassimpático foi diminuído nos animais que receberam *N. oleander* quando comparada ao controle, mas a diferença também não é relevante ($p>0,05$). Estes resultados estão nas tabelas 12 e 13 e nas figuras 31 e 32.

Tabela 12: Valores médios e desvio-padrão do tônus simpático (bpm) dos grupos controle (CON-AM) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM) submetidos ao teste de Tukey ($p>0,05$).

Grupos	Tônus simpático (bpm)
CON-AM	56,7 ± 38,2 A
OLE-AM	43,8 ± 15,1 A

*Médias com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

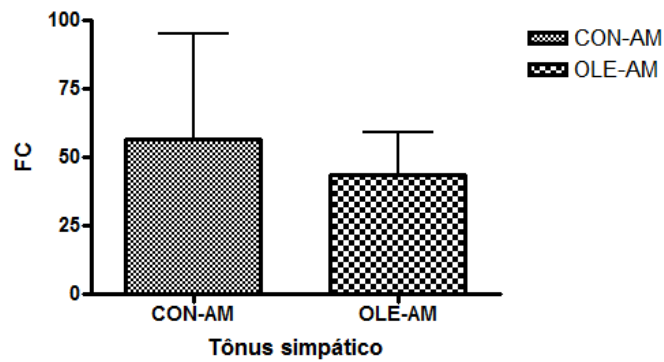


Figura 31: Valores médios do tônus simpático (bpm) dos animais dos grupos controle (CON-AM) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM) submetidos ao teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 13: Valores médios e desvio padrão do tônus parassimpático (bpm) dos grupos controle (CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-MA) submetidos ao teste de Tukey ($p > 0,05$).

Grupos	Tônus parassimpático (bpm)
CON-MA	$-13,9 \pm 12,6$ A
OLE-MA	$5,18 \pm 27,2$ A

*Médias com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

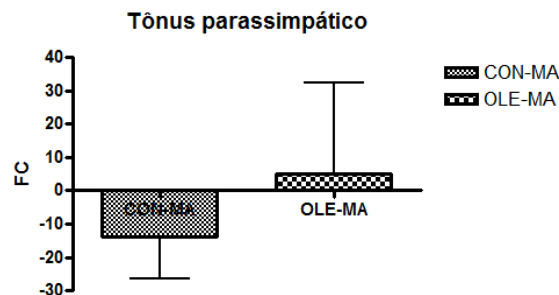


Figura 32: Valores médios do tônus parassimpático (bpm) dos grupos controle (CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-MA) submetidos ao teste de Tukey ($p > 0,05$).

Como medida final da modulação autonômica, o Índice Autonômico ou Índice Simpático Vagal (ISV) não apresentou diferença estatística entre os grupos estudados pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Os resultados estão apresentados na Tabela 14 e na Figura 33.

Tabela 14: Valores médios e desvio padrão do Índice Simpático Vagal dos grupos controle (CON-AM e CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM e OLE-MA) submetidos ao teste de Tukey ($p > 0,05$).

Grupos	ISV
CON-AM	$1,14 \pm 0,13$ A
CON-MA	$1,29 \pm 0,14$ A
OLE-AM	$1,26 \pm 0,31$ A
OLE-MA	$1,27 \pm 0,17$ A

*Médias com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

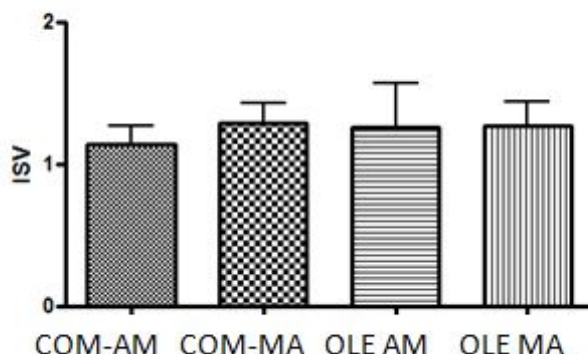


Figura 33: Valores médios do Índice Simpático Vagal dos grupos controle (CON-AM e CON-MA) e intoxicados com *N. oleander* (OLE-AM OLE-MA) submetidos ao teste de Tukey ($p>0,05$).

Sabe-se que glicosídeos como a digoxina podem exercer sua atividade cardiotoxica de forma dependente da inervação simpato-vagal do coração (Goodman et al., 1975). Segundo Demiryürek e Demiryürek, 2005, o aumento do tônus simpático pode estar envolvido com a indução da cardiotoxicidade de digitálicos em altas doses, sendo que o uso de bloqueadores adrenérgicos diminuem potenciais arritmias. Assim, baseado em protocolos farmacológicos conhecidos, foi possível avaliar a influencia do extrato da planta na função autonômica cardíaca (Goldeberger, 1999; Martins, 2007; Brandólis, 2009).

Não foram observadas alterações na FC basal nos animais que receberam o extrato, ao contrário dos indícios do experimento 1, em que a FC foi inferior em animais que receberam 150mg/kg (teste de Tukey, $p<0,05$). Os animais do experimento 1 podem ter apresentado diminuição da FC pelo efeito compensatório às arritmias encontradas independentemente da ação direta do extrato no sistema autonômico.

Após a administração de atropina, antagonista colinérgico, observa-se o aumento da FC no grupo controle, já esperada no bloqueio do ramo parassimpático. Mas quando a mesma é aplicada em animais intoxicados, provocou uma queda na FC, o que pode ser explicado pelo efeito reflexo que 3 dos 5 animais avaliados apresentaram. Após a administração da atropina os animais tiveram um aumento rápido da FC que não foi sustentado ao longo do traçado, causando, na avaliação média final, uma diminuição da FC.

Após a administração do metoprolol, bloqueador β - adrenérgico, observamos uma redução mais intensa da FC nos animais intoxicados em relação aos do grupo controle, o que corrobora com o achado de predomínio parassimpático visto a seguir no ISV. O duplo bloqueio não foi afetado pelas diferentes combinações de drogas usadas em animais controle e intoxicados, indicando que a manipulação farmacológica dos grupos teve resultado final semelhante. O tônus parassimpático apresentou desvio grande na comparação individual das médias, devido às variações da FC detectadas pelo método, o que determinou a média positiva do efeito vagal. Entretanto, em comparação com os grupos controles, os tônus simpático e parassimpático não sofreram alterações pela administração do extrato de *N. oleander* na dose de 150mg/kg.

O ISV mostra predomínio parassimpático em todas as combinações sem diferença entre grupos ($p>0,05$). Esses resultados em conjunto podem sugerir que o extrato não possui atividade autonômica significativa 1h após a intoxicação, sendo sua ação cardiotoxica apenas associada á

sua interação direta com os cardiomiócitos. Os resultados diferem de algumas citações na literatura que afirmam que os glicosídeos podem apresentar além da interação local na bomba NKA, influência sobre o sistema nervoso autônomo. Rezakhani e Mahan (1992) sugerem efeito dose-dependente da intoxicação por *N. oleander* na diminuição da FC, atribuída ao seu potencial parassimpático. Estudos com a digoxina e ouabaina determinaram que seu potencial farmacológico é dependente da inervação cardíaca (Goodman et al., 1975) e que podem modular a atividade de fibras pós-ganglionares por meio de ação primária central (Weaver et al., 1976; Watanabe, 1985). Sabe-se que a oleandrina pode ultrapassar a barreira hemato-encefálica (Ni et al., 2002) e que tem efeitos neurológicos centrais (Siddiqui et al., 1997), mas a modulação farmacológica do sistema nervoso autônomo no presente estudo não permite afirmar que sua ação possa ser associada essa via. No entanto, outros estudos são necessários para confirmar que não há influência dos glicosídeos da *N. oleander* no SNA.

5.10 Efeitos da *N. oleander* na fisiologia dos cardiomiócitos

Os cardiomiócitos isolados de camundongos foram submetidos a análises de viabilidade celular, contratilidade, transiente de cálcio e ensaios de *patch clamp* para determinar possíveis alterações no potencial de ação e no funcionamento da bomba NKA. O teste de viabilidade celular foi feito em triplicata e o resultado da média final comparado entre as células controle (sem extrato) e as células submetidas a tratamento com 0,3mg/mL de extrato. Não foram encontradas diferenças entre a viabilidade das amostras ($p>0,05$) como mostra a Tabela 15 e a Figura 34.

Tabela 15. Valores médios dados em porcentagem do número de células viáveis e não viáveis dos grupos de cardiomiócitos controle e tratadas com 0,3 mg/mL de extrato de *N. oleander*.

Viabilidade celular (%)	Controle	OLE 0,3 mg/mL
Células não viáveis	31,3 A	31,6 A
Células viáveis	68,6 B	68,4 B

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste de T ($p>0,05$).

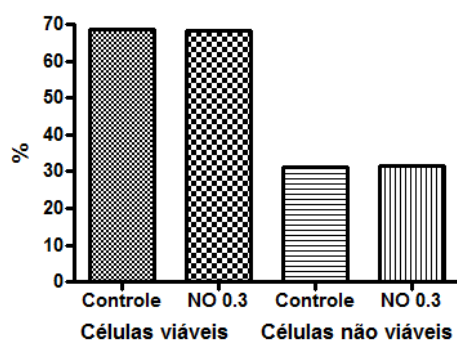


Figura 34: Valores médios dados em porcentagem do número de células viáveis e não viáveis do grupo de cardiomiócitos controle e tratadas com 0.3mg/mL de extrato de *N. oleander*; teste de T ($p>0,05$).

Esses resultados mostram que as células permanecem viáveis em detrimento das disfunções elétrico-mecânicas causadas pelo extrato de *N. oleander*. Esse achado corrobora com os resultados encontrados na histologia e na avaliação das enzimas marcadoras cardíacas. A ausência de aumento da CK-MB, cTnI e de achados compatíveis, como necrose ou apoptose no coração, indicam que a falência elétrica do coração é o mecanismo mais provável de atuação da *N. oleander*.

O potencial bloqueio da bomba NKA foi avaliado em comparação com a ouabaína em meio na presença e ausência de potássio, por meio do método de *patch clamp*. Foi possível observar que o extrato na concentração de 0,3mg/mL é capaz de bloquear a bomba NKA de forma semelhante á ouabaína. Além disso, o bloqueio causado pelo extrato é reversível, uma vez que após a lavagem da solução, a bomba retoma à sua atividade normal (Figura 35).

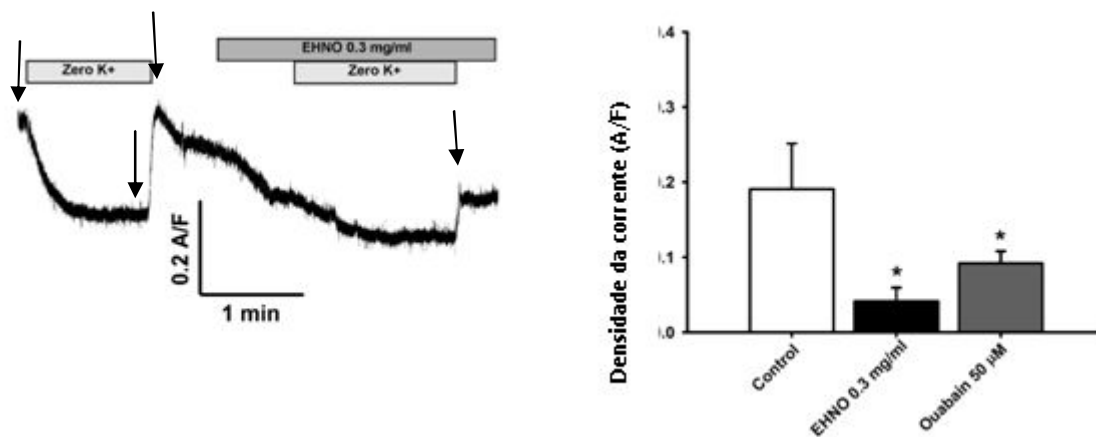


Figura 35: A- Queda da corrente elétrica promovida pela bomba NKA dos cardiomiócitos após adição de 0,3mg/mL de extrato de *N. oleander*. Setas indicando na sequência: 1- a retirada do K⁺ do meio extracelular para estabelecer o estado inicial do funcionamento da bomba NKA; 2- inserção do K⁺ solução para restabelecer o funcionamento da bomba NKA; 3- adição do extrato de *N. oleander* 0,3mg/mL mostrando o decaimento da função da bomba; 4- lavagem da solução com o extrato e inserção de solução com K⁺ mostrando o decaimento a retomada da função da bomba após a lavagem das soluções e restabelecimento dos níveis de K⁺. B- Análise da corrente elétrica da bomba de NKA dos grupos controle, 0,3mg/mL de extrato de *N. oleander* e 50µM de ouabaína. * Redução da corrente da bomba em comparação com o grupo controle (p<0,05).

Desde o início da década de 1940, é sabido que a excitabilidade celular é acompanhada do influxo de Na⁺ e efluxo de K⁺, de forma que para que os gradientes de concentração desses íons sejam mantidos, um fluxo reverso e equivalente deve ocorrer. Um dos principais componentes celulares envolvidos nesse processo é a NKA, que quando bloqueada pelos glicosídeos da *N. oleander* compromete a extrusão de Na⁺ dos cardiomiócitos provocando aumento na concentração intracelular desse íon (Clausen et al., 1998).

A mudança no gradiente eletroquímico do Na⁺ influencia a atividade de outros componentes celulares. Em nosso modelo, é possível hipotetizar que a redução do gradiente de Na⁺ decorrente do bloqueio de NKA pode acometer a função direta do trocador NCX. Essa proteína transportadora atuando em seu modo direto, internaliza três íons Na⁺ para cada um Ca²⁺ extrusado para fora do citoplasma, constituindo um componente essencial na manutenção das propriedades elétricas e contráteis do coração, regulando os estoques intracelulares de Ca²⁺. A redução da atividade do NCX pode dessa maneira determinar o acúmulo de Ca²⁺ no citoplasma, que culmina na modulação das propriedades eletromecânicas do coração, como discutido adiante (Bers, 2001; Bers, 2002). Assim, para determinar a possível alteração do balanço de Ca²⁺ nos cardiomiócitos permeados com extrato de *N. oleander*, foi realizada a medida do transiente desse íon. O pico do transiente de cálcio, dado pela razão entre a fluorescência máxima e fluorescência basal (F/F₀), durante o transiente foi menor nas células dos animais tratados com o extrato quando comparadas às células do grupo controle (p < 0,05) (Figura 36).

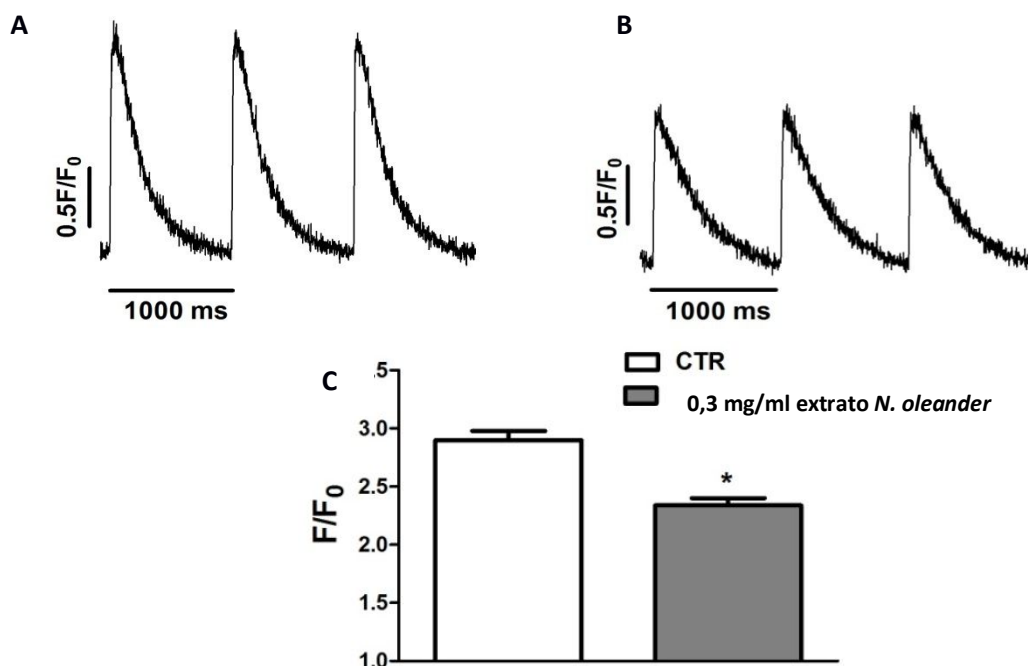


Figura 36: Transiente global de Ca^{2+} em cardiomiócitos de animais controle (A) e expostos ao extrato de *N. oleander* na dose de 0,3mg/mL (B) Figuras representativas da varredura de cardiomiócitos incubados com a sonda sensível a Ca^{2+} , estimulados com pulsos elétricos de células expostas a PBS (controle) e ao extrato de *N. oleander*. (C) Pico do transiente de cálcio ilustrando a relação entre fluorescência máxima sobre a fluorescência basal mostrando a diminuição do transiente no grupo tratado. (Os dados são expressos como média \pm EPM, * $p < 0,05$ em relação ao controle).

A administração do extrato também promoveu a diminuição da velocidade de decaimento do transiente de Ca^{2+} , indicando possível falha na recaptção intracitoplasmática do íon, prolongando sua presença no meio intracelular ($p < 0,05$) (Figura 37).

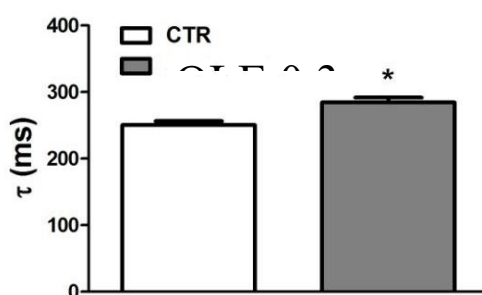


Figura 37: Constante de decaimento do transiente de Ca^{2+} (τ ms) cardiomiócitos de animais controle e expostos ao extrato de *N. oleander* na concentração de 0,3 mg/mL. Constante de decaimento do transiente de Ca^{2+} é maior nas células que receberam o extrato de *N. oleander* se comparadas às células do grupo controle. (Os dados são expressos como média \pm EPM, * $p < 0,05$ em relação ao controle).

A diminuição do pico do transiente do Ca^{2+} associada ao prolongamento do decaimento desse íon pode ser justificada pelo desbalanço decorrente do bloqueio da bomba NKA. Com o acúmulo de Na^+ intracelular e a possível alteração do trocador NCX, os íons Ca^{2+} podem estar mais presentes no citoplasma. De fato, alterações na fisiologia do cálcio intracelular são as

maiores causas de disfunções contráteis e arritmias na patofisiologia da falência cardíaca (Bers e Despa, 2006).

O aumento na concentração de Ca^{2+} do citoplasma ocorre de maneira transiente, e dessa forma, sua concentração deve ser restaurada para que o relaxamento dos sarcômeros se proceda. No miócito cardíaco existem quatro principais componentes envolvidos na restauração da concentração diastólica de Ca^{2+} : recaptção pela SERCA dependente de ATP restituindo o conteúdo de Ca^{2+} do RS; pelo sistema uniporte de Ca^{2+} na mitocôndria; pela bomba de Ca^{2+} dependente de ATP presente no sarcolema e pelo NCX, sendo que esses dois últimos componentes determinam a extrusão de Ca^{2+} da célula, compensado de forma precisa pelo influxo desses íons pelos canais de Ca^{2+} tipo *L* (Bers, 2002, Venetucci et al., 2008).

O prejuízo na função do NCX, dessa forma, determina o acúmulo de Ca^{2+} no citoplasma e/ou nos estoques de Ca^{2+} celulares (por exemplo, no RS e mitocôndria). É sabido que o acúmulo de Ca^{2+} nas mitocôndrias pode comprometer sua funcionalidade, causando redução da eficiência da cadeia respiratória, do metabolismo oxidativo e eventualmente acarretando destruição das mitocôndrias e sinalização para a apoptose (Santulli et al., 2015). No presente trabalho, por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, observa-se alterações na morfologia mitocondrial, evidenciada pela destruição das cristas mitocondriais, tumefação estrutural e perda da forma em comparação com o grupo controle. De maneira interessante, já foi descrito que o influxo de Ca^{2+} na matriz mitocondrial causado por glicosídeos cardioativos é acompanhado do influxo de água, promovendo o *swelling* mitocondrial, que pode comprometer o seu potencial de membrana e a fosforilação oxidativa (Ramirez-Ortega et al., 2007).

A destruição das cristas mitocondriais prejudica diretamente a produção de ATP, que por consequência atrapalha o funcionamento da Ca^{2+} /ATPase do sarcolema e do fosfolambam (PLB), peptídeo responsável pela modulação da atividade da SERCA. Uma vez desfosforilada, a PLB inibe a recaptção do Ca^{2+} pela SERCA, o que em nosso modelo determina o aumento ainda maior do Ca^{2+} no citoplasma dos cardiomiócitos (Bers, 2002). Corroborando esses resultados, em nossos experimentos observamos redução da taxa de decaimento do transiente citoplasmático do íon, o qual é primariamente determinado pela atividade dessa proteína. As vias e mecanismos pelos quais é possível afirmar que essa modulação ocorre ainda são desconhecidos. Mas é possível supor que haja modulação da atividade da SERCA, responsável por maior parte da recaptção fisiológica de Ca^{2+} intracelular.

Não obstante, observa-se também redução da amplitude do transiente de Ca^{2+} . Esse resultado à primeira vista pode parecer contraditório, quando se considera a possível redução da função do NCX e da NKA, o que determinaria o aumento da concentração citoplasmática de Ca^{2+} no citoplasma e conseqüentemente nos estoques celulares, como discutido acima para a mitocôndria. Entretanto, como já descrito, a recaptção do Ca^{2+} para o RS está prejudicada em células expostas ao extrato de *N. oleander*. Além disso, a amplitude do transiente é obtida a partir da razão entre a fluorescência máxima e a fluorescência basal. O aumento na concentração diastólica de Ca^{2+} pode, dessa forma, determinar a redução dessa razão.

Com o provável prolongamento da disponibilidade do Ca^{2+} no citoplasma, é possível inferir mudanças na maquinaria contrátil do coração. A maior disponibilidade do íon faz com ele se ligue à troponina de C de forma mais eficaz, promovendo aumento na interação entre os filamentos de actina e miosina, e conseqüentemente da formação de pontes cruzadas, o que finalmente determina aumento no encurtamento do sarcômero e na contratilidade celular. Para confirmar as alterações na contratilidade, foram realizados experimentos testando diferentes doses do extrato nos cardiomiócitos isolados.

A concentração de 10mg/mL de extrato de *N. oleander* não permitiu as análises de contratilidade, pois interrompeu completamente a atividade mecânica dos cardiomiócitos. Foi possível realizar, nas concentrações 0,1mg/mL, 0,3mg/mL e 1mg/mL as seguintes análises: % de arritmias, comprimento diastólico, fração de encurtamento, taxa máxima de contração e relaxamento, tempo para o pico, 50% da taxa de relaxamento e 90% da taxa de relaxamento.

Não foram encontradas alterações relevantes nos parâmetros % de arritmias e comprimento diastólico, como demonstra a Tabela 16 ($p < 0,05$).

Tabela 16: Avaliação do comprimento diastólico e arritmias dos cardiomiócitos dos grupos controle, 0,1mg/mL, 0,3mg/mL e 1mg/mL de extrato de *N. oleander*.

Grupos	Comprimento diastólico	Arritmias	N
Controle	132,96 ± 2,66 A	1,59 ± 0,43 A	55
0,1mg/mL	128,69 ± 3,05 A	0,43 ± 0,31 A	14
0,3mg/mL	142,06 ± 5,15 A	2,26 ± 1,49 A	15
1mg/mL	128,94 ± 10,79A	3,87 ± 2,00 A	8

*Médias com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A utilização do camundongo nos experimentos de *patch-clamp* implicam certas diferenças fisiológicas à resposta aos glicosídeos em relação aos cobaios dos experimentos *in vivo*. A ausência de arritmias na avaliação da contratilidade, reafirmada na análise do potencial de ação (descrita a seguir), pode estar associada a essas distinções. Esse fato está relacionado à diferença da contribuição individual de cada componente envolvido no manejo intracelular de cálcio entre as espécies usadas no experimento 1 e 3. Os cobaios, assim como os coelhos e humanos tem cerca de 70% do Ca^{2+} removido das células por meio da SERCA, apenas 28% pela NCX e 2% para o transportador *uniporter* mitocondrial. Enquanto em ratos e camundongos, a participação da SERCA atinge até 92% da contribuição de retirada, sendo 7% pela NCX (Hove-Madsen e Bers, 1993; Bassani et al., 1994; Li et al., 1998). A menor participação do trocador NCX no transporte de Ca^{2+} dos camundongos faz com que eles sejam menos susceptíveis à geração de *trigger activity* induzida por *afertdepolarizations* e, por conseguinte às arritmias provocadas pelas alterações da bomba NKA, apesar de apresentarem fisiologicamente os mesmos fenômenos estudados nas outras espécies, apenas como menor representatividade final.

As doses de 0,1mg/mL, 0,3mg/mL e 1mg/mL permitiram a avaliação da contratilidade celular. A fração de encurtamento é um parâmetro indicativo da capacidade contrátil da célula, capaz de avaliar a mudança do seu estado de repouso para o contraído. A concentração de 1mg/mL provocou aumento da fração de encurtamento em relação às outras concentrações estudadas ($p < 0,05$) (Figura 38).

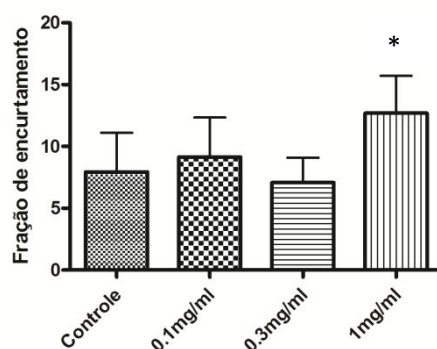


Figura 38: Fração de encurtamento. Controle (n=55); 0,1mg/mL (n=14); 0,3mg/mL (n=15); 1mg/mL (n=8). Resultados expressos como médio e desvio (*p<0,05 em relação aos grupos controle, 0,1mg/mL, 0,3mg/mL; One-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey).

A avaliação das taxas máximas de contração e relaxamento revelou o mesmo resultado. Houve um aumento de ambas as taxas na concentração de 1,0mg/mL se comparada ao controle e à 0,1mg/mL, como mostra a Figura 39 (p<0,05). A dose de 1,0mg/mL foi capaz de aumentar a velocidade de contração e a fração de encurtamento celular, mas é necessário destacar que nessa concentração apenas 44% células amostradas puderam ser avaliadas, 56% do total não apresentaram atividade contrátil.

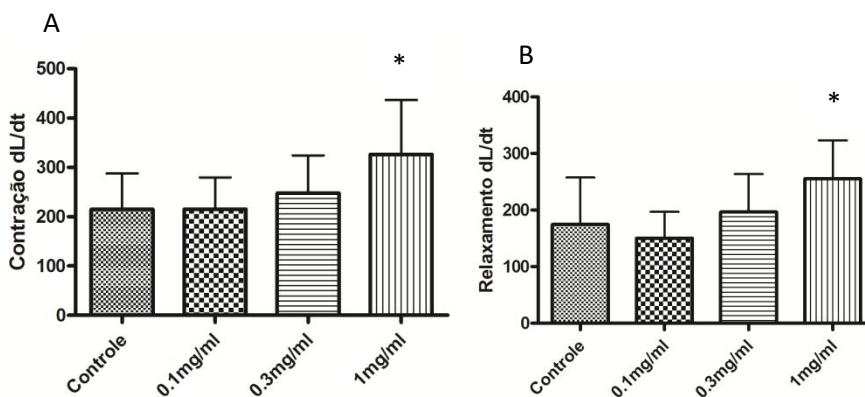


Figura 39: Taxas máximas de contração (A) e relaxamento (B). Controle (n=55); 0,1mg/mL (n=14); 0,3mg/mL (n=15); 1mg/mL (n=8). Resultados expressos como médio e desvio (*p<0,05 em relação aos grupos controle, 0,1mg/mL; One-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey).

Esses resultados indicam que o extrato exerce atividade sobre a contração e relaxamento celular, aumentando a velocidade de contração e de encurtamento na dose de 1mg/mL. De maneira coerente, outros estudos apontam inotropismo positivo quando da utilização de digitálicos. Desde 1785, os digitálicos são utilizados para o tratamento de insuficiência cardíaca congestiva e apenas em 1953, Schatzmann descreveu sua inibição da bomba de NKA implicando no inotropismo positivo do coração, aumentando a força de contração no músculo desgastado na falência congestiva (Reuter et al., 2002).

Como um número considerável de células não apresentaram atividade contrátil foi realizado experimento para avaliação do potencial de ação, considerando que o desbalanço eletroquímico causado pelo bloqueio da bomba NKA está relacionado com as arritmias encontradas no experimento *in vivo*.

Por meio da técnica de *patch-clamp* observa-se que a adição do extrato de *N. oleander* na dose de 10 mg/mL inibe a capacidade do miócito cardíaco em gerar PAs em uma porcentagem de 77%, com perda total da excitabilidade celular (Fig. 40), corroborando com os achados de contratilidade, onde nessa concentração não foram possíveis fazer as medidas de encurtamento e relaxamento. Nas concentrações de 0,3mg/mL e 0,1mg/mL temos respectivamente as proporções de 60% e 0% de perda da excitabilidade celular.

A adição do extrato também promoveu a despolarização do potencial de repouso, de maneira rápida e reversível na concentração de 10 mg/mL. A figura 40 ilustra que antes da administração do extrato o potencial de repouso das células estava estabilizado e sem grandes alterações, o que sugere que o efeito sobre o potencial de repouso é realmente induzido pelo extrato e não por diferenças individuais dentro da amostragem de células.

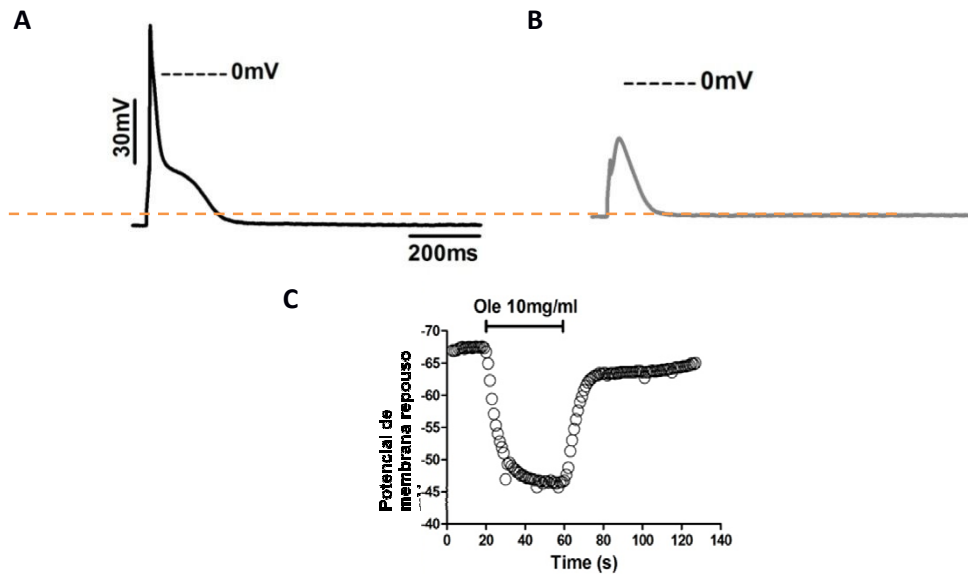


Figura 40: Gráfico representativo dos traçados do potencial de ação. Redução do PA nas células tratadas; * $p < 0,05$. A: controle; B: 10mg/mL de extrato de *N. oleander*. C)- Curso temporal representativo do efeito da administração de *N. oleander* no potencial de repouso dos cardiomiócitos, evidenciando a indução de despolarização de maneira rápida e reversível induzida pelo extrato. Cada círculo aberto representa o potencial de repouso registrado para um potencial de ação, com frequência de estimulação de 1 Hz.

As análises da amplitude do PA, taxa máxima de despolarização, taxa máxima de repolarização, e tempo para 50 e 90% da repolarização foram avaliadas a partir de potenciais de ação obtidos de células expostas à concentração de 0,3mg/mL do extrato de *N. oleander* (Figura 41).

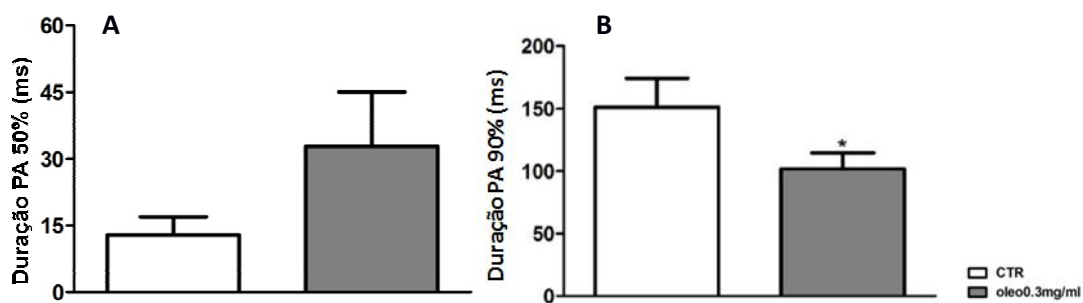


Figura 41: Duração máxima do potencial de ação 50% (Figura A) e a 90% (Figura B) em células controle e submetidas a 0.3m/ml de extrato de *N. oleander** $p < 0,05$ em relação ao controle.

A amplitude do PA também foi alterada pela adição de extrato de *N. oleander*, que diminuiu de forma importante frente às células do grupo controle, com redução das taxas de despolarização e repolarização (Figuras 42 e 43) ($p < 0,05$).

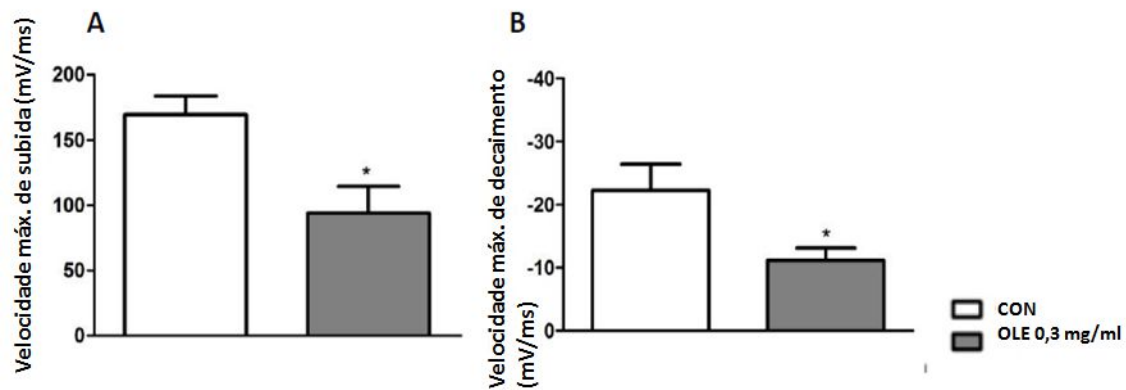


Figura 42: Potencial de ação de células controle e submetidas a 0,3m/ml de extrato de *N. oleander*. A- Máxima velocidade de despolarização celular. Redução nas células tratadas * $p < 0,05$ em relação ao controle. B- Máxima velocidade de repolarização celular. Redução nas células tratadas; * $p < 0,05$ em relação ao controle.

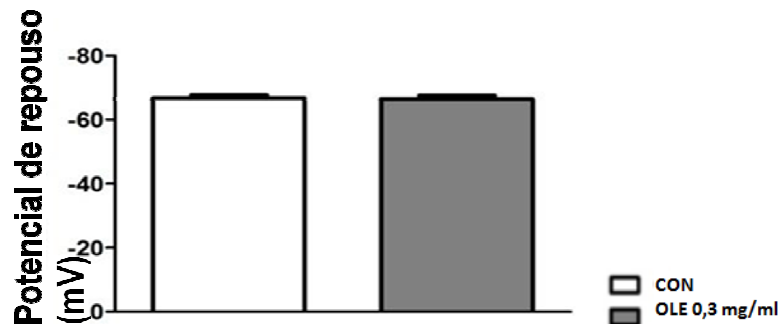


Figura 43: Potencial de repouso da membrana de células controle e submetidas a 0,3mg/mL de extrato. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Os resultados indicam que a adição do extrato de *N. oleander* inibe de forma dose-dependente a capacidade do miócito cardíaco em gerar PAs, bem como altera sua forma morfológica. As principais alterações observadas foram: redução da amplitude do PA, redução das taxas máximas de despolarização e repolarização, despolarização do potencial de repouso e redução do tempo para repolarização do PA. Esses resultados revelam a gravidade da disfunção elétrica celular.

A despolarização de potencial de repouso induzida pelo extrato pode ser explicada pela redução da atividade da NKA, o que prejudica os gradientes de Na^+ e K^+ . A redução do gradiente de K^+ tem um impacto importante no potencial de membrana, por ser o íon que apresenta maior condutância no repouso através da membrana dessas células. A diminuição da amplitude do PA, por outro lado, pode ser atribuída à redução do gradiente de Na^+ , o que pode acarretar redução da densidade dessa corrente, de modo que a inativação dos canais de Na^+ se proceda em um potencial menos despolarizado comparado aos de células não expostas à droga. Somado a esse processo, a despolarização celular pode determinar uma menor disponibilidade da fração total dos canais de Na^+ em função da dependência de voltagem para a ativação estacionária desses canais (Bers, 2002; Bers, 2006).

Nos experimentos, observa-se uma redução do tempo para que se concretize 90% repolarização. Um componente iônico importante para a repolarização celular e manutenção do potencial de repouso é a corrente de K^+ sensível ao ATP. Esses canais são bloqueados na presença de Mg-ATP. As alterações na morfologia mitocondrial discutidas anteriormente

sugerem redução dos estoques de ATP celulares decorrentes da perda de função mitocondrial. Esse fato pode estar correlacionado, dessa forma, com o aumento do corrente de potássio tipo KATP e conseqüentemente redução do tempo de repolarização do PA. De fato, diversos estudos apontam redução da duração do PA cardíaco em eventos de hipóxia, associado à redução dos estoques de ATP e conseqüentemente ativação do KATP (Nerbonne & Kass, 2005) De forma importante, a presença de mais Ca^{2+} no citoplasma durante o período diastólico discutidas anteriormente pode induzir a ocorrência de *sparks* de cálcio. Esses eventos estão associados com processos conhecidos como *afterdepolarizations*, que são despolarizações do potencial de membrana que ocorrem no intervalo entre dois eventos de excitação celular. Quando em magnitude suficiente, esses eventos podem induzir uma contração adjacente da célula cardíaca, determinando um evento de arritmia celular. Essas arritmias podem se propagar pelo tecido cardíaco e determinar arritmias por todo o órgão, processo conhecido como *afterdepolarization related triggered activity* (Cheng et al., 2008). Esses resultados estão em concordância com a presença de arritmias observadas no ECG dos cobaios sob efeito da *N. oleander*. As alterações no PA se relacionam também com os achados da contratilidade celular, ilustrando que o extrato pode aumentar a velocidade de contração cardíaca, mas atrasar e alterar a condução do impulso elétrico celular como mostram os resultados das taxas de despolarização e repolarização, novamente contribuindo para o efeito arritmogênico da *N. oleander*.

6. CONCLUSÕES

Ao longo desse trabalho foram investigados os mecanismos pelos quais a *N. oleander* provoca arritmias cardíacas graves, bem como sua atividade inotrópica e alterações clínico-patológicas. De maneira geral, foi possível concluir que a atividade cardiotóxica da *N. oleander*, atribuída aos seus glicosídeos cardioativos, se dá pela sua interação direta com os cardiomiócitos causando arritmias nas doses estudadas. Por meio da inibição da bomba de NKA, os glicosídeos causam alterações eletroquímicas importantes que associadas a uma possível sobrecarga de cálcio no citoplasma e disfunção mitocondrial promovem as arritmias que levam os animais ao óbito. A causa *mortis* é dada pelo distúrbio elétrico na formação e condução do impulso no miocárdio, independente do sistema nervoso autônomo, causando a falência cardíaca aguda.

7. REFERÊNCIAS

- ABBASI, M.H.; FATIMA, S.; NAZ. et al. Effect of *Nerium oleander* (N.O.) Leaves Extract on Serum *hepcidin*, Total Iron, and Infiltration of ED1 Positive Cells in Albino Rat. *Biomed. Res. Int.*, v. 2013, p.8, 2013.
- ADAM, S.E.I.; AL-YAHYA, M.A.; AL-FARHAN, A.H. Acute toxicity of various oral doses of dried *Nerium oleander* leaves in sheep. *Am. J. Chin. Med.*, v. 29, n.3-4, p. 525-532, 2001.
- AKERA, T. YAMAMOTO, S.; CHUBB, J. et al. Biochemical basis of the low sensitivity of the heart to digitalis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 308, p. 81-88, 1979
- AKHTAR, T.; SEHIKH, N.; ABBASI, M.H. Clinical and pathological features of *Nerium oleander* extract toxicosis in wistar rats. *BMC Res. Notes*, v. 23, p. 940-947, 2014.
- AL-FARWACHI, M.I. In vivo immunomodulatory activities of *Nerium oleander* aqueous leaf extract in rabbits. *J. Anim. Vet. Adv.*, v. 6, p. 1047-1050.
- AL-FARWACHI, M.I.; RHAYMAH, M.S.; AL-BADRANI, B.A. Acute toxicity of *Nerium oleander* aqueous leaf extract in rabbits. *Iraqi J. Vet. Sci.*, v.22, n.1, p.1-4, 2008.
- ALFONSO, H.A.; SANCHEZ, L.M.; MERINO, N et al. Intoxication due to *Nerium oleander* in geese. *Vet. Human Toxicol.*, v. 36, p.47, 1994.
- ALTAEI, M.F. In vivo toxicity study of *Nerium oleander's* leaves and flowers aqueous extracts in mice (Cytogenetic, Biochemical and Hematological Study). *Baghdad Sci. J.*, v.8, p. 366-372., 2011.
- ANADON, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑA, M.R.; CASTELLANO, V. *Poisonous plants of Europe*. In: GUPTA, R.C. Veterinary toxicology: basic and clinical principles. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier: Academic Press, cap. 78, p. 1080-1087, 2012.
- ASGHARI, A.; OZMAIE, S.; SAKHA, M. Propranolol hydrochloride and activated charcoal as a treatment of experimental oleander poisoning in sheep. *Adv. Environ. Biol.*, v. 5, p. 1401-1406, 2011.
- ASLANI, M.R.; MOVASSAGHI, A.R.; JANATI-PIROUZ, H. et al. Experimental oleander (*Nerium oleander*) poisoning in goats: a clinical and pathological study. *Iran. J. Vet. Res.*, v.8, n.1, p.18, 2007.
- ASLANI, M.R.; MOVASSAGHI, A.R.; MOHRI, M. et al. Clinical and pathological aspects of experimental oleander (*Nerium oleander*) toxicosis in sheep. *Vet. Res. Commun.*, v.28, p. 609-616. 2004.
- BAKKALI, H.; ABABOU, K.; NASSIM, S.T. et al. Les brulures chimiques par le laurier rose. *Ann. Burns Fire. Disasters*, v. 23, n. 3, 128-131, 2010.
- BANDARA, V.; WEINSTEIN, S. A. et al. A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. *Toxicon*, v.56, p. 273-281, 2010.
- BARBOSA, R.R.; FONETELE-NETO, J.D.; SOTO-BLANCO, B. Toxicity in goats caused by oleander (*Nerium oleander*). *Res. Vet. Sci.*, v. 85, p. 279-281, 2008.
- BARRETTO, A.C.P.; RAMIRES, J.A.F. Insuficiência Cardíaca. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 7, n.4, p. 635-343, 1998.
- BAS, A.L.; DEMIRCI, S.; YAZIHAN, N. et al. *Nerium oleander* distillate improves fat and glucose metabolism in high-fat diet-fed streptozotocin induced diabetic rats. *Int. J. Endocrinol.*, p. 1-10, 2002.

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

BĚBAROVÁ, M. Advances in patch clamp technique: towards higher quality and quantity. *Gen. Physiol. Biophys.*, v. 31, p. 131-140, 2012.

BEGUM, S.; SIDDIQUI, B.S.; SULTANA, R. et al. Bio-active cardenolides from the leaves of *Nerium oleander*. *Phytochemistry*, v.50, p. 435-438, 1999.

BERNE, RM, LEVY MN, KOEPPEN BM. et al. *Fisiologia*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2009.

BERS, D.M. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force, *Developments in Cardiovascular Medicine*, v. 237, 2001.

BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, v. 415, p. 198-205, 2002.

BERS, D.M.; DESPA, S. Cardiac myocytes Ca^{2+} and Na^{+} regulation in normal and failing hearts, *J. Pharmacol. Sci.*, v. 100, p. 315-322, 2006.

BOURGEOIS, B.; INCAGNOLI, P.; HANNA, J. et al. Traitement par anticorps antidigitalique d'une intoxication volontaire par laurier rose. *Ann Fr Anesth Reanim.*, v. 24, p. 640-642, 2005.

BRAMLET, D.A.; MORRIS, K.G.; COLEMAN, R.E. et al. Effects of rate-dependent left bundle branch block on global and regional left ventricular function. *Circulation*, v. 67, n. 5, 1983.

BRANDÓLIS, R.A.M. Modulação autonômica cardiovascular no modelo experimental de obesidade induzida por glutamato monossódico em ratos. 97f. Dissertação (Mestrado em Patologia)- UFTM, Patologia, 2009.

BREIDTHARDT, T.; CHRIST, M.; MATTI, M. et al. QRS and QTc interval prolongation in the prediction of long-term mortality of patients with acute destabilized heart failure. *Heart*, v.93, p. 1093-1097, 2007.

BROWN, L.; WERDAN, K.; ERDMANN, E. Consequences of specific (3H) ouabain binding to guinea pig left atria and cardiac cell membranes. *Biochem. Pharmacol.*, v. 32, p. 423-435, 1983.

CALDERÓN-MONTAÑO, J.M.; BURDOS-MÓRON, E.; ORTAL, M.L. et al. A hydroalcoholic extract from the leaves of *Nerium oleander* inhibits glycolysis and induces selective killing of lung cancer cells. *Planta Med.*, v. 79, p.1017-1023, 2013.

CALONI, F.; CORTINOVIS, C.; RIVOLTA, M. et al. Animal poisoning in Italy: 10 years of epidemiological data from the Poison Control Centre of Milan. *Vet. Rec.*, v. 170, p.16-415, 2012.

CAMPHAUSEN, C.; HASS, N.A.; MATTKE, A.C. Successful treatment of oleander intoxication (cardiac glycosides) with digoxin-specific Fab antibody fragments in a 7-year-old child. *Z. Kardiol.*, v. 94, p. 817-823, 2005.

CAMPLESI, A.C.; SAKATE, M.; SIMÃO, N.M.B. et al. Dosagem de marcadores cardíacos CK-MB e TnIc e eletrólitos no envenenamento experimental por veneno de sapo em cães. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 29, n.8, p. 632-636, 2009.

CHENG, H.; LEDERER, W.J.; CANNELL, M.B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*, v. 29, n. 262, p. 740-744, 1993.

CHEUNG, K.; HINDA, J.A.; DUFFY, P. Detection of poisoning by plant-origin cardiac glycoside with the Abbott TDx Analyser. *Clin. Chem.*, v. 35, n.2, p. 295-297, 1989.

CHOWDHRY, M.G.A.; AZIZUNNESA; HOSSAIN, M.A. et al. Effect of *Nerium oleander* poisoning on blood of male guinea pigs. *Bangl. J. Vet. Med*, v.3, n.1, p. 71-73, 2005.

CLARK, R.F.; SELDEN, B.C.; CURRY, S.C. Digoxin-specific Fab fragments in the treatment of oleander toxicity in a canine model. *Ann. Emerg. Med.*, v.20, p. 2073-2077, 1991.

CLAUSEN, T.; NIELSEN, O.B.; HARRISON, A.P. et al. The Na⁺,K⁺ pump and muscle excitability. *Acta Physiol. Scand.*, v. 162, n. 3, p. 183-190, 1998.

COSTANZO, L. S. *Fisiologia*. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

CRUZ, G.L. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, p. 599, 1979.

DEMIRYUEK, A.T.; DEMIRYUEK, S. Cardiotoxicity of digitalis glycosides: role of autonomic pathways, autacoids and ion channels. *Autonomic & Autacoid Pharmacology*, v. 25, p. 35-52, 2005.

DERWICH, E.; BENZIANE, Z.; BOUKIR, A. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil from flowers of *Nerium oleander*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, v.9, n.6, p. 1074-1084, 2010.

DORSEY, C. Plant dermatitis in California. *Calif. Med.*, v. 96, n. 6, p. 412-413, 1962.

EBNER, F.; SIEGL, H. Frequent stimulation of the guinea-pig myocardium raises the inotropic effect of tissue-bound ouabain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 334, p. 475-479, 1986.

EDDLESTON, M.; WARREL, D.A. Management of acute yellow oleander poisoning. *Q. J. Med.*, v. 92, p. 483-485, 1999.

FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.*, v. 245, p. 1-14, 1983.

FULLER, W.; TULLOCH, L.B.; SHATTOCK, M.J. et al. Regulation of the cardiac sodium pump. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 70, p. 1357-1380, 2013.

GALLEY, F.D.; HOLSTEGE, D.M.; PUMLEE, K.H. Diagnosis of oleander poisoning in livestock. *J. Vet. Diagn. Inves.*, v. 8, n.3, p. 358-364, 1996.

GARBEROGLIO, L.; GIUSETTO, C.; WOLPERT, C. et al. Is acquired short QT due to digitalis intoxication responsible for malignant ventricular arrhythmias? *Journal of Electrocardiology*, v. 40, p. 43-46, 2007.

GAZTAÑAGA, L.; MARCHLINSKI, F.E.; BETENSKY, B.P. Mechanism of cardiac arrhythmias. *Rev. Esp. Cardiol.*, v. 65, p. 174-185, 2012.

GEERING, K. FX₂D proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, v. 290, p. 241-250, 2006.

GEYIK, B.; OZDEMIR, O.; OSMONOV, D. et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and electrocardiographic variables associated with increased risk of complete atrioventricular block and mortality in patients with acute inferior myocardial infarction. *Cardiol. K.*, v. 19, p. 479-486, 2012.

GOLDBERGER, J.J. Sympathovagal balance: how should we measure it? *Am J Physiol.*, p. 273-281 1999.

GOODMAN, D.J.; ROSSEN, R.M.; CANNOM, D.S. et al. Effect of digoxin on atrioventricular conduction. *Circulation*, v. 51, p. 251-258, 1975.

GUATIMOSIM, S.; SOBIE, E.A.; DOS SANTOS CRUZ, J. et al. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca(2⁺) current. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, v. 280, n. 5, p. 1327-1339, 2001.

- HADIZADEH, I.; PERIVASTEGAN, B.; KOLAH, M. Antifungal activity of Nettle (*Urtica dioica* L.), Colocynthis (*Citryllus colocynthis* L. Schrad), Oleander (*Nerium oleander* L.) and Konar (*Ziziphus spina-christi* L.) extracts on plants pathogenic fungi. *Pak. J. Biol. Sci.*, v. 12, n.1, p. 58-63, 2009.
- HAMIL, O. P.; MARTY, A.; NEHER, E. et al. Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.*, v. 391, p. 85-100, 1981.
- HANSEN, R.S.; OLESEN, S.P.; RONN, L.C.B. et al. In vivo effects of IKr agonist NS3623 on cardiac electrophysiology of the guinea pig. *J. Cardiovas. Pharmacol.*, v. 52, p. 35-41, 2008.
- HAUSER, D.S.; STADE, M.; SHMIDT, A. et al. Cardiovascular parameters in anaesthetized guinea pigs: a safety pharmacology screening model. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, v. 52, p. 106-114, 2005.
- HAYNES, B.E.; BESSEN, H.A.; WIGHTAMN, W.D. Oleander tea: herbal draught of death. *Ann Emerg. Med.*, v. 14, p. 350-3, 1985.
- HERZIG, S.; MOHR, K. Sodium load and high affinity ouabain binding in rat and guinea-pig cardiac tissue. *Br. J. Pharmacol.*, v. 84, n.3, p. 686-688, 1985.
- HOLLMAN, A. Plants and cardiac glycosides. *Br. Heart*, v. 7, p. 258-261, 1985.
- HOVE-MADSEN, L.; BERS, D.M. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and thapsigargin. *Circ. Res.*, v. 73, n. 5, p. 820-828, 1993.
- HUGHES, K.J.; DART, A.J.; HODGSON, D.R. Suspected *Nerium oleander* (Oleander) poisoning in a horse. *Aust. Vet. J.*, v. 80, p. 412-415, 2002.
- HUGUES, T.; ARNOULT, M.; BEAU, N. et al. Intoxication volontaire au laurier rose: cas Clinique et revue de la littérature. *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)*, v. 61, p. 128-131, 2012.
- IRONS, G.V.; ORGAIN, E.S. Digitalis-induced arrhythmias and their management. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, v.8, p. 531-539, 1966.
- ISHIKAWA, A.; YAMASHITA, H.; HIEMORI, M. et al. Characterization of inhibitors of postprandial hyperglycemia from the leaves of *Nerium indicum*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v. 53, p. 166-173, 2007.
- JAMES, P.F.; GRUPP, I.L.; WOO, A.L. et al. Identification of a specific role for the Na, K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart, *Mol. Cell.*, v. 3, n.5, p. 555-563, 1999.
- JOHN, R.M.; TEDROW, U.B.; KOPLAN, B.A. et al. Ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. *Lancet*, v. 380, p. 1520-1529, 2012.
- KANJI, S.; MACLEAN, R.D. Cardiac glycoside toxicity., *Pharm. Db. Crit. Care Clin.*, n.28, p. 527-535, 2012.
- KARAWYA, M.S.; BALBAA, S.I.; KHAYYAL, S.E. Estimation of cardenolides in *Nerium oleander*. *Planta Med.*, v.23, p 70-73, 1973.
- KARLISH, S.J.D.; KATZ, A.; KAPRI-PARDES, E. et al. The sodium-potassium pump: structure, function, regulation and pharmacology. *Life Science*, p. 1-3, 2008.
- KASSOP, D.; DONOVAN, M.S.; COHEE, B.M. et al. An unusual case of cardiac glycoside toxicity. *Int. J. Cardiol.* , v. 170, p. 434-444, 2014.
- KHAN, I.; KANT, C.; SANWARIA, A. et al. Acute cardiac toxicity of *Nerium Oleander/Indicum* poisoning (Kaner) Poisoning. *Heart Views*, v.11, p.115-116, 2010.
- KLÉBER, A.G.; RUDY, Y. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol. Rev.*, v. 84, p. 431-488, 2004.

KRUM, H.; BIGGER, T.; GOLDSMITH, R.L. et al. Effect of long-term digoxin therapy on autonomic function in patients with chronic heart failure. *JACC*, v. 25, p. 289-294, 1995.

KRYCHAK, S. Estudo das alterações clínicas e anatomopatológicas observadas em ovinos (*Ovis aries*) intoxicados experimentalmente com a planta espiroleira (*Nerium oleander*). 137f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curitiba: UFPR, Escola de Veterinária, 1997.

KUÇUDKURMAZ, Z.; KARAPINAR, H.; GUL, İ. et al. Complete atrioventricular blok after self-ingestion of *Nerium oleander* for relief of hemorrhoidal complaints. *Arch. Turk. Soc. Cardiol.*, v.40, p.168-170, 2012.

KUMAR, R.S., MADHAB, K.D. An experimental evaluation of anticonvulsant activity of *Nerium oleander* leaf extract. *IRJP*, n.10, p. 73-75, 2011.

KUMAR, S.; ANAND, G.R. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Nerium oleander*. *Pharmacia*, v.1, n.1., p. 33-38, 2010.

KUMMER, J.I.; NAIR, R.; KRISHMAN, S.C. Bidirectional ventricular tachycardia caused by digitalis toxicity. *Circulation*, v. 113, p. 156-157, 2006.

LANGER, G.A. Mechanism of action of the cardiac glycosides on the heart. *Biochem. Pharmacol.*, v. 30, n.24, p. 3261-3264, 1981.

LANGFORD, S.D.; BOOR, P. J. Oleander toxicity: examination of human and animal toxic exposures. *Toxicology*, v.109, p.1-13, 1996.

LE COUTER, D.G. L.; FISHER, A.A. Chronic and criminal administration of *Nerium oleander*. *Clin. Toxicol.*, v. 40, p 523-424, 2002.

LECHAT, P.; MUDGETT-HUNTER, M.; MARGOLIES, M.N. et al. Reversal of lethal digoxin toxicity in guinea pigs using monoclonal antibodies and Fab fragments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 229, n.1, 1984.

LI, L.; CHU, G.; KRANIAS, E.G. et al. Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am. J. Physiol*, v. 274, p. 335-347, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Plantarum, p.512, 2002.

MAHIN, L.; MARZOU, A.; HUART, A. A case report of *Nerium oleander* poisoning in cattle. *Vet. Hum. Toxicol.*, v.26, p. 303-304, 1984.

MALLIANI, A. The pattern of sympathovagal balance explored in the frequency domain. *News Physio. Sci.*; v. 14, p. 111-117, 1999.

MARTINS, C.D.D. Avaliação do balanço autonômico cardíaco de ratos submetidos a uma dieta hipoproteica. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Outro Preto: UFOP, Ciências Biológicas, 2007.

MESA-SOCHA, J.X. Intoxicação experimental de cães com folhas verdes de *Nerium oleander* e uso da frutose 1,6 difosfato e da glicose como tratamentos. 67f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária)- Jaboticabal: UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.

MIDDLETON, W.S.; MADISON, W.; CHEW, K.K. Clinical results from oral administration of thevetin, a cardiac glucoside. *Am. Heart J.*, v.11, p. 75-88, 1936.

MILEWSKI, L.M.; KHAN, S.A. An overview potentially life-threatening poisonous plants in dogs and cats. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, v.1, p. 23-33, 2006.

- MINARDI, I.A.; LUNELLI, I.A.; CAPOVILLA, L.C.T. et al. Intoxicação acidental de bovinos por espirradeira. *Revista do Setor de Ciências Agrárias*, v. 4, p. 89-91, 1982.
- MITRA, R.; MORAD, M. A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. *Am. J. Physiol.*, v. 1, p. 1056-1060, 1985.
- MORISSETTE, P.; NISHIDA, M.; TREPAKOVA, E. et al. The anesthetized guinea pig: An effective early cardiovascular derisking and lead optimization model. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, v. 68, p. 137-149, 2013.
- MORRIS, P.D.; ROBINSON, T.; CHANNER, K.S. Reversible heart failure: toxins, tachycardiomyopathy and mitochondrial abnormalities. *Postgrad. Med. J.*, v. 88, p. 706-712, 2012.
- MOULSMA, M.; LACASSIE, E.; BOUDRE, I. et al. A nonfatal case of self poisoning by the pink bay-tree. *Ann. Toxicol. Anal.*, v.12, p. 122-130, 2000.
- MUDD, J.O.; KASS, D.A. Review article tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature*, v. 451, p. 919-928, 2008.
- MWAFAY, S.N.; YASSIN, M.M. Antidiabetic activity evaluation of glimepiride and *Nerium oleander* extract on insulin, glucose levels and some liver enzymes activities in experimental diabetic rat model. *Pak. J. Biol. Sci.*, v.14, n. 51, p. 984-990, 2011.
- NERBONNE JM, RS KASS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol. Ver.*, v. 85, p. 1205-1253, 2005.
- NEWTON, G.E.; TONG, J.H.; SCHOFIELD, A.M. et al. Digoxin reduces cardiac sympathetic activity in severe congestive heart failure, *JACC.*, v. 26, n.1, p. 155-161, 1996.
- NI, D.; MADDEN, T.L.; JOHANSEN, M. et al. Murine pharmacokinetics and metabolism of oleandrin, a cytotoxic component of *Nerium oleander*. *J. Exp. Ther. Oncol.* v.2, p. 278-285, 2002.
- O'BRYEN, P.J.; SMITH, D.E.C.; KNECHTEL, T.J. et al. Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab. Anim.*, v.40, p. 153-157, 2006.
- OMIDI, A.; RAZAVIZADEH, A.T.; MOVASSAGHI, A.R. et al. Experimental oleander (*Nerium oleander*) intoxication in broiler chickens (*Gallus gallus*). *Hum. Exp. Toxicol.*, v.31, p. 853-858, 2012.
- ORYAN, A.; MAHAM, M.; REZAKHANI, A. et al. Morphological studies on experimental oleander poisoning in cattle. *J. Vet. Med.*, v. 43, p. 625-634, 1996.
- PAGE, C.; MURTAUGH, R.J. Hypoglycemia associated with oleander toxicity in a dog. *J. Med. Toxicol.*, v. 11, n. 1, p. 141-143, 2015.
- PAPI, L.; LUCIANI, A.B.; FORNI, D. et al. Unexpected double lethal oleander poisoning. *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, v. 33, n.1, p. 93-98, 2012.
- PASTORE, C.A.; PINHO, C.; GERMIANI, H. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Análise e Emissão de Laudos Eletrocardiográficos. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 93, p.1-19, 2009.
- PEDROSO, P.M. O.; BANDARRA, P.M.; JÚNIOR, P. B. et al. Intoxicação natural e experimental por *Nerium oleander* (Apocynaceae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 29, p. 404-408, 2009.
- PEDROZA, H.P.; FERREIRA, M.G.; CARVALHO, J.G. et al. Concentrações de oleandrina nas folhas de *Nerium oleander* de diferentes cores de floração. *Cienc. Rural*, v. 45, n. 5, p. 864-866, 2014.

PENTEL, P.R.; SALERNO, D.M. Cardiac drug toxicity: digitalis glycosides and calcium-channel and β -blocking agents. *Med. J. Aust.*, v. 12, p. 88-94, 1990.

PEYMANI, P.; ZAMIRI, N.; TAHMASBI, J. A case of non-fatal oleander poisoning. *Iran Red. Crescent Med. J.*, v. 13, p. 219-220, 2011.

PINTO, M.C.L.; BORBOLETA, L.R.; MELO, M.B. et al. *Tityus fasciolatus* envenomation induced cardio-respiratory alterations in rats. *Toxicon*, v. 55, p. 1132-1137, 2010.

PIO CORREA, M; PENNA, L.A. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v.6, p.428, 1978.

RAMIREZ-ORTEGA, M.; ZARCO, G.; MALDONADO, V. et al. Is digitalis compound-induced cardiotoxicity, mediated through guinea-pig cardiomyocytes apoptosis? *Eur. J. Pharmacol.*, v. 566, p. 34-42, 2007.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

RENIER, A.C.; KASS, P.H.; MAGDESIAN, K.G. et al. Oleander toxicosis in equids: 30 cases (1995-2010), *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 15, p. 540-549, 2013.

REZAKHANI, A.; MAHAN, M. Oleander poisoning in cattle on the Fas province. *Iran. Vet. Human Toxicol.*, v.34, p.549, 1992.

REUTER, H.; SCOTT, A.H.; HAN, T. et al. The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger Is Essential for the Action of Cardiac Glycosides; *Circ Res.*, v. 90, p. 305-308, 2002.

RIET-CORREA, G.; TERRA, F.F.; SCHILD, A.L. et al. Intoxicação experimental por *Tetrapterys multiglandulosa* (Malpighiaceae) em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.*; v. 25, n.2, p. 91-96, 2005.

RONI, M.; MURUGAN, K.; PANNEERSELVAM, C. et al. Evaluation of leaf aqueous extract and synthesized silver nanoparticles using *Nerium oleander* against *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.*, v. 112, p. 981-990, 2013.

ROUT, S.K.; KAR, D.M.; ROUT, B. Study of CNS activity of leaf extracts of *Nerium oleander* experimental animal models. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, v.4, n.4, 2012.

SALIEM, A.H. Effect of the medial lethal dose of the ethanolic extract of (*Nerium oleander*) leaves on the histopathology features of the vital organs in mice. *Iraqi J. Vet. Med.*, v. 34, n.2, p.103-109, 2010.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada á experimentação animal*. Belo Horizonte: FEP/MVZ: 2007

SANTOS, A.L.F.; LARSSON, M.H.M.A; PEREIRA. G.G. et al. Dosagem sérica de troponina I em cães com desnível do segmento ST utilizando quimioluminescência. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 63, n.6, p. 1330-1336, 2011.

SANTULLI, G.; XIE, W.; REIKEN, S.R. et al. Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 112, p. 11389-94, 2015.

SARAVANAPAVANANTHAN, N; GANESHAMOORTHY, J. Yellow oleander poisoning - a study of 170 cases. *Forensic Sci. Int.*, v.35, p.247-250, 1988.

SENTHILKUMARAN, S.; MEENAKSHISUNDARAM, R.; MICHAELS, A.D. et al. Electrocardiographic changes during inhalational oleander toxicity. *Journal of Electrocardiology*, v. 44, p. 470-472, 2011.

SHARMA, P.; CHOUDHARY, A.S.; PARASHAR, P. et al. Chemical constituents of plants from genus *Nerium*. *Chem. Biodivers.*, v. 5, p. 1198-1207, 2010.


SHATTOCK, M.J. Phospholemman: its role in normal cardiac physiology and potential as a drugable target in disease. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 9, p. 160-166, 2009.

- SHELDON, S.H.; GARD, J.J.; ASIRVATHAM, S.J. Premature Ventricular Contractions and Non-sustained Ventricular Tachycardia: Association with Sudden Cardiac Death, Risk Stratification, and Management Strategies. *Indian Pacing Electrophysiol. J.*, v.10 , p. 357-371, 2010.
- SHUMAİK, G.M.; WU, A.W.; PING, A.C. Oleander poisoning: treatment with digoxin-specific Fab antibody fragments. *Ann. Emer. Med.*, v. 17, p. 732-5, 1988.
- SHWARTZ, W.L.; BAY, W.W.; DOLLAHITE, J.W. et al. Toxicity of *Nerium oleander* in the Monkey (*Cebus paella*). *Vet. Pathol.*, v. 11, p. 259-277, 1974.
- SIDDIQUI, B.S.; SULTANA, R.; BEGUM, S. et al. Cardenolides from the methanolic extract of *Nerium oleander* leaves possessing central nervous system depressant activity in mice. *J. Nat. Prod.*, v. 60, p. 540-544, 1997.
- SIKARWAR, M.; PATIL, M.; KOKATE, C. et al. Antidiabetic activity of *Nerium indicum* leaf extract in alloxan-induced diabetic rats. *J. Young Pharm.*, p. 330-335, 2009.
- SINGHAL, K.G.; GUPTA, G.D. Anti-anxiety studies of various extracts of *Nerium oleander* Linn. Flowers. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, v. 3, p. 323-326, 2011.
- SINGH, S.; SHENOY, S.; NEHETE, P.N. et al. *Nerium oleander* derived cardiac glycoside oleandrina is a novel inhibitor of HIV infectivity. *Fitoterapia*, v. 84, p. 32-39, 2013.
- SKOU, J.C.; HOFFMAN, J.F. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 23, p. 394-401, 1957.
- SKRZYPIEC-SPRING, M.; GROTHUS, B.; SZELAG, A. et al. Isolated heart perfusion according to Langendorff- Still viable in the new millennium. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, v. 55, p. 113-126, 2007.
- SMITH, P.A.; ALDRIDGE, B.M.; KITTLESON, M.D. Oleander toxicosis in a donkey. *J. Vet. Intern. Med.*, v.17, p. 111-114, 2003.
- SOTO-BLANCO, B.; FONETELE-NETO, J.D; SILVA, D.M.; REIS. et al. Acute cattle intoxication from *Nerium oleander* pods. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 38, p. 451-454, 2006.
- STIGGER, A.L.; BARROS, C.S.L.; LANGOHR, I.M. et al. Intoxicação experimental por *Ateleia glazioviana* (Leg.Papilionoideae) em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.*; v. 21, n.3, p. 98-108, 2001.
- SWEADNER, K.J.; RAEL, E. The FCYD gene family ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomics*, v. 68, p. 41-56, 2000.
- TAHERI, S.; SOLATI, A.; MORADI, P. et al. Toxic effects of *Nerium oleander* aqueous leaf extract on haematological parameters and histopathological changes of the lungs and heart in rabbits. *Comp. Clin. Pathol.*, v. 22, n. 6, p. 1189-1193, 2013.
- TILLEY, L.P. *Essentials of canine and feline electrocardiography: interpretation and treatment*. 3a ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1992. p. 470.
- TILLEY, L.P.; BURTNICK, N.L. *ECG- Eletrocardiografia para o clínico de pequenos animais*. São Paulo, Editora Roca, p. 99, 2004.
- TOBIN, T.; HENDERSON, R.; SEN, A.K. Species and tissue differences in the rate of dissociation of ouabain from (Na⁺ + K⁺)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.254, p.551-555, 1972.
- TOR, E.R.; FILIGENZI, M.S.; PUSCHNER, B. Determination of oleandrin in tissues and biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 4322-5, 2005

- VALLÉ, B.; GANDIA, P.; ROUGE, D. et al. *Circuitous* diagnosis in concealed self-poisoning with *Nerium oleander*. *Clin.Toxicol.*, v. 50, p. 228-229, 2012.
- VASEGHI, M.; SHIVKUMAR, K. The role of the autonomic nervous system in sudden cardiac death. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, v. 50, n.6, p. 404-419, 2008.
- VENETUCCI, L.A.; TRAFFORD, A.W.; O'NEILL, S.C.; EISNER, D.A. The sarcoplasmic reticulum and arrhythmogenic calcium release. *Cardiovasc. Res.*, v. 77, p. 285-292, 2008.
- VERMUT, J. Oleander- Decorative and very poisonous. *N.Z.Vet. J.*, v. 35, p. 138-139, 1987.
- WAGNER, J.E.; MANNING, P.J. *The biology of the guinea pig*. American College of Laboratory Animal Medicine Academic Press, 1976, 317p.
- WASFI, I. A.; ZOROB, O.; AL KATHEERI, N.A. et al. A fatal case of oleandrin poisoning. *Forensic Sci. Int.*, v. 179, n. 2 , p. 36, 2008.
- WATANABE, T.; RAUTAHARJU, P.M.; MCDONALD, T.F. Ventricular action potentials, ventricular extracellular potentials, and the ECG of Guinea pig. *Circ. Res.*, v. 57, p. 362-374, 1985.
- WEAVER, L.C.; AKERA, T.; BRODY, T. Digoxin toxicity: primary sites of drug action on the sympathetic nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 197, n.1, p.1-9,1976.
- WIEGREBE, H.; WICHTL, M. High-performance liquid chromatographic determination of cardenolides in digitalis leaves after solid-phase extraction. *J. Chromatogr.*, v. 630, p. 402-7, 1993.
- WOJTYNA, W.; ENSELEIT, F. A rare cause of complete heart block after transdermal botanical treatment for psoriasis. *Pacing Clin. Electrophysiol.*, v. 27, p 1686-8, 2004.
- YAMAUCHI, T.; ABE, F.; TACHIBANA, Y. et al. Quantitative variations in the cardiac glycosides of oleander. *Phytochemistry*, v. 22, n. 10, p. 211-2214, 1983.
- ZAMANI, J.; ASLANI, A.; Cardiac finding in acute yellow oleander poisoning. *J. Cardiovasc. Dis. Res.* v.1, n.1, p.27-28, 2010.

8. ANEXO

8.1 Certificado do CEUA



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO
Certificamos que o Protocolo nº. 216 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Efeitos do extrato de glicosídeos cardioativos da *Nerium oleander* em cobaios", que tem como responsável MARILIA MARTINS MELO, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 24/09/2014. Este certificado expira-se em 24/09/2019.

CERTIFICATE
We hereby certify that the Protocol nº. 216 / 2014, related to the Project entitled "Effects of cardioactive glycosides extracted from *Nerium oleander* in guinea pigs", under the supervision of MARILIA MARTINS MELO, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 24/09/2014. This certificate expires in 24/09/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 24/09/2014.

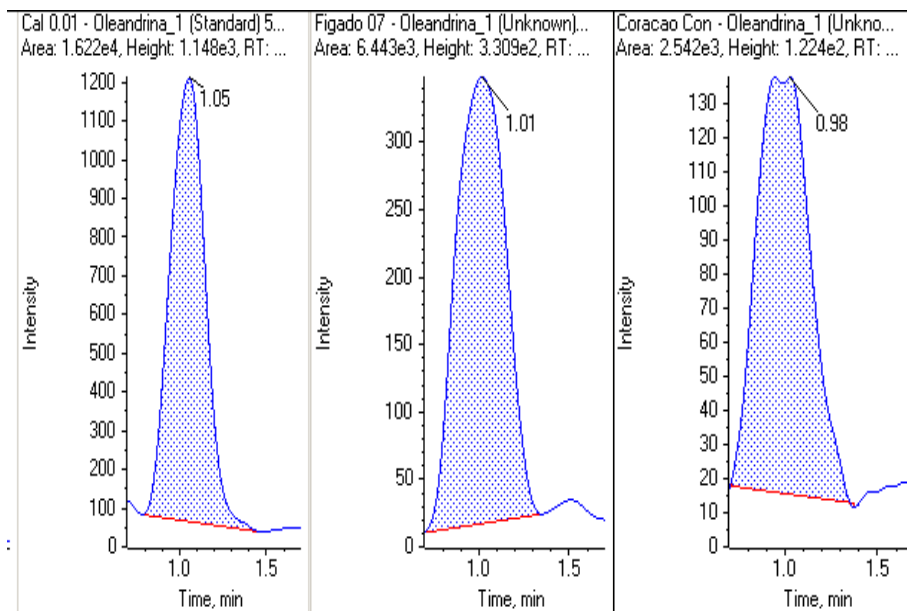
Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

8.2 Dados cromatográficos

Exemplos de cromatogramas mostrando a quantificação de amostras controle de oleandrina (Sigma®) e de órgãos de cobaios intoxicados com extrato de *N. oleander*.



As condições cromatográficas foram estabelecidas utilizando coluna C18 Shimpack ODX-II com 100 mm de comprimento, diâmetro interno de 2,0mm e tamanho de partícula de 2,2µm. A fase móvel era composta 80% de metanol e 20% de solução de acetato de amônio

10mmolar e 0,01% de ácido fórmico. O tempo total de corrida foi de 3 minutos. Para a detecção iônica da oleandrina, o tempo de retenção foi de 1,2min, com energia de colisão de 13, temperatura da fonte de 520°C, potencial de exclusão do cone de 38 e potencial *declustering* igual a 201.