

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA

**EFEITOS DOS GLICOSÍDEOS CARDIOATIVOS (DIGOXINA, OUABAÍNA E
OLEANDRINA) NA FISIOLÓGIA CARDIORRENAL EM RATOS WISTAR
HÍGIDOS**

Ana Flávia Machado Botelho

Belo Horizonte- MG

2018

Ana Flávia Machado Botelho

**EFEITOS DOS GLICOSÍDEOS CARDIOATIVOS (DIGOXINA, OUABAÍNA E
OLEANDRINA) NA FISIOLOGIA CARDIORRENAL EM RATOS WISTAR
HÍGIDOS**

Defesa de tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Martins Melo.

Coorientador: Prof. Dr. Benito Soto-Blanco.

Coorientador: Prof. Dr. Jader Santos Cruz

Belo Horizonte

Escola de Veterinária- UFMG

2018

B748e Botelho, Ana Flávia Machado, 1991-
Efeitos dos glicosídeos cardioativos (digoxina, ouabaina e oleandrina) na fisiologia cardiorrenal em ratos Wistar hígidos / Ana Flávia Machado Botelho. – 2018.
98 p. : il.

Orientadora: Marília Martins Melo
Co-orientadores: Benito Soto-Blanco, Jader Santos Cruz
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

I. Rato como animal de laboratório – Teses. 2. Coração – Teses. 3. Insuficiência cardíaca – Teses. 4. Glicosídeos – Teses. 5. Eletrocardiografia veterinária – Teses.
I. Melo, Marília Martins. II. Soto-Blanco, Benito. III. Cruz, Jader Santos.
IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.089 612

FOLHA DE APROVAÇÃO

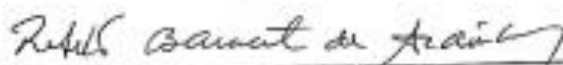
ANA FLÁVIA MACHADO BOTELHO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

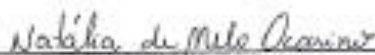
Aprovada em 15 de Junho de 2018, pela banca constituída pelos membros:



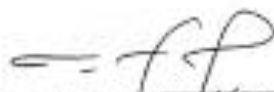
Prof.^a Marília Martins Melo
Presidente - Orientador



Prof. Roberto Baracat de Araújo
Escola de Veterinária - UFMG



Prof.^a Natália de Melo Ocarino
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Vitor Márcio Ribeiro
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUCMINAS



Dr.^a Maira Souza de Oliveira
Escola de Veterinária - UFMG



*A meu pai, pela inspiração e força,
com todo o meu amor e gratidão.*

*“O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
Aperta e daí afrouxa,
Sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem”.*

Guimarães Rosa

*“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 e amiga, por dar forma à minha vida como pesquisadora. Obrigada pelo constante apoio e incentivo, por todos os ensinamentos, pela paciência infinita, pelo conhecimento sempre compartilhado sem hesitação e principalmente por me proporcionar oportunidades únicas ao longo de toda a minha carreira na área de Toxicologia Veterinária. Agradeço pelos quase seis anos de convívio que me trouxeram evolução pessoal e científica. Te admiro imensamente, não só pela sua competência profissional, mas principalmente pela pessoa que você é. Obrigada por tudo!

Aos Professores Benito e Jáder, meus coorientadores, pela disponibilidade, paciência, conselhos e ensinamentos. Obrigada por todo o incentivo e por sempre estarem dispostos a me ajudar. Sem as suas participações essa tese não seria possível.

A todos do Laboratório de Toxicologia pelo apoio em cada etapa, em especial à Ana Luísa, Camila, Maria Elvira, Stephanie, e às alunas de IC, Ana, Michele, Marina e Thalita. Sem a participação de vocês nada disso teria sido possível, meu eterno obrigado.

A todos do LAMEX, em especial à Tati, cuja participação e ensinamentos foram primordiais para realização deste trabalho. Obrigada pela amizade e pela paciência.

Ao Professor Felipe, doutorandos Camila e Matheus, técnicas Leimar, Natália e Valéria do Laboratório de Patologia, pela disponibilidade e ensinamentos que proporcionaram as análises histológicas deste trabalho.

Às professoras Rogéria, Natália e Eliane pelo incentivo, conselhos e por participarem da minha formação acadêmica. Muito obrigada!

Aos funcionários da limpeza, da esterilização, e aos porteiros, em especial à Dona Beth e pela convivência e carinho.

Aos componentes da banca e aos suplentes pela prontidão em compor a banca para avaliação desta tese.

Aos colegas e ao Colegiado do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal pelo auxílio ao longo do doutorado.

Às agências de fomento que proporcionaram a realização deste trabalho, FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

À minha família, em especial minha mãe e 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.

Em especial, a meu pai, Ramiro, que hoje é meu anjo da guarda. Obrigada pelo incentivo e conselhos que sempre me guiaram e que vão continuar a nortear a minha vida. Carregamos sua presença em nossos corações sempre. Com amor e gratidão essa tese é dedicada a você.

Sumário

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	17
RESUMO	21
ABSTRACT	22
OBJETIVOS	25
CAPÍTULO 1	26
REVISÃO DE LITERATURA	26
Insuficiência cardíaca	26
Bomba NKA	27
Acoplamento excitação-contração	28
Glicosídeos cardioativos	29
Fontes dos principais glicosídeos cardioativos	30
Digoxina	32
Ouabaína	33
Oleandrina	34
CAPÍTULO 2	36
Avaliação da contratilidade de cardiomiócitos de animais submetidos ao tratamento prolongamento com digoxina	36
Resumo	36
Introdução	37
Material e Métodos	37
Seleção dos animais e grupos experimentais	37
Avaliação clínica	37
Eletrocardiograma	37
Análise histológica	38
Isolamento dos cardiomiócitos	38
Análise da contratilidade	38
Análise estatística e delineamento experimental	39
Resultados e discussão	39
Avaliação clínica	39
Avaliação eletrocardiográfica	39
Avaliação macro e microscópica	41
Contratilidade celular	42
Conclusões	43
CAPÍTULO 3	44
Efeitos <i>in vivo</i> da oleandrina, digoxina e ouabaína na fisiologia cardiorrenal de ratos Wistar hígidos	44
Resumo	44
Introdução	45
Material e Métodos	45
Seleção dos animais e grupos experimentais	45
Avaliação cardiovascular	45
Análise do traçado de ECG	46
Coletas de sangue e exames laboratoriais	46
Avaliação histológica e ultraestrutural	47
Avaliação da modulação da NKA e atividade da cTnI e BNP	47
Preparação dos tecidos para a mensuração das atividades enzimáticas e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	48
Determinação dos níveis de TBARS	48
Atividade da Superóxido Dismutase	48

Atividade da Catalase.....	48
Atividade da Glutathione Peroxidase	49
Análise estatística e delineamento experimental.....	49
Resultados e discussão.....	49
Valores de normalidade de parâmetros eletrocardiográficos.....	49
Hematologia	58
Bioquímica sérica	62
Avaliação histológica dos rins e coração.....	67
Avaliação ultraestrutural dos rins e coração	72
Expressão proteica da troponina I e BNP no tecido cardíaco	75
Expressão proteica das isoformas alfa-1 e alfa-2 da bomba NKA	76
Atividade oxidativa dos glicosídeos cardioativos	78
Conclusões.....	81
Considerações finais	82
Referências bibliográficas	83
ANEXO	98

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Fórmula química, massa molecular e resíduos de açúcar dos principais glicosídeos cardioativos.....	30
Tabela 2: Principais glicosídeos cardioativos e suas fontes.....	31
Tabela 3: Principais sinais clínicos associados à intoxicação por digoxina, ouabaína e oleandrina.....	34
Tabela 4: Achados eletrocardiográficos mais comuns atribuídos à intoxicação por digoxina, ouabaína e oleandrina.....	35

Capítulo 3

Tabela 1. Fórmulas de correção do QT utilizadas no presente estudo e suas respectivas referências.....	46
Tabela 2. Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos dos parâmetros eletrocardiográficos de ratos da linhagem Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>). Os traçados foram registrados em seis derivações do plano frontal, com 50mm/s de velocidade e sensibilidade de 1cm = 2mV (2N) em ratos adultos saudáveis anestesiados usando eletrocardiograma computadorizado.....	50
Tabela 3. Valores de correlação de Pearson entre as fórmulas de correção QT de ratos Wistar hígidos. As seguintes fórmulas foram utilizadas: Bazett, Fridericia, Van der Water, Framingham, Hodges e Mitchell. As gravações foram feitas em seis derivações do plano frontal, com 50mm/s de velocidade e sensibilidade de 1cm = 2mV (2N) usando um ECG computadorizado.....	51
Tabela 4. Valores médios, desvio-padrão e relação entre as médias da creatina quinase (CK) e sua fração MB (CK-MB) de ratos Wistar submetidos a tratamento por 21 dias com NaCl (CON), digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE).....	63
Tabela 5. Valores médios, desvio-padrão e relação entre as médias da creatinina de ratos Wistar submetidos a tratamento por 21 dias com NaCl (CON), digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE).....	66

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Mecanismo de ação dos glicosídeos cardioativos: a inibição da corrente da bomba de sódio e potássio (NKA), impede a extrusão de 3Na^+ do citoplasma em troca de 2K^+ contra o seu gradiente eletroquímico. O acúmulo do Na^+ intracelular promove a troca de 3Na^+ por 1Ca^{2+} pelo trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Consequente acúmulo do Ca^{2+} intracelular aumenta a interação com as proteínas contráteis do coração, promovendo o inotropismo positivo. ATP: adenosina trifosfato; NCX: trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; RyR: receptores de rianodina; PLB: fosfolambam (Adaptado de Grandi e Herren, 2014).

.....28

Figura 2. Estrutura molecular dos glicosídeos cardioativos: A- Digoxina, B-Ouabaína, C-Oleandrina (adaptado de Prassas e Diamandis, 2009).

.....31

Capítulo 2

Figura 1. Valores médios e desvio padrão da frequência cardíaca (FC) de ratos Wistar submetidos à administração diária SC de NaCl 0,9% por 21 dias (CON), digoxina 50µg/kg (DIG 50) e digoxina 100 µg/kg (DIG 100). Avaliações seriadas foram realizadas nos tempos zero (A), sete (B), 14 (C) e 21 (D). Análises realizadas por ANOVA seguida de pós-teste de Tukey ($p<0,05$).40

Figura 2. Valores médios e desvio padrão da amplitude da onda T (TmV) de ratos Wistar submetidos à administração diária SC de NaCl 0,9% por 21 dias (CON), digoxina 50µg/kg (DIG 50) e digoxina 100 µg/kg (DIG 100). Avaliações seriadas foram realizadas nos tempos zero (A), sete (B), 14 (C) e 21 (D). Análises realizadas com teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p<0,05$). *Diferença significativa entre grupos.41

Figura 3. Fotomicroscopia do ventrículo esquerdo de ratos Wistar. Grupos controle e tratados com digoxina 50 e 100µg/kg, respectivamente. A) Fibras cardíacas dispostas longitudinalmente com preservação da arquitetura do tecido de animais do grupo CON que receberam NaCl 0.9% por via SC durante 21 dias. B) Ausência de alterações em amostras de animais do grupo DIG 50 que receberam 50µg/kg de digoxina por via SC durante 21 dias. C) Ausência de alterações em amostras de animais do grupo DIG 100 que receberam 100µg/kg de digoxina por via SC durante 21 dias. (HE, aumento de 400x).42

Figura 4. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros de contratilidade celular de cardiomiócitos de ratos Wistar submetidos à administração diária SC de NaCl 0,9% por 21 dias (CON), digoxina 50µg/kg (DIG 50) e digoxina 100 µg/kg (DIG 100). A) Tamanho sistólico (*peak*); B) Tamanho diastólico (BL); C) Fração de encurtamento celular (BL% *peak*); D) tempo para atingir a contração máxima (*t to peak*); E) Tempo para o relaxamento a 90% (*t to bl 90%*). Análises realizadas por ANOVA seguida de pós teste de Tukey ($p<0,05$). *Diferença significativa entre grupos.43

Capítulo 3

Figura 1. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eletrocardiográficos do tempo zero (T0) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG),

ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram FC (A), duração da onda P (Pms) (B), amplitude da onda P (PmV) (C), duração do segmento PR (D), duração do complexo QRS (E), amplitude da onda R (F), duração do intervalo QT (G), duração do intervalo QT corrigido pela fórmula de Hodges (QTcH) (H) e amplitude da onda T (I). Dados paramétricos (FC, Pms, PmV, R e QT) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p<0,05$). Dados não paramétricos (PR, QRS, T e QTcH) foram avaliados por teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p<0,05$).....52

Figura 2. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eletrocardiográficos do tempo sete (T7) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram FC (A), duração da onda P (Pms) (B), amplitude da onda P (PmV) (C), duração do segmento PR (D), duração do complexo QRS (E), amplitude da onda R (F), duração do intervalo QT (G), duração do intervalo QT corrigido pela fórmula de Hodges (QTcH) (H) e amplitude da onda T (I). Dados paramétricos (FC, PmV, PR, R, QT, QTcH e T) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p<0,05$). Dados não paramétricos (Pms e QRS) foram avaliados por teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p<0,05$). * Diferença significativa em relação ao grupo CON.....53

Figura 3. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eletrocardiográficos do tempo 14 (T14) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram FC (A), duração da onda P (Pms) (B), amplitude da onda P (PmV) (C), duração do segmento PR (D), duração do complexo QRS (E), amplitude da onda R (F), duração do intervalo QT (G), duração do intervalo QT corrigido pela fórmula de Hodges (QTcH) (H) e amplitude da onda T (I). Dados paramétricos (FC, Pms, PmV, PR, r, QT, QTcH e T) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p<0,05$). Dados não paramétricos (QRS) foram avaliados teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p<0,05$). *Diferença significativa entre grupos.....54

Figura 4. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eletrocardiográficos do tempo 21 (T21) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram FC (A), duração da onda P (Pms) (B), amplitude da onda P (PmV) (C), duração do segmento PR (D), duração do complexo QRS (E), amplitude da onda R (F), duração do intervalo QT (G), duração do intervalo QT corrigido pela fórmula de Hodges (QTcH) (H) e amplitude da onda T (I). Dados paramétricos (FC, Pms, PmV, R, QT, QTcH e T) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p<0,05$). Dados não paramétricos (PR, QRS) foram avaliados por teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p<0,05$). *Diferença significativa entre os grupos tratados e o CON.....55

Figura 5. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eletrocardiográficos de ratos Wistar tratados por 21 dias com digoxina (DIG) nos tempos zero (T0), sete (T7), 14 (T14) e 21 (T21). Os parâmetros avaliados foram FC (A), amplitude da onda P (Pms) (B), duração do complexo QRS (C), duração do intervalo QT (D) e duração do intervalo QT corrigido pela fórmula de Hodges (QTcH) (E). Dados não paramétricos (FC, QRS, PmV, QT e QTcH) foram avaliados por teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p<0,05$). *Diferença significativa entre grupos.....56

Figura 6. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eletrocardiográficos de ratos Wistar tratados por 21 dias com ouabaína (OUA) nos tempos zero (T0), sete (T7), 14 (T14) e 21 (T21). Os parâmetros avaliados foram FC (A), duração do intervalo QT (Pms) (B) e

duração do intervalo QT corrigido pela fórmula de Hodges (QTcH) (C). Dados não paramétricos (FC, QT e QTcH) foram avaliados por teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre grupos.....57

Figura 7. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eletrocardiográficos de ratos Wistar tratados por 21 dias com oleandrina (OLE) nos tempos zero (T0), sete (T7), 14 (T14) e 21 (T21). Os parâmetros avaliados foram FC (A), duração do intervalo QT (B) e duração do intervalo QT corrigido pela fórmula de Hodges (QTcH) (C). Dados não paramétricos (FC, QT e QTcH) foram avaliados por teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre grupos.....57

Figura 8. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematimétricos do tempo 21 (T21) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram número de eritrócitos (ERI) (A), valores médios de concentração de hemoglobina (Hb) (B), hematócrito (HCT) (C), volume globular médio (VGM) (D), hemoglobina corpuscular média (HCM) (E) e concentração corpuscular média de hemoglobina (CHMC) (F). Dados paramétricos (HCT, VGM, VCM) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados não paramétricos (HB, ERI, CHCM) foram avaliados por teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre os grupos tratados.....59

Figura 9. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematimétricos do tempo 21 (T21) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram número de plaquetas (PLT) (A), desvio padrão na amplitude dos eritrócitos (RDW-SD) (B), coeficiente de variação da amplitude dos eritrócitos (RDW-CV) (C), amplitude de variação do tamanho plaquetário (PDW) (D), volume plaquetário médio (VPM) (E) e índice de macroplaquetas (MPLT) (F). Dados paramétricos (RDW-SD, PDW, MPV, MPLT) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados não paramétricos (PLT, RDW-CV) foram avaliados por Dunn e Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre os grupos tratados ($p < 0,05$); **Diferença significativa entre os grupos tratados ($p < 0,01$).....60

Figura 10: Valores médios e desvio padrão dos parâmetros leucocitários do tempo 21 (T21) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram número total de leucócitos (A) e porcentagem diferencial de linfócitos (B), neutrófilos (C), eosinófilos (D) e monócitos (E). Dados paramétricos (LEU, LIN) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados não paramétricos (NEU, EOS, MON) foram avaliados por teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p < 0,05$).....61

Figura 11. Imagem representativa de testes imunocromatográficos de troponina I (cTnI) realizados com amostras de soro de ratos Wistar controle (CON) (A) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG) (B), ouabaína (OUA) (C) e oleandrina (OLE) (D). A presença de um único traço no cassete de análise indica de forma qualitativa que as amostras possuem níveis de cTnI inferiores a 0,5ng/mL.....63

Figura 12: Valores médios e desvio padrão dos marcadores séricos de lesão cardíaca do tempo 21 (T21) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram creatina quinase (CK) (A), creatina quinase fração MB (CK-MB) (B), a relação entre CK/CK-MB (C),

aspartato amino-transferase (AST) (D) e lactato desidrogenase (LDH) (E). Dados paramétricos (CK, CK-MB e CK/CK-MB) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados não paramétricos (AST, LDH) foram avaliados por teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre os grupos tratados.....64

Figura 13. Valores médios e desvio padrão dos marcadores séricos de lesão cardíaca do tempo 21 (T21) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram creatinina (Creat) (A), ureia (B), magnésio (Mg) (C), cloreto (Cl) (D) e cálcio séricos (Ca) (E). Dados paramétricos (Mg, Ca, Cl, Creat, Ureia) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre os grupos.....65

Figura 14. Valores médios e desvio padrão dos marcadores séricos de lesão cardíaca do tempo 21 (T21) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram proteínas totais (PT) (A), albumina (Alb) (B) e relação albumina/globulina (Alb/Glo) (C). Dados paramétricos (PT, Alb) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados não paramétricos (A/G) foram avaliados por Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre os grupos.....65

Figura 15. Micrografia óptica de tecido cardíaco de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). A) Grupo CON sem alterações. B) Grupo DIG com discreta vacuolização intracitoplasmática focal de cardiomiócitos em área de músculo papilar (setas pretas). C) Grupo OUA com perda focal e discreta das estriações cardíacas em áreas de músculo papilar associadas a discreta vacuolização intracitoplasmática focal do miocárdio (setas pretas) e discreta área focal de necrose de cardiomiócitos (asterisco). D) Grupo OLE mostrou alterações semelhantes ao grupo OUA, com perda focal e discreta das estriações cardíacas acompanhadas de vacuolização intracitoplasmática multifocal discreta a moderada de cardiomiócitos (setas pretas) e necrose de cardiomiócitos focal moderada (asteriscos); (HE, Bar=50µm).....68

Figura 16. Micrografia óptica de tecido cardíaco de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). A) Grupo CON sem alterações. B) Grupo DIG sem alterações. C) Grupo OUA sem alterações. D) Grupo OLE sem alterações; (Tricômio de Masson, Bar=50µm).....69

Figura 17. Micrografia óptica de amostras dos rins de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). A) Grupo CON sem alterações. B) Grupo DIG apresenta material basofílico amorfo multifocal moderado no interior dos túbulos proximais. C) Grupo OUA manifesta vacuolização intracitoplasmática multifocal moderada das células epiteliais dos túbulos proximais. D) Grupo OLE apresenta vacuolização intracitoplasmática multifocal moderada das células epiteliais dos túbulos proximais e necrose tubular focal moderada (HE, Bar=50µm).....70

Figura 18. Micrografia óptica de amostras dos rins de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). A) Grupo

CON sem alterações. B) Grupo DIG apresenta material basofílico amorfo multifocal discreto no interior dos túbulos proximais. C) Grupo OUA manifesta material basofílico amorfo multifocal moderado. D) Grupo OLE apresenta material basofílico amorfo multifocal discreto (PAS, Bar=50µm).....71

Figura 19. Micrografia eletrônica de varredura de miocárdio de ratos Wistar controle (CON) (A, B) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG) (C,D), ouabaína (OUA) (E,F) e oleandrina (OLE) (G,H). A ultraestrutura do coração de animais CON mostrou fibras cardíacas intactas, alinhadas e sem alterações (A,B). Amostras do grupo DIG (C,D) revelou aumento da matriz extracelular adjacente às fibras cardíacas (asterisco branco) e discreta desorganização de cardiomiócitos (seta vermelha). O grupo OUA (E,F) expressou aumento moderado da matriz extracelular (asterisco branco) com preservação do alinhamento de cardiomiócitos. Já o grupo OLE (G,H) apresentou grave dissociação, encurtamento e ruptura das fibras cardíacas (seta vermelha).....73

Figura 20. Micrografia eletrônica de varredura do tecido renal de ratos Wistar controle (CON) (A) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG) (B), ouabaína (OUA) (C) e oleandrina (OLE) (D). A ultraestrutura dos rins de animais dos grupos CON e OUA não revelou alterações importantes (A,C), com preservação das estruturas vasculares, glomerulares e tubulares. No grupo DIG foi possível identificar alterações morfológicas em eritrócitos compatíveis com equinócitos (seta azul). No grupo OLE é possível observar apenas um aumento da matriz extracelular.....74

Figura 21. Valores médios e desvio padrão dos biomarcadores teciduais cardíacos: peptídeo natriurético cerebral (BNP) (A) e troponina I (cTnI) (B) obtidos de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Dados não paramétricos foram avaliados por Kruskal-Wallis ($p<0,05$). *Diferença significativa entre os grupos tratados ($p<0,05$).....76

Figura 22. Análise da expressão das isoformas alfa-1 e alfa-2 da bomba de sódio e potássio (NKA) por meio de análise de *Western blot* de amostras do coração de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) (C) e oleandrina (OLE). Os tratamentos não alteraram os níveis de da isoforma alfa-1 (A) e alfa-2 (B). A expressão da isoforma alfa-1 foi significativamente maior em todos os grupos estudados em relação à alfa-2 (C). A avaliação relativa entre as isoformas alfa-1/alfa-2 também não revelou diferenças significativas entre os tratamentos (D). Dados não paramétricos foram avaliados por Kruskal-Wallis ($p<0,05$). *Diferença significativa entre os grupos. *Diferença significativa entre os grupos tratados ($p<0,05$); **Diferença significativa entre os grupos tratados ($p<0,01$); ***Diferença significativa entre os grupos tratados ($p<0,001$).....77

Figura 23. Análise de estresse oxidativo (níveis de peroxidação lipídica – TBARs) e atividade das principais enzimas antioxidantes - SOD, CAT e GPx - no tecido cardíaco de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) (C) e oleandrina (OLE). Os tratamentos não alteraram os níveis de TBARs (A). A SOD apresentou aumento significativo de sua atividade enzimática nos grupos DIG e OLE, em relação ao controle e OUA (B). A atividade enzimática da CAT encontra-se aumentada em todos os tratamentos, com diferença significativa nos grupos DIG e OUA em relação ao

controle (C). Os tratamentos não alteraram a atividade enzimática da GPx (D). Dados paramétricos foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre os grupos.....79

LISTA DE ABREVIATURAS

µL: Microlitro

µm: Micrometro

µM: Micromolar

Ach: Acetilcolina

ANOVA: Análise 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 NKA: Bomba de sódio e potássio dependente de ATP

BPM: Batimentos por minuto

BS: Bradicardia sinusal

C57BL6: Linhagem de camundongo selvagem

Ca²⁺: Íon cálcio

cAMP: Adenosina monofosfato cíclica

CAT: Catalase

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CIB: *Cell Isolated Buffered*

CK: Creatina Quinase

CK-MB: Fração cardíaca da creatina quinase

Cl⁻: Cloreto

cm: Centímetros

CM-UFGM: Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais

COX-2: Cicloxigenase 2

cTnI: Troponina tipo I

DL50: Dose letal para 50% dos animais

ECG: Eletrocardiograma

EGFR: Receptor do fator de crescimento epidérmico
ERK: *Extracellular Signal-regulated Kinase-1*
ESSV: Extrassístole supraventricular
ESV: Extrassístole ventricular
EUA: Estados Unidos da América
EV: Escola de Veterinária
Fab: Fração de anticorpo
FC: Frequência cardíaca
FV: Fibrilação ventricular
FV: Fibrilação ventricular
FXYP: *Family of Small Membrane Proteins*
g/kg: Gramas por quilogramas
g: Gramas
GCs: Glicosídeos Cardioativos
GPx: Glutathione peroxidase
h: Horas
H⁺: Íon hidrogênio
HCO₃: Bicarbonato
HE: Hematoxilina Eosina
HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
Hz: Hertz
ICa: Corrente de cálcio
IC: Insuficiência Cardíaca
K⁺: Íon potássio
KCl: Cloreto de potássio
KHz: K hertz
LAMEX: Laboratório de Membranas Excitáveis
M: Molar
ME: Microscopia eletrônica
mg/dL: Miligramas por decilitro
mg/kg: Miligramas por quilogramas
mg/mL: Miligramas por mililitros
mg: Miligramas

Mg: Magnésio
MG: Minas Gerais
 MgCl_2 : Cloreto de magnésio
min: Minutos
mL: Mililitros
mm/s: Milímetros por segundo
mm: Milímetros
ms: Milissegundos
mV: Milivolt
 $\text{M}\Omega$: Mega ohm
n: Número de animais amostrados
 Na^+ : Íon sódio
NaCl: Cloreto de sódio
 NaH_2PO_4 : Fosfato monossódico
NAV: Nó atrioventricular
NCX: Trocador de sódio e cálcio
NKA: Bomba de sódio e potássio
ng/ml: Nanogramas por ml
nM: Nano molar
nM: Nanomolar
NO: Noradrenalina
NSA: Nó sino atrial
°C: graus Celsius
P: Onda de despolarização atrial do eletrocardiograma
Pms: Duração da onda P
PmV: Amplitude da onda P
PR: Segmento entre a despolarização atrial e ventricular do eletrocardiograma
PRms: Duração do intervalo PR
PS: Parada Sinusal
Q: Onda de despolarização inicial ventricular do eletrocardiograma
QRS: Complexo de despolarização ventricular do eletrocardiograma
QRSms: Duração do complexo QRS
QT: Intervalo de repolarização ventricular do eletrocardiograma

QTcB: Intervalo QT corrigido pela fórmula de Bazett
QTcF: Intervalo QT corrigido pela fórmula de Fridericia
QTcFr: Intervalo QT corrigido pela fórmula de Framingham
QTcH: Intervalo QT corrigido pela fórmula de Hodges
QTcM: Intervalo QT corrigido pela fórmula de Mitchell
QTcV: Intervalo QT corrigido pela fórmula de Van der Water
QTms: Duração do intervalo QT
R: Onda de despolarização ventricular do eletrocardiograma
RmV: Amplitude da onda R
ROS: Espécies reativas de oxigênio
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* – Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático
SNC: Sistema Nervoso Central
SOD: Superóxido Dismutase
ST: Segmento entre a despolarização e repolarização ventricular do eletrocardiograma
T: Onda de repolarização ventricular do eletrocardiograma
TBARs: *Thiobarbituric Acid-reactive Substances*
TmV: Amplitude da onda T
TS: Taquicardia sinusal.
TSSV: Taquicardia supra ventricular
TV: taquicardia ventricular
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
V: volts

RESUMO

Os glicosídeos cardioativos (GCs) são substâncias que atuam na bomba de sódio e potássio (NKA) do coração exercendo atividade inotrópica. O GC mais conhecido é a digoxina, empregado até hoje no tratamento da insuficiência cardíaca (IC). No entanto, sua restrita margem de segurança impulsiona a descoberta de novas substâncias cardioativas. Nesse âmbito, pouco se sabe sobre a atuação cardiovascular da oleandrina e ouabaína. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos comparativos dos GCs na fisiologia cardiorrenal. Inicialmente, foi realizado estudo da posologia da digoxina determinando-se que a dose efetiva capaz de alterar a contratilidade dos cardiomiócitos sem causar arritmias graves é de 50ug/kg via SC por 21 dias. Determinaram-se os valores de referência para os parâmetros eletrocardiográficos (ECG) e a melhor fórmula de correção do intervalo QT para ratos Wistar. Estabeleceu-se um protocolo anestésico para realização de ECG com isoflurano e determinação dos valores médios, desvio-padrão, mínimo e máximo dos principais parâmetros: frequência cardíaca (FC), duração e amplitude da onda P, duração dos intervalos PR e QT, duração do complexo QRS, amplitude das ondas R e T. Também foi feita a avaliação comparativa das fórmulas de QT, onde a fórmula de Hodges apresentou melhor correlação com a FC. E, finalmente, avaliaram-se os efeitos comparativos da digoxina, ouabaína e oleandrina na fisiologia cardiorrenal. A análise comparativa entre os GCs revelou importantes diferenças quanto à sua ação no sistema cardiovascular. Os GCs alteraram a série vermelha do hemograma, o que foi comprovado pela presença de equinócitos observados pela microscopia de varredura. Os animais que receberam oleandrina apresentaram lesões cardíacas mais graves observadas pela maior atividade sérica de LDH, aumento relativo da CK-MB necrose focal moderada de cardiomiócitos visto na microscopia óptica; ruptura, encurtamento e desorganização das fibras cardíacas como observado na microscopia eletrônica de varredura. Os três tratamentos provocaram aumento relativo da creatinina e discretas lesões observadas na microscopia óptica renal. A expressão da troponina I e isoforma alfa-1 não foram alteradas, no entanto os níveis proteicos de BNP e alfa-2 foram superiores nos grupos que receberam oleandrina e ouabaína em relação ao grupo digoxina. Todos os GCs afetaram a produção de ROS, sem no entanto causar peroxidação lipídica, por meio da ativação de diferentes vias antioxidantes. Conclui-se que os efeitos dos GCs são variáveis, possivelmente pela diferença entre a afinidade e inibição da bomba NKA.

Palavras-chave: digoxina, ouabaína, oleandrina, insuficiência cardíaca, eletrocardiograma, espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Cardioactive glycosides (GCs) are substances that act on the sodium and potassium pump of the heart (NKA) exerting inotropic activity. The best known GC is digoxin, used to date in the treatment of heart failure (HF). However, its narrow range of safety drives the discovery of new cardioactive substances. In this context, little is known about cardiovascular performance of oleandrin and ouabain. The aim of this study was to evaluate the comparative effects of GCs on cardiorenal physiology. Initially, a digoxin dosage study was performed, determining that the effective dose capable of altering the contractility of cardiomyocytes without causing serious arrhythmias is 50 ug/kg via SC for 21 days. The reference values for the electrocardiographic parameters (ECG) and the best QT interval correction formula were determined for especially Wistar rats. An anesthetic protocol was established for ECG with isoflurane and determination of mean values, standard deviation, minimum and maximum of the main parameters: heart rate (HR), duration and amplitude of P wave, duration of PR and QT intervals, duration of the QRS complex, amplitude of the R and T waves. The comparative evaluation of the QT formulas was also performed, where the Hodges formula presented a better correlation with the HR. Finally, the comparative effects of digoxin, ouabain, and oleandrin on the cardiorenal system were evaluated. The comparative analysis between GCs revealed important differences in their action on the cardiovascular system. GCs altered the red blood cell series, which was confirmed by the presence of echinocytes observed by scanning microscopy. Animals receiving oleandrin had more severe cardiac lesions observed by increased serum LDH activity, relative increase of CK-MB, and moderate focal necrosis of cardiomyocytes seen in light microscopy; rupture, shortening and disorganization of cardiac fibers as observed in scanning electron microscopy. The three treatments caused a relative increase of the creatinine and discrete lesions observed in renal optic microscopy. The expression of troponin I and alpha-1 isoform were not altered, however, the protein levels of BNP and alpha-2 were higher in the groups that received oleandrin and ouabain in relation to digoxin group. All GCs affected the production of ROS, without causing lipid peroxidation, through the activation of different antioxidant pathways. It is concluded that the effects of GCs are variable, possibly due to the difference between the affinity and inhibition of the NKA pump.

Keywords: digoxin, ouabain, oleandrin, heart failure, electrocardiogram, reactive oxygen species.

INTRODUÇÃO

Os glicosídeos cardioativos (GCs) são substâncias utilizadas, historicamente, no tratamento da insuficiência cardíaca (IC). As moléculas mais conhecidas, cujo potencial farmacológico é explorado até hoje, são a digoxina e digitoxina (Whitering, 1785; Prassas e Diamandis, 2009; Ambrosy et al., 2016). Novos usos terapêuticos e a retomada dos estudos desses compostos vêm sendo explorados em pesquisas recentes (Hamlyn e Blaustein, 2013; Córdova et al., 2016).

Essas substâncias são derivados esteroides, relacionados com a defesa dos organismos que os produzem. Existem dois grandes grupos de GCs: os cardenolídeos (mais produzidos pelas plantas) (Bandara et al., 2010) e os bufodienolídeos (produzidos principalmente pelos sapos) (Ma et al., 2012). Os cardenolídeos possuem um grupo lactona com cinco carbonos, enquanto os bufodienolídeos possuem anéis com seis carbonos (Kanji e MacLean, 2012). Esses esteroides podem ser encontrados em algumas plantas, tais como, *Digitalis* spp. (Kwon et al., 2011) e *Nerium oleander* (Pedroza et al., 2015), conhecidas popularmente como dedaleira e espiroleira, respectivamente.

Desde a descoberta dos GCs presentes na *Digitalis purpurea* (Whitering, 1785), estes tiveram um importante papel na medicina humana e veterinária, devido ao seu potencial inotrópico positivo. Muito se discute sobre os riscos de utilização da digoxina, o principal digitálico prescrito nas últimas décadas em função do seu potencial tóxico, o que limita o uso na terapia da IC, podendo causar arritmias graves e até o óbito (Hauptman e Kelly, 1999; Adams Jr. et al., 2016).

A IC é uma das síndromes clínicas mais importantes na medicina humana e animal. Em cães está associada principalmente a doenças valvares adquiridas, cardiomiopatia dilatada e alterações congênitas (Castro et al., 2009). Independente da patologia de origem, a instalação da IC geralmente cursa com falha na contração ventricular, sendo os GCs recomendados para pacientes com redução da fração de ejeção. Em pacientes idosos, com alteração da função renal e fibrilação atrial, sua utilização é considerada controversa (Ponikowski et al., 2016).

Outro GC que vem sendo estudado é a ouabaína, uma molécula produzida de forma endógena por seres humanos e animais, cujo o mecanismo de ação na regulação da hipertensão arterial ainda não foi totalmente elucidado (Hamlyn e Blaustein, 2013). A ouabaína foi descoberta em 1976 por Haddy e Overbeck como um GC presente fisiologicamente nos mamíferos. Os autores propuseram a existência de um fator inibidor da bomba de Na^+/K^+ (NKA) no plasma, que exerceria papel crucial na hipertensão sistêmica dependente de volume. Em seguida esse fator foi detectado na circulação humana e apenas em 1991, purificado e, descrito, desde então, como ouabaína-endógena (Hamlyn et al., 1991). Em mamíferos, foi comprovada que a presença da ouabaína está intimamente ligada a alguns modelos de hipertensão arterial (Meira et al., 2015).

Os GCs têm como alvo principal a NKA do coração, e seus impactos benéficos são atribuídos aos efeitos inotrópicos positivos devido ao aumento da disponibilidade do cálcio (Ca^{2+}) intracelular. Acredita-se que a inibição da NKA resulta em elevação do sódio (Na^+) intracelular que reduz secundariamente a extrusão do Ca^{2+} por meio do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), causando o aumento da contratilidade dos cardiomiócitos (Bers, 2002). A ouabaína pode, ainda, afetar a pressão sistêmica por meio da inibição da NKA, com consequente desequilíbrio iônico desencadeando a hipertensão sistêmica (Hamlyn e Blaustein, 2013; Meira et al., 2015).

Os efeitos adversos mais relatados da administração dos GCs são as arritmias. Acredita-se que o excesso de Ca^{2+} intracelular possa causar disparos espontâneos conhecidos como *waves* de Ca^{2+} , provocando oscilações no potencial de membrana dos cardiomiócitos, despolarizações atrasadas e extrassístoles ventriculares (Bers, 2002).

A oleandrina, proveniente da planta *N. oleander* é um dos GCs recentemente estudados. Não se conhece ainda o potencial farmacológico desse composto na terapia da IC e sua capacidade de alterar a eletrofisiologia dos cardiomiócitos. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa determinam sua capacidade de modular a atividade da bomba NKA e provocar arritmias em doses altas (Botelho et al., 2017).

Considerando a importância dos GCs na terapia de pacientes com IC, esse trabalho objetiva avaliar os potenciais efeitos da oleandrina, ouabaína e digoxina na fisiologia cardiorrenal.

OBJETIVOS

Geral

Investigar alterações eletromecânicas e estruturais cardiorrenais após a administração prolongada de oleandrina em comparação com a ouabaína e a digoxina em ratos Wistar hígidos.

Específicos:

Avaliar os parâmetros cardiovasculares *in vivo* e *ex vivo* dos efeitos do tratamento prolongado com digoxina por meio de avaliação seriada com eletrocardiograma, histologia e contratilidade celular em animais hígidos para determinação da posologia a ser empregada nos demais experimentos (Capítulo 2).

Determinar parâmetros eletrocardiográficos e a melhor fórmula de correção do intervalo QT para a linhagem de ratos Wistar a serem empregados como padrões de normalidade para futuros experimentos (Capítulo 3).

Avaliar os parâmetros cardiovasculares *in vivo* dos efeitos do tratamento prolongado com oleandrina, digoxina e ouabaína por meio de monitoramento seriado com eletrocardiograma, creatina quinase (CK) e sua fração MB (CK-MB), aspartato transaminase (AST), lactato desidrogenase (LDH), cálcio iônico (Ca^{2+}), cloreto (Cl^-), magnésio (Mg^{2+}), proteínas totais (PT), albumina (Alb), relação albumina/globulina (A/G), creatinina (Creat), ureia e troponina I (cTnI) (Capítulo 3).

Analisar as alterações anatomopatológicas do coração e rins após administração crônica de oleandrina, digoxina e ouabaína, assim como a ultraestrutura do coração e do tecido renal por meio de microscopia eletrônica de varredura (Capítulo 3).

Estudar o efeito do tratamento com oleandrina, digoxina e ouabaína sobre a expressão proteica de biomarcadores teciduais cardíacos troponina I (cTnI) e peptídeo natriurético (BNP) por meio de *Western blot* (Capítulo 3).

Estudar o efeito do tratamento com oleandrina, digoxina e ouabaína sobre a expressão proteica da bomba de sódio e potássio do coração, comparando a modulação das suas isoformas alfa-1 e alfa-2 (Capítulo 3).

Estudar os efeitos do tratamento com oleandrina, digoxina e ouabaína sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), por meio de mensuração dos níveis de TBARs (*Thiobarbituric Acid-reactive Substances*), e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) pelos métodos de ELISA e espectrofotometria (Capítulo 3).

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

Insuficiência cardíaca

Doenças cardiovasculares são as maiores causas de morte humana em países desenvolvidos. Sua etiologia e complicações são multifatoriais, envolvendo tanto fatores genéticos quanto ambientais, dificultando a capacidade de prevenção dessas doenças que frequentemente evoluem para a IC (Zaragoza et al., 2011).

A IC é uma síndrome clínica caracterizada por sinais e sintomas associados a anormalidades estruturais e/ou funcionais do coração, resultando em queda do débito cardíaco e/ou aumento das pressões intracardíacas. Os principais achados clínicos são fraqueza, falta de ar, inchaço nos membros inferiores, aumento da pressão da jugular, ruídos pulmonares e edema periférico (Ponikowski et al., 2016). No Brasil, em humanos, as principais etiologias descritas são cardiomiopatias indeterminadas, associadas à doença hipertensiva e isquêmica, doença de Chagas, choque cardiogênico, doença pericárdica e amiloidose (Bocchi et al., 2016).

Dados dos EUA indicaram que cerca de cinco milhões de pessoas têm insuficiência cardíaca congestiva (ICC), com o surgimento de 550 mil casos em cada ano, representando até um milhão de hospitalizações. O custo estimado pode chegar a 29 bilhões de dólares/ano e mortalidade entre 5-75%. Devido à epidemiologia da IC e o seu impacto econômico várias pesquisas vêm buscando novas terapias para diminuir a gravidade dos casos e até mesmo prevenir essa doença (Hunt et al., 2005).

Na medicina veterinária, os cães representam a espécie em que a IC é mais comumente diagnosticada e estudada. Em levantamento recente realizado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFGM), 90,6% dos cães encaminhados com suspeita de cardiopatias apresentaram doença degenerativa valvar e 9,38% cardiomiopatia dilatada (Botelho et al., 2016a). Com o prolongamento da vida dos animais de companhia, há uma tendência ao aumento das doenças cardiovasculares crônicas e o estudo de novas terapias e biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico e tratamento dos pacientes se faz necessário.

Existem cinco classes importantes de biomarcadores cardíacos de acordo com a patologia e apresentação clínica do paciente: (1) inflamação e placa; (2) isquemia; (3) necrose inicial; (4) necrose intermediária e tardia; e (5) IC (Singh et al., 2010). Os principais marcadores de inflamação e desestabilização da placa de atheroma são a proteína C reativa (CRP), mieloperoxidases, metaloproteinases, interleucina 6 e fator de crescimento placentário (Singh et al., 2010). Entretanto, esses marcadores não fazem parte da rotina diagnóstica da medicina humana, com exceção da CRP (Santos et al., 2003), e ainda são pouco descritos na medicina veterinária. A isquemia pode ser diagnosticada com o auxílio da albumina modificada pela isquemia, enzima glicogênica-fosforilase, ácidos graxos livres e fosfolipases (Singh et al., 2010).

Os principais marcadores precoces da necrose de miocárdio são a mioglobina e a creatina quinase fração MB, em especial a isoforma CK-MB. Para identificação de necrose intermediária e tardia, além da própria CK, as troponinas cardíacas (cTn) podem ser avaliadas, com destaque para a cTnT e cTnI. Já em casos de IC, os marcadores mais utilizados são os peptídeos natriuréticos, em especial o peptídeo natriurético cerebral (BNP), cujo aumento está diretamente relacionado com o remodelamento atrioventricular e à presença de arritmias importantes (Yonezawa et al., 2009; Singh et al., 2010).

Na medicina humana, diretrizes são frequentemente atualizadas para adequar aos novos biomarcadores e fármacos que vem surgindo. Os medicamentos mais indicados para a terapia da IC são os betabloqueadores, inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA),

antagonistas da aldosterona, diuréticos, anticoagulantes e antiagregadores plaquetários, antiarrítmicos, bloqueadores dos canais de Ca^{2+} e inotrópicos (Bocchi et al., 2012; Ponikowski et al., 2016).

Dentre os inotrópicos positivos, a classe dos digitálicos, em especial a digoxina, representa uma das poucas drogas de uso oral aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o aumento da contratilidade cardíaca em pacientes com IC. No entanto, a curta margem de segurança da digoxina limita a sua utilização e impulsiona novos estudos sobre o potencial cardioativo de outros compostos semelhantes, os GCs ou cardenolídeos, que atuam no mesmo sítio de ação, a bomba NKA do coração.

Bomba NKA

A bomba NKA é uma proteína tipo T ubíqua, que exporta três íons Na^+ e internaliza dois íons K^+ contra seu gradiente eletroquímico, consumindo ATP. Sua atividade é primordial para o transporte ativo celular e múltiplos mecanismos regulatórios nos tecidos onde é expressada, como no músculo esquelético cardíaco, rins, endotélio, epitélio alveolar, jejuno, epitélio ciliar, encéfalo e, principalmente, no sarcolema de células cardíacas (Fuller et al., 2013; Zhang et al., 2014).

A descoberta de diferentes isoformas da NKA foi crucial para o entendimento da diferença de sensibilidade entre espécies frente a ação dos GCs e o seu papel em cada tecido onde é expressada. Sua estrutura é formada por três subunidades: α , β e γ ; a última também é conhecida como proteína FXYD. Existem quatro isoformas da subunidade α , três da β e sete proteínas FXYD (Geering, 1991; Sweadner e Rael, 2000; Karlish et al., 2008). Acredita-se que a combinação entre as subunidades possa gerar cem diferentes tipos de bombas com atividades fisiopatológicas distintas (Fuller et al., 2013). No músculo cardíaco, predominam as isoformas α -1, α -2 e β -1. O sítio catalítico da bomba é a subunidade α , com locais de ligação para o Na^+ , K^+ e GCs (James et al., 1999).

O bloqueio da bomba NKA pelos GCs pode ser benéfico para pacientes com redução da fração de ejeção e, até mesmo, auxiliar na terapia antiarrítmica devido ao seu consequente aumento na contratilidade dos cardiomiócitos. No coração, NKA tem papel importante no estabelecimento do gradiente de Na^+ intracelular, sendo fundamental para manutenção do potencial de ação (PA), além de estar associada a vários trocadores e transportadores essenciais para funcionamento celular normal, homeostase iônica e controle do volume celular (Fuller et al., 2013).

Os GCs se ligam à subunidade α da NKA, impedindo o transporte ativo dos íons Na^+ e K^+ . Consequentemente, há aumento do Na^+ intracelular e dos níveis séricos de K^+ (Langford e Boor, 1996). O aumento do Na^+ intracelular afeta o trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), impedindo a saída do Ca^{2+} da célula. O incremento dos níveis intracitoplasmáticos de Ca^{2+} promove maior interação com o mecanismo contrátil celular, impedindo o relaxamento do músculo cardíaco e promovendo sua contração, fenômeno conhecido como efeito inotrópico positivo (Figura 1), benéfico para pacientes com IC (Langer, 1981; Langford e Boor, 1996).

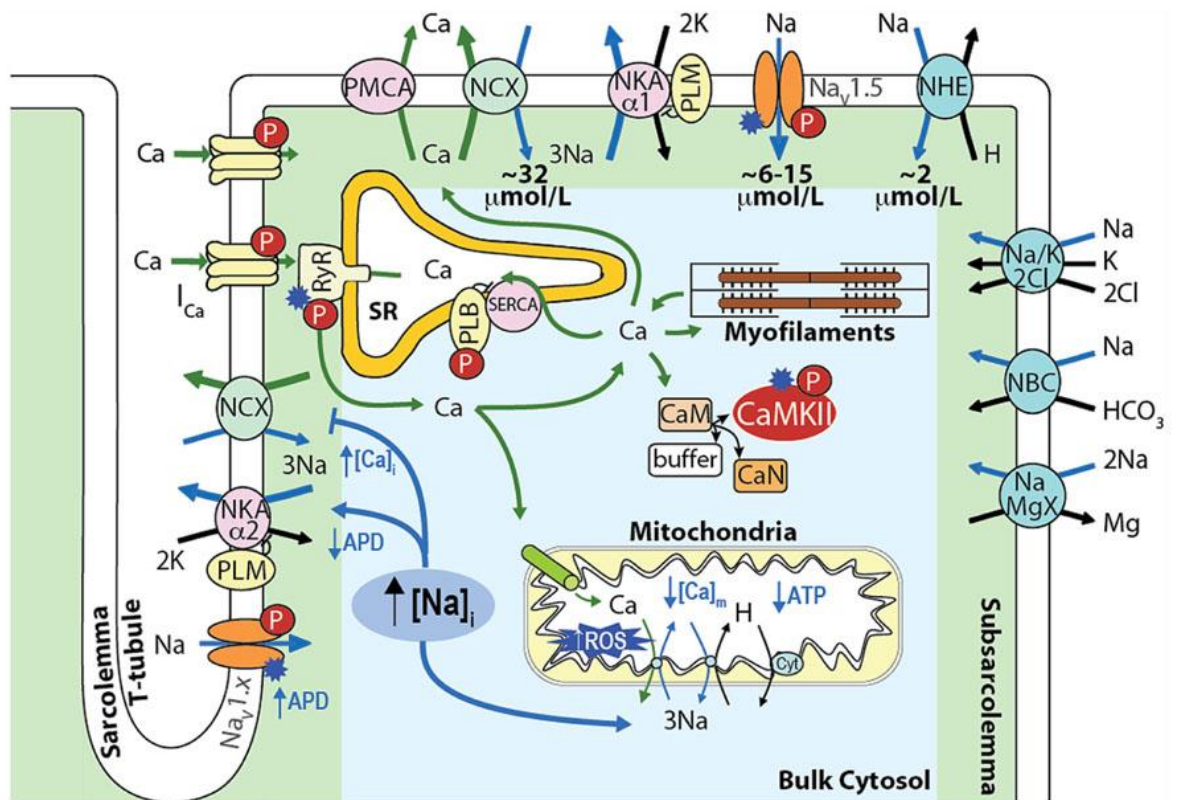


Figura 1: Mecanismo de ação dos glicosídeos cardioativos: a inibição da corrente da bomba de sódio e potássio (NKA), impede a extrusão de 3Na^+ do citoplasma em troca de 2K^+ contra o seu gradiente eletroquímico. O acúmulo do Na^+ intracelular promove a troca de 3Na^+ por 1Ca^{2+} pelo trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Consequente acúmulo do Ca^{2+} intracelular aumenta a interação com as proteínas contráteis do coração, promovendo o inotropismo positivo. ATP: adenosina trifosfato; NCX: trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; RyR: receptores de rianodina; PLB: fosfolambam (Adaptado de Grandi e Herren, 2014).

Acoplamento excitação-contração

A atividade elétrica do miocárdio é atribuída à capacidade das células cardíacas de gerar e coordenar potenciais de ação (PAs), prontamente detectados pelo eletrocardiograma. A geração dos PAs depende da expressão e atividade de diversos canais, bombas e trocadores iônicos que participam dos processos de despolarização e repolarização da membrana citoplasmática. Mudanças nas propriedades desses canais podem levar a alterações na morfologia do potencial de ação (PA), sincronização e/ou propagação os impulsos elétricos, predispondo assim o coração a arritmias potencialmente letais (Nerbonne e Kass, 2005).

O impulso elétrico surge em células com propriedades biofísicas autoexcitatórias encontradas principalmente no nó sinusal. O estímulo elétrico é então conduzido por todo o miocárdio 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).

Ondas de despolarização iniciadas no nó sinusal se propaga pelos átrios, o que é identificado pelo eletrocardiograma como onda P. Na sequência, o sinal elétrico passa pelo nó atrioventricular, onde ocorre pequena pausa fisiológica observada como intervalo PR. O impulso ao atingir os cardiomiócitos ventriculares, promovem a despolarização no seu potencial de membrana, representado pelo complexo QRS. A fase de repolarização é visualizada pela onda T, principalmente devido ao processo de inativação dos canais de Na^+ e abertura dos canais de K^+ dependentes de voltagem, principal componente iônico responsável pela repolarização do potencial de membrana, representada pela onda T (Bers e Despa, 2006; Tilley, 2012).

O acoplamento excitação-contração é o processo que permite a interação do íon Ca^{2+} com a maquinaria contrátil do coração realizando sua contração e relaxamento a partir da propagação do PA. O PA cardíaco pode ser dividido de forma didática em cinco fases. A fase 0 é caracterizada pelo início da despolarização induzida pela abertura dos canais de Na^+ e início da abertura dos canais de K^+ transiente rápidos (I_{to}). A fase 1 é deflagrada principalmente pela abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem tipo L ($I_{\text{Ca,L}}$), para permitir sua interação com a troponina. Durante a fase 2 a ativação da corrente de Ca^{2+} permanece, formando o platô do PA e alguns canais de K^+ iniciam a ativação lenta. Durante a fase 3 a corrente de Ca^{2+} é inativada e as correntes de K^+ recuperam o PA no processo repolarização. A fase 4 é retomada ao potencial de repouso, com contribuição ativa de canais K^+ (Bers, 2002; Bers, 2008).

O acoplamento excitação-contração está diretamente relacionado à disposição das proteínas nele envolvidas. Regiões de túbulos T concentram a grande maioria de canais e transportadores, como os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, bomba NKA, especialmente a isoforma alfa-2, e o trocador NCX. Nesses mesmos locais podem ser encontrados grande concentração de organelas, em especial retículo sarcoplasmático e mitocôndrias, o que cria microdomínios eletroquímicos que favorecem o inotropismo cardíaco (Aronsen et al., 2013).

À medida que o PA atinge os túbulos T, a ativação dos canais de Ca^{2+} tipo L, permite grande entrada de Ca^{2+} intracelular, ativando receptores de rianodina (RsRy) que por sua vez induzem a liberação de Ca^{2+} estocado no retículo sarcoplasmático (RS) em processo chamado *calcium-increase calcium release*. O Ca^{2+} disponível no citoplasma interage com a troponina C (TnC) e favorece sua interação com a troponina I (TnI), fazendo com que a TnI se desligue do sítio ativo da actina liberando sua conexão com a tropomiosina (TmT) e TnT . O que permite sua interação com a miosina e, portanto, a contração por meio do encurtamento das fibras cardíacas (Bers, 2002; Bers, 2008).

Glicosídeos cardioativos

Os GCs são um grupo de substâncias amplamente distribuídas na natureza, com diferentes fontes e aplicações, e estrutura química muito semelhante. Todos os GCs têm em comum um anel esteróide, ligado a um anel lactona insaturado na posição 17 e a maioria deles também está ligada a uma porção de açúcar na posição 3 (Figura 2 e Tabela 1) (Schonfeld et al. 1985).

A diversidade destas moléculas provém de pequenas diferenças na estrutura, especialmente o número de carbonos do anel de lactona e porções de açúcar associadas. Os cardolídeos, encontrados principalmente em plantas, possuem um anel de butirólactona com cinco carbonos, enquanto os bufodienolidos, encontrados principalmente em veneno de sapos, possuem um anel de pirona com seis carbonos (Prassas e Diamandis, 2008).

Tabela 1. Fórmula química, massa molecular e resíduos de açúcar dos principais glicosídeos cardioativos

Glicosídeos cardioativos	Fórmula química	Massa molecular (g/mol)	Molécula de açúcar
Digoxina	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₄	780.949	Polissacarídeos de <i>hexopyranosyl</i>
Ouabaína	C ₂₉ H ₄₄ O ₁₂	584.659	Monossacarídeo de <i>mannopyranosyl</i>
Oleandrina	C ₃₂ H ₄₈ O ₉	576.727	Monossacarídeo de <i>hexopyranosyl</i> e acetoxil

O grupo esteróide é comum a todas as substâncias, formado por 17 carbonos distribuídos em quatro anéis ligados a um anel de lactona e diferentes resíduos de açúcar. Os açúcares mais frequentemente encontrados são glicose, galactose, manose, ramnose e digitalose. A atividade de GCs está relacionada ao anel lactona, enquanto os resíduos de açúcar são determinantes para a toxicocinética e toxodinâmica de cada substância (Brown et al., 1986; Kanji e Mac Lean, 2012). A presença de agliconas livres, por exemplo, favorece a absorção e biotransformação de GCs, enquanto a presença de resíduos de açúcar, como a ramnose, pode potencializar sua ação em mais de 25 vezes (Melero et al., 2000; Cornelius et al., 2013).

Considerando isso, a forma glicosídica de moléculas conhecidas como digoxina, digitoxina e ouabaína proporciona maior bloqueio da NKA em comparação à sua forma de aglicona. No entanto, esse fenômeno depende não apenas do número e da natureza dos açúcares, mas também da estrutura esteróide e do número de grupos hidroxila presentes (Cornelius et al., 2013). Os açúcares não possuem receptores específicos no local de interação, mas podem permitir uma ligação e estabilidade mais fortes. A primeira molécula ligada ao anel esteróide é potencialmente a mais importante para garantir o bloqueio da NKA (Melero et al., 2000; Cornelius et al., 2013).

Fontes dos principais glicosídeos cardioativos

GCs são substâncias farmacologicamente ativas produzidas por diferentes espécies de plantas e animais, incluindo o homem. Os mais conhecidos são: digoxina, digitoxina, ouabaína, oleandrina, bufalina, marinobufagenina, aerobufagenina e telocinobufagina. A tabela a seguir mostra a associação entre cada GC e suas respectivas fontes (Tabela 2).

Os GCs são historicamente descritos em plantas e sua ingestão está associada a sinais clínicos cardiovasculares devido ao bloqueio da corrente da NKA no coração. A ouabaína é encontrada em plantas do gênero *Acokanthera* e *Strophanthus* (Cassels, 1985; Strobach et al., 1986), digoxina em plantas do gênero *Digitalis*, como *D. lanata* e *D. purpurea* (Whitering, 1875; Braga et al., 1997) e oleandrina da planta *Nerium oleander* (Pedroza et al., 2015). A intoxicação por bufodienolídeos também permite a mesma inferência; relatos de intoxicação por veneno de rã do gênero *Rhinella* impulsionaram a pesquisa para a identificação de diferentes GCs e seu veneno (Li et al., 2013; Huang et al., 2015).

Tabela 2: Principais glicosídeos cardioativos e suas fontes

Glicosídeos cardioativos	Fontes	Referências
Digoxina	Planta <i>Digitalis purpurea</i> Urina humana (<i>digoxin-like</i>)	Whitering, 1785 Goto et al., 1990
Digitoxina	Plantas do gênero <i>Digitalis</i>	Braga et al., 1997
Ouabaína	Plasma humano (<i>ouabain-like</i>) Glândula adrenal bovina (<i>ouabain-like</i>) Hipotálamo bovino (<i>ouabain-like</i>) Plantas dos gêneros <i>Acokanthera</i> e <i>Strophanthus</i>	Hamlyn et al., 1991 Hamlyn et al., 1991; Tymiak et al., 1993 Cassels, 1985; Strobach et al., 1986
Oleandrina	Planta <i>Nerium oleander</i>	Pedroza et al., 2014 Botelho, 2015; Botelho 2016 b
Thevetina	Planta do gênero <i>Thevetia</i>	Melero et al., 2000
Bufalina	Chá <i>Chan Su</i> (<i>Bufo bufo gargarizans</i> e <i>Bufo melsanostictus</i>) Veneno de <i>Rhinella schneideri</i>	Li et al., 2013 Simão, 2015
Marinobufagenina	Plasma e urina de humanos e ratos	Fedorova et al., 2001; Tian et al., 2010
Telocinobufagina	Plasma humano	Komyiama et al., 2005
Bufotalina	Veneno de <i>Bufo vulgaris</i>	Melero et al., 2000

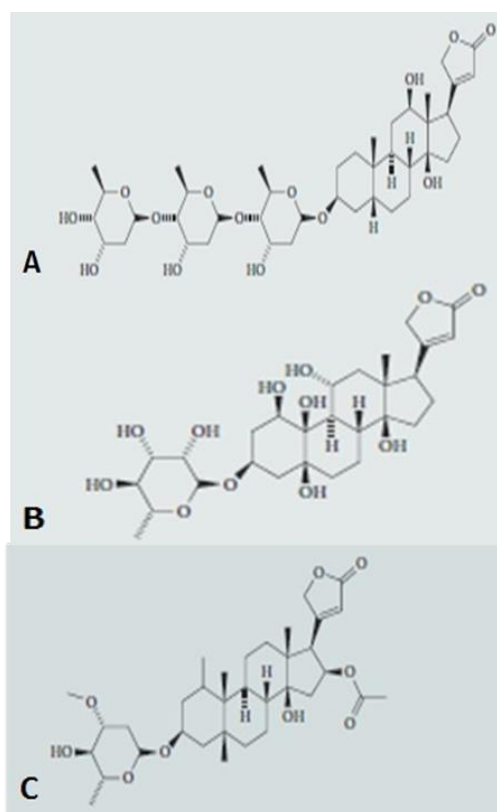


Figura 2. Estrutura molecular dos glicosídeos cardioativos: A- Digoxina, B-Ouabaína, C- Oleandrina (adaptado de Prassas e Diamandis, 2009).

Somente no início da década de 1990, com a identificação de compostos endógenos do tipo digitálico, a busca por GCs produzidos por mamíferos foi intensificada. Com isso foi possível identificar moléculas análogas e/ou idênticas à ouabaína, digoxina, digitoxina, marinobufagenina e telocinobufagenina em amostras de plasma (Hamlyn et al., 1991) e urina (Goto et al., 1990) de pacientes com insuficiência cardíaca e renal (Gottlieb et al., 1992; Komiyama et al., 2005).

Esta descoberta foi seguida pela correlação de GCs endógenos, controle da pressão arterial (Hamlyn et al., 1991) e IC (Gottlieb et al., 1992) impulsionando novos estudos em relação ao seu mecanismo de ação e diferentes respostas fisiológicas.

Digoxina

Entre os GCs, a digoxina é a molécula mais conhecida, utilizada no tratamento da IC por mais de dois séculos. Derivada de compostos digitálicos encontrados nas plantas *Digitalis lanata* e *D. purpurea*, o primeiro relato da sua utilização no tratamento da IC foi feito por Withering em 1785. Entretanto, devido ao seu potencial tóxico, pequena margem de segurança e a descoberta de novas substâncias para o tratamento da IC, sua utilização clínica foi reduzida (DIG Trial, 1997; Pincus, 2016).

Pesquisas randomizadas que investigaram a capacidade terapêutica da digoxina determinaram que sua utilização reduziu hospitalizações causadas pela falência cardíaca, sem, no entanto, afetar a sua mortalidade (DIG Trial, 1997). Em pacientes com histórico de isquemia miocárdica e falência cardíaca utilizando a digoxina de forma crônica também não foi possível estabelecer associação com a mortalidade (Chamaria et al., 2015; Metawee et al., 2016).

Entretanto, a eficácia da digoxina é muito controversa. Pacientes com fibrilação atrial que utilizam digoxina possuem 27% mais chance de morte, sendo 21% de causas relacionadas às doenças cardiovasculares (Qureshi et al., 2016). Estudos recentes também sugerem que sua utilização, possa sim, aumentar o risco de morte (Vamos et al., 2015; Adams Jr. et al., 2016; Madelaire et al., 2016; Zeng et al., 2016).

Atualmente, a digoxina é recomendada para o tratamento da IC, em pacientes com ritmo sinusal normal e fração de ejeção alterada. Pode ser utilizada concomitantemente com betabloqueadores e inibidores da ECA (Bocchi et al., 2012). Também é recomendável a avaliação dos níveis séricos de digoxina em pacientes com IC para determinação da dose adequada em função da idade, sexo, patologias presentes e função renal (DIG Trial, 1997). Pacientes com baixos níveis séricos, entre 0,5-0,9 ng/mL, apresentaram menor morbidade sem alteração da mortalidade geral em comparação com pacientes cujos níveis séricos foram superiores a 1,2 ng/mL (Adams Jr. et al., 2016).

Em casos de intoxicação os valores séricos da digoxina podem atingir 5,7 ng/mL e já foram relatados de forma acidental (Renard et al., 2015) ou em tentativas de suicídio (Juneja et al., 2012). A conduta clínica nesses casos envolve tratamento antiarrítmico, de suporte e a utilização de anticorpo específico, Fab anti-digoxina, capaz de neutralizar com sucesso a droga (Chan e Buckley, 2014). Entretanto, o uso do Fab é restrito até mesmo em centros médicos mais avançados devido ao seu alto custo.

Os principais sinais clínicos associados a essa intoxicação se assemelham a outros cardenolídeos e incluem náusea, vômito, dor abdominal, alteração do *status* mental e distúrbios visuais (Tabelas 3 e 4). O achado laboratorial mais comum é a hiperpotassemia. No eletrocardiograma (ECG) pelo menos 26,8% dos pacientes apresentam alterações e, 41,5% dos pacientes que já apresentavam lesões, exibem novas arritmias (Limon et al., 2016; Scalese et al., 2016). Dentre as mais comuns foram identificadas a fibrilação ventricular (FV), taquicardia

ventricular (TV), arritmias supraventriculares, bloqueio atrioventricular de segundo (BAV 2) e terceiro grau (BAV 3) (DIG Trial, 1997). Em função das ressalvas em sua utilização, novas opções terapêuticas vêm surgindo para tentar substituir a digoxina no tratamento da IC.

Ouabaína

A ouabaína é um cardenolídeo conhecido por estar presente no veneno de flechas da tribo Massai, na África, originada da semente de plantas como *Strophantus gratus* e *Acokenthera schimperi* (Cassels, 1985). Além disso, seu reconhecimento como um glicosídeo endógeno iniciou na década de 1970, com a busca por um ligante da bomba NKA responsável pela regulação da excreção do Na^+ em modelos de expansão plasmática (Haddy et al., 1978).

Em 1976, foi observado que esse fator endógeno inibidor da NKA participava da fisiopatogenia da hipertensão dependente de volume. Cães hipertensos apresentavam diminuição da atividade da NKA e a substância responsável por essa atuação passou a ser chamada de *digitalis-like* (Haddy et al., 1978). Durante os anos seguintes ela foi utilizada em pesquisas sobre a hipertensão arterial e inotropismo, e a busca pela identificação da sua forma química se iniciou.

Apenas em 1991, essa substância foi identificada como ouabaína a partir do plasma humano (Hamlyn et al., 1991). Com alta afinidade pela bomba NKA e ações cardiotônicas e vassopressoras já conhecidas, a ouabaína passou a ser mais amplamente pesquisada. Nos mamíferos, ela já foi identificada no plasma, adrenal (Laredo et al., 1994), hipotálamo (Huang et al., 1996) e coração (D'Urso et al., 2004), sendo considerada um hormônio com atividade fisiológica pouco conhecida (Blaustein et al., 2009). Acredita-se que seu papel é controlar a pressão arterial e o balanço de Na^+ (Hamlyn et al., 1996). Mas a ouabaína também é capaz de atuar no músculo cardíaco e endotélio modulando sua função, proliferação e diferenciação (Huang e Li, 1997; Aydemir-Koskoy et al., 2001).

Em alguns estados patológicos é possível encontrar altos níveis circulantes de ouabaína, sugerindo um possível envolvimento na fisiopatogenia de doenças como a IC (Gottlieb et al., 1992), hipertensão arterial primária (Hamlyn et al., 1991), síndrome de Cushing (Naruse et al., 1994) e insuficiência renal crônica (Hamlyn et al., 1996) (Tabelas 3 e 4).

Seu mecanismo de ação mais conhecido é o bloqueio da NKA, alterando o balanço eletroquímico de íons importantes como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , resultando em efeito inotrópico positivo por meio de interferência no NCX (Bai et al., 2013). Entretanto, em doses baixas, a ouabaína pode aumentar a atividade da NKA, reduzindo a tensão ventricular (Meira et al., 2015). Essa ação inotrópica negativa não é relatada em outros GCs e ainda não foi totalmente elucidada.

Devido a suas propriedades inotrópicas, a ouabaína vem sendo usada como um marcador da atividade da bomba NKA na busca por drogas para o tratamento de diferentes patologias cardiovasculares. Além do inotropismo, ela também ativa vias de sinalizações intracelulares associadas a moléculas como a ERK (*Extracellular Signal-regulated Kinase-1*) e EGFR (Receptor do fator de crescimento epidérmico), que participam da fisiopatogenia da hipertrofia cardíaca (Bai et al., 2013).

Sabe-se que a administração exógena de ouabaína de forma crônica é capaz de induzir a hipertensão arterial, sugerindo sua atuação na patogênese ou manutenção da hipertensão. Em ratos propensos à doença, a ouabaína está associada ao aumento da pressão arterial, com modulação na produção do (óxido nítrico) NO e aumento da produção de fatores vasoconstritores derivados da (ciclooxigenase) COX-2, sugerindo que seu mecanismo de ação vai além do bloqueio da NKA e pode estar relacionado com fatores centrais e periféricos (Xavier et al., 2009; Davel et al., 2014). Os efeitos prolongados da sua administração exógena ainda não foram totalmente elucidados.

Tabela 3: Principais sinais clínicos associados à intoxicação por digoxina, ouabaína e oleandrina

Glicosídeos cardioativos	Sinais clínicos	Referências
Digoxina	Alterações do estado mental, cefaleia, convulsão, náusea, vômito, diarreia, dor abdominal, distúrbios da visão, palpitações cardíacas, fadiga, fraqueza, pulso irregular, arritmias	Joost et al., 2010; Mitchell, 2010; Renard et al., 2015; Janssen et al., 2016
Ouabaína	Aumento da pressão arterial e arritmias	Xavier et al., 2009; Davel et al., 2014
Oleandrina	Vômito, sialorreia, dor abdominal, tremores, diarreia, arritmias, pulso fraco e irregular, dor de cabeça, letargia, dor torácica, palpitações cardíacas, apatia, alteração do estado mental, incoordenação, fraqueza e depressão	Haynes et al., 1985; Le Couter e Fisher, 2002; Aslani et al., 2007; Barbosa et al., 2008 Peymani et al., 2011; Kuçukdurmaz et al., 2012, Page and Murtaugh, 2014

Oleandrina

A oleandrina é o principal GC encontrado na *N. oleander*, planta pertencente à família Apocynacea, nativa de regiões mediterrâneas da Europa e Ásia, cultivada como planta ornamental em todo o mundo (Pio Corrêa, 1975; Cruz, 1979). Popularmente é conhecida como espiroleira, oleander, adelfa, loureiro rosa, flor de São José, loandro da Índia, solan e kaner (Cruz, 1979).

Estudos sobre os efeitos tóxicos desse GC são escassos, sendo os relatos de caso de intoxicação pela ingestão da planta mais comuns, envolvendo geralmente lesões agudas e morte súbita em homens (Dorsey, 1962; Langford e Boor, 1996; Papi et al., 2002; Wojtyna e Enseleit, 2004; Peymani et al., 2011) e diferentes espécies animais (Langford e Boor, 1996; Hughes et al., 2002; Soto-Blanco et al., 2006; Pedroso et al., 2009) (Tabelas 3 e 4).

Sua utilização fitoterápica no passado envolveu patologias como a IC (Middleton et al., 1936), dermatopatias e tumores externos (Lorenzi e Matos, 2002). O extrato da *N. oleander* também pode ser benéfico no tratamento experimental de diabetes tipo 2 (Bas et al. 2012) e alguns tipos de neoplasia de origem mamária e pulmonar (Siddiqui et al., 2012; Calderón-Montaña et al. 2013). Várias pesquisas mostram seu amplo potencial como antifúngico (Hadizadeh et al., 2009), antimicrobiano (Derwich et al., 2010), inseticida (Roni et al., 2013), antiinflamatório, antipirético (Kumar e Anand, 2010) e imunomodulador (Al-Farwachi et al., 2007).

Sua utilização, entretanto, é limitada pelos efeitos colaterais, principalmente as arritmias. As mais frequentemente relatadas são bradicardia (Shumaik et al., 1988; Khan et al., 2010), taquicardia (Le Couter e Fisher, 2002), ritmo idioventricular (Haynes et al., 1985), inversão da onda P, BAVs de 1º (Khan et al., 2010), 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).

O seu potencial terapêutico e pró-arrítmico se deve à sua ação inibitória da corrente da bomba NKA (Botelho et al., 2017). Em cardiomiócitos isolados é capaz de aumentar os níveis

intracelulares de Ca^{2+} de forma dose-dependente, reduzindo o pico do transiente e aumentando os *sparks* de Ca^{2+} . É provável que além da modulação da NKA, a oleandrina seja capaz de afetar os receptores de rianodina e/ou canais de Ca^{2+} do sarcolema (Poindexter et al., 2007).

Tabela 4: Achados eletrocardiográficos mais comuns atribuídos à intoxicação por digoxina, ouabaína e oleandrina

Glicosídeos cardioativos	Achados eletrocardiográficos	Referências
Digoxina	Bradicardia, bloqueio atrioventricular, parada sinusal, ritmo idioventricular acelerado, inversão da onda T, taquicardia ventricular, extra-sístole ventricular, extra-sístole supraventricular e taquicardia, fibrilação atrial	Smith et al., 1982; Princi et al., 2000; Ramirez-Ortega et al., 2007; Joost et al., 2010; Mitchell, 2010; Janssen et al., 2016
Ouabaína	Extrassístole ventricular, taquicardia ventricular, fibrilhação ventricular, arritmia sinusal, bradicardia, bloqueio atrioventricular	Chagas, 1932; Page and Real, 1955; Zipes et al., 1974; Germiani et al., 1995
Oleandrina	Extrassístoles ventriculares, ritmo juncional, bloqueio atrioventricular, fibrilação atrial, taquicardia ventricular, fibrilação ventricular, taquicardia sinusal, ritmo idioventricular, bloqueio de His, parada sinusal, ritmo de escape juncional, flutter atrial	Haynes et al., 1985; Le Couter e Fisher, 2002; Camphausen et al., 2005; Peymani et al., 2011, Senthilkumaran et al., 2011; Kuçukdurmaz et al., 2012; Khan et al., 2013

A IC é uma das patologias mais importantes para a medicina humana e animal, e apesar dos avanços na terapia, diagnóstico e prognóstico ainda faltam fármacos cardioativos seguros que atuem de forma crônica na contração cardíaca. O potencial farmacológico da oleandrina vêm sendo estudado e sua capacidade de aumentar a contração ventricular em doses reduzidas pode ser determinante na terapia da IC.

CAPÍTULO 2

Avaliação da contratilidade de cardiomiócitos de animais submetidos ao tratamento prolongamento com digoxina

Resumo

A digoxina é fármaco um inotrópico positivo usado para tratamento de insuficiência cardíaca (IC); no entanto, sua eficácia é questionada devido a sua curta margem terapêutica. O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma posologia segura para o uso da digoxina (DIG) por meio da avaliação do remodelamento eletromecânico do coração. Foram utilizados 12 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) distribuídos em três grupos (n=4), tratados diariamente durante 21 dias, por via subcutânea (SC): grupo controle (NaCl 0,9%), grupo DIG 50 e grupo DIG 100 (50 e 100 µg/kg de digoxina, respectivamente). Estes animais foram avaliados por meio de exame clínico e eletrocardiograma seriado a cada sete dias. Ao final do experimento, um animal de cada grupo foi eutanasiado para coleta de material histológico e outros três animais para isolamento de cardiomiócitos e avaliação da contratilidade celular. Não foram observadas alterações clínicas, eletrocardiográficas e histopatológicas significativas, embora o grupo DIG 100 tenha apresentado diminuição da onda T após sete dias. Essa alteração não se manteve ao longo do experimento e, portanto, não representa achado importante associado à administração da digoxina. A ausência de alterações significativas confirma que a dose de 50µg/kg de digoxina, por 21 dias, não é tóxica, já que o tratamento com essa droga pode causar arritmias graves, vacuolização intracitoplasmática de cardiomiócitos e necrose de coagulação das fibras cardíaca. No grupo DIG 50, a análise de contratilidade celular revelou prolongamento da contração inicial e relaxamento final dos cardiomiócitos isolados. Esse achado está relacionado à capacidade da digoxina de inibir a corrente da bomba de sódio (Na^+) e potássio (K^+) (NKA) e impedir o transporte ativo dos íons Na^+/K^+ , promovendo um aumento do Na^+ intracelular e do K^+ extracelular. Esse distúrbio eletrolítico promove aumento do cálcio intracelular (Ca^{2+}) e consequente efeito inotrópico. Foi possível observar neste experimento que a provável maior disponibilidade do Na^+ e Ca^{2+} prolongou o tempo de contração e relaxamento celular no grupo DIG 50. Os resultados indicam que a posologia (50µg/kg) utilizada tem potencial antiarrítmico e pode ser utilizada como modelo no tratamento experimental da IC.

Palavras-chave: contratilidade, cardenolídeos, insuficiência cardíaca.

Introdução

A digoxina é um GC utilizado na terapia da IC há séculos (Withering, 1785; DIG Trial, 1997). Capaz de bloquear a corrente da NKA do coração teve seu uso difundido devido ao baixo custo e boa resposta inotrópica positiva e cronotrópica negativa. No entanto, estudos nas últimas décadas vêm questionando sua capacidade de reduzir a mortalidade de pacientes internados (DIG Trial, 1997; Pincus, 2016).

Com o surgimento de novas drogas, especialmente os betabloqueadores, sua utilização clínica foi significativamente reduzida. A curta margem de segurança da digoxina fez com que a pesquisa por novos fármacos fosse impulsionada (Bocchi et al., 2012).

Diante disso, GCs similares à digoxina serão avaliados no decorrer desta tese com o intuito de estudar os seus efeitos na fisiologia cardiorrenal e potencial na terapia cardiovascular. Para isso, é necessário estabelecer uma posologia padronizada para que os GCs sejam inicialmente avaliados de forma equiparada.

A partir dos estudos de Meira et al. (2015) optou-se pelas doses de 50 e 100 µg/kg de digoxina. Considerando os efeitos observados *in vivo* e *ex vivo* da digoxina sobre o músculo cardíaco, iniciamos os estudos sobre a ação cardiorrenal dos GCs. Utilizando tratamento prolongado com 50 e 100 µg/kg de digoxina subcutânea (SC) por 21 dias, determinamos a dose para que os próximos estudos sejam conduzidos na tentativa de elucidar alguns dos mecanismos pelos quais as alterações cardiovasculares ocorrem. Considerando o potencial cardiovascular da digoxina, o objetivo do presente capítulo foi estudar os efeitos da sua administração prolongada na capacidade contrátil do coração.

Material e Métodos

Seleção dos animais e grupos experimentais

Todos os animais utilizados foram manejados respeitando o bem-estar e minimizando o desconforto, após aprovação do Comitê de Ética no Uso dos Animais (CEUA-74/2017) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Anexo 1). Foram utilizados 12 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) machos da linhagem Wistar, com cinco a seis semanas de idade e com peso médio inicial de 137g. Os animais foram provenientes do Biotério Central-UFMG e mantidos no Laboratório de Experimentação Animal da EV- UFMG onde receberam água e ração *ad libitum*, em regime de 12 horas de ciclo claro/escuro, em temperatura ambiente média de 23°C.

Os animais foram distribuídos em três grupos (n=4) e receberam durante 21 dias, injeções diárias por via subcutânea (SC) de 0,1mL de NaCl 0,9% (grupo controle); 50 µg/kg de digoxina (grupo DIG 50) e 100 µg/kg de digoxina (Teuto®) (grupo DIG 100).

Avaliação clínica

Os animais foram avaliados diariamente quanto ao comportamento normal da espécie, sensibilidade no local de aplicação e possíveis sinais de IC.

Eletrocardiograma

Os animais foram avaliados por eletrocardiograma (ECG) (Eletrocardiógrafo ECGPCVVET- Tecnologia Eletrônica Brasileira S.A) durante 5 minutos, previamente aos tratamentos (T0) e, de forma sequenciada aos sete (T7), 14 (T14) e 21 dias (T21), de acordo com Oliveira et al. (2013). O exame foi conduzido no Laboratório de Toxicologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG) mediante anestesia

inalatória em circuito fechado (VetCase, Brasmed®) com isoflurano (Isoflurine® 2,5% indução; 1,5% para manutenção).

Análise histológica

Após 21 dias de tratamento foi realizada a eutanásia de um animal de cada grupo com tiopental 100mg/kg IP, de acordo com o Guia Brasileiro de Boas Práticas de Eutanásia (CFMV, 2013), para obtenção de fragmentos do coração, fixados em formol a 10%. Os cortes e as etapas de preparação foram realizados no Laboratório de Patologia da EV- UFMG.

Isolamento dos cardiomiócitos

Após os 21 dias de tratamento com o GC, três animais de cada grupo receberam heparina (10 U/mL; IP) e foram deixados em repouso por um período de 10 a 15 minutos, quando, então, foram eutanasiados por decapitação. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Membranas Excitáveis (LAMEX) do ICB-UFMG.

O tórax foi aberto e as cartilagens costais de ambos os lados 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 placa de Petri com 100 ml de solução tampão (ST) gelada (130 mM NaCl, 1,0 mM ácido láctico, 3,0 mM ácido pirúvico, 25 mM HEPES, 0,5 mM MgCl₂, 0,33 mM NaH₂PO₄, 22 mM D-glicose, e 5 µL de solução estoque de insulina a 100 µg/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 três a cinco minutos de solução sem Ca²⁺ contendo: 130 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,33 mM NaH₂PO₄, 3,0 mM piruvato, 22 mM glicose e 25 mM HEPES (pH mantido em 7,4).

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 cinco minutos com solução contendo 1 mg/mL de collagenase tipo II (Worthington, NJ, USA), 0,17 mg/mL protease tipo IX (Sigma®) e tripsina. O coração digerido foi removido da cânula e, a região do ventrículo esquerdo separada e cortada em pequenos fragmentos. Células isoladas por trituração mecânica foram mantidas em solução de Tyrode nutritora contendo: 140 mM NaCl, 1,0 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 10 mM glicose ajustada para pH 7,4 com NaOH. Apenas células tolerantes ao Ca²⁺, quiescentes, *rod-shaped* e com estriações evidentes foram estudadas.

Análise da contratilidade

Para a análise da contratilidade celular, as células foram mantidas em placas em câmara acoplada a microscópio invertido (Eclipse, TS 100, Nikon, Japão). Durante os experimentos, realizados em temperatura ambiente (25-30°C), as células foram mantidas em solução de Tyrode nutritora contendo: 140 mM NaCl, 1,0 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 10 mM glicose ajustada para pH 7,4 com NaOH.

Os cardiomiócitos foram estimulados por meio de estimulador de campo conectado a um par de eletrodos de platina imersos na câmara contendo as células, com pulsos de voltagem de 4 ms de duração e intensidade de 80 V bifásico. A frequência de estimulação foi

ajustada a 2 Hz. As células foram visualizadas em um computador com câmera NTSC (MyoCam CCD100V, 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 uma frequência de aquisição de 240 Hz. 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 10-20 contrações consecutivas foram utilizadas para realizar a média de contração de uma determinada célula. Foram utilizadas 10-20 células por animal.

Os parâmetros avaliados foram: tamanho da célula no período diastólico (BL), tamanho da célula no período sistólico (*peak*), fração de encurtamento (BL % to *peak*), tempo para atingir a contração máxima (*time-to-peak*) e tempo a 90% do relaxamento (t to bl 90%).

Análise estatística e delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os dados obtidos estão apresentados na forma de médias e desvio padrão. Em relação às variáveis quantitativas foram feitos testes de normalidade de distribuição (Kolmogorov-Smirnov), seguida de ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Em caso de não normalidade, foi utilizado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de comparações múltiplas de Dunn. Os dados foram avaliados por meio de *Instat GraphPad 3* e *GraphPad Prism 7*. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Avaliação clínica

Os animais não apresentaram alterações clínicas. O grupo que recebeu a maior dose de digoxina (DIG 100), a partir da sétima aplicação, apresentou discreta sensibilidade dolorosa no local de aplicação.

A ausência de sinais clínicos é indicativo de que as doses usadas estão na margem terapêutica para a espécie. Achados de intoxicação comuns à digoxina, como dor abdominal, inapetência, alteração do estado mental e comportamental (Limon et al., 2016; Scalese et al., 2016), não foram observados no presente experimento.

Avaliação eletrocardiográfica

O ECG seriado permitiu o comparativo entre grupos nos tempos T0, T7, T14 e T21. Nenhuma arritmia foi observada nos animais. Sabe-se que as arritmias são os achados mais comuns nas intoxicações por GCs. Estudos determinaram que pelo menos 26,8% dos pacientes apresentam alterações eletrocardiográficas e, 41,5% dos pacientes que já apresentavam alterações, exibem novas arritmias (Limon et al., 2016; Scalese et al., 2016). Dentre elas são descritas a fibrilação ventricular, taquicardia ventricular, arritmias supraventriculares, bloqueio atrioventricular de segundo (BAV 2) e terceiro grau (BAV 3) (DIG Trial, 1997).

Não houve diferença significativa entre a FC nos tempos estudados (Figura 1). Este é um achado importante, pois a modulação autonômica é descrita em pacientes cardiopatas submetidos à terapia crônica com digoxina. Esse fármaco é capaz de diminuir a FC, prolongar o intervalo PR e diminuir níveis circulantes de noradrenalina em pacientes com IC (Krum et al., 1995). No entanto, o presente trabalho, realizado em três semanas, objetivou avaliar os efeitos diretos da digoxina no coração, sendo assim a manutenção da FC reafirma que as doses e o

tempo utilizados foram suficientes para induzir alterações cardíacas sem alterar a modulação autonômica em animais hígidos e, principalmente, sem causar arritmias.

A amplitude da onda T foi significativamente menor no grupo DIG 100 após sete doses de digoxina (Figura 2). Essa alteração não se manteve ao longo do experimento e, portanto, não representa alteração importante associada à administração da digoxina. Distúrbios eletrolíticos causados pelo bloqueio da NKA podem estar associados aos achados. Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferença estatística significativa (Dados não mostrados).

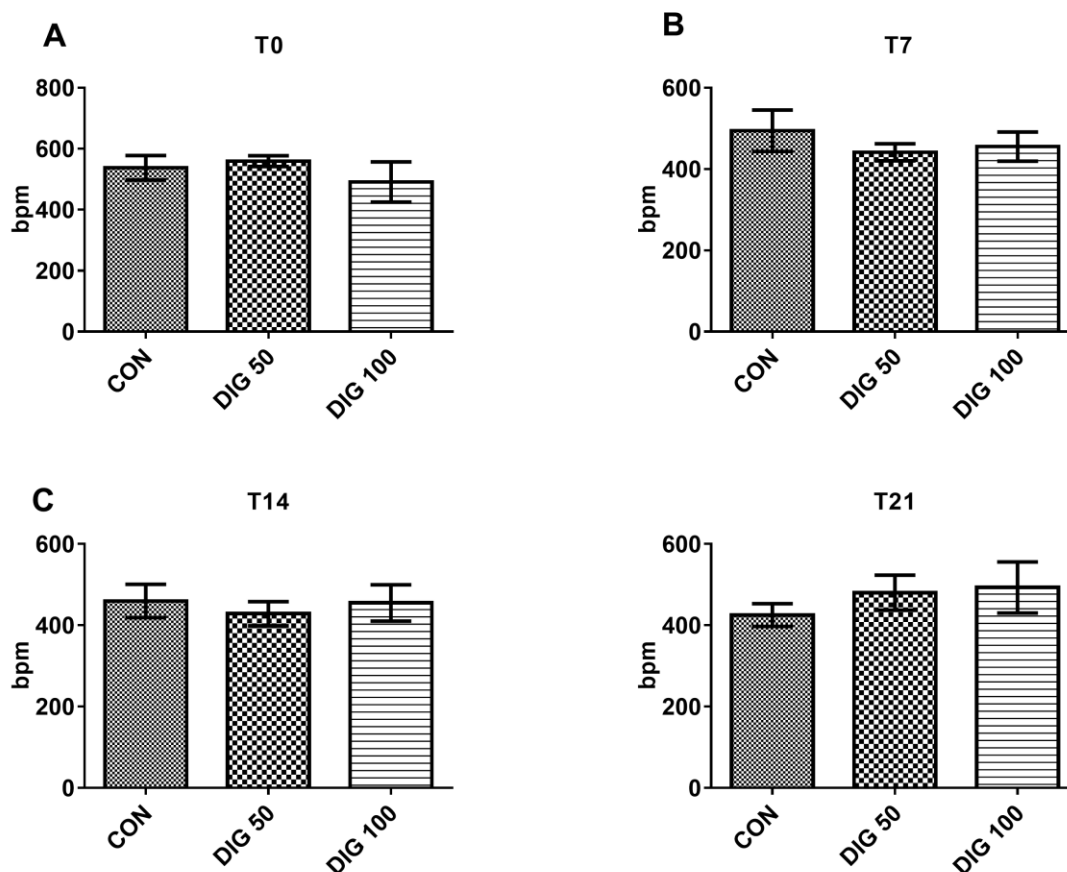


Figura 1. Valores médios e desvio padrão da frequência cardíaca (FC) de ratos Wistar submetidos à administração subcutânea (SC) diária de NaCl 0,9% por 21 dias (CON), digoxina 50µg/kg (DIG 50) e digoxina 100 µg/kg (DIG 100). Avaliações seriadas foram realizadas nos tempos zero (A), sete (B), 14 (C) e 21 dias (D). Análises realizadas por ANOVA seguida de pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

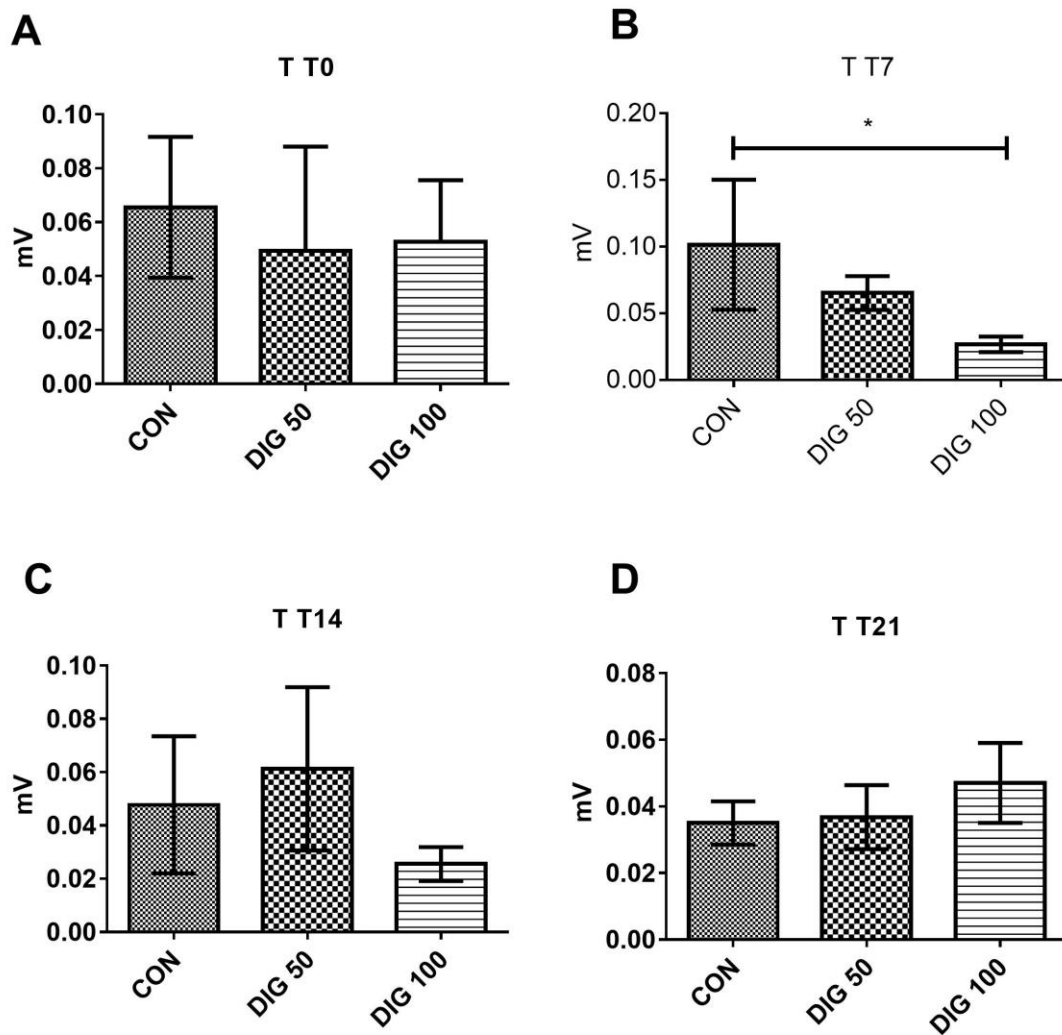


Figura 2. Valores médios e desvio padrão da amplitude da onda T (TmV) de ratos Wistar submetidos à administração diária subcutânea (SC) de NaCl 0,9% por 21 dias (CON), digoxina 50µg/kg (DIG 50) e digoxina 100 µg/kg (DIG 100). Avaliações seriadas foram realizadas nos tempos zero (A), sete (B), 14 (C) e 21 dias (D). Análises realizadas com teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre grupos.

Avaliação macro e microscópica

A avaliação macroscópica do coração não revelou nenhuma alteração aparente. À avaliação histológica dos tecidos cardíacos não foram observadas diferenças entre os grupos. Ambos os controles e tratados apresentavam, fibras cardíacas organizadas em feixes longitudinais e transversais com preservação das estriações, como mostra a Figura 3.

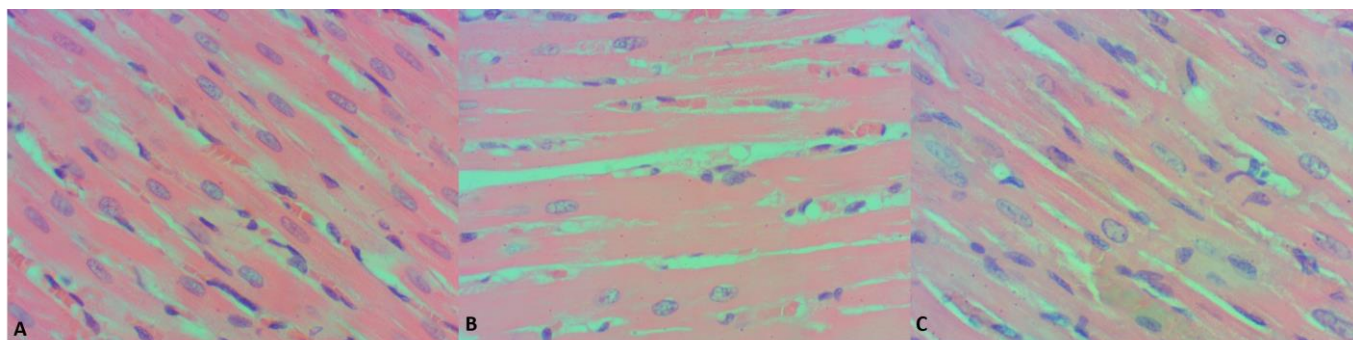


Figura 3. Fotomicroscopia do ventrículo esquerdo de ratos Wistar. Grupos controle e tratados com digoxina 50 e 100µg/kg, respectivamente. A) Fibras cardíacas dispostas longitudinalmente com preservação da arquitetura do tecido de animais do grupo CON que receberam NaCl 0.9% por via SC durante 21 dias. B) Ausência de alterações em amostras de animais do grupo DIG 50 que receberam 50µg/kg de digoxina por via SC durante 21 dias. C) Ausência de alterações em amostras de animais do grupo DIG 100 que receberam 100µg/kg de digoxina por via SC durante 21 dias. (HE, aumento de 400x).

A ausência de lesões significativas no músculo cardíaco à avaliação histológica sugere que a posologia utilizada não foi tóxica. Em casos graves de intoxicação por GCs podem ser observados vacuolização intracitoplasmática (Botelho et al., 2017), miocardite focal não purulenta, necrose de coagulação das fibras cardíacas, vacuolização e extensas áreas de necrose no coração (Minardi et al., 1982; Pedrosa et al., 2009).

Contratilidade celular

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos na avaliação do tamanho das células no período sistólico (*peak*), diastólico (BL) e quanto à sua fração de encurtamento (BL% *peak*), como mostra a Figura 4 (A-C). O tempo para atingir o pico a partir do início da contração (*t peak*) foi prolongado no grupo DIG 50 (Figura 4- D), assim como o tempo entre o pico e 90% do retorno à linha base (*t bl 90%*) (Figura 4-E).

A bomba NKA é responsável pelo estabelecimento do gradiente eletroquímico do Na^+ nos cardiomiócitos (Fuller et al., 2013). A digoxina, ao se ligar à subunidade alfa da NKA, impede o transporte ativo do Na^+/K^+ promovendo um aumento do Na^+ intracelular (Langford e Boor, 1996). A maior disponibilidade desse íon justifica o aumento do tempo para o pico da contração e o tempo para o retorno ao estado relaxado, como visto no presente experimento. Essa alteração está associada a um efeito lusitrópico negativo e pode ser interpretada como o prolongamento das contrações e um potencial antiarrítmico.

O consequente aumento do Ca^{2+} relacionado ao efeito indireto da digoxina no NCX também pode estar associado a esses achados (Langford e Boor, 1996). A maior disponibilidade desse íon pode promover aumento da contração, não visualizado no presente experimento, como demonstrado principalmente pelos parâmetros *peak* e BL *to peak*, representando a fração de encurtamento celular. No entanto, o incremento do Ca^{2+} nos cardiomiócitos pode ter contribuído para o prolongamento da contração, já que sua maior disponibilidade prolonga a fase de platô do PA (Bers e Despa, 2006).

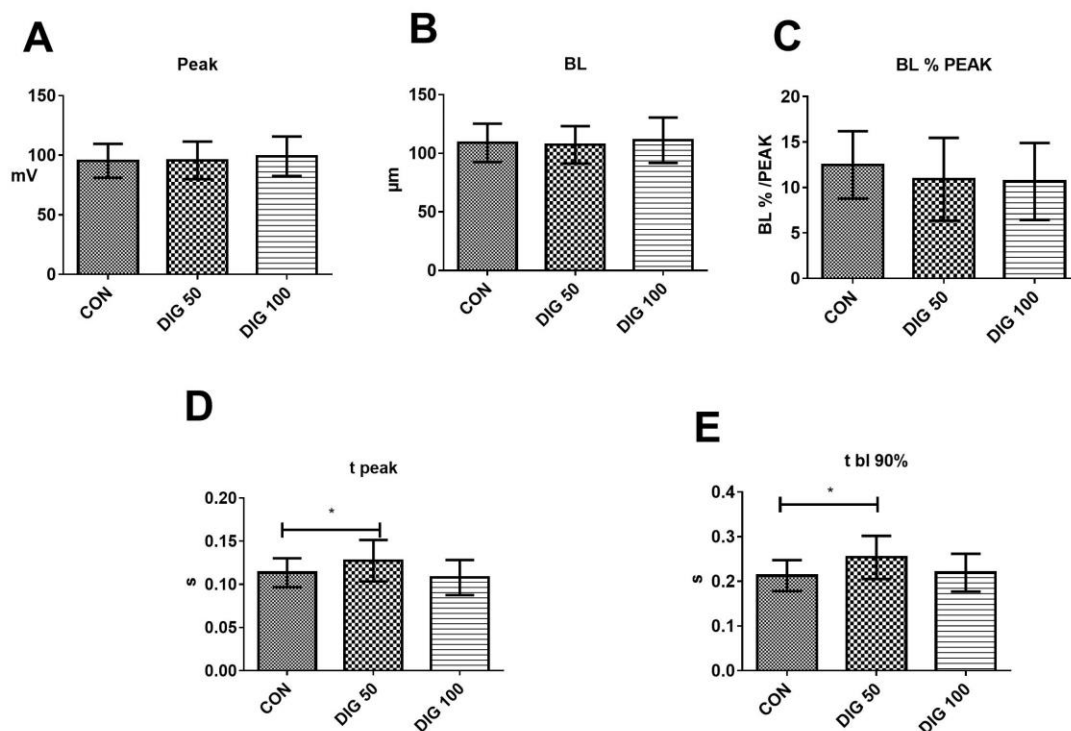


Figura 4. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros de contratilidade celular de cardiomiócitos de ratos Wistar submetidos à administração diária SC de NaCl 0,9% por 21 dias (CON), digoxina 50µg/kg (DIG 50) e digoxina 100 µg/kg (DIG 100). A) Tamanho sistólico (*peak*); B) Tamanho diastólico (BL); C) Fração de encurtamento celular (BL% *peak*); D) tempo para atingir a contração máxima (*t to peak*); E) Tempo para o relaxamento a 90% (*t to bl 90%*). Análises realizadas por ANOVA seguida de pós teste de Tukey ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre grupos.

Conclusões

A análise comparativa da administração crônica de digoxina definiu que a dose de 50µg/kg por 21 dias (DIG 50) promove alterações na análise da contratilidade de cardiomiócitos sem causar quadro de intoxicação. Os resultados indicam que a posologia utilizada de 50µg/kg SC diários de digoxina em ratos por 21 dias, tem potencial antiarrítmico devido ao prolongamento dos parâmetros *t to peak* e *t to bl 90%*.

CAPÍTULO 3

Efeitos *in vivo* da oleandrina, digoxina e ouabaína na fisiologia cardiorrenal de ratos Wistar hígdos

Resumo

O objetivo desse capítulo é apresentar os efeitos prolongados da administração de oleandrina, ouabaína e digoxina sobre a fisiologia cardiorrenal. Foram utilizados 28 animais (*Rattus norvegicus*, Wistar) distribuídos em quatro grupos (n=7). O grupo controle (CON) recebeu NaCl 0,9% a cada 24h durante 21 dias. Os grupos tratados receberam 50µg/kg de digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE), respectivamente. Foram feitas análises seriadas de eletrocardiograma (ECG) aos zero, sete, 14 e 21 dias; seguidas de coleta de sangue, tecido cardíaco e renal. Foram realizados hemograma e análise bioquímica sérica de creatina quinase (CK), fração MB (CK-MB), troponina I, aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), proteína total (PT), albumina (Alb), cálcio (Ca²⁺), magnésio (Mg²⁺), cloreto (Cl⁻), ureia e creatinina (Creat). Os tecidos cardíaco e renal foram processados para análise de microscopia óptica por meio das colorações Hematoxilina Eosina (HE), *Periodic Acid Schiff* (PAS) e Tricômico de Masson e também pela microscopia eletrônica de varredura. Amostras do coração foram encaminhadas para análise de *Western blot* com anticorpos marcadores para a troponina I, peptídeo natriurético cerebral (BNP), bomba NKA isoforma alfa-1 e alfa-2, e análise das espécies reativas de oxigênio por meio de ELISA para dosagem dos níveis de TBARs (*Thiobarbituric Acid-reactive Substances*) e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e espectrofotometria para determinação da atividade enzimática da catalase (CAT). O exame de ECG mostrou a diminuição do intervalo QT corrigido em todos animais tratados. Todos os grupos tratados alteraram a série vermelha do hemograma. O grupo OLE apresentou maior expressão de CK-MB e LDH, enquanto todos os grupos tratados tiveram aumento relativo da creatinina. A análise histológica determinou que os GCs promovem alterações degenerativas no coração e rins, sendo que apenas a oleandrina promoveu necrose focal moderada de cardiomiócitos e células epiteliais tubulares renais. A microscopia de varredura também confirmou o maior potencial lesivo da oleandrina, com ruptura e encurtamento de fibras cardíacas. A expressão da troponina I e isoforma alfa-1 não foram alteradas, no entanto os níveis proteicos de BNP e alfa-2 foram superiores nos grupos que receberam oleandrina e ouabaína em relação ao grupo digoxina. Todos os GCs afetaram a produção de ROS, sem no entanto causar peroxidação lipídica, por meio da ativação de diferentes vias antioxidantes. Conclui-se que os GCs aqui estudados provocam alterações cardiorrenais sem alterar a expressão proteica da bomba NKA, com produção de ROS e danos teciduais variáveis que sugerem diferenças entre a atuação da digoxina, ouabaína e oleandrina no tecido cardíaco, assim como prováveis diferenças quanto à afinidade e inibição da bomba NKA.

Palavras-chave: espécies reativas de oxigênio, microscopia eletrônica de varredura, remodelamento cardíaco.

Introdução

Os GCs tem amplo potencial na terapêutica da IC, no entanto apenas a digoxina e digitoxina são encontradas no mercado (Prassas e Diamandis, 2009; Ambrosy et al., 2016). Sua curta margem de segurança impulsionou a descoberta de novas drogas mais seguras. A comercialização de fármacos como os betabloqueadores reduziu significativamente o emprego da digoxina (DIG Trial, 1997), entretanto poucos agentes tem atuação cardiopativa inotrópica crônica.

A ouabaína é um GC produzido de forma endógena, que se encontra aumentando em pacientes cardiopatas e hipertensos. É muito utilizada para estudos de eletrofisiologia celular como inibidor da corrente da bomba NKA. Já a oleandrina proveniente da planta *N. oleander* é um dos GCs menos estudados. Não se conhece ainda o potencial farmacológico desse composto na terapia da IC e sua capacidade de alterar a eletrofisiologia dos cardiomiócitos. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa determinam sua capacidade de modular a atividade da bomba NKA e provocar arritmias em doses altas (Botelho et al., 2017).

Estudos sobre a utilização de outros GCs com finalidade terapêutica cardiovascular são pouco descritos na literatura (Meira et al., 2015; Botelho et al., 2017). A maioria dos trabalhos avaliam suas atividades tóxicas em altas doses e de forma isolada. Assim como a digoxina, a oleandrina e ouabaína podem atuar na bomba NKA do coração e potencializar a contratilidade dos cardiomiócitos. Doses terapêuticas podem ser benéficas para a terapia da IC; no entanto não há avaliações dos impactos *in vivo* da administração prolongada desses agentes cardiopativo.

O objetivo desse experimento é avaliar de forma comparativa os efeitos prolongados da administração subcutânea de digoxina, ouabaína e oleandrina em ratos hígidos com o intuito de elucidar possíveis diferenças do seu potencial de ação e investigar as alterações eletromecânicas e estruturais do sistema cardiovascular.

Material e Métodos

Seleção dos animais e grupos experimentais

Foram utilizados um total de 28 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) provenientes do Biotério Central-UFMG, mantidos no Laboratório de Experimentação Animal da EV-UFMG onde receberam água e ração *ad libitum*, em regime de 12 horas de ciclo claro/escuro, em temperatura ambiente média de 25°C.

Os animais hígidos foram distribuídos em quatro grupos (n=7): grupo controle (CON) recebeu apenas 0,1 mL de veículo por via subcutânea (SC), a cada 24h, por três semanas (21 dias); grupo DIG, grupo OUA e grupo OLE receberam respectivamente 50 µg/kg de digoxina, ouabaína e oleandrina (Sigma®), ressuspensos em 0,1 mL de NaCl 0,9% por via SC também a cada 24h, durante três semanas.

Avaliação cardiovascular

Todos os animais foram avaliados diariamente considerando o estado geral e possíveis alterações clínicas. Os animais foram avaliados por eletrocardiograma (ECG) (Eletrocardiógrafo ECGPCVVET- Tecnologia Eletrônica Brasileira S.A) durante cinco minutos, previamente aos tratamentos (T0) e de forma sequenciada aos sete (T7), 14 (T14) e 21 dias (T21), de acordo com Oliveira et al. (2013). O exame foi conduzido no Laboratório de Toxicologia da EV-UFMG mediante anestesia inalatória em circuito fechado (VetCase, Brasmed®) com isoflurano (Isoflurine®, durante a 2,5% indução e 1,5% para manutenção).

Análise do traçado de ECG

Todos os ECGs foram realizados e analisados pelo mesmo veterinário de acordo com metodologia padronizada. Os traçados foram registrados em seis derivações do plano frontal, com 50mm/s de velocidade e sensibilidade de 1cm = 2mV (2N). Em cada traçado, três segmentos contendo cinco batimentos (derivação II) foram selecionados para qualidade (linha de base bem definida e sem artefatos) e os valores médios para frequência cardíaca (FC) e amplitude e comprimento das deflexões P-QRS-T foram determinados.

Os parâmetros avaliados foram: frequência cardíaca (FC) e ritmo cardíaco, duração da onda P (Pms), complexo QRS (QRS), intervalos PR e QT e amplitude das ondas P (PmV), R e T. Os padrões e o ritmo da morfologia foram avaliados em cada derivação, e as medidas do P-QRS-T foram conduzidas na derivação II.

Resultados do ECG de dez ratos Wistar saudáveis foram utilizados para determinação de valores de normalidade para a espécie/linhagem. O intervalo QT foi corrigido pelas fórmulas de Bazett (1920); Fridericia (1920); Van der Water et al. (1989), Framingham (Sagie et al., 1992); Mitchell et al. (1998) e Hodges et al. (1983) como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Fórmulas de correção do QT utilizadas no presente estudo e suas respectivas referências

Fórmulas para correção do QT	Referências
$QTcB = QT/(RR)^{1/2}$	Bazett (1920)
$QTcF = QT/(RR)^{1/3}$	Fridericia (1920)
$QTcV = QT + 0.087(1 - RR)$	Van de Water et al. (1989)
$QTcFr = QT + 0.154 \times (1 - RR)$	Framingham- Sagie et al. (1992)
$QTcM = QT / \sqrt{RR/100}$	Mitchell et al. (1998)
$QTcH = QT + 0.00175 \times (FC - 60)$	Hodges et al. (1983)

RR: segmento RR do traçado eletrocardiográfico; FC: frequência cardíaca; QTcB: fórmula de correção de Bazett; QTcF: fórmula de correção de Fridericia; QTcV: fórmula de correção de Van der Water; QTcFr: fórmula de correção de Framingham; QTcM: fórmula de correção de Mitchell; QTcH: fórmula de correção de Hodges.

Coletas de sangue e exames laboratoriais

Após 21 dias, foi realizada a anestesia de todos os animais com isoflurano e administração tiopental intraperitoneal na dose de 100mg/kg, de acordo com o Guia Brasileiro de Boas Práticas de Eutanásia (CFMV, 2013). Logo em seguida o sangue foi coletado por punção na artéria aorta abdominal em tubos sem anticoagulante para obtenção do soro e com anticoagulante EDTA a 10%, para na análise hematológica.

Para realização do hemograma, o sangue foi homogeneizado e processado em aparelho automático (PocH-100iV - Sysmex®) que forneceu os parâmetros contagem total de leucócitos (LEU), contagem total de eritrócitos (ERI), hematócrito (HCT) hemoglobina (Hb), volume globular médio (VGM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração corpuscular média de hemoglobina (CHCM), desvio-padrão da amplitude de eritrócitos (RDW-SD), coeficiente de variação da amplitude de eritrócitos (RDW-CV), número total de plaquetas (PLT), amplitude de variação do tamanho plaquetário (PDW), volume plaquetário médio (VPM) e número de macroplaquetas (MPLT). Foram confeccionados esfregaços

sanguíneos imediatamente após a coleta, corados pela técnica de Romanowsky para diferenciação de leucócitos e avaliação morfológica celular.

O perfil bioquímico foi obtido por meio das dosagens séricas de creatina quinase (CK) e a isoenzima CK-MB, desidrogenase láctica (LDH), aspartato aminotransferase (AST), ureia, creatinina, cálcio iônico (Ca^{2+}) (corrigido pela albumina), magnésio (Mg), cloreto (Cl^-), proteínas totais (PT), albumina (Alb) e relação albumina/globulinas por método colorimétrico cinético utilizando kits comerciais (Veteste®) e leitura em espectrofotômetro (TP Analyser®). Dosagens troponinas I foram feitas por método imunocromatográfico rápido semi-quantitativo utilizando kit comercial (Bioclin®).

Avaliação histológica e ultraestrutural

Foram coletados fragmentos do coração e rins de quatro animais de cada grupo. Secções do músculo papilar do ventrículo esquerdo e da interseção córtico-medular do rim esquerdo foram mantidos em glutaraldeído a 2% e encaminhadas para avaliação de microscopia eletrônica varredura no Centro de Microscopia da UFMG (CM-UFMG). As secções remanescentes foram fixadas em formol a 10%. Após parafinização, foram realizados cortes histológicos de 4 μm de espessura corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE), Periódico Ácido-Schiff (PAS) e Tricômico de Masson. Os cortes e as etapas de preparação foram realizados no Laboratório de Patologia Animal da EV- UFMG.

Avaliação da modulação da NKA e atividade da cTnI e BNP

Para a realização do *Western blot*, as amostras de tecido cardíaco foram adicionadas em um tampão de carregamento de amostras (Laemmli 2X buffer) contendo ureia 0,5M; SDS 0,17 mM; DTT 39 μM ; Tris-HCl 0,01 M pH 8,0, em uma proporção de 1:1 (Laemmli 2X buffer) e aquecidas a 95°C por quatro minutos. Em seguida carregados os géis de SDS-poliacrilamida 10% imersos em um tampão de eletroforese (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1 %) e submetidos a uma amperagem de 120 V por 1h e meia. Após o término da eletroforese, foi feita a transferência elétrica das proteínas do gel para uma membrana de PVBF (Amersham, UK) em um tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20%) a temperatura ambiente, usando 120 V (Bio-Rad). Após a transferência das proteínas, as membranas foram bloqueadas por uma hora, em uma solução bloqueadora de leite desnatado diluído a 5% em um tampão TBS – tween (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 a 0,1 %, pH 7,5).

Os anticorpos primários utilizados foram: isoforma alfa-1 NKA (1:5000) monoclonal (Upstated), isoforma alfa-2 NKA (1:250) monoclonal (Upstated), troponina I e BNP (1:500) (ABCAM) e GAPDH (Santa Cruz) monoclonal (1:1000), diluídos em uma solução de BSA a 5% em um tampão TBS – tween (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 0,1 %, pH 7,5) e incubados overnight a 4°C. Após o período de incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas por 15 minutos com uma solução TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 20 0,1%, pH 7,5), para remoção dos anticorpos primários. Os anticorpos secundários foram *anti-mouse* monoclonal IgG, (1:5000, Stressgen, Victoria, Canadá), incubados por uma hora em uma solução de leite desnatado diluído a 5% em um tampão TBS – T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, tween 200 a 1%, pH 7,5).

Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas por 15 minutos, para remoção do anticorpo secundário com a solução TBS-T. As

bandas foram detectadas utilizando um composto fluorescente (Luminata, Amersham, UK). As proteínas pesquisadas foram corrigidas pela quantidade de GAPDH detectada.

Preparação dos tecidos para a mensuração das atividades enzimáticas e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os ventrículos foram homogeneizados (Euro Turrax T20b IKA LABORTECHNIK) por cerca de três minutos em solução salina/tampão fosfato (pH 7,2), sempre mantidos no gelo. Após este processo, os homogenatos foram centrifugados a 10.000g, durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a mensuração dos níveis de TBARS (*Thiobarbituric Acid-reactive Substances*) e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase. Para a determinação da atividade da glutathiona peroxidase, as amostras foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl (50mM, pH 7,5, contendo 5mM de EDTA) e centrifugadas a 10.000g, durante 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi retirado para a mensuração da atividade da glutathiona peroxidase (Barreto, 2012). A determinação da concentração de proteína nos tecidos foi realizada como descrito por Lowry e colaboradores (1951), e a albumina sérica bovina foi utilizada para a construção da curva padrão.

Determinação dos níveis de TBARS

O TBARS é um ensaio bioquímico utilizado para determinar a presença de peroxidação lipídica nos tecidos pela reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (MDA) que é o principal produto da peroxidação lipídica. Os níveis de TBARS foram mensurados de acordo com o método descrito por Ohkawa et al. (1979) e Janero et al. (1990). Alíquotas do homogenato (0,05ml) foram adicionadas em 0,5ml de ácido tiobarbitúrico (0,67%) e 0,25ml de ácido tricloroacético (20%). A mistura foi incubada por 20 minutos a 100° C. Após a centrifugação dos homogenatos a 8.000g durante cinco minutos, a leitura da absorbância das amostras foi realizada à 532nm. Os níveis de TBARS foram expressos em nmol de MDA/mg proteína.

Atividade da Superóxido Dismutase

Este ensaio foi realizado de acordo com Dieterich et al. (2007), com algumas modificações (Gioda et al., 2010). Alíquotas do homogenato foram adicionadas em solução salina/Tampão fosfato (pH 7.2), MTT (1.25mM) e pirogalol (100mM). Após cinco minutos, a reação foi interrompida pela adição de DMSO. A leitura foi realizada à 570 nm. A determinação da atividade da enzima dada em U.mg proteína, e foi determinada a partir da capacidade da superóxido dismutase em inibir a autoxidação do pirogalol, onde 1U = 50% de inibição da autoxidação do pirogalol.

Atividade da Catalase

O ensaio da catalase foi realizado conforme o método de Nelson e Kiesov (1972). Foram adicionados 2 mL de tampão fosfato (50mM, pH 7.0) junto a alíquota do sobrenadante (0,06ml) obtido após a homogeneização dos tecidos, e em seguida foi adicionado 0,04ml do substrato (H₂O₂, 3M). A leitura foi realizada durante um minuto à 25°C em espectrofotômetro a

240nm. A atividade da catalase foi expressa em $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, sendo que ΔE corresponde a variação da atividade da enzima durante um minuto.

Atividade da Glutathione Peroxidase

O ensaio da glutathione peroxidase foi realizado conforme o método de Paglian & Valentine (1967), com algumas modificações. Aliquotas do homogenato (0,004ml) foram adicionadas em 0,2ml de tampão fosfato de potássio (100mM, pH=7,5), contendo 2mM de glutathione reduzida (GSH), 0,1U/ml de glutathione redutase, 0,12mM de NADPH, 2mM de H_2O_2 e 1mM de azida sódica. A atividade da glutathione peroxidase foi mensurada à 340 nm e expressa em nmol NADPH/min/ml.

Análise estatística e delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, os dados obtidos estão apresentados na forma de média e desvio padrão. Em relação às variáveis quantitativas foram feitos testes de normalidade de distribuição (Kolmogorov-Smirnov), seguida de ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Em caso de não normalidade, foi utilizado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de comparações múltiplas de Dunn. A influência das diferentes fórmulas de QT foi comparada pelo teste de Pearson (variáveis normalmente distribuídas). Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os dados foram avaliados por meio de *Instat GraphPad 3* e *GraphPad Prism 7*.

Resultados e discussão

Valores de normalidade de parâmetros eletrocardiográficos

A análise do ECG de ratos Wistar hígidos determinou que em todos os animais as derivações DI, DII, DIII e aVF são positivas, enquanto avR e aVL são negativas.. Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos dos parâmetros eletrocardiográficos (FC, Pms, PmV, PR, WRS, R, T, QT) são descritos em Tabela 2.

O ECG é utilizado rotineiramente na medicina e na pesquisa experimental e, embora seja definido como uma técnica simples, sua interpretação pode ser desafiadora. A falta de padronização dos parâmetros do ECG é uma lacuna importante para comparações na pesquisa. Diferentes desenhos experimentais, como tipo de eletrodos e anestesia, idade e tamanho dos animais podem contribuir para a falta de valores de referências e erros na interpretação dos resultados (Konopelski e Ufnal, 2016).

O uso de um ECG de seis canais não invasivo e a anestesia com isoflurano é uma técnica bem conhecida que fornece um registro não invasivo, seguro e de baixo custo com alta repetibilidade (Murakami et al., 2014; Botelho et al., 2016). Dez animais foram avaliados considerando a similaridade entre os roedores, já que trabalhos anteriores demonstraram que esse número é suficiente para estabelecer correlações entre os parâmetros de ECG (Roussel et al., 2016).

Usando este design experimental foi possível definir os principais valores de ondas e intervalos nos roedores utilizados. Vale ressaltar que os parâmetros são afetados pelo tipo de anestesia utilizada em todas as espécies de roedores. Por exemplo, a anestesia com éter de ratos Wistar define FC entre 290-378bpm (Fraser et al., 1967), sob anestesia com uretano de 357-452bpm (Buschmann et al., 1980), enquanto a quetamina e xilazina de 242-336 bpm (Miranda et al., 2007). O presente trabalho descreve a FC de ratos entre $326 \pm 57,45\text{bpm}$ de acordo com valores previamente encontrados (320 ± 6) (Murakami et al., 2014).

Tabela 2. Média, desvio padrão, valores mínimos e máximos dos parâmetros eletrocardiográficos de ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*). Os traçados foram registrados em seis derivações do plano frontal, com 50mm/s de velocidade e sensibilidade de 1cm = 2mV (2N) em ratos adultos saudáveis anestesiados usando eletrocardiograma computadorizado

Parâmetros	Média ± Desvio padrão	Mín.	Máx.
FC (bpm)	326 ± 57,45	189	378
P (ms)	34,40 ± 5,01	25	43
P (mV)	0,050 ± 0,015	0,03	0,082
PR (ms)	54,50 ± 10,14	48	75
QRS (ms)	34,10 ± 4,58	27	42
R (mV)	0,182 ± 0,064	0,13	0,293
T (mV)	0,046 ± 0,02	0,03	0,086
QT (ms)	75,60 ± 11,89	62	98

Frequência cardíaca (FC), duração da onda P (Pms), amplitude da onda P (PmV), duração do segmento PR (PRms), duração do complexo QRS (QRSms), amplitude da onda R (RmV), amplitude de onda T (TmV), duração do intervalo QT (QTms), valores mínimos (Mín.) e valores máximos (Máx).

A determinação da duração do intervalo PR entre os animais utilizados deve ser notada. O intervalo PR é essencial para a avaliação do bloqueio atrioventricular de primeiro grau, e intervalos específicos de referência devem ser usados para cada linhagem, como proposto pelos nossos resultados. Isso provavelmente minimizará erros em tal diagnóstico e fornecerá evidências adicionais de arritmias em doenças que frequentemente apresentam esses bloqueios (Zhang et al., 2013; Vilar-Pereira et al., 2016). O intervalo PR também é afetado pela anestesia e foi relatado em ratos Wistar de 39 a 78 ms (Shintaku et al., 2014). O presente estudo revelou valores médios similares de 34,4 ms.

O teste de Pearson permitiu a avaliação da correlação entre as fórmulas de correção do QT, o intervalo QT não corrigido, a frequência cardíaca e segmento RR, apresentados na Tabela 3. Em todos os animais avaliados, a fórmula de Van der Water apresentou correlação perfeita ($r=1$) quando comparada com o QT não corrigido. No entanto, a correlação mais forte com RR e FC foi obtida pela fórmula de Hodge, que apresentou todos os valores de r superiores a 0,9.

No que diz respeito à correção do QT, as diferentes correlações entre as fórmulas revelam a importância em se estabelecer a mais adequada para os modelos animais atualmente utilizados. Estudos anteriores usaram fórmulas destinadas a parâmetros humanos, gerando possíveis erros nas estimativas de correção (Costa et al., 2008), pois cada fórmula é determinada para uma faixa específica de FC. Nossos resultados revelam que a fórmula de Hodges tem a melhor correlação com FC/RR e, portanto, deve ser usada para este modelo. As menores correlações foram encontradas para Bazett, Framingham e Fridericia, por serem mais adequadas à FC humana do que as encontradas roedores. Esse achado é particularmente importante para a avaliação da hipocalcemia, isquemia, infarto do miocárdio, canalopatias, toxicidade medicamentosa e patologias gerais que perturbam a repolarização dos cardiomiócitos. Como o prolongamento do intervalo QT é um dos preditores de arritmias ventriculares, sua avaliação completa pode fornecer informações sobre alterações no ECG de roedores e correlacionar melhor a doença humana a modelos animais.

Tabela 3. Valores de correlação de Pearson entre as fórmulas de correção QT de ratos Wistar hígidos. As seguintes fórmulas foram utilizadas: Bazett, Fridericia, Van der Water, Framingham, Hodges e Mitchell. As gravações foram feitas em seis derivações do plano frontal, com 50mm/s de velocidade e sensibilidade de 1cm = 2mV (2N) usando um ECG computadorizado

Wistar	RR	HR	QT
QTcB	-0,222	0,334	0,754
QTcFr	-0,002	0,120	0,880
QTcV	0,473	-0,359	1
QTcH	-0,954	0,993	-0,243
QTcFra	-0,019	0,125	0,713
QTcM	0,226	0,339	0,750

RR: segmento RR do traçado eletrocardiográfico; FC: frequência cardíaca; QTcB: fórmula de correção de Bazett; QTcF: fórmula de correção de Fridericia; QTcV: fórmula de correção de Van der Water; QTcFr: fórmula de correção de Framingham; QTcM: fórmula de correção de Mitchell; QTcH: fórmula de correção de Hodges.

Um estudo recente usando camundongos anestesiados mostrou que o QT tem pouca correlação com a FC (Roussel et al. , 2016); no entanto, não há consenso sobre a avaliação de animais anestesiados (Hayes et al., 1994, Kmecova e Klimas 2010), devido á grande variabilidade de modelos de mensuração e anestesia (Hamdy e Brocks 2009) . No entanto, o presente trabalho, utilizando diferentes roedores anestesiados, mostrou que existe uma correlação moderada a alta entre o QT corrigido, o intervalo RR e FC.

Alterações eletrocardiográficas

Como esperado não houve diferença significativa entre os grupos no tempo 0 (Figura 1). A avaliação após sete dias de administração revelou diminuição significativa na duração do complexo QRS do grupo DIG em comparação com o grupo CON (Figura 2); resultado que não se manteve nos tempos seguintes. Aos 14 dias, foi possível observar redução da duração da onda P nos grupos DIG e OUA (Figura 3) e aos 21 dias a duração do complexo QRS foi superior nos três grupos tratados em relação ao grupo CON (Figura 4).

De acordo com os valores de referência estabelecidos anteriormente, a duração e amplitude das ondas e segmentos se mantiveram entre os valores mínimos e máximos estabelecidos ou muito próximos deles. No entanto, a avaliação após 21 dias indicou discreta diminuição do intervalo QT para os grupos DIG e OUA, mas que não se revelou significativa (dados não mostrados). Não foram encontradas arritmias nos grupos CON, DIG, OUA e OLE nos tempos estudados.

Os achados eletrocardiográficos indicam que a dose utilizada não causou quadros de intoxicação e permitiu a avaliação cardiovascular dos GCs estudados. A posologia estabelecida poderá ser empregada em estudos de toxicocinética e pesquisas sobre o potencial cardioativo dessas substâncias, pois não causou o óbito de nenhum animal ou sinais clínicos.

As arritmias mais comumente associadas a intoxicações por GCs são: bradicardia, taquicardia, bloqueios atrioventriculares, bloqueio de ramo, extrassístoles ventriculares, taquicardia ventricular, extrassístoles supraventriculares, taquicardia supraventricular e fibrilação ventricular (Zipes et al., 1974; Haynes et al., 1985; Le Couter e Fisher, 2002;

Camphausen et al., 2005; Ramirez-Ortega et al., 2007; Peymani et al., 2011; Senthilkumaran et al., 2011; Kuçukdurmaz et al., 2012; Khan et al., 2010). Essas alterações não foram vistas com a posologia aqui empregada.

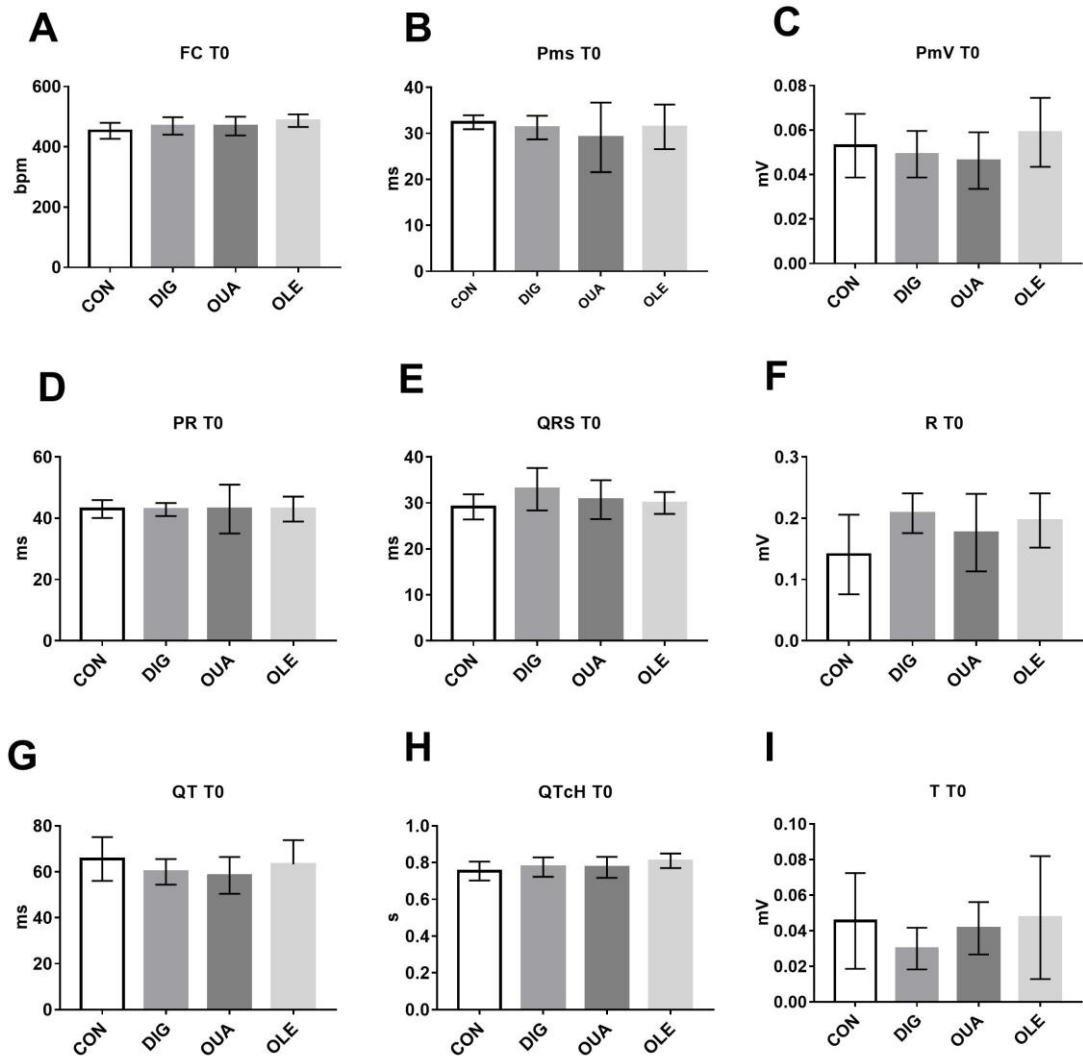


Figura 1. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eletrocardiográficos do tempo zero (T0) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaina (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram FC (A), duração da onda P (Pms) (B), amplitude da onda P (PmV) (C), duração do segmento PR (D), duração do complexo QRS (E), amplitude da onda R (F), duração do intervalo QT (G), duração do intervalo QT corrigido pela fórmula de Hodges (QTcH) (H) e amplitude da onda T (I). Dados paramétricos (FC, Pms, PmV, R e QT) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados não paramétricos (PR, QRS, T e QTcH) foram avaliados por teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p < 0,05$).

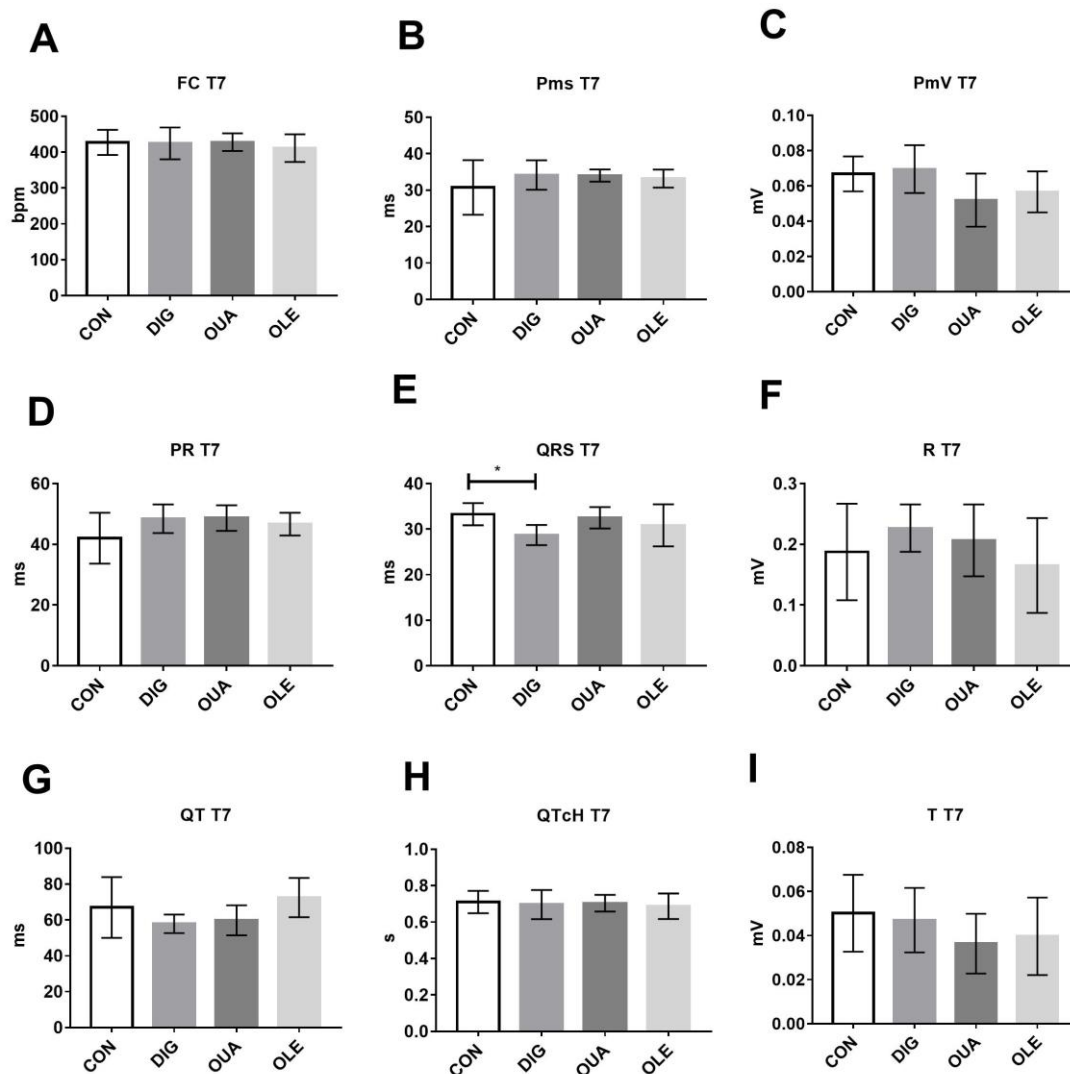


Figura 2. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eletrocardiográficos do tempo sete (T7) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram FC (A), duração da onda P (Pms) (B), amplitude da onda P (PmV) (C), duração do segmento PR (D), duração do complexo QRS (E), amplitude da onda R (F), duração do intervalo QT (G), duração do intervalo QT corrigido pela fórmula de Hodges (QTcH) (H) e amplitude da onda T (I). Dados paramétricos (FC, PmV, PR R, QT, QTcH e T) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados não paramétricos (Pms e QRS) foram avaliados teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p < 0,05$). * Diferença significativa em relação ao grupo CON.

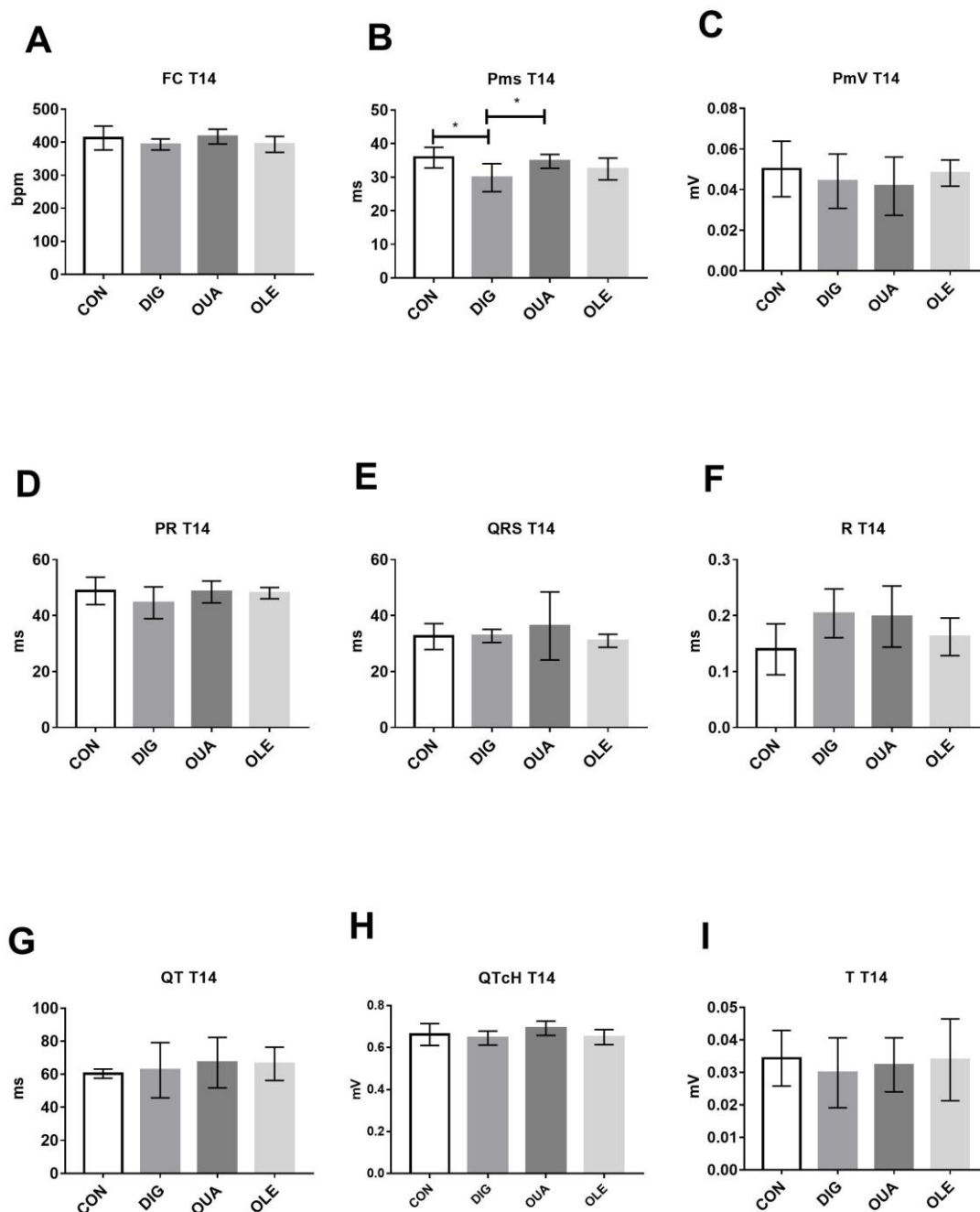


Figura 3. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eletrocardiográficos do tempo 14 (T14) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram FC (A), duração da onda P (Pms) (B), amplitude da onda P (PmV) (C), duração do segmento PR (D), duração do complexo QRS (E), amplitude da onda R (F), duração do intervalo QT (G), duração do intervalo QT corrigido pela fórmula de Hodges (QTcH) (H) e amplitude da onda T (I). Dados paramétricos (FC, Pms, PmV, PR, R, QT, QTcH e T) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados não paramétricos (QRS) foram avaliados por Dunn e Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre grupos.

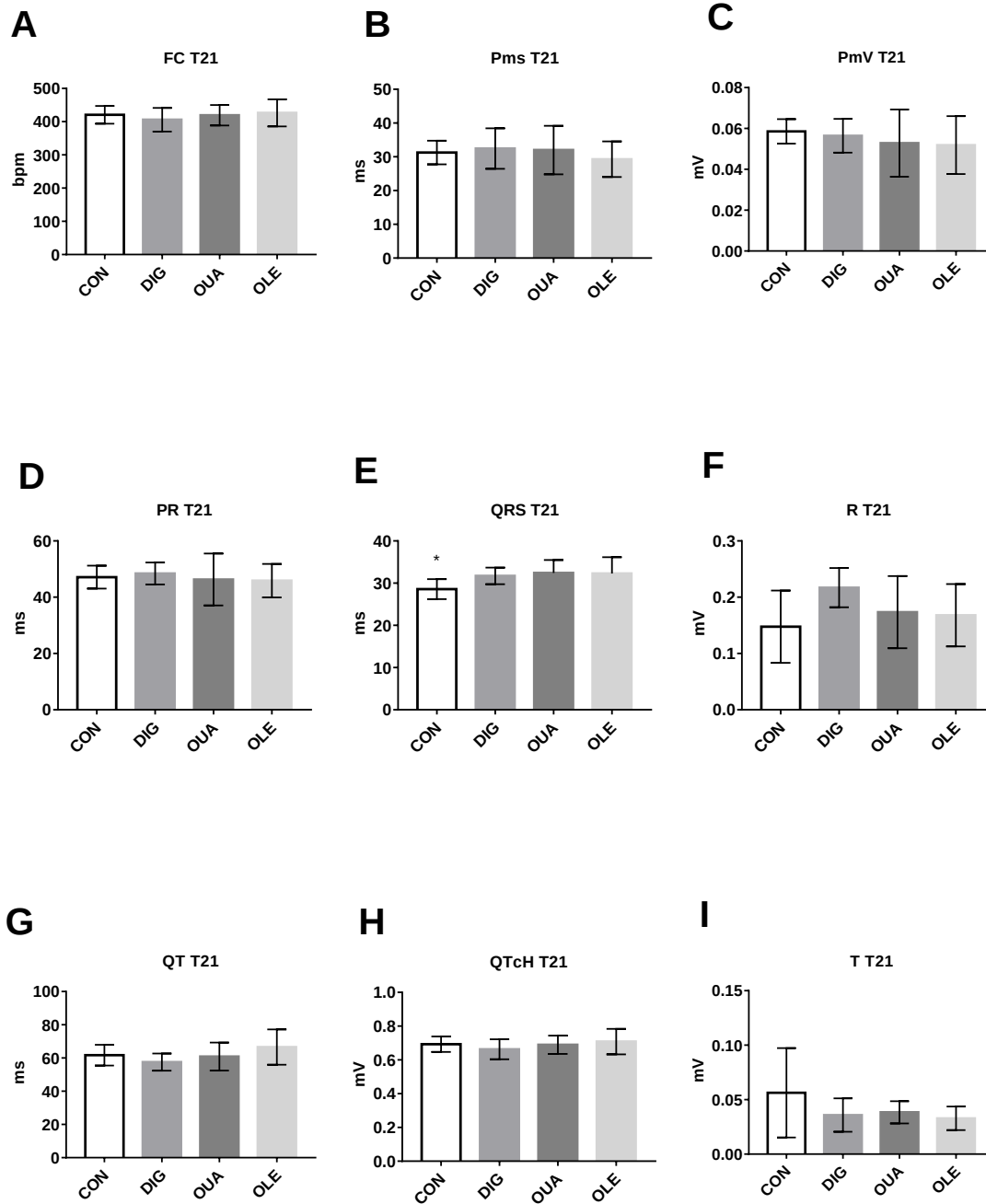


Figura 4. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eletrocardiográficos do tempo 21 (T21) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaina (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram FC (A), duração da onda P (Pms) (B), amplitude da onda P (PmV) (C), duração do segmento PR (D), duração do complexo QRS (E), amplitude da onda R (F), duração do intervalo QT (G), duração do intervalo QT corrigido pela fórmula de Hodges (QTcH) (H) e amplitude da onda T (I). Dados paramétricos (FC, Pms, PmV, R, QT, QTcH e T) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados não paramétricos (PR, QRS) foram avaliados por Dunn e Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre os grupos tratados e o CON.

Aos sete e 14 dias, foram observadas discretas alterações nas ondas P e QRS que não perduraram, e possivelmente não tem significado clínico ou relação direta com os efeitos dos GCs. Aos 21 dias no entanto, todos os grupos tratados (DIG, OUA e OLE) apresentaram discreto prolongamento significativo do QRS em comparação ao grupo CON. Apesar dos valores médios estarem dentro dos valores de referência, esse é um achado estatisticamente significativo e é descrito como fator preditor para arritmias, especialmente o bloqueio do ramo do feixe de His e extrasístoles ventriculares. Em humanos também tem relação direta com a mortalidade de pacientes com patologias cardiovasculares (Bleidhardt et al., 2007; Baslaib et al., 2010). Em relação a eletrofisiologia celular, esse achado indica um prolongamento na despolarização ventricular que pode ou não estar relacionado a alterações de contratilidade cardíaca. Esse atraso pode ser explicado pela maior disponibilidade do Ca^{2+} intracelular causada indiretamente pelo bloqueio da bomba NKA pelos GCs.

A análise de cada grupo tratado entre os tempos estudados revelou alterações pontuais que não se mantiveram entre todos os tempos. O grupo DIG apresentou discreta alteração de FC no T14, de amplitude da onda P nos tempos T7 e T14 e duração de QRS no T14. Um achado importante, no entanto, foi que a avaliação do QT não corrigido não apresentou diferença significativa, enquanto o QT corrigido pela fórmula de Hodges (QTcH) revelou diminuição progressiva nos tempos T14 e T21 (Figura 5). Achado similar foi visto no grupo OUA, com discreta alteração na FC no T14 e progressiva queda do QTcH em relação ao tempo 0 (Figura 6); e também no grupo OLE com discreta alteração não sustentada da FC nos tempos T7 e T14 e progressiva queda do QTcH nos tempos estudados (Figura 7). Demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas (dados não mostrados).

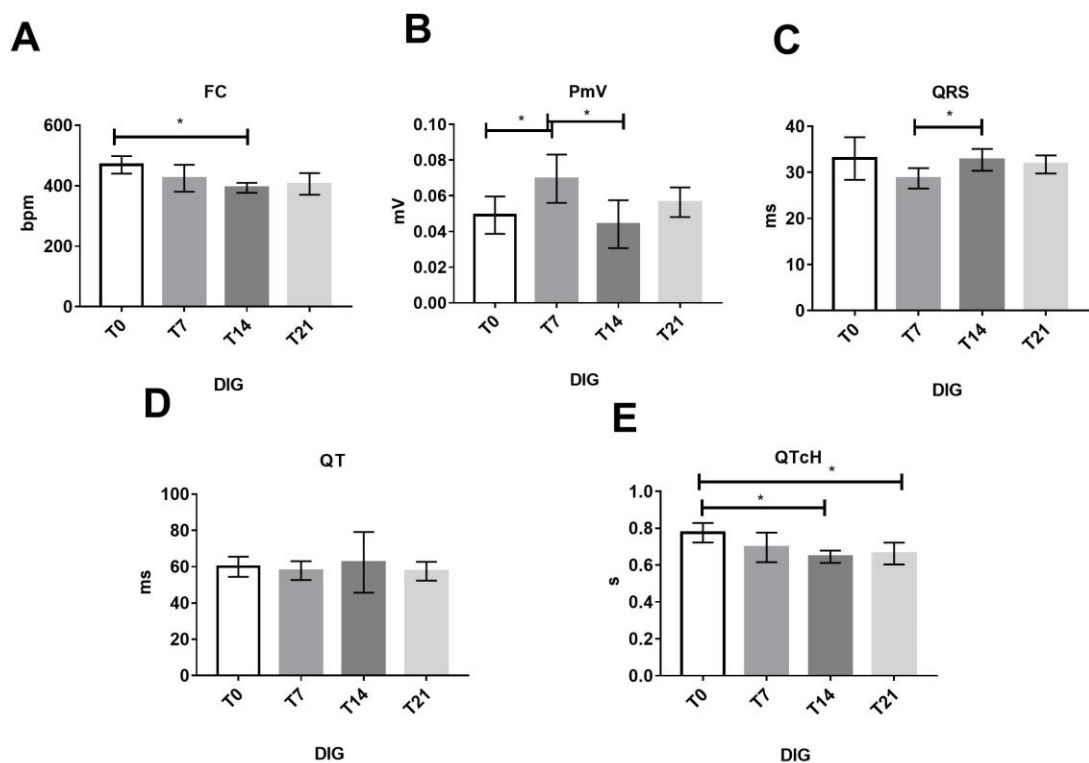


Figura 5. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eletrocardiográficos de ratos Wistar tratados por 21 dias com digoxina (DIG) nos tempos zero (T0), sete (T7), 14 (T14) e 21 (T21). Os parâmetros

avaliados foram FC (A), amplitude da onda P (Pms) (B), duração do complexo QRS (C), duração do intervalo QT (D) e duração do intervalo QT corrigido pela fórmula de Hodges (QTcH) (E). Dados não paramétricos (FC, QRS, PmV, QT e QTcH) foram avaliados por Dunn e Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre grupos.

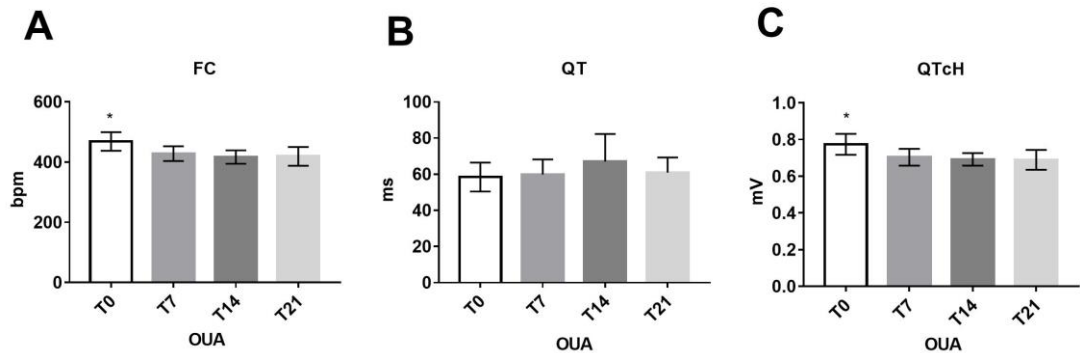


Figura 6. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eletrocardiográficos de ratos Wistar tratados por 21 dias com ouabaína (OUA) nos tempos zero (T0), sete (T7), 14 (T14) e 21 (T21). Os parâmetros avaliados foram FC (A), duração do intervalo QT (Pms) (B) e duração do intervalo QT corrigido pela fórmula de Hodges (QTcH) (C). Dados não paramétricos (FC, QT e QTcH) foram avaliados por Dunn e Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre grupos.

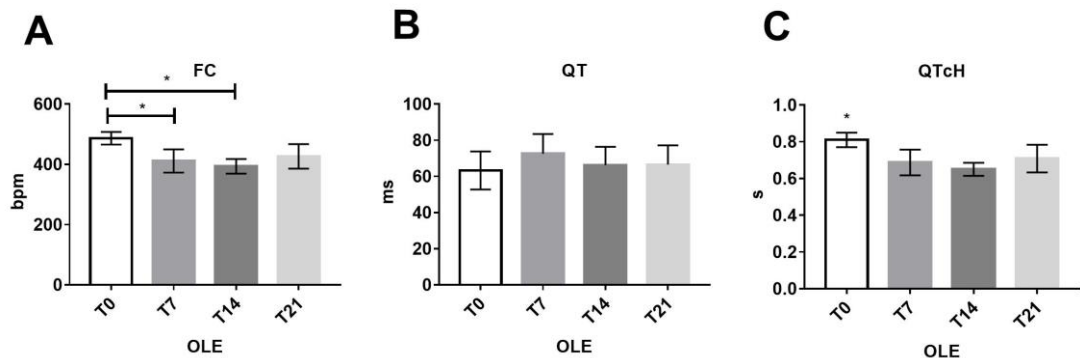


Figura 7. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros eletrocardiográficos de ratos Wistar tratados por 21 dias com oleandrina (OLE) nos tempos zero (T0), sete (T7), 14 (T14) e 21 (T21). Os parâmetros avaliados foram FC (A), duração do intervalo QT (B) e duração do intervalo QT corrigido pela fórmula de Hodges (QTcH) (C). Dados não paramétricos (FC, QT e QTcH) foram avaliados por Dunn e Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre grupos.

A avaliação comparativa entre os tempos estudados revelou diferenças que não perduraram e que possivelmente não tem significado clínico (dados não mostrados). No entanto, a avaliação do QT e QT corrigido reafirmou a importância de se correlacionar o valor desse intervalo com a FC. A duração do segmento QT não foi significativa nos grupos estudados, mas após correção pela fórmula de Hodges foi possível observar progressiva queda entre os tempos e grupos avaliados. Esse achado é reportado em pacientes humanos submetidos à administração de digoxina (Cheng, 2004; Frommeyer et al., 2017). A atuação dos GCs na bomba NKA promove aumento da extrusão do Na^+ e internalização do Ca^{2+} pelo trocador de sódio e cálcio

(NCX), o que pode causar aumento da permeabilidade da membrana ao K^+ (Bassingthwaight et al., 1976). Um incremento à corrente de K^+ durante o platô do potencial de ação (PA) possivelmente é o responsável pela redução do período refratário, observado no ECG pela diminuição do intervalo QT (Gaita et al., 2004).

Hematologia

A coleta de sangue realizada após 21 dias, na eutanásia, indicou alterações na série vermelha (Figuras 8 e 9). O grupo DIG apresentou aumento significativo do número de eritrócitos, enquanto o grupo OUA apresentou maiores níveis de hemoglobina que os grupos CON e DIG. Os animais que receberam OUA também apresentaram hematócrito mais elevado em comparação com o CON (Figura 8).

Tanto o volume globular médio, quanto a hemoglobina corpuscular média foram inferiores nos grupos tratados (DIG, OUA, OLE) em relação ao controle. Já a concentração de hemoglobina corpuscular média (HCM) foi inferior no grupo OUA em comparação com os outros grupos tratados com GCs, mas não em comparação com o grupo CON (Figura 8). O desvio na amplitude dos eritrócitos, indicado pelo parâmetro RDW-SD (Figura 9) revela diminuição significativa nos grupos OLE e DIG em relação ao CON.

Foi possível observar também aumento significativo do número de plaquetas no grupo OLE e alteração na variação de seu tamanho (PDW) apenas no grupo DIG, ambos em comparação com o grupo CON. O volume plaquetário médio (VPM) foi inferior no grupo OUA (Figura 9) em relação ao controle. Não foram observadas alterações quanto à presença de macroplaquetas (MPLT) e coeficiente de variação do tamanho das hemácias (RDW-CV).

As alterações observadas na série eritrocitária indicam que os três GCs utilizados podem atuar nas hemácias. Esse é o primeiro estudo que avalia os efeitos comparativos da digoxina, ouabaína e oleandrina. Os resultados indicam principalmente aumento da hemoglobina e presença de hemácias microcíticas, com maior concentração e menor peso relativo de hemoglobina. Estudos que avaliaram a toxicidade da *N. oleander*, planta que contém oleandrina, apresentaram resultados semelhantes quanto ao aumento do hematócrito, visto no grupo OUA e hemoglobina, observado nos grupos OUA e DIG (Hughes et al., 2002; Rhaymah et al., 2011). Dados de intoxicação por digoxina são associados principalmente a doenças prévias que não permitem inferir a real atuação desse GC. Não há dados clínicos de atuação da ouabaína em eritrócitos.

Sabe-se que os GCs podem se ligar à bomba NKA dos eritrócitos, células que participam diretamente da sua cinética de distribuição tecidual (Solomon, 1956). Alguns estudos afirmam que a afinidade dos GCs a eritrócitos é variável e pode estar associada ao aumento intracitoplasmático de Na^+ (Ford et al., 1979; Ozaki et al., 1985; Balzan et al., 2000). Esse desbalanço eletrolítico é responsável por modificações morfológicas das hemácias também vistas em estudos de citotoxicidade. Pesquisas que avaliam o potencial citotóxico da digoxina e oleandrina, por exemplo, determinam atuação direta e eficaz em células sanguíneas neoplásicas malignas da série branca e vermelha (Hallbook et al., 2011; Xu et al., 2016).

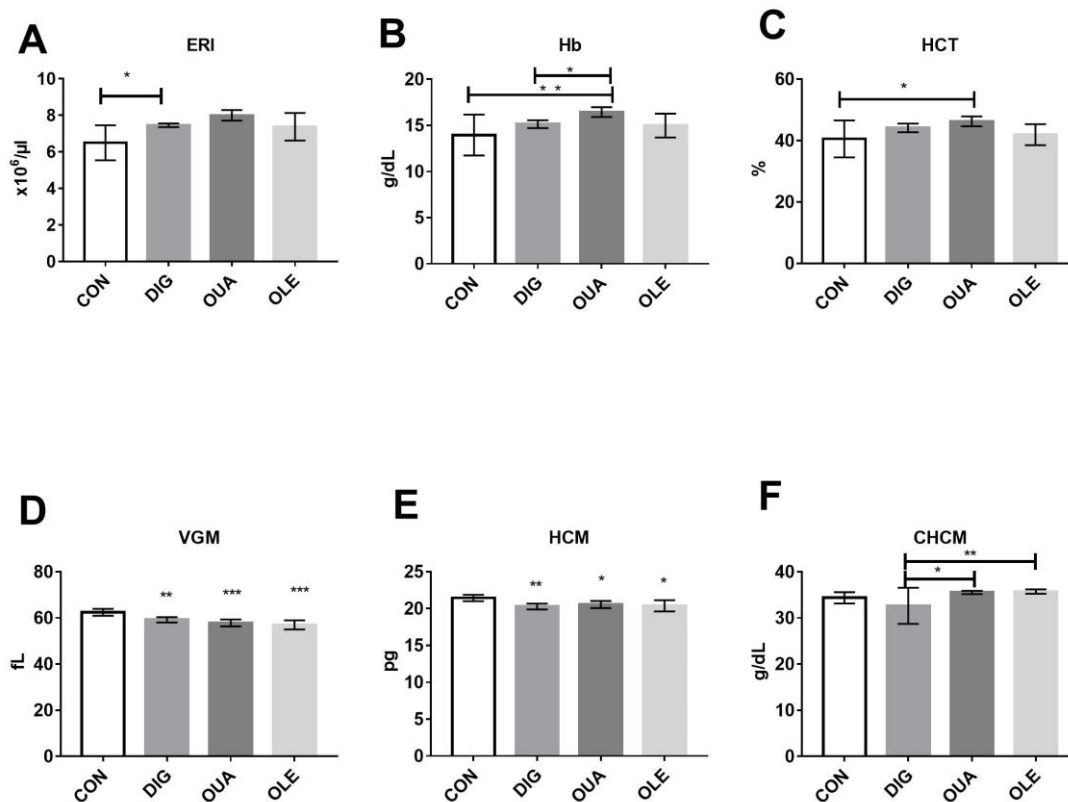


Figura 8. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematimétricos do tempo 21 (T21) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram número de eritrócitos (ERI) (A), valores médios de concentração de hemoglobina (Hb) (B), hematócrito (HCT) (C), volume globular médio (VGM) (D), hemoglobina corpuscular média (HCM) (E) e concentração corpuscular média de hemoglobina (CHCM) (F). Dados paramétricos (HCT, VGM, HCM) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey. Dados não paramétricos (Hb, ERI, CHCM) foram avaliados por Dunn e Kruskal-Wallis. *Diferença significativa entre os grupos tratados ($p < 0,05$); **Diferença significativa entre os grupos tratados ($p < 0,01$); ***Diferença significativa entre os grupos tratados ($p < 0,001$).

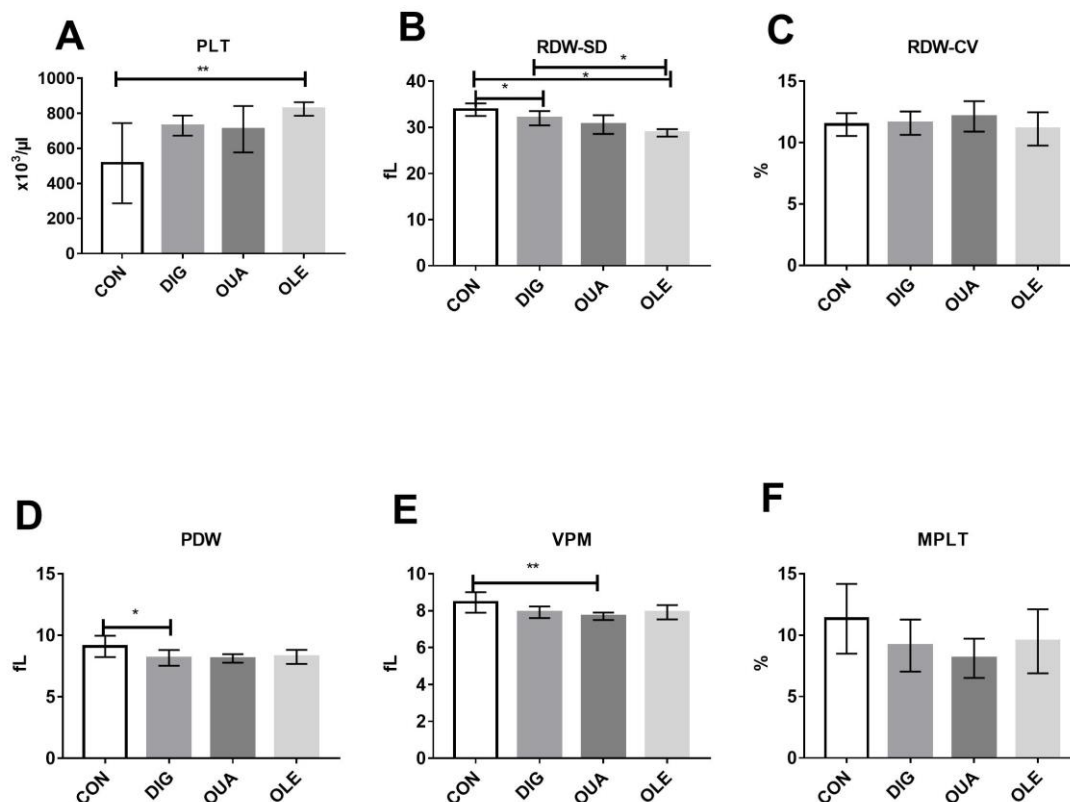


Figura 9. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematimétricos do tempo 21 (T21) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram número de plaquetas (PLT) (A), desvio padrão na amplitude dos eritrócitos (RDW-SD) (B), coeficiente de variação da amplitude dos eritrócitos (RDW-CV) (C), amplitude de variação do tamanho plaquetário (PDW) (D), volume plaquetário médio (VPM) (E) e índice de macroplaquetas (MPLT) (F). Dados paramétricos (RDW-SD, PDW, MPV, MPLT) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados não paramétricos (PLT, RDW-CV) foram avaliados por Dunn e Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre os grupos tratados ($p < 0,05$); **Diferença significativa entre os grupos tratados ($p < 0,01$).

Em relação às plaquetas, houve aumento significativo na contagem total apenas no grupo OLE e diminuição do volume plaquetário no grupo OUA. Poucos estudos foram reportam alterações plaquetárias em função da administração de GCs. Pacientes humanos com fibrilação atrial tratados com digoxina apresentam trombocitose devido à ativação endotelial e plaquetária. Esse achado está provavelmente relacionado ao aumento intracitoplasmático de Ca^{2+} , essencial para a via de sinalização endotelial. Os autores inclusive sugerem que a administração crônica nessas condições pode predispor eventos trombóticos (Chirinos et al., 2005). No entanto, por tratar-se de pacientes com condições patológicas prévias sua interpretação deve ser cuidadosa. Nos animais do presente estudo não foram observados sinais clínicos ou alterações histológicas compatíveis com eventos trombóticos.

A administração da DIG no presente estudo não promoveu alterações plaquetárias, como observado em estudos *in vivo* em pacientes humanos saudáveis indicando que a utilização de digoxina não altera o número de plaquetas (Pettersen et al., 2002). No entanto, estudos *in vitro* afirmam que a ouabaína é capaz de ativar as plaquetas de forma dose-dependente e promover

efeito pró-coagulante (Prodouz et al., 1987; Tomasiak et al., 2007). Acredita-se que, assim como visto em eritrócitos, a modulação da bomba NKA é responsável por alterar o Na^+ intracelular e ativar vias de sinalização dependentes desse íon com impacto direto na capacidade coagulante plaquetária (Tomasiak et al., 2007). Não foram encontrados dados sobre a atuação da oleandrina nas plaquetas, assim mais estudos são necessários para caracterizar a atuação dos GCs nas plaquetas e cascata de coagulação.

A avaliação do número total e diferencial de leucócitos não indicou diferenças significativas (Figura 10). Em todos os animais houve um predomínio de linfócitos, seguidos de neutrófilos, eosinófilos e monócitos e os valores se mantiveram dentro do esperado para a espécie (Thrall et al., 2007). Estudos *in vivo* e *in vitro* com diferentes GCs, incluindo a digoxina, ouabaína e oleandrina mostram o potencial anti-inflamatório dessas substâncias (Furst et al., 2017). A ouabaína promove redução da inflamação, efeito antinociceptivo (de Vasconcelos et al., 2011) e reduz a migração de neutrófilos em camundongos experimentalmente infectados com *Leishmania* (Jacob et al., 2013). Já a digoxina reduz a produção de citocinas e é experimentalmente benéfica em modelos murinos de artrite imunomediada (Lee et al., 2015). A oleandrina também possui efeito anti-inflamatório e antipirético similar à administração de paracetamol (Kumar e Anand, 2010). Apesar do potencial anti-inflamatório desses compostos, no presente estudo não foi possível observar alterações leucocitárias compatíveis (Figura 10).

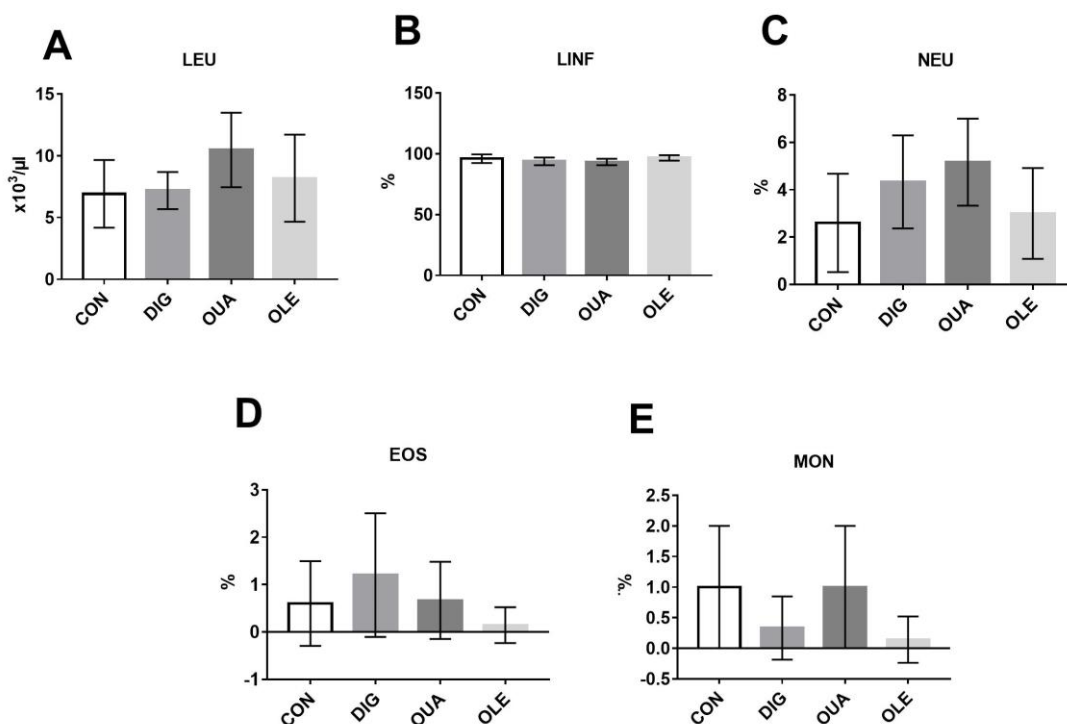


Figura 10: Valores médios e desvio padrão dos parâmetros leucocitários do tempo 21 (T21) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram número total de leucócitos (A) e porcentagem diferencial de linfócitos (B), neutrófilos (C), eosinófilos (D) e monócitos (E). Dados paramétricos (LEU, LIN) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados não paramétricos (NEU, EOS, MON) foram avaliados por Dunn e Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Bioquímica sérica

Foram realizadas análises séricas dos seguintes marcadores cardíacos: troponina I (cTnI), CK, CK-MB, AST e LDH. O teste de cTnI foi negativo para todos os animais avaliados (Figura 11). As troponinas cardíacas, especialmente a cTnI, são altamente sensíveis e específicos marcadores de lesão cardíaca, sendo amplamente utilizados na medicina veterinária (Wells e Sleeper, 2008; Plebani e Zaninotto, 2009; Fonfara et al., 2010). A cTnI é uma subunidade estrutural encontrada no miocárdio com pico de liberação entre quatro a seis horas após a lesão do aparato contrátil do coração (O'Bryen et al., 2006; Pinto et al., 2010). Em equídeos sadios submetidos à administração endovenosa de digoxina também não foram encontradas alterações nos níveis de cTnI (Tharwat e Al-Sobayil, 2014). O teste utilizado no presente experimento é imunocromatográfico e semi-quantitativo com limite de detecção de 0,5ng/mL. As amostras dos animais submetidos a 21 dias de tratamento com os GCs possivelmente apresentaram níveis inferiores ao limite de detecção e por isso foram determinadas negativas.

A avaliação da CK, CK-MB e da relação entre essas enzimas é representada pelas Figura 12 e Tabela 4. Foi observada diferença estatística apenas entre os grupos OUA e OLE quanto à relação CK/CK-MB. Esse achado está provavelmente associado às diferenças no desvio padrão observado entre esses grupos. O comparativo com o grupo CON não revelou diferenças, no entanto, a fração MB do grupo OLE representa mais de 85% do valor total da CK, enquanto a digoxina apresentou 67%, ouabaína 44% e controle 42% (Tabela 1).

O aumento relativo da fração MB no grupo OLE indica que esse GC tem maior potencial lesivo no coração; resultado esse corroborado pelo aumento de LDH e achados histológicos e ultraestruturais discutidos a seguir. As intoxicações por GCs podem muitas vezes provocar o aumento da CK-MB (Camplesi et al., 2009; Pedroso et al., 2009; Kassop et al., 2014), considerada uma enzima marcadora específica de danos teciduais cardíacos, secretada principalmente quando a membrana celular se torna permeável ou se rompe. O seu pico de liberação ocorre entre oito e 30h após a injúria cardíaca, podendo retornar aos valores basais após 48 ou 72h (Pinto et al., 2010).

Outros importantes parâmetros avaliados foram AST e LDH. É possível observar aumento significativo da AST no grupo OUA e aumento da LDH nos grupos OUA e OLE. A AST é uma enzima marcadora de lesão hepática que se encontra aumentada em casos de dano celular hepático, disfunção hepática e colestase. No entanto, pesquisas nos últimos anos estendem a interpretação desse marcador, correlacionando o aumento progressivo de AST com a gravidade do quadro de pacientes com IC (Vasconcelos et al., 2006; Samsky et al., 2013). Os níveis séricos de AST também estão diretamente relacionados aos níveis séricos de LDH em pacientes cardiopatas (Hu et al., 2015). A LDH é uma enzima citoplasmática expressada em vários tecidos, incluindo o fígado e coração. Seus níveis podem estar aumentados em casos de lesão tecidual, necrose, hipóxia e hemólise, por exemplo (Graeber et al., 1990; Kato et al., 2006; Karlsson et al., 2010; Hu et al., 2015). A LDH é considerado um marcador precoce de lesão cardíaca, sendo especialmente importante para o estabelecimento do prognóstico de pacientes com IC (Piper et al., 2002; Hu et al., 2015).

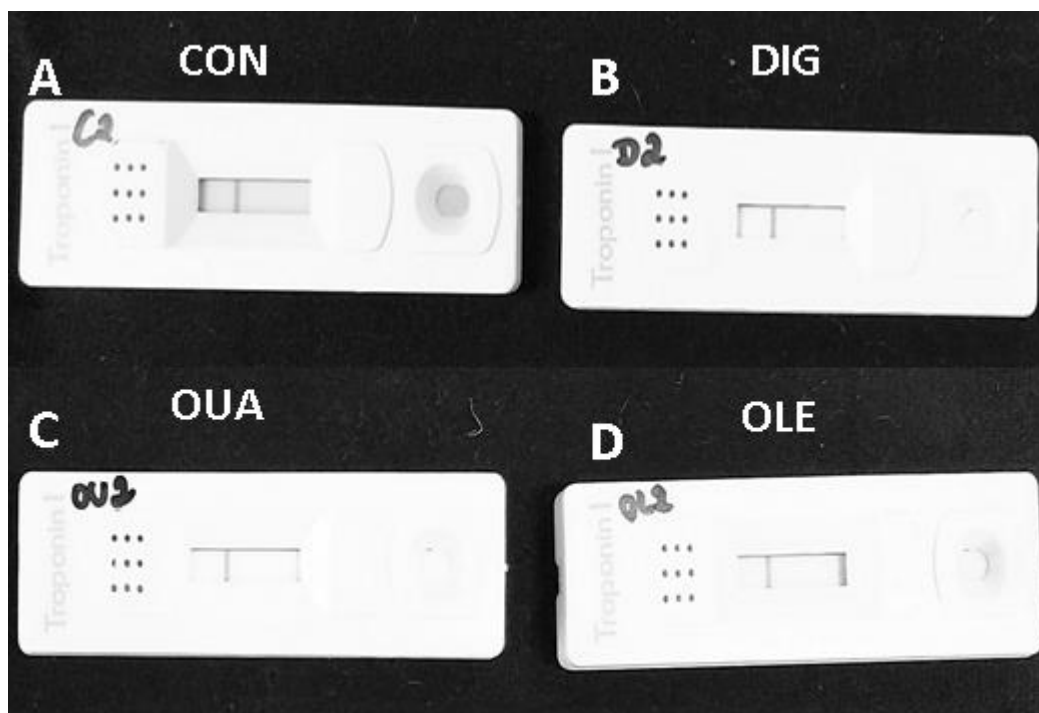


Figura 11. Imagem representativa de testes imunocromatográficos de troponina I (cTnI) realizados com amostras de soro de ratos Wistar controle (CON) (A) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG) (B), ouabaína (OUA) (C) e oleandrina (OLE) (D). A presença de um único traço no cassete de análise indica de forma qualitativa que as amostras possuem níveis de cTnI inferiores a 0,5ng/mL.

Tabela 4. Valores médios, desvio-padrão e relação entre as médias da creatina quinase (CK) e sua fração MB (CK-MB) de ratos Wistar submetidos a tratamento por 21 dias com NaCl (CON), digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE)

Grupo	CON	DIG	OUA	OLE
CK	1983 ± 1391,6	881,00 ± 483,12	1097 ± 869,37	1136,70 ± 693,15
CK-MB	845,66 ± 532,71	595,93 ± 477,70	490,02 ± 659,86	979,48 ± 216,92
CK-MB/CK	42,64%	67,64%	44,67%	86,17%

A administração de digoxina não provocou alterações nos níveis de AST e LDH, assim como visto em humanos (Andersen e Damsgaard, 1976) e equídeos (Tharwat e Al-Sobayl, 2014). No entanto, em modelo experimental com cães, esse GC causou elevação progressiva da LDH (Teske et al., 1976; Karadeniz et al., 2008). O aumento das AST em animais que receberam ouabaína e do LDH em animais que receberam ouabaína e oleandrina representam um indicativo precoce de lesão cardíaca que pode contribuir de forma crônica para lesão hepática secundária. Esse é um achado importante a ser monitorado nas pesquisas futuras com GCs, pois pode comprometer o tratamento e agravar quadros de IC e indicam que a oleandrina e ouabaína tem maior potencial lesivo ao coração.

O cálcio, cloreto, magnésio e creatinina permaneceram inalterados em todos os grupos. Já a avaliação da ureia revelou apenas discreta diminuição no grupo que recebeu oleandrina (Figura 13). Os níveis séricos das proteínas totais (PT), albumina (Alb) e relação

albumina/globulinas (A/G) também não foram alterados pelos tratamentos (Figura 14). Foi possível, dessa forma, descartar a possibilidade de desidratação.

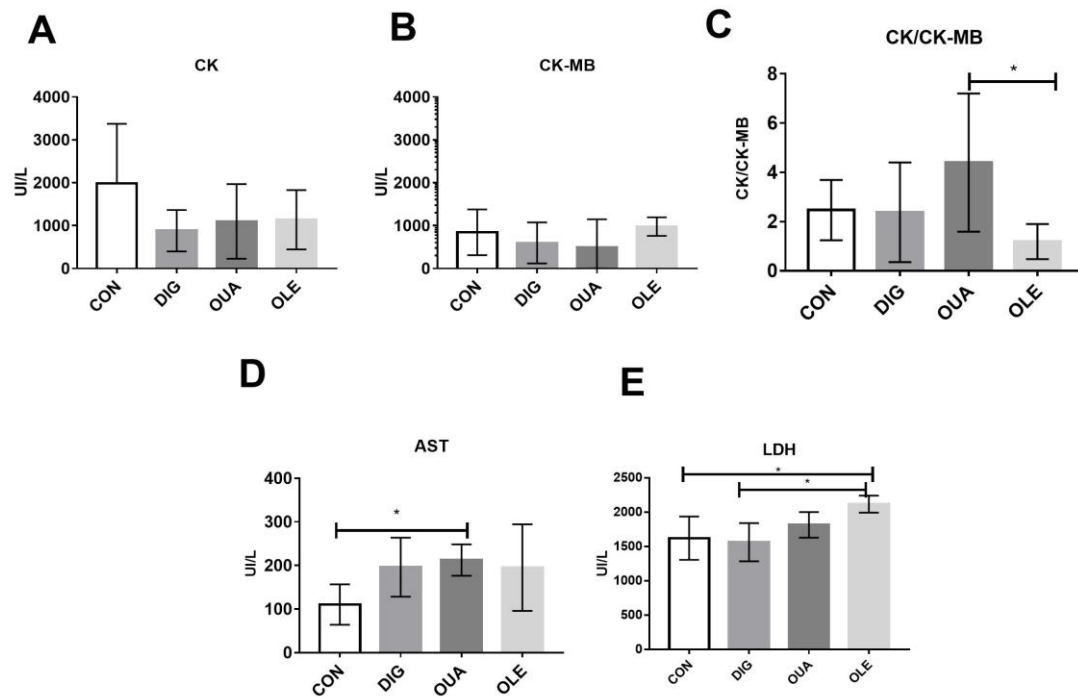


Figura 12: Valores médios e desvio padrão dos marcadores séricos de lesão cardíaca do tempo 21 (T21) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram creatina quinase (CK) (A), creatina quinase fração MB (CK-MB) (B), a relação entre CK/CK-MB (C), aspartato amino-transferase (AST) (D) e lactato desidrogenase (LDH) (E). Dados paramétricos (CK, CK-MB e CK/CK-MB) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados não paramétricos (AST, LDH) foram avaliados por Dunn e Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre os grupos tratados.

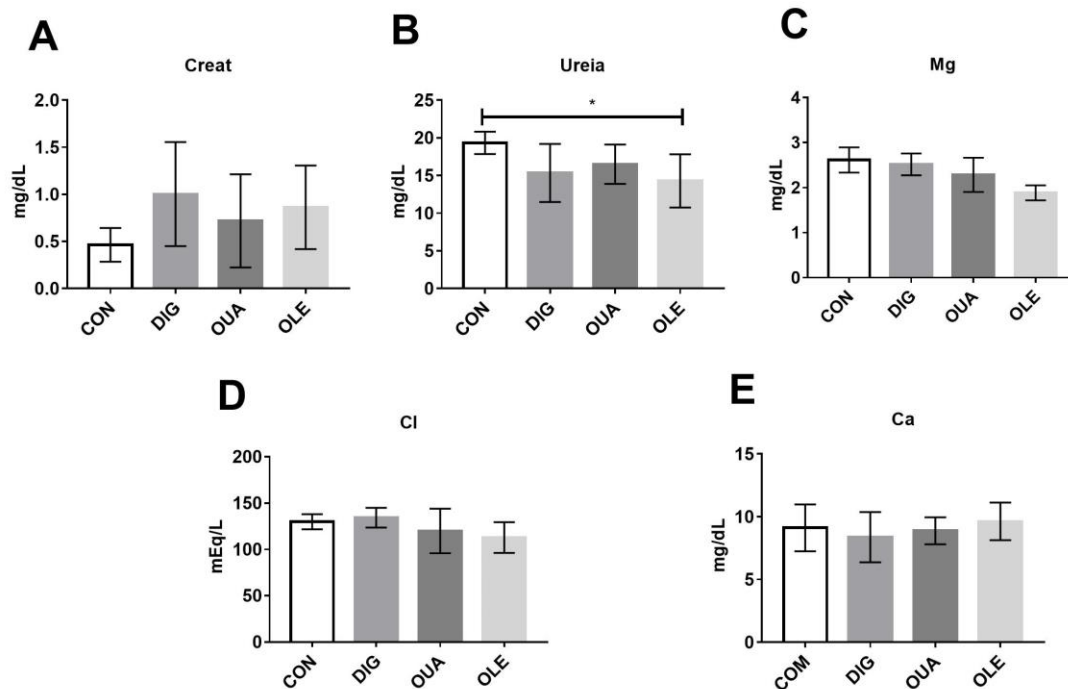


Figura 13. Valores médios e desvio padrão dos marcadores séricos de lesão cardíaca do tempo 21 (T21) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram creatinina (Creat) (A), ureia (B), magnésio (Mg) (C), cloreto (Cl) (D) e cálcio séricos (Ca) (E). Dados paramétricos (Mg, Ca, Cl, Creat, Ureia) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre os grupos.

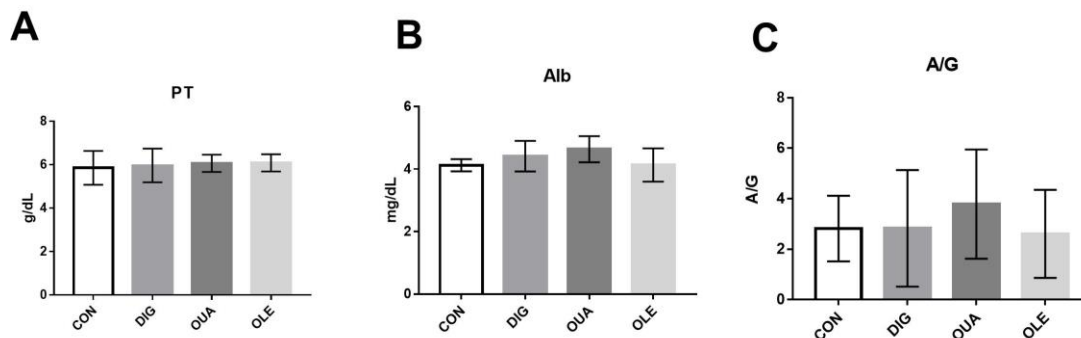


Figura 14. Valores médios e desvio padrão dos marcadores séricos de lesão cardíaca do tempo 21 (T21) de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Os parâmetros avaliados foram proteínas totais (PT) (A), albumina (Alb) (B) e relação albumina/globulina (Alb/Glo) (C). Dados paramétricos (PT, Alb) foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados não paramétricos (A/G) foram avaliados por Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre os grupos.

A diminuição da ureia no grupo OLE não possui significado clínico. A manutenção de níveis normais de ureia e creatinina, assim como dos íons cloreto, magnésio e cálcio indicam que os GCs, na posologia aqui empregada, não causaram danos aos rins capazes de serem

identificados por esses marcadores. Apesar de não serem estatisticamente significativos, os valores de creatinina foram superiores nos animais tratados. As médias e desvio-padrão de cada grupo foram: controle $0,46 \pm 0,17$, digoxina $1,00 \pm 0,55$, ouabaína $0,71 \pm 0,49$, e oleandrina $0,86 \pm 0,44$ (Tabela 5). O tratamento com a digoxina elevou em $0,54\text{mg/dL}$ o valor médio da creatinina em comparação com o controle, representando aumento de 217%; para a ouabaína o acréscimo foi de 154% ou $0,25\text{mg/dL}$ e da oleandrina $0,4\text{mg/dL}$ representando aumento de 187%. Segundo a classificação do AKIN para a insuficiência renal crônica, os animais que receberam digoxina se encontram no segundo estágio e os animais que receberam oleandrina e ouabaína no primeiro estágio (Critical Care, 2007). De acordo com a classificação clínica da doença renal crônica proposta pela *International Renal Interest Society* (IRIS) o quadro aqui apresentado por todos os animais tratados é classificado no primeiro estágio da insuficiência renal, pois as médias dos grupos são inferiores a $1,4\text{mg/dL}$ (IRIS, 2016).

Tabela 5. Valores médios, desvio-padrão e relação entre as médias da creatinina de ratos Wistar submetidos a tratamento por 21 dias com NaCl (CON), digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE)

Grupo	CON	DIG	OUA	OLE
Creatinina	$0,46 \pm 0,17$	$1,00 \pm 0,55$	$0,71 \pm 0,49$	$0,86 \pm 0,44$
Aumento % em relação ao grupo controle	-	217	154	187
Aumento em mg/dL em relação ao controle	-	0,54	0,25	0,4

O primeiro estágio é considerado a fase inicial, que ocorre durante ou logo após a lesão renal, marcando o início dos sinais patológicos, como discutidos a seguir. O segundo estágio, chamado de fase de extensão, inclui lesões isquêmicas, hipóxia e inflamação mais graves que culminam em necrose e apoptose. Como observado em nosso estudo, a azotemia e/ou uremia geralmente não estão presentes nos dois primeiros estágios. Esses marcadores, ureia e creatinina, são atualmente considerados tardios para identificação da lesão renal, e apenas apresentam aumento no terceiro estágio, chamado de fase de manutenção. O último estágio, quarto, é a fase de recuperação do quadro de azotemia (Ross, 2011).

Algumas pesquisas determinam o potencial nefrotóxico dos GCs, especialmente a digoxina. Doses prolongadas de DIG em cães provocam aumento de ureia, creatinina e nitrogênio não ureico. Acredita-se que essa ação seja resultado da sua excreção renal e atuação na bomba NKA tubular (Teske et al., 1976). A intoxicação espontânea por *N. oleander* em cavalos também provoca aumento de creatinina (Renier et al., 2014), nem sempre observado em casos de intoxicação humana por digoxina (Limon et al., 2016).

Os íons cálcio, cloreto e magnésio são utilizados rotineiramente para determinação da capacidade de filtração renal. O cálcio sérico está presente em três frações: cálcio ionizado, cálcio ligado a proteínas séricas e cálcio complexado a ânions. O cálcio iônico é o mais relevante para os estudos da fisiologia renal e seu valor é determinado por uma equação de correção a partir da albumina (Duncan e Prasse, 1986; Sena e Bowers, 1988; Bush, 1991; Nelson et al., 1994). Não há relatos que as intoxicações por GCs alteram os valores séricos do cálcio e cloreto, no entanto o magnésio pode diminuir significativamente após consumo de altas doses de digoxina (Flink, 1985) e predispor arritmias (Seller et al., 1985). Isso se deve à ação dos GCs na bomba NKA renal com comprometimento do balanço eletrolítico celular e consequente alteração da Mg-ATPase (Seller et al., 1985). Possivelmente a lesão renal

observada pelos achados histológicos e ultraestruturais apresentados a seguir não foi identificada pelos marcadores cardíacos e íons aqui mensurados. A utilização de biomarcadores mais precoces, como a cistatina c, molécula-1 de lesão renal (KIM-1) e interleucina 8 (IL-8) pode ser importante para avaliação da lesão renal. Provavelmente esses marcadores apresentam maior correlação com os achados histológicos.

Não houve diferença no valor sérico de proteínas totais, albumina e na relação albumina/globulina (A/G). Os GCs, na posologia aqui empregada, não provocaram alterações graves no metabolismo proteico ou causaram desidratação, assim como foi observado para os marcadores de lesões renais. Também não provocaram quadros inflamatórios, correlacionando com os níveis normais de leucócitos encontrados no presente estudo. Esse achado é corroborado por outros autores que descrevem quadros de intoxicação por GCs (Hughes et al., 2002; Renier et al., 2014).

Avaliação histológica dos rins e coração

À macroscopia não foram visualizadas alterações em nenhum dos animais estudados, achado comum às intoxicações por GCs (Botelho et al., 2017). Alguns achados necroscópicos são descritos na literatura, como congestão e hemorragias cardiopulmonares (Bourdouis et al., 1982); a ingestão de grandes quantidades de GCs também pode provocar irritação gástrica e intestinal (Papi et al., 2002; Aslani et al., 2004). A via de administração empregada no presente estudo foi SC, o que não provocou danos locais nos animais.

A análise histológica (HE) do coração do grupo CON não revelou alterações significativas. Já o grupo DIG apresentou discreta vacuolização intracitoplasmática focal de cardiomiócitos em área de músculo papilar; o grupo OUA apresentou perda focal e discreta das estriações cardíacas em áreas de músculo papilar associadas a discreta vacuolização intracitoplasmática focal do miocárdio, hipereosinofilia multifocal discreta das fibras cardíacas e discreta área focal de necrose de cardiomiócitos. E o grupo OLE apresentou alterações semelhantes ao grupo OUA, com perda focal e discreta das estriações cardíacas acompanhadas de vacuolização intracitoplasmática multifocal discreta a moderada de cardiomiócitos e necrose de cardiomiócitos focal moderada (Figura 15). A coloração especial de Tricômico de Masson foi utilizada para identificação de áreas de fibrose, no entanto nenhuma diferença foi visualizada entre os grupos (Figura 16).

As alterações vistas na análise de histológica confirmam a atuação dos GCs no músculo cardíaco, sendo a oleandrina o composto que causou visualmente mais lesões e que possivelmente atuou de forma mais intensa sobre a bomba NKA. Exames histológicos de indivíduos intoxicados por digoxina também revelam necrose miocárdica (Bourdouis et al., 1982). Já os estudos com a ouabaína identificaram principalmente a apoptose de cardiomiócitos (Ramirez-Ortega et al., 2007), o que não foi observado no presente estudo e a presença de vacúolos intracitoplasmáticos, assim como observado na Figura 15. A ingestão de *N. oleander* descrita em estudos experimentais e relatos de caso revelam alterações como miocardite, fragmentação e degeneração dos cardiomiócitos, com infiltrado mononuclear multifocal acompanhados de vacúolos intracitoplasmáticos e extensa necrose (Minardi et al., 1982; Pedroso et al., 2009). A necrose observada no grupo OLE não foi extensa, o que provavelmente está associado à manutenção dos níveis normais de marcadores séricos cardíacos. Esse achado no entanto é importante, pois indica um maior potencial lesivo desse GC em comparação com a digoxina e ouabaína.

O Tricômio de Masson é uma coloração utilizada para identificação de fibras colagênicas, marcadas de azul (Jong et al., 2012). No presente estudo não foram encontradas

áreas de deposição colagênica compatíveis com fibrose. As únicas regiões com fibras de colágeno se concentraram na túnica adventícia dos vasos do miocárdio, sem diferenças entre os grupos. Esse é um achado importante, que indica que a aplicação dos GCs por 21 dias não causou remodelamento no coração com deposição de colágeno.

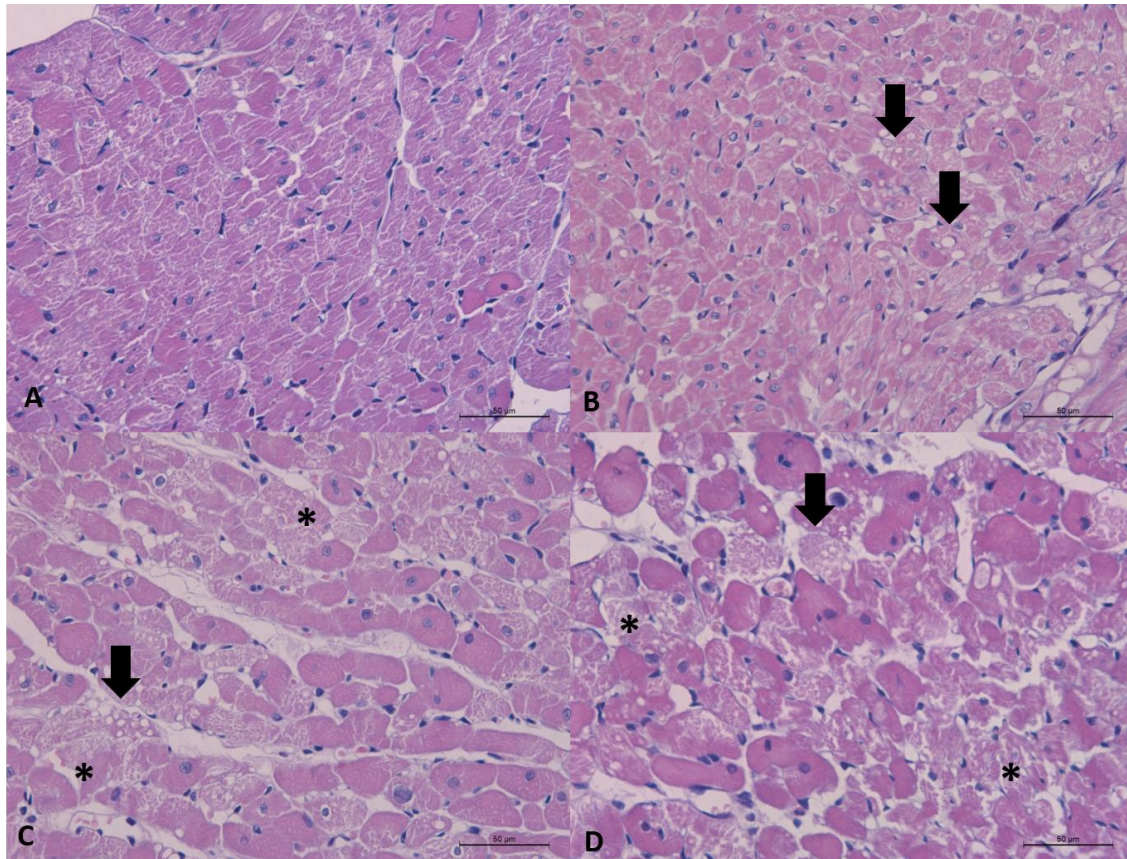


Figura 15. Micrografia óptica de tecido cardíaco de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). A) Grupo CON sem alterações. B) Grupo DIG com discreta vacuolização intracitoplasmática focal de cardiomiócitos em área de músculo papilar (setas pretas). C) Grupo OUA com perda focal e discreta das estriações cardíacas em áreas de músculo papilar associadas a discreta vacuolização intracitoplasmática focal do miocárdio (setas pretas) e discreta área focal de necrose de cardiomiócitos (asterisco). D) Grupo OLE mostrou alterações semelhantes ao grupo OUA, com perda focal e discreta das estriações cardíacas acompanhadas de vacuolização intracitoplasmática multifocal discreta a moderada de cardiomiócitos (setas pretas) e necrose de cardiomiócitos focal moderada (asteriscos); (HE, Bar=50µm).

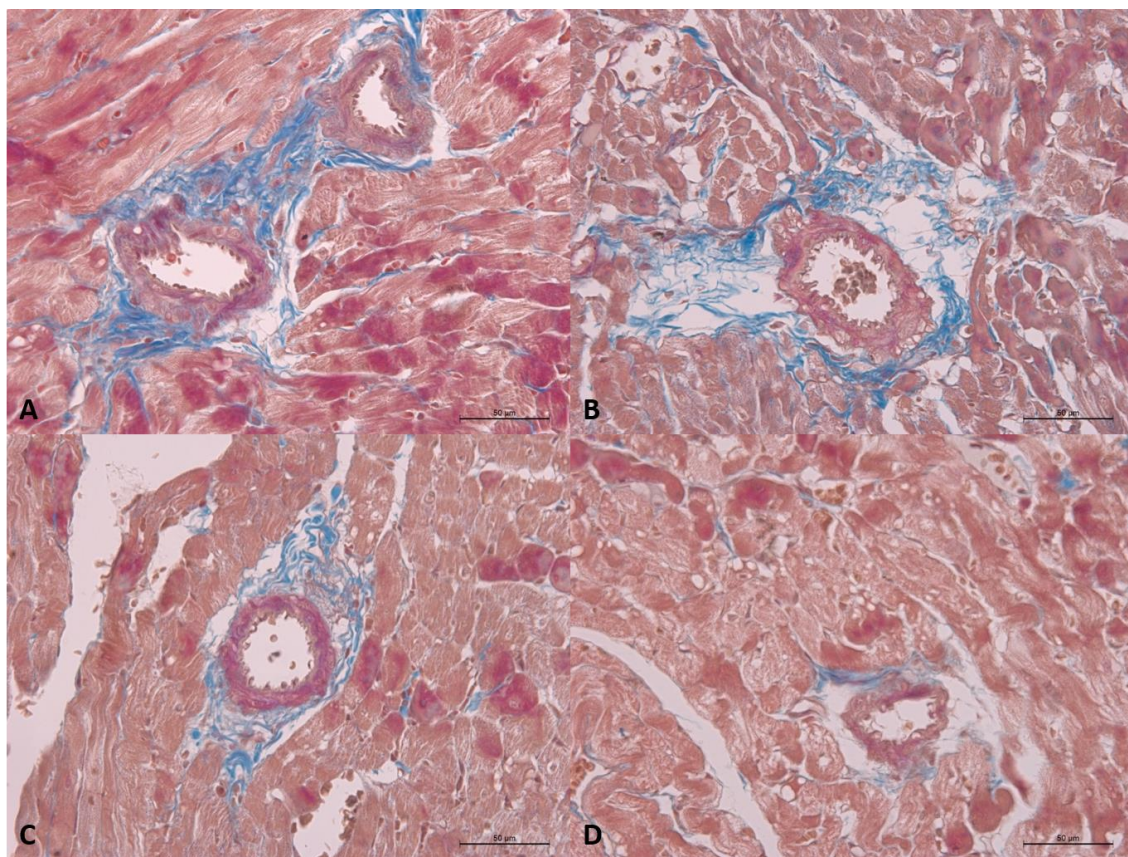


Figura 16. Micrografia óptica de tecido cardíaco de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). A) Grupo CON sem alterações. B) Grupo DIG sem alterações. C) Grupo OUA sem alterações. D) Grupo OLE sem alterações; (Tricômio de Masson, Bar=50µm).

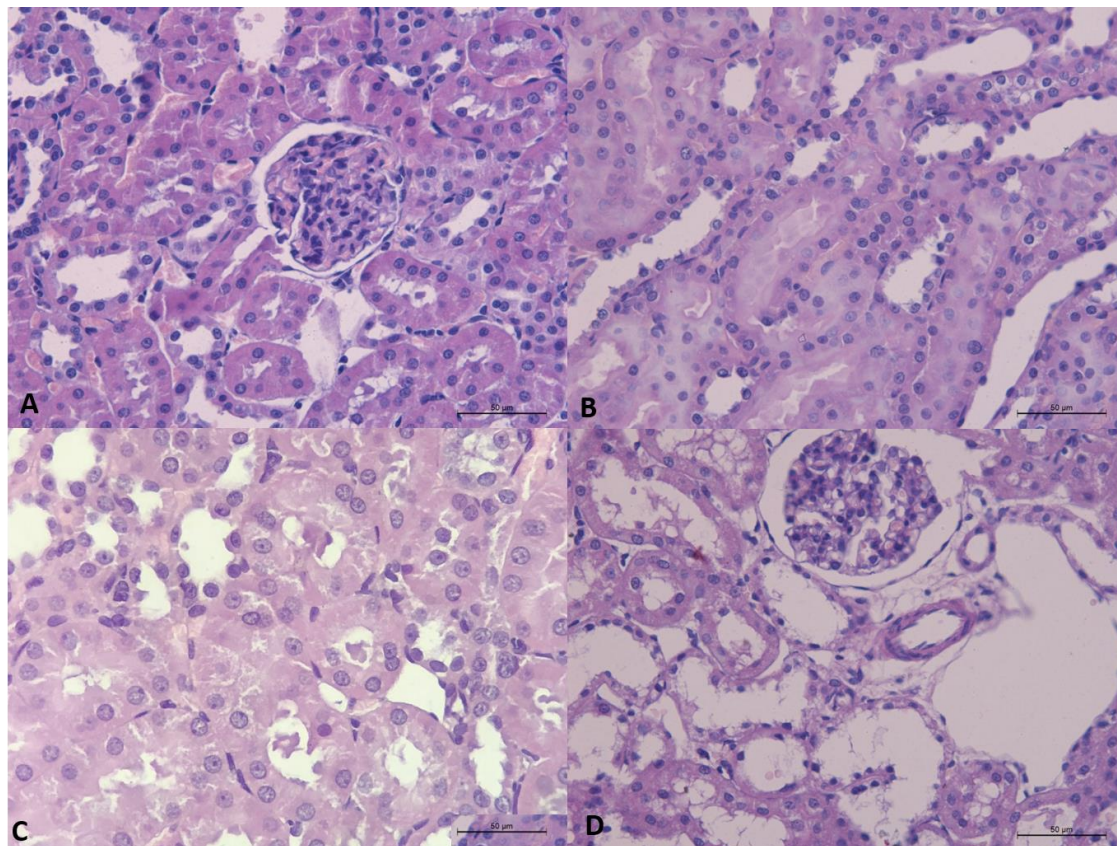


Figura 17. Micrografia óptica de amostras dos rins de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). A) Grupo CON sem alterações. B) Grupo DIG apresenta material basofílico amorfo multifocal moderado no interior dos túbulos proximais. C) Grupo OUA manifesta vacuolização intracitoplasmática multifocal moderada das células epiteliais dos túbulos proximais. D) Grupo OLE apresenta vacuolização intracitoplasmática multifocal moderada das células epiteliais dos túbulos proximais e necrose tubular focal moderada (HE, Bar=50µm).

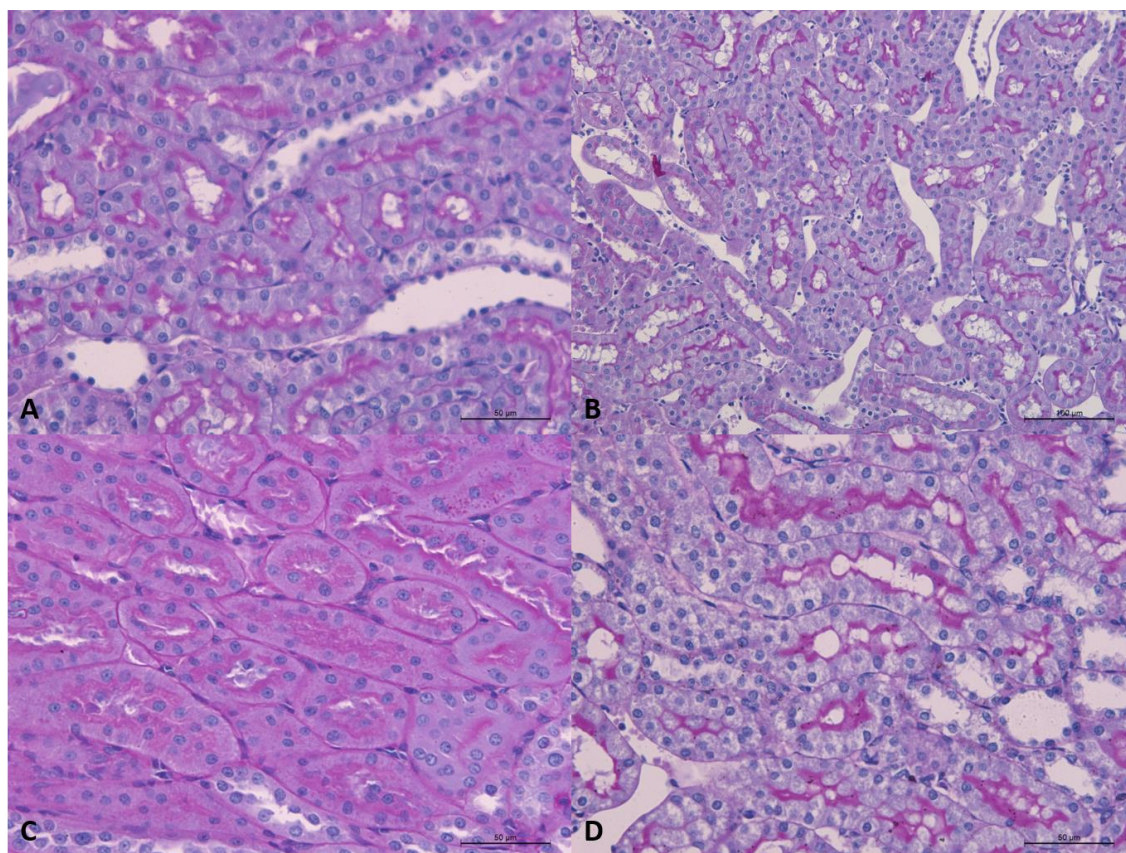


Figura 18. Micrografia óptica de amostras dos rins de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). A) Grupo CON sem alterações. B) Grupo DIG apresenta material basofílico amorfo multifocal discreto no interior dos túbulos proximais. C) Grupo OUA manifesta material basofílico amorfo multifocal moderado. D) Grupo OLE apresenta material basofílico amorfo multifocal discreto (PAS, Bar=50µm).

As amostras de tecido renal do grupo CON não revelaram alterações importantes. O grupo DIG não apresentou alterações degenerativas, inflamatórias ou necróticas. Enquanto os grupos OUA e OLE apresentaram vacuolização intracitoplasmática multifocal moderada das células epiteliais dos túbulos proximais. Um animal do grupo OLE apresentou necrose tubular focal moderada (Figura 17). Todos os grupos tratados apresentaram material basofílico amorfo multifocal moderado no interior dos túbulos proximais, corado pelo PAS sugere presença de glicoproteínas (Figura 18).

Os rins podem ser alvo da ação dos GCs, principalmente por essa ser uma de suas vias de excreção (Kelman et al., 1980; Ni et al., 2002). A presença de bombas NKA nos túbulos renais já foi descrita na literatura, assim como o seu bloqueio pela digoxina e ouabaína (Liu et al., 2002; Touza et al., 2011). A perda proteica, degeneração e necrose tubular ocorrem em consequência do desbalanço eletrolítico local e são relatados em casos de intoxicação pelos três GCs aqui estudados (Minardi et al., 1982; Bourdouis et al., 1982; Aslani et al., 2007; Barbosa et al., 2008; Pedroso et al., 2009; Taheri et al., 2012).

A perda proteica está intimamente relacionada às lesões degenerativas e necróticas e advém da perda de células epiteliais tubulares, sem comprometer os valores séricos de proteína, albumina e globulinas como observado no presente estudo. A lesão renal vista nos animais que receberam GCs, especialmente do grupo OLE, são discretas e podem estar relacionados com o aumento da creatinina. Do ponto de vista patológico no entanto, não foram encontradas lesões extrarrenais compatíveis com quadro de insuficiência renal. Assim como a lesão cardíaca, as alterações renais não comprometeram o funcionamento dos órgãos a ponto de causar alterações graves como a azotemia. Sabe-se que os rins tem alta capacidade de compensação e as lesões nos néfron devem ser extensas para provocar tal alteração (Waki et al., 2010). Mesmo sendo achados moderados, as imagens histológicas renais reafirmam o potencial dos GCs de atuarem sobre esses órgãos e a necessidade de monitoração da sua função em estudos futuros que almejem sua utilização clínica.

Avaliação ultraestrutural dos rins e coração

A ultraestrutura do coração observada pela microscopia eletrônica de varredura mostrou fibras cardíacas intactas, alinhadas e sem alterações nas amostras do grupo CON (Figura 19). Amostras do grupo DIG revelaram aumento da matriz extracelular adjacente às fibras cardíacas e discreta dissociação de cardiomiócitos. O grupo OUA apresentou aumento moderado da matriz extracelular com preservação do alinhamento de cardiomiócitos. Já o grupo OLE apresentou grave dissociação, encurtamento e ruptura das fibras cardíacas.

Os achados da microscopia eletrônica de varredura correlacionam diretamente com os resultados da microscopia óptica e de bioquímica sérica. O grupo que recebeu OLE apresentou lesões compatíveis com a necrose de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo, acompanhadas de um aumento sérico de CK-MB e LDH e a nível celular da ruptura e encurtamento das fibras cardíacas, com perda da sua estrutura e alinhamento. O conjunto desses resultados indicam que, no comparativo entre a atividade dos GCs, a oleandrina tem maior potencial cardiotoxico que a digoxina e ouabaína. Estudo prévio conduzido pela nossa equipe já havia identificado o potencial lesivo da *N. oleander* em cardiomiócitos, com ruptura de fibras e lesão mitocondrial observadas pela microscopia eletrônica de transmissão (Botelho et al., 2017). No entanto, este é o primeiro trabalho que identificou a ação lesiva da oleandrina isolada a nível celular, observada pela microscopia de varredura do tecido cardíaco.

Os GCs podem promover danos mitocondriais, nucleares e alterar a estrutura das fibras cardíacas (Ramirez et al., 2007; Botelho et al., 2017). Acredita-se que a inibição persistente da bomba NKA promove acumulação intracelular de Na^+ , que estimula o trocador de NCX a extrair o Na^+ excessivo em troca de íons Ca^{2+} . O *overload* de Ca^{2+} e a diminuição dos níveis de ADP e Pi secundários à inibição da bomba NKA podem provocar disfunção mitocondrial e liberação de citocromo C. A cascata de apoptose é então ativada, causando a morte celular. O extenso dano mitocondrial pode ainda provocar liberação de ROS e agravar as lesões cardíacas (Ramirez-Ortega et al., 2007). A análise da peroxidação lipídica e produção das ROS será apresentada a seguir.

As amostras de tecido renal submetidas à análise de varredura (Figura 20) não revelaram alterações estruturais no grupo CON e OUA, com preservação das estruturas vasculares, glomerulares e tubulares. No grupo DIG foi possível identificar alterações morfológicas em eritrócitos compatíveis com equinócitos. No grupo OLE é possível observar apenas um aumento discreto da matriz extracelular.

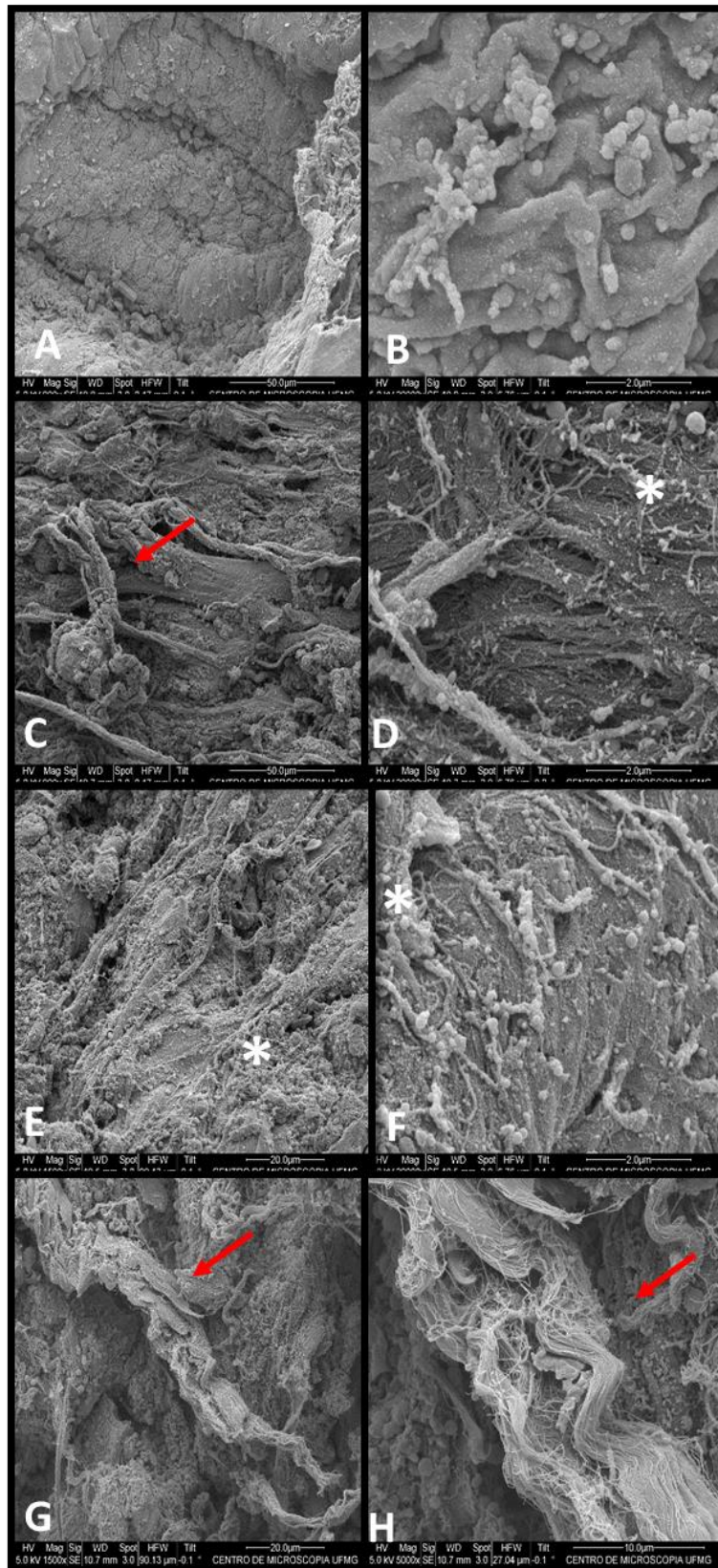


Figura 19. Micrografia eletrônica de varredura de miocárdio de ratos Wistar controle (CON) (A, B) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG) (C,D), ouabaína (OUA) (E,F) e oleandrina (OLE) (G,H). A ultraestrutura do coração de animais CON mostrou fibras cardíacas intactas, alinhadas e sem alterações (A,B). Amostras do grupo DIG (C,D) revelou aumento da matriz extracelular adjacente às fibras cardíacas (asterisco branco) e discreta desorganização de cardiomiócitos (seta vermelha). O grupo OUA (E,F) expressou aumento moderado da matriz extracelular (asterisco branco) com preservação do alinhamento de cardiomiócitos. Já o grupo OLE (G,H) apresentou grave dissociação, encurtamento e ruptura das fibras cardíacas (seta vermelha).

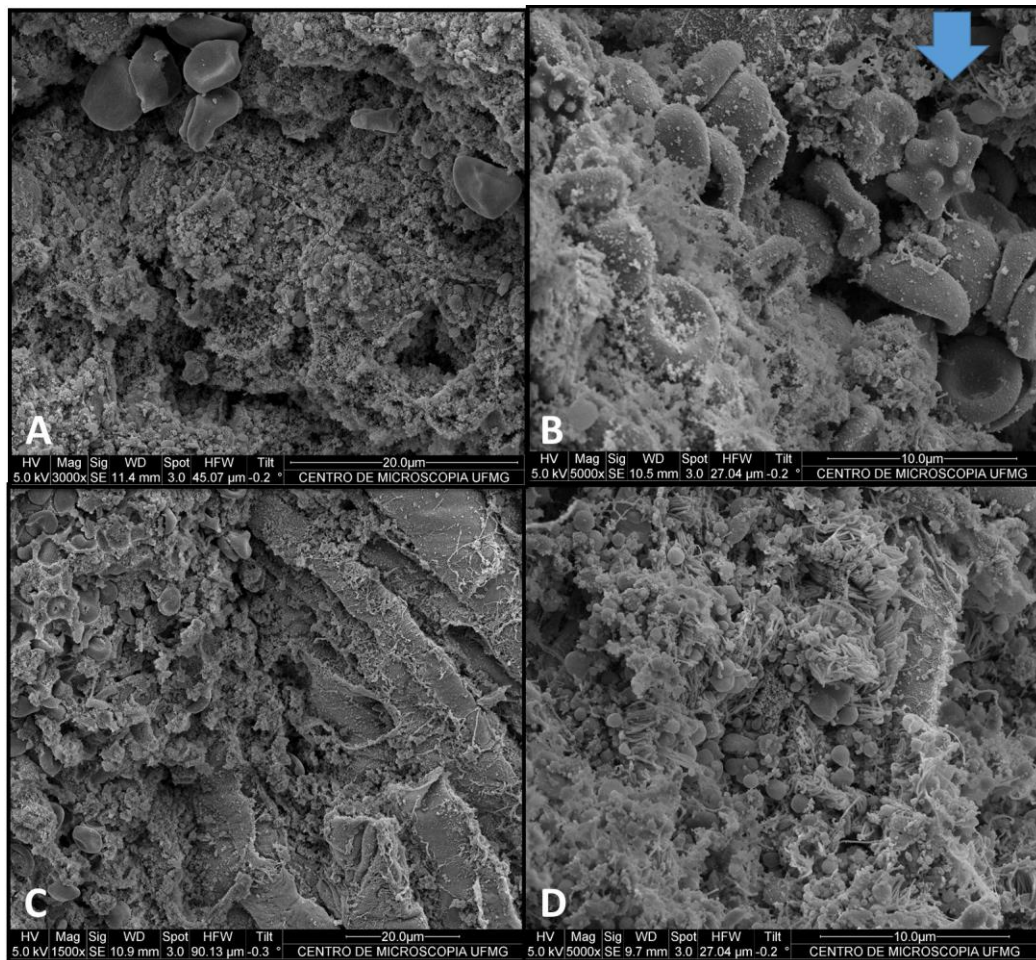


Figura 20. Micrografia eletrônica de varredura do tecido renal de ratos Wistar controle (CON) (A) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG) (B), ouabaína (OUA) (C) e oleandrina (OLE) (D). A ultraestrutura dos rins de animais dos grupos CON e OUA não revelou alterações importantes (A,C), com preservação das estruturas vasculares, glomerulares e tubulares. No grupo DIG foi possível identificar alterações morfológicas em eritrócitos compatíveis com equinócitos (seta azul). No grupo OLE é possível observar apenas um aumento da matriz extracelular.

A ausência de lesões renais na microscopia de varredura pode estar associada às limitações da técnica quanto à de visualização das estruturas renais. Os cortes realizados permitiram a observação externa de capilares, podócitos e células tubulares de áreas restritas.

Não foram vistos sinais de degeneração e necrose dos tecidos ou deposição de imunocomplexos perivasculares/glomerulares. Esse é o primeiro estudo em que amostras de tecido renal de animais submetidos ao tratamento com GCs são avaliadas pela microscopia de varredura. Sabe-se que essa é uma importante técnica para o diagnóstico de patologias renais, com alta especificidade e sensibilidade, determinante para a identificação de lesões precoces e estadiamento da doença renal crônica (Pearson et al., 1994; Sementilli et al., 2004).

No grupo DIG foi possível identificar equinócitos, caracterizados como eritrócitos formados por inúmeras espículas bem distribuídas e projeções relativamente uniformes em tamanho e forma (Thrall et al., 2007). Essa alteração morfológica é descrita em pacientes com doença renal crônica, neoplasias e no caso de envenenamento por serpentes do gênero *Crotalus* (Brown et al., 1994; Walton et al., 1997; Thrall et al., 2007). Geralmente está associada a defeitos na composição lipídica ou protéica dos eritrócitos e também já foi descrita em casos de depleção intracelular de ATP (Backman et al., 1998; Jacob et al., 1973), aumento de pH e do Ca^{2+} intracelular (Smith, 1987). Acredita-se que o aumento intracelular de Ca^{2+} promova a ativação de calpaínas responsáveis pela degradação de proteínas estruturais de membrana contribuindo para alterações morfológicas em eritrócitos (Cohen e Gascard, 1992).

Esse achado correlaciona com as alterações hematológicas observadas anteriormente. Os grupos tratados apresentaram diminuição no volume globular médio e hemoglobina corpuscular média (Figura 8), o que também indica alteração morfológica nas hemácias. Os GCs podem se ligar à bomba NKA na membrana dos eritrócitos e promover citotoxicidade por meio das alterações eletrolíticas subsequentes. As mudanças nos níveis de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} podem contribuir para a alteração da estrutura das células sanguíneas, especialmente com a formação de equinócitos (Cohen e Gascard, 1992; Hallbook et al., 2011; Xu et al., 2016).

Expressão proteica da troponina I e BNP no tecido cardíaco

As análises da troponina I e BNP são apresentadas na Figura 21. Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de troponina dos grupos estudados. A troponina como discutido anteriormente, especialmente sua isoforma cTnI, e o BNP são excelentes biomarcadores de lesões cardíacas agudas e da progressão da IC crônica. Segundo Maisel e colaboradores (2018) pacientes assintomáticos com IC podem apresentar alta liberação de peptídeos natriuréticos e baixa liberação de troponina. Após o diagnóstico de alterações estruturais no sistema cardiovascular, os níveis de troponina podem cair em detrimento do aumento dos peptídeos natriuréticos e outros biomarcadores como o fator de crescimento e diferenciação 15 (GDF-15) e Galectina -3.

É possível observar aumento do BNP nos grupos OLE e OUA, em comparação com o grupo DIG. No presente estudo foram visualizadas importantes alterações estruturais no músculo cardíaco, vistas pela microscopia óptica e eletrônica, o que pode implicar em liberação de BNP não acompanhada do aumento da cTnI. A manutenção dos níveis séricos de cTnI também corroboram com os achados dos biomarcadores teciduais. Tanto no músculo cardíaco quanto no soro dos animais que receberam os GCs não foi possível observar aumento significativo dessa proteína aqui estudada.

Os peptídeos natriuréticos são importantes biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico da IC e podem estar aumentados em casos de remodelamento cardíaco, arritmias graves e intoxicação por digoxina. O BNP é o metabólito ativo produzido a partir da clivagem proteolítica do pro-hormônio pro-BNP. Ambos são secretados diretamente pelo ventrículo esquerdo em resposta ao estresse diastólico na parede do coração por meio de aumento da pressão e volume locais. O BNP atua como um hormônio vasoativo envolvido no controle da homeostase, vasodilatação e remodelamento cardíaco (Heinrich et al., 2005; Ponikowski et al.,

2016; Maisel et al., 2018). Os resultados sugerem que a oleandrina e ouabaína podem apresentar maiores níveis de remodelamento cardíaco que a digoxina.

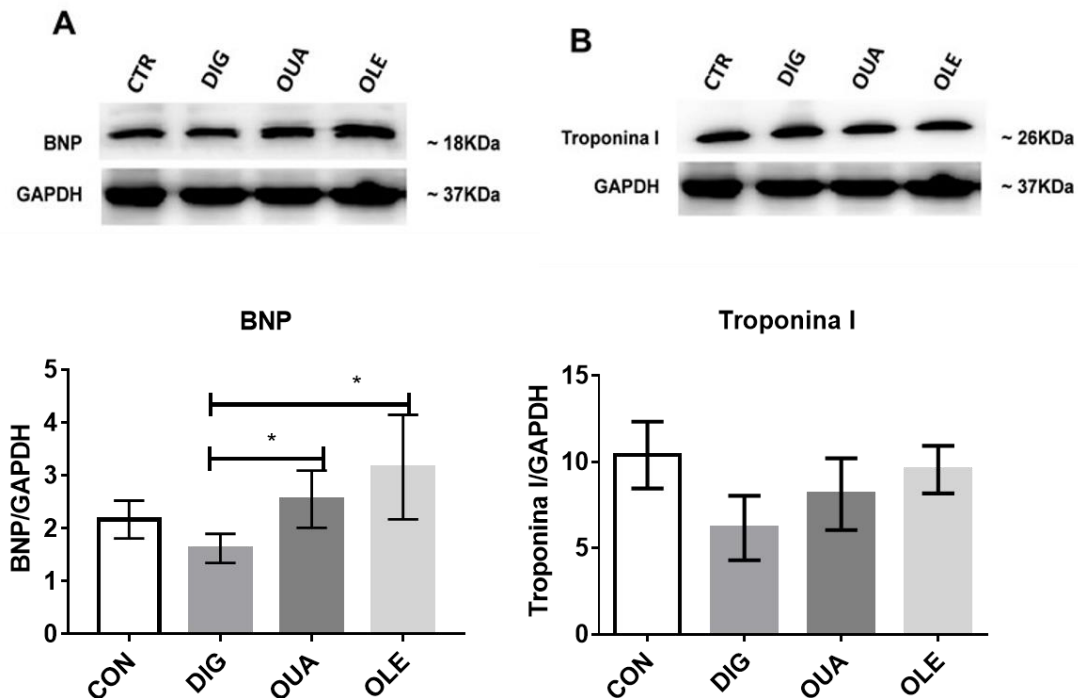


Figura 21. Valores médios e desvio padrão dos biomarcadores teciduais cardíacos: peptídeo natriurético cerebral (BNP) (A) e troponina I (cTnI) (B) obtidos de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) e oleandrina (OLE). Dados não paramétricos foram avaliados por Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre os grupos tratados ($p < 0,05$).

Expressão proteica das isoformas alfa-1 e alfa-2 da bomba NKA

A expressão das isoformas alfa-1 e alfa-2 da bomba NKA é observada na Figura 22. Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos quanto à expressão das isoformas alfa-1 e a relação entre as isoformas. A expressão da alfa-1 foi superior em todos os grupos estudados, apresentando valores significativamente superiores à alfa-2.

A isoforma alfa-1 é cerca de 10 vezes mais presente no tecido que a alfa-2, como reportado por Lev et al. (2015). Segundo os mesmos autores, uma forma indireta de estimar a atividade da bomba NKA é pela sua expressão. Acredita-se que o grau de internalização das isoformas reflete diretamente a afinidade dos GCs, correlacionando com o grau de ocupação dos sítios de ligação. Dessa forma a menor expressão de determinada isoforma de NKA determina que essa proteína é mais fortemente inibida pelo GC (Lev et al., 2015). No entanto, essas considerações se baseiam em experimentos *in vitro* com células humanas originárias de outros tecidos e aplicações crescentes de digoxina e ouabaína. Considerando as limitações dessa afirmação, a interpretação quanto à expressão da NKA no tecido cardíaco deve ser cuidadosa. A relação entre a expressão da bomba e sua atividade, medida especificamente pela sua corrente, ainda não foi determinada.

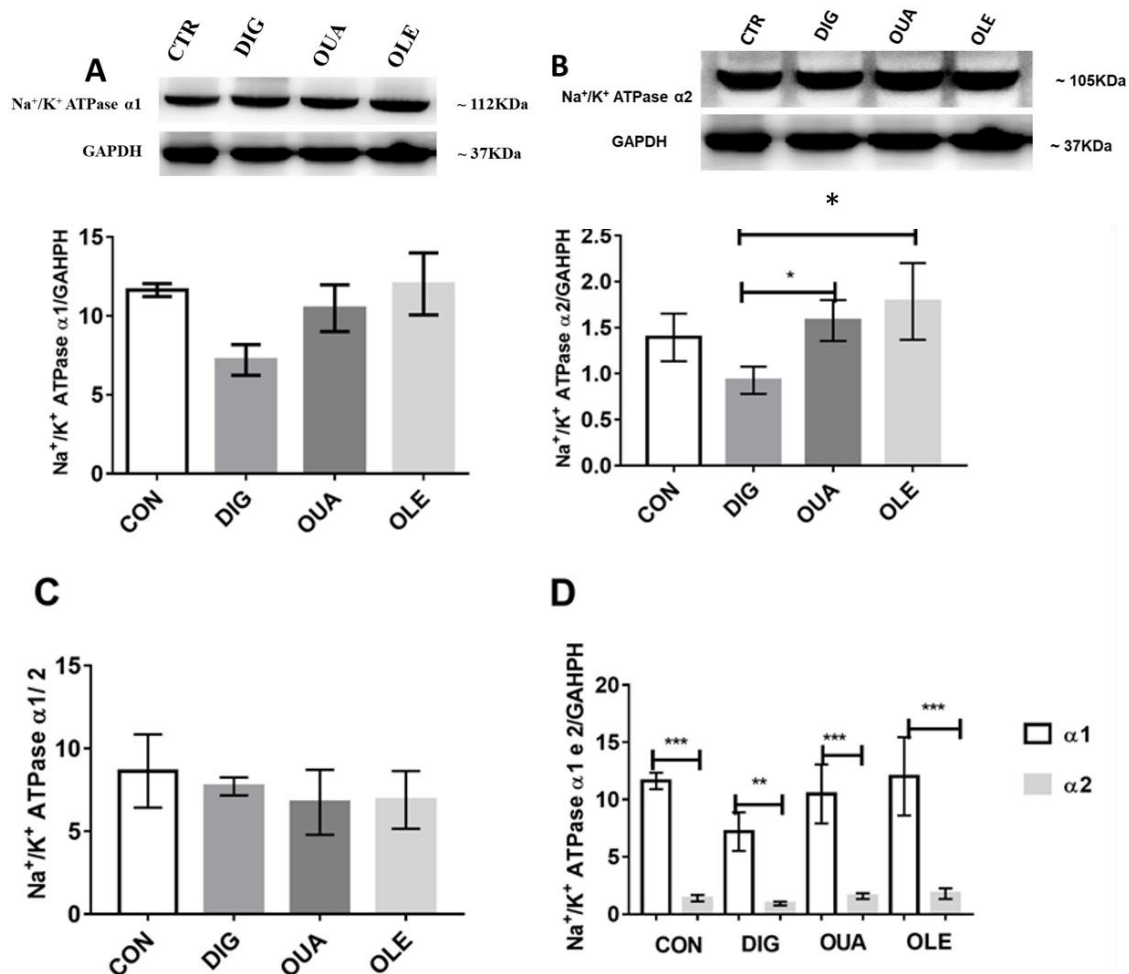


Figura 22. Análise da expressão das isoformas alfa-1 e alfa-2 da bomba de sódio e potássio (NKA) por meio de análise de *Western blot* de amostras do coração de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaína (OUA) (C) e oleandrina (OLE). Os tratamentos não alteraram os níveis de da isoforma alfa-1 (A) e alfa-2 (B). A expressão da isoforma alfa-1 foi significativamente maior em todos os grupos estudados em relação à alfa-2 (C). A avaliação relativa entre as isoformas alfa-1/alfa-2 também não revelou diferenças significativas entre os tratamentos (D). Dados não paramétricos foram avaliados por Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre os grupos. *Diferença significativa entre os grupos tratados ($p < 0,05$); **Diferença significativa entre os grupos tratados ($p < 0,01$); ***Diferença significativa entre os grupos tratados ($p < 0,001$).

Os grupos OUA e OLE apresentam maiores expressões da alfa-2 em comparação com o grupo DIG. Os estudos sobre a ação dos GCs avançaram nos últimos anos e indicam que em cardiomiócitos a isoforma alfa-2 é mais sensível aos GCs que a alfa-1 (Katz et al., 2010). Esse é um achado importante, pois a subunidade alfa-2 está presente em maior densidade nos túbulos T (Despa e Bers, 2007; Berry et al., 2007), assim a interação entre a NKA e o NCX nesse local ocorre em microdomínios de membrana (Golovina et al., 2003; Song et al., 2006). A ligação preferencial dos GCs com cerca de 25% do total de bombas, que representam 50% do número de bombas presentes nos túbulos T, é capaz de aumentar a corrente de Ca^{2+} e contração celular (Berry et al., 2007). Acredita-se ainda que a atuação da isoforma alfa-2 é voltagem dependente.

Dessa forma a ligação com os GCs só aumentará os níveis intracelulares de Na^+ e Ca^{2+} durante a despolarização (controlada pela alfa 2), mas não em repouso (dependente da alfa-1); o que representa uma maior segurança em sua atuação com menores chances de causarem arritmias (Stanley et al., 2015).

Para que seja possível afirmar que os GCs aqui estudados modulam a atividade da bomba NKA são necessários mais estudos, especialmente quanto à sua corrente. No entanto, existe uma diferença na expressão das isoformas aqui avaliadas, corroborada pelos achados já apresentados e pela produção de ROS, discutidas a seguir, o que implica em provável diferença de afinidade entre a digoxina, ouabaína e oleandrina no tecido cardíaco.

Atividade oxidativa dos glicosídeos cardioativos

As análises de estresse oxidativo (níveis de peroxidação lipídica- TBARs) e atividade das principais enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) estão apresentadas na Figura 23. A enzima superóxido dismutase (SOD) apresentou aumento significativo de sua atividade enzimática nos grupos DIG e OLE e discreta redução não significativa no grupo OUA. Os tratamentos com GCs não alteraram a atividade enzimática da GPx. No entanto, houve aumento da atividade enzimática da CAT nos três grupos tratados, especialmente nos animais que receberam DIG e OUA.

A SOD, CAT e GPX constituem o principal sistema de defesa antioxidante enzimático do organismo. A SOD, considerada a primeira linha de defesa contra o ânion superóxido, é responsável por sua dismutação e pela formação de peróxido de hidrogênio; enquanto a CAT e GPx atuam de forma similar decompondo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Molina e Garcia, 1997; Fang et al., 2002; Urso et al., 2003; Valko et al., 2007; Reuter et al.; 2010). Os resultados indicam que os GCs alteram o sistema antioxidante do coração, evitando assim o aumento do estresse oxidativo nesses grupos.

Estresse oxidativo é um termo empregado em situações em que espécies contendo radicais livres causam dano tecidual, por meio de alterações no DNA, membranas, degeneração de tecidos, envelhecimento prematuro e apoptose. Isso ocorre quando os sistemas antioxidantes são superados pelos sistemas próoxidantes, geradores das ROS, de forma que as defesas enzimáticas e não enzimáticas não são suficientes para neutralizar e detoxicar os níveis elevados de ROS (Matés e Sanchez-Jimenez, 2000; Leornarduzzi et al., 2010; Reuter et al.; 2010; Kryston et al., 2011).

Uma das principais consequências do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, que constitui uma série de complexas reações bioquímicas que atinge ácidos graxos poli-insaturados, culminando na degradação de macromoléculas (Ahmad, 1995).

A digoxina provocou o aumento do ânion superóxido, refletido na maior atividade enzimática da SOD. Essa enzima desencadeia a formação de peróxido de hidrogênio, que por sua vez é metabolizado pela via da CAT e GPx. Nesse caso, apenas a CAT foi suficiente para neutralizar e detoxicar o peróxido de hidrogênio, sem que fosse necessário o aumento da atividade da GPx. A atuação de ambas as vias antioxidantes, SOD e CAT, foi então suficiente para neutralizar os ROS produzidos de forma a não afetar a membrana plasmática e causar a peroxidação lipídica.

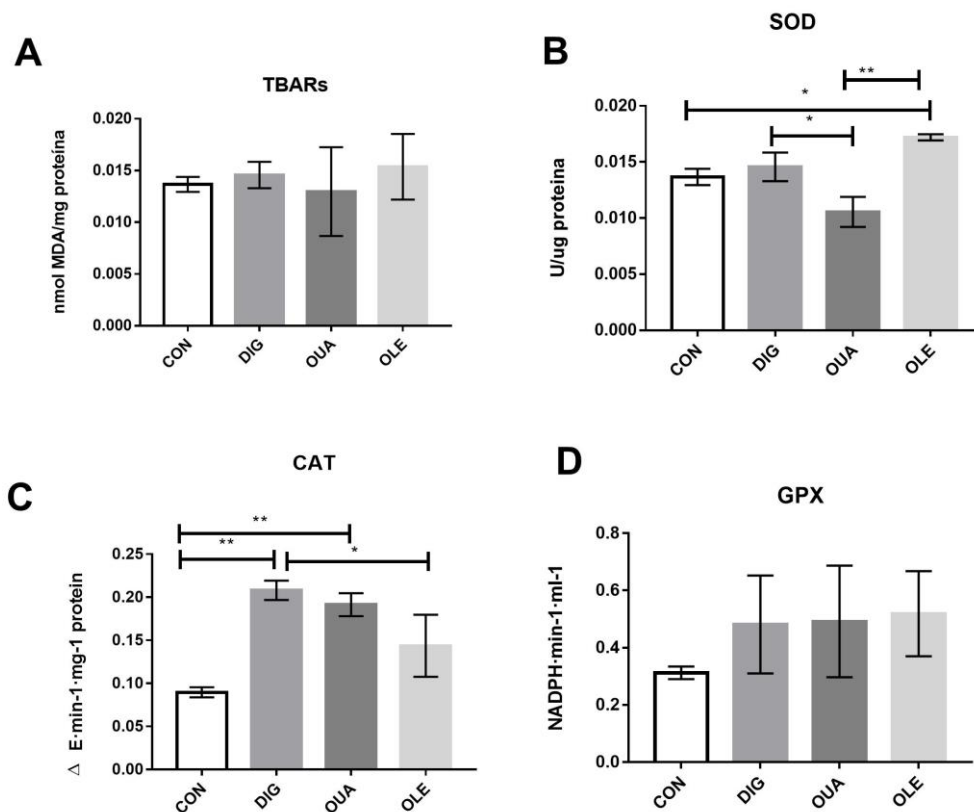


Figura 23. Análise de estresse oxidativo (níveis de peroxidação lipídica – TBARs) e atividade das principais enzimas antioxidantes - SOD, CAT e GPx - no tecido cardíaco de ratos Wistar controle (CON) e tratados por 21 dias com GCs com digoxina (DIG), ouabaina (OUA) (C) e oleandrina (OLE). Os tratamentos não alteraram os níveis de TBARs (A). A SOD apresentou aumento significativo de sua atividade enzimática nos grupos DIG e OLE, em relação ao controle e OUA (B). A atividade enzimática da CAT encontra-se aumentada em todos os tratamentos, com diferença significativa nos grupos DIG e OUA em relação ao controle (C). Os tratamentos não alteraram a atividade enzimática da GPx (D). Dados paramétricos foram avaliados por ANOVA e pós teste de Tukey ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre os grupos.

A oleandrina aumentou de forma significativa a atividade enzimática da SOD, correlacionando assim com maior produção de ânion superóxido, sem no entanto alterar a atividade da CAT, GPx e os níveis de TBARs em comparação com o grupo CON. A ausência da peroxidação lipídica nesse caso indica que o peróxido de hidrogênio formado pela atuação da oleandrina é provavelmente neutralizado por outra via, que não inclui a CAT e GPx.

Já a ouabaina causou apenas aumento da atividade enzimática da CAT. Isso indica que o peróxido de hidrogênio está aumentando, por outra via independente da SOD, também sem induzir a peroxidação lipídica, como comprovado pelos níveis de TBARs.

É possível observar que nenhum tratamento causou alterações nos níveis de TBARs. TBARS é uma sigla do inglês *Thiobarbituric Acid-reactive Substances* que determina a presença da peroxidação lipídica pela reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (MDA), um dos principais produtos finais do processo de oxidação e decomposição de ácidos

graxos poliinsaturados de membrana. Sua detecção nos tecidos é um forte indicativo de estresse oxidativo (Buege e Aust, 1978).

É possível afirmar que a digoxina afeta a atividade enzimática da SOD e CAT, enquanto a oleandrina afeta de forma mais relevante a atividade enzimática da SOD e a ouabaína a CAT. Os resultados sugerem a maior produção de ROS; especificamente a oleandrina induz maior produção de ânion superóxido, enquanto a ouabaína produz peróxido de hidrogênio e a digoxina ambas as espécies.

A produção dos ROS induzida pelos GCs pode estar relacionada com o desbalanço eletrolítico causado pela inibição da NKA, com consequente *overload* de Ca^{2+} e alteração na atividade mitocondrial como descrito previamente (Camello-Almaraz et al., 2006; Chen e Zweier, 2014). O bloqueio da bomba NKA no coração promove aumento do Na^+ intracelular, que é extrusado a favor do seu gradiente de concentração pelo NCX em troca de íons Ca^{2+} . O excesso de Ca^{2+} no citosol pode afetar a maquinaria contrátil do coração e as mitocôndrias, especialmente no microambiente formado em regiões de túbulos T, contendo bomba NKA, NCX, canais de Ca^{2+} *L-type*, receptores de rianodina, SERCA e retículo sarcoplasmático. O excesso de Ca^{2+} é controlado pelos estoques intracelulares e diferentes proteínas são responsáveis por sua recaptação e extrusão, principalmente no retículo sarcoplasmático e mitocôndria. A última é especialmente sensível ao excesso de Ca^{2+} , que entra na organela por meio do uniporter de Ca^{2+} e pelo trocador NCX mitocondrial. O aumento da concentração desse íon pode ativar uma série de vias metabólicas que culminam na formação de ROS.

Sabe-se que a maior parte das ROS são produzidas nas mitocôndrias durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória. Alterações no fluxo de elétrons acarreta um aumento da redução do oxigênio molecular a ânion superóxido, principalmente nos complexos I e III da cadeia respiratória. Uma série de reações consecutivas culmina com a produção de outras ROS, como o peróxido de hidrogênio de radical hidroxil (Leornarduzzi et al., 2010; Tahara et al., 2009). O excesso de ROS é implicado na patofisiologia da insuficiência cardíaca e tem papel crucial na progressão de disfunções cardiovasculares, por meio de ativação de vias de sinalização (Santos et al., 2011; Xu et al., 2017).

O aumento da produção de ROS mitocondrial leva a disfunções da própria organela e consequente diminuição da sua atividade, que inclui a fosforilação oxidativa. Com isso, há diminuição na produção de ATP, incremento do estresse oxidativo, desbalanço na homeostase iônica, principalmente do Ca^{2+} e desenvolvimento de alterações estruturais cardíacas, que podem levar à morte celular (Dey et al., 2010; Diogo et al., 2013).

Os danos causados pelo estresse oxidativo a longo prazo são bem caracterizados em diferentes modelos de IC (Sawyer, 2011; Tsutsui et al., 2011; Hafstad et al., 2013). Os achados aqui apresentados de bioquímica sérica, histologia e microscopia eletrônica são compatíveis com lesões causadas pelo aumento das ROS. Esse aumento no entanto não provocou peroxidação lipídica, consequência direta do acúmulo de ROS, quando esse supera a atividade dos sistemas antioxidantes. A partir dos resultados aqui apresentados é possível afirmar que a digoxina, ouabaína e oleandrina promovem aumento das ROS nos cardiomiócitos.

Conclusões

Os resultados aqui apresentados sugerem valores de referência para os parâmetros cardiovasculares de ratos Wistar submetidos à anestesia com isoflurano. A melhor fórmula de correção do intervalo QT nesse modelo é a fórmula de Hodges, comprovada pelos achados subsequentes.

A análise comparativa entre a digoxina, ouabaína e oleandrina revelou importantes diferenças quanto à sua ação no sistema cardiovascular. A dose utilizada no presente experimento, 50µg/kg, administrada por 21 dias não causou arritmias nos animais, o que permitiu a observação dos efeitos cardiovasculares das substâncias estudadas.

Os GCs alteraram a série vermelha do hemograma, o que foi comprovado pela presença de equinócitos observados pela microscopia de varredura, sem no entanto alterar o número total e diferencial de leucócitos.

Os animais que receberam oleandrina apresentaram lesões cardíacas mais graves observadas pela maior atividade sérica de LDH, aumento relativo da CK-MB, necrose focal moderada de cardiomiócitos visto na microscopia óptica; ruptura, encurtamento e desorganização das fibras cardíacas como observado na microscopia eletrônica de varredura.

O aumento relativo da creatinina foi observado nos três grupos tratados. Análise histológica e ultraestrutural indicaram que os GCs afetam os rins, em especial a oleandrina promovendo necrose tubular aguda. Do ponto de vista clínico o quadro pode ser classificado como estágio inicial de doença renal; no entanto não foram vistos achados patológicos extrarrenais compatíveis com quadros graves.

A troponina I não foi alterada pelos GCs, mas os grupos que receberam ouabaína e oleandrina apresentaram valores de BNP superiores ao grupo que recebeu digoxina. Esse achado indica um potencial remodelamento cardíaco induzido pela OUA e OLE.

A expressão da isoforma alfa-1 também não apresentou diferença significativa entre os grupos, sendo a isoforma alfa-1 a mais expressa em todos os animais estudados. Apesar disso, as maiores médias da alfa-2 foram encontradas nos animais dos grupos OLE e OUA em comparação com o grupo DIG, o que sugere uma possível diferença na modulação da expressão e atividade dos GCs na bomba NKA de cardiomiócitos de ratos.

Todos os GCs afetaram a produção de ROS, sem no entanto causar peroxidação lipídica, por meio da ativação de diferentes vias anti-oxidantes. Esse achado pode estar relacionado com a inibição da bomba NKA e a provável diferença de afinidade entre a digoxina, ouabaína e oleandrina.

Considerações finais

Os glicosídeos cardioativos são substâncias amplamente encontradas na natureza e utilizadas para o tratamento de insuficiência cardíaca há séculos. A digoxina é o fármaco comercial mais comumente utilizado dessa classe, no entanto sua curta margem de segurança e alto potencial tóxico limitam seu emprego. Com isso a avaliação do potencial cardioativo de outras substâncias se faz importante. Os objetivos aqui apresentados foram alcançados, uma vez que foram demonstradas diferenças entre a ação dos GCs: digoxina, ouabaína e oleandrina, sem a pretensão de extinguir toda dúvida a cerca de seus mecanismos de ação, mas com o intuito principal de trazer novas informações, relevantes ao estudo clínico-toxicológico dessas substâncias, levantando questionamentos que devem ser futuramente investigados.

Com base na atividade já conhecida da digoxina, foi estabelecida uma posologia segura (50µg/kg a cada 24h, por via subcutânea durante 21 dias), capaz de promover atividade antiarrítmica sem causar danos graves ao coração, de forma a permitir a avaliação do potencial das substâncias alvo.

O ECG foi a ferramenta inicial utilizada para estimar as alterações elétricas no coração de ratos Wistar após a administração dos GCs. Não foram observadas arritmias, mas a redução do intervalo QT observada em todos os grupos sugere alterações na eletrofisiologia celular possivelmente causadas pela inibição da bomba de sódio e potássio (NKA) do coração; visto que esse é o mecanismo de ação dos cardenolídeos.

A administração de oleandrina causou maior remodelamento eletromecânico do coração, comprovado pela maior atividade sérica de LDH, aumento relativo da CK-MB, necrose de cardiomiócitos visto na microscopia óptica e maiores valores médios de BNP.

Para tentar elucidar a origem das diferenças entre os GCs foram estudadas a expressão das isoformas alfa-1 e alfa-2 da NKA e produção de espécies reativas de oxigênio. Os grupos que receberam oleandrina e ouabaína apresentaram maior expressão média da isoforma alfa-2 em comparação com os animais que receberam digoxina, o que sugere uma possível diferença na modulação da expressão e atividade dos GCs na bomba NKA de cardiomiócitos de ratos.

Todos os GCs afetaram a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), sem no entanto causar peroxidação lipídica, por meio da ativação de diferentes vias antioxidantes. A produção das ROS pode estar associada às lesões microscópicas e ultraestruturais observadas.

Conclui-se que os GCs aqui estudados provocam danos cardiorrenais, com importantes diferenças na expressão da isoforma alfa-2 da NKA, produção de ROS e danos teciduais variáveis que sugerem diferenças entre a atuação da digoxina, ouabaína, assim como prováveis diferenças quanto á afinidade e inibição da bomba NKA.

Referências bibliográficas

- ADAMS J.R., K.F.; BUTLER, J.; PATTERSON, J.H. et al. Dose response characterizations of the association of serum digoxin concentration with mortality outcomes in the Digitalis Investigation Group trial. *Eur. J. Heart Fail.*, v.18, p.1072-1081, 2016. doi: 10.1002/ehf.584.
- AHMAD, S. Oxidative stress and antioxidant defenses in biology, New York: Chapman e Hall, 1995.
- 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, 2007.
- AMBROSY, A.P.; PANG, P.S.; GHEORGHIAD, M. Digoxin for worsening chronic heart failure: underutilized and underrated. *JACC Heart Fail.*, v. 4, p. 365-367, 2016. doi: 10.1016/j.jchf.2016.03.005.
- ANDERSEN, K.E.; DAMSGAARD, T. The effect on serum enzymes of intramuscular injections of digoxin, bumetanide, pentazocine and isotonic sodium chloride. *Acta Med. Scand.*, v.199, p.317-319, 1976.
- ANDRAG, E.; CUTIS, M.J. Feasibility of targeting ischemia-related ventricular arrhythmias by mimicry of endogenous protection by endocannabinoids. *Br. J. Pharmacol.*, v.169, p.1840-1848, 2013. doi: 10.1111/bph.12252.
- ARONSEN, J.N.; SWIFT, F.; SEJERSTED, O.M. Cardiac sodium transport and excitation-contraction coupling. *JMCC.* v.61, p. 11-19, 2013.
- BACKMAN, L.; JONASSON, J.B.; HORSTEDT, P. Phosphoinositide metabolism and shape control in sheep red blood cells. *Mol. Membr. Biol.*, v.15, p.27-32, 1998.
- BAI, Y.; MORGAN, E.E.; GIOVANNUCCI, D.R. et al. Different roles of the cardiac Na/Ca exchangers in ouabain induced inotropy, cell signaling, and hypertrophy. *Am. J. Heart Circ. Physiol.*, v.304, p. 427-425, 2013. doi: 10.1152/ajpheart.00462.2012
- BALZAN, S.; D'URSO, G.; GHIONE, S. et al. Selective inhibition of human erythrocyte Na⁺/K⁺ ATPase by cardiac glycosides and by a mammalian digitalis like factor. *Life Sci.*, v.67, p.1921-1928, 2000.
- BANDARA, V.; WEINSTEIN, S. A. et al. A review of the natural history, toxicology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. *Toxicon*, v.56, p. 273-281, 2010. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.03.026.
- 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.
- BARRETO, T.O. *Avaliação do estresse oxidativo nos tecidos cardíaco, hepático, esquelético e renal na deficiência em tiamina*. Dissertação Programa de Pós Graduação em Biologia Celular, ICB, UFMG, 76p. 2012.
- 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. doi: 10.1155/2012/947187.
- BASLAIB, F.; ALKAABI, S.; YAN, A.T. et al. QRS prolongation in patients with acute coronary syndromes. *Am. Heart J.*, v.159, p.593-598, 2010. doi: 10.1016/j.ahj.2010.01.007.
- BASSINGTHWAIGHTE, J.B.; FRU, C.H.; MCGUIGAN, J.A.S. Relationship between internal calcium and outward current in mammalian ventricular muscle; a mechanism for the control of the action potential duration? *J. Physiol.*, v.262, p.15-37, 1976.
- BAZETT, H.C. An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Heart*, 7, 353-370, 1920.

- BERRY, R.G.; DESPA, S.; SHATTOCK, M.J. Differential distribution and regulation of mouse cardiac Na⁺/K⁺-ATPase alpha1 and alpha2 subunits in T-tubule and surface sarcolemmal membranes. *Cardiovasc. Res.* 73:92–100, 2007.
- BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, v. 10, p. 198-205, 2002. doi :10.1038/415198a.
- BERS, D.M.; DESPA, S. Cardiac myocytes Ca²⁺ and Na⁺ regulation in normal and failing hearts. *J. Pharmacol. Sci.*, v. 100, p. 315-322, 2006.
- BLAUSTEIN, M.P.; ZHANG, J.; CHEN, L. et al. The Pump, the Exchanger and Endogenous Ouabain: Signaling Mechanisms that Link Salt Retention to Hypertension. *Hypertension*, v.53, p.291-298, 2009.
- BOCCHI, E.A.; BRAGA, F.G.M.; BACAL, F. et al. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.98, p.1-33, 2012.
- BOTELHO, A.F.M. *Alterações cardiovasculares induzidas pelo extrato de Nerium oleander*. Dissertação Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária, UFMG, 95p. 2015.
- BOTELHO, A.F.M., OLIVEIRA, M.S., SOTO-BLANCO, B., MELO, M.M. Computerized electrocardiography in healthy conscious guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Pesq. Vet. Bras.*, 36, 1203-1208, 2016.
- BOTELHO, A.F.M.; OLIVEIRA, M.S.; SOTO-BLANCO, B.; MELO, M.M. Retrospective study of pre-anesthetic electrocardiogram examination of 700 dogs conducted at the Veterinary Hospital of UFMG (2013-2014). *Pesq. Vet. Bras.*, v. 36, p.90-93, 2016. doi: 10.1590/S0100-736X2016000200005.
- BOTELHO, A.F.M.; SANTOS-MIRANDA, A.; JOCA, H.C. et al. Hydroalcoholic extract from *Nerium oleander* L. (Apocynaceae) elicits arrhythmogenic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.206, p.170-177, 2017.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, v.7, p.248-254, 1976. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- BRAGA, F.C.; KREIS, W.; RÉCIO, R.A.; DE OLIVEIRA, A.B. Avaliação quantitativa de cardenólídeos no cultivar experimental de *Digitalis lanata* do maciço do Itatiaia e perspectivas de seu emprego industrial. *Quim. Nova*, v.20, n.5, p.481-485, 1997.
- 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, 1093-1097. doi: 10.1135/hrt.2006.102319.
- BROWN, D.E.; MEYER, D.J.; WINGFIELD, E.E. et al. Echinocytosis associated with rattlesnake envenomation in dogs. *Vet. Pathol.*, v.34, p.654-7, 1994.
- BROWN, L.; THOMAS, R.; WATSON, T. Cardiac glycosides with non-rotting steroid to sugar linkages: tools for the study of digitalis structure-activity relationships. *Arch. Pharmacol.*, v.332, p.98-102, 1986.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, v.52, p.302-310, 1978.
- BUGGER, H.; ABEL, E.D. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. *Dis. Model. Mech.*, 2:454-466, 2009. doi: 10.1242/dmm.001941.
- BUSCHMANN, G.; SCHUMACHER, W.; BUDDEN, R. et al. Evaluation of the effect of dopamine and other catecholamines on the electrocardiogram and blood pressure of rats by means of on-line biosignal processing. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2:777-795, 1980.
- 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. doi: 10.1055/s-0032-1328715.

CAMACHO, A.A.; PAULINO, J.R.D.; PASCONI, J.P.E.; TEIXEIRA, A.A.A. Comparison between conventional and computerized electrocardiography in cats. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* 62:765-769, 2010.

CAMELLO-ALMARAZ, C.; GOMEZ-PINILLA, P.J.; POZO, M.J.; CAMELO, P.J. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v.291, p.1082-8, 2006.

CAMPHAUSEN, C.; HASS, N.A.; MATTHE, 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. doi: 10.1007/s00392-005-0293-3.

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

CASSELLS, B.K. Analysis of a maasai arrow poison. *J. Ethnopharmacol.*, v.14, p.273-281, 1985.

CASTRO, M.G.; VEADO, J.C.C.; SILVA, E.F.; ARAÚJO, R.B. Estudo retrospectivo ecodopplercardiográfico das principais cardiopatias diagnosticadas em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n5, p. 1238-1241, 2009.

CFMV. *Guia de boas práticas para eutanásia em animais*. Brasília, DF, 35p., 2013.

CHAGAS, E. Contribuição ao estudo do mecanismo de morte do coração pela ouabaína. *Memórias do Instituto Evandro Chagas*, v.27, 2, 1932.

CHAMARIA, S.; DESAI, A.M.; REDDY, R.C. et al. Digoxin Use to Control Ventricular Rate in Patients with Atrial Fibrillation and Heart Failure Is Not Associated with Increased Mortality. *Cardiol. Res. Pract.*, 2015. doi: 10.1155/2015/314041.

CHAN, B.S.; BUCKLEY, N.A. Digoxin-specific antibody fragments in the treatment of digoxin toxicity. *Clin. Toxicol. (Phila)*, v.52, p.824-836, 2014. doi: 10.3109/15563650.2014.943907.

CHEN, Y.R.; ZWEIER, J.L. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ. Res.*, v.114, p.524-537, 2014.

CHENG, T.O. Digitalis administration: an underappreciated but common cause of short QT interval. *Circulation*, v.109, e152, 2004. doi: 10.1161/01.CIR.0000118177.56908.5B.

CHIRINOS, J.A.; CASTRELLON, A.; ZAMBRANO, J.P. et al. Digoxin use is associated with increased platelet and endothelial cell activation in patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Heart Rhythm.*, v.2, p.525-529, 2005.

CHU, V.; OTERO, J.M.; LOPEZ, O. et al. Method for non-invasively recording electrocardiograms in conscious mice. *BMC Physiol.* V.1:6, 2001.

COHEN, C.M.; GASCARD, P. Regulation and post-translational modification of erythrocyte membrane and membrane-skeletal proteins. *Semin. Hematol.* v.29 , p.244-292, 1992.

CORDÓVA, W.H.P.; LEITÃO, S.G.; CUNHA-FILHO, G. et al. Bufodienolides from parotoid gland secretions of Cuban toad *Peltophyryne fustiger* (Bufonidae): Inhibition of human kidney Na/K-ATPase activity. *Toxicon*, v.110, p.27-34, 2016. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.11.015.

CORNELIUS, F.; KANAI, R.; TOYOSHIMA, C. A structural view of the functional importance of the sugar moiety and steroid hydroxyls of cardiotonic steroids in binding to Na, K-ATPase. *J. Biol. Chem.*, v.288, p.6602-6615, 2013.

COSTA, E.C., GONÇALVES, A.A., AREAS, M.A.; MORGABEL, R.G. Effects of metformin on QT and QTc interval dispersion of diabetic rats. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, 90:232-238, 2008.

CRITICAL CARE. *Acute kidney injury network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury*. v.11, n.2, p.1-23, R31, 2007.

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

D'URSO, G.; FRASCARELLI, S.; BALZAN, S. et al. Production of ouabain like factor in normal and ischemic rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v.43, p.657-662, 2004.

DAVEL, A.P.; COUTO, G.K.; WENCESLAU, C.F. et al. Enhanced Na⁺, K⁺-ATPase activity and endothelial modulation decrease phenylephrine-induced contraction in aorta from ouabain-treated normotensive and hypertensive rats. *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.*, v. 18, p. 113-122, 2014.

DE VASCONCELOS, D.I.; LEITE, J.A.; CARNEIRO, L.T. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. *Mediators Inflamm.*, 2011.

DERWICH, E.; BENZIANE, Z.; BOUKIR, A. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil from flowers of *Nerium oleander*. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.*, v.9, n.6, p. 1074-1084, 2010.

DESPA, S.; BERS, D.M. Functional analysis of Na⁺/K⁺-ATPase isoform distribution in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.*, v.293, p.321-327, 2007.

DEY, A.; SWAMINATHAN, K. Hyperglycemia-induced mitochondrial alterations in liver. *Life Sciences*, v.87, p. 197-214, 2010.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart. Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, v.101, p.33-39, 2000.

DIG TRIAL. The Digitalis Investigation Group. The Effect of Digoxin on Mortality and Morbidity in Patients with Heart Failure. *N. Engl. J. Med.*, v. 336, p.525-533, 1997. doi: 10.1056/NEJM199702203360801.

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

DRUM, B.M., DIXON, R.E., YUAN, C. et al. Cellular mechanisms of ventricular arrhythmias in a mouse model of Timothy syndrome (long QT syndrome 8). *Journal of Molecular Cell Cardiology*, v.66, p.63-71, 2014. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.10.021.

EINTHOVEN, W. Ueber die Form des menschlichen Electrocardiogramms. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, v.60, p.101-123, 1895.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, v.18, p.872-878, 2002.

FEDOROVA, O.V.; KOLODKIN, N.I.; AGALAKOVA, N.I. et al. Marinobufagenin, and endogenous alpha-1 sodium pump ligand, in hypertensive Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*, v.37, p.462-466, 2001.

FLINK, E.B. Hypomanesemia in the patient receiving digitalis. *Arch Intern Med.*, v.145, p.625-626, 1985. doi:10.1001/archinte.1985.00360040043006

FONFARA, S.; LOUREIRO, J.; SWIFT, S. et al. Cardiac troponin I as a marker for severity and prognosis of cardiac disease in dogs. *Vet. J.*, v. 184, p. 334-339, 2010.

FORD, A.R.; ARONSON, J.K.; GRAHAME-SMITH, D.G.; CARVER, J.G. The acute changes seen in cardiac glycoside receptor sites, ⁸⁶Rb uptake and intracellular sodium concentration in the erythrocytes of patients during the early phases of digoxin therapy are not found during chronic therapy: pharmacological and therapeutic implication for chronic digoxin therapy. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v.8, 135-142, 1979.

FRASER, R.S.; HARLEY, C. WILEY, T. Electrocardiogram in the normal rat. *Journal of Applied Physiology*, 23: 401- 402, 1967.

FRIDERICIA, L.S. Die Systolendauer im Elektrokardiogramm bei normalen Menschen und bei Herzkranken. [The duration of systole in the electrocardiogram of normal subjects and of patients with heart disease]. *Acta Medica Scandinavica*, 53, 469–486, 1920.

FROMMEYER, G.; PUCKHABER, D.; ELLERMANN, C. et al. Interactions of digitalis and class-III antiarrhythmic drugs: amiodarone versus dronedarone. *International Journal of Cardiology*. v.228, p.74-49, 2017.

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. doi: 10.1007/s00018-012-1134-y.

FURST, R.; ZUNDORF, I.; DINGERMAN, T. New knowledge about old drugs: the anti-inflammatory properties of cardiac glycosides. *Planta Med.*, v.83, p.977-984, 2017.

GADELHA, I.C.N.; LIMA, J.M.; BATISTA, J.S. et al. Toxicity effects of toad (*Rhinella jimi* Stevaux, 2002) venom in chicken (*Gallus gallus domesticus*). *The Scientific World Journal*, p.1-6, 2014.

GAITA, F.; GIUSTETTO, C.; BIANCHI, F. et al. Short QT syndrome: pharmacological treatment. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v.43, p.1494-1499, 2004.

GEERING, K. FXYD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, v. 290, p. 241-250, 2006. doi: 10.1152/ajprenal.00126.2005.

GERMINIANI, H.; GERMINIANI, C.L.B.; SANTI, R.P.; VIEIRA, G. Estudo comparativo das ações anti-arrítmicas da cibenzolina e da difenilhidantoina sódica em arritmias ventriculares digitálico-induzidas. *Rebfampa*, v. 8(2), p. 77-84, 1995.

GIODA, C.R.; DE OLIVEIRA BARRETO, T.; PRÍMOLA-GOMES, T.N. et al. Cardiac oxidative stress is involved in heart failure induced by thiamine deprivation in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* v.298, p.2039-2045, 2010.

GOLOVINA, V.; SONG, H.; BLAUSTEIN, M. Regulation of Ca²⁺ signaling by Na⁺ pump alpha-2 subunit expression. *Ann. N. Y. Acad.Sci.* v.986, p.509–513, 2003.

GOTO, A.; ISHIGURO, T.; YAMADA, K. et al. Isolation of a urinary digitalis-like factor indistinguishable from digoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.173, n.3, p.1093-1101, 1990.

GRAEBER, G.M.; CLAGETT, G.P.; WOLF, R.E.; et al. Alterations in serum creatine kinase and lactate dehydrogenase. Association with abdominal aortic surgery, myocardial infarction and bowel necrosis. *Chest*, v. 97, p. 521-527, 1990.

GRAEBER, G.M.; CLAGETT, G.P.; WOLF, R.E. et al. Alterations in serum creatine kinase and lactate dehydrogenase. Association with abdominal aortic surgery, myocardial infarction and bowel necrosis. *Chest.*, v.97, p.521-527, 1990.

GRANDI, E.; HERREN, A.W. CaMKII-dependent regulation of cardiac Na⁺ homeostasis. *Front. Pharmacol.*, 2014. doi: 10.3389/fphar.2014.00041.

HADIZADEH, I.; PERIVASTEGAN, B.; KOLAH, M. Antifungal activity of Nettle (*Urtica dioica* L.), Colocynth (*Citrullus 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.

HAFSTAD, A.D.; NABEEBACCUS, A.A.; SHAH, A.M. Novel aspects of ROS signaling in heart failure. *Basic Res. Cardiol.*, v.108, 2013.

HALLBOOK, H.; FELTH, J.; ERIKSSON, A. et al. Ex vivo activity of cardiac glycosides in acute leukaemia. *PLoS One*, v.6, e1518, 2011.

HAMDY, D.A.; BROCKS, D.R. Experimental hyperlipidemia causes an increase in the electrocardiographic changes associated with amiodarone. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 53:1-8, 2009. doi: 10.1097/FJC.0b013e31819359d1.

- HAMLYN, J.M.; BLASUTEIN, M.P.; BOVA, S. et al. Identification and characterization of an ouabain-like compound from human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 6259-6263, 1991.
- HAMLYN, J.M.; BLAUSTEIN, M.P. Salt sensitivity, endogenous ouabain and hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, v. 22, p. 51-58, 2013. doi: 10.1097/MNH.0b013e32835b36ec.
- HAMLYN, JM; HAMILTON, BP; MANUNTA, P. Endogenous ouabain, sodium balance and blood pressure: a review and hypothesis. *J. Hypert.* v. 14, p. 151-197, 1996.
- HARADA, T., FUMIKO, I., HAMADA, M. et al. Circadian rhythm of heart-rate variability and autonomic cardiovascular regulation in Parkinson's disease. *Autonomic Neuroscience*. 158: 133-140, 2010.
- HAUPTAMN, P.J.; KELLY, R.A. Digitalis. *Circulation*, v.99, p. 1265-1270, 1999.
- HAYES, E., PUGSLEY, M.K., PENZ. et al. Relationship between QT and RR interval in rats, guinea pigs, rabbits and primates. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 32:201-207, 1994.
- HAYNES, B.E.; BESSEN, H.A.; WIGHTAMN, W.D. Oleander tea: herbal draught of death. *Ann Emerg. Med.*, v. 14, p. 350-3, 1985.
- HEINRICH, K.; PRENDERGAST, H.M.; ERICKSON, M.D. Chronic digoxin toxicity and significantly elevated BNP levels in the presence of mild heart failure. *Am. J. Emerg. Med.*, v.23, p.561-2, 2005.
- HEYWOOD, S.E., RICHART, A.L., HENSTRIDGE, A. et al. High-density lipoprotein delivered after myocardial infarction increases cardiac glucose uptake and function in mice. *Science Translational Medicine*, 9, 411, 2017. doi: 10.1126/scitranslmed.aam6084.
- HO, H., STEVENS, S.C.W., TERENCEA, R. et al. Arrhythmogenic adverse effects of cardiac glycosides are mediated by redox modification of ryanodine receptors. *Journal of Physiology*, 589:4697-4708, 2011.
- HODGES, M., SALERNO, D.; ERLIEN, D. Bazett's QT correction reviewed. Evidence that a linear QT correction for heart is better. *Journal of the American College of Cardiology*. 1:694, 1983.
- HOLTER, N.J.; GENERELLI J.A. Remote recording of physiologic data by radio. *Rocky Mountain Medicine Journal*, 747-751, 1949.
- HU, E.; HE, J.; LIU, Z. et al. High levels of serum lactate dehydrogenase correlate with the severity and mortality of idiopathic pulmonary artery hypertension. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v.9, p.2109-2113, 2015.
- HUANG, B.S.; LEENEN, F.H. Sympathoexcitatory and pressor responses to increased brain sodium and ouabain are mediated via brain ANG II. *Am. J. Physiol.*, v.270, pp.275-2880, 1996.
- HUANG, L.; LI, H.; XIE, Z. Ouabain-induced hypertrophy in cultured cardiac myocytes is accompanied by changes in expression of several late response genes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v.29, p.429-437, 1997.
- HUGHES, K.J.; DART, A.J.; HODGSON, D.R. Suspected *Nerium oleander* (Oleander) poisoning in a horse. *Aust. Vet. J.*, v80, p. 412-415, 2002. doi: 10.1111/j.1751-0813.2002.tb11000.x.
- HUNT, S.A.; ABRAHAM, W.T.; CHIN, M.H. et al. Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v.53, p.1-90, 2009.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY. Grading of acute kidney injury. 2016. Disponível em: < <http://www.iris-kidney.com/guidelines/grading.html>>. Acesso em: 01 jun. 2018.

JACOB, H.S.; YAWATA, Y.; CRADDOCK, P. et al. Hyperalimentation hypophosphatemia: hematologic-neurologic due to ATP depletion. *Trans. Assoc. Am. Physicians*. v.86, p.143-153, 1973.

JACOB, P.I.; LEITE, J.A.; ALVES, A.K.A. et al. Immunomodulatory activity of ouabain in *Leishmania leishmania amazonensis*-infected Swiss mice. *Parasitol. Res.*, v.112, p.1313-1321, 2013.

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.

JANERO, D. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 9, p.515-540, 1990.

JANSSEN, R.M.; BERG, M.; OVAKIM, D.H. Two cases of cardiac glycoside poisoning from accidental foxglove ingestion. *CMAJ.*, v.188, p.747-750, 2016.

JOOST, A.; KUROWKI, V.; KAISER, A. Intoxication by *Digitalis purpurea* in suicidal intention – a case report. *Medicina Interna*, v.4, p.77-81, 2010.

JUNEJA, D.; SINGH, O.; BHASIN, A. et al. Severe suicidal digoxin toxicity managed with resin hemoperfusion: A case report. *Indian J. Crit. Care Med.*, v.16, p.231-233, 2012.

KANJI, S.; MACLEAN, R.D. Cardiac glycoside toxicity. *Pharm. Db. Crit. Care Clin.*, n.28, p. 527-535, 2012.

KARADENIZ, A.; AYTEKIN, I.; AKGUL, Y. Effects of acute and subacute digoxin intoxication on hematological parameters and serum CK and LDH activities in dogs. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v.2, p.96-100, 2008.

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.

KARLSSON, M.; WIBERG-ITZEL, E.; CHAKKARAPANI, E. et al. Lactate dehydrogenase predicts hypoxic ischemic encephalopathy in newborns infants: a preliminary study. *Acta Paediatr.*, v.99, p.1139-1144, 2010. doi: 10.1111/j.1651-2227.2010.01802.x.

KARLSSON, M.; WIBERG-ITZEL, E.; CHAKKARAPANI, E. et al. Lactate dehydrogenase predicts hypoxic ischemic encephalopathy in newborn infants: a preliminary study. *Acta Paediatr.*, v. 99, p. 1139-1144, 2010.

KASSOP, D.; DONOVAN, M.S.; COHEE, B.M. et al. An unusual case of cardiac glycoside toxicity. *International Journal of Cardiology*, v.170, p.434-444, 2014.

KATO, G.J.; MCGOWAN, V.; MACHADO, R.F. et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood* 107: 2279-2285, 2006.

KATO, G.J.; MCGOWAN, V.; MACHADO, R.F. et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*, v.107, p.2279-2285, 2006. doi: 10.1182/blood-2005-06-2373.

KATZ, A.; LIFSHITZ, Y.; BAB-DINITZ, E. et al. Selectivity of digitalis glycosides for isoforms of human Na, K, ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, v.285, p.19582-19592, 2010.

KELMAN, A.W.; SUMNER, D.J.; LONSDALE, M. et al. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of cardiac glycosides. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v.10, p.135-143, 1980.

- 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.
- KMECOVA, J.; KLIMAS, J. Heart rate correction of the QT correction in rats. *European Journal of Pharmacology*, 641:187'-192, 2010.
- KOMIYAMA, Y.; DONG, X.H.; NISHIMURA, N. et al. A novel endogenous digitalis, telocinobufagenin, exhibits elevated plasma levels in patients with terminal renal failure, *Clin. Biochem.*, v.28, p.36-45, 2005.
- KONOPELSKI, P.; UFNAL, M. Electrocardiography in rats: a comparison to human. *Physiological Research.*, 65:717-725, 2016.
- KRUM, H.; BIGGER Jr., T.; ROCHELLE, 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.
- KRYSTON, T.B.; GEORGIEV, A.B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A.G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research*, v.711, p.193-201, 2011.
- 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.
- KUÇUDKURMAZ, Z.; KARAPINAR, H.; GUL, İ. et al. Complete atrioventricular block after self-ingestion of *Nerium oleander* for relief of hemorrhoidal complaints. *Arch. Turk. Soc. Cardiol.*, v.40, p.168-170, 2012.
- KUMAR, P., SRIVASTAVA, P., GUPTA, A.; BAJPAI, M. Non-invasive recording of electrocardiogram in conscious rat: A new device. *Indian Journal of Pharmacology*, 49:116-118, 2017. doi: 10.4103/0253-7613.201031.
- KUMAR, S.; ANAND, G.R. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Nerium oleander*. *Pharmacia*, v.1, n.1., p. 33-38, 2010.
- KUO, H.; HSU, C.; CHEN, J. et al. Life-threatening episode after ingestion of toad eggs: a case report with literature review. *Emerg. Med. J.*, 2007.
- KWON, H.J.; SIM, H.J.; LEE, S.I. et al. HPLC method validation for digitalis and its analogue by pulsed amperometric. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v. 42, p. 217,-221, 2011. doi: 10.1016/j.jpba.2010.07.037.
- 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.
- LAREDO, J.; HAMILTON, B.P.; HAMLYN, J.M. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. *Endocrinology*, v.135, p.794-797, 1994.
- LE COUTER, D.G. L.; FISHER, A.A. Chronic and criminal administration of *Nerium oleander*. *Clin. Toxicol.*, v. 40, p 523-424, 2002.
- LEE, J.; BAEK, S.; LEE, J. et al. Digoxin ameliorates autoimmune arthritis via supression of Th17 differentiation. *International Immunopharmacology*, v.26, p.103-111, 2015.
- LEONARDUZZI, G.; SOTTERO, B.; POLI, G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. *Pharmacology & Therapeutics*, v.128, p.336-74, 2010.
- LEV, M.C.; KARLISH, S.J.D.; GARTY, H. Cardiac glycosides induced toxicity in human cells expressing $\alpha 1$, $\alpha 2$ - or $\alpha 3$ - isoforms of Na-K-ATPase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v.309, 126-135, 2015.
- LI, J.; ZHANG, Y.; LIN, Y. et al. Preparative separation and purification of bufadienolides from *ChanSu* by high-speed counter-current chromatography combined with preparative HPLC. *Quim. Nova*, v.36, n.5, p.686-680, 2013.

LIMON, G.; ERSOY, G.; COLAK, N. et al. Retrospective evaluation of patients with elevated digoxin levels at an emergency department. *Turk. J. Emerg. Med.*, v.16, p.17-21, 2016.

LIMON, G.; ERSOY, G.; ORAY, N. et al. Retrospective evaluation of patients with elevated digoxin levels at an emergency department. *Turkish Journal of Emergency Medicine*, v.16, p.17-21, 2016.

LIU, J.; PERIYASAMY, S.M.; GUNNING, W. et al. Effects of cardiac glycosides on sodium pump expression and function in LLC-PK1 and MDCK cells. *Kidney Int.*, v.62, p.2118-2125, 2002.

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

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, H.J.; FARRA, L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.

MA, H.; JIANG, J. ZHANG, J. Protective effect of taurine on cardiotoxicity of the bufodienolides derived from toad (*Bufo bufo gargarizans* Canto) venom in guinea-pigs in vivo and in vitro. *Toxicol. Mech. Methods*, v.22, pp.1-8, 2012. doi: 10.3109/15376516.2011.583295.

MADELAIRE, C.; SCHOU, M.; NELVEG-KRISTENSEN, K.E. et al. Use of digoxin and risk of death or readmission for heart failure and sinus rhythm: A nationwide propensity score matched study. *Int. J. Cardiol.*, v. 15, p.944-950, 2016. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.07.111.

MAISEL, A.S.; DURAN, J.M.; WETTERSTEN, N. Natriuretic peptides in heart failure: atrial and B-type natriuretic peptides. *Heart Fail. Clin.*, v.14, p.13-25, 2018.

MATÉS, J.M.; SANCHEZ-JIMENEZ, F.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v.32, p.57-170, 2000.

MEIRA, E.F.; SIMAN, F.D.M.; FARIA, T.O. et al. Low-dose ouabain administration increases Na⁺, K⁺-ATPase activity and reduces cardiac force development in rats. *Pharmacol. Rep.*, v. 67, p. 253-259, 2015. doi: 10.1016/j.pharep.2014.10.005.

MELERO, C.P.; MEDARDE, M.; SAN FLICIANO, A. A short review on cardiotonic steroids and their amunoguanadine analogues. *Molecules*, v.5, p.51-81, 2000.

METAWEE, M.; CHARNIGO, R.; MORALES, G. et al. Digoxin and short-term mortality after acute STEMI: Results from the MAGIC trial. *Int. J. Cardio.*, v.218, p.176-180, 2016. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.05.022.

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.

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.

MITCHELL, A. A bitter pill to swallow: a case of accidental poisoning with digitalis purpurea. *BMJ Case Rep.*, 2010.

MITCHELL, G.F.; JERON, A.; KOREN, G. Measurement of hear rat and QT interval in the conscious mice. *American Journal of Physiology*, 274, H747-51, 1998.

MITRA, R; MORAD, M. A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. *Am. J. Physiol.*, v. 249, n.5, p. 1056-1060, 1985.

NACHIMUTHU, S., ASSAR, M.D.; SCHUSSLER, J.M. Drug-induced QT interval prolongation mechanisms and clinical management. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 3:241-253, 2012. doi: 10.1177/2042098612454283.

NARUSE, K; NARUSE, M; TANABE, A; et al. Does plasma immunoreactive ouabain originate from the plasma adrenal gland? *Hypertension*, v.23, p. 102-105, 1994.

NELSON, D.P.; KIESOW, L.A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem.*, v. 49, p.474-478, 1972.

- NERBONNE, J.M. (2014). Mouse models of arrhythmogenic cardiovascular disease: challenges and opportunities. *Current Opinion in Pharmacology*, 15, 107-114.
- NIEMEIJER, M.N., VAN DEN BERG, M.E., EIJGELSHEIM, M., et al. Short-term QT variability markers for the prediction of ventricular arrhythmias and sudden cardiac death: a systematic review. *Heart*, 23:1831-1836, 2014. doi: 10.1136/heartjnl-2014-305671.
- O'BRYEN, P.J.; SMITH, D.E.; KNECTEL, T.J. et al. Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab. Anim.*, v.40, p.153-171, 2006.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.*, v. 95, p.351-358, 1979.
- OLIVEIRA, M.S.; MELO, M.B.; CARVALHO, J.L.; et al. Doxorubicin cardiotoxicity and cardiac function improvement after stem cell therapy diagnosed by strain echocardiography. *J. Cancer Sci. Ther.*, v.2, p.52-57, 2013.
- OZAKI, H.; NAGASE, H.; URAKAWA, N. Interaction of palytoxin and cardiac glycosides on erythrocyte membrane ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPase. *Eur. J. Biochem.*, v.152, 475-480, 1985.
- PAGE, C.; MURTAUGH, R.J. Hypoglycemia associated with oleander toxicity in a dog. *J. Med. Toxicol.*, v. 11, n. 1, p. 141-143, 2015.
- PAGE, E.; REAL, J.D. Interrelationships between cardiac effects of ouabain, hypocalcemia and hyperkalemia. *Circulation Research*, v.111, p.501-507, 1955.
- PAGLIA DE, V.W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 70, p.158-169, 1967.
- 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.
- PEARSON, J.M.; MCWILLIAM, L.J.; COYNE, J.D.; CURRY, A. Value of electron microscopy in diagnosis of renal disease. *J. Clin. Pathol.*, v.47, p.126-128, 1994.
- 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.
- PETERSEN, E.; HAGBERG, I.A.; LYBERG, T; GJESDAL, K. Do cardiac glycosides affect platelet function? A flow cytometric study in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v.58, p.181-186, 2002.
- PEYMANI, P.; ZAMIRI, N.; TAHMASBI, J. A case of non-fatal oleander poisoning. *Iran Red. Crescent Med. J.*, v. 13, p. 219-220, 2011.
- PINCUS, M. Management of digoxin toxicity. *Aus. Prescr.*, v.39, p.18-20, 2016. doi: 10.18773/auspresc.2016.006.
- PINTO, M.C.K., BORBOLETA, L.R., MELO, M.B. et al. *Tityus fasciolatus* envenomation induced cardio-respiratory alterations in rats. *Toxicon*, 55:1132-1137, 2010.
- PIPER, C.; HORSKOTTE, D.; BOCK, A. et al. Myocardial lactate dehydrogenase patterns in volume or pressure overloaded left ventricles. *The European Journal of Heart Failure*, v.4, p.587-591, 2002.
- PLEBANI, M.; ZANINOTTO, M. Cardiac troponins: what we knew, what we know—where are we now. *Clin. Chem. Lab. Med.*, v. 47, 1165-1166, 2009.
- PONIKOWSKI, P.; VOORS, A.A.; ANKER, S.D. et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC)

Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.*, v.37, p.2129–200, 2016.

PRASSAS, I.; DIAMANDIS, E.P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 11, p. 926-935, 2008.

PRINCI, T.; DELBELLO, G.; GRILL, V. Experimental urethane anaesthesia prevents digoxin intoxication: electrocardiographic and histological study in rabbit. *Pharmacol. Res.*, v.42, p.355-360, 2000.

PRODOUZ, K.N.; POINDEXTER, B.J.; FRATANTONI, J.C. Ouabain affects platelet reactivity as measured *in vitro*. *Thrombosis Research*, v.46, p.337-346, 1987.

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.

REES, S.A.; CURTIS, M.J. Selective IK blockade as an antiarrhythmic mechanism: effects of UK66, 914 on ischemia and reperfusion arrhythmias in rat and rabbit heart. *Br. J. P.*, v.108, p.139-145, 1993.

RENARD, D.; RUBI, E.; VOLDE, N. et al. Spectrum of digoxin-induced ocular toxicity: a case report and literature review. *BMC Res. Notes*, v. 8, 1-8, 2015.

RENARD, D.; RUBLI, E.; VOIDE, N. et al. Spectrum of digoxin induced ocular toxicity: a case report and literature review. *BMC Res Notes.*, v. 8, p.368, 2015.

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.242, p.540-549, 2013. doi: 10.2460/javma.242.4.540.

REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, v.49, p.1603–1616, 2010.

REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, v.49, p.1603–1616, 2010.

RHAYMAH, M.S.; AL-FARWACHI, M.I.; AL-BRADANI, A. Chronic toxicity of Nerium oleander aqueous leaf extract in rabbits. *Al-Anbar J. Vet. Sci.*, v.4, 2011.

ROMAN-CAMPOS, D., SALES-JÚNIOR, P., DUARTE, H.L. et al. Cardiomyocyte dysfunction during the chronic phase of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108:243-245. 2013.

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.

ROUSSEL, J., CHAMPEROUZ, P., ROY, J. et al. The Complex QT/RR Relationship in Mice. *Scientific Reports*, 25388, 2016. doi: 10.1038/srep25388.

RUPPERT, S., VOERMBERGE, T., BERND-WOLFGANG, I.; HOFFMANN, M. ECG telemetry in conscious guinea pigs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 81:88-98, 2016. doi: 10.1016/j.vascn.2016.04.013.

SABLES, C.L.; CURTIS, M.J. Development and characterization of a mouse *in vitro* model of ischemia-induced ventricular fibrillation. *Cardiovasc. Res.*, v.83, p.397-404, 2009. doi: 10.1093/cvr/cvp068.

SAGIE, A., LARSON, M.G., GOLDBERG, R.J. et al. An improved method for adjusting the QT interval for heart rate (the Framingham Heart Study). *American Journal of Cardiology*, 70:797–801, 1992.

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

- SAMSKY, M.D.; PATEL, C.B.; DEWALD, T.A. et al. Cardiohepatic interactions in heart failure: an overview and clinical implications. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v.61, p.2397-2405, 2013.
- SANTOS, B.A.; ROMAN-CAMPOS, D.; CARVALHO, M.S. et al. Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca^{2+} current blockade. *Phytomedicine*, v.15, p. 539-543, 2011.
- SANTOS, C.K.; BRAGA, P.C.; BARBANERA, O.P. et al. Cardiac energy metabolism and oxidative stress biomarkers in diabetic rat treated with resveratrol. *Plos One*, v.9, 2014.
- SANTOS, W.B.; MESQUITA, F.T.; VIEIRA, R.M.R. et al. Proteína-C-reativa e doença cardiovascular: as bases da evidência científica. *Arq. Bras. Cardiol.* [Online], v.80, n.4, 2003. doi: 10.1590/S0066-782X2003000400010.
- SCALESE, M.J.; SALVATORE, D.J. Role of Digoxin in Atrial Fibrillation. *J. Pharmac. Pract.*, v.30, p.434-440, 2017. doi: 10.1177/0897190016642361.
- SCHONFELD, W.; WEILAND, J.; LINDIG, C. et al. The lead structure in cardiac glycosides is $5\beta,14\beta$ -androstane- $3\beta,14$ -diol. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* v. 329, p. 414-426, 1985.
- SELLER, R.H.; CANGIANO, J.; KIM, K.E. et al. Digitalis toxicity and hypomagnesemia. *Am. Heart J.*, v.79, p.57-68, 1970.
- SEMENTILLI, A.; MOURA, L.A.; FRANCO, M.F. The role of electron microscopy for the diagnosis of glomerulopathies. *Sao Paulo Med. J.*, v.122, 104-109, 2004.
- SETHILKUMARAN, S.; MEENAKSHISUNDARAM, R.; MICHAELS, A.D. et al. Electrocardiographic changes during inhalational oleander toxicity. *Journal of Electrocardiology*, v. 44, p. 470-472, 2011.
- SHINTAKU, T.; OHBA, T.; NIWA, H. et al. Effects of propofol on electrocardiogram measures in mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, 126:351-358, 2014.
- SHUMAIK, 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.
- 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.
- SIMÃO, N.M.B. *Intoxicação experimental por veneno de sapo em cães anestesiados: estudos clínico e laboratorial*. Dissertação Programa de Pós-Graduação Clínica Veterinária, UNESP 98p. 2007
- SINGH, V.; MARTINEZCLARK, P.; PASCUAL, M. et al. Cardiac biomarkers: the old and the new: a review. *Coron. Artery Dis.*, v.21, p.244-256, 2010. doi: 10.1097/MCA.0b013e328338cd1f.
- SMITH, J.E. Erythrocyte membrane: structure, function, and pathophysiology. *Vet. Pathol.*, v. 24, p.471-476, 1987.
- SMITH, T.W.; BUTLER, V.P.; HABER, E. et al. Treatment of life-threatening digitalis intoxication with digoxin-specific Fab antibody fragments. *The New England Journal of Medicine*, v.307, n.22, p. 1357-1363, 1982.
- SOLOMON, A.K.; GILL, T.J.; GOLD, G.L. The kinetics of cardiac glycoside inhibition of potassium transport in human erythrocytes. *J. Gen. Physiol.*, v.40, p.327-350, 1956.
- SONG, H.; LEE, M.Y.; BLAUSTEIN, M. An N-terminal sequence targets and tethers Na⁺ pump alpha2 subunits to specialized plasma membrane microdomains. *J. Biol. Chem.* v.281, p.12929-12940, 2006.
- 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.

STROBACH, H.; WIRTH, K.E.; ROJASTHAPORA, K. Absorption, metabolism and elimination of strophanthus glycosides in man. *Namyn-Schiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v.334, p.496-500. 1986.

SURIKOW, S.Y.; NGUYEN, T.H.; STAFFORD, I., et al. Development of Therapeutic Strategies for Takotsubo Syndrome: Insights From a Rat Model. *Circulation*, 136, A18970, 2017.

SUSKI, J.M.; LEBIEDZINSKA, M.; KARKUCINSKA-WIECKOWSKA, A.; et al. Cardiac mitochondrial dysfunction during hyperglycemia--the role of oxidative stress and p66Shc signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.45, p.114-122, 2013.

SWAYER, D.B. Oxidative Stress in Heart Failure: What are we missing? *Am. J. Med. Sci.*, v.342, 120-4, 2011.

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.

SWIFT, F.; TOVSRUD, N.; ENGER, U.H. et al. The Na⁺/K⁺ -ATPase $\alpha 2$ -isoform regulates cardiac contractility in rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, v.75, p.109-117, 2007.

TAHARA, E.B.; NAVARETE, F.D.; KOWALTOWSKI, A.J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology and Medicine*, v.46, p.1283-1297, 2009.

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. 2, n.6, p.1189-1193, 2012.

TESKE, R.H.; BISHOP, S.P.; FIGHTER, H.F.; DETWEILER, D.K. Subacute digoxin toxicosis in the Beagle dog. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.35, p.283-301, 1976.

THARWAT, M.; AL-SOBAYIL, F. Influence of the cardiac glycoside digoxin on cardiac troponin I, acid-base and electrolyte balance, and haematobiochemical profiles in healthy donkeys (*Equus asinus*). *BMC Vet. Res.*, 2014.

THRALL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1ª. Edição. São Paulo: Roca, 2007. p.283-287.

TIAN, J.; HALLER, S.; PERIYASAMY, S. et al. Renal ischemia regulates marinobufagenin release in humans. *Hypertension*, v.56, p.914-919, 2010.

TILLEY, L.P. *Essentials of canine and feline electrocardiography: interpretation and treatment*. 3a ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1992. p. 470.

TOMASIAK, M.; STELMACH, H.; RUSAK, T. et al. The involvement of Na⁺/K⁺ ATPase in the development of platelet procoagulant response. *Acta Biochim. Pol.*, v.54, p.625-639, 2007.

TOUZA, N.A.; PÔÇAS, E.S.C.; QUINTAS, L.E.M.; CUNHA-FILHO, G.; SANTOS, M.L.; NOEL, F. Inhibitory effect of combinations of digoxin and endogenous cardiotonic steroids on Na⁺/K⁺ -ATPase activity in human kidney membrane preparation. *Life Sciences*, v.68, p.39-42, 2011.

TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Oxidative stress and heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v.301, 2181-90, 2011.

TYMIAK, A.A.; NORMAN, J.A.; BOLGAR, M. et al. Physicochemical characterization of an ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v.90, p.8189-8193, 1993.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology*, v.189, p.41-54, 2003.

- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.39(1), p. 44–84, 2007.
- 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.
- VAMOS, M.; ERATH, J.W.; HONLOSER, S.H. Digoxin-associated mortality: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Eur. Heart J.*, v.36, p.1831-1938, 2015. doi: 10.1093/eurheartj/ehv143.
- VAN DE WATER A., VERHEYEN J., XHONNEUX R.; RENEMAN R.S. An improved method to correct the QT interval of the electrocardiogram for changes in heart rate. *Journal of Pharmacological Methods*, 22:207-217, 1989.
- VASCONCELOS, L.A.B.A.; DE ALMEIDA, E.A.; BACHUR, L.F. Clinical evaluation and hepatic laboratory assessment in individuals with congestive heart failure. *Arq. Bras. Cardiol.* [Online]. v.88, n.5, p.590-595, 2007. doi: 10.1590/S0066-782X2007000500015.
- VILAR-PEREIRA, G., CARNEIRO, V.C., MATA-SANTOS, H. et al. Resveratrol Reverses Functional Chagas Heart Disease in Mice. *PLoS Pathogens*, 12(10): e1005947, 2016. doi:10.1371/journal.ppat.1005947.
- WAKI, M.F. et al. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos: abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. *Cienc. Rural*, v. 40, n. 10, p. 2226-2234, 2010.
- WALTON, R.M.; BROWN, D.E.; HAMAR, D.W. et al. Mechanisms of echinocytosis induced by *Crotalus atrox* venom. *Vet. Pathol.*, v.34, p.442–9, 1997.
- WELLS, S.M.; SLEEPER, M. Cardiac troponins. *Vet. Emerg. Crit. Care.*, 18:235–245, 2008.
- WHITERING, W. *An account of the foxglove, and some of its medical uses: with practical remarks on dropsy, and other diseases*. Birmingham, England: M Swinney, 1785.
- WILSON, N.F., JOHNSTON, F.E., MACLEOD, A.G.; BARKER, P.S. Electrocardiograms that represent the potential variations of a single electrode. *American Heart Journal*, 9, 447-458, 1934.
- 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.
- XAVIER, F.E.; DAVELA, A.P.C.; FUKUDA, L.E. et al. Chronic ouabain treatment exacerbates blood pressure elevation in spontaneously hypertensive rats: the role of vascular mechanisms. *J. Hyperten.*, v.27, p.1233-1242, 2009. doi: 10.1097/HJH.0b013e32832a391f.
- XU, X., ROE, N.D., WEISER-EVANS, M.C.; REN, J. Inhibition of mammalian target of rapamycin with rapamycin reverses hypertrophic cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-specific knockout of PTEN. *Hypertension*, 63, 729-739, 2014.
- XU, Y.; LI, J.; CHEN, B. et al. Cardiac glycosides inhibit proliferation and induce apoptosis of human hematological malignant cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, v.9, p.9268-9275, 2016.
- XU, Z.; TONG, Q.; ZHANG, Z. et al. Inhibition of HDAC3 prevents diabetic cardiomyopathy in OVE26 mice via epigenetic regulation of DUSP5-ERK1/2 pathway. *Clinical Science*, v.131, p. 1841-1857, 2017.
- YAP, Y.G.; CAMM, A.J. Drug induced prolongation and torsades de pointes. *Heart*, 89:1363-1372, 2003.
- YU, Q., LI, N.A., R., LI, X. et al. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 387, 279-285, 2014.
- ZARAGOZA, C.; GOMEZ-GUERRERO, C.; MARTIN-VENTURA, J.L. et al. Animal models of cardiovascular diseases. *J. Biom. Biotech.*, v.11, p. 13, 2011.

ZENG, W.T.; ZHI-HAO, L.; LI, Z.Y.; ZHNAG, N. Digoxin Use and Adverse Outcomes in Patients With Atrial Fibrillation. *Medicine (Baltimore)*, v.95, 2016.doi: 10.1097/MD.0000000000002949.

ZHANG, Y.; SUN, L.; ZHANG, Y., et al. Overexpression of microRNA-1 causes atrioventricular block in rodents. *International Journal of Biological Sciences*, 9: 455-462, 2013.

ZIPES, D.P.; ARBEL, E.; KNOPE, R.F.; MOE, G.K. Accelerated cardiac escape rhythms caused by ouabain intoxication. *Am. J. Cardio.*, v,33, p.248-253, 1974.

ANEXO
Certificado do CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 74/2017

Título do projeto: Efeitos dos glicosídeos cardioativos no remodelamento eletromecânico do coração

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Marília Martins Melo

Unidade: Escola de Veterinária

Departamento: Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 05/06/2017. Validade: 05/06/2017 à 04/06/2022
Belo Horizonte, 05/06/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_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) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br