

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
PROF. DELBY FERNANDES MEDEIROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

ISLANIA GISELIA ALBUQUERQUE ARAÚJO

**ESTUDO DAS AÇÕES CARDIOVASCULARES DA
IANGAMBINA EM RATOS
- ESTUDOS *in vivo* e *in vitro* -**

**JOÃO PESSOA – PB
2007**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ISLANIA GISELIA ALBUQUERQUE ARAÚJO

**ESTUDO DAS AÇÕES CARDIOVASCULARES DA
IANGAMBINA EM RATOS
- ESTUDOS *in vivo* e *in vitro* -**

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** do **Laboratório de Tecnologia Farmacêutica** da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**. Área de concentração: **FARMACOLOGIA**

Orientadores:

Prof^a. Dr^a. Nadja de Azêvedo Correia

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

**João Pessoa – PB
2007**

A663e Araújo, Islania Giselia Albuquerque

Estudo das ações cardiovasculares da iangambina em ratos - estudos *in vivo* e *in vitro* / Islania Giselia A. Araújo - João Pessoa, 2007. / Islania Giselia A. Araújo __ João Pessoa, 2007.
98f. il.:

Orientadores: Prof^a Dr^a Nadja de Azevedo Correia
Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica) Universidade Federal da Paraíba.

1 Iangambina 2. Hipotensão 3. Anéis mesentéricos 4. Ação vasorelaxante 5. Bloqueador de canais para Ca²⁺ I. Título.

CDU: 615 (043)

ISLANIA GISELIA ALBUQUERQUE ARAÚJO

**ESTUDO DAS AÇÕES CARDIOVASCULARES DA
IANGAMBINA EM RATOS
- ESTUDOS *in vivo* e *in vitro* –**

Aprovado em 27 de fevereiro de 2007

COMISSÃO EXAMINADORA

**Prof^a. Dr^a. Nadja de Azêvedo Correia
Orientadora**

**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
Co-orientador – Examinador Interno**

**Prof^a. Dr^a. Glória Isolina B. P. Duarte
Examinadora Externo**

**Prof^a. Dr^a. Maria Regina de Freitas
Examinadora Externo**

Dedicatória

Dedico esta conquista às pessoas mais importantes da minha vida:

Aos meus queridos pais, *Jacinto e Abadia*, pelo amor, carinho, dedicação e por sempre incentivarem e valorizarem a importância do conhecimento.

Ao meu amado esposo, *Miguel*, pelo apoio, amor, paciência, dedicação e companheirismo.

A minha avó *Arinda* (em memória), que com a sua ausência me fez perceber como a vida é frágil.

Aos meus queridos irmãos, *João Paulo e Selenia*, e sobrinho, *Neto*, pelo carinho e força em todos os momentos da minha vida.

Em especial, aos meus maravilhosos filhos *Miguel e Gabriel* pelos sorrisos alegres nas horas difíceis e por fazer da minha vida uma grande festa.
Como eu amo esses meninos!!!!

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sua imprescindível presença em todos os momentos da minha vida e por ter me concedido esta vitória;

A **Prof^a. Dr^a. Nadja de Azêvedo Correia** pela orientação, incentivo, competência, amizade, honestidade e pelo exemplo de pesquisadora e ser humano. Você tem um coração enorme!!!!

Ao **Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**, pela orientação, confiança, oportunidade, incentivo, amizade, sempre com honestidade e seriedade que foram imprescindíveis para minha formação pessoal e profissional. Serei eternamente grata...

A **Darizy** (doutoranda) pela pessoa maravilhosa que é, demonstrando uma inestimável amizade e cumplicidade e por ser um exemplo de competência e determinação;

A **Karla** (doutoranda) pela colaboração na realização deste trabalho e inestimável amizade e por ser tão prestativa;

A **Prof^a. Dr^a. Katy Lísia Gondim Dias** pela amizade, apoio, atenção, ajuda e pelas enriquecedoras contribuições;

A **Carminha, Natália e Ataíde** pela ajuda na bancada e parceria na realização deste trabalho;

Ao **Prof. Dr. Diego guedes Nunes** pelo carinho, amizade e confiança inestimáveis;

Ao **Prof. Dr. José Maria Barbosa filho**, pela colaboração e por ter fornecido a substância para a realização deste estudo;

Ao **Prof. Dr. Jader Cruz, Prof. Dr. Demétrius** e todos que compõem o LEBIME – DBM/UFPB, pela acolhida, competência e ensinamentos;

Aos Professores de Pós-Graduação da USP-Ribeirão Preto/SP, **Dra. Lusiane Bendhack** e **Dr. Gustavo Ballejo**, pela imprescindível ajuda, apoio e ensinamentos valiosos;

Ao **Mário dos Anjos Neto** (doutorando - USP-Ribeirão Preto/SP) por todo apoio e imprescindível ajuda nos experimentos bioquímicos realizados;

A **Prof^a. Dr^a. Cristina Salgado** por ter doado o S(-)-Bay K 8644;

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: alunos de doutorado (**Aldeídia, Alessandra, Ethiene, Horacinna, Raline, Robson e Socorro**); alunos de mestrado (**Ápio, Etiene, Júnior, Nayara, Thaís Josy, Thaís Porto**) e, alunos de iniciação científica (**Abrahão, Bruna, Camila, Carol, Couras,**

Dayanne, Ericelle, Fabíola, George, Mônica, Renata, Thyago, Valéria), que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho;

A **Coordenação, funcionários** e a todos os **professores** que compõem o Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela competência, seriedade, honestidade, incentivo e apoio;

A **minha turma de mestrado** pelo apoio e companheirismo;

A **José Crispim Duarte** pela competência, sempre disposto em ajudar e repassar conhecimentos, além da valiosa amizade;

A **Luís Cordeiro da Silva**, pelo trabalho realizado no Biotério do LTF;

A **Tânia Alves** (Secretaria da Pós-graduação) pelo seu trabalho desempenhado com dedicação na secretaria e pela atenção em momentos difíceis;

A todos que fazem o LTF;

Ao CNPq e a Capes, pelo apoio financeiro;

MUITO OBRIGADA.

Isolania Giselia A. Araújo
Fevereiro, 2007

Resumo e Abstract

**Estudo das ações cardiovasculares da
iangambina em ratos
- Estudos *in vivo* e *in vitro* -**

RESUMO

Os efeitos farmacológicos de iangambina, uma lignana furofurânica isolada na forma pura das folhas e das cascas do caule da *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae), sobre o sistema cardiovascular, foram estudados em ratos usando técnicas combinadas *in vivo* e *in vitro*. Em ratos normotensos não anestesiados, iangambina (1; 5; 10; 20 e 30 mg.kg⁻¹ i.v., randomicamente) produziu uma hipotensão (-3,9 ± 0,2; -7,5 ± 0,6; -9,3 ± 1,3; -15,0 ± 1,9 e -25,5 ± 1,6 mmHg, respectivamente) acompanhada por uma resposta taquicárdica (21,8 ± 1,7; 22,8 ± 6,1; 32,0 ± 5,2; 42,0 ± 4,8 e 67,5 ± 9,9 bpm, respectivamente), provavelmente de origem reflexa. Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, com endotélio funcional, iangambina (10⁻⁷ – 10⁻³ M) induziu relaxamento das contrações induzidas por fenilefrina (1 nM - 10 μM) (pD₂ = 4,5 ± 0,06, E_{máx} = 78,7 ± 2,9 %, n = 9) de maneira dependente de concentração e esse efeito não foi atenuado pela remoção do endotélio vascular (pD₂ = 4,4 ± 0,04, E_{máx} = 75,6 ± 3,1 %, n = 7). Esses resultados sugerem que a resposta vasorelaxante induzida pela iangambina parece ser independente do endotélio vascular. Baseado nessas observações iniciais, os experimentos subseqüentes foram realizados com preparações sem endotélio vascular. Em preparações incubadas com KCl 20 mM, o efeito vasorelaxante induzido por iangambina não foi alterado (pD₂ = 4,5 ± 0,08, E_{máx} = 77,4 ± 5 %, n = 7). Interessantemente, iangambina foi mais potente (p < 0,001) em relaxar as contrações induzidas pelo KCl 80 mM (pD₂ = 4,8 ± 0,05, E_{máx} = 79,9 ± 3,7 %, n = 7) do as contrações induzidas pela fenilefrina (pD₂ = 4,4 ± 0,04, E_{máx} = 75,6 ± 3,1 %, n = 7). Sugerindo que iangambina possa estar atuando sobre os canais para Ca²⁺ dependentes de voltagem. Além do mais, iangambina (10 μM, 30 μM, 100 μM, 300 μM e 1 mM) antagonizou de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por CaCl₂ em meio despolarizante nominalmente sem Ca²⁺. A lignana (10⁻⁷ – 10⁻³ M) induz relaxamento das contrações induzidas pelo S(-)-Bay K 8644, um agonista de canais para Ca²⁺ tipo-L (pD₂ = 4,0 ± 0,04, E_{máx} = 72,9 ± 4,7 %, n = 7). Iangambina (30 μM, 100 μM, 300 μM e 1 mM) não alterou as contrações transientes induzidas por cafeína (20 mM) e/ou fenilefrina (10 μM). Por outro lado, em átrio isolado de rato, iangambina produziu um efeito inotrópico negativo de 37,5 ± 6,4 %. Em miócitos de artéria mesentérica de rato, iangambina (0,1 μM, 30 μM ou 1 mM) inibiu os sinais de Ca²⁺ produzidos por KCl 65,4 mM e S(-)-Bay K 8644. Em conclusão, esses resultados sugerem que o efeito hipotensor induzido por iangambina é provavelmente devido a vasodilatação periférica envolvendo a inibição do influxo de Ca²⁺ através dos canais para Ca²⁺ dependentes de voltagem.

Palavras-chave: iangambina. Hipotensão. Anéis mesentéricos. Ação vasorelaxante. Bloqueador de canais para Ca²⁺.

**Cardiovascular action studies of
yangambin in rats
- Approach *in vivo* and *in vitro* -**

ABSTRACT

The pharmacological effects of yangambin, a furofuran lignan isolated in the pure form the leaves and stem of *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) on the cardiovascular system, were studied in rats using a combined *in vivo* and *in vitro* approach. In normotensive non-anaesthetized rats (n=5), yangambin (1; 5; 10; 20 and 30 mg.kg⁻¹ i.v., randomly) injections produced a hypotension (-3.9 ± 0.2; -7.5 ± 0.6; -9.3 ± 1.3; -15.0 ± 1.9 and -25.5 ± 1.6 mmHg, respectively) probably due to a decrease of the peripheral resistance accompanied by an tachycardic response (21.8 ± 1.7; 22.8 ± 6.1; 32.0 ± 5.2; 42.0 ± 4.8 and 67.5 ± 9.9 bpm, respectively) probably of reflex in origin. In isolated rat mesenteric artery rings, with endothelium intact, yangambin (10⁻⁷ – 10⁻³ M) induced concentration-dependent relaxation of the contractions induced by phenylephrine (1 nM - 10 μM) (pD₂= 4.5 ± 0.06, E_{max} = 78.7 ± 2.9 %, n=9) and this effect was not attenuated by removal of the vascular endothelium (pD₂= 4.4 ± 0.04, E_{max} = 75.6 ± 3.1 %, n=7). These results demonstrated that the vascular endothelium, probably, is not participating in the vasorelaxant response induced by yangambin. Therefore all the experimental protocols were carried out in endothelium-denuded mesenteric rings. In preparations pre-incubated with KCl 20 mM, the vasorelaxant activity was not changed (pD₂= 4.5 ± 0.08, E_{max}=77.4 ± 5 %, n=7). Interestingly, the relaxant effect induced by yangambin was more potent (p<0.001) on the contractile response induced by KCl 80 mM (pD₂ = 4.8 ± 0.05, E_{max}=79.9 ± 3.7 %, n=7) when compared to that induced by phenylephrine (pD₂= 4.4 ± 0.04, E_{max} = 75.6 ± 3.1 %, n=7). Furthermore, in depolarizing nominally without Ca²⁺ medium, yangambin (10 μM, 30 μM, 100 μM, 300 μM and 1 mM) antagonized CaCl₂-induced contractions in a concentration-dependent manner. This lignan (10⁻⁷ – 10⁻³ M) induced relaxation concentration-dependent manner the contraction elicited by the L-type Ca²⁺ channel agonist, S(-)-Bay K 8644 (pD₂= 4.0 ± 0.04, E_{max} = 72.9 ± 4.7 %, n=7). Yangambin (30 μM, 100 μM, 300 μM and 1 mM) did not alter the transients contraction induced by caffeine (20 mM) or phenylephrine (10 μM). On the order hand, in rat isolated atrium, yangambin produced negative inotropic effect of 37.5 ± 6.4 %. In fura-2-loaded myocytes of rat mesenteric arteries, yangambin (0.1 μM, 30 μM or 1 mM) inhibited, in a concentration-dependent manner, the Ca²⁺ signal evoked by KCl 65.4 mM and S(-)-Bay K 8644. In conclusion, these results suggest that the hypotension effect of yangambin is probably due to a peripheral vasodilatation that involves, at least, the inhibiting the Ca²⁺ influx through voltage-dependent Ca²⁺ channels.

Key words: Yangambin. Hypotension. Mesenteric rings. Vasorelaxant action. Calcium channel blocker.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
b.p.m.	batimentos por minuto
Ca ²⁺	íon cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
[Ca ²⁺] _i	concentração de cálcio intracelular
°C	graus Celsius
CO ₂	dióxido de carbono
CE ₅₀	concentração efetiva 50%
DMSO	dimetil sulfóxido
E _{máx}	efeito máximo
e.p.m.	erro padrão da média
FC	freqüência cardíaca
g	gramas
Hz	hertz
IP ₃	trisfosfato de inositol
i.p.	intra-peritoneal
i.v.	intra-venoso
K ⁺	íon potássio
K _{Ca}	canais de K ⁺ sensíveis ao Ca ²⁺
KCl	cloreto de potássio
Kg	quilograma
M	molar
mg	miligramas
ml	mililitro
min.	minuto
mmHg	milímetro de mercúrio
mm	milímetros
mM	milimolar
ms	milisegundo
μL	microlitro

μg	micrograma
μM	micromolar
n	número de experimentos
nM	nanomolar
nm	nanômetro
O ₂	oxigênio molecular
PA	pressão arterial
PAD	pressão arterial diastólica
PAM	pressão arterial média
PAS	pressão arterial sistólica
rpm	rotações por minuto
uv	ultravioleta
vs	versus

Observação: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas internacionalmente.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Ocotea duckei</i> Vattimo	26
Figura 2: Rato Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>).....	35
Figura 3: Aparato utilizado para aquisição de dados de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não anestesiados.....	43
Figura 4: Aparato utilizado para os experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	45
Figura 5: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M). (A) Anéis com endotélio funcionalmente intacto. (B) Anéis sem o endotélio funcionalmente removido	46
Figura 6: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de canais para K^{+} na resposta vasorelaxante induzida por iangambina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional.....	47
Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 80 mM).....	48
Figura 8: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da nifedipina (10^{-14} - 10^{-5} M) frente as contrações induzidas por FEN (1 nM - 10 μ M) (A) e/ou KCl 80 mM (B), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional.	49
Figura 9: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito da iangambina sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de $CaCl_2$ (10^{-6} - 3×10^{-2} M) em meio despolarizante (KCl 65,4 mM) nominalmente sem Ca^{2+}	50
Figura 10: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (200 nM).....	51

Figura 11: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações isoladas da iangambina sobre as contrações transientes induzidas FEN (10 μ M) e/ou cafeína (20 mM) em solução de Tyrode livre de Ca^{2+}	52
Figura 12: Aparato utilizado para aquisição de dados do cronotropismo e inotropismo cardíaco em átrio isolado de rato.....	53
Figura 13: Miócitos de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	57
Figura 14: Aparato utilizado para medida de Ca^{2+} intracelular usando a sonda de fluorescência Fura-2/AM.....	57
Figura 15: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações isoladas da iangambina sobre o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v em miócitos de artéria mesentérica de rato carregados com Fura-2/AM	58
Figura 16: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações isoladas da iangambina sobre o influxo de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} sensíveis a diidropiridinas em miócitos de artéria mesentérica de rato carregados com Fura-2/AM	59
Figura 17: Registro original representativo ilustrando o efeito de doses crescentes da iangambina (1; 5; 10; 20 e 30 mg/Kg, i.v.) sobre a PAS, PAM, PAD (A) e FC (B) em rato normotenso não anestesiado. As setas indicam o momento da administração de iangambina.....	62
Figura 18: Efeitos da iangambina sobre a Pressão Arterial Média (PAM, mmHg) (A) e Freqüência Cardíaca (FC, bpm) (B) em ratos normotensos não anestesiados. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. de 5 experimentos.....	63
Figura 19: Curva concentração-resposta para iangambina (10^{-7} – 10^{-3} M) em anéis intactos de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) (●). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. de 9 experimentos.....	65
Figura 20: Curva concentração-resposta para iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com endotélio intacto (●) e sem endotélio (■), pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 9 e 7 experimentos, respectivamente.....	65

- Figura 21: Curva concentração-resposta para iangambina (10^{-7} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional. O efeito relaxante induzido por iangambina foi determinado na presença de $[K^+]_e = 4$ mM (■) e $[K^+]_e = 20$ mM (▲). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 7 experimentos 66
- Figura 22: Curva concentração-resposta para iangambina (10^{-7} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, pré-contraindo com FEN (1 nM - 10 μ M) (■) e/ou com KCl 80 mM (●). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 7 experimentos..... 67
- Figura 23: Curva concentração-resposta para nifedipina (10^{-14} – 10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, pré-contraindo com FEN 10 μ M (■) e/ou KCl 80 mM (◆). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 experimentos 68
- Figura 24: Curvas concentração-resposta para $CaCl_2$ em solução despolarizante (KCl 65,4 mM) nominalmente sem Ca^{2+} em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato desprovidos de endotélio funcional (Controle) e na presença de concentrações isoladas de iangambina (10, 30, 100, 300 μ M e 1 mM). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 5 experimentos para cada concentração. *** $p < 0,001$ vs Controle..... 70
- Figura 25: Curva concentração-resposta para iangambina (10^{-7} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio vascular, pré-contraindo com S(-)-Bay K 8644 (200 nM) (◆). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. de 7 experimentos 71
- Figura 26: Efeito da iangambina (30, 100, 300 μ M e 1 mM) sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 μ M) (A) e cafeína (20 mM) (B) em anéis de artéria mesentérica superior de rato, sem o endotélio funcional. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 5 experimentos para cada concentração 73
- Figura 27: Curva concentração-resposta para iangambina (10^{-7} – 10^{-3}) em átrio isolado de rato. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 5 experimentos. 74
- Figura 28: Registro original representativo do efeito da iangambina sobre a intensidade de fluorescência em miócito isolado de artéria mesentérica superior de rato carregado com Fura-2/AM. Está representada a razão de emissão de

fluorescência (340/380 nm) de 10^6 contagens em função do tempo. Em meio 1,6 mM de Ca^{+2} a célula foi estimulada com KCl 65,4 mM. Após a lavagem da preparação (L), a célula foi pré-incubada com iangambina (1 mM) e após de 10 minutos estimulada com KCl 65,4 mM (iangambina + KCl 65,4 mM)..... 75

Figura 29: Efeito da iangambina sobre a intensidade de fluorescência em miócitos isolados de artéria mesentérica superior de rato carregados com Fura-2/AM. Os valores estão expressos pelo Δ de fluorescência (efeito final – basal) x 10^6 contagens da razão de emissão de fluorescência (340/380 nm). * $p < 0,05$ vs KCl 65,4 mM, ** $p < 0,01$ vs KCl 65,4 mM..... 75

Figura 30: Registro original representativo do efeito da iangambina sobre a intensidade de fluorescência em miócito isolado de artéria mesentérica superior de rato carregado com Fura-2/AM. Está representada a razão de emissão de fluorescência (340/380 nm) de 10^6 contagens. Em meio 1,6 mM de Ca^{+2} a célula foi estimulada com S(-)-Bay K 8644 (100 nM). Após a lavagem da preparação (L), a célula foi pré-incubada com iangambina (1 mM) e após de 10 minutos estimulada com S(-)-Bay k 8644 (100 nM) (iangambina + Bay K 8644)..... 76

Figura 31: Efeito de iangambina sobre a intensidade da fluorescência em miócitos isolados de artéria mesentérica superior de rato carregados com Fura-2/AM. Os valores estão expressos pelo Δ de fluorescência (efeito final – basal) x 10^6 contagens da razão de emissão de fluorescência (340/380 nm). ** $p < 0,01$ vs S(-)-Bay k 8644 76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Aspectos químicos que caracterizam a iangambina.....	25
Quadro 2: Classificação da pressão arterial para adultos	30
Quadro 3: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito da iangambina (1; 5; 10; 20 e 30 mg/Kg, randomicamente, i.v.) sobre a PAM e FC em ratos normotensos e não anestesiados	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da solução de Tyrode (pH=7,4)	37
Tabela 2: Composição da solução de Tyrode nominalmente sem cálcio (pH=7,4)..	37
Tabela 3: Composição da solução de Tyrode livre de cálcio (pH=7,4).....	37
Tabela 4: Composição da solução despolarizante com cloreto de potássio a 20 mM (pH=7,4)	38
Tabela 5: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 80 mM (pH=7,4)	38
Tabela 6: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 65,4 mM (pH=7,4)	38
Tabela 7: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 65,4 mM nominalmente sem cálcio (pH=7,4)	39
Tabela 8: Composição da solução de Krebs (pH=7,4).....	39
Tabela 9: Composição da solução Hanks (pH=7,4)	39
Tabela 10: Composição da solução Hanks sem cálcio e magnésio (pH=7,4).....	40
Tabela 11: Composição da solução de dissociação (pH=7,4).....	40
Tabela 12: Valores de pD_2 e $E_{máx}$ para iangambina em anéis de artéria mesentérica superior de rato em diferentes condições experimentais	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	GERAL.....	33
2.2	ESPECÍFICOS	33
2.2.1	Estudos <i>in vivo</i>	33
2.2.2	Estudos <i>in vitro</i>	33
3	MATERIAL	35
3.1	ANIMAIS.....	35
3.2	DROGAS	35
3.3	ISOLAMENTO DA IANGAMBINA.....	36
3.4	SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS.....	36
3.5	MEIO DE CULTURA CELULAR.....	40
4	MÉTODOS	42
4.1	ESTUDOS <i>in vivo</i>	42
4.1.1	Medida direta da Pressão Arterial (PA) e Frequência Cardíaca (FC) em ratos normotensos não anestesiados.....	42
4.1.2	Protocolo experimental utilizado nos estudos <i>in vivo</i>	43
4.1.2.1	Avaliação do efeito da iangambina sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.....	43
4.2	ESTUDOS <i>in vitro</i>	44
4.2.1	Ensaio farmacológico utilizando anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	44
4.2.2	Protocolo experimental utilizando anéis de artéria mesentérica superior de rato	45
4.2.2.1	Avaliação do efeito da iangambina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 µM).....	45
4.2.2.2	Avaliação da participação de canais para K ⁺ na resposta vasorelaxante induzida por iangambina em anéis de artéria mesentérica isolada de rato ..	47
4.2.2.3	Avaliação do efeito da iangambina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 80mM)....	48
4.2.2.4	Avaliação do efeito da nifedipina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN e/ou KCl 80 mM	48
4.2.2.5	Avaliação do efeito da iangambina sobre as contrações induzidas por CaCl ₂ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	50
4.2.2.6	Avaliação do efeito da iangambina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644	51

4.2.2.7	Avaliação do efeito da iangambina sobre as contrações transientes induzidas por FEN e/ou cafeína em artéria mesentérica superior isolada de rato	52
4.2.3	Ensaio farmacológico utilizando átrio isolado de rato.....	53
4.2.4	Protocolo experimental utilizado átrio isolado de rato	54
4.2.4.1	Avaliação do efeito da iangambina em átrio isolado de rato	54
4.2.5	Ensaio bioquímico	54
4.2.6	Preparação das lamínulas.....	54
4.2.7	Isolamento dos miócitos de artéria mesentérica superior de rato	54
4.2.8	Cultura primária dos miócitos de artéria mesentérica de rato	55
4.2.9	Carregamento das células com a sonda de fluorescência Fura-2/AM	55
4.2.10	Protocolos experimentais empregados nos ensaios bioquímicos	57
4.2.10.1	Avaliação do efeito da iangambina sobre o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v em miócitos de artéria mesentérica de rato	57
4.2.10.2	Avaliação do efeito da iangambina sobre o influxo de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} sensíveis a diidropiridinas	58
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
5	RESULTADOS	61
5.1	ESTUDOS <i>in vivo</i>	61
5.1.1	Efeitos da iangambina sobre a Pressão Arterial Média (PAM) e Freqüência Cardíaca (FC) em ratos normotensos não anestesiados	61
5.2	ESTUDOS <i>in vitro</i>	64
5.2.1	Estudos utilizando anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	64
5.2.1.1	Efeito da iangambina sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença ou ausência do endotélio funcional.....	64
5.2.1.2	Efeito do KCl 20 mM sobre a resposta relaxante induzida por iangambina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional	66
5.2.1.3	Efeito da iangambina sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, pré-contraídos com KCl 80 mM	67
5.2.1.4	Efeito da nifedipina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN e/ou KCl 80 mM.....	68
5.2.1.5	Efeito da iangambina sobre as contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante e nominalmente sem Ca^{2+} em anéis de artéria mesentérica isolada de rato, sem endotélio funcional.....	69
5.2.1.6	Efeito da iangambina sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional	71
5.2.1.7	Efeito da iangambina sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 μ M) e/ou cafeína (20 mM), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	72
5.2.2	Estudos com átrio isolado de rato.....	73

5.2.2.1	Efeito da iangambina sobre átrio isolado de rato	73
5.2.3	Ensaio Bioquímico	74
5.2.3.1	Efeito da iangambina sobre o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por KCl (65,4 mM) em miócitos de artéria mesentérica de rato	74
5.2.3.2	Efeito da iangambina sobre o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por S(-)-Bay K 8644 em miócitos de artéria mesentérica de rato	76
6	DISCUSSÃO.....	78
7	CONCLUSÕES	86
8	PERSPECTIVAS	88
	REFERÊNCIAS.....	90

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas desde a antiguidade no tratamento de doenças humanas, principalmente como preparações caseiras, em todo mundo. Adicionalmente aos extratos, compostos isolados também são utilizados em preparações industriais. Além disso, a terapêutica moderna, composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas, canais iônicos, não teria atingido o grau de desenvolvimento atual se não fosse o auxílio dos produtos naturais, notadamente aqueles derivados das plantas superiores (DI STASI, 1996).

Muitas evidências apontam as plantas medicinais como a mais antiga e principal forma de medicação difundida no mundo. Até o último século, a maioria dos medicamentos foi derivada de plantas ou de fonte animal (MCNEILL; JURGENS, 2006).

Desta forma, as plantas pelas suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, adquiriram fundamental importância na medicina popular. A flora brasileira é riquíssima em exemplares que são utilizados pela população para fins medicinais. Toda planta que é administrada de alguma forma e, por qualquer via ao homem ou animal exercendo sobre eles uma ação farmacológica qualquer é denominada de planta medicinal (CRAVO, 1999). Além do mais, as plantas medicinais sempre foram objeto de estudo na tentativa de descobrir novas fontes de obtenção de princípios ativos.

O isolamento de substâncias de origem vegetal foi, e continua sendo uma importante fonte de obtenção de fármacos. Estima-se que cerca de vinte e cinco mil espécies de plantas são usadas em todo o mundo para produção de medicamentos (LANDINI, 1997). Este interesse pelos vegetais tem justificativa econômica e mercadológica, pois as plantas, entre outros fatores, anulam a fase de síntese, já que elas próprias sintetizam os compostos que produzem, reduzindo assim os custos das pesquisas em novas drogas (GALVÃO, 1987).

Várias espécies vegetais já foram amplamente estudadas e muitas substâncias foram isoladas, identificadas e, posteriormente, utilizadas no tratamento de várias doenças. A aspirina é um bom exemplo. Amplamente prescrita por suas

ações analgésica, antipirética e antiinflamatória, é um simples derivado do composto de origem natural ácido salicílico, obtido originalmente da árvore Salgueiro (*Salix* spp) (VANE, 1994). Baseados nisto, a busca por novas substâncias químicas presentes em espécies vegetais, que possam ser utilizadas na terapêutica, são de extrema importância para preservação da vida.

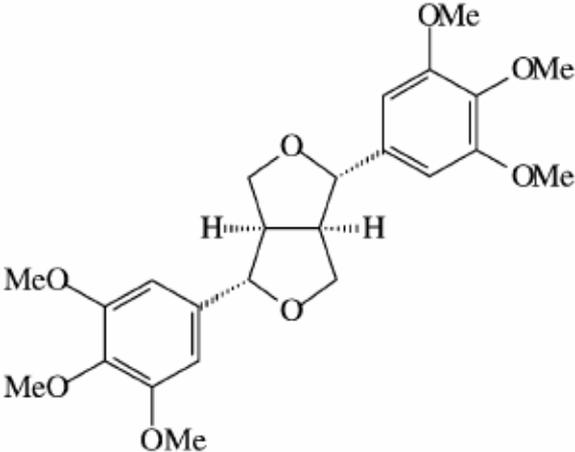
A literatura botânica, do ponto de vista descritivo, relata cerca de 200 espécies do gênero *Ocotea* que ocorrem, em geral, em florestas úmidas tropicais e subtropicais. Quimicamente, este gênero apresenta uma grande diversidade de classes de substâncias cujos principais metabólitos são monoterpenos, alcalóides, lignanas e neolignanas (BARBOSA FILHO, 1999).

As lignanas são metabólitos secundários de plantas originadas da via dos fenilpropanóides, dos quais são formados biologicamente pela via do ácido chiquímico, apresentando uma vasta distribuição no reino das plantas e estando presente nas pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (MASSANET et al., 1988). Estes metabólitos já foram identificados e isolados em cerca de 70 famílias diferentes, em todas as partes da planta, sendo a maioria destes utilizado pela medicina popular (MASSANET et al., 1988).

O papel das lignanas na defesa da planta foi sugerido devido as suas vastas atividades antimicrobianas, antifúngicas, antiviral e antioxidante. Neste contexto, estudos farmacológicos demonstraram também a eficácia das lignanas como agentes antivirais e antioxidantes (TIBIRIÇÁ, 2001). Apresentam também atividade inibitória da fosfodiesterase III, responsável por metabolizar o mensageiro secundário AMPc (3,5 – monofosfato de adenosina cíclica), mostrando seu potencial terapêutico como agente cardiotônico (GHISALBERTI, 1997). Algumas lignanas também apresentaram atividade antagonista de receptor de PAF (Fator ativador de Plaqueta) e bloqueadora de canal para Ca^{2+} tipo-L (GHISALBERTI, 1997; TIBIRIÇÁ, 2001). Adicionalmente, as lignanas podem ligar-se com baixa afinidade a receptores ETa de endotelina (HUSSAIN et al., 1995 apud TIBIRIÇÁ, 2001).

As lignanas podem ser classificadas, de acordo com a estrutura química, em: furofuranas, tetrahydrofuranas, dibenzilbutanas, dibenzilbutirolactonas, ariltetrahidronaftalenos, arilnaftalenos, 2,7-ciclolignan-9'-olides e dibenzociclooctadienos. Dentre estas as mais comuns são as furofurânicas, tais como a iangambina (GHISALBERTI, 1997).

A iangambina (Quadro 1), uma lignana furofurânica e objeto de estudo do nosso trabalho, já foi isolada de cerca de 20 espécies de plantas em diferentes partes do mundo tais como América do Sul e do Norte, África e Europa (TIBIRIÇÁ, 2001). Esta lignana já foi isolada, por exemplo, das espécies *Rollinia pickeli*, *Rollinia exalbida* e *Rollinia mucosa*, todas pertencentes à família Annonaceae (MESQUITA et al., 1988). Também foi isolada da *Magnolia biondii* pertencente à família Magnoliaceae e na *Ocotea duckei* da família Lauraceae (MESQUITA et al., 1988; MORAIS et al., 1999; TIBIRIÇÁ, 2001).

▪ ASPECTOS QUÍMICOS:
- Nome: iangambina
- Classe de metabólico secundário: Lignana furofurânica
- Fórmula Molecular: C ₂₄ H ₃₀ O ₈
- Estrutura Molecular:

- Peso Molecular: 446
- Aspecto: pó amorfo de coloração branca
- Solubilidade: Clorofórmio (CHCl ₃)

Quadro 1: Aspectos químicos que caracterizam a iangambina

A *Ocotea duckei* Vattimo (Figura 1) é um vegetal de porte arbóreo pertencente à família Lauraceae, conhecida popularmente como louro de cheiro, louro pimenta ou louro canela. É vastamente encontrado no Nordeste brasileiro nos estados da Paraíba, Pernambuco, Ceará, Sergipe e Bahia (MORAIS et al., 1999).

Das folhas e das cascas do caule da *Ocotea duckei* Vattimo foi isolada iangambina na forma de cristais brancos, com fórmula molecular $C_{24}H_{30}O_8$ e peso molecular de 446 (MORAIS et al., 1999).



Figura 1: *Ocotea duckei* Vattimo

Várias atividades biológicas foram atribuídas a iangambina, tais como: antagonista seletivo do receptor de PAF no sistema cardiovascular e em plaquetas, tornando-se o primeiro antagonista deste receptor capaz de discriminar entre os dois tipos de receptores de PAF existentes nas plaquetas e nos polimorfonucleares (CASTRO-FARIA-NETO et al., 1995 a, b; TIBIRIÇÁ et al., 1996; HEBERT et al., 1997); agente farmacológico efetivo contra colapsos cardiovasculares e mortalidades por choques endotóxicos (TIBIRIÇÁ et al., 1996; RIBEIRO et al., 1996; ARAÚJO et al., 2001); atividade anti-alérgica (SERRA et al., 1997). A nível de Sistema Nervoso Central, aumentou o tempo de sono induzido por pentobarbital e bloqueou as convulsões induzidas por pentilenotretazol (ALMEIDA et al., 1995; PACHÚ et al., 1993). Além disso, não apresentou efeito mutagênico na linhagem bacteriana *S. typhimurium* (MARQUES et al., 2003).

Em estudos de toxicidade aguda, a administração oral ou intraperitoneal de iangambina até a dose de 1g/Kg, não induziu mortes em camundongos no período de 48 horas (TIBIRIÇÁ, 2001).

Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, demonstramos que iangambina foi capaz de relaxar aorta torácica isolada de rato, através de dois

mecanismos distintos, um dependente de endotélio envolvendo a ativação de receptores muscarínicos M_3 , e uma via independente de endotélio que parece envolver o bloqueio de canais para Ca^{2+} (ALENCAR, 2001).

O sistema cardiovascular é o principal responsável pela regulação e manutenção da pressão arterial, uma das funções fisiológicas mais complexas do sistema biológico; necessitando da ação integrada de outros sistemas como o renal, neural e endócrino. (CAMPAGNOLE SANTOS; HAIBARA, 2001).

A pressão arterial (PA) que é o resultado do débito cardíaco multiplicado pela resistência vascular periférica total (RVPT) pode ser influenciada pela ação de drogas sobre um ou ambos os parâmetros (OASTES et al., 1996 apud HARDMAN et al., 1996). A RVPT é influenciada por modificações tensionais no músculo liso vascular e está diretamente envolvida no controle da pressão arterial.

O tônus vascular das pequenas artérias e arteríolas, estado de contratilidade das células musculares lisas vasculares (CMLV), é o maior determinante da resistência ao fluxo sanguíneo na circulação (JACKSON, 2000) e conseqüentemente da pressão sanguínea sistêmica (CRIBBS, 2006). Assim, o tônus vascular tem um importante papel na regulação da pressão arterial e distribuição do fluxo sanguíneo entre os tecidos e órgãos do corpo (JACKSON, 2000).

A regulação do tônus vascular é dependente de uma interação entre estímulos vasodilatadores e vasoconstritores gerados por sinais variados, tais como: hormônios circulantes, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio, sinais elétricos e/ou mecânicos, como a própria pressão sanguínea (JACKSON, 2000; CRIBBS, 2006). Todos estes sinais são integrados no miócito vascular para determinar a atividade contrátil do músculo, estabelecendo assim o diâmetro e a resistência dos vasos sanguíneos (JACKSON, 2000). Os canais iônicos, principalmente os canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v), desempenham um papel central neste processo.

Os canais iônicos são importantes reguladores da contratilidade do músculo liso, pois funcionam como moduladores do potencial de membrana plasmática e das concentrações de Ca^{2+} no meio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). (KEVIN; NELSON, 2005).

Os canais Ca_v são considerados a principal via de entrada de Ca^{2+} do meio extracelular para as CMLV (CRIBBS, 2006). Eles consistem em um grande complexo multimérico composto por uma subunidade α_1 formadora do poro e outras

subunidades menores (β , $\alpha 2\delta$ e γ). A subunidade $\alpha 1$ apresenta quatro domínios (I-IV) homólogos, contendo cada um seis segmentos em α -helices transmembranares (S1 a S6). Cada domínio contém um sensor de voltagem localizado no segmento S4 que contém resíduos de aminoácidos carregados positivamente. Alças que entram para região transmembrana entre o segmento S5 e S6, contém quatro resíduos de aminoácidos Glu-Glu-Glu-Glu (EEEE), formando o apertado filtro de seletividade iônica, na parte extracelular do poro (YU; CATTERALL, 2004; SONKUSARE et al., 2006).

São dez genes humanos que codificam a subunidade $\alpha 1$ do Ca_v (subunidade formadora do poro) que se agrupam em três subfamílias distintas, são elas: canais $Ca_v 1$ (Cav 1.1 – 1.4), que conduzem correntes tipo-L; canais $Ca_v 2$ (2.1 – 2.3), que conduzem correntes tipo-N, P/Q e R; Canais $Ca_v 3$ (Cav 3.1-3.3), que conduzem corrente tipo-T (LIPSCOMBE et al., 2004; YU; CATTERALL, 2004; CRIBBS, 2006).

As células musculares lisas vasculares expressam dois tipos de canais Ca_v , os $Ca_v 1$ (tipo-L) e os $Ca_v 3$ (tipo-T). Os canais para Ca^{2+} tipo-L são caracterizados por gerar correntes de Ca^{2+} ativadas por altos valores de voltagens, além de apresentarem sensibilidade às diidropiridinas. Quando as CMLV despolarizam, ocorrem abertura dos canais para Ca^{2+} tipo-L levando ao aumento de Ca^{2+} intracelular, contração celular e vasoconstrição (CRIBBS, 2006). Entretanto, a hiperpolarização induz fechamento destes canais levando a vasodilatação (JACKSON, 2000).

No entanto, os canais para Ca^{2+} tipo-T são ativados em baixos valores de voltagem, são caracterizados pela sua rápida ativação, correntes transientes de inativação rápida e relativa insensibilidade a agentes que bloqueiam os canais para Ca^{2+} tipo-L (PEREZ-REYES, 2003). Apesar de existirem dados na literatura reportando a presença destes canais nos miócitos vasculares, são os canais tipo-L que parecem ser dominantes na maioria dos leitos vasculares (JACKSON, 2000).

Nelson e colaboradores (1990) relataram que a composição das subunidades formadoras dos canais Ca_v vasculares é um determinante do tônus vascular e dos níveis de pressão sanguínea. Além disso, estes canais inativam lentamente durante despolarizações sustentadas, de maneira que o influxo de Ca^{2+} através de uma fração de canais Ca_v é suficiente para mediar a contração induzida

por pressão em pequenas artérias, contribuindo desta maneira para auto-regulação dinâmica de vários leitos vasculares (NELSON et al., 1990, SONKUSARE et al., 2006).

Então, o sustentado influxo de Ca^{2+} , por canais Ca_v , induz um nível tônico de vasoconstrição e também cria um modelo excitatório que auxilia na ação de substâncias vasoativas endógenas para melhor modular o diâmetro arterial (SONKUSARE et al., 2006).

Devido a estas importantes funções dos canais Ca_v no controle do tônus vascular, anormalidades nestes canais são consideradas como parte da extensiva adaptação biológica e morfológica que caracteriza a hipertensão. Inicialmente, durante aumentos agudos na pressão sanguínea, pequenas artérias e arteríolas mostram uma imediata despolarização dependente de estiramento e contração, comumente referida como resposta miogênica. Esta resposta depende da abertura dos canais Ca_v tipo-L nas células musculares lisas vasculares para induzir contração (NELSON et al. 1990 apud SONKUSARE et al., 2006). A resposta miogênica, nas pequenas artérias e arteríolas, pode amplificar o aumento inicial na pressão sanguínea, devido ao maior aumento da RVPT, podendo levar a hipertensão (SONKUSARE et al., 2006).

Existem dois mecanismos que parecem estar envolvidos no elevado nível de influxo de Ca^{2+} , pelos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem, e indução da hipertensão. Primeiro, uma diminuição na condutância ao K^+ levando a despolarização e abertura dos canais Ca_v tipo-L (STEKIEL et al., 1993). Segundo, um aumento do número de subunidades α_{1C} , ou seja, de canais Ca_v tipo-L na CMLV (PESIC et al., 2004). Além disso, Ohya e colaboradores (1993) relataram que em CMLV renal, mesentérica e cerebral de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), apresentaram um aumento no número de canais para Ca^{2+} tipo-L. Com isso, observa-se a importância dos canais Ca_v tipo-L no controle do tônus vascular e seu envolvimento na patogênese da hipertensão.

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem um grave problema de saúde pública, pois correspondem à cerca de 30% de todas as mortes ocorridas no mundo, com cerca de 80% destas ocorrendo em países em desenvolvimento (GAZIANO et al., 2006). No Brasil, as DCV representam a primeira causa de morte, sendo que um terço dos óbitos por DCV, ocorrem precocemente em adultos na faixa etária de 35 a 64 anos. Nesta faixa etária, as principais causas de óbito por doenças

do aparelho circulatório são as doenças isquêmicas do coração, as doenças cerebrovasculares e as doenças hipertensivas (ISHITANI et al., 2006).

Segundo Chobanian e colaboradores (2003) os valores de pressão sanguínea, em indivíduos adultos, são classificados como normais, pré-hipertensão, hipertensão estágio 1 e hipertensão estágio-2 (quadro 2).

Classificação das Pressões Sanguíneas	Pressão Sanguínea Sistólica	Pressão Sanguínea Diastólica
Normal	< 120	e < 80
Pré-Hipertensão	120 - 139	ou 80 - 89
Hipertensão estágio 1	140 - 159	ou 90 - 99
Hipertensão estágio 2	≥ 160	ou ≥ 100

Quadro 2: Classificação da pressão arterial para adultos

O estado hipertensivo está associado com várias anomalias estruturais no sistema cardiovascular (FOLKOW, 1982). Estas incluem aumento da parede em relação a luz das artérias (SAFAR et al., 1981), aumento na resistência periférica, diminuição da complacência venosa (TAKESHITA; MARK, 1979), aumento da quantidade da massa cardíaca e muscular lisa (FOLKOW, 1982), além de anomalias intrínsecas na função renal (COLEMAM et al., 1975).

As alterações observadas na hipertensão decorrem, em parte, do aumento na contractilidade da camada muscular lisa que forma a parede da artéria e algumas substâncias químicas do próprio organismo é que promovem a contração das artérias. Em situações de desequilíbrio dessas substâncias, ou da alteração dessa camada muscular ocorre o aumento da pressão do sangue dentro dos vasos (KAPLAN, 2001).

Atualmente existem diversas substâncias amplamente utilizadas no tratamento da hipertensão, as quais incluem vários grupos de drogas tais como: os inibidores da enzima conversora da angiotensina (LUND-JOHANSEN; OMVIK, 1993; TOMHS, 1991; SCHIFFRIN et al., 1994), bloqueadores dos receptores β -adrenérgicos (AALKJAER et al., 1987; SCHIFFRIN et al., 1994, KUROEDOV et al., 2004), diuréticos (AALKJAER et al., 1987; FREIS, 1983; WELSH; FERRO et al., 2004), antagonistas dos receptores da angiotensina II (AZIZI, 2004), antagonistas dos receptores α 1-adrenérgicos (BRUNNER et al., 1993; KARLBERG, 1993; INSEL,

1996) e os bloqueadores dos canais para Ca^{2+} (TOMHS, 1991; MROCZEK et al., 1991).

Os bloqueadores de canais para Ca^{2+} estão dentre as drogas cardiovasculares mais frequentemente prescritas. Como o Ca^{2+} desempenha um papel central em muitos processos fisiológicos, é comumente relatada que os bloqueadores de canais para Ca^{2+} possuem muitas propriedades clínicas importantes para tratamento de uma vasta variedade de desordens clínicas, tais como: várias arritmias cardíacas, síndromes isquêmicas miocárdicas, anginas, cardiomiopatias hipertróficas e hipertensão arterial (DEEDWANIA, 1982).

Portanto, baseados na grande importância dos canais Ca_v no controle das funções cardiovasculares, bem como as vastas ações dos bloqueadores de canais para Ca^{2+} , se torna de extrema importância a avaliação de novas substâncias que possam apresentar esse perfil farmacológico. E considerando que a literatura disponível não aborda trabalhos efetivamente direcionados para as atividades hipotensoras e vasorelaxantes desta lignana de forma mais detalhada, este trabalho buscou avaliar tais propriedades cardiovasculares através de uma abordagem *in vivo* e *in vitro*.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos pela iangambina em ratos normotensos através de uma abordagem *in vivo* e *in vitro*, procurando elucidar os possíveis mecanismos implicados nestes efeitos.

2.2 ESPECÍFICOS

2.2.1 Estudos *in vivo*

- Estudar os efeitos de iangambina, sobre a Pressão Arterial (PA) e Frequência Cardíaca (FC) em ratos normotensos e não anestesiados.

2.2.2 Estudos *in vitro*

- Caracterizar o efeito de iangambina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato;

- Avaliar a participação dos canais para K^+ e Ca^{2+} neste efeito;

- Estudar os efeitos de iangambina sobre o cronotropismo e inotropismo cardíaco em átrio isolado de rato;

- Estudar as alterações na $[Ca^{2+}]_i$ induzidas por iangambina.

Material

3 MATERIAL

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados para todos os experimentos ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) (Figura 2), pesando entre 260-300 gramas, os quais foram provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes Medeiros da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Estes animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas (6 - 18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água.



Figura 2: Rato Wistar (*Rattus norvegicus*)

3.2 DROGAS

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas: tiopental sódico (Cristália), sal sódico de heparina (Roche), S(-)-Bay K 8644 (RBI/Sigma), nifedipina (Sigma), nitroprussiato de sódio (Sigma), cloridrato de L (-) fenilefrina (Sigma), cloridrato de acetilcolina (Sigma), cafeína (Sigma), EGTA

(Sigma), Fura-2/AM (Sigma), poli-L-lisina (Sigma), albumina sérica bovina (Sigma), Azul de Tripan (Sigma).

Para a preparação das soluções estoques, a nifedipina e o S(-)-Bay K 8644 foram dissolvidas em etanol absoluto e diluídos em água destilada, de modo a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental. O fura-2/AM foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO). As demais drogas foram dissolvidas em água destilada.

3.3 ISOLAMENTO DA IANGAMBINA

Iangambina, o objeto do nosso estudo, foi obtida das folhas e das cascas do caule da *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) de acordo com o procedimento previamente descrito por DE QUEIROZ – PAULO et al., 1991. A *Ocotea duckei* Vattimo foi coletada em Santa Rita – PB e identificada pela Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Agra do LTF/UFPB. Uma exsicata do material botânico foi depositada no herbário Lauro Pires Xavier sob N^o de registro AGRA 4309.

Iangambina foi isolada e cedida pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da UFPB. Para a realização dos ensaios farmacológicos, a iangambina foi solubilizada em cremofor (duas gotas por mL de solução) e diluída em água destilada (experimentos *in vitro*) ou em NaCl 0,9% (experimentos *in vivo*) de modo a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental. Nos ensaios bioquímicos, iangambina foi solubilizada em Tween 80 e diluída em água destilada.

3.4 SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

Para a preparação das soluções fisiológicas foram utilizados as seguintes substâncias: cloreto de sódio (NaCl) (MERCK), cloreto de potássio (KCl) (MERCK), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl₂.2H₂O) (MERCK), sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄.7H₂O) (MERCK), cloreto de magnésio hexa-hidratado (MgCl₂.6H₂O) (MERCK), glicose (C₆H₁₂O₆) (MERCK), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (VETEC), fosfato de sódio mono-hidratado (NaH₂PO₄.H₂O) (VETEC) e

fosfato de potássio (KH_2PO_4) (VETEC), HEPES (Sigma), EGTA (Sigma), colagenase tipo II-S (Sigma).

As Tabelas a seguir mostram as composições das soluções fisiológicas utilizadas:

A) Soluções fisiológicas para anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Tabela 1: Composição da solução de Tyrode (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,05
NaHCO_3	10,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Tanaka et al., (1999).

Tabela 2: Composição da solução de Tyrode nominalmente sem cálcio (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,05
NaHCO_3	10,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de Tanaka et al., (1999).

Tabela 3: Composição da solução de Tyrode livre de cálcio (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,05
NaHCO_3	10,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,42
Glicose	5,6
EGTA	1,0

Fonte: Adaptado de Tanaka et al., (1999).

Tabela 4: Composição da solução despolarizante com cloreto de potássio a 20 mM (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	142,3
KCl	20,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,0
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de Tanaka et al., (1999).

Tabela 5: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 80 mM (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	82,3
KCl	80,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,0
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de Tanaka et al., (1999).

Tabela 6: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 65,4 mM (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	96,9
KCl	65,4
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,0
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de Tanaka et al., (1999).

Tabela 7: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 65,4 mM nominalmente sem cálcio (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	96,9
KCl	65,4
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de Tanaka et al., (1999).

B) Soluções fisiológicas para átrio isolado de rato

Tabela 8: Composição da solução de Krebs (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	118,4
KCl	4,7
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,2
NaHCO ₃	25,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	11,0
Glicose	10,0

Fonte: Nasa et al. (1992).

C) Soluções fisiológicas para miócitos isolados de artéria mesentérica superior isolada de rato

Tabela 9: Composição da solução Hanks (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	145,0
KCl	5,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,6
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,5
Glicose	10,0
HEPES	10,0

Tabela 10: Composição da solução Hanks sem cálcio e magnésio (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	145,0
KCl	5,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,5
Glicose	10,0
HEPES	10,0

Tabela 11: Composição da solução de dissociação (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	145,0
KCl	5,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,6
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,5
Glicose	10,0
HEPES	10,0
Colagenase tipo II-S	0,03*

* mg/mL

3.5 MEIO DE CULTURA CELULAR

Para cultura dos miócitos de artéria mesentérica de rato foi utilizado meio de cultura DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina 2 mM, 1% de penicilina 10.000 U e estreptomicina 10.000 µg.

Métodos

4 MÉTODOS

Foram utilizadas duas formas diferentes de abordagens: uma com ensaios farmacológicos *in vivo*, utilizando animais íntegros, e outra com ensaios farmacológicos *in vitro*, utilizando órgãos isolados e cultura primária de célula muscular de artéria mesentérica superior de rato. Todos os animais foram sacrificados, seguindo as normas de cuidados com animais, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB, parecer nº 0201/07.

4.1 ESTUDOS *in vivo*

4.1.1 Medida direta da Pressão Arterial (PA) e Frequência Cardíaca (FC) em ratos normotensos não anestesiados

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.), e cateteres de polietileno (PE), segmentos de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), foram implantados na aorta abdominal e na veia cava inferior, via artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (*scapulae*).

A PA e FC foram medidas 24 h após o procedimento cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (Statham P23 ID; Gould, Cleveland, OH, EUA) acoplado a um amplificador (Modelo TBM-4M, WPI, Sarasota, FL, EUA), conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital (CIO-DAS16/JR, Computer Boards, Inc., Mansfield, MA, EUA) contendo o programa CVMS (WPI, Sarasota, FL, EUA) (Figura 3). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou a pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), e o intervalo de pulso, referido como FC. O cateter venoso foi implantado para a administração das drogas.

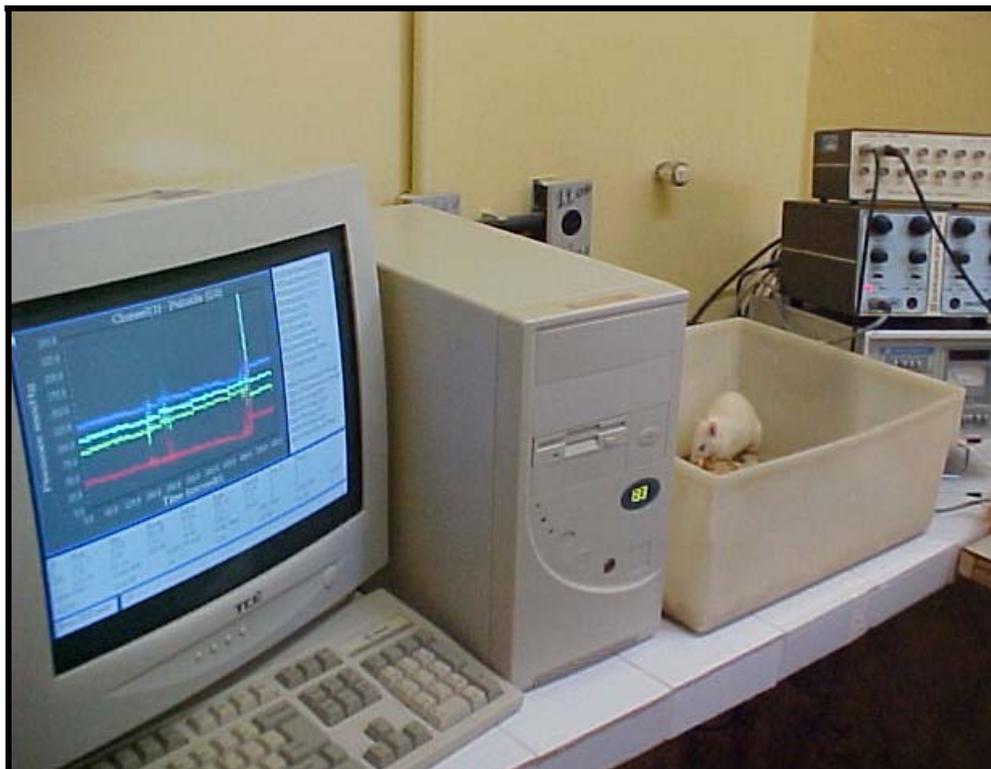
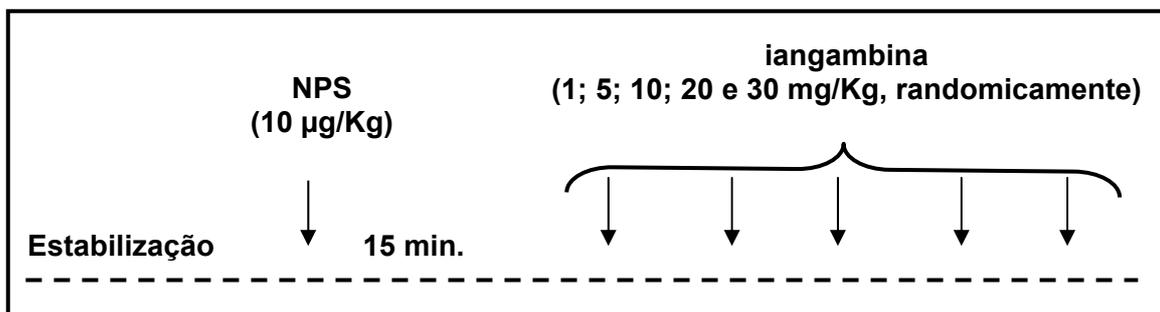


Figura 3: Aparato utilizado para aquisição de dados de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não anestesiados

4.1.2 Protocolo experimental utilizado nos estudos *in vivo*

4.1.2.1 Avaliação do efeito da iangambina sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados

Para obtenção de uma curva dose-resposta, os animais foram mantidos em aclimação por um período de no mínimo 30 minutos, para estabilização dos parâmetros cardiovasculares, e em seguida administrou-se nitroprussiato de sódio (NPS) (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) para verificar a eficácia da implantação do cateter venoso. Após 15 min., doses diferentes de iangambina (1; 5; 10; 20 e 30 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, i.v.) foram administradas randomicamente (Quadro 3) com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores da linha de base. Os valores de PAM e FC foram computados antes (valores da linha de base) e após a administração de iangambina, e suas variações foram expressas em valores absolutos.



Quadro 3: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito da iangambina (1; 5; 10; 20 e 30 mg/Kg, randomicamente, i.v.) sobre a PAM e FC em ratos normotensos e não anestesiados

4.2 ESTUDOS *in vitro*

4.2.1 Ensaios farmacológicos utilizando anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Os ratos foram sacrificados por concussão cerebral seguida por secção dos vasos cervicais. Através de uma laparotomia, retirou-se a artéria mesentérica superior. Anéis do primeiro segmento da artéria (1 - 2 mm) foram obtidos livres de tecido conectivo e adiposo. Os anéis foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode (Tabela 1), a 37° C e gaseificada com uma mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂ (carbogênio). Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (FORT 10, WPI, Sarasota, EUA), o qual estava acoplado a um sistema de aquisição (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA) para o registro das tensões isométricas (Figura 4). Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de estabilização de 60 minutos. Durante este tempo, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 minutos para prevenir a produção de metabólitos indesejáveis (ALTURA; ALTURA, 1970).

A presença de endotélio funcional foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de 10 µM de acetilcolina (ACh). Foram considerados com endotélio funcional (E⁺), os anéis com relaxamento superior a 90% sobre a pré-contração com 10µM de fenilefrina (FEN). Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10 %, foram considerados sem endotélio funcional (E⁻). Os anéis sem endotélio funcional foram obtidos através do atrito entre as paredes internas do vaso com uma haste de metal. Anéis com relaxamentos entre 10% e 90 % foram descartados.



Figura 4: Aparato utilizado para os experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

4.2.2 Protocolo experimental utilizando anéis de artéria mesentérica superior de rato

4.2.2.1 Avaliação do efeito da iangambina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M)

Após um período de 60 minutos de estabilização das preparações, concentrações crescentes de iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M), foram adicionadas cumulativamente aos anéis pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) (Figura 5). O efeito vasorelaxante de iangambina foi avaliado em anéis com o endotélio funcional intacto e anéis com o endotélio funcionalmente removido, em ambas as preparações a concentração de FEN (1 nM - 10 μ M) foi ajustada para obtenção de contrações de magnitude semelhante (AU et al., 2004). A percentagem de relaxamento induzida por iangambina foi calculada pela comparação da resposta antes e após a adição da lignana, considerando-se que a tensão desenvolvida por FEN (1 nM - 10 μ M)

equivale a 0 % de relaxamento e que a tensão de repouso é igual a 100 % de relaxamento. Os valores pD_2 foram obtidos como descrito posteriormente no item 4.3. A partir da observação inicial que a integridade do endotélio não interfere no vasorelaxamento induzido por iangambina, os experimentos subsequentes foram realizados em preparações sem endotélio funcional.

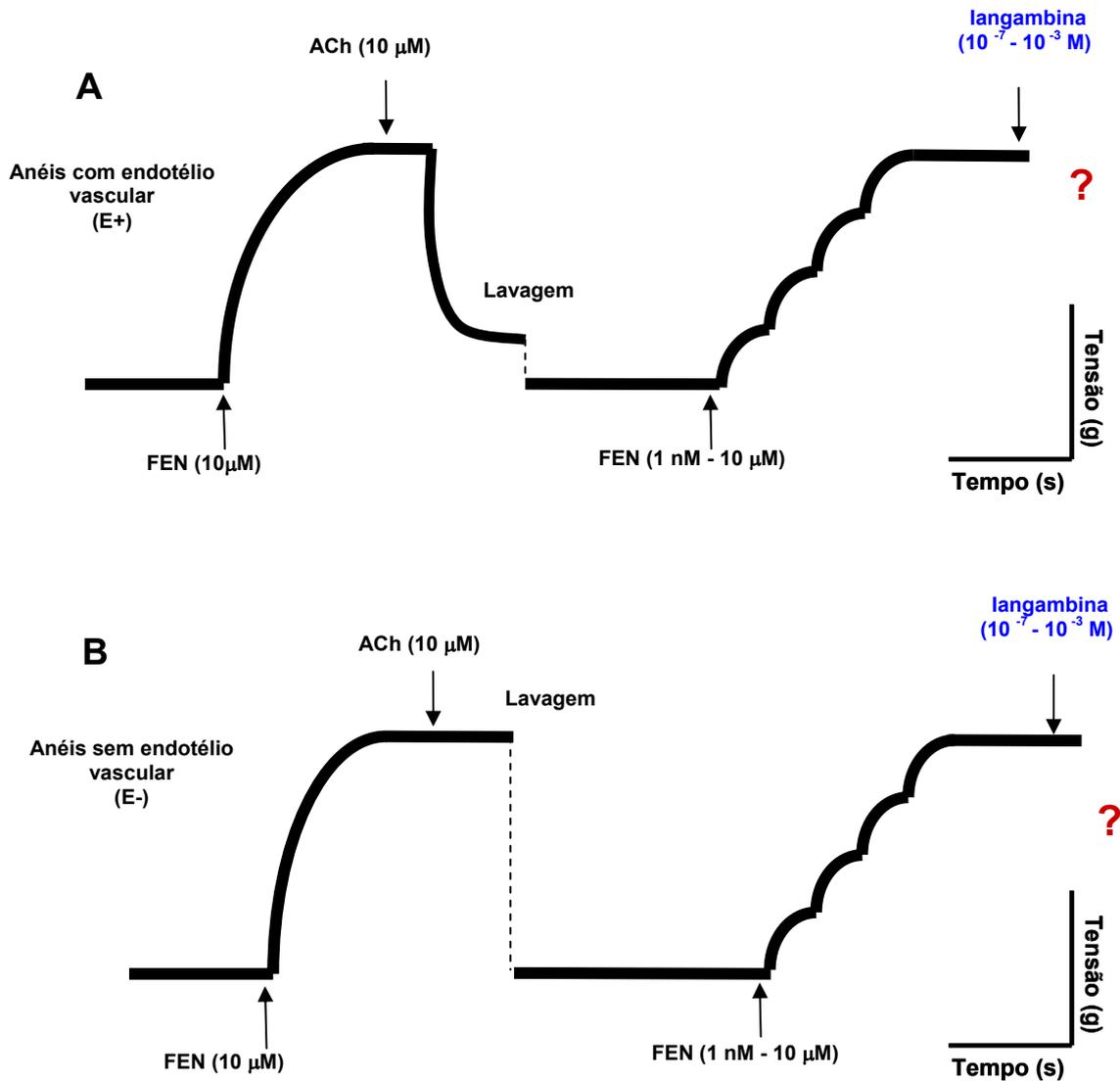


Figura 5: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da iangambina ($10^{-7} - 10^{-3}$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μM). **(A)** Anéis com endotélio funcionalmente intacto. **(B)** Anéis sem o endotélio funcionalmente removido

4.2.2.2 Avaliação da participação de canais para K^+ na resposta vasorelaxante induzida por iangambina em anéis de artéria mesentérica isolada de rato

Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito no item 4.2.1, a solução de Tyrode (Tabela 1) das cubas foi trocada pela solução despolarizante de Tyrode com KCl 20 mM (KCl 20) (Tabela 4) e as preparações permaneceram nesta solução até o final do experimento. Este procedimento impede parcialmente o efluxo de K^+ e atenua relaxamentos mediados por abertura de canais para K^+ (CLARK; FUCHS, 1997; CAMPBELL; HARDER, 1999). Decorridos 30 minutos da incubação da solução de KCl 20 mM, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (1 nM - 10 μ M) e, em seguida, uma curva concentração-resposta para iangambina foi obtida. O valor pD_2 foi obtido como descrito posteriormente no item 4.3 (Figura 6).

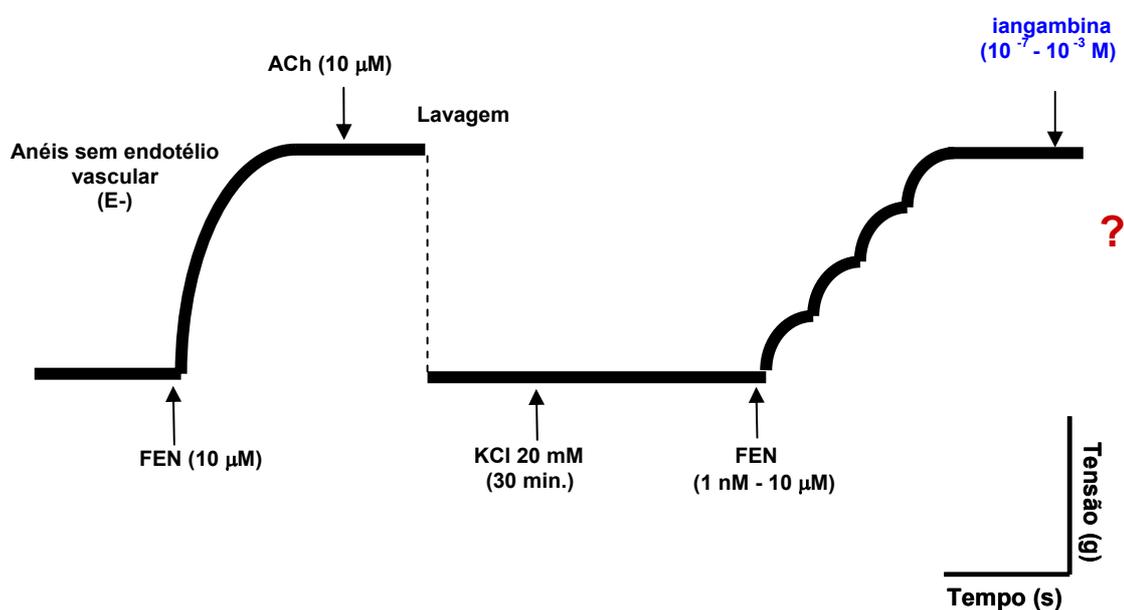


Figura 6: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de canais para K^+ na resposta vasorelaxante induzida por iangambina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional

4.2.2.3 Avaliação do efeito da iangambina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 80mM)

Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito no item 4.2.1, concentrações crescentes de iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) foram adicionadas cumulativamente aos anéis pré-contraídos com KCl (80 mM) (Tabela 5). A porcentagem de relaxamento induzida por iangambina foi calculada pela comparação da resposta antes e após a adição da lignana e considerando-se que a tensão desenvolvida por KCl 80 mM equivale a 0 % de relaxamento e que a tensão de repouso é igual a 100 % de relaxamento. O valor de pD_2 foi obtido como descrito posteriormente no item 4.3 (Figura 7).

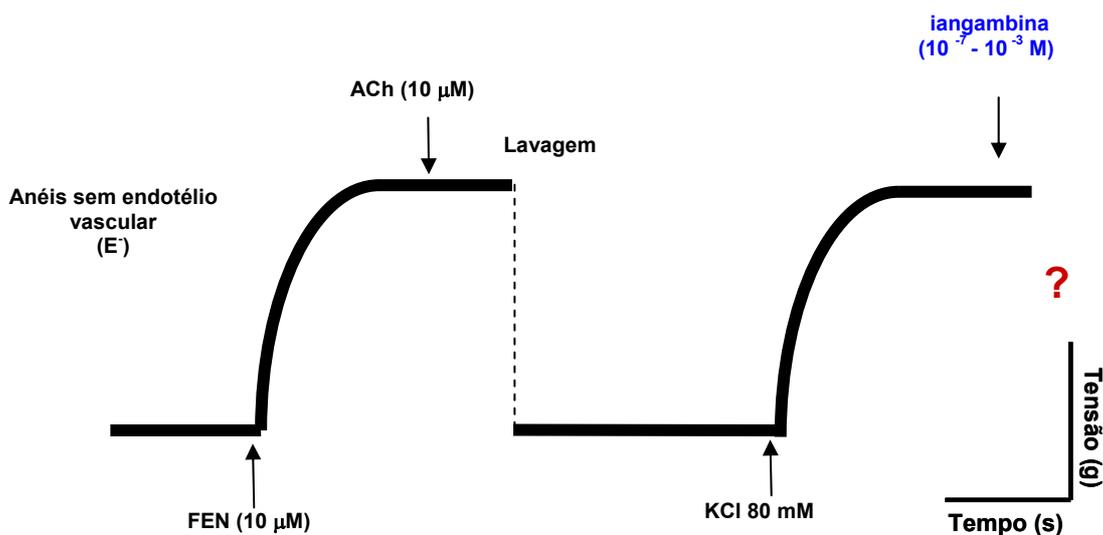


Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 80 mM)

4.2.2.4 Avaliação do efeito da nifedipina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN e/ou KCl 80 mM

A avaliação do efeito da nifedipina, uma diidropiridina que bloqueia os Ca_v tipo-L (FERRARI et al., 1994), frente às contrações induzidas por FEN (1 nM - 10

μM) e/ou solução despolarizante de KCl 80 mM foi avaliado em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional.

Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito no item 4.3.1, concentrações crescentes nifedipina (10^{-14} - 10^{-5} M) foram adicionadas cumulativamente aos anéis pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μM) e/ou KCl (80 mM) (Tabela 5). A porcentagem de relaxamento induzida pela nifedipina foi calculada pela comparação da resposta antes e após a adição da diidropiridina e considerando-se que a tensão desenvolvida por FEN (1 nM - 10 μM) e/ou KCl (80 mM) equivale a 0 % de relaxamento e que a tensão de repouso é igual a 100 % de relaxamento. Os valores de pD_2 foram obtidos como descrito posteriormente no item 4.3 (Figura 8).

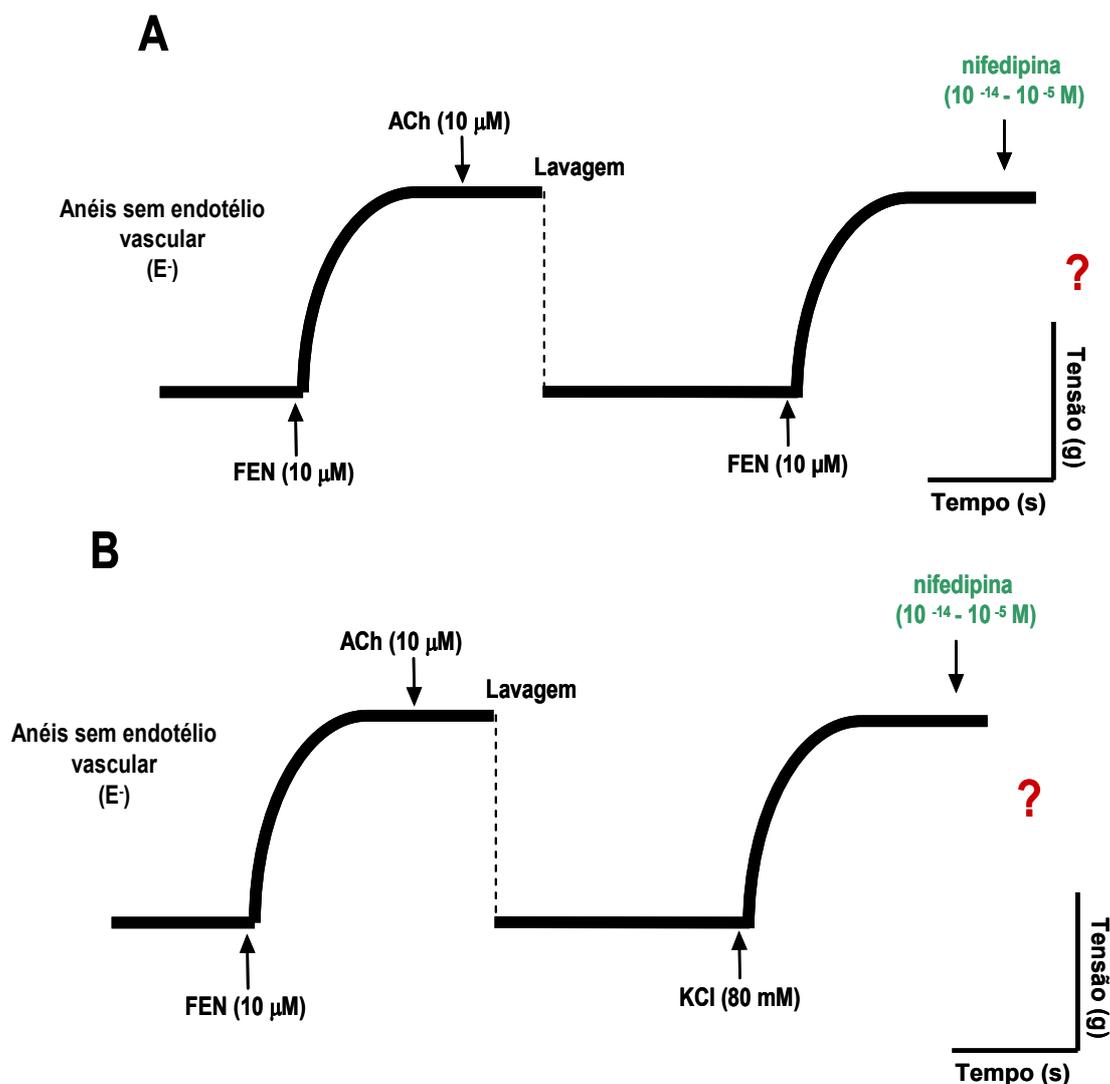


Figura 8: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da nifedipina (10^{-14} - 10^{-5} M) frente às contrações induzidas por FEN (1 nM - 10 μM) (A) e/ou KCl 80 mM (B), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional

4.2.2.5 Avaliação do efeito da iangambina sobre as contrações induzidas por CaCl_2 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

O efeito de iangambina (30 μM , 100 μM , 300 μM e 1mM) sobre as contrações induzidas por CaCl_2 foi avaliado em anéis desprovidos do endotélio funcional.

As preparações foram expostas a uma solução despolarizante de KCl 65,4 mM (Tabela 6) (CUNHA, 2004). Logo após, as preparações foram lavadas com solução de Tyrode nominalmente sem Ca^{2+} (Tabela 2) e mantidas nesse meio por 15 minutos. Após esse período, o meio foi permutado por uma solução despolarizante de KCl 65,4 mM, nominalmente sem Ca^{2+} (Tabela 7). A ausência de Ca^{2+} foi inferida pela falha da solução despolarizante em produzir vasoconstricção. Posteriormente, foi obtida uma curva concentração-resposta ao CaCl_2 (10^{-6} – 3×10^{-2} M) (curva controle).

O processo foi novamente repetido, sendo concentrações isoladas de iangambina (30 μM , 100 μM , 300 μM e 1mM) incubada as preparações juntamente com a solução despolarizante de KCl 65,4 mM, nominalmente sem Ca^{2+} e uma nova curva concentração resposta ao CaCl_2 (10^{-6} – 3×10^{-2} M) foi obtida. O efeito de iangambina sobre as contrações induzidas por CaCl_2 foi avaliado comparando-se as curvas de CaCl_2 na ausência (controle) e na presença da lignana (Figura 9).

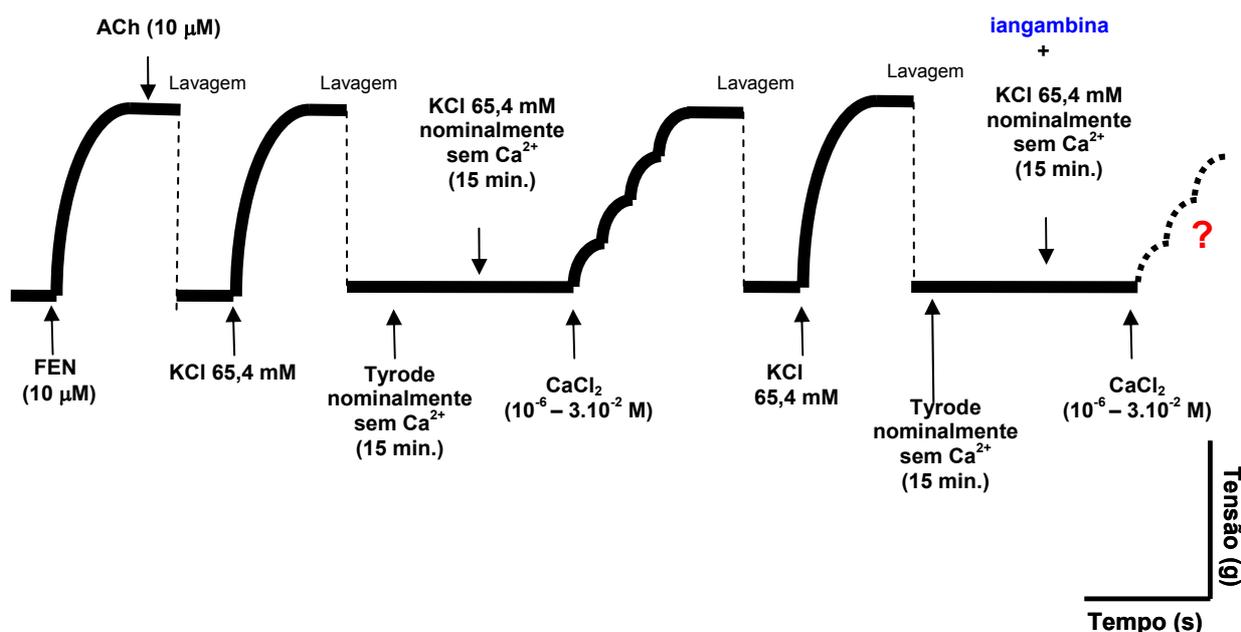


Figura 9: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito da iangambina sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de CaCl_2 (10^{-6} – 3×10^{-2} M) em meio despolarizante (KCl 65,4 mM) nominalmente sem Ca^{2+}

4.2.2.6 Avaliação do efeito da iangambina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644

Para avaliar o efeito de iangambina sobre o influxo de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} sensíveis a diidropiridinas, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem o endotélio funcional foi utilizado o S(-)-Bay K 8644, um ativador dos canais para Ca^{2+} sensíveis a diidropiridinas (ADACHI-AKAHANES et al., 1999). Devido uma despolarização parcial ser necessária para obtenção da resposta ao S(-)-Bay K 8644, a resposta contráctil a esse agonista foram obtidas em meio contendo KCl 20 mM (SCHRAMM et al., 1983; DAVIE et al., 1998).

Após a verificação da ausência de endotélio, as preparações foram expostas a uma solução despolarizante de KCl 20 mM durante 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado o S(-)-Bay K 8644 (200 nM) e concentrações crescentes de iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) foram adicionadas à cuba de maneira cumulativa na fase tônica da contração (Figura 10).

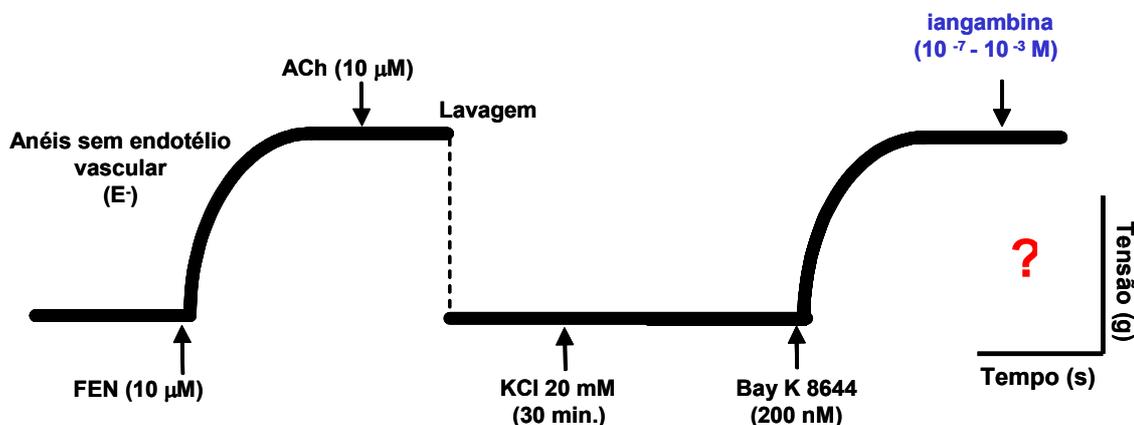


Figura 10: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (200 nM)

4.2.2.7 Avaliação do efeito da iangambina sobre as contrações transientes induzidas por FEN e/ou cafeína em artéria mesentérica superior isolada de rato

O efeito de iangambina (30 μ M, 100 μ M, 300 μ M e 1mM) sobre as contrações transientes promovidas pelo Ca^{2+} liberado dos estoques intracelulares sensíveis a IP_3 , um segundo mensageiro mobilizante de cálcio via IP_3R (ZHANG;LI, 2006) e/ou cafeína, uma metilxantina que aumenta a sensibilidade dos RyR ao Ca^{2+} (LINO, 1989), foram avaliados em anéis desprovidos do endotélio funcional.

As preparações foram expostas à solução despolarizante de K^+ 65,4 mM (Tabela 6) durante 3 minutos. O tecido foi então lavado com solução de Tyrode livre de Ca^{2+} (Tabela 3), decorridos 3 minutos, a resposta contrátil à FEN (10 μ M) e/ou à cafeína (20 mM) foi determinada na ausência de iangambina. Os anéis foram lavados e mantidos em solução nutritiva de Tyrode com níveis fisiológicos de Ca^{2+} (2 mM) (Tabela 1) durante quinze minutos, para retorno às condições basais e reestocagem dos estoques intracelulares de Ca^{2+} . O processo descrito foi repetido até a obtenção de duas contrações transientes de magnitude similar. Em seguida, iangambina em concentrações isoladas foi incubada juntamente com solução de Tyrode livre de Ca^{2+} , durante 3 minutos e finalmente, a resposta contrátil à FEN (10 μ M) ou à cafeína (20 mM), na presença de iangambina, foi obtida. O efeito de iangambina foi calculado comparando-se a média das amplitudes das contrações na ausência (controle) e na presença de iangambina (Figura 11).

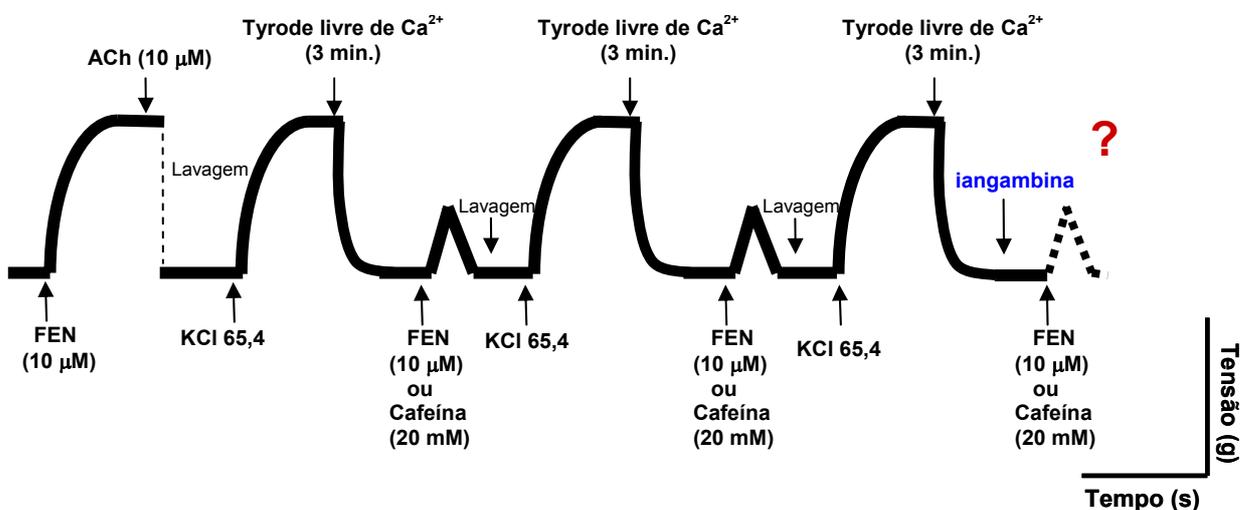


Figura 11: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações isoladas da iangambina sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 μ M) e/ou cafeína (20 mM) em solução de Tyrode livre de Ca^{2+}

4.2.3 Ensaios farmacológicos utilizando átrio isolado de rato

Os ratos foram sacrificados e exsanguinados e o coração imediatamente removido. Os átrio direito e esquerdo foram retirados perpendicularmente ao eixo do coração, suspensos por fios de algodão e mantidos em cubas de 10 mL contendo solução de Krebs para átrio (Tabela 8), a 37° C e gaseificadas com carbogênio. Cada átrio foi submetido a uma tensão inicial de 0,5 g por um período de estabilização de 60 minutos. Durante esse tempo a solução fisiológica foi trocada a cada 15 minutos para prevenir o acúmulo de metabólitos.

Como o átrio esquerdo não apresenta o nodo-sinotrial, ele foi estimulado eletricamente através de eletrodos de platina, por pulsos retangulares com uma frequência de 3 Hz, a duração de 3 ms e a uma voltagem de 1,5 vezes o seu limiar de excitação. Os efeitos inotrópicos e cronotrópicos foram registrados através de um transdutor de força (7004, Ugo Basile, Italy) acoplado ao fisiógrafo (Gemini, Ugo Basile, Italy) (Figura 12). A frequência de batimentos espontâneos do átrio direito foi medida e definida como frequência atrial para a avaliação dos efeitos cronotrópicos.

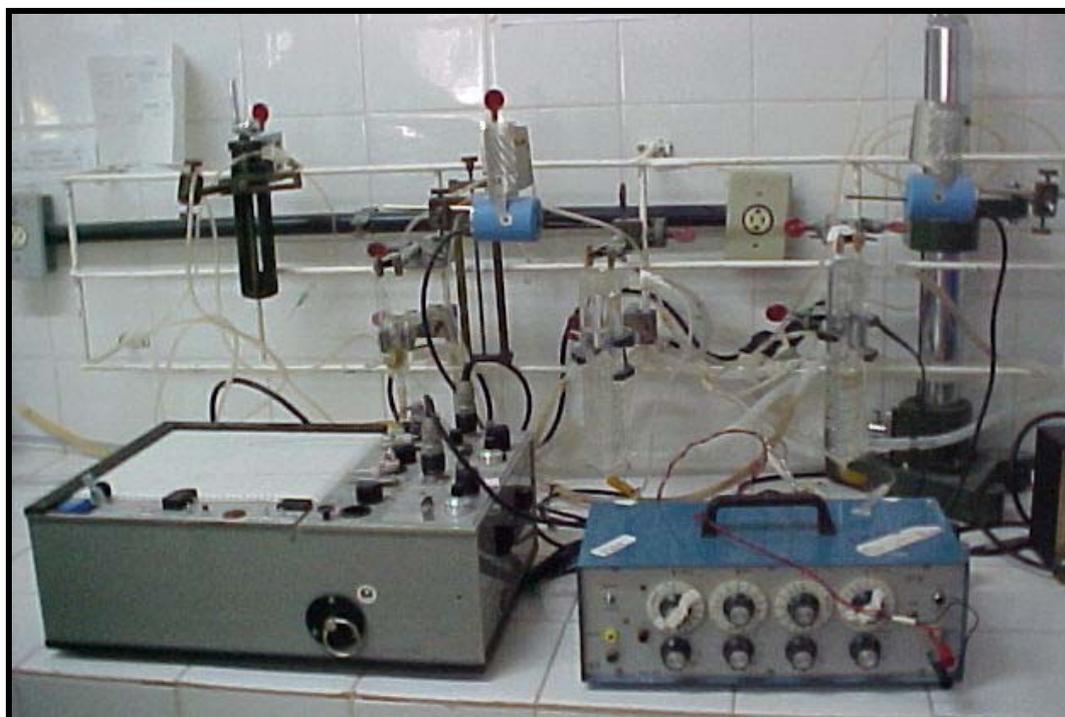


Figura 12: Aparato utilizado para aquisição de dados do cronotropismo e inotropismo cardíaco em átrio isolado de rato.

4.2.4 Protocolo experimental utilizado átrio isolado de rato

4.2.4.1 Avaliação do efeito da iangambina em átrio isolado de rato

O efeito de iangambina sobre o inotropismo e cronotropismo cardíaco foram avaliados em átrio esquerdo e direito isolados de rato, respectivamente.

Após o período de estabilização, concentrações crescentes de iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) foram adicionadas cumulativamente às preparações de átrio isolado de rato e os efeitos inotrópicos e cronotrópicos para cada concentração foram observados durante 10 minutos após a incubação de iangambina.

4.2.5 Ensaio bioquímicos

Estes experimentos foram realizados em colaboração com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto no Departamento de Física e Química – USP.

4.2.6 Preparação das lamínulas

Em fluxo laminar, as lamínulas foram higienizadas com álcool 70% e expostas à luz UV por 20 min. Em seguida foram adicionados 100 μ L da solução (1/10) de poli-L-lisina sobre as lamínulas, para adesão celular. Após 10 minutos o excesso de poli-L-lisina foi aspirado. As lamínulas permaneceram em fluxo laminar até a completa secagem.

4.2.7 Isolamento dos miócitos de artéria mesentérica superior de rato

Para obtenção dos miócitos isolados, seguimentos da artéria mesentérica superior foram removido como descrito em 4.2.1 e posteriormente reservado em placas de petri contendo solução Hanks sem Ca^{2+} e Mg^{2+} (Tabela 10), para

dissecção. Após esse procedimento, seguimentos artérias medindo aproximadamente 1 cm de comprimento, foram obtidos desprovidos de tecido conjuntivo e adiposo, e cortados longitudinalmente para remoção do endotélio com o auxílio de um pequeno rodo. Duas lavagens do seguimento arterial com solução de Hanks (Tabela 9) foram realizadas para remoção de células endoteliais e outros debrís da preparação.

Os seguimentos artérias foram incubados a 37° C por 20 minutos em solução de dissociação (Tabela 11) sob aeração com mistura carbogênica. Após esse período, a dissociação das células foram paralisadas com a adição de albumina sérica bovina (10% m/v) e posteriormente, as células foram liberadas através de agitação mecânica, utilizando-se uma pipeta de Pasteur. Em seguida as células em suspensão foram centrifugadas por 3 minutos (1000 rpm – velocidade 2). Uma alíquota do concentrado de células foi destinadas ao teste de viabilidade celular com Azul de Tripán 0,9% (1:1). Foram utilizadas suspensões de células com viabilidade acima de 90%.

4.2.8 Cultura primária dos miócitos de artéria mesentérica de rato

As células foram ressuspendidas em 600 µL de DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) estéril, suplementado com soro bovino fetal 10 %, glutamina 2 mM e solução antibiótica (Penicilina G sódica 10000 U/mL e Estreptomicina 10 mg na concentração final de 1 %). As células foram cultivadas em lamínulas de vidro de 32 cm de diâmetro, tratadas com poli-L-lisina e acondicionadas em placas de Petri. No centro de cada lamínula foram semeados 200 µL da suspensão de células e a seguir, mantidas em estufa com atmosfera de CO₂ 5 %, 95 % de O₂, a 37 °C, por 12 horas, para sedimentação e adesão das células.

4.2.9 Carregamento das células com a sonda de fluorescência Fura-2/AM

A medida da concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{+2}]_i$) foi efetuada com o indicador fluorescente de Ca⁺², Fura-2, na forma acetoximetil éster (Fura-2/AM). Fura-

2/AM é um derivado do Fura-2, que tem 5 grupos acetoximetil éster ligados aos grupos COO^- da molécula de Fura-2, por ligações éster. Esta molécula é bastante hidrofóbica passando facilmente através da membrana plasmática. Uma vez dentro das células, esterases citoplasmáticas clivam os grupamentos acetoximetil da molécula de Fura-2, resultando em um componente que é altamente carregado e que não pode cruzar outras membranas de organelas intracelulares, ficando assim retida no citoplasma ligada com uma alta e específica afinidade aos íons Ca^{+2} (GRYNKIEWICZ; POENIE; TSIEN, 1985).

A solução estoque de Fura-2/AM 10 mM (dissolvida em dimetilsulfóxido) foi diluída (1 μL) em 25 μL de albumina sérica bovina 25 % em solução aquosa e sonicado por 2 min. A seguir, a solução contendo Fura-2/AM foi adicionada à solução de Hanks contendo uma concentração suficiente de Ca^{2+} 1,6 mM e albumina sérica bovina (Fração V) 0,1 %, em quantidade suficiente para 1 mL, resultando numa concentração final de 5 μM , sonificada por mais 3 min. Este procedimento favorece a incorporação da sonda quando em contato com a membrana citoplasmática.

As células aderidas em lamínulas foram então incubadas com 1 mL de solução de Fura-2/AM (5 μM) em estufa com atmosfera de 5 % CO_2 e temperatura de 37 °C durante 40 min., sob proteção da luz, para o carregamento das células com a sonda fluorescente.

Após o período de carregamento, a lamínula foi montada em câmara aquecida à 37 °C e as células foram imersas com solução de Hanks.

A câmara contendo as células estava acoplada a um microscópio invertido, Nikon Diaphot D104B, equipado para epifluorescência e focalizadas com objetiva de fluorescência e imersão a óleo com aumento de 40 vezes (Nikon Flúor) (Figura 13). Foram utilizadas células que apresentaram intensidade de fluorescência acima de 4×10^5 contagens.

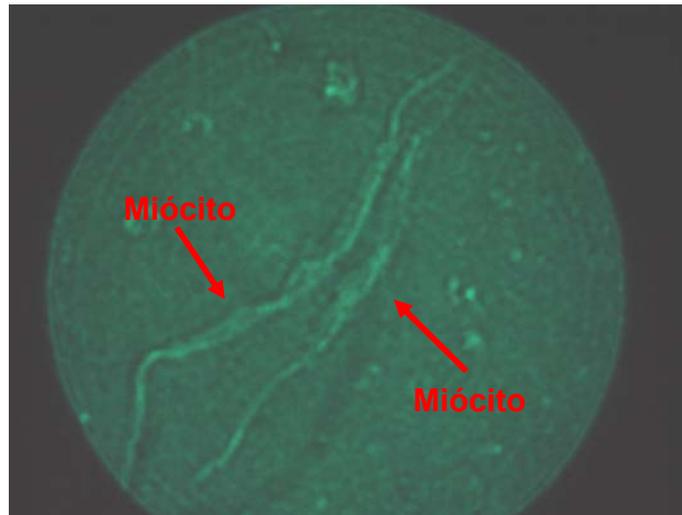


Figura 13: Miócitos de artéria mesentérica superior isolada de rato

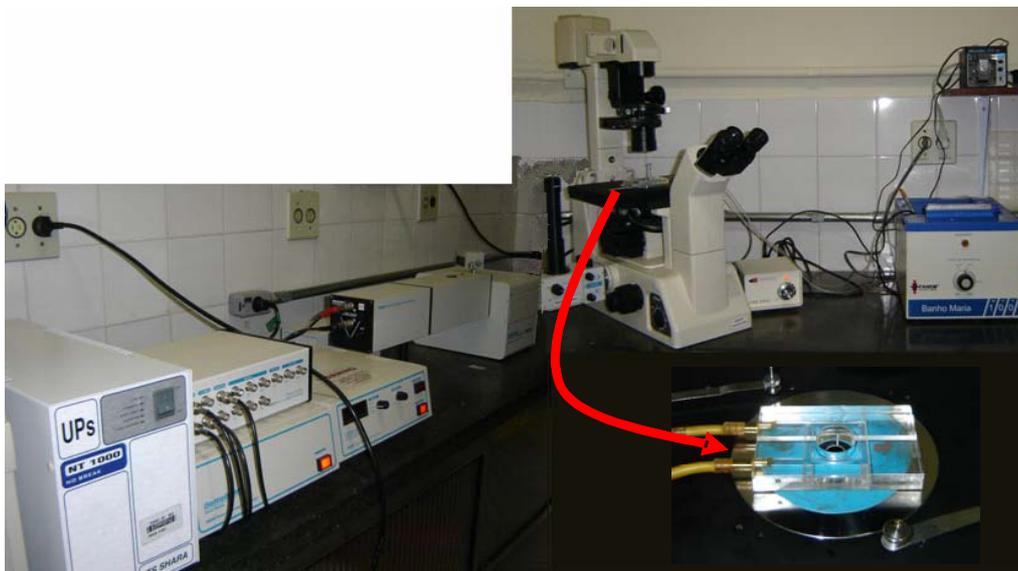


Figura 14: Aparato utilizado para medida de Ca^{2+} intracelular usando a sonda de fluorescência Fura-2/AM

4.2.10 Protocolos experimentais empregados nos ensaios bioquímicos

4.2.10.1 Avaliação do efeito da iangambina sobre o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v em miócitos de artéria mesentérica de rato

Após o período de carregamento dos miócitos com a sonda de fluorescência Fura-2/AM como descrito no item 4.2.9, os miócitos foram incubados com solução de Hanks (Tabela 9) e $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi medida antes de qualquer estímulo (valor basal). Em

seguida as células foram expostas a solução de KCl 65,4 mM (Tabela 6) e as alterações na $[Ca^{2+}]_i$ foram registradas. Posteriormente, concentrações isoladas de iangambina (0,1 μ M, 30 μ M e 1 mM) foram incubadas juntamente com solução de Hanks, durante 10 minutos e finalmente, a resposta ao KCl 65,4 mM na presença de iangambina foi obtida. O efeito de iangambina sobre o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v foi calculado comparando-se as alterações na $[Ca^{2+}]_i$ induzidas por KCl 65,4 mM na ausência (controle) e na presença da lignana (Figura 15).

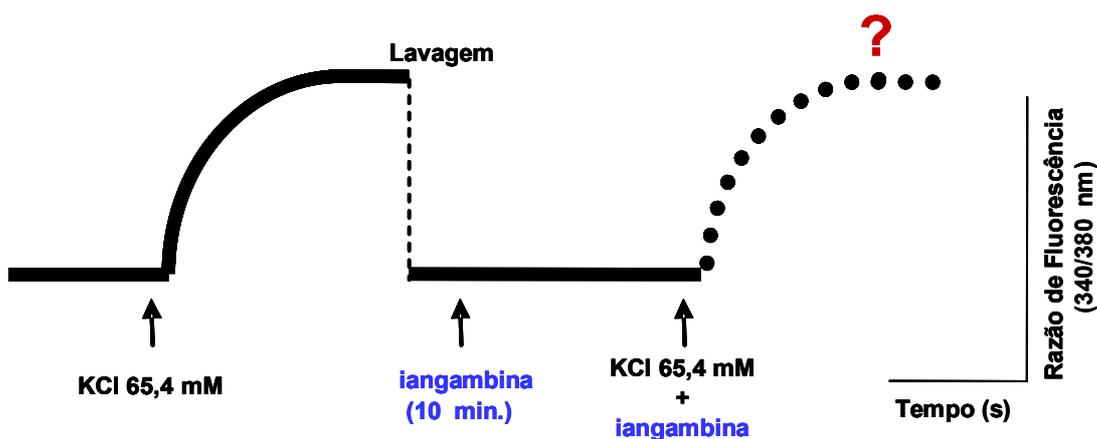


Figura 15: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações isoladas da iangambina sobre o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v em miócitos de artéria mesentérica de rato carregados com Fura-2/AM

4.2.10.2 Avaliação do efeito da iangambina sobre o influxo de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} sensíveis a diidropiridinas

Para avaliar o efeito de iangambina sobre o influxo de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} sensíveis a diidropiridinas, em miócitos de artéria mesentérica de rato carregados com Fura-2/AM, foi utilizado o S(-)-Bay K 8644, um ativador de canais para Ca^{2+} sensíveis a diidropiridinas (ADACHI-AKAHANES et al., 1999).

As células foram expostas ao S(-)-Bay K 8644 (100 nM) e as alterações na $[Ca^{2+}]_i$ foi registrada. Posteriormente, concentrações isoladas de iangambina (0,1 μ M, 30 μ M e 1 mM) foram incubadas juntamente com solução de Hanks, durante 10 minutos e finalmente, a resposta ao S(-)-Bay K 8644 (100 nM) na presença de iangambina foi obtida. O possível efeito de iangambina foi avaliado comparando-se as alterações na $[Ca^{2+}]_i$ induzidas pelo S(-)-Bay K 8644 na ausência (controle) e na presença da lignana (Figura 16).

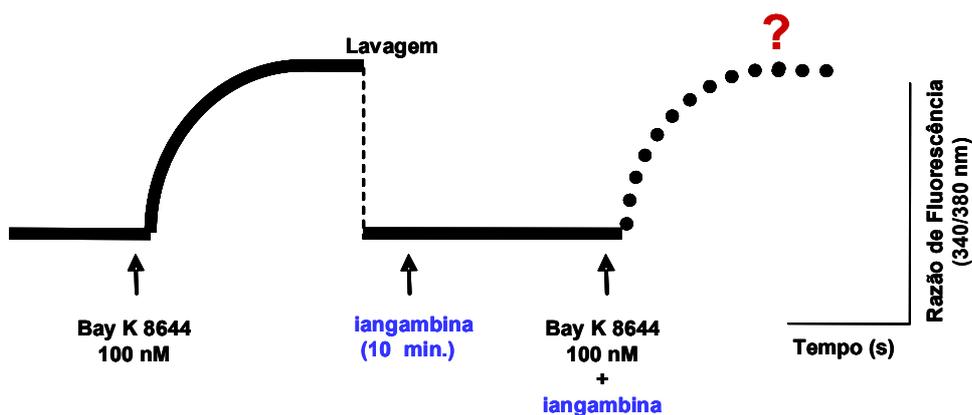


Figura 16: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações isoladas da iangambina sobre o influxo de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} sensíveis a diidropiridinas em miócitos de artéria mesentérica de rato carregados com Fura-2/AM

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Os testes t de *Student* (pareado e não pareado) e análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido de teste de Dunnett, onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Os valores de pD_2 ($-\log \text{EC}_{50}$) foram obtidos através de regressão não-linear das curvas individuais traçadas a partir dos valores percentuais das respostas induzidas por iangambina para cada experimento. Para estudar o efeito vasorelaxante induzido por iangambina, dois parâmetros farmacológicos foram analisados: o $E_{\text{máx}}$ (resposta máximo induzida pela substância) e pD_2 .

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDOS *in vivo*

5.1.1 Efeitos da iangambina sobre a Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) em ratos normotensos não anestesiados

Os valores basais de PAM e FC dos animais antes da administração de iangambina foram respectivamente de 109 ± 3 mmHg e 363 ± 10 bpm. A administração de iangambina (1; 5; 10; 20 e 30 mg/kg, i.v.) induziu uma resposta transiente caracterizada por hipotensão (Δ PAM = $-3,9 \pm 0,2$; $-7,5 \pm 0,6$; $-9,3 \pm 1,3$; $-15,0 \pm 1,9$ e $-25,5 \pm 1,6$ mmHg, respectivamente) associada a uma taquicardia (Δ FC = $21,8 \pm 1,7$; $22,8 \pm 6,1$; $32,0 \pm 5,2$; $42,0 \pm 4,8$ e $67,5 \pm 9,9$ bpm, respectivamente) de maneira dependente de dose (n=5) (Figura 17 e 18).

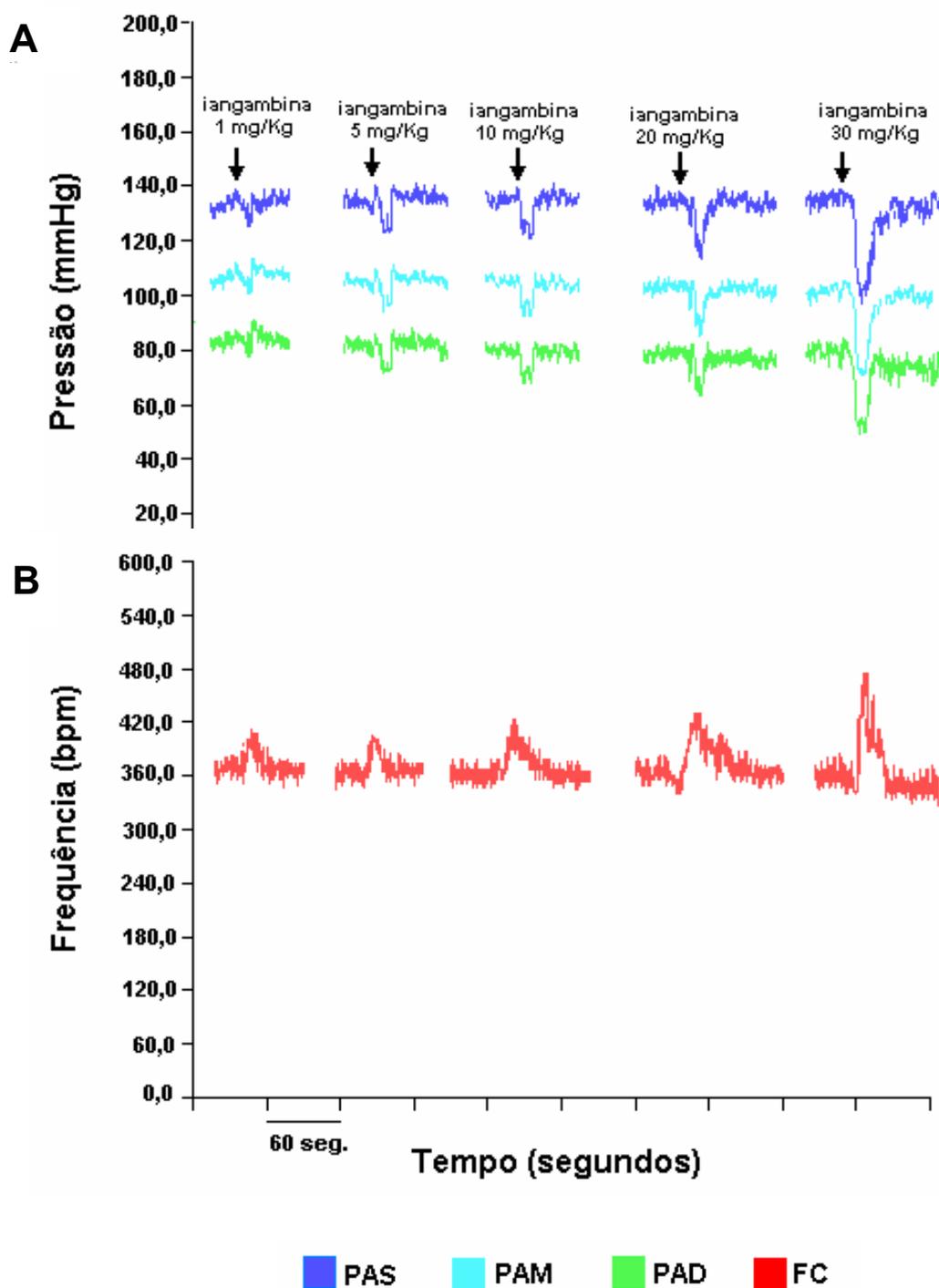


Figura 17: Registro original representativo ilustrando o efeito de doses crescentes da iangambina (1; 5; 10; 20 e 30 mg/Kg, i.v.) sobre a PAS, PAM, PAD (**A**) e FC (**B**) em rato normotenso não anestesiado. As setas indicam o momento da administração de iangambina

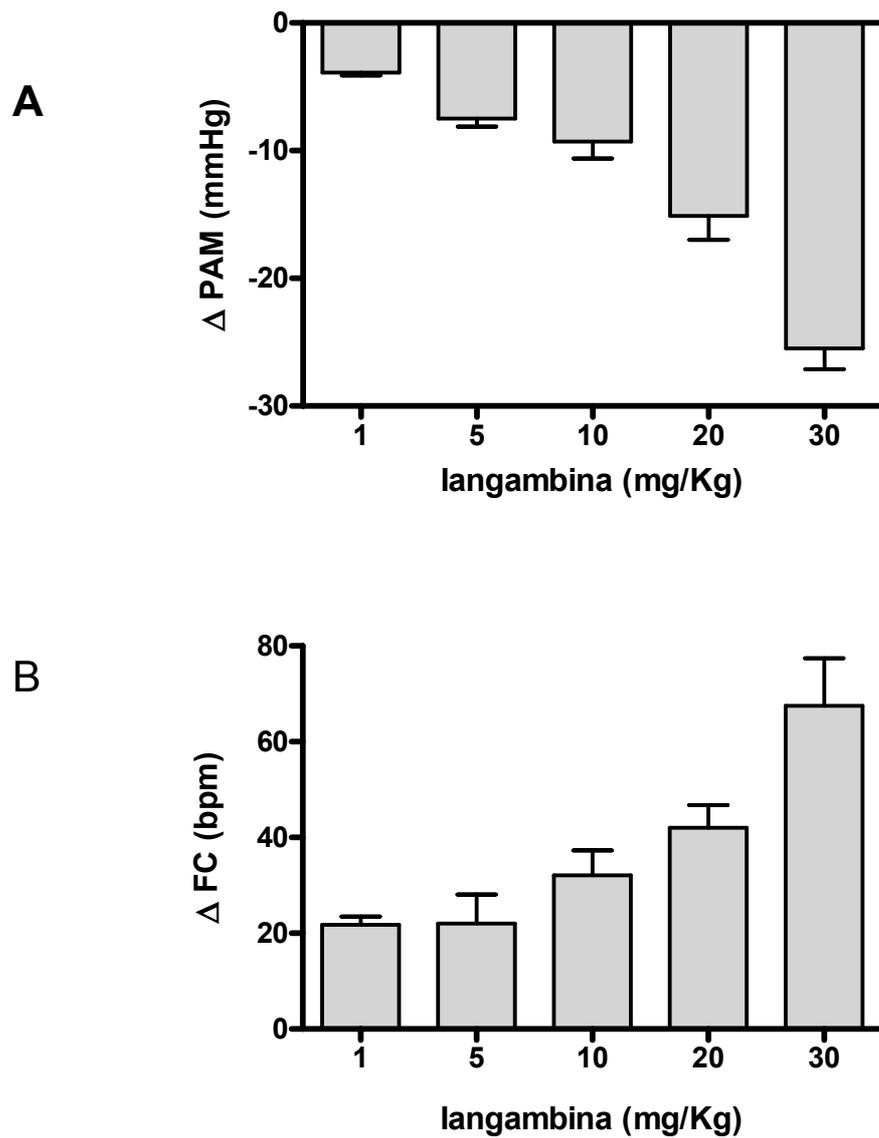


Figura 18: Efeitos da langambina sobre a Pressão Arterial Média (PAM, mmHg) **(A)** e Frequência Cardíaca (FC, bpm) **(B)** em ratos normotensos não anestesiados. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. de 5 experimentos

5.2 ESTUDOS *in vitro*

5.2.1 Estudos utilizando anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

5.2.1.1 Efeito da iangambina sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença ou ausência do endotélio funcional

A administração cumulativa de iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) induziu um vasorelaxamento dependente de concentração em anéis intactos de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) (Figura 19). A remoção do endotélio não alterou a resposta vasorelaxante induzida por iangambina, com demonstrado pelos valores de pD_2 obtidos de artérias com endotélio intacto ($pD_2 = 4,5 \pm 0,06$, $n=9$) e artérias em que o endotélio foi removido ($pD_2 = 4,4 \pm 0,04$, $n=7$). Também, a percentagem de relaxamento máximo ($E_{m\acute{a}x}$) induzida por iangambina não foi alterada pela remoção do endotélio, os valores de $E_{m\acute{a}x}$ foram $78,7 \pm 2,9$ % e $75,6 \pm 3,1$ % para artérias com ou sem o endotélio funcional, respectivamente (Figura 20).

O tempo necessário para que fossem obtidas as respostas máximas para cada concentração de iangambina variou entre 8 a 10 min. No final dos experimentos, a reversão do relaxamento produzido por iangambina foi conseguido após 20 minutos de sua retirada das cubas através da troca de solução de Tyrode e verificação da reposta do tecido a FEN (1 nM - 10 μ M). A reversibilidade foi rotineiramente observada para assegurar que o relaxamento não foi devido a alterações na contractilidade do tecido (dados não mostrados).

A adição de iangambina não foi capaz de modificar, de maneira significativa, o tônus basal, tanto em anéis com endotélio funcional intacto quanto em anéis com endotélio funcionalmente removido (dados não mostrados).

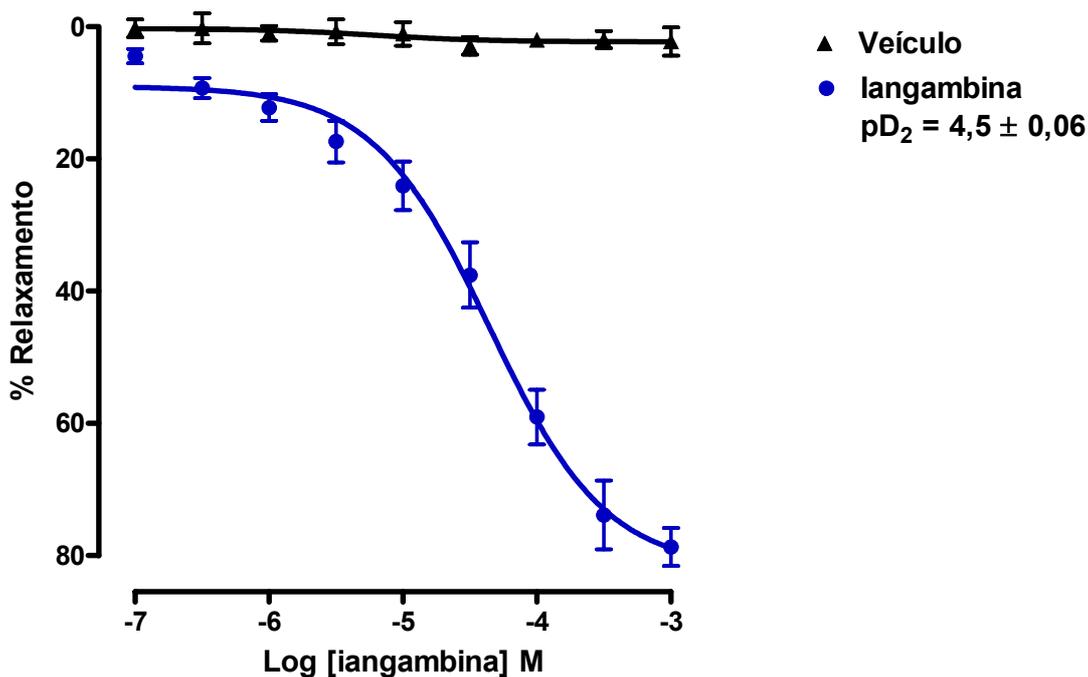


Figura 19: Curva concentração-resposta para iangambina (10^{-7} – 10^{-3} M) em anéis intactos de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contráidos com FEN (1 nM - 10 μ M) (●). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. de 9 experimentos

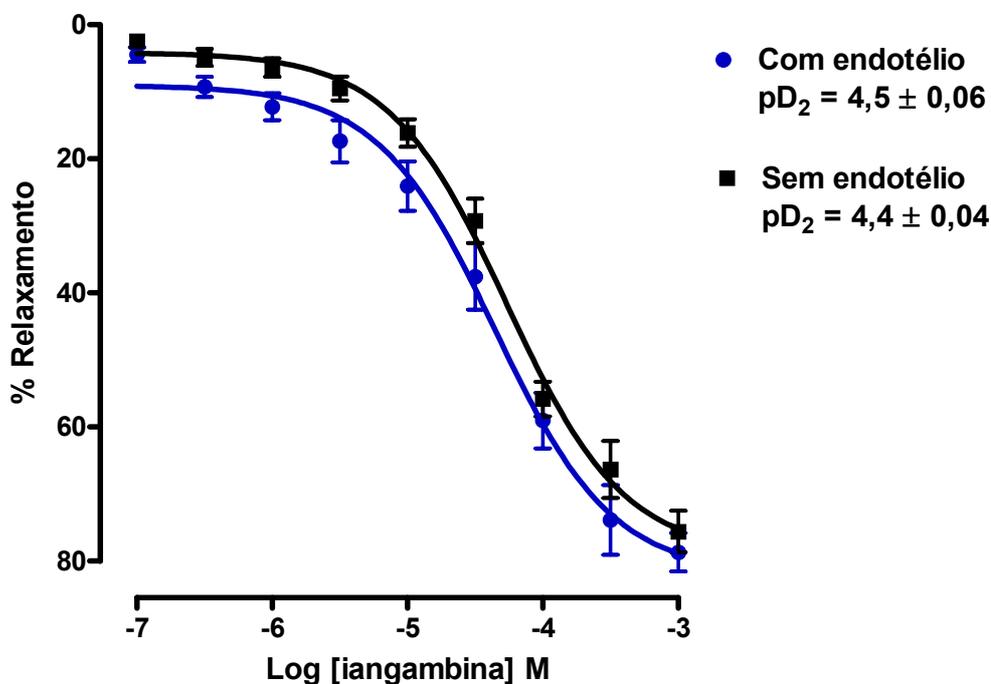


Figura 20: Curva concentração-resposta para iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com endotélio intacto (●) e sem endotélio (■), pré-contráidos com FEN (1 nM - 10 μ M). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 9 e 7 experimentos, respectivamente

5.2.1.2 Efeito do KCl 20 mM sobre a resposta relaxante induzida por iangambina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional

Para avaliarmos a participação de canais para K^+ na resposta vasorelaxante induzida por iangambina realizamos estudos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M), na presença de solução de KCl 20 mM. A curva concentração-resposta para iangambina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-tratados com KCl 20 mM está representada na figura 21. O bloqueio parcial do efluxo de K^+ com o aumento da concentração K^+ extracelular ($[K^+]_e$) para 20 mM não alterou significativamente o vasorelaxamento dependente de concentração induzido por iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) ($pD_2 = 4,5 \pm 0,08$ e $E_{m\acute{a}x} = 77,4 \pm 5,0$ %).

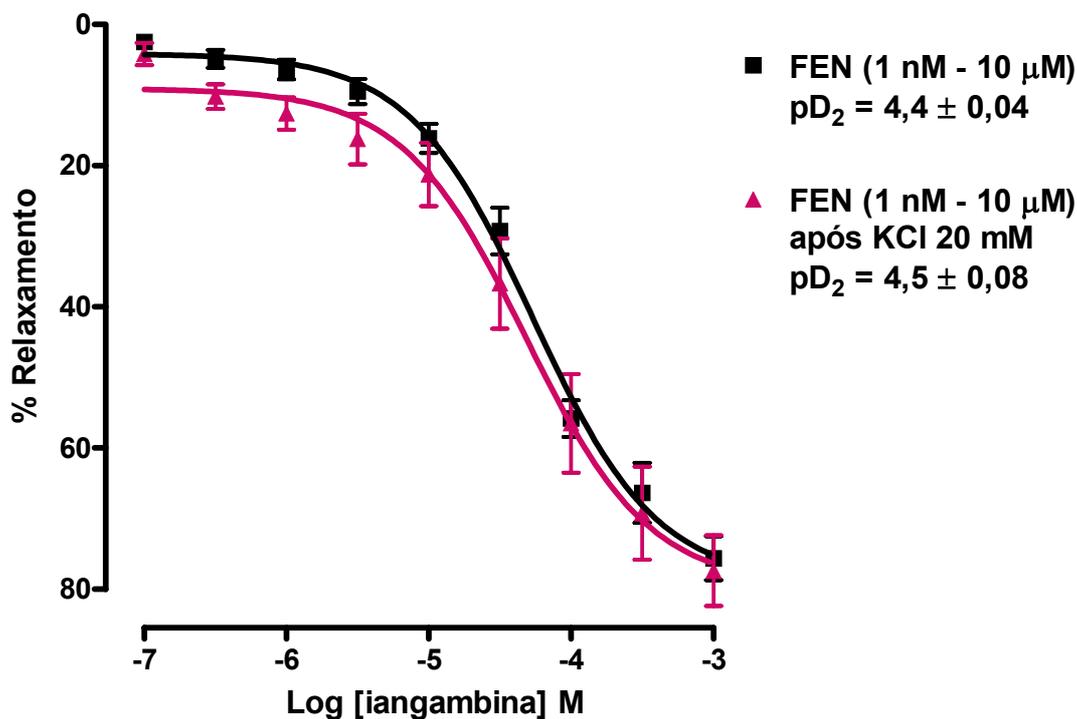


Figura 21: Curva concentração-resposta para iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional. O efeito relaxante induzido por iangambina foi determinado na presença de $[K^+]_e = 4$ mM (■) e $[K^+]_e = 20$ mM (▲). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 7 experimentos

5.2.1.3 Efeito da iangambina sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, pré-contraídos com KCl 80 mM

Iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) induziu vasorelaxamento dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 80 mM). Interessantemente, a curva concentração-resposta para iangambina, em anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com KCl 80 mM foi deslocada para esquerda como indicado pelo significativo aumento no $pD_2 = 4,8 \pm 0,05$ ($p < 0,001$) porém, sem alterar o valor do $E_{m\acute{a}x} = 79,9 \pm 3,7$ % ($n=7$) quando comparado aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) ($pD_2 = 4,4 \pm 0,04$ e $E_{m\acute{a}x} = 75,6 \pm 3,1$ %, $n=7$) (Figura 22).

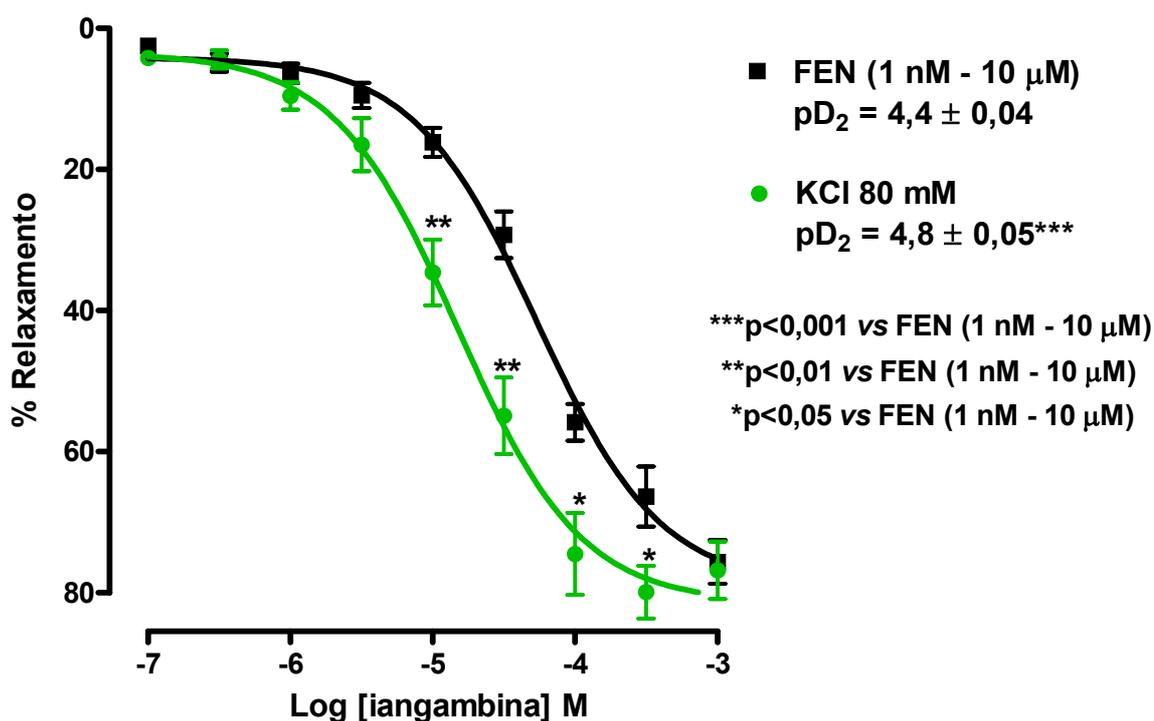


Figura 22: Curva concentração-resposta para iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (1 nM - 10 μ M) (■) e/ou com KCl 80 mM (●). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 7 experimentos

5.2.1.4 Efeito da nifedipina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN e/ou KCl 80 mM

Nifedipina (10^{-14} - 10^{-5} M) induziu vasorelaxamento dependente de concentração do tônus induzido por FEN ($10 \mu\text{M}$) ($pD_2 = 8,0 \pm 0,16$, $E_{\text{máx}} = 77,20 \pm 5,3$, $n=6$) e KCl 80 mM ($pD_2 = 8,8 \pm 0,22$, $E_{\text{máx}} = 78,13 \pm 8,4$, $n=6$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com o endotélio removido.

Como indicado pelos valores de pD_2 , nifedipina relaxou as contrações induzidas por KCl 80 mM de forma mais potente ($p < 0,05$) do que a inibição das contrações geradas por FEN ($10 \mu\text{M}$) (Figura 23).

O tempo necessário para que fossem obtidas as respostas máximas para cada concentração de nifedipina variou entre 10 a 15 minutos (dados não mostrados).

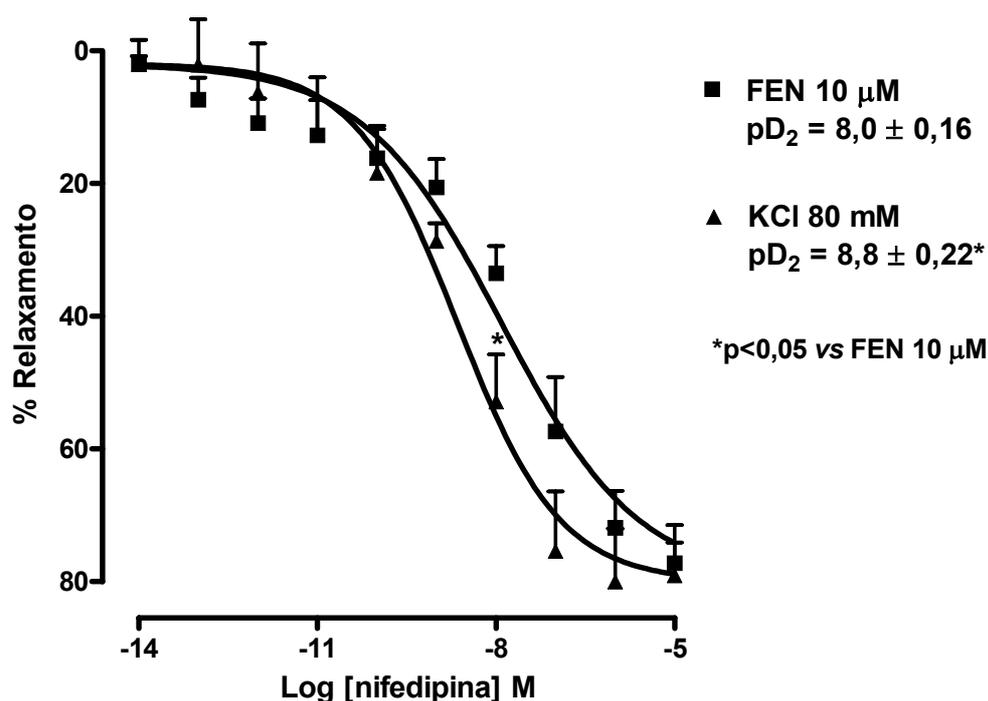
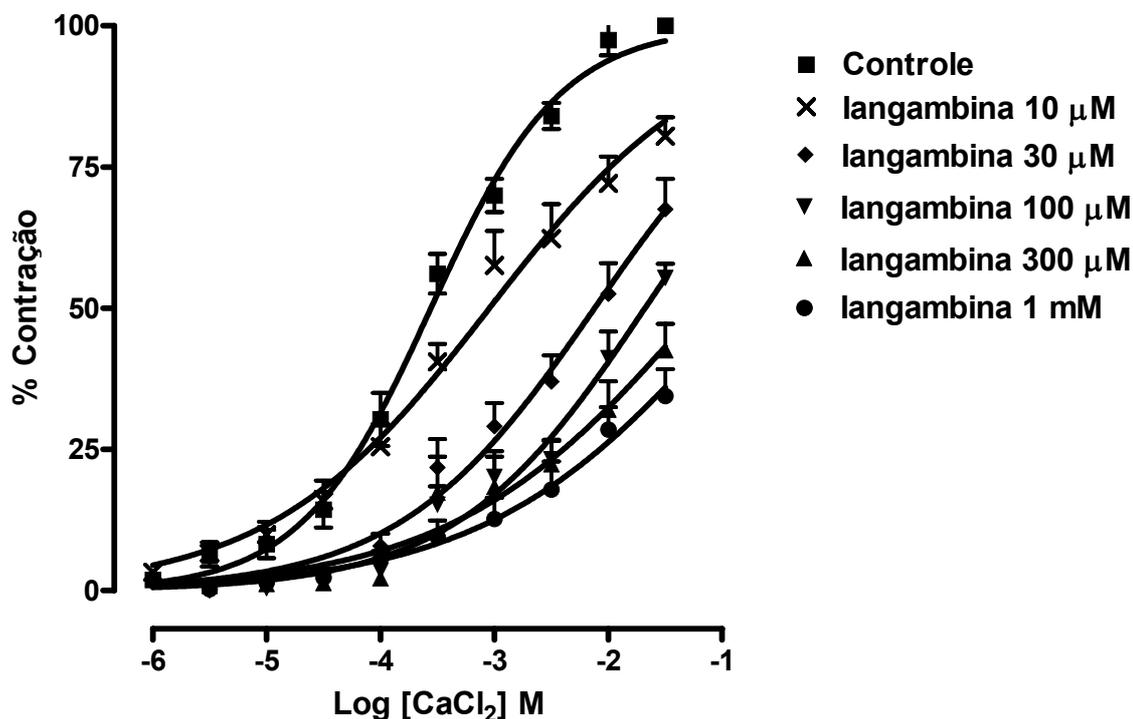


Figura 23: Curva concentração-resposta para nifedipina (10^{-14} – 10^{-5} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN $10 \mu\text{M}$ (■) e/ou KCl 80 mM (♦). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 experimentos

5.2.1.5 Efeito da iangambina sobre as contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante e nominalmente sem Ca^{2+} em anéis de artéria mesentérica isolada de rato, sem endotélio funcional

A administração cumulativa de CaCl_2 (10^{-6} - 3×10^{-2} M) promoveu uma contração dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional incubados com solução despolarizante (KCl 65,4 mM) e nominalmente sem Ca^{2+} , com $\text{pD}_2 = 3,6 \pm 0,04$ (Figura 22). Quando os anéis foram incubados com iangambina (10, 30, 100, 300 μM e 1 mM) a contração induzida por CaCl_2 foi significativamente reduzida de maneira dependente de concentração (Figura 24).

Iangambina na concentração de 1 mM inibiu cerca de 65% da contração induzida por CaCl_2 , sendo este o efeito máximo observado com a droga em estudo.



	$E_{\text{máx}}$ (% contração)
Controle	100%
langambina 10 μM	80,5 \pm 3,3 % ***
langambina 30 μM	67,5 \pm 5,3 % ***
langambina 100 μM	55,4 \pm 2,5 % ***
langambina 300 μM	42,5 \pm 4,7 % ***
langambina 1 mM	34,4 \pm 4,8% ***

Figura 24: Curvas concentração-resposta para CaCl_2 em solução despolarizante (KCl 65,4 mM) nominalmente sem Ca^{2+} em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato desprovidos de endotélio funcional (Controle) e na presença de concentrações isoladas de langambina (10, 30, 100, 300 μM e 1 mM). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 5 experimentos para cada concentração. *** $p < 0,001$ vs Controle

5.2.1.6 Efeito da iangambina sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional

A administração cumulativa de iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) induziu um vasorelaxamento dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (200 nM) ($pD_2 = 4,0 \pm 0,04$ e $E_{máx} = 72,9 \pm 4,7$, $n=7$) (Figura 25).

O tempo necessário para que fossem obtidas as respostas máximas para cada concentração de iangambina variou entre 15 a 18 min. (dados não mostrados).

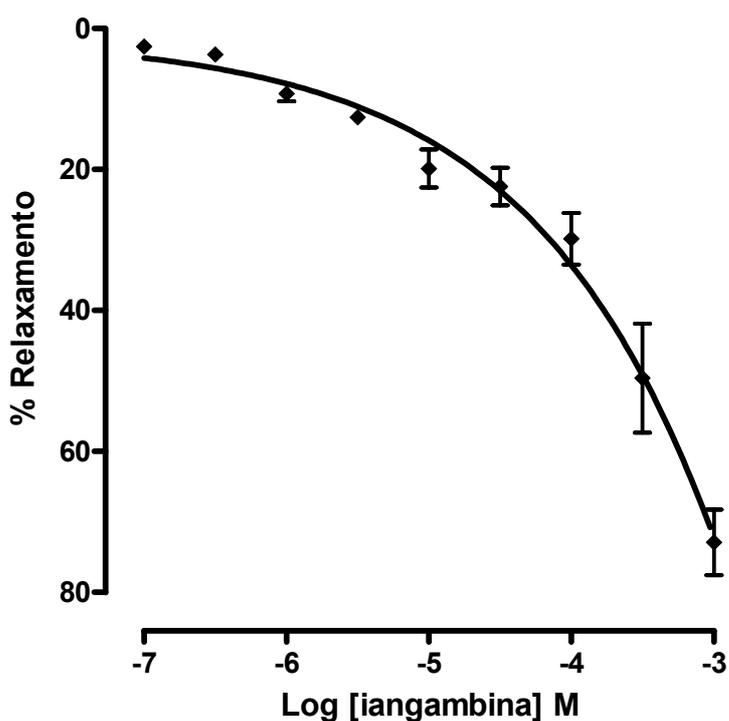


Figura 25: Curva concentração-resposta para iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio vascular, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (200 nM) (♦). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. de 7 experimentos

Tabela 12: Valores de pD_2 e $E_{m\acute{a}x}$ para iangambina em anéis de artéria mesentérica superior de rato em diferentes condições experimentais

Condição Experimental	pD_2 (- log CE_{50})	$E_{m\acute{a}x}$ (% de relaxamento)
Pré-contraídos com FEN (com endotélio)	4,5 ± 0,06	78,7 ± 2,9
Pré-contraídos com FEN (sem endotélio)	4,4 ± 0,04	75,6 ± 3,1
Pré-contraídos com FEN e após KCl 20 mM (sem endotélio)	4,5 ± 0,08	77,4 ± 5
Pré-contraídos com KCl 80 mM (sem endotélio)	4,8 ± 0,05***	79,9 ± 3,7
Pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (sem endotélio)	4,0 ± 0,04***	72,9 ± 4,7

Os valores estão expressos como média ± e.p.m. ***p < 0,001 vs Pré-contraídos com FEN (sem endotélio).

5.2.1.7 Efeito da iangambina sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 μ M) e/ou cafeína (20 mM), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Em meio livre de Ca^{2+} , as contrações transientes induzidas por FEN (10 μ M) ou cafeína (20 mM) não foram modificadas na presença de concentrações isoladas de iangambina (30, 100, 300 μ M e 1 mM) (Figura 26).

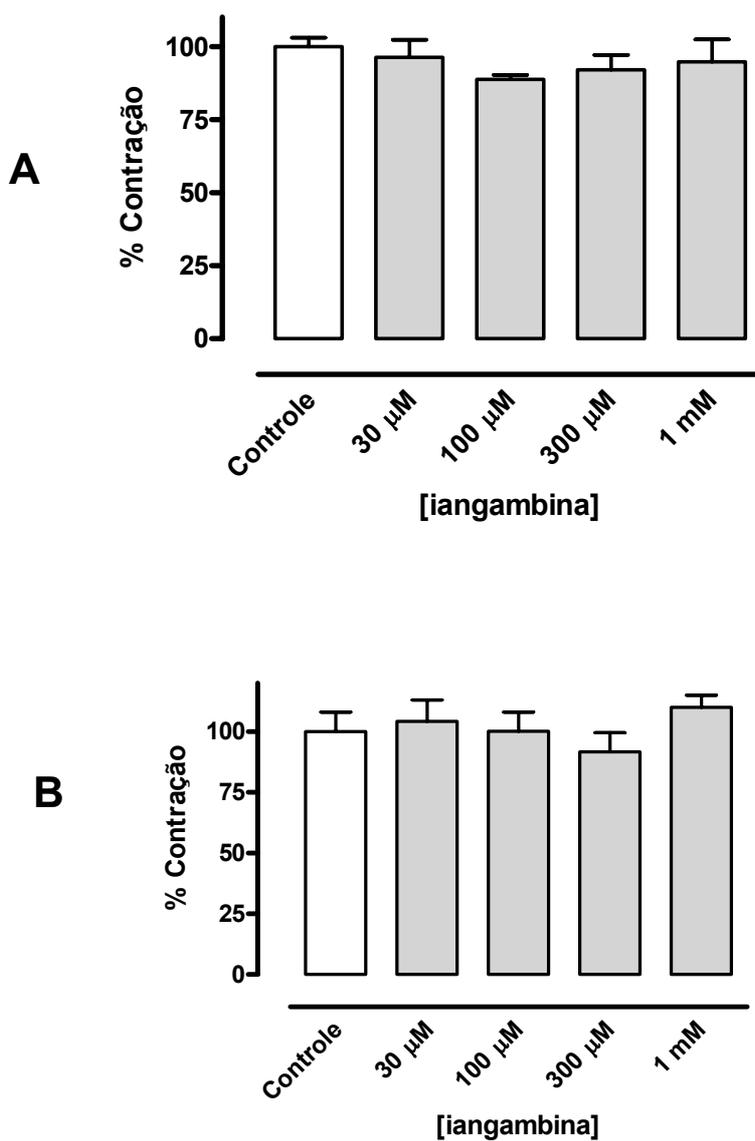


Figura 26: Efeito da iangambina (30, 100, 300 µM e 1 mM) sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 µM) (**A**) e cafeína (20 mM) (**B**) em anéis de artéria mesentérica superior de rato, sem o endotélio funcional. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. de 5 experimentos para cada concentração

5.2.2 Estudos com átrio isolado de rato

5.2.2.1 Efeito da iangambina sobre átrio isolado de rato

O efeito da iangambina (10^{-7} - 10^{-3} M) sobre a cronotropismo e inotropismo em preparação de átrio isolado de rato são mostrados na figura 27. A força contráctil

inicial do átrio esquerdo foi $0,3 \pm 0,04$ g. Concentrações crescentes da iangambina diminuíram gradualmente a contractilidade do átrio esquerdo, com efeito inotrópico negativo máximo de $37,5 \pm 6,4$ %, na contração de 1 mM de iangambina.

A automaticidade cardíaca foi avaliada em preparações de átrio direito isolado de rato. Iangambina produziu um discreto efeito cronotrópico negativo, detectável apenas em concentrações altas, com inibição máxima de cerca de 10% (Figura 27).

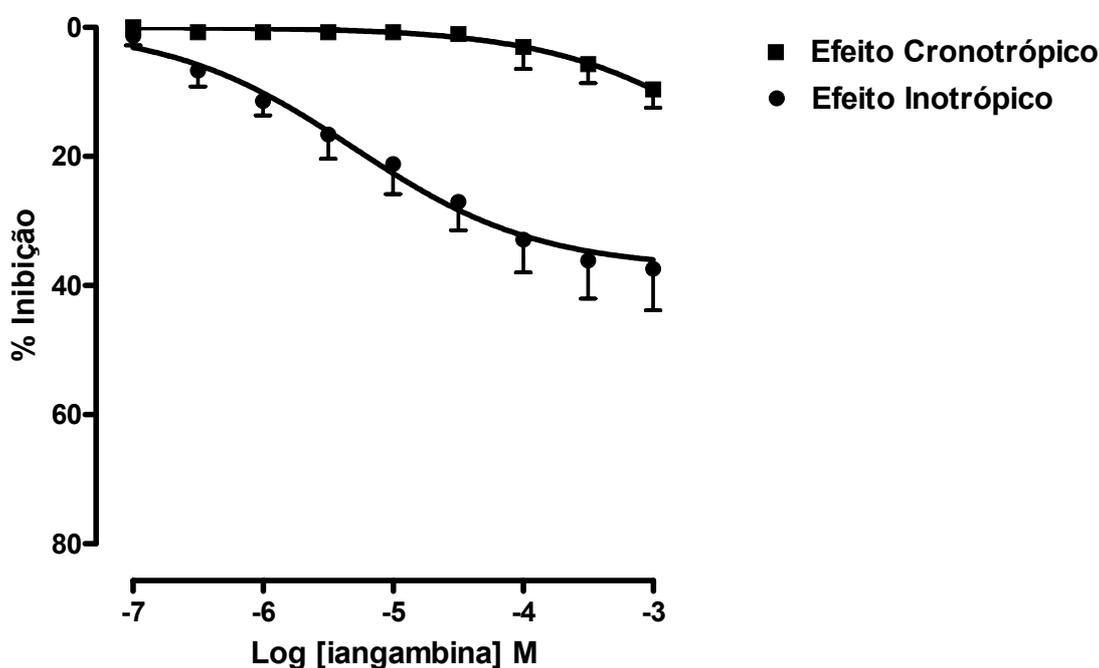


Figura 27: Curva concentração-resposta para iangambina (10^{-7} – 10^{-3}) em átrio isolado de rato. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 5 experimentos

5.2.3 Ensaio Bioquímicos

5.2.3.1 Efeito da iangambina sobre o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por KCl (65,4 mM) em miócitos de artéria mesentérica de rato

A incubação da iangambina (0,1 μ M, 30 μ M e 1 mM) não induziu alterações na $[Ca^{2+}]_i$ (dados não mostrados).

Em miócitos de artéria mesentérica superior de rato carregados com Fura-2/AM, a despolarização de membrana induzida por solução de KCl 65,4 mM induziu um aumento na $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 28 e 29). Quando as células foram pré-incubadas com concentrações isoladas de iangambina (0,1 μ M, 30 μ M e 1 mM) o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por KCl 65,4 mM foi significativamente inibido de maneira dependente de concentração.

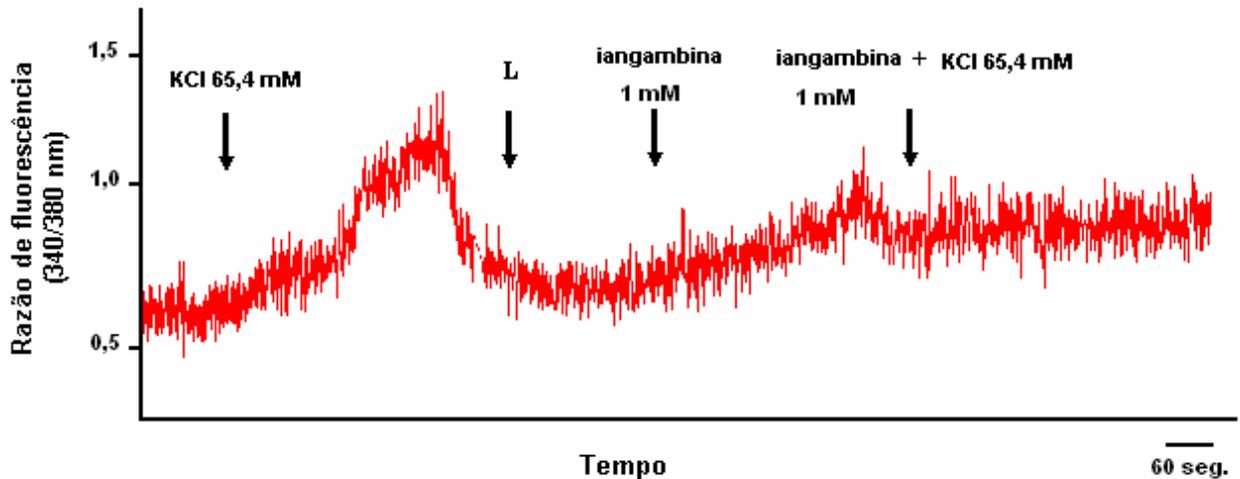


Figura 28: Registro original representativo do efeito da iangambina sobre a intensidade de fluorescência em miócito isolado de artéria mesentérica superior de rato carregado com Fura-2/AM. Está representada a razão de emissão de fluorescência (340/380 nm) de 10^6 contagens em função do tempo. Em meio 1,6 mM de Ca^{+2} a célula foi estimulada com KCl 65,4 mM. Após a lavagem da preparação (L), a célula foi pré-incubada com iangambina (1 mM) e após de 10 minutos estimulada com KCl 65,4 mM (iangambina + KCl 65,4 mM)

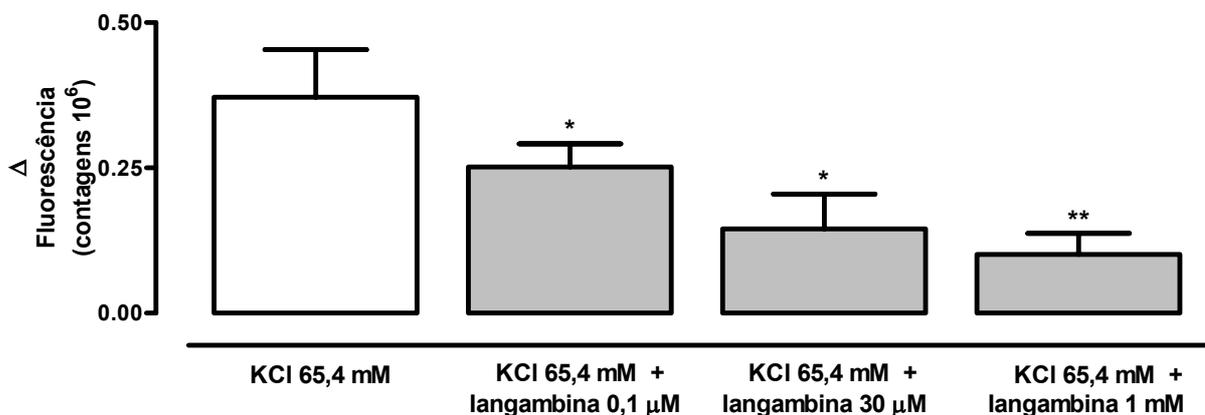


Figura 29: Efeito da iangambina sobre a intensidade de fluorescência em miócitos isolados de artéria mesentérica superior de rato carregados com Fura-2/AM. Os valores estão expressos pelo Δ de fluorescência (efeito final – basal) $\times 10^6$ contagens da razão de emissão de fluorescência (340/380 nm). * $p < 0,05$ vs KCl 65,4 mM, ** $p < 0,01$ vs KCl 65,4 mM

5.2.3.2 Efeito da iangambina sobre o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por S(-)-Bay K 8644 em miócitos de artéria mesentérica de rato

Em miócitos de artéria mesentérica superior de rato carregados com Fura-2/AM, a adição de S(-)-Bay K 8644 (100 nM), um ativador dos canais para Ca^{2+} sensíveis a diidropiridinas (ADACHI-AKAHANES et al., 1999), induziu um aumento na $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 30 e 31). Quando as células foram pré-incubadas com concentrações isoladas de iangambina (0,1 μ M, 30 μ M e 1 mM) o aumento do $[Ca^{2+}]_i$ induzido por S(-)-Bay K 8644 foi significativamente inibido.

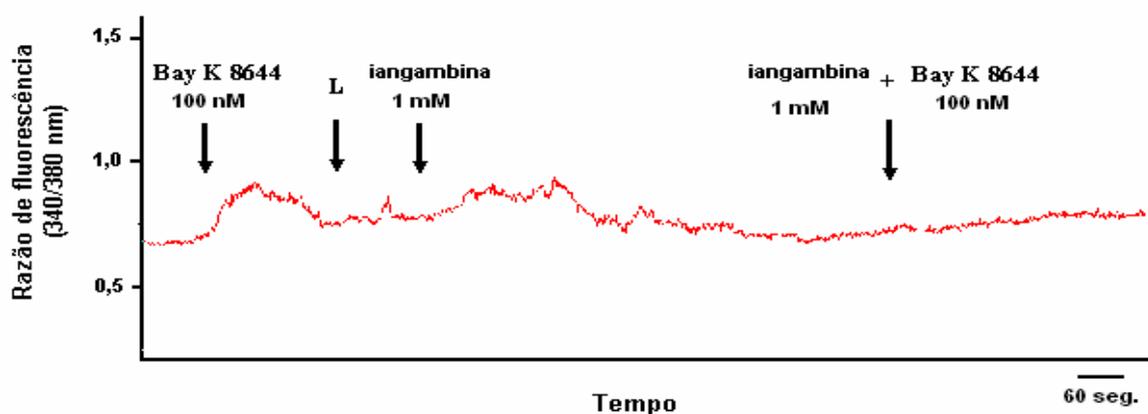


Figura 30: Registro original representativo do efeito da iangambina sobre a intensidade de fluorescência em miócito isolado de artéria mesentérica superior de rato carregado com Fura-2/AM. Está representada a razão de emissão de fluorescência (340/380 nm) de 10^6 contagens. Em meio 1,6 mM de Ca^{2+} a célula foi estimulada com S(-)-Bay K 8644 (100 nM). Após a lavagem da preparação (L), a célula foi pré-incubada com iangambina (1 mM) e após de 10 minutos estimulada com S(-)-Bay k 8644 (100 nM) (iangambina + Bay K 8644)

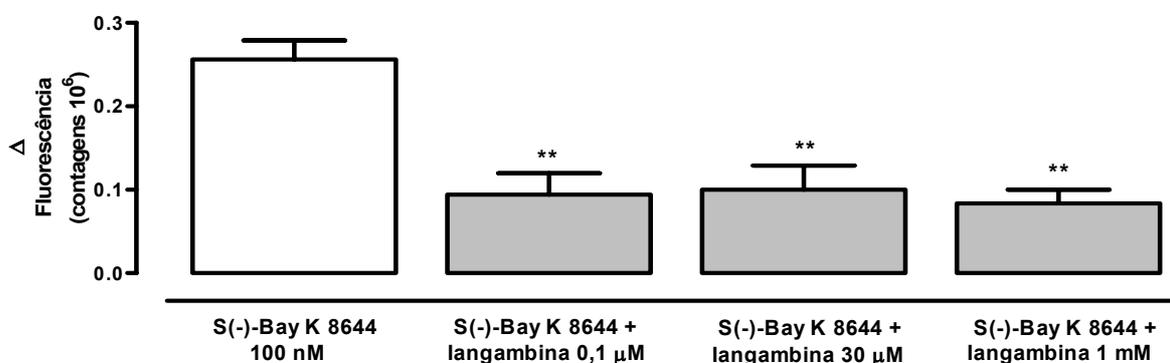


Figura 31: Efeito de iangambina sobre a intensidade da fluorescência em miócitos isolados de artéria mesentérica superior de rato carregados com Fura-2/AM. Os valores estão expressos pelo Δ de fluorescência (efeito final – basal) $\times 10^6$ contagens da razão de emissão de fluorescência (340/380 nm). ** $p < 0,01$ vs S(-)-Bay k 8644

Discussão

6 DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo foi que iangambina, uma lignana isolada das folhas e das cascas do caule da *Ocotea duckei* Vattimo, promove efeito hipotensor em ratos normotensos não anestesiados e induz vasorelaxamento em artéria mesentérica de rato. O efeito relaxante induzido por iangambina parece ser mediado por uma inibição do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v , levando a uma diminuição na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e conseqüente relaxamento do músculo liso vascular.

A avaliação do efeito da administração aguda de iangambina sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos foi realizada em animais não anestesiados, uma vez que, a anestesia modifica os níveis de PA e FC além do funcionamento dos principais sistemas envolvidos na regulação da PA, tais como o sistema renina-angiotensina, o sistema nervoso simpático e o barorreflexo (FLUCKIGER et al., 1985; DORWARD et al., 1985), produz depressão de algumas sinapses do sistema nervoso central, alterando as respostas autonômicas (KORNER et al., 1968; WHITE; MCRITCHIE, 1973; ZIMPFER et al., 1982), além de outros efeitos prejudiciais sobre os sistemas básicos de controle fisiológico da PA (FLUCKIGER et al., 1985; SMITH; HUTCHINS, 1980).

Em animais normotensos não anestesiados a administração aguda de iangambina induziu uma resposta transiente de maneira dependente de dose, caracterizada por uma hipotensão associada a uma taquicardia provavelmente de origem reflexa. Esses resultados iniciais estão de acordo com estudos mostrando que a administração sistêmica de iangambina induziu uma hipotensão transiente (2 – 3 minutos) tanto em coelhos (FARIA NETO et al., 1995b; TIBIRIÇÁ, 2001) como em ratos (TIBIRIÇÁ et al., 1996; TIBIRIÇÁ, 2001), ambos anestesiados e ventilados artificialmente, embora a redução da pressão arterial tenha sido menos intensa do que a observada em animais não anestesiados.

Tibirichá e colaboradores (1996) observaram que a hipotensão induzida por iangambina, em ratos anestesiados e ventilados artificialmente, não foi antagonizada por WEB 2086, um antagonista do receptor do PAF, derrubando sua hipótese inicial de que o efeito hipotensor induzido por iangambina poderia ser devido a uma possível atividade agonista parcial lignana sobre o receptor do PAF.

No presente estudo foi observado que iangambina induziu um vasorelaxamento dependente de concentração em anéis de mesentérica superior isolada de rato, com endotélio intacto, pré-contraídos com FEN, um agonista α -adrenérgico.

Durante a década passada, novas funções para a célula endotelial foram sendo descobertas, e o endotélio vascular conceitualmente deixou de ser uma barreira passiva entre o tecido e o sangue e passou a seu *status* atual de um órgão multifuncional e integrado, principalmente a partir da descoberta do chamado fator relaxante derivado do endotélio e sua posterior identificação como óxido nítrico (FURCHGOTT et al., 1980). Na literatura estudos mostram o importante papel desempenhado pelos fatores vasorelaxantes difusíveis produzido pelo endotélio vascular, atualmente descritos como óxido nítrico (espécie reativa de oxigênio), prostaglandina (metabólitos do ácido araquidônico) e um terceiro fator ainda não caracterizado chamado fator hiperpolarizante derivado do endotélio, no controle do tônus vascular e pressão sangüínea (FELETOU; VANHOUTTE, 2006). Assim como, a participação do endotélio nos relaxamentos induzidos por uma variedade de substâncias químicas, endógenas e exógenas (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; COHEN; VANHOUTTE, 1995; CHAUHAN et al., 2003). Diante destas considerações, passamos a avaliar a influência do endotélio funcional na resposta vasorelaxante induzida por iangambina, para tanto, utilizamos preparações em que o endotélio foi mecanicamente removido e comparamos a resposta relaxante desta lignana na presença e na ausência do mesmo. De fato, iangambina relaxa de forma equipotente as contrações induzidas por FEN na presença e na ausência do endotélio funcional, levando-nos a sugerir que o vasorelaxamento produzido por iangambina, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, não parece ser mediado por fatores vasoativos liberados pelo endotélio vascular, mas provavelmente devido a um efeito direto da lignana sobre o músculo liso arterial.

Nas células de músculo liso, a hiperpolarização ou repolarização podem ser produzidas por agentes que ativam os canais para K^+ , levando ao efluxo desses íons e conseqüente vasodilatação (GURNEY, 1994; NELSON; QUAYLE, 1995). Os canais para K^+ têm um importante papel na homeostasia da pressão sanguínea, pela regulação das funções vasculares das células musculares lisas e cardiomiócitos (BERG, 2002).

Uma propriedade típica das drogas que promovem vasodilatação por ativarem canais para K^+ é que elas efetivamente inibem a contração da musculatura vascular produzida por um aumento moderado na concentração de K^+ extracelular (< 40 mM), porém não são efetivas quando a concentração de K^+ é alterada para níveis mais altos. Isto porque em elevadas concentrações de K^+ , o potencial de membrana da célula muscular lisa está próximo do potencial de equilíbrio do K^+ , onde não ocorre efluxo deste íon, e portanto, a hiperpolarização é evitada. Esta propriedade permite estabelecer distinção entre os ativadores de canais para K^+ e os antagonistas de canais para Ca^{2+} , que demonstram comportamento diferenciado nesta circunstância (GURNEY, 1994).

Baseado na importância dos canais para K^+ na regulação de funções vasculares resolvemos avaliar a participação destes canais na resposta vasorelaxantes induzida por iangambina. Utilizando preparações incubadas com KCl 20 mM, condição em que promove bloqueio parcial do efluxo de K^+ e atenuando desta forma relaxamentos mediados por abertura de canais para K^+ (GURNEY, 1994; CLARK; FUCHS, 1997). O aumento do K^+ extracelular (de 4 para 20 mM) não alterou significativamente o vasorelaxamento dependente de concentração induzido por iangambina, esses indícios sugerem que a resposta relaxante induzida pela iangambina parece não envolver estes canais.

Com a finalidade de observar a resposta de iangambina frente às contrações geradas por diferentes estímulos, passamos a avaliar o efeito de iangambina em preparações pré-contraídas com solução despolarizante de KCl 80 mM. Já é bem descrito na literatura que contrações induzidas por altas concentrações de K^+ , nas células de músculo liso, é mediada por uma despolarização de membrana e um aumento do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v (GODFRAIND; KABA, 1969; SOMLYO; SOMLYO, 1994). A geração da contração por agonista de receptores acoplados a proteína Gq/11 (ex. FEN), em células de músculo liso, é resultado da mobilização de ambos Ca^{2+} intracelular e extracelular (KITAZAWA; MASUO; SOMLYO, 1991; KARAKI et al., 1997). Interessantemente, iangambina foi mais potente em relaxar as contrações induzidas por altas concentrações de K^+ do que as contrações geradas por FEN. Esses resultados podem ser indicativo que o efeito vasorelaxante induzido por iangambina possa envolver o bloqueio de canais para Ca^{2+} . Baseado nestes resultados, comparamos o perfil farmacológico apresentado por iangambina frente às contrações induzidas por

FEN e KCl 80 mM com o da nifedipina, um antagonista dos Ca_v tipo L (FERRARI et al., 1994). Nifedipina também foi mais potente em relaxar as contrações induzidas por KCl 80 mM do que as contrações geradas por FEN. A semelhança no perfil farmacológico apresentado por iangambina e nifedipina corrobora com a hipótese de que iangambina possa estar bloqueando os Ca_v .

Para verificar a hipótese de que iangambina estaria bloqueando o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v , avaliou-se o efeito de iangambina frente às contrações induzidas por $CaCl_2$, em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} . Este protocolo experimental baseia-se no fato de que as contrações são geradas, quase que exclusivamente, pelo influxo de Ca^{2+} , já que a despolarização promovida por concentração elevada de K^+ extracelular induz a abertura dos Ca_v . Iangambina antagonizou de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por $CaCl_2$.

Esses resultados em conjunto, sugerem que o efeito vasorelaxante induzido por iangambina pode ser devido a uma possível interação da lignana com os Ca_v , resultando em uma diminuição no influxo de Ca^{2+} em músculo liso de artéria mesentérica superior de rato.

As células musculares lisas vasculares expressam dois tipos principais de Ca_v , os Ca_v1 (tipo-L) e os Ca_v3 (tipo-T). Os Ca_v1 (tipo-L), mais recentemente referidos como $Ca_v 1.2$ (CATERRAL et al., 2005), são os mais expressos, desta forma, exercendo um papel importante na determinação da pressão sanguínea sendo seus bloqueadores uma importante classe de drogas anti-hipertensivas (CRIBBS, 2006).

Com o intuito de avaliar o sub-tipo de Ca_v envolvido na resposta vasorelaxante induzida pela iangambina, analisou-se seu efeito sobre as contrações tônicas induzidas pelo derivado diidropiridínico S(-)-Bay K 8644, um agonista seletivo dos Ca_v1 tipo-L (SCHRAMM et al., 1983). Iangambina inibiu as contrações tônicas induzidas por S(-)-Bay K 8644 de maneira dependente de concentração, entretanto com potência menor do que aquelas obtidas quando as contrações foram induzidas por FEN ou KCl 80 mM. Esses dados sugerem o envolvimento dos Ca_v tipo-L na resposta vasorelaxante induzida por iangambina porém, não descartando o envolvimento de outros Ca_v nesta resposta.

Vários produtos naturais derivados de plantas causam vasodilatação por alterar o metabolismo do Ca^{2+} nas células de músculo liso vascular (MCNEILL;

JURGENS, 2006). De fato, o aumento e a diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular são os principais sinais que iniciam respectivamente, a contração e o relaxamento musculares (KARAKI et al., 1997). O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em células de músculo liso vascular é principalmente controlada pelo influxo de Ca^{2+} e a mobilização de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. Tem sido bem documentado que a mobilização de Ca^{2+} é um importante mediador da resposta vascular de muitas substâncias vasoativas. O inositol 1,4,5-tris-fosfato (IP_3) foi reconhecido como o primeiro mensageiro secundário a mediar respostas vasculares de vários agonistas tais como noradrenalina, angiotensina II, vasopressina, endotelina, tromboxano A2 e outros (ZHANG; LI, 2006). Neste processo, agonistas atuando através dos seus respectivos receptores ativam a fosfolipase C, o qual converte fosfatidilinositol-4, 5,-bifosfato (PIP_2) em IP_3 e diacilglicerol (DAG). O IP_3 induz a liberação de Ca^{2+} através dos receptores de IP_3 (IP_3R) no retículo sarcoplasmático levando a um aumento do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (THORNELOE; NELSON, 2005). Os eventos de liberação de Ca^{2+} mediados por IP_3R são chamados “puffs” de Ca^{2+} (THORNELOE; NELSON, 2005).

Existem muitos agonistas ou estímulos que induz a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares independente da via do IP_3 , por exemplo a cafeína, o próprio Ca^{2+} e outros induz a mobilização de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático através da ativação dos receptores de rianodina (RYR). Os RYRs são canais para Ca^{2+} , análogos aos IP_3Rs , presentes na membrana do retículo sarcoplasmático que são abertos por ligação do Ca^{2+} em um sítio citoplasmático do canal (THORNELOE; NELSON, 2005). Os eventos de liberação de Ca^{2+} mediados por RYRs são chamados “sparks” de Ca^{2+} (JAGGAR et al., 2000).

A mobilização de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático através de IP_3Rs e RYRs, em células de músculo liso, pode gerar ondas de Ca^{2+} , o qual é sugestivo de mediar vasoconstrição (JAGGAR et al., 2000; THORNELOE; NELSON, 2005). Paradoxalmente, os transientes de Ca^{2+} gerados pela liberação de Ca^{2+} através de IP_3Rs e RYRs, na forma de “puffs” e “sparks” de Ca^{2+} , respectivamente, em células de músculo liso, podem ativar os canais para K^+ ativados pelo Ca^{2+} (K_{Ca}) promovendo hiperpolarização de membrana limitando a contratilidade do músculo liso (JAGGAR et al., 2000; THORNELOE; NELSON, 2005).

Baseado na importância dos sinais de Ca^{2+} gerados por IP_3Rs e RYRs para as funções vasculares resolvemos avaliar a participação da mobilização de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis a IP_3 e cafeína na resposta vasorelaxante induzida

por iangambina. Para isso, foram geradas contrações transientes induzidas por 10 μ M FEN ou 20 mM cafeína, em meio livre de Ca²⁺. Nestas condições, essas contrações são mediadas apenas via a liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares. A incubação de iangambina, nas mesmas condições, não alterou as contrações transientes induzidas por FEN ou cafeína. Esses resultados sugerem que iangambina provavelmente não interfere com a mobilização de Ca²⁺ induzida por IP₃ (ativada pela FEN) nem tão pouco com a mobilização de Ca²⁺ através de RYRs (ativada pela cafeína).

Com os dados até aqui apresentados demonstramos em nível funcional, que iangambina promove relaxamento de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato provavelmente devido a um bloqueio no influxo de Ca²⁺ através dos Ca_v. A fim de confirmarmos tais evidências, foram realizados ensaios bioquímicos utilizando miócitos de artéria mesentérica de rato para medida da concentração citoplasmática de Ca²⁺.

Nestes experimentos, foi constatado que iangambina foi capaz de inibir o aumento na [Ca²⁺]_i induzido por solução despolarizante (KCl 65,4 mM) e por S(-)-Bay K 8644. Esses achados corroboram com os resultados obtidos nos experimentos funcionais, onde evidenciam que o vasorelaxamento induzido por iangambina é provavelmente promovido por uma inibição do influxo de Ca²⁺ através dos Ca_v com conseqüente diminuição da [Ca²⁺]_i.

As drogas que bloqueiam os canais para Ca²⁺ tem sido usadas clinicamente no tratamento de uma variedade de desordens cardiovasculares, incluindo a hipertensão (VAN ZWIETEN; JONGE; TIMMERMANS, 1983). Sabe-se que as diidropiridinas são bloqueadores de canais para Ca²⁺ relativamente seletivos para os canais para Ca²⁺ tipo-L no músculo liso vascular e bloqueia a porção extracelular deste canal, levando a uma vasodilatação e uma taquicardia reflexa (FERRARI et al., 1994). O mecanismo pelo qual as diidropiridinas interage com os canais para Ca²⁺ tipo-L parece ser dependente de estado do canal, apresentado maior afinidade de ligação com o canal no estado inativado, o qual é favorecido em potenciais de despolarizados (BEAN, 1984). Em contraste, outras classes de bloqueadores de canais para Ca²⁺, tais como fenilalquilaminas, atuam através de efeitos combinados, incluindo redução na frequência cardíaca e contratilidade cardíaca, resultando em depressão cardíaca e bradicardia (FERRARI et al., 1994).

Baseado nessas diferenças de seletividade teciduais apresentadas pelas diferentes classes de bloqueadores de canais para Ca^{2+} , resolvemos avaliar o efeito de iangambina sobre o cronotropismo e inotropismo cardíaco usando átrio isolado de rato. Nestas preparações, iangambina induziu um efeito inotropico negativo de $37,5 \pm 6 \%$ associado a uma discreto efeito cronotropico negativo de cerca de 10%. Comparando-se os efeitos cardíacos da iangambina com suas propriedades vasorelaxantes, é relevante sugerir que seu efeito vascular se sobressai aos seus efeitos cardíacos, mostrando uma maior vasoseletividade.

Por fim, esses resultados em conjunto sugerem que iangambina induz efeito vasorelaxante em anéis de artéria mesentérica superior de rato medido pelo bloqueio dos Ca_v , e esse efeito vasorelaxante pode ser responsável pelo efeito hipotensor observado nos experimentos *in vivo*.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, o presente estudo, fazendo uso de abordagens *in vivo* e *in vitro*, demonstrou que:

- 1) Iangambina induz hipotensão e taquicardia em ratos normotensos não anestesiados de maneira dependente da dose. Os resultados encontrados sugerem que a hipotensão é provavelmente devido a uma diminuição da resistência vascular periférica total, enquanto que a taquicardia parece ser decorrente de uma resposta reflexa;
- 2) Iangambina apresenta um efeito discreto em átrio isolado de rato, o qual não parece contribuir para as alterações na pressão arterial induzidas por iangambina;
- 3) Iangambina promove vasorelaxamento, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, de maneira independente do endotélio vascular;
- 4) Os efeitos biológicos induzidos por iangambina parecem não envolver diretamente a participação de canais para K^+ nem interferir com a mobilização de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis ao IP_3 e/ou sensíveis à cafeína;
- 5) Iangambina inibe o aumento na $[Ca^{2+}]_i$ induzidos por soluções despolarizante (KCl 65,4 mM) e por S(-)-Bay K 8644, em miócitos de artéria mesentérica de rato;
- 6) O efeito relaxante vascular induzido por iangambina parece ser mediado por uma inibição do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v .

Perspectivas

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar as influências do tratamento com iangambina sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em modelos diferentes de animais hipertensos, tais como: modelo de ratos geneticamente hipertensos de Lyon e modelo de hipertensão renovascular, 2 rins e 1 clip;
- Avaliar a reatividade vascular, em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos tratados com iangambina;
- Estudar o efeito de iangambina sobre as correntes de Ca^{2+} e suas propriedades, utilizando a técnica de patch-clamp na configuração whole cell.

Referências

REFERÊNCIAS

AALKJAER, C.; FRISCHE, S.; LEIPZIGER, J. et al. Sodium coupled bicarbonate transporters the Kidney, an update. **Acta Physiol Scand**, v.181, n.4, p.505 –512, 2004.

ADACHI-AKAHANE, S.; CLEEMANN, L.; MORAD, M. BAY K 8644 modifies Ca^{2+} cross signaling between DHP and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. **Am J Physiol**, n. 276, p.H1178 – H1189, 1999.

ALENCAR, V. P. **Atividade vasorelaxante da iangambina, uma lignana furofurância obtida da *Ocotea dickei* Vattimo (Lauraceae), em aorta isolada de rato**. João Pessoa, 2001. Dissertação (Mestrado) UFPB.

ALMEIDA, R. N.; PACHÚ, C. O.; BARBOSA FILHO, J. M. Avaliação da possível atividade analgésica da iangambina obtida *Ocotea duckei* Vattimo. **Revista do CCS**, n. 14 p.07-10, 1995.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **Am J Physiol**. v.219, n.6, p.1698 -1705, 1970.

ARAÚJO, C. V.; BARBOSA FILHO, J. M.; CORDEIRO, R. S. B. et al. Protective effects of yangambin on cardiovascular hyporeactivity to catecholamines in rats with endotoxin-induced shock. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, n. 363, p.267 - 275, 2001.

AU, A. L.; KWOK, C. C.; LEE, A. T. et al. Activation of iberiotoxin-sensitive, Ca^{2+} -activated K^+ channels of porcine isolated left anterior descending coronary artery by diosgenin. **Eur J Pharmacol**, n. 502, p.123 - 133, 2004.

AZIZI, M.; MENARD, J.; BISSERY, A. et al. Pharmacologic demonstration of the synergistic effects of a combination of the renin inhibitor aliskiren and the AT1 receptor antagonist valsartan on the angiotensin II-renin feedback interruption. **Am J Hypertens**, n.12 p. 3126 -3133, 2004.

BARBOSA FILHO, J. M.; VARGAS, M. R. W.; SILVA, I. G.; FRANÇA, I. S. et. al. *Ocotea duckei*: exceptional source of yangambin and other furofuran lignans. **An Acad Bras Cienc**, n. 71, p. 231 – 238, 1999.

BEAN, B. P. Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 81, n.20, p.6388 – 6392, 1984.

BERG, T. Analysis of the pressor response to the K⁺ channel inhibitor 4-aminopyridine. **Eur J Pharmacol**, n. 452: p.325 - 337, 2002.

BRUNNER, H. R.; NUSSBERGER, J.; WAEBER, B. Angiotensin II blockade compared with other pharmacological methods of inhibiting the renin-angiotensin system. **J Hypertens Suppl**, v.11, n.3, p.S53 - S58, 1993.

CAMPAGNOLE SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, n.8, p.30 - 40, 2001.

CAMPBELL, W. B.; GEBREMEDHIN, D.; PRATT, P. F.; HERDER, D. R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circ Res**, v.78, n.3, p.415 - 423, 1996.

CATTERALL, W. A.; REYES, E. P.; SNUTCH, T. P. et al.; STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. **Pharmacol Ver**, n.57, p.411 – 425, 2005.

CLARK, S. G.; FUCHS, L. C. Role of nitric oxide and Ca²⁺-dependent K⁺ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **J Pharmacol Exper Ther**, v.282, n.3, p.1473 - 1479, 1997.

CHAUHAN, S.; RAHMAN, A.; NILSSON, H.; CLAPP, L.; MACALLISTER, R.; AHLUWALIA, A. NO contributes to EDHF-like responses in rat small arteries: a role for NO stores. **Cardiovascular Res**, v.57, n.1, p.207 - 216, 2003.

CHOBANIAM, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C. et. al. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure. **Hypertension**, v.42, n.6, p.1206 -1252, 2003.

COHEN, R. A.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization: beyond nitric oxide and cyclic GMP. **Circulation**, v.92, n.11, p.3337 – 3349, 1995.

COHUET, G.; STRUIJKER-BOUDIER, H. Mechanisms of target organ damage caused by hypertension: Therapeutic potential. **Pharmacol Ther**, v.111, n.1, p.81 – 98, 2006.

COLEMAN, T. G.; MANNINIG, R. D. Jr.; NORMAN, R. A. Jr. et al. The role of the kidney in spontaneous hypertension. **Am Heart J**, v.89, n.1, p.94 - 98, 1975.

CRAVO, A. B. **Frutas e ervas que curam**. São Paulo-SP: Húmus. 1999.

CRIBBS, L. L. T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. **Cell Calcium**, v.40, n.20, p.221 - 230, 2006.

CUNHA, R. M. **Efeitos do óleo essencial de *ocatea duckei vattimo* (Lauraceae) sobre parâmetros cardiovasculares de ratos**. João Pessoa, 2004. 106p. Tese (Doutorado). UFPB.

DAVIE, C. S.; KUBO, M.; STANDEN, N. B. et al. Potassium channel activation and relaxation by nicorandil in rat small mesenteric arteries. **Br J Pharmacol**, v. 125, n.8, p.1715 - 1725, 1998.

DEEDWANIA, P. C. Calcium channel blockers. **West J Med**, v.137, n.1, p.24 - 31, 1982.

DE QUEIROZ-PAULO, M.; KAPLAN, M. A. C.; LAPREVOTE, O. et al. Lignanas and other non-alkaloidal constituents from *Rollinea mucosa*. **Fitoterapia**, n.62, p.150 - 152, 1991.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: Arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed. Univ. Estadual Paulista, 1996. 230p.

DORWARD, P. K.; RIEDEL, W.; BURKE, S. L. et al. The renal sympathetic baroreflex in the rabbit. Arterial and cardiac baroreceptor influences, resetting, and effects of anesthesia. **Circ Res**, n.57, p.618 - 633, 1985.

FARIA NETO, C. H. C.; BOZZA, P. T.; CRUZ, H. N. et al. Yangambin: a new naturally-occurring platelet-activating factor receptor antagonist: Binding and in vitro functional studies. **Planta Med**, v.61, n.2, p.101 - 105, 1995a.

FARIA NETO, C. H. C.; ARAÚJO, C. V.; MOREIRA, S. et al. Yangambin: a new naturally-occurring platelet-activating factor receptor antagonist: *in vivo* pharmacological studies. **Planta Med**, v.61, n.2, p.106 - 112, 1995b.

FELETOU, M.; VANHOUTTE P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.26, n.6, p.1215 - 25, 2006.

FERRARI, R.; CUCCHINI, F.; BOLOGNESI, R. et. al. How do calcium antagonists differ in clinical practice? **Cardiovasc Drug Ther**, n.8, p.565 – 575, 1994.

FLUCKIGER, J. P.; SONNAY, M.; BOILLAT, N. et. al. Attenuation of baroreceptor reflex by general anesthetic agent in the normotensive rat. **Eur J Pharmacol**, n.109, p.105 - 109, 1985.

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiol Rev**, n.62 p.347 -504, 1982.

FREIS, E. D. How diuretics lower blood pressure. **Am Heart J**, n.106, p.185 - 187, 1983.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 373 - 376, 1980.

GALVÃO, S. Plantas Mediciniais. **Revista do INCOR**, v. 2, n.25, 1987.

GAZIANO, T. A. Cardiovascular disease in the developing world and its cost-effective management. **Circulation**, v.112, n.23, p. 3547 - 53, 2006.

GHISALBERTI, E. L. Cardiovascular activity of naturally occurring lignans. **Phytomedicine**. v.4, n.2, p. 151 - 166, 1997.

GODFRAIND, T.; KABA, A. Blockade or reversal of the contraction induced by calcium and adrenaline in depolarized arterial smooth muscle, v.36, n.3, p.549 - 60, 1969.

GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R. Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. **J Biol Chem**, v.260, n.6, p.3440 - 50, 1985.

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilatation. **J Pharm Pharmacol**, v.46, n.4, p. 242 - 251, 1994.

HERBERT, J. M.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; Pharmacological evidence for the putative existence of two different subtypes of PAF receptors on platelets and leukocytes; studies with yangambin. **J Lipid Mediat Cell Signal**, n.17, p. 1 - 14, 1997.

HUSSAIN, R. A.; DICKEY, J. K.; ROSSER, M. P. et al. A novel class of non-peptide antagonists isolated from the medicinal herb *Phyllanthus niruri*. **J Nat prod**, n.58, p.1515 - 1520, 1988.

INSEL, P. A. Adrenergic receptors – evolving concepts and clinical implications. **N Engl J Méd**, n.334, p.580 - 585, 1996.

ISHITANII, L. H.; FRANCO, G. C.; PERPÉTUO, I. H. O. Desigualdade social e mortalidade precoce por doenças cardiovasculares no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 40, n.4, p.684 - 91, 2006.

JACKSON, W. F. Ion channel and vascular tone. *Hypertension*. n. 35 [parte 2], p.173 -178, 2000.

JAGGAR, J. H.; PORTER, V. A.; LEDERER, W. J.; NELSON, M. T. Calcium sparks in smooth muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, n.278, p.C235 – C256, 2000.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M. et. al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol Rev**, v.49, n.2, p.157 - 230, 1997.

KAPLAN, N. M. Systemic hypertension: Mechanisms and diagnostics in Braunwald. In: ZIPES, Libby. **Heart Disease: Saunders**. Systemic Hypertension: Mechanisms and Diagnostics in Braunwald, Zipes, Libby, 2001. p.954-960. cap.5.

KARLBERG, B. E. Cough and inhibition of the renin-angiotensin system. *J Hypertens*. n.11 (suppl 3), p. 49 - 52, 1993.

KEVIN, S. T.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Can J Pharmacol**, n.83, p.215 - 242, 2005.

KITAZAWA, T.; MASUO, M.; SOMLYO, A. P. G protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.88, n.20, p.9307 - 10, 1991.

KORNER, P. I.; LANGSFORD, G.; STARR, D. The effects of chloralose-urethane and sodium pentobarbitone anesthesia on the local and autonomic components of the circulatory response to arterial hypoxia. **J Physiol**, (Lond), n.199, p. 283 - 302, 1968.

KUROEDOV, A.; COSENTINO, F.; LUSCHER, T. F. Pharmacological mechanisms of clinically favorable properties of a selective beta-1 adrenoceptor antagonist, nebivolol. **Cardiovascular drug Ver**, v.22, n.3, p.155 - 68, 2004.

LANDINI D. Princípios Ativos Naturais: O Potencial do Brasil. **Revista do INCOR**, n.35, p.20 – 28, 1997.

LINO, M. Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci. **J Gen Physiol**, n. 94, p.363 – 383, 1989.

LIPSCOMBRE, D.; HELTOM, T. D.; XU, W. L-type calcium channels: the low down. **J. Neurophysiol**, v.92, n.5, p. 2633 - 41, 2004.

LUND-JOHANSES, P.; OMVIK, P. Cardiac effects of ACE inhibition. **J Cardiovasc Pharmacol**, n.22 (suppl. 1), p.S36 - S40, 1993.

MASSANET, G. M.; PANDO, E.; RODRIGUEZ-LUIS, P.; ZUBIA, E. Lignans: A review. **Fitoterapia**. n.60, p. 3 – 35, 1988.

MARQUES, R. C. P.; MEDEIROS, S. R. B.; DIAS, C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGNEZ-LIMA, L. F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. **Mutat Res**, v.536, n.1 – 2, p.117 - 120, 2003.

MESQUITA, L. M.; ROQUE, N. F.; QUINTANA, L. M. B. et. al. Lignans from *Rollinia* species. **Biochem Syst Ecol**, n.16, p.379 - 380, 1988.

MCNEILL, J. R.; JURGENS, T. M. A systematic review of mechanisms by which natural products of plant origin evoke vasodilatation. **Can J Physiol Pharmacol**, n.84, p.803 - 821, 2006.

MORAIS, L. C. S. L.; ALMEIDA, R. N.; DA-CUNHA, E. V. L. et. al. Further lignans from *Ocotea duckei*. **Pharm Biol**, n.37, p.144 - 147, 1999.

MROCZEK, W. J.; BURRIS, J. F.; ALLENBY, K. S. Effect of amlodipine on 24-hour ambulatory blood pressure in hypertensive patients. **J Cardiovasc Pharmacol**, n.17 (suppl. 1), p.S13 - S15, 1991.

NASA, Y.; ICHIHARA, K.; YOSHIDA, R.; ABIKO, Y. Positive inotropic and negative chronotropic effects of (-)-cis-diltiazem in rat isolated atria. **Br J Pharmacol**, v.105, n.3, p.696 - 1992.

NELSON, M. T.; PATLAK, J. B.; WORLEY, J. F.; STANDEN, N. B. Calcium channels, potassium channels, and voltage-dependence of arterial smooth muscle tone. **Am J Physiol**, n.259, p. C3 - C18, 1990.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial muscle. **Am J Physiol**, n.268, p.C799 - C822, 1995.

OATES, J. A. Antihypertensive agents and the drug therapy of hypertension. In: HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. G.; LIMBRIND L. E.; GOODMAN & GILMAN'S. **The pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. USA: McGraw-Hill, 1996. 781p.

OHYA, Y.; ABE, I.; FUJI, K. Voltage-dependent Ca^{2+} channels in resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. **Circ Res**, n.73, p.1090-1099, 1993.

PACHÚ, C. O. et al. Atividade depressora do sistema nervoso central da iangambina. **Cienc Cult Saúde**, n.12, p.14-16, 1993.

PEREZ-PEYESE Molecular Physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. **Physiol Rev**, v.83, n.1, p.117 - 61, 2003.

PESIC, A.; MADDEN, J. A.; PESIC, M. et. al. High blood pressure upregulates arterial L-type Ca^{2+} channels: is membrane depolarization the signal? **Circ Res**, p.94;97;104, 2004.

RIBEIRO, R.; CARVALHO, F. A. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Protective effects of yangambin – a naturally occurring platelet-activating factor (PAF) receptor antagonist – on anaphylactic shock in rats. **Phytomedicine**, n.3, p.249 - 256, 1996.

SAFAR, M. E.; PERONNEAU, P. P.; LEVENSON, J. A. et al. Pulsed Doppler: diameter, blood flow velocity and volumic flow of the brachial artery in sustained essential hypertension. **Circulation**, n.63, p.393 - 400, 1981.

SCHIFFRIN, E. L.; DENG, L. Y.; LAROCHELLE, P. Prospective Study of the Effects of an Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor and a Beta Blockader on the Structure and Function of Resistant Arteries in Mild Essential Hypertension. **Arch Mal Coeur Vaiss**, n.87, p.979 - 981. 1994b.

SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R. et. al. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca^{2+} channels. **Nature**, n.303, p.535 - 537, 1983b.

SERRA, M. F.; DIAZ, B. L.; BARRETO, E. O. et. al. Anti-allergic properties of the natural PAF antagonist yangambin. **Planta Méd**, n.63, p.207-212, 1997.

SONKUSARE, S.; PALADE, P. T.; MARSH, J. D. et. al. Vascular calcium channel and high blood pressure: Pathophysiology and therapeutic implications. **Vascul Pharmacol**, v.44, n.3, p.131 - 142, 2006.

SMITH, T. L.; HUTCHINS, P. M. Anesthetic effects on hemodynamics of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **Am J Physiol**, n.238, p.H539 - H544, 1980.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v.372, n.6503, p. 231 - 6, 1994.

STEKIEL, W. J.; CONTNEY, S. J.; RUSCH, N. J. Altered β -receptor control of in situ membrane potential in hypertensive rats. **Hypertension**, n.21, p.1005 - 1009, 1993.

TAKESHITA, A.; MARK, A. L. Decreased venous distensibility in boderline hypertension, **Hypertension**, n.1, p. 202 - 206, 1979.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; TANAKA, H. et. al. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sypanthetic neurogenic contraction of rat mesenteric. **Br J Pharmacol**, n.128, p.1602 - 1608, 1999.

TIBIRIÇÁ, E V.; MOSQUERA, K.; ABREU, M. et. al. Antagonistic effect of yangambin on platelet-activating factor (PAF)-induced cardiovascular collapse. **Phytomedicine**, n.2, p. 235 - 242, 1996.

TIBIRIÇÁ, E. Cardiovascular Properties of yangambin, a Lignan Isolated from Brazilian Plants. **Cardiovasc Drug rev**, v.19, n.14, p.313 - 327, 2001.

TOMHS, H. Treatment of mild hypertension. **Arch Intern Med**, p.151, 1991.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Can J Physiol Pharmacol**, n.83, p. 215 – 242, 2005.

YU, F. H.; CATTERALL, W. A. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. **Sci STK**, n.253, p. 15, 2004.

VAN ZWIETEN, P. A.; DE JONGE, A.; TIMMERMANS, P. B. Inhibitors of the angiotensin I converting enzyme as antihypertensive drugs. **Pharm Weekbl Sci**, v. 21, n. 5, p. 197 - 204, 1983.

VANE, J. Towards a better aspirin. **Nature**, v.367, n.6460, p. 215-6, 1994.

WELSH, L.; FERRO, A. Drug treatment of essential hypertension: The case for initial combination therapy. **Int J Clin pract**, v.58, n.10, p. 956 - 63, 2004.

WHITE, S. W.; MCRITCHIE, R. J. Nasopharyngeal reflexes: Integrative analysis of evoked respiratory and cardiovascular effects. **Aust J Exp Biol Med Sci**, n.51, p.17 - 31, 1973.

ZHANG, A. Y.; LI, P. Vascular Physiology of a Ca²⁺ mobilizing second messenger – cyclic ADP – ribose. **J Cell Mol Med**, v.10, n.2, p. 407 - 422, 2006.

ZIMPFER, M.; MANDERS, W. T.; BARGER, A. C. et. al. Pentobarbital alters compensatory neural and humoral mechanisms in response to hemorrhage. **Am J Physiol**, n. 243, p. H713 - H721, 1982.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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