

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

FABÍOLA FIALHO FURTADO

EFEITOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELO
EXTRATO ETANÓLICO DE *Aspidosperma tomentosum*
Mart. (APOCYNACEAE), EM RATOS

JOÃO PESSOA-PB
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FABÍOLA FIALHO FURTADO

**EFEITOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELO
EXTRATO ETANÓLICO DE *Aspidosperma tomentosum*
Mart. (APOCYNACEAE), EM RATOS**

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde/Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof Delby Fernandes de Medeiros”** da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), para obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**. Área de concentração: **FARMACOLOGIA**.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

JOÃO PESSOA-PB

2009

F992e Furtado, Fabíola Fialho.

Efeitos cardiovasculares induzidos pelo extrato etanólico de *Aspidosperma tomentosum* Mart. (Apocynaceae), em ratos / Fabíola Fialho Furtado. - - João Pessoa: UFPB, 2009.

111 f. : il.

Orientador: Isac Almeida de Medeiros.

Dissertação (Mestrado) – UFPB, CCS, LTF, Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

1. Substâncias naturais. 2. *Aspidosperma tomentosum*. 3. Artéria mesentérica. 4. Vasorelaxamento.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

Responsável pela catalogação: Viviane Lima CRB-15/250

FABÍOLA FIALHO FURTADO

**EFEITOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELO
EXTRATO ETANÓLICO DE *Aspidosperma tomentosum*
Mart. (APOCYNACEAE), EM RATOS**

APROVADA EM 11 / 03 /2009

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientador

Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira
(Universidade Federal do Piauí)
Examinadora Externa

Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Interna

“Alegre-se, pois só os mais corajosos são capazes de buscar diante da incerteza; somente os sábios têm o poder de ver na dúvida o caminho para a verdade e apenas os mágicos conseguem transformar uma realidade medíocre em sonhos grandiosos.”

(CÉLIO FURTADO)

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista:

A minha querida e eterna amiga, minha Mãe Maria Marinete (*in memoriam*) pelo amor e dedicação, por me mostrar sempre o melhor caminho a seguir, e pela certeza de sua presença em todos os momentos de minha vida. Hoje meu anjo, te amo;

Ao meu pai Francisco Furtado pelo incentivo, carinho e dedicação, por sempre acreditar em seus filhos, meu pai a sua alegria é o meu maior presente;

Aos meus irmãos, Fabiana Fialho, Samuel Fialho e Fabricio Sampaio por todo amor, carinho e incentivo, por compartilharem comigo tudo e estarem sempre ao meu alcance;

A minha linda sobrinha, Ana Beatriz, milagre de Deus em nossas vidas, que com sua pureza e alegria me faz sorrir quando parece impossível;

Ao meu namorado Bruno Gouvêa, pela dedicação, paciência e carinho principalmente pela compreensão;

A minha grande família Fialho e Furtado pelo amor e carinho e por sempre acreditar que eu conseguiria;

AGRADECIMENTOS

A Deus fonte de toda a sabedoria, responsável por tudo o que conquistamos e somos, que me dá ânimo para não desistir da luta, que enxuga as minhas lágrimas de cansaço, que é responsável pelos momentos de felicidade vividos, ao meu Deus eu te agradeço;

Ao Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros, meu orientador, sou grata pelo incentivo e oportunidade de poder realizar e conquistar este sonho e pelos valiosos ensinamentos para pesquisa e principalmente para a vida;

A minha Amiga. Prof. Dra. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro, pelo carinho e dedicação à pesquisa, pelos ensinamentos compartilhados e por acreditar em mim;

À Dra. Aldeídia Pereira minha querida amiga pelos ensinamentos, por compartilhar comigo todos os momentos e principalmente pelo exemplo de coragem e dedicação.

Ao Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior da Universidade Federal de Alagoas, pelo fornecimento do extrato e pela parceria na realização deste trabalho;

Às professoras Aldeídia Pereira de Oliveira e Bagnólia Araújo da Silva por toda ajuda prestada a este trabalho, pela colaboração e atenção, como integrantes da banca examinadora, pelos ensinamentos valiosos e por tornar este trabalho melhor;

Aos Amigos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: Abrahão Filho, Alessandra Medeiros, Ápio Cláudio, Angélica Sátiro, Aurilene Carlos, Bruna Priscilla, Darizy Flávia, Dayanne Lopes, Ericelle Carvalho, Francisco Júnior, Horacina Maria, Islânia Albuquerque, José George, José Couras, Karla Veruska, Katy Ilias, Maria do Carmo Alustau, Melissa Luciano, Nayara Magalhães, Karoline Rodrigues, Mônica, Renata, Socorro Cartágenes, Valéria Lopes, Raline Mendonça, Robson Veras, Thais Josy, Thais Porto, Thyago Queiroz e a Prof. Dra. Nadja Azevêdo, pelo apoio, pelos sorrisos, pela força, pela amizade;

À Raline Mendonça, uma grande amiga, pelo apoio incondicional, por ter me “aturado” nos momentos mais complicados, pela atenção e carinho e por esta sempre disponível a ajudar e servir;

À Camilla Menezes, aluna de iniciação Científica, pela dedicação e carinho em todos os experimentos, e principalmente pela amizade sincera;

À Maria do Carmo (Carminha) e Thyago Queiroz (IC) e Aurylene Carlos, pelo apoio constante e amizade, pela companhia sempre descontraída, por acreditarem em mim e por saber que posso contar com vocês em todos os momentos;

Aos meus amigos da graduação Kalianne Lucena, Augusto Souto, Analúcia Guedes, Valéria lopes e a todos os farmacianos, em especial Dayanne Lopes e Narayana Martins pela amizade, mesmo distante mas presente em todos os momentos, pelas palavras de apoio, carinho e incentivo;

As minhas amigas companheiras de apartamento, Kelly Samara, Gabriela Gonçalves e Naiana Gondin por compartilharem todos os momentos desta caminhada e por dividir as angústias, as alegrias e as conquistas;

Aos meus amigos da Pós-Graduação, Naiana, Gláucia, Mery, Kelly, Analúcia, Solange, Ana Karina, Aron, Daniel, Vicente, Fábio, Marianne, Angélica, pelos bons e ricos momentos de convivência durante esta jornada;

Ao amigo José Crispim Duarte (CRISPA) que com sabedoria conduz o biotério sempre com alegria e disponibilidade a ajudar, mas principalmente pela amizade;

Aos professores do programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos do LTF/UFPB;

Aos funcionários Luís Cordeiro, Adriano Cordeiro e Mônica Rodrigues pelo exemplo de dedicação;

À Tânia Maria Alves de Araújo pelo apoio, atenção e carinho com que conduz a secretaria da pós-graduação;

À Coordenação, funcionários e a todos os professores do programa de pós-graduação pela dedicação e empenho com que conduzem este programa;

Ao CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro;

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, pelo suporte técnico através do Portal Periódicos;

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Professor Delby Fernandes de Medeiros (LTF) e à Universidade Federal da Paraíba (UFPB) por possibilitar e apoiar esta pesquisa;

A todos que participaram deste trabalho

Fabiola Fialho Furtado

RESUMO

RESUMO

Aspidosperma tomentosum Mart. (Apocynaceae) é conhecida popularmente como “peroba do campo”. Devido à ausência de estudos desta espécie no sistema cardiovascular, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo extrato etanólico bruto das cascas do caule de *A. tomentosum* (EEAT). Foram empregadas técnicas *in vivo* e *in vitro*. O EEAT (5; 10; 20; 40; 50 mg/Kg, i.v.) promoveu hipotensão em ratos normotensos ($-4,2 \pm 1,2$; $-7,8 \pm 1,3$; $-9 \pm 1,7$; $-24,5 \pm 4,7$; $-27,5 \pm 3,1$ %) e bradicardia ($-3,4 \pm 0,9$; $-4,7 \pm 1,6$; $-7,4 \pm 1,7$; $-15,5 \pm 4$; $-21 \pm 3,3$; $n=6$) de maneira dependente de dose. Estes efeitos não foram alterados na presença de atropina (2 mg/Kg, i.v.). Em átrio direito isolado de rato o EEAT (0,03-300 $\mu\text{g/mL}$), promoveu efeito cronotrópico negativo ($E_{\text{max}} = 94 \pm 1$ %). Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, EEAT (0,03-300 $\mu\text{g/mL}$), induziu vasorelaxamento dependente de concentração em anéis com endotélio vascular ($CE_{50} = 37,07 \pm 4,72$ $\mu\text{g/mL}$). Esse efeito não foi alterado após a remoção do endotélio ($CE_{50} = 32,93 \pm 3,16$ $\mu\text{g/mL}$), sugerindo, portanto, que a resposta vasorelaxante induzida por EEAT parece ser independente do endotélio vascular. A incubação com KCl (20 mM) em preparações sem endotélio vascular não alterou a atividade relaxante ($CE_{50} = 37,42 \pm 8,4$ $\mu\text{g/mL}$). Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, EEAT promoveu inibição das contrações induzida por fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M). Em anéis pré-contraídos com KCl (80 mM) o EEAT promoveu efeito vasorelaxante ($CE_{50} = 26,38 \pm 3,1$ $\mu\text{g/mL}$), sendo este efeito sem diferenças significativas em relação ao relaxamento obtido em anéis pré-contraídos com FEN, indicando bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v . Em anéis pré-contraídos com $\text{PGF}_{2\alpha}$ o relaxamento induzido ($CE_{50} = 44,88 \pm 11,9$ $\mu\text{g/mL}$) não foi significativamente diferente do obtido pelos agentes contracturante: FEN ou KCl 80mM. A adição de CaCl_2 (1-30 mM), em meio desprovido de Ca^{2+} , resultou em contração dependente do influxo de Ca^{2+} , nos anéis de artéria mesentérica despolarizados. Estas contrações foram significativamente reduzidas na presença do EEAT, reafirmando a possibilidade do bloqueio dos Ca_v . Em preparações pré-contraídas com BayK 8644, um agonista dos $\text{Ca}_v\text{-L}$, o EEAT induziu vasorelaxamento em anéis mesentéricos ($CE_{50} = 34,59 \pm 4,48$ $\mu\text{g/mL}$), indicando ser o bloqueio dos Ca_v o provável mecanismo pelo qual o EEAT promove vasorelaxamento. O EEAT antagonizou as contrações transientes induzidas por fenilefrina em meio livre de Ca^{2+} , porém não promoveu alterações das contrações transientes induzidas por cafeína, sugerindo que o EEAT promove inibição da liberação de Ca^{2+} apenas dos estoques sensíveis a IP_3 . Em conclusão, estes resultados sugerem que o EEAT promove efeitos hipotensor e bradicárdico em ratos normotensos não anestesiados. Esta hipotensão é provavelmente, devido a vasodilatação periférica, decorrente da inibição do influxo de Ca^{2+} , através dos $\text{Ca}_v\text{-L}$ e da inibição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis a IP_3 .

Palavra-chave: *Aspidosperma tomentosum*, artéria mesentérica, vasorelaxamento

ABSTRACT



ABSTRACT

Aspidosperma tomentosum Mart. (Apocynaceae) is popularly known as "peroba do campo". Due to lack of studies of this species in the cardiovascular system, the aim of this study was to investigate the cardiovascular effects induced by the ethanolic extract (EEAT). Intravenous injection of EEAT (5; 10; 20; 40; 50 mg/kg, i.v.) in normotensive rats reduced the mean arterial pressure (-4.2 ± 1.2 ; -7.8 ± 1.3 ; -9 ± 1.7 ; -24.5 ± 4.7 ; -27.5 ± 3.1 %) and heart rate (-3.4 ± 0.9 ; -4.7 ± 1.6 ; -7.4 ± 1.7 ; -14.2 ± 0.9 ; -15.5 ± 3.8 ; -21 ± 3.3 %) in a dose dependent manner. These effects were not affected by atropine (2 mg/kg, i.v.). In rat isolated right atria EEAT promoted negative chronotropic effect (0.03-300 $\mu\text{g/mL}$), (94 ± 1 %). The EEAT relaxed, in a concentration and equipotent manner, Phe pre-contracted rat mesenteric artery rings both with intact ($\text{EC}_{50} = 37.07 \pm 4.72$ $\mu\text{g/mL}$) and denuded endothelium ($\text{EC}_{50} = 32.93 \pm 3.16$ $\mu\text{g/mL}$). These results demonstrated that the vascular endothelium is probably not participating in the vasorelaxant response induced by EEAT. In preparations pre-incubated with KCl 20 mM without endothelium the vasorelaxant activity was not changed ($\text{EC}_{50} = 37.42 \pm 8.4$ $\mu\text{g/mL}$). In endothelium removal mesenteric rings, application of the Phe (10^{-9} - 10^{-5} M), induced contractions in a concentration-dependent manner. These contractions were reduced in presence of EEAT. In rings pre-contracted with KCl 80 mM, indicating a blockade of Ca^{2+} influx through Ca_v ($\text{EC}_{50} = 26.38 \pm 3.1$ $\mu\text{g/mL}$). In rings pre-contracted with $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($\text{EC}_{50} = 44.88 \pm 11.9$ $\mu\text{g/mL}$), the relaxation was similar to the one obtained with Phe or KCl 80 mM. The addition of the CaCl_2 (1-30 mM) in solution without Ca^{2+} resulted in contraction-dependent of the concentration in the rings of mesenteric artery. These contractions were significantly reduced in the presence of the EEAT, reaffirming the possibility of the blockade of the Ca_v . In pre-contracted preparations with BayK 8644 an activator of $\text{Ca}_v\text{-L}$, the EEAT induced relaxation in a equipotent manner ($\text{EC}_{50} = 34.59 \pm 4.48$ $\mu\text{g/mL}$), indicating to be the blockade of the Ca_v a probable mechanism in which the EEAT induces vasorelaxation. The EEAT also reduced the Phe induced transient contraction in Ca^{2+} -free solution, however it did not promote alterations of the transient contractions induced by caffeine, suggesting that the EEAT promotes inhibition of the Ca^{2+} release just of the IP_3 -sensitive stores. In conclusion, these results showed that the EEAT promotes hypotensive and bradycardic effects in normotensive non-anaesthetized rats. The hypotension is probably due to a decrease of peripheral resistances. Our results suggest that EEAT induce vasorelaxation through an blockade of Ca^{2+} channels and inhibition of the mobilization of Ca^{2+} of the IP_3 -sensitive Ca^{2+} stores.

Key words: *Aspidosperma tomentosum*, mesenteric artery, vasorelaxant effect

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Rato Wistar	38
Figura 2-	Aparato utilizado para aquisição de dados de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não anestesiados.....	46
Figura 3-	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do EEAT sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.....	47
Figura 4-	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação dos receptores muscarínicos no efeito do EEAT sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.....	47
Figura 5-	Aparato utilizado para aquisição de dados do cronotropismo cardíaco em átrio direito isolado de rato.....	48
Figura 6-	Experimento <i>in vitro</i> , em A) a artéria mesentérica superior isolada de rato, B) a artéria após a remoção do tecido conectivo e adiposo, C) os anéis seccionados e colocados em hastes, D) os anéis suspensos por linhas de algodão, no banho e em solução nutritiva e E) Sistema de cubas e aquisição de dados de tensão isométrica para órgão isolado.....	50
Figura 7-	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante induzido pelo EEAT (0,03 – 300 µg/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN, com e sem endotélio funcional	52
Figura 8-	Representação esquemática do protocolo experimental, para avaliação da participação dos canais para K ⁺ , no efeito vasorelaxante induzido pelo EEAT (0,03-300 µg/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN, sem endotélio funcional (L=lavagem).....	53
Figura 9-	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito induzido pelo EEAT (0,03-300 µg/mL), curva concentração-resposta induzida por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional (L=lavagem).....	54
Figura10-	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de EEAT (0,03 – 300 µg/mL), sobre a contração induzida por PGF _{2α} em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional (L=lavagem)	55

Figura11-	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de EEAT (0,03 – 300 µg/mL), sobre a contração induzida por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional (L=lavagem).....	56
Figura12-	Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação dos Ca _v no efeito relaxante induzido pelo EEAT (0,03-300 µg/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional (L=lavagem; Ty = Tyrode), sendo A) condição controle e B) na presença do EEAT (L=lavagem).....	58
Figura13-	Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliação do efeito de EEAT (0,03-300 µg/mL) sobre contração induzida por BayK 8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional (L=lavagem).....	59
Figura14-	Representação esquemática do protocolo experimental para estudo dos efeitos de concentrações isoladas do EEAT sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10µM) ou CAF (20mM) (L=lavagem; Ty = Tyrode), sendo A) condição controle e B) na presença de concentrações isoladas do EEAT (L=lavagem).....	61
Figura15-	Registros originais da administração aguda (i.v.) de EEAT. Valores de PAS (■) PAM (■) PAD (■) das doses de 5 ,10 e 20mg/kg em (A) e 40 e 50 mg/kg em (C) e FC (■) das doses de 5 , 10 e 20mg/kg em (B) e 40 e 50 mg/kg em (D).....	65
Figura16-	Traçado original mostrando o efeito de concentrações crescentes do EEAT (0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100; 300 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato wistar com endotélio intacto A) e em B) endotélio removido, pré-contraídos com 10 µM de FEN.....	73

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Efeito do EEAT (5; 10; 20; 40 e 50 mg/kg, i.v.) sobre a PAM (A) e FC (B) em ratos normotensos não anestesiados..... 66
- Gráfico 2** Efeito do EEAT (i.v.) sobre a PAS, PAM e PAD (A) e FC (B) em ratos normotensos não anestesiados. Representando a influência do extrato, em função do tempo, na dose de 50 mg/kg..... 67
- Gráfico 3** Efeito da atropina (2 mg/kg; i.v.) sobre a resposta hipotensora (a) e bradicárdica (b) induzida pela administração aguda de doses crescentes do EEAT (5; 10; 20; 40 e 50 mg/kg, i.v.) em ratos Wistar não anestesiados..... 69
- Gráfico 4** Curva concentração-resposta para EEAT (0,03-300 µg/mL) em átrio direito isolado de rato (■)..... 70
- Gráfico 5** Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do EEAT (0,03-300 µg/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, com endotélio intacto (●) e sem endotélio (○), pré-contraídos com 10 µM de FEN..... 72
- Gráfico 6** Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do EEAT(0,03-300 µg/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (10 µM), na ausência (○) ou na presença KCl 20 mM (■)..... 74
- Gráfico 7** Curvas concentração-resposta para FEN na ausência de EEAT controle (■) e na presença de concentrações isoladas de EEAT (µg/mL): (■) 10; (■) 30; (■) 100 e (■) 300, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio removido..... 75
- Gráfico 8** Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do EEAT (0,03-300 µg/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio, (○) pré-contraídos com FEN (10 µM) (■) pré-contraídos com PGF_{2α}..... 76
- Gráfico 9** Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do EEAT (0,03-300 µg/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (10 µM) (○) ou KCl 80 mM (■)..... 77
- Gráfico10-** Curvas cumulativa para CaCl₂ na ausência de EEAT controle (◇) e na presença de concentrações isoladas de EEAT (µg/mL): 10 µg/mL (△); 30 µg/mL (■);50 µg/mL (●); 100 µg/mL(▲) e 300 µg/mL(▼), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos..... 78

Gráfico11 · Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do EEAT (0,03-300 µg/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (10 µM) (○), (■) pré-contraídos com Bay K8644 (0,1 µM).....	79
Gráfico12 · Efeito do EEAT sobre contrações induzidas por FEN (10 µM) em meio livre de Ca ²⁺ , em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.....	80
Gráfico13 · Efeito do EEAT sobre contrações induzidas por CAF 20 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos em meio livre de Ca ²⁺	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Composição da solução de Tyrode.....	40
Tabela 2-	Composição da solução de Tyrode nominalmente sem cálcio	40
Tabela 3-	Composição da solução de Tyrode com cloreto de potássio a 20 mM.....	41
Tabela 4-	Composição da solução despolarizante com cloreto de potássio a KCl 60 mM.....	41
Tabela 5-	Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 60 mM nominalmente sem cálcio.....	42
Tabela 6-	Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto com cloreto de potássio a 80 mM.....	42
Tabela 7-	Composição da solução de Tyrode livre de cálcio.....	43
Tabela 8-	Composição da solução de Krebs para átrio isolado de rato.....	43
Tabela 9-	Valores de CE_{50} e E_{max} obtida para contrações induzida por FEN (10^{-9} – 10^{-5} M) na presença de concentrações isoladas do EEAT.....	75
Tabela10	Valores de CE_{50} e E_{max} obtida para contrações induzida por $CaCl_2$ na presença de concentrações isoladas do EEAT.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca²⁺]_c	concentração de Ca ²⁺ citosólico
ACh	acetilcolina
AMP_c	monofosfato cíclico de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
ANP	peptídeo natriurético atrial
Ang I	angiotensina I
Ang II	angiotensina II
BK_{Ca}	canal para potássio de grande condutância sensível ao cálcio
b.p.m.	batimentos por minuto
CaM	calmodulina
Ca²⁺	íon cálcio
Ca_v	canal para cálcio ativado por voltagem
Ca_v.L	canais para cálcio sensível à voltagem do tipo L
Ca_v.T	canais para cálcio sensível à voltagem do tipo T
CE₅₀	concentração de uma substância capaz de produzir 50 % do seu efeito máximo
CMLV	célula muscular lisa vascular
DAG	diacilglicerol
DC	débito cardíaco
ECA	enzima conversora de angiotensina
EEAT	extrato etanólico das cascas do caule de <i>Aspidosperma tomentosum</i>
EGTA	ácido etilenoglicol-bis-(-β-aminoetiléter) N, N,N', N'-tetracético
E_{max}	efeito máximo
e.p.m.	erro padrão da média
FC	freqüência cardíaca
FEN	L(-)-fenilefrina
Gs	proteína Gs estimulatória da adenilil ciclase
GMP_c	monofosfato cíclico de guanosina
GTP	trifosfato de guanosina
HA	hipertensão arterial
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol

IP₃R	receptor de IP ₃
K_{ATP}	canal para potássio sensível ao ATP
K_{IR}	canal para potássio retificador de entrada
M	concentração molar (mol/l)
MLC	cadeia leve de miosina
MLCK	cinase da cadeia leve de miosina
MLCP	fosfatase da cadeia leve de miosina
mM	milimolar (10 ⁻³ mol/L)
n	número de experimentos realizados
NO	óxido nítrico
NPS	nitroprussiato de sódio
PIP₂	4,5 – difosfato de inositol
PGI₂	prostaciclina
PAD	pressão arterial diastólica
PAM	pressão arterial média
PAS	pressão arterial sistólica
PKA	proteína cinase A
PKC	proteína cinase C
PKG	proteína cinase G
PLC	fosfolipase C
RPT	resistência periférica total
RyR	receptor sensível à rianodina
ROK	proteína cinase dependente do complexo Rhoa-GTP
RS	retículo sarcoplasmático

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
1.1	Considerações sobre plantas medicinais.....	26
1.2	Considerações sobre a família Apocynaceae e a espécie <i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.....	27
1.3	Considerações sobre a Pressão Arterial e vasorelaxamento.....	29
2	OBJETIVOS.....	36
2.1	GERAL.....	36
2.2	ESPECÍFICOS.....	36
2.2.1	Testes <i>in vivo</i>	36
2.2.2	Testes <i>in vitro</i>	36
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1	Animais.....	38
3.2	Drogas e Reagentes.....	38
3.3	Soluções Nutritivas.....	39
3.4	Obtenção do EEAT.....	44
3.5	Preparação da solução do EEAT.....	44
4	MÉTODOS.....	45
4.1	Ensaio Farmacológico <i>in vivo</i>	45
4.1.1	Medida direta da Pressão Arterial (PA) e Frequência Cardíaca (FC) em ratos normotensos não anestesiados.....	45
4.1.2	Protocolos experimentais para estudos <i>in vivo</i>	46
4.1.2.1	Avaliação do efeito da EEAT sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.....	46
4.1.2.2	Avaliação da participação muscarínica na resposta hipotensora e bradicárdica induzida pelo EEAT.....	47
4.2	Ensaio farmacológico para estudos <i>in vivo</i>	48
4.2.1	Ensaio farmacológico utilizando átrio isolado de rato.....	48
4.2.1.1	Protocolo experimental utilizando átrio isolado de rato.....	49
4.2.2	Preparações com artéria mesentérica superior isolada de rato	49
4.2.2.1	Curva concentração-resposta do EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	51
4.2.2.2	Verificação da participação dos canais para K ⁺ na resposta relaxante induzida por EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	53

4.2.2.3	Avaliação da resposta contrátil da FEN na presença de concentrações de EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	54
4.2.2.4	Efeito de EEAT sobre as contrações induzidas por PGF _{2α} em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	55
4.2.2.5	Efeito de EEAT sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	56
4.2.2.6	Efeito do EEAT sobre o influxo de Ca ²⁺ através dos Ca _v em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	57
4.2.2.7	Efeito do EEAT sobre contrações induzidas por S-(-) BayK 8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	59
4.2.2.8	Efeito do EEAT sobre as contrações transientes induzidas por FEN ou CAF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, em meio livre de Ca ²⁺	60
4.3	Análise estatística.....	62
5	RESULTADOS	64
5.1	Estudos Farmacológicos com EEAT <i>in vivo</i>	64
5.5.1	Efeito do EEAT sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.....	64
5.1.2	Efeito do bloqueio dos receptores muscarínicos na hipotensão e bradicardia induzida por EEAT em ratos normotensos não anestesiados.....	68
5.2	Estudos Farmacológicos com EEAT <i>in vitro</i>	70
5.2.1	Estudos com átrio isolado de rato.....	70
5.2.1.1	Efeito do EEAT sobre átrio isolado de rato.....	70
5.2.2	Estudo com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	71
5.2.2.1	Efeito do EEAT sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem o endotélio funcional pré-contraídos com FEN.....	71
5.2.2.2	Efeito do modulador do efluxo de potássio KCl 20 mM na resposta vasorelaxante induzida por EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.....	74
5.2.2.3	Verificação da resposta vascular para a FEN na presença de EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.....	75
5.2.2.4	Efeito vasorelaxante induzido por EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídos com PGF _{2α}	76

5.2.2.5	Efeito de um agente despolarizante KCl 80 mM na resposta vasorelaxante induzida por EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.....	77
5.2.2.6	Verificação do efeito do EEAT sobre as contrações induzidas por CaCl ₂ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.....	78
5.2.2.7	Efeito vasorelaxante induzido por EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com S-(-) Bay K8644.....	79
5.2.2.8	Efeito de EEAT sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 µM) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, em meio livre de Ca ²⁺	80
5.2.2.9	Efeito de EEAT sobre as contrações induzida por CAF (20 mM) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, em meio livre de Ca ²⁺	81
6	DISCUSSÃO.....	83
7	CONCLUSÕES.....	93
8	PERSPECTIVAS.....	95
	REFERÊNCIAS.....	97

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre Plantas Medicinais

As plantas medicinais são utilizadas com finalidades terapêuticas há milhares de anos. O uso popular foi propagado por várias gerações e descrito em diversas farmacopéias. Somente no início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, tais plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (COELHO; DALBELO; LOLIS, 2005).

Nos países em desenvolvimento, assim como nos mais desenvolvidos, os incentivos para o consumo de produtos à base de fontes naturais aumentam a cada dia (ELIZABETSKY, 2001). Cerca de 80% da população mundial usou alguma planta na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável (OLIVEIRA et al., 2006). No entanto, poucas plantas têm eficácia, segurança e mecanismos de ação conhecidos (VORA; MANSOOR, 2005).

Produtos naturais obtidos de plantas tem sido alvo de diversas pesquisas, devido à elevada biodiversidade e à riqueza de suas moléculas (HARVEY, 2000; HARVEY, 2007). Cerca de 80% de produtos medicinais obtidos em 1996 foram derivados diretos ou inspirados em produtos naturais (SNEADER, 1996). Uma análise mais recente confirma a contínua importância dos produtos naturais para o descobrimento de novas drogas (HARVEY, 2001). Por exemplo, entre 1981 e 2002, 28% das 868 novas drogas introduzidas na terapêutica foram oriundas de produtos naturais ou derivadas, e ainda 24% dos grupos farmacofóricos foram criados a partir de um produto natural (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Pelo menos 70 produtos naturais estavam em triagens clínicas no ano de 2004 (BUTLER, 2008). Portanto, a exploração contínua da bioatividade de produtos naturais promove avanços químicos modernos para o desenvolvimento de novas drogas (CHIN et al., 2006; HARVEY, 2007; BUTLER, 2008).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, avaliada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. “Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade” (CALIXTO apud RODRIGUES; OLIVEIRA; KOVALESKY, 2007).

Em países como Brasil, que apresenta uma grande biodiversidade distribuída em biomas diferenciados, observa-se um crescente e expressivo interesse da indústria farmacêutica na produção de agentes terapêuticos de origem natural, devido à variedade de propriedades biológicas que estas plantas podem possuir (CALIXTO, 2005), revelando-se como uma enorme oportunidade para exploração das biomoléculas, para uso terapêutico, um privilégio a ser explorado (CAMARGO et al., 2005).

As plantas medicinais endêmicas são pouco conhecidas e se constituem num fascinante assunto de pesquisa e de desenvolvimento científico (PINTO, et al., 2002). Apesar da crescente importância das plantas medicinais, poucos estudos foram realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, sendo que muitas são utilizadas com base somente no uso empírico (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Torna-se, portanto, de suma importância a realização de pesquisas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais no Brasil, que ainda são incipientes (VEIGA JUNIOR; PINTO; MARCIEL, 2005). Tais pesquisas investigam possíveis efeitos de produtos naturais para desenvolver uma base científica com aplicação terapêutica (MENEZES et al., 2007).

1.2 Considerações sobre a família Apocynaceae e a espécie *Aspidosperma tomentosum* Mart.

A família Apocynaceae compreende 415 gêneros e 4555 espécies, encontrada predominantemente em regiões tropicais e temperadas (STEVENS, 2001). Na flora brasileira são catalogadas como apocynaceae mais de 400 espécies em 41 gêneros, sendo 32 destes encontrados apenas na Amazônia (CAMPBELL; HAMMOND, 1989).

O gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae) é constituído por 43 espécies de distribuição tropical (MARCONDES-FERREIRA; KINOSHITA 1996). Estas espécies são encontradas principalmente entre o México e a Argentina (CORRÊA, 1926). São importantes fornecedoras de madeira nobre e fontes de alcalóides (RAFFAUF, 1964; GILBERT, 1966; ROBERT et al., 1983; LOPES et al. 1989), os quais são responsáveis por diversas atividades biológicas (PEREIRA et al., 2007).

As plantas do gênero *Aspidosperma* são empregadas popularmente para tratamento de várias doenças (PEREIRA et al., 2007). As cascas de espécies do gênero *Aspidosperma* são usadas comumente na forma de infusões pela medicina popular da região Amazônica, devido sua baixa toxicidade e a ausência de contra-indicações (GOTTLIEB; KUBITZKI; MESQUITA, 1978; FERREIRA et al., 2004). A espécie *A. ramiflorum* é empregada no tratamento de leishmaniose (FERREIRA et al., 2004). *A. nitidum* é utilizada como anticonceptiva (RIBEIRO et al., 1999), no tratamento de inflamações de útero e ovário, no diabetes, em problemas estomacais, contra câncer, febre e reumatismo (WENIGER et al., 2001). As cascas de *A. nitidum*, *A. album*, *A. discolor*, *A. excelsum* e *A. polineuron* são usadas por nativos de diferentes locais da Amazônia no tratamento da malária (BRANDÃO et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2003). Estudos atribuem atividade antimalárica as espécies *A. megalocarpon* (WENIGER et al., 2001; MITAINE-OFFER et al., 2002) e *A. quebracho-blanco* (BOURDY et al., 2004) e *A. macrocarpon* (MESQUITA et al., 2007). As cascas de *A. quebrachoblanco* são usadas na região andina como afrodisíaco e contra febre (DEUTSCH et al., 1994; LYON et al., 1973a; LYON, 1973b). Extratos desta espécie são utilizados para o tratamento da disfunção erétil (SPERLING et al., 2002). No Brasil, esta espécie é usada também em casos de enfisema, bronquite e pneumonia, bem como no tratamento da impotência, contra sintomas da hiperplasia prostática benigna e em dispnéia asmática e cardíaca (LYON et al., 1973a; AIMI et al., 1991). Além de *A. quebrachoblanco* a espécie *A. ulei* demonstrou atividade pró-erétil em ratos (CAMPOS et al., 2006).

O gênero *Aspidosperma* é rico em alcalóides de diversos esqueletos (DEUTSCH et al., 1994). Ensaio biológico com alcalóides monoterpênicos isolados das cascas de *A. quebracho-blanco* (AIMI et al., 1991) demonstraram atividade bloqueadora α -adrenérgica e ação inibitória de contrações de músculo liso de tecidos de diferentes animais (DEUTSCH et al., 1994), além de ação hipotensora (LYON et al., 1973a) e analgésica (FOYE; LEMKE; WILLIAMS, 1995). Dentre os alcalóides identificados no gênero tem-se a quebracamina e aspidospermina e ioimbina, caracterizada como droga bloqueadora adrenérgica (DEUTSCH, 1994). Alcalóides isolados das cascas das raízes e folhas de *A. pyriformium* apresentaram forte efeito hipotensor. Esse efeito foi atribuído a alcalóides indólicos presentes nos extratos desta espécie (CRAVEIRO; MATOS; SERUR, 1983). Destaca-se o

potencial dos alcalóides provenientes de espécies deste gênero no tratamento de cânceres (KANSAL; POTIER, 1986).

Apesar dos diversos e significantes estudos de espécies do gênero *Aspidosperma*, algumas espécies são pouco relatadas ou mesmo não possuem estudos de suas atividades biológicas. Um exemplo é a espécie *A. tomentosum* é uma árvore, medindo 15 m de altura (GOMES, 1997), popularmente conhecida como “peroba-do-campo”, Apenas um estudo das propriedades biológicas desta espécie é relatado, neste demonstra-se que extratos e frações obtidos de *A. tomentosum* possui atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais humanas, e que os princípios ativos responsáveis por este efeito estão na fração terpênica de média polaridade e na fração polar (KOHN, 2006).

1.3 Considerações sobre a Pressão Arterial e Vasorelaxamento.

O sistema cardiovascular humano é composto por uma bomba (coração), uma série de tubos de distribuição e coleta (vasos sanguíneos) e um extenso sistema de vasos finos (os capilares) (BERNE; LEVY, 2004) e é devido a esta extensiva rede de conexões entre artérias, capilares e veias, que as funções celulares, como: crescimento, desenvolvimento, absorção de nutrientes essenciais, remoção celular e de metabólitos, promovem a manutenção da homeostase celular (PUSGLEY; TABRIZCHI, 2000).

A pressão arterial (PA) é representada matematicamente, através de um valor de PA não pulsátil, a pressão arterial média (PAM). Esta pressão é a média das pressões sobre o tempo. De maneira simplificada, a PAM pode ser determinada pelo produto do débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica (RVP). A interação dessas variáveis é fornecida pela seguinte equação: $PAM = DC \times RVP$. O DC é definido como a quantidade de sangue bombeado pelo coração a cada minuto e em termos matemáticos, é determinado como o produto do volume de ejeção sistólica (VES) pela frequência cardíaca (FC), expresso na equação. $DC = VES \times FC$. A PA pode ser influenciada pela ação de drogas sobre uma ou ambas as variáveis (OASTES et., 1996).

Os níveis de PA são controlados de maneira complexa através da interação resultante da ação integrada dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001).

O baroreflexo é um mecanismo homeostático de ajuste da pressão a curto prazo, considerado como um mecanismo essencial da homeostase cardiovascular, cuja rápida ação se expressa em segundos/minutos. Os barorreceptores são mecanorreceptores localizados no arco aórtico e no seio carotídeo que quando tensionados (pela elevação de pressão) estimulam áreas inibitórias no centro vasomotor. O sistema nervoso autônomo promove redução da PA pela vias eferentes vagais (GUYTON, 2002; GUYENET, 2006; KAREMAKER; WESSELING, 2008). Os quimiorreceptores são responsáveis pela regulação local do tônus da musculatura lisa dos vasos, sendo ativados pela redução de O₂ ou excesso de CO₂ e H⁺ (CARVALHO; COSTA, 1979; GUYENET, 2006).

Mecanismos hormonais estão implicados no controle da PA a médio prazo, promovendo elevação da PA através do sistema catecolaminérgico (adrenalina e noradrenalina) e hormônio antidiurético, ou redução da PA pela liberação do peptídeo atrial natriurético (ANP) e ativação do sistema caliceína-cininas. Além da liberação de fatores pelo endotélio (óxido nítrico, endotelinas e prostaglandinas) (EVORA et al., 1995).

O rim é o centro do sistema de regulação da PA a longo prazo, através da secreção da renina. Esta enzima quando liberada, converte o angiotensinogênio (produzido pelo fígado) em angiotensina I (Ang I), que pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) é convertida em angiotensina II (Ang II). Este peptídeo atua no sistema cardiovascular promovendo vasoconstricção, aumento da contratilidade cardíaca, hipertrofia cardíaca, nos rins reabsorção tubular de sódio, além de estimular a secreção de aldosterona, estes mecanismos em conjunto são responsáveis pela elevação da PA, este sistema é denominado sistema renina-angiotensina (SRA) (OATES; BROWN, 2003; ATLAS, 2007).

A Hipertensão arterial sistêmica (HAS) é resultante do desequilíbrio entre os vários mecanismos que contribuem para a regulação da pressão (CAIN; KHALIL, 2002), como por exemplo, à hiperatividade do sistema nervoso simpático ou alterações do sistema SRA, que estão implicados no desencadeamento desta patologia, além de fatores e doenças associadas que atuam em sinergia na HAS, tais como: tabagismo, sedentarismo, alcoolismo, diabetes, obesidade e

predisponibilidade genética (CODY, 1997; GRYNBERG, 2005). A HAS é uma enfermidade crônica que apresenta elevados custos médicos e socioeconômicos decorrentes principalmente das complicações que a acompanha, como, acidente vascular cerebral (AVC), doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica (KANNEL, 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2007).

Em pacientes com HAS, a taxa de mortalidade tem como causa algumas dessas complicações, as principais são: AVC (40%) e doença arterial coronariana (25%) (CHOBANIAN et al., 2003), a HAS além de ser o principal fator que influencia no risco das doenças cardiovasculares, também têm uma alta prevalência e impacto na morbi-mortalidade dos indivíduos. São considerados hipertensos indivíduos que apresentam pressão arterial sistólica (PAS) > 140 mmHg e pressão arterial diastólica (PAD) > 90 mmHg (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2007).

As doenças cardiovasculares permanecem como a principal causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com uma elevada probabilidade de crescimento de sua incidência. (KEARNEY et al., 2005; MARK et al., 2007). No Brasil, cerca de 27,4% dos óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares (LOTUFO, 2005), representando um grave problema de saúde pública. Portanto, a descoberta de novos medicamentos, bem como novas estratégias terapêuticas representam um significativo aumento da expectativa de vida dos portadores (GRYNBERG, 2005).

O tônus vascular desempenha um importante papel na regulação e manutenção da pressão arterial (SONKUSARE et al., 2006). A regulação do tônus da célula muscular lisa vascular (CMLV) é determinada por fatores vasoconstritores e vasorelaxantes. Os vasoconstritores agem por meio da elevação das concentrações de Ca^{2+} intracelular $[Ca^{2+}]_c$, e aumento a aparente sensibilidade ao Ca^{2+} . Já os fatores vasodilatadores promovem efeitos opostos (LEDOUX et al., 2006). Na célula endotelial a elevação da $[Ca^{2+}]_c$ promove relaxamento das CMLVs adjacentes. Portanto, o nível de $[Ca^{2+}]_c$ nas células endoteliais e CMLVs é imperativo para a precisa regulação de órgãos e tecidos (LEDOUX et al., 2006).

O endotélio promove o controle do tônus vascular através da liberação de numerosas substâncias vasoativas incluindo NO, espécies reativas de oxigênio, e metabólitos do ácido araquidônico (como exemplos: prostaciclina, EETs e derivados da lipoxigenase). Dentre os vasoconstritores pode-se destacar o tromboxano A₂ (TXA₂) e a endotelina dentre outros, além de fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDEs), dentre eles as prostaciclina PGI₂, fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e o óxido nítrico (NO) (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006). Os fatores vasodilatadores se opõem à vasoconstrição gerada pela atividade simpática. No estado hipertensivo encontram-se anormalidades na estrutura dos vasos sanguíneos e no coração. Nos vasos o desequilíbrio entre a liberação de fatores vasoconstritores e FRDEs é uma característica que promove o aumento do tônus vascular na HAS (TÖRÖK, 2008).

A capacidade do Ca²⁺ e dos íons fosfato de alterar os campos eletrostáticos e a conformação protéica, representam duas ferramentas universais na transdução de sinal (CALPHAM, 2007). O influxo de Ca²⁺ na célula é favorecido pela diferença de gradientes químico dos íons Ca²⁺ (MISSIAEN et al, 1991) e a manutenção deste gradiente é realizado pela atuação das Ca²⁺-ATPase da membrana plasmática (PMCA) e do retículo sarcoplasmático (SERCA), e do trocador Na⁺/Ca²⁺ nas células CMLVs (FLOYD; WRAY, 2007).

O processo contrátil da CMLVs é iniciado com o aumento da [Ca²⁺]_c, que pode ocorrer por aumento do influxo de Ca²⁺ através dos canais para Ca²⁺ operados por receptores ou voltagem (Ca_v) e da liberação de Ca²⁺ dos estoques do retículo sarcoplasmático, (WEBB, 2003). O influxo de Ca²⁺ através da membrana depende da função dos canais iônicos. O Ca_v do tipo L (Ca_v-L) que é ativado em resposta a uma despolarização de membrana, permite o influxo de Ca²⁺ do meio extracelular. A estimulação da via da fosfolipase C (PLC) após a ativação de receptores de membrana, por ligantes específicos, promove subseqüentemente hidrólise dos fosfolípídeos de membrana 4,5-bisfosfato de inositol (PIP₂) e produção do diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP₃) (COLLIER; WANG; KOTLIKOFF, 2000; CHALMERS et al., 2007). O IP₃ estimula a liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático por ativação dos receptores sensíveis ao (IP₃R). Os receptores de rianodina são ativados pelo Ca²⁺, oriundo dos estoques sensíveis a IP₃, processo esse denominado de liberação de Ca²⁺ induzida por Ca²⁺ (CIRC)

(MCHALE et al., 2006). O DAG juntamente com o Ca^{2+} pode promover a ativação da PKC, que fosforila proteínas alvo específicas e $\text{Ca}_V\text{-L}$ (WEBB, 2003).

Uma vez aumentada a concentração citoplasmática de Ca^{2+} nas CMLVs, ocorre a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina [$(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CAM}$]. Este complexo promove a ativação da cadeia leve de miosina cinase (MLCK), que promove a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC20) permitindo que a miosina interaja com a actina e o trifosfato de adenosina (ATP), resultando na ligação da ponte cruzada da miosina com a actina e conseqüente contração muscular. A redução da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ desfaz o complexo Ca^{2+} -calmodulina, inativa a MLCK, e ativa a fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP), removendo os fosfatos de alta energia, promovendo assim o relaxamento muscular (WEBB, 2003). Um equilíbrio dinâmico entre a forma fosforilada e não fosforilada MLC20 regula o diâmetro dos vasos, sendo controlada pela MLCK, dependente de Ca^{2+} -calmodulina e pela MLCP (HILL et al., 2006). Pode ocorrer, aumento da fosforilação da MLC20 por inibição da MLCP sem alteração nos níveis de Ca^{2+} . A RhoA tem sido demonstrada como moduladora da sensibilidade ao Ca^{2+} em CMLVs (PFITZER, 2001; SOMLYO; SOMLYO, 2003). A ativação de receptores acoplados a proteína $G_{12/13}$, pode ativar o fator trocador de nucleotídeo de guanina da RhoA (RhoGEF) que por ativação da Rho cinase (RhoK) inibe a atividade da MLCP (SOMLYO; SOMLYO, 2003; SCHUBERT; LINDINGTON; BOLZ, 2008).

No músculo liso, o aumento dos níveis de nucleotídeos cíclicos promove vasorelaxamento. O monofosfato cíclico de guanosina (GMP_c) induz ativação da proteína quinase dependente de GMP_c (PKG), (WALDMAN; MURAD, 1987; LUCAS et al., 2000). A elevação dos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c) deve-se à estimulação da ciclase de adenilil (AC), que pode ocorrer pela ativação de uma proteína G_s (ISHIKAWA; HOMCY, 1997; DEFER; BEST-BELPOMME; HANOUNE, 2000), seguido de aumentos dos níveis de AMP_c e ativação da proteína cinase A (PKA) (WALDMAN; MURAD, 1987; LUCAS et al., 2000) a PKA e PKG promovem alterações na dinâmica do Ca^{2+} e na função contrátil, este mecanismo envolve: (1) abertura de canais para K^+ promovendo hiperpolarização e redução do influxo de Ca^{2+} pelos $\text{Ca}_V\text{-L}$; (2) ativação da SERCA e PMCA com aumento conseqüente do seqüestro e extrusão de Ca^{2+} , respectivamente; (3) diminuição da mobilização de Ca^{2+} através da inibição da formação de IP_3 e inibição do IP_3R do RS; (4) inibição da MLCK e ativação da MLCP com conseqüente redução da fosforilação

da MLC (WALDMAN; MURAD, 1987; LUCAS et al., 2000; SOMLYO; SOMLYO, 1994; MATSUMOTO et al., 2005). Os nucleotídeos cíclicos são regulados pela ação das fosfodiesterases (PDEs) (MATSUMOTO; KOBAYASHI; KAMATA, 2003; MAURICE et al., 2003).

Diversos produtos naturais atuam no sistema cardiovascular através de múltiplos mecanismos. Neste contexto, é importante mencionar a quinidina utilizada contra arritmia que foi isolada da casca da *Cinchona* spp. Outro alcalóide que merece ser destacado é a reserpina, isolada de *Rauwolfia* spp, um poderoso anti-hipertensivo. Há também inúmeros flavonóides que possuem relevantes ações biológicas por previnirem os acidentes vasculares, além de muitos compostos utilizados pela indústria farmacêutica na formulação de agentes vasodilatadores, como a diosmina, a rutina e outros flavonóides (DILLARD; GERMAN, 2000).

O estudo do mecanismo de ação de produtos naturais deverá facilitar a prática clínica aumentando notavelmente a habilidade para prever efeitos adversos e interações entre os medicamentos, além de contribuir para o desenvolvimento de futuros agentes terapêuticos (MCNEILL; JURGENS, 2006).

Apesar de ser relatado o uso popular do gênero *Aspidosperma*, bem como existir diversos estudos em busca da elucidação das propriedades biológicas atribuídas a este gênero, a discussão sobre as propriedades biológicas da espécie *Aspidosperma tomentosum* Mart. permanece com lacunas. Notadamente no que diz respeito ao estudo farmacológico de seus efeitos, fornecendo perspectivas de significativa importância para o estudo desta espécie.

Uma vez que não existem dados na literatura sobre atividade biológica da espécie *Aspidosperma tomentosum* Mart, aliado ao fato de espécies deste gênero possuírem indicação para o tratamento de distúrbios cardiovasculares, este estudo, portanto, enfoca as ações farmacológicas da espécie *Aspidosperma tomentosum* sobre o sistema cardiovascular.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo Extrato Etanólico Bruto das cascas do caule de *Aspidosperma tomentosum* (EEAT) através de uma abordagem *in vivo* e *in vitro* em ratos normotensos não anestesiados, além de elucidar os mecanismos de ação implicados nas respostas obtidas.

2.2 Específicos

Testes *in vivo*

Caracterizar o efeito do EEAT sobre a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos não anestesiados.

Testes *in vitro*:

- Avaliar o efeito do EEAT em átrio direito isolado de rato.
- Avaliar o efeito de EEAT sobre a resposta relaxante em artéria mesentérica superior isolada de rato observando:
 - A influência do endotélio na resposta vascular induzida por EEAT.
 - A participação dos canais para potássio na resposta vascular induzida por EEAT.
 - A participação dos íons Ca^{2+} na resposta relaxante induzida por EEAT.
 - A participação dos estoques intracelulares de Ca^{2+} .

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados em todos os experimentos ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) (Figura 1), pesando entre 250-300 g, provenientes do biotério professor Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba – LTF/UFPB, mantidos sob condições controle de temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (das 6h 00 às 18h 00), sem restrição de ração e água. Os experimentos foram realizados no período de 7h 00 às 17h 00 (*in vivo*) e de 7h 00 às 19h 00 (*in vitro*). Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF (CEPA), certidão número 0106/08.



Figura 1- Rato Wistar

3.2 Drogas e Reagentes

Durante o desenvolvimento dos experimentos, foram utilizadas diversas ferramentas farmacológicas tais como: tiopental sódico (Cristália), sal sódico de hparina (Roche). Cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN), sulfato de atropina, cloridrato de acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (NPS), cafeína (CAF), S-(-)-BayK8644 (Sigma-aldrich St. Louis, MO, EUA). As substâncias utilizadas foram dissolvidas em

água destilada, exceto o BayK8644 que foi dissolvido em etanol absoluto para obtenção da solução estoque de (10^{-3}M), que foi preparado, mantido e utilizado ao abrigo da luz. As soluções foram diluídas em salina (experimentos *in vivo*) ou água destilada (experimentos *in vitro*), para concentrações desejadas.

3.3 Soluções Nutritivas

Nos protocolos experimentais realizados *in vitro*, foram utilizadas diversas soluções nutritivas (pH=7,4), sendo aeradas com uma mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2), mantidas a 37°C , baseadas na metodologia desenvolvida por Tanaka et al., (1999).

Os sais utilizados em todas as preparações das soluções nutritivas foram: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (todos da VETEC), fosfato de sódio mono-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Merck Darmstadt Alemanha). Ácido tetracético (*N, N, N', N'*) bis beta amino étil éster etilenoglicol (EGTA) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA). No preparo das soluções despolarizantes de Tyrode com cloreto de potássio a 20 mM, 60 mM ou 80 mM, a concentração de Na^+ foi isosmoticamente alterada. Nas soluções livres de Ca^{2+} foi omitida a adição de CaCl_2 e adicionou-se 1 mM de EGTA. Porém no preparo das soluções nominalmente sem cálcio apenas omitiu-se o CaCl_2 . Após o preparo das soluções media-se o pH e era feito o ajuste para 7,4, quando necessário.

As tabelas a seguir demonstram as composições das soluções nutritivas:

TABELA 1-Composição da solução de Tyrode

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
C ₆ H ₁₂ O ₆	5,6

FONTE: TANAKA et al., 1999.

TABELA 2-Composição da solução de Tyrode nominalmente sem Ca²⁺

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
C ₆ H ₁₂ O ₆	5,6

FONTE: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

TABELA 3-Composição da solução de Tyrode com cloreto de potássio a 20 mM

Substância	Concentração (mM)
NaCl	142,3
KCl	20,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
C ₆ H ₁₂ O ₆	5,6

FONTA: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

TABELA 4-Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio KCl 60mM

Substância	Concentração (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
C ₆ H ₁₂ O ₆	5,6

FONTA: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

TABELA 5-Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 60 mM nominalmente sem cálcio

Substância	Concentração (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
C ₆ H ₁₂ O ₆	5,6

FONTE: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

TABELA 6-Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 80mM

Substância	Concentração (mM)
NaCl	82,3
KCl	80,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
C ₆ H ₁₂ O ₆	5,6

FONTE: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

TABELA 7-Composição da solução de Tyrode livre de cálcio

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
C ₆ H ₁₂ O ₆	5,6
EGTA	1,00

FONTE: Adaptado de TANAKA et al.,

TABELA 8-Composição da solução de Krebs para átrio isolado de rato

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

Fonte: NASA et al., 1992

3.4 Obtenção do EEAT

A espécie *Aspidosperma tomentosum*, selecionada para o estudo, foi coletada em São José da Tapera-AL, e identificada pelo botânico Dr. José Elias de Paula. Uma exsicata do material botânico foi depositada no herbário JEP da Universidade de Brasília (UNB), sob número de registro 3732 (UB).

A obtenção do extrato foi realizada pelos colaboradores da fitoquímica, o Professor Dr. João Xavier de Araújo Júnior e sua equipe da Universidade Federal de Alagoas-UFAL.

A casca do caule de *Aspidosperma tomentosum* Mart. foi submetida à secagem em estufa a 40°C por 72 horas com posterior trituração. O material seco e moído apresentou peso total de 3,64 kg, e foi submetido à extração com 20 L de etanol 90 % em percolador à temperatura ambiente por 96 h. A remoção do solvente foi realizada sob pressão reduzida, em aparelho rotatório, com posterior obtenção de 316,55 g (8, 7%) do extrato etanólico bruto (EEAT) concentrado e homogêneo.

Uma triagem fitoquímica foi realizada no laboratório da Universidade Federal a partir do extrato etanólico bruto das cascas do caule desta espécie, e detectou a presença de diversos metabólitos, dentre eles; taninos condensados ou catequínicos, flavonóis, xantonas, flavononas, flavononóis e triterpenóides pentacíclicos livres.

3.5 Preparação da solução do EEAT

O extrato foi solubilizado em cremofor® (3%), dissolvido em solução salina para obtenção da dose de 100 mg/kg (solução estoque), para os experimentos *in vivo*. Nestes a concentração de cremofor® foi desprovida de efeitos sobre a PA e FC (dados obtidos em experimentos anteriores em nosso laboratório). Para experimentos *in vitro*, foi dissolvido em água destilada para obtenção da concentração 10 mg/mL, a concentração final de cremofor® na cuba não excedeu 0,01 %, sendo esta desprovida de quaisquer efeitos sobre os anéis de artéria mesentérica (dados obtidos em experimentos anteriores em nosso laboratório).

4 MÉTODOS

Ensaio Farmacológicos

Foram utilizadas duas diferentes formas de abordagens: uma com ensaios farmacológicos *in vivo*, utilizando animais íntegros, e outra com ensaios farmacológicos *in vitro*, utilizando órgãos isolados.

4.1 Ensaio farmacológicos para 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), um segmento 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 aferidas 24 h após o ato 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) e conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital (CIO-DAS16/JR, Computer Boards, Inc., Mansfield, MA, EUA) (Figura 2). Para aquisição dos registros foi utilizado o programa CVMS (WPI, Sarasota, FL, EUA). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou PAS, PAD e PAM, e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca). O cateter venoso foi utilizado para a administração das drogas. Após os experimentos os animais foram eutanasiados com tiopental sódico (i.v.).

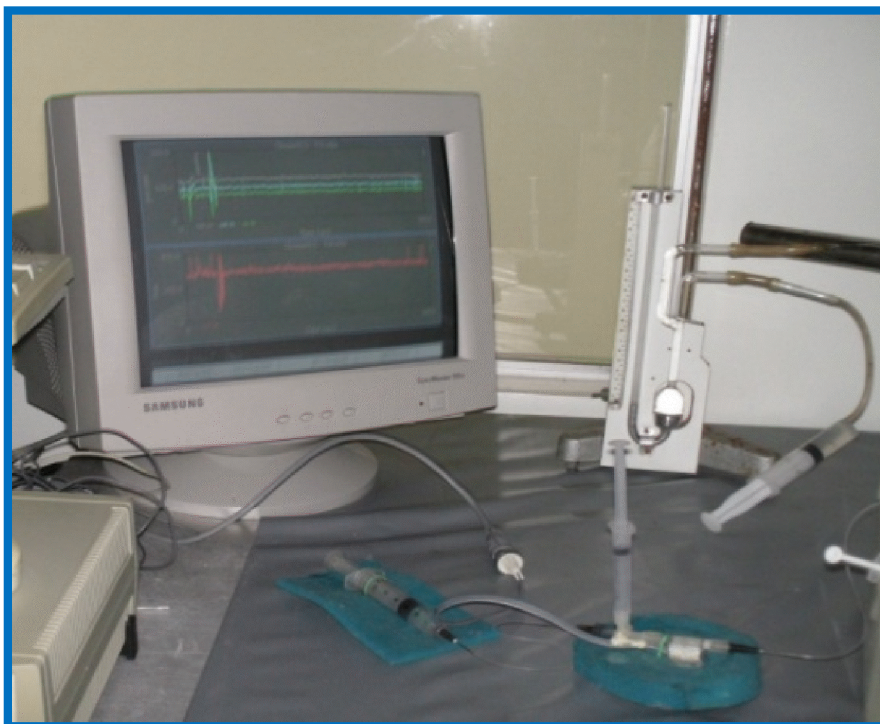


Figura 2- Aparato utilizado para aquisição dos dados de PA e FC em ratos normotensos não anestesiados.

4.1.2 Protocolos experimentais para os estudos *in vivo*

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

Para obtenção de uma curva dose-resposta controle, os animais foram mantidos em aclimação por um período de no mínimo 30 minutos, para estabilização dos parâmetros cardiovasculares, e em seguida administrou-se NPS (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) para verificar a eficácia da implantação do cateter venoso. Após o retorno dos parâmetros hemodinâmicos, doses randômicas do EEAT foram administradas, com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos valores basais (Figura 3). Os valores de PAM e FC, foram computados antes (valores da linha de base) e imediatamente após a administração das substâncias, e suas variações foram expressas em porcentagem, para cada dose, calculadas através das fórmulas (equação 1 e 2)

$$1) \text{ Valores de PAM (\%)} = \frac{(\text{PAM após} - \text{PAM antes}) \times 100}{\text{PAM antes}}$$

$$2) \text{ Valores de FC (\%)} = \frac{(\text{FC após} - \text{FC antes}) \times 100}{\text{FC antes}}$$

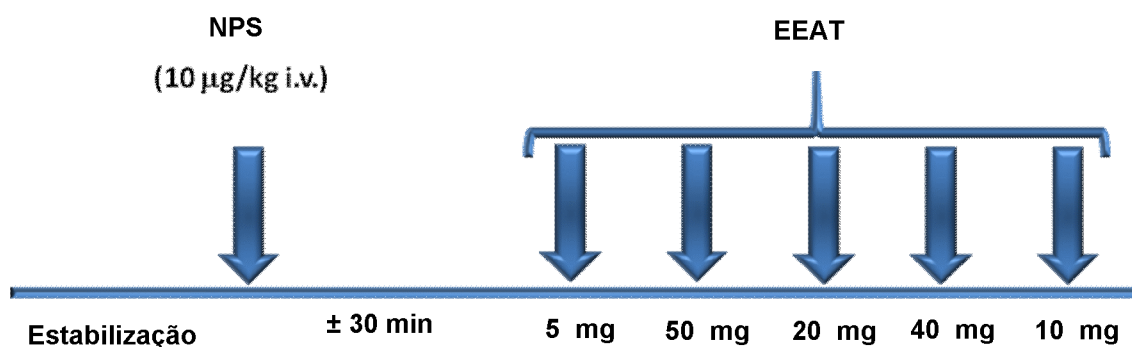


Figura 3- Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do EEAT sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.

4.1.2.2 Avaliação da participação muscarínica na resposta hipotensora e bradicárdica induzida pelo EEAT

Após um registro controle, como descrito no item 4.1.2.1, os animais foram tratados com atropina (2 mg/kg, i.v.), um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (WANG et al., 2007). Percorrido 15 minutos, um novo registro foi obtido com EEAT (Figura 4)

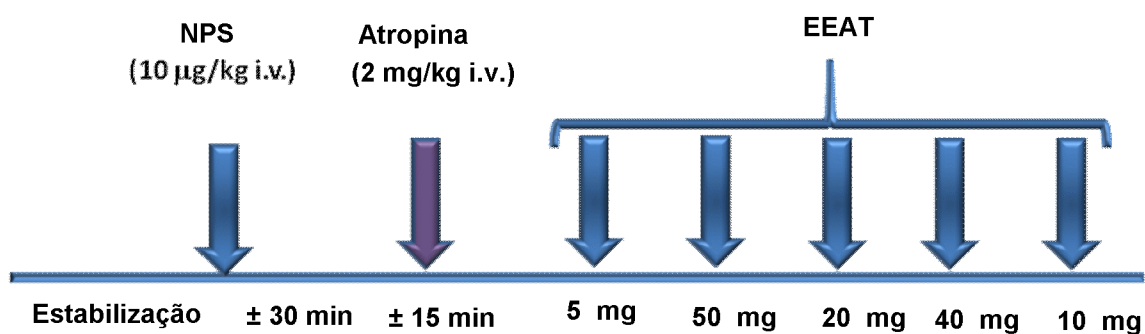


Figura 4- Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação dos receptores muscarínicos no efeito do EEAT sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.

4.2 Ensaios farmacológicos para estudo *In vitro*

4.2.1 Ensaios farmacológicos utilizando átrio isolado de rato

Os ratos foram eutanasiados por deslocamento cervical. O átrio direito foi retirado 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 gaseificado com carbogênio. O átrio foi submetido a uma tensão inicial de 0,5 g por um período de estabilização de 60 minutos. Durante esse período a solução fisiológica foi trocada a cada 15 minutos para prevenir o acúmulo de metabólitos. O efeito cronotrópico foi registrado através de um transdutor de força (7004, Ugo Basile, Itália) acoplado ao fisiógrafo (Gemini, Ugo Basile, Itália) (Figura 5). A frequência de batimentos espontâneos do átrio direito foi medida e definida como frequência atrial para a avaliação dos efeitos cronotrópicos.



Figura 5- Aparato utilizado para aquisição de dados do cronotropismo cardíaco em átrio direito isolado de rato.

4.2.1.1 Protocolo experimental utilizando átrio direito isolado de rato.

Após um período de estabilização de 60 minutos, foi obtido um registro controle para avaliação do cronotropismo cardíaco (átrio direito) e em seguida foram adicionadas concentrações crescentes do EEAT (0,03 – 300 µg/mL) de maneira cumulativa, para a construção de uma curva concentração-resposta. Os resultados foram expressos como % de inibição do registro controle.

4.2.2 Preparações com artéria mesentérica superior de isolada de rato

Os ratos foram eutanasiados por deslocamento cervical. Após uma incisão no abdome do animal, a artéria mesentérica superior foi retirada e livre de tecido conectivo e adiposo (Figura 6A e 6B), foi seccionada em anéis do primeiro segmento da artéria de 1-2 mm (Figura 6C). Os anéis foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode, a 37° C e gaseificada com uma mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂ (carbogênio) (Figura 6D). Esses anéis foram suspensos por linhas de algodão, fixadas a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA), para o registro das tensões isométricas (Figura 6E). Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de 60 minutos. Durante este tempo, as soluções nutritivas foram trocadas a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

A presença de endotélio foi verificada pelo relaxamento dos anéis, pré-contraídos com FEN (10 µM), após adição de ACh (10 µM). Sendo considerados com endotélio, os anéis com relaxamento superior a 90%, enquanto que os anéis com relaxamentos inferiores a 10% foram considerados sem endotélio vascular. (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

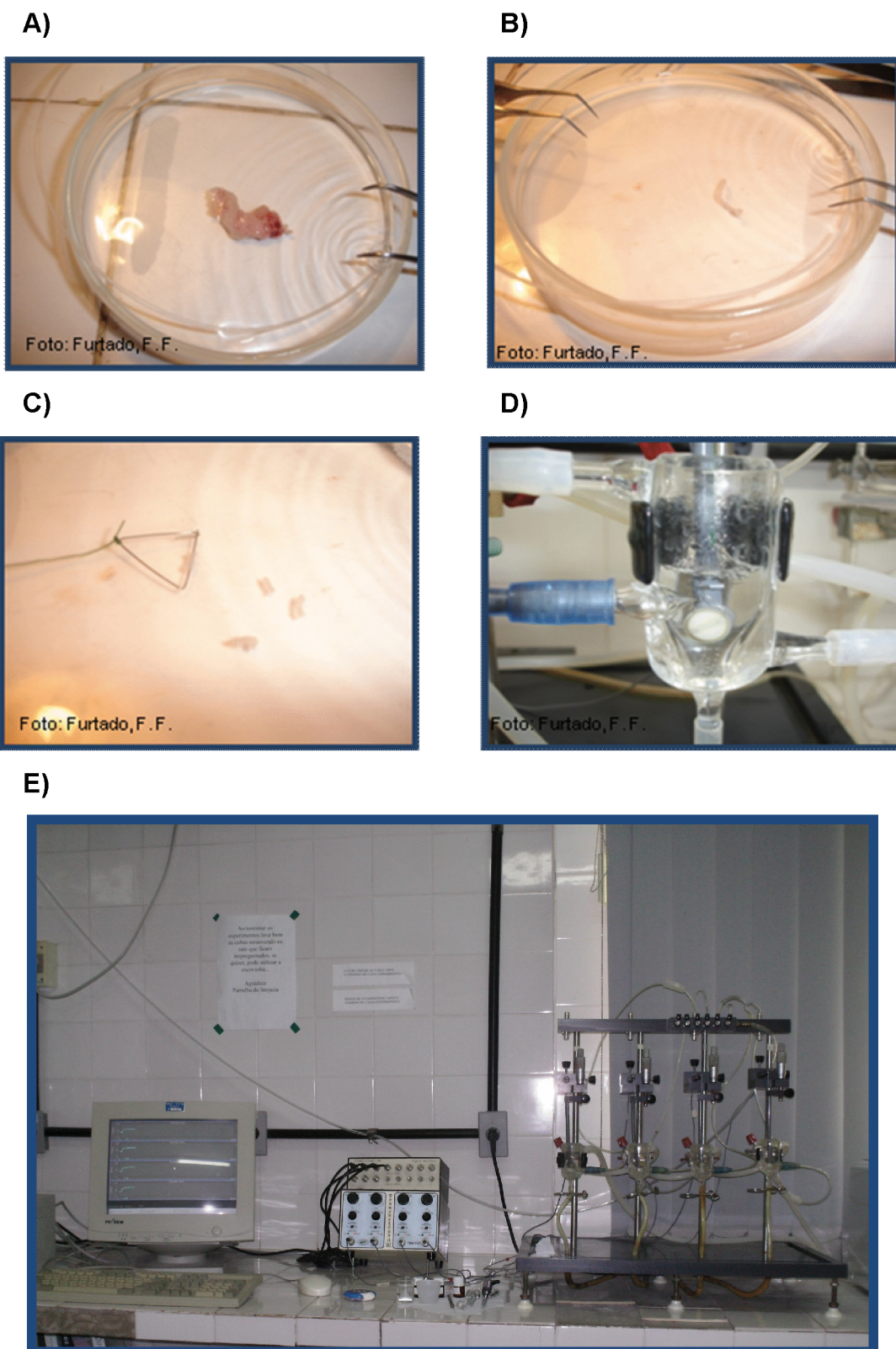


Figura 6- Experimento *in vitro*, em **A)** a artéria mesentérica superior isolada de rato, **B)** a artéria após a remoção do tecido conectivo e adiposo, **C)** os anéis seccionados e colocados em hastes, **D)** os anéis suspensos por linhas de algodão, no banho e em solução nutritiva e **E)** Sistema de cubas e aquisição de dados de tensão isométrica para órgão isolado.

4.2.2.1 Curva concentração-resposta do EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Após o período de estabilização de 1 hora e posterior verificação do endotélio funcional, como descrito no item 4.2.2, foi induzida uma contração com FEN (10 μM) (aproximadamente 40 minutos) e concentrações crescentes do EEAT (0,03 – 300 $\mu\text{g/mL}$), foram adicionadas às cubas de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta na presença ou ausência do endotélio vascular (Figura 7). O relaxamento foi expresso como a porcentagem reversa da contração produzida pelo FEN na presença ou na ausência do endotélio vascular. A potência e eficácia do vasorelaxante do EEAT foram avaliados através dos valores de CE_{50} e E_{max} , respectivamente. Os valores de CE_{50} foram calculados como descrito no item 4.3.

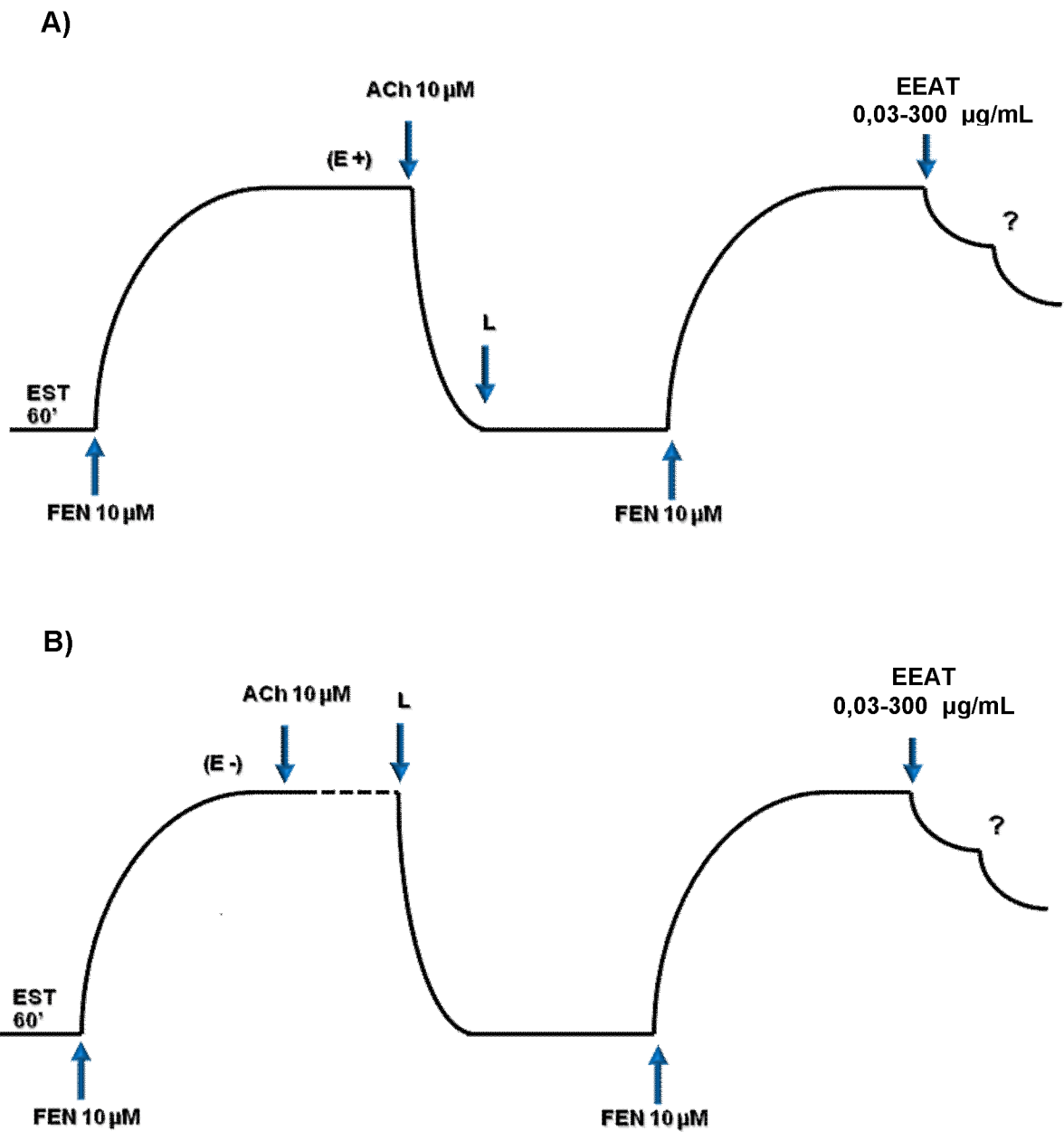


Figura 7- Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante induzido pelo EEAT (0,03 – 300 µg/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN, com e sem endotélio funcional (L=lavagem).

4.2.2.2 Verificação da participação dos canais para K^+ na resposta relaxante induzida por EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Após a verificação da ausência do endotélio funcional, como descrito no item 4.2.2. a solução de Tyrode presente nas cubas foi substituída pela solução de Tyrode com 20 mM de KCl, uma solução moduladora do efluxo de K^+ (MENEZES et al., 2007), (tabela 3) que permanecia durante todo o experimento. Após 20 minutos deste procedimento foi induzida uma contração com FEN (10 μ M). Na fase tônica desta contração, foi adicionado EEAT (0,03-300 μ g/mL). O relaxamento foi expresso como a porcentagem reversa da contração produzida pelo FEN na presença de KCl 20 mM (Figura 8). A potência e eficácia do vasorelaxante do EEAT foram avaliados através dos valores de CE_{50} e E_{max} , respectivamente, na presença e na ausência do KCl 20 mM. Os valores de CE_{50} foram calculados como descrito no item 4.3.

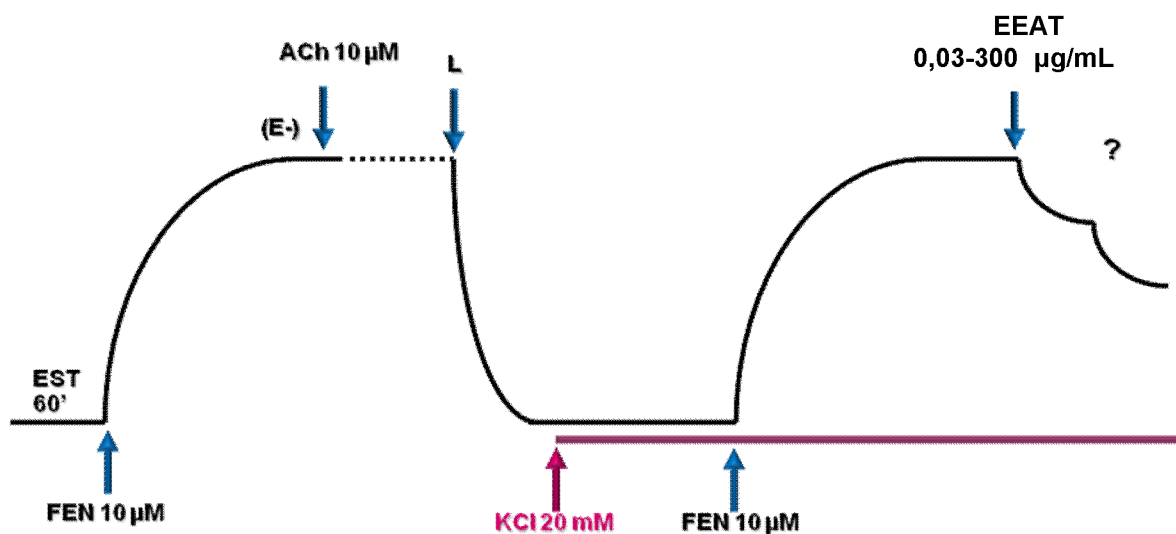


Figura 8- Representação esquemática do protocolo experimental, para avaliação da participação dos canais para K^+ , no efeito vasorelaxante induzido pelo EEAT (0,03 - 300 μ g/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN, sem endotélio funcional (L=lavagem)

4.2.2.3 Avaliação da resposta contrátil da FEN na presença de concentrações do EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Após a obtenção de uma curva controle para a FEN (10^{-9} - 10^{-5} M), as preparações foram lavadas e ao retorno dos valores do tônus basal, incubaram-se separadamente concentrações do EEAT por 30 minutos. Após esse processo as preparações foram submetidas novamente a adição cumulativa de FEN (10^{-9} - 10^{-5} M), para obtenção de uma segunda curva concentração-resposta (Figura 9). Foram calculados os valores de E_{max} e CE_{50} para esta resposta como descrito posteriormente.

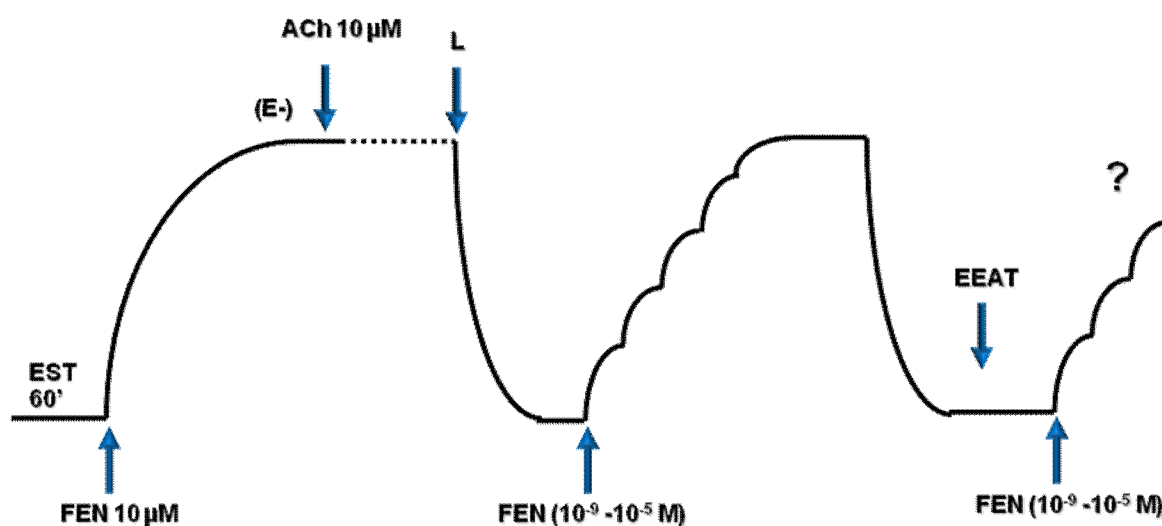


Figura 9- Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito induzido pelo EEAT (0,03 - 300 µg/mL), curva concentração-resposta induzida por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional (L=lavagem).

4.2.2.4 Efeito do EEAT sobre as contrações induzidas por $\text{PGF}_{2\alpha}$ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Após a verificação da ausência do endotélio funcional, como descrito no item 4.2.2, foi obtida uma contração pela adição de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 10 μM (SAITO et al., 1999) um prostanóide vasoconstritor. No componente tônico desta contração, foi adicionado EEAT (0,03 - 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de maneira cumulativa (Figura 10). A potência e eficácia do vasorelaxante do EEAT foram avaliados através dos valores de CE_{50} e E_{max} respectivamente, obtidos para $\text{PGF}_{2\alpha}$ e FEN. Os valores de CE_{50} foram calculados como descrito no item 4.3.

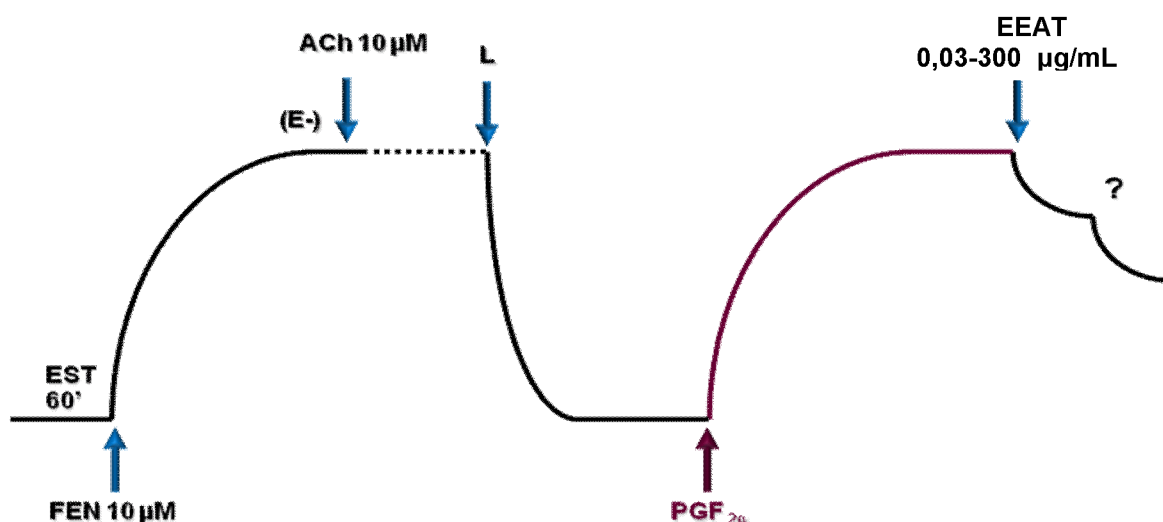


Figura 10- Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do EEAT (0,03 – 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sobre a contração induzida por $\text{PGF}_{2\alpha}$ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional (L=lavagem).

4.2.2.5 Efeito do EEAT sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Após a verificação da ausência do endotélio funcional, como descrito no item 4.2.2, o meio nutritivo de cada preparação foi trocado por uma solução com elevada concentração de K^+ (KCl 80 mM) que promove uma despolarização da membrana plasmática gerando a ativação dos canais para Ca^{2+} sensíveis a voltagem (Ca_v) com consequente influxo de Ca^{2+} e contração (REMBOLD, 1996). Este processo foi então repetido com o objetivo de se obter duas contrações com magnitude similar para o KCl 80mM. No componente tônico e sustentado da segunda contração, com o tempo médio de 30 minutos para a estabilização, foi adicionado à cuba concentrações crescentes do EEAT (0,03 - 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de maneira cumulativa (Figura 11). A potência e eficácia vasorelaxante do EEAT foram avaliados através dos valores de CE_{50} e E_{max} , respectivamente, obtidos para KCl 80mM e FEN. Os valores de CE_{50} foram calculados como descrito no item 4.3.

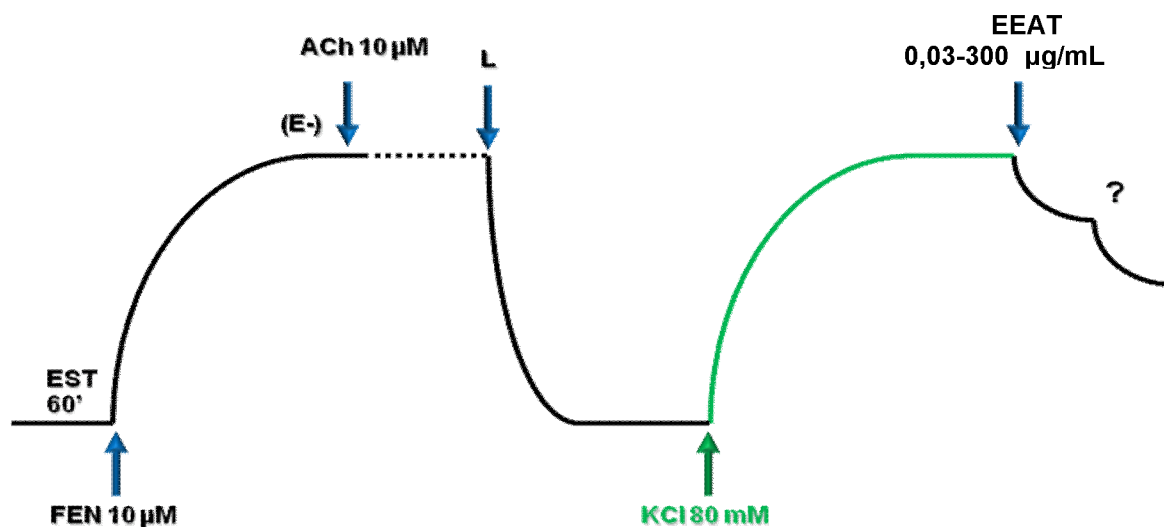
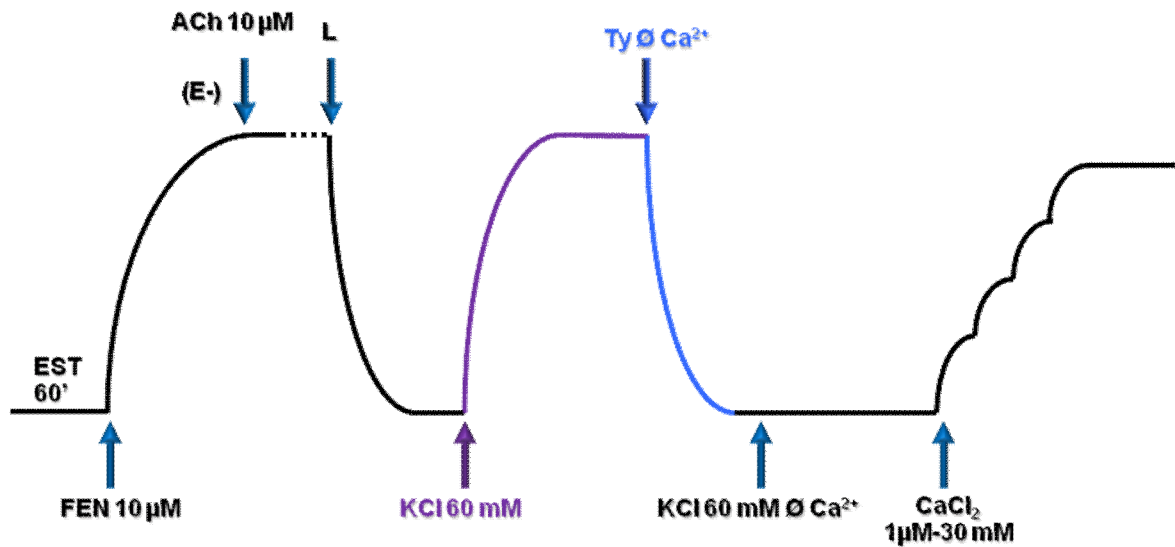


Figura 11: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do EEAT (0,03 – 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sobre a contração induzida por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional (L=lavagem)

4.2.2.6 Efeito do EEAT sobre o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Após a verificação da ausência do endotélio funcional, como descrito no item 4.2.2. Para esse experimento, a solução de Tyrode da cuba, foi substituída por uma solução de KCl 60mM (Tabela 4), para a obtenção de duas contrações de magnitude similar. As preparações foram lavadas com uma solução de Tyrode nominalmente sem Ca^{2+} (Ty Φ Ca^{2+}) e permaneciam nesta solução por 15 minutos. Após este período, as preparações foram lavadas novamente com uma solução de KCl 60 mM nominalmente sem cálcio (KCl 60mM Φ Ca^{2+}) por mais 15 minutos em seguida induziu-se uma curva cumulativa para o CaCl_2 (10 μM - 3 mM). Este procedimento era repetido para construção de uma segunda curva para o CaCl_2 . Após este processo eram adicionadas às cubas concentrações isoladas do EEAT (10, 30, 50, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por um período de incubação de 15 minutos, decorrido este tempo induzia-se novamente uma curva cumulativa de CaCl_2 (Figura 12). Os resultados foram avaliados comparando-se a porcentagem da resposta contrátil na presença do EEAT com àquela obtida pela amplitude média das curvas controle (na ausência do EEAT).

A)



B)

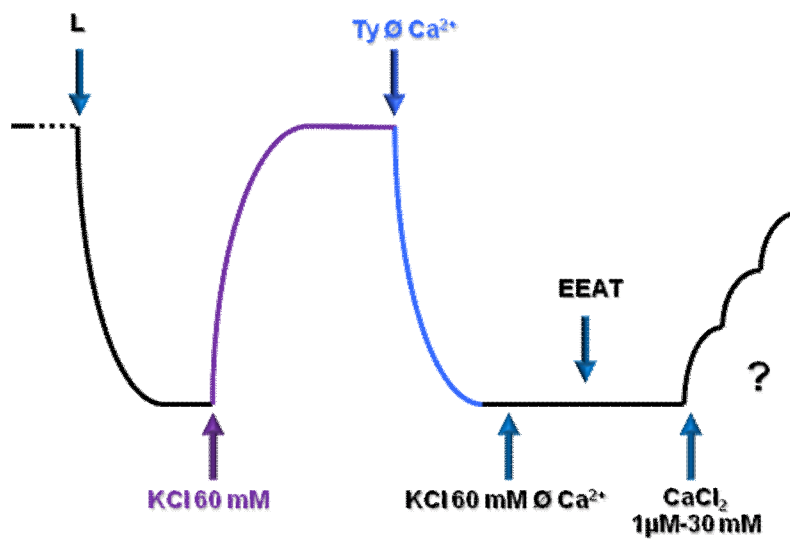


Figura 12- Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação dos Ca_v no efeito relaxante induzido pelo EEAT (0,03-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional (L=lavagem; Ty = Tyrode), sendo **A)** condição controle e **B)** na presença do EEAT (L=lavagem).

4.2.2.7 Efeito do EEAT sobre contrações induzidas por S-(-) BayK 8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Após a verificação da ausência do endotélio funcional, como descrito no item 4.2.2, as preparações foram pré-incubadas com uma solução despolarizante de KCl 20 mM (Tabela 3) por 20 minutos. Em seguida adicionou-se às cubas o S-(-) Bay K8644 (10^{-7} μ M) um ativador de Ca_v (BARRÚS et al., 1996), para obtenção de uma contração sustentada. Na fase tônica desta contração adicionou-se EEAT de maneira cumulativa (0,03 – 300 μ g) (figura 13). A potência e eficácia do vasorelaxamento do EEAT foram avaliados através dos valores de CE_{50} e E_{max} , respectivamente. Os valores de CE_{50} foram calculados como descrito no item 4.3.

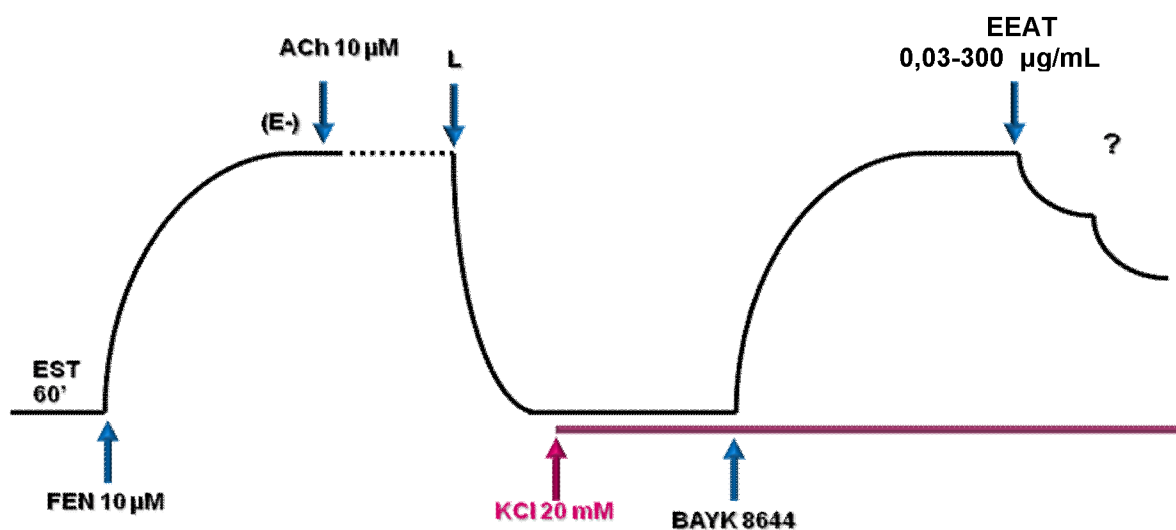
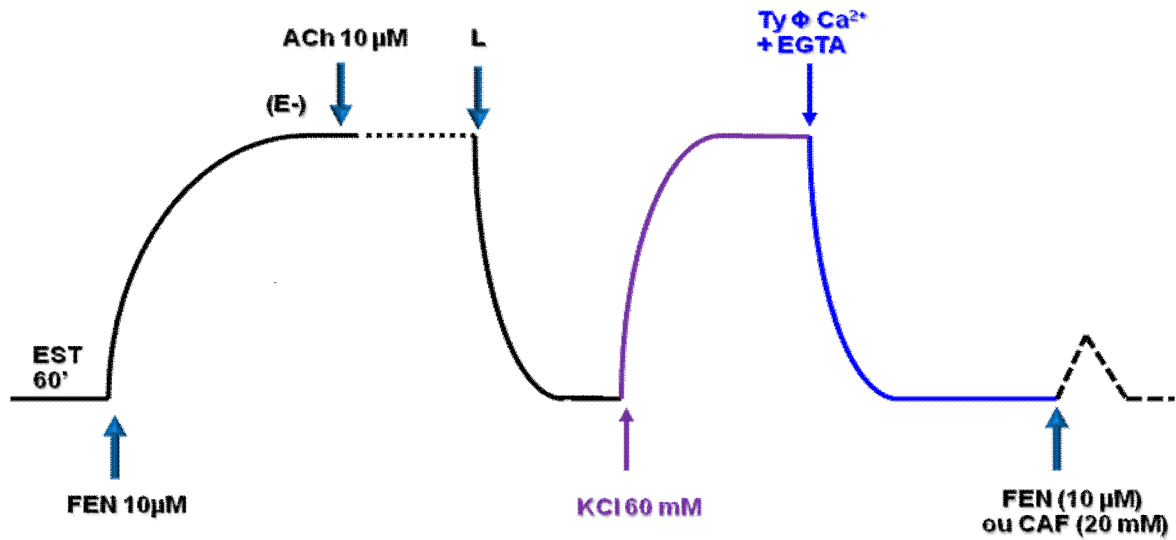


Figura 13- Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliação do efeito do EEAT (0,03-300 μ g/mL) sobre contração induzida por S-(-) BayK 8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional (L=lavagem).

4.2.2.8 Efeito do EEAT sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 μM) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, em meio livre de Ca^{2+}

O efeito do EEAT sobre os estoques de cálcio intracelulares sensíveis à FEN ou CAF foi investigado de acordo com o protocolo descrito por SAKATA e KARAKI (1991). Após a verificação da ausência do endotélio funcional, como descrito no item 4.2.2, as preparações foram expostas à solução isosmótica 60 mM de K^+ , para obtenção de uma contração tônica. Após este processo as preparações eram lavadas com uma solução de Tyrode sem Ca^{2+} adicionada de 1 mM de EGTA, por um período de 2-3 minutos, em seguida adicionava-se à cuba FEN 10 μM ou CAF 20 mM, para obtenção de uma contração transiente. Após este processo as preparações foram lavadas com Tyrode normal e ao retorno do tônus basal, repetiu-se o processo anterior de forma que se obtivessem duas contrações de magnitude similar (controle). O EEAT (10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em concentrações isoladas foi adicionado às cubas 3 minutos antes da indução de uma terceira contração transiente com FEN 10 μM e EEAT (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) antes da indução de uma terceira contração transiente com CAF 20 mM (Figura 14). Nos experimentos com CAF a temperatura do banho era mantida à 21°C.

A)



B)

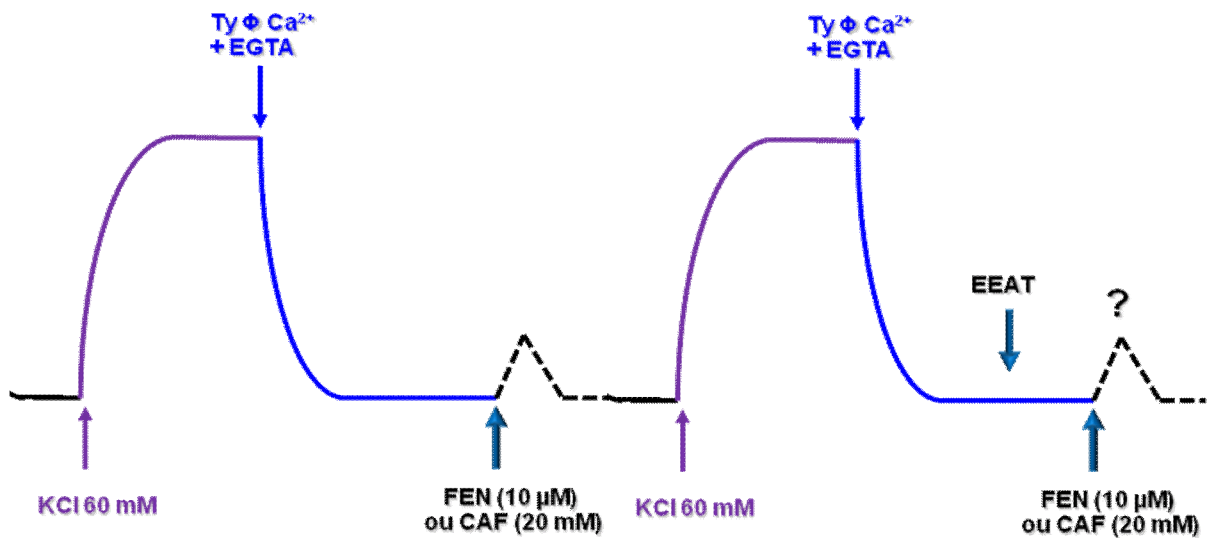


Figura 14- Representação esquemática do protocolo experimental para estudo dos efeitos de concentrações isoladas do EEAT sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 μ M) ou CAF (20 mM) (L=lavagem; Ty = Tyrode), sendo **A)** condição controle e **B)** na presença de concentrações isoladas do EEAT (L=lavagem).

4.3 Análise Estatística

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). Foram realizados testes “t” de Student não-pareados, para análise de diferença entre todas as médias e ANOVA “one way” seguida do pós-teste de Bonferroni.

As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando valor obtido para “p” foi menor que 0,05 ($p < 0,05$). As curvas foram obtidas através de regressão não-linear. A Concentração capaz de induzir 50% de uma resposta máxima (CE_{50}) foi obtida através de regressão não-linear. O valor de E_{max} corresponde à média percentual de relaxamento do EEAT para cada condição estudada. Toda a análise estatística e plotagem das curvas foram realizadas utilizando o programa estatístico Graph-Pad Prism[®] 5.0.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Estudos Farmacológicos com EEAT *in vivo*

5.1.1 Efeito do EEAT sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados

Após um período de estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, a administração de maneira randômica de doses EEAT (5, 10, 20, 40 e 50 mg/kg i.v.), promoveu uma hipotensão significativa ($-4,2 \pm 1,2$; $-7,8 \pm 1,3$; $-9 \pm 1,7$; $-24,5 \pm 4,7$ e $-27,5 \pm 3,1$ %, respectivamente) e uma bradicardia ($-3,4 \pm 0,9$; $-4,7 \pm 1,6$; $-7,4 \pm 1,7$; $-15,5 \pm 4$ e $-21 \pm 3,3$ %, respectivamente) de maneira dose dependente em ratos normotensos não anestesiados (Gráfico 1). Na maior dose do EEAT (50 mg/kg) promoveu uma hipotensão e bradicardia de maneira sustentada e reversível, como é possível observar na figura 15, que demonstra a hipotensão e bradicardia em função do tempo.

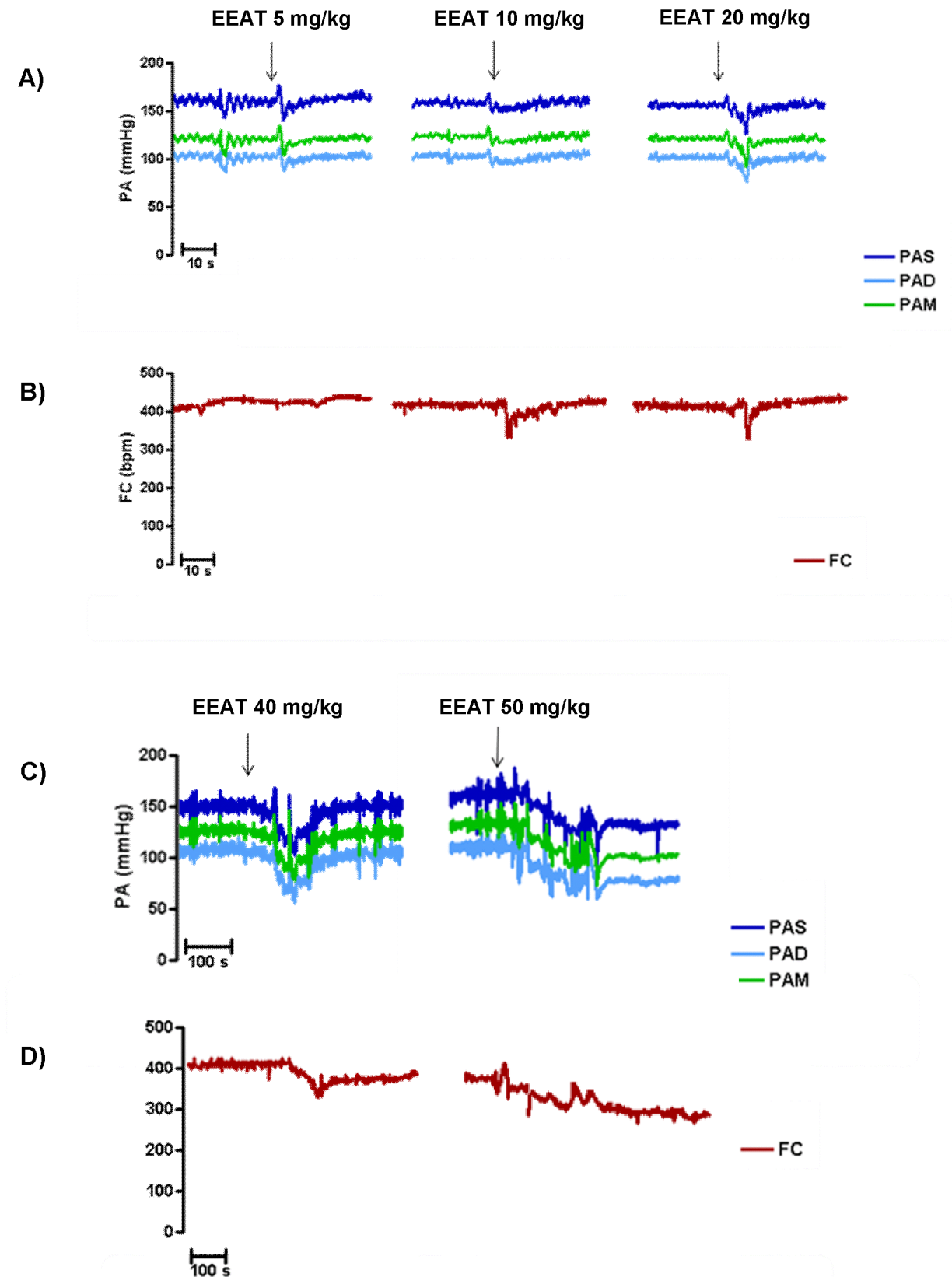
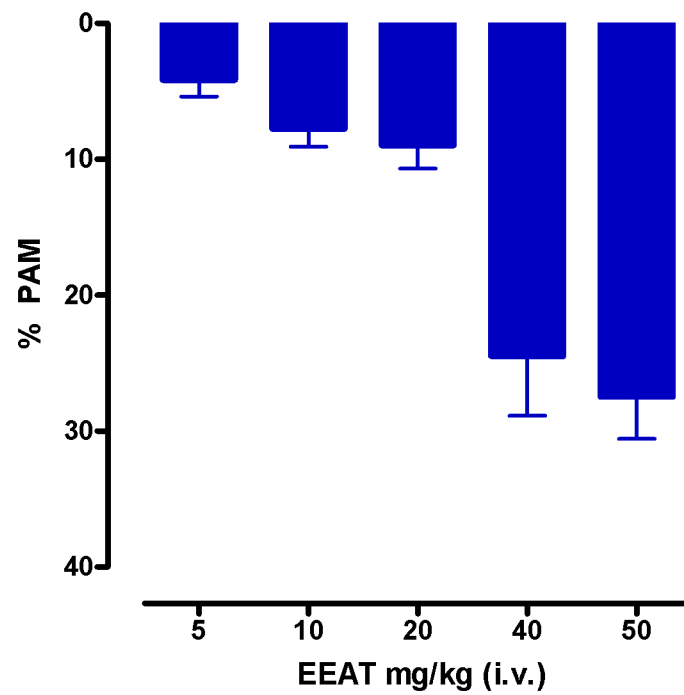


Figura 15- Registros originais da administração aguda (i.v.) de EEAT. valores de PAS (■) PAM (■) PAD (■) das doses de 5 ,10 e 20mg/kg em (A) e 40 e 50 mg/kg em (C) e FC (■) das doses de 5 , 10 e 20mg/kg em (B) e 40 e 50 mg/kg em (D) .

A)



B)

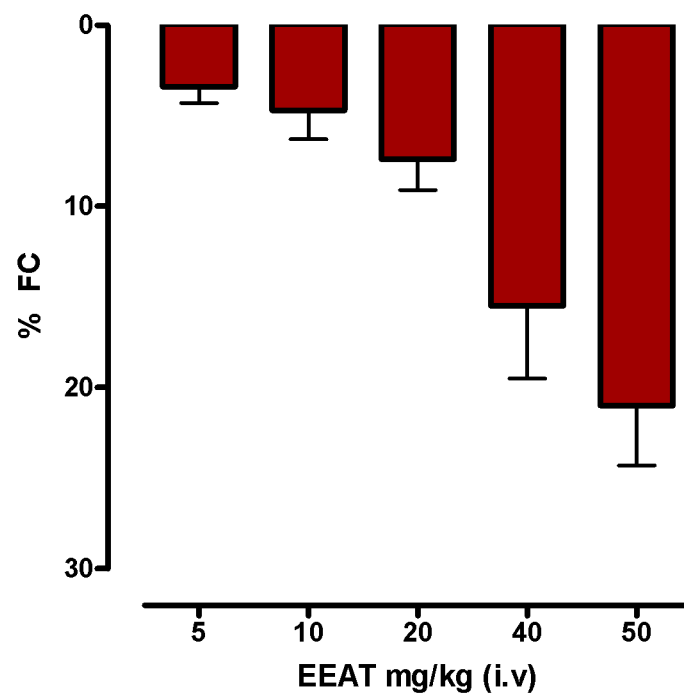
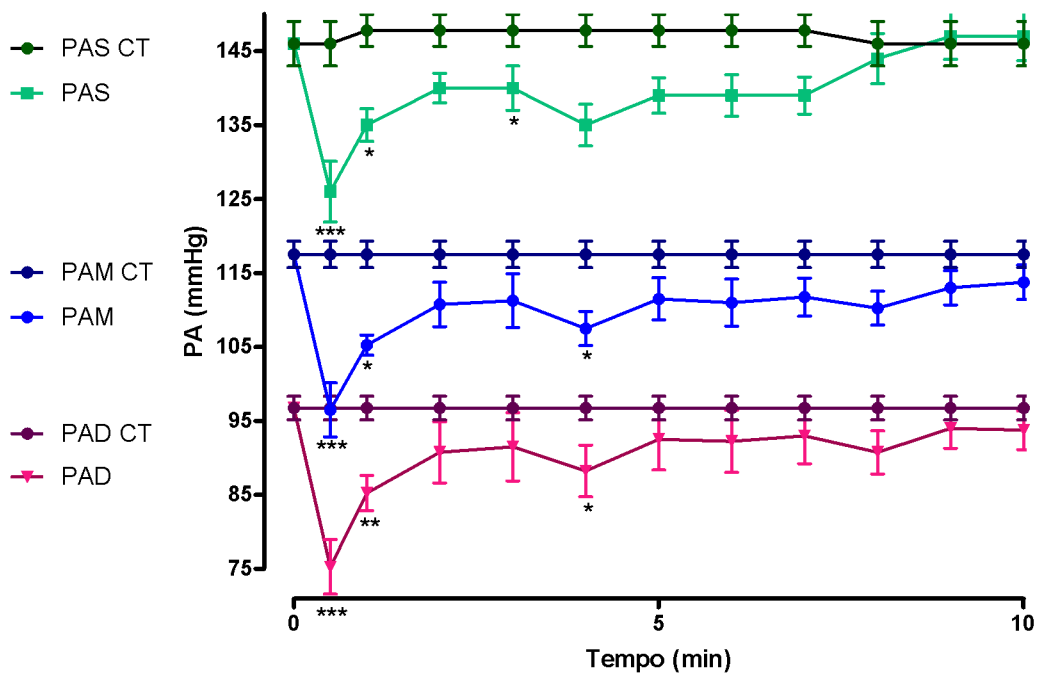


Gráfico 1- Efeito do EEAT (5; 10; 20; 40 e 50 mg/kg, i.v.) sobre a PAM (A) e FC (B) em ratos normotensos não anestesiados, n=6.

A)



B)

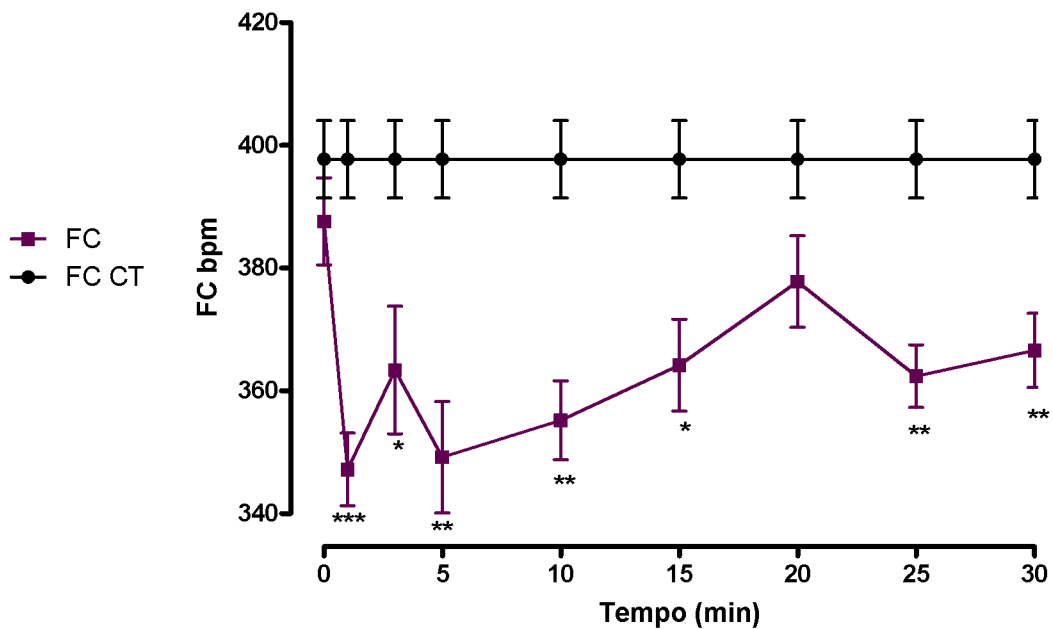
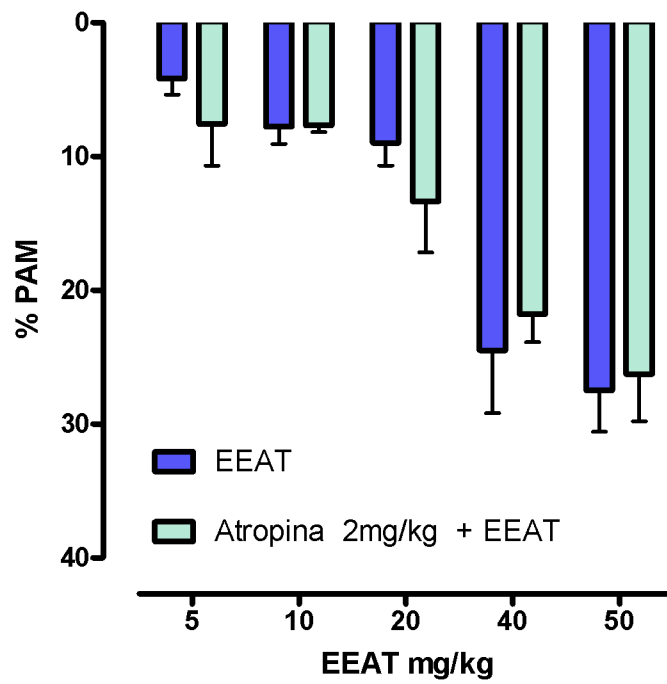


Gráfico 2-Efeito do EEAT (i.v.) sobre a PAS, PAM e PAD (A) e FC (B) em ratos normotensos não anestesiados. Representando a influência do extrato, em função do tempo, na dose de 50 mg/kg, n=6, (CT= condição controle); *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (controle versus EEAT).

5.1.2 Efeito do bloqueio dos receptores muscarínicos na hipotensão e bradicardia induzida por EEAT em ratos normotensos não anestesiados

No gráfico 3, observa-se que o bloqueio dos receptores muscarínicos induzido pela administração de atropina (2 mg/kg, i.v.), não promoveu alterações significantes no efeito induzido por EEAT (5; 10; 20 ; 40 e 50 mg/kg) na resposta hipotensora ($-7,6 \pm 3,1$; $-7,7 \pm 0,5$; $-13,4 \pm 3,8$; $-21,8 \pm 2,1$ e $-27,5 \pm 3,1$ %, respectivamente) e bradicárdica ($-2,7 \pm 0,9$; $-1,7 \pm 0,3$; $-4,2 \pm 1,4$; $-10 \pm 1,8$ e $-19,6 \pm 4,6$ % respectivamente).

A)



B)

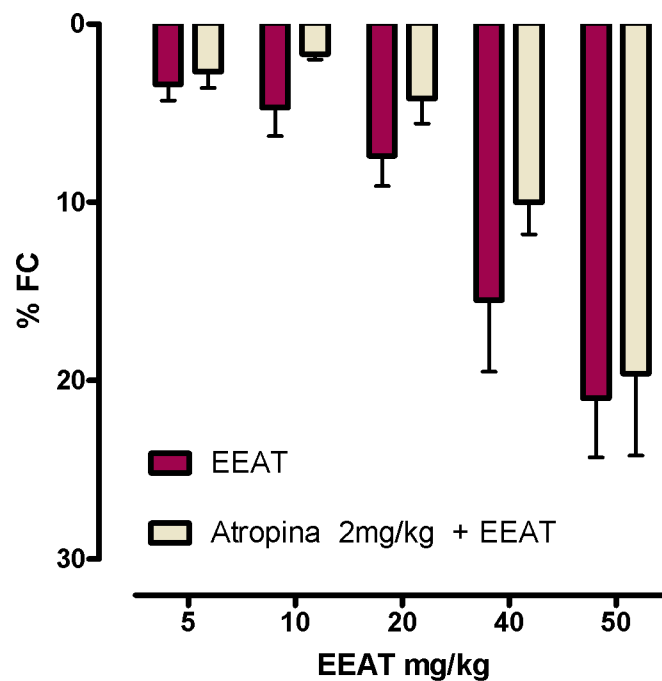


Gráfico 3-Efeito da atropina (2 mg/kg; i.v.) sobre a resposta hipotensora (A) e bradicárdica (B) induzida pela administração aguda de doses crescentes do EEAT (5; 10; 20; 40 e 50 mg/kg, i.v.) em ratos Wistar não anestesiados (n = 6).

5.2 Estudos Farmacológicos com EEAT *in vitro*

5.2.1 Estudos com átrio isolado de rato

5.2.1.1 Efeito do EEAT sobre átrio isolado de rato

A automaticidade cardíaca foi avaliada em preparações de átrio direito isolado de rato. Concentrações crescentes de EEAT (0,03-300 $\mu\text{g/mL}$) produziram efeito cronotrópico negativo, com inibição máxima de $94 \pm 1\%$, na concentração final de 300 $\mu\text{g/mL}$ do extrato (Gráfico 4).

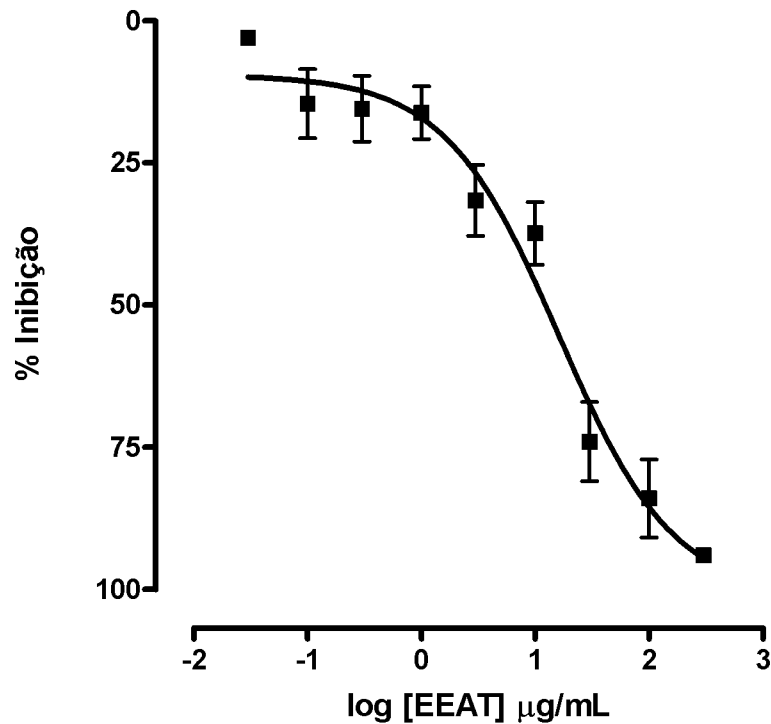


Gráfico 4-Curva concentração-resposta para EEAT (0,03-300 $\mu\text{g/mL}$) em átrio direito isolado de rato (■), n=6.

5.2.2 Estudo com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

5.2.2.1 Efeito do EEAT sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem o endotélio funcional pré-contraídos com FEN

O EEAT (0,03-300 $\mu\text{g/mL}$) promoveu vasorelaxamento, de maneira dependente de concentração, em anéis com endotélio funcional de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (10 μM). A remoção do endotélio não alterou a resposta vasorelaxante induzida pelo EEAT, como demonstrado pelos valores de CE_{50} obtidos de artérias com endotélio intacto ($CE_{50} = 37,07 \pm 4,72 \mu\text{g/mL}$, $n=6$) e artérias com endotélio removido ($CE_{50} = 32,93 \pm 3,16 \mu\text{g/mL}$, $n=6$). A porcentagem de E_{max} , também não foi alterada pela remoção do endotélio, os valores de E_{max} foram $97 \pm 4,0 \%$ e $99 \pm 3,6 \%$ para artérias com ou sem endotélio funcional, respectivamente (Gráfico 5).

O tempo máximo de estabilização do relaxamento entre uma concentração e outra foi de aproximadamente 8 min, com uma duração máxima de relaxamento total em torno de 80 minutos (Figura 16). Após o experimento controle as preparações foram lavadas por 40 minutos e induziu-se então uma contração com FEN (10 μM) para verificação da reversão do relaxamento induzido por EEAT. Em todas as preparações houve reversão da resposta (Dados não mostrados).

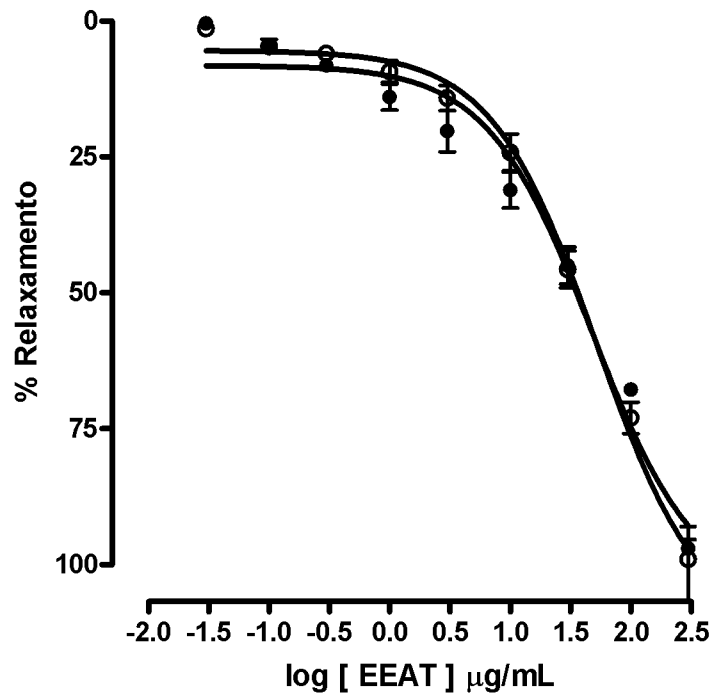
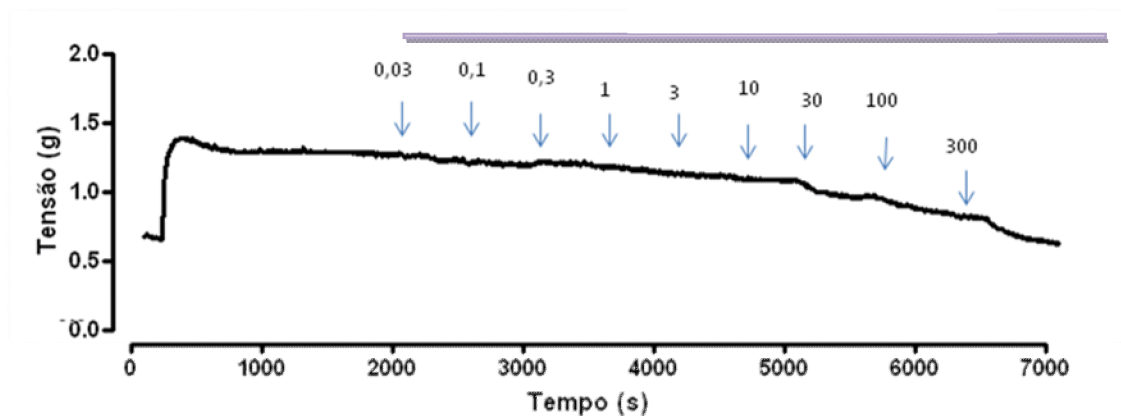


Gráfico 5-Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do EEAT (0,03-300 µg/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, com endotélio intacto (●) e sem endotélio (○), pré-contraídos com 10 µM de FEN (n = 6).

A)

EEAT (0,03-300 $\mu\text{g/mL}$)

B)

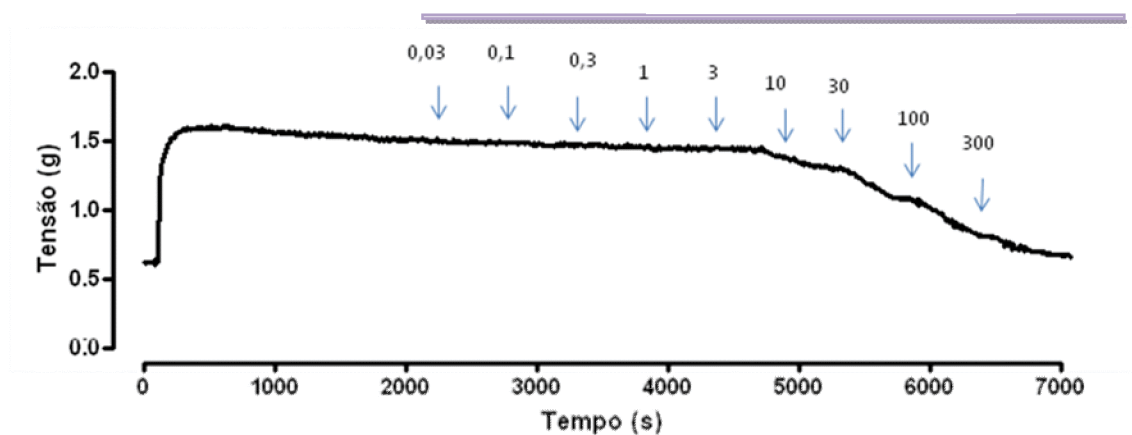
EEAT (0,03-300 $\mu\text{g/mL}$)

Figura 16- Traçado original mostrando o efeito de concentrações crescentes do EEAT (0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100; 300; $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato wistar com endotélio intacto (A) e em (B) endotélio removido, pré-contraídos com 10 μM de FEN.

5.2.2.2 Efeito do modulador do efluxo de potássio KCl 20 mM na resposta vasorelaxante induzida por EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.

Os anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio funcional, foram pré-incubados com KCl 20 mM, e contraídos com FEN (10 μ M). O efeito vasorelaxante induzido por EEAT (0,03-300 μ g/mL) não foi modificado, não havendo alterações nos valores de CE_{50} e nem no E_{max} ($CE_{50} = 37,42 \pm 8,4$ μ g/mL; $E_{max} = 100 \pm 2,7$ %), em relação ao controle com FEN ($CE_{50} = 32,93 \pm 3,16$; $E_{max} = 99 \pm 3,6$ %) (Gráfico 6).

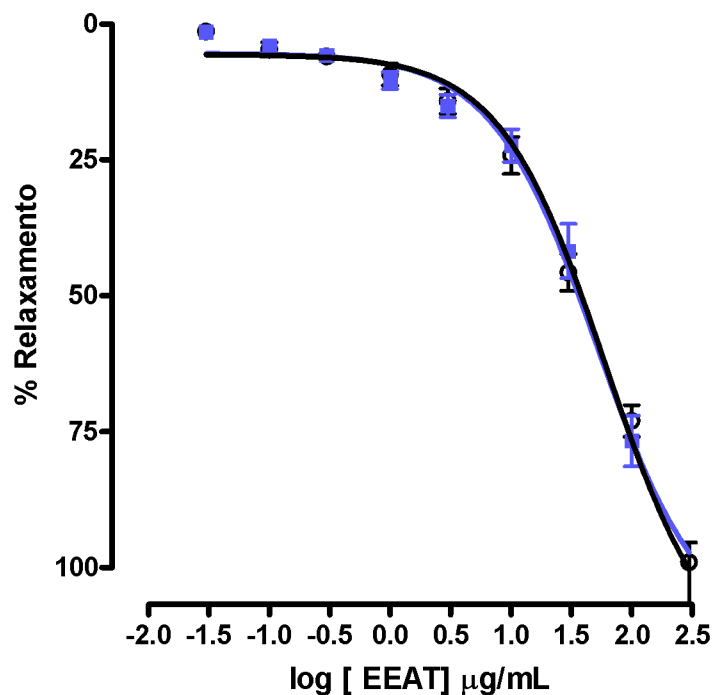


Gráfico 6- Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do EEAT(0,03-300 μ g/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (10 μ M), na ausência (\circ) ou na presença KCl 20 mM (\blacksquare) (n=6).

5.2.2.3 Verificação da resposta vascular para a FEN na presença de EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio funcional, a pré-incubação com EEAT (10; 30; 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$) inibiu de maneira dependente de concentração as contrações induzida por FEN (10^{-9} – 10^{-5} M). As curvas cumulativas promovidas pela adição de FEN, foram deslocadas para a direita de forma não paralela com redução do E_{max} , como pode-se observar no (Gráfico 7), (ver tabela 9).

Tabela 9- Valores de CE_{50} e E_{max} obtida para contrações induzida por fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) na presença de concentrações isoladas do EEAT.

EEAT ($\mu\text{g/mL}$)	CE_{50} (10^{-7} M)	E_{max} (%)
Controle	$1,69 \pm 0,72$	$100,0 \pm 0,0$
10	$4,3 \pm 1,1$	$103,49 \pm 5,2$
30	$8,04 \pm 1,83^{**}$	$80,6 \pm 5,9^{**}$
100	$12,48 \pm 3,43^{**}$	$54,92 \pm 6^{***}$
300	$20,7 \pm 5,6^{***}$	$18,72 \pm 2,1^{**}$

** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ significativo *versus* controle.

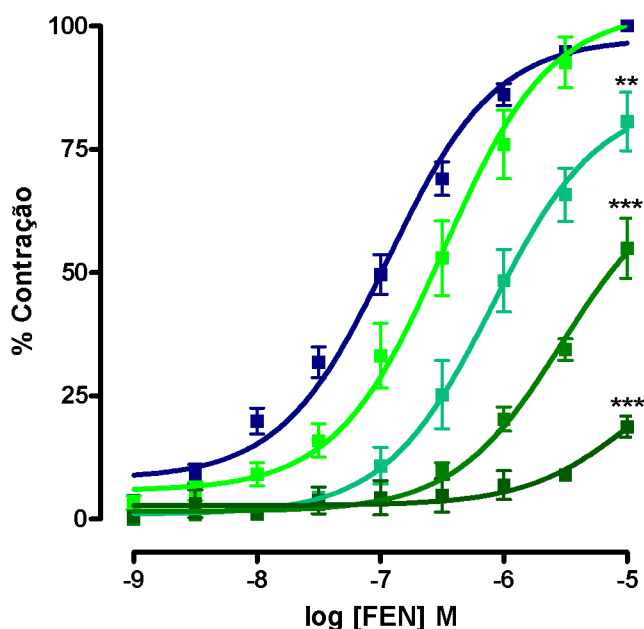


Gráfico 7- Curvas concentração-resposta para FEN na ausência de EEAT controle (■) e na presença de concentrações isoladas de EEAT ($\mu\text{g/mL}$): (■) 10; (■) 30; (■) 100 e (■) 300, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio removido ($n=6$). ANOVA “one-way” seguido de Bonferroni, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (controle *versus* [EEAT]) para E_{max} .

5.2.2.4 Efeito vasorelaxante induzido por EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídos com $\text{PGF}_{2\alpha}$

Os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio vascular, foram pré-contraídos com a $\text{PGF}_{2\alpha}$, um prostanóide vasoconstritor. A adição cumulativa do EEAT (0,03-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) promoveu um potente efeito vasorelaxante dependente de concentração $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($\text{CE}_{50} = 44,88 \pm 11,09 \mu\text{g}/\text{mL}$; $E_{\text{max}} = 95,1 \pm 4,47 \%$), resultado semelhante ao obtido com contrações induzidas por FEN, na ausência do endotélio vascular FEN ($\text{CE}_{50} = 32,93 \pm 3,16 \mu\text{g}/\text{mL}$; $E_{\text{max}} = 99 \pm 3,6 \%$); (Gráfico 8).

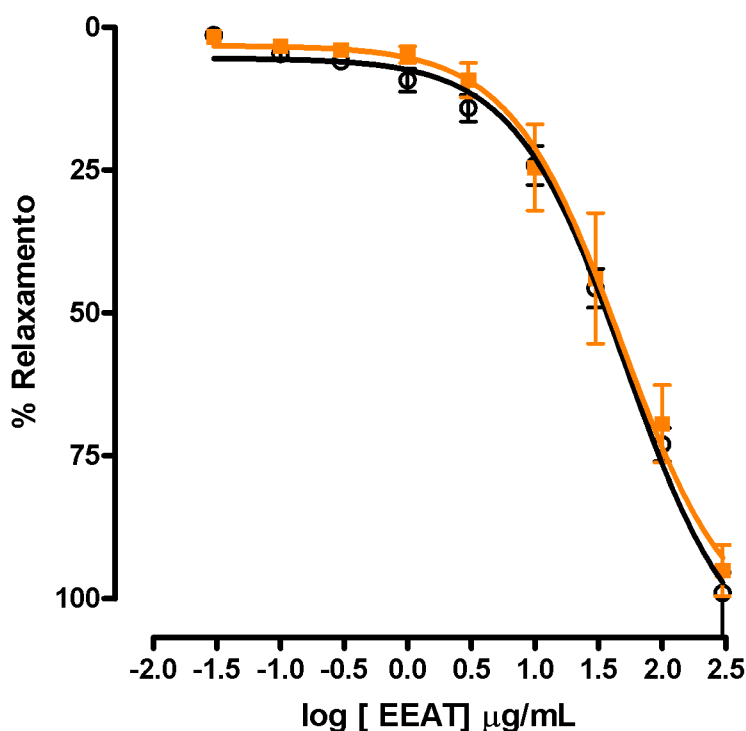


Gráfico 8- Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do EEAT (0,03-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio, (○) pré-contraídos com FEN (10 μM) (■) pré-contraídos com $\text{PGF}_{2\alpha}$ (n=6).

5.2.2.5 Efeito de um agente despolarizante KCl 80 mM na resposta vasorelaxante induzida por EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio vascular, pré-contraídos com um agente despolarizante KCl 80 mM, a adição cumulativa do EEAT (0,03-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) promoveu um potente efeito vasorelaxante dependente de concentração, com CE_{50} e E_{max} $26,38 \pm 3,1 \mu\text{g}/\text{mL}$ e $94,4 \pm 4,5 \%$, respectivamente, semelhante ao obtido com contrações induzidas por FEN em endotélio removido ($\text{CE}_{50} = 32,93 \pm 3,16 \mu\text{g}/\text{mL}$; $\text{E}_{\text{max}} = 99 \pm 3,6 \%$) (Gráfico 9).

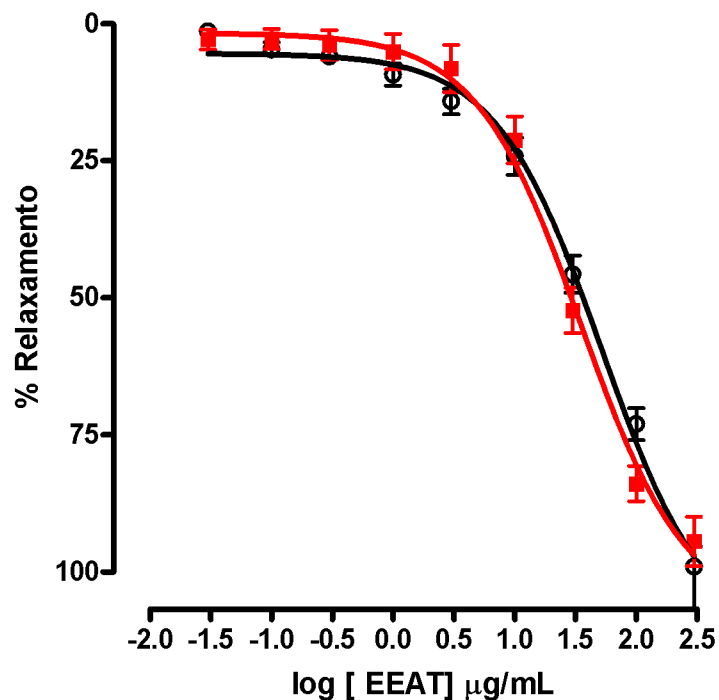


Gráfico 9- Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do EEAT (0,03-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (10 μM) (\circ) ou KCl 80 mM (\blacksquare) ($n=6$).

5.2.2.6 Verificação do efeito do EEAT sobre as contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+}

O EEAT nas concentrações de 10; 30; 50; 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ inibiu de maneira dependente de concentração as contrações induzidas pelo CaCl_2 em solução despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} . As curvas cumulativas promovidas pela adição do CaCl_2 foram deslocadas para direita de forma não paralela com redução do E_{max} . Como pode-se observar no (Gráfico 10), (ver tabela 10).

Tabela 10- Valores de CE_{50} e E_{max} obtida para contrações induzida por CaCl_2 na presença de concentrações isoladas do EEAT.

EEAT ($\mu\text{g/mL}$)	CE_{50} (10^{-4}M)	E_{max} (%)
Controle	$1,9 \pm 0,4$	$100,0 \pm 0,0$
10	$8,4 \pm 4,7$	$99,05 \pm 0,6$
30	$6,3 \pm 1,4$	$79,63 \pm 5,16^*$
50	$10 \pm 2,4$	$64,99 \pm 6,98^{***}$
100	$23 \pm 9,0^{***}$	$22,62 \pm 4,66^{***}$
300	$15,0 \pm 6^{***}$	$13,07 \pm 2,25^{***}$

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ significativo *versus* controle

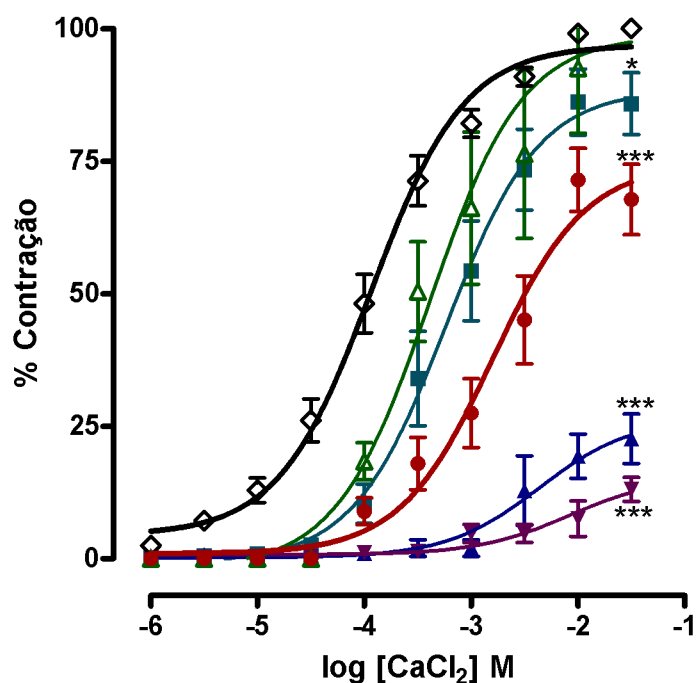


Gráfico 10- Curvas cumulativas para CaCl_2 na ausência de EEAT controle (\diamond) e na presença de concentrações isoladas de EEAT ($\mu\text{g/mL}$): 10 $\mu\text{g/mL}$ (Δ); 30 $\mu\text{g/mL}$ (\blacksquare); 50 $\mu\text{g/mL}$ (\bullet); 100 $\mu\text{g/mL}$ (\blacktriangle) e 300 $\mu\text{g/mL}$ (\blacktriangledown), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos ($n=6$). ANOVA “one-way” seguido de Bonferroni, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (controle *versus* [EEAT]) para E_{max} .

5.2.2.7 Efeito vasorelaxante induzido por EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com S-(-) Bay K8644

O EEAT relaxou de maneira dependente de concentração os anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio funcional, pré-contraídos com S-(-) Bay K8644 (10^{-7} μ M) ($CE_{50} = 34,59 \pm 4.48$ μ g/mL; $E_{max} = 100 \pm 4,4$) (Gráfico 11).

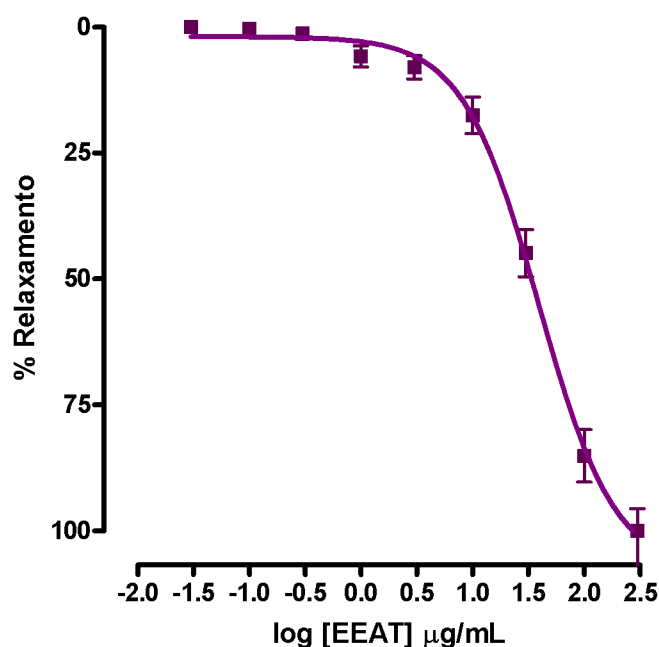


Gráfico 11- Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do EEAT (0,03-300 μ g/mL), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, (■) pré-contraídos com S-(-) Bay K8644 (0,1 μ M) (n=6).

5.2.2.8 Efeito de EEAT sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 μM) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, em meio livre de Ca^{2+}

A avaliação do efeito do EEAT sobre as contrações transientes induzida por FEN (10 μM), em meio livre de Ca^{2+} , foi estudada em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio. O EEAT promoveu inibição das contrações transientes induzida por FEN de maneira dependente de concentração. A porcentagem de contração máxima obtida na presença do EEAT nas concentrações 10, 30, 100 ou 300 $\mu\text{g/mL}$ foi de $90,43 \pm 13,49$; $61,57 \pm 10,52$; $44,74 \pm 9,29\%$, $30,18 \pm 7,67\%$, respectivamente (Gráfico 12).

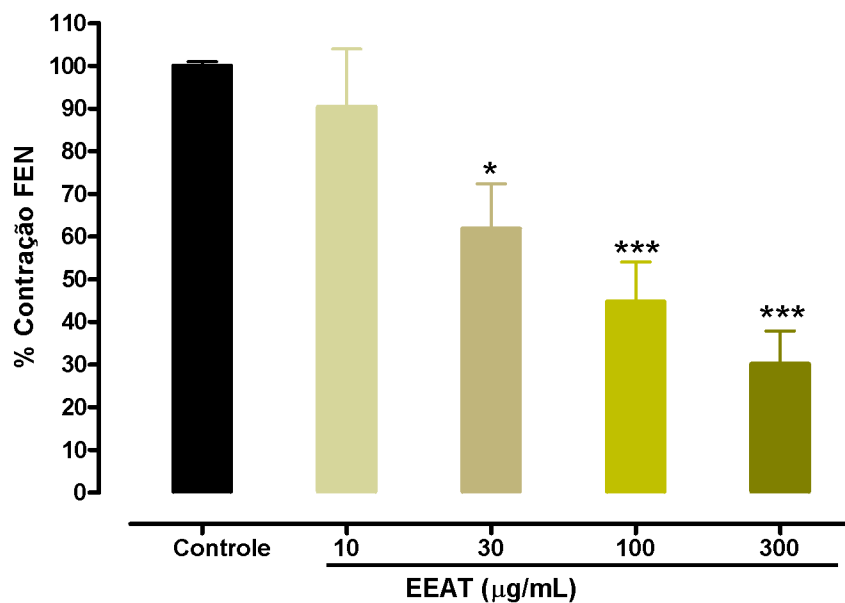


Gráfico 12- Efeito do EEAT sobre contrações induzidas por FEN (10 μM) em meio livre de Ca^{2+} , em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos ($n=6$). ANOVA “one-way” seguido de Bonferroni, * $p<0,05$; *** $p<0,001$ (controle *versus* [EEAT]).

5.2.2.9 Efeito de EEAT sobre as contrações induzida por CAF (20 mM) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, a concentração do EEAT utilizada foi 300 $\mu\text{g/mL}$, e como pode observado no gráfico 13 não houve alteração da contração transiente induzida por CAF 20 mM. Os valores de contração máxima obtida na presença do EEAT foi $95,93 \pm 13,29 \%$ (Gráfico 13).

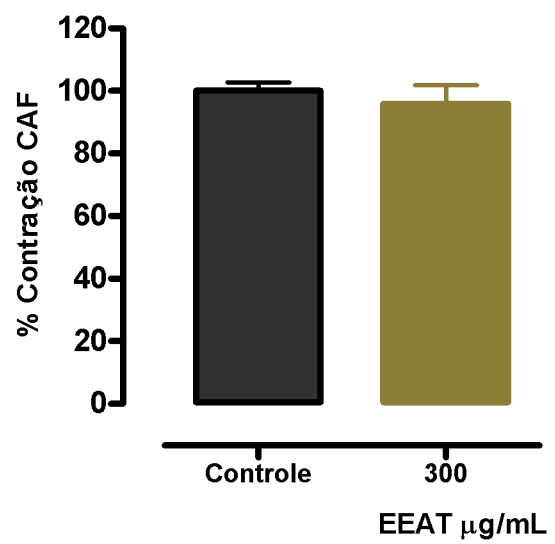


Gráfico 13- Efeito do EEAT sobre contrações induzidas por CAF 20 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos em meio livre de Ca^{2+} (n= 6).

DISCUSSÃO



6 DISCUSSÃO

Este estudo foi proposto com o intuito de avaliar as ações cardiovasculares induzidas por *Aspidosperma tomentosum* Mart, investigando os mecanismos de ação envolvidos. Para tanto, foram utilizadas duas abordagens metodológicas: *in vivo* para avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca em ratos normotensos não anestesiados e *in vitro* em átrio direito isolado de rato e em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato. O principal achado deste trabalho foi que: a administração aguda do extrato etanólico das cascas do caule de *A. tomentosum* (EEAT) promoveu hipotensão e bradicardia em ratos normotensos não anestesiados, sendo este efeito hipotensor atribuído a diminuição da resistência vascular periférica. O mecanismo de ação responsável pela atividade vasorelaxante envolve o bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v-L e inibição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis a IP_3 .

A avaliação do efeito induzido pelo EEAT sobre a PA e FC em ratos, foi realizada em animais não anestesiados, uma vez que, a anestesia promove alterações nos principais sistemas regulatórios da PA e FC, tais como: o sistema nervoso simpático e barorreflexo (FLUCKIGER et al., 1985; DORWARD et al., 1985), induzindo depressão das sinapses do sistema nervoso central e alterando as respostas autonômicas (KORNER et al., 1968; WHITE; MCRITCHIE, 1973; ZIMPFER et al., 1982).

Em animais normotensos não anestesiados, o EEAT administrado agudamente (i.v.) em doses randômicas, promoveu hipotensão e bradicardia, sendo que tais efeitos foram dependente de dose (Gráfico 1). É interessante ressaltar que na maior dose estudada (50 mg/Kg i.v.), o EEAT promoveu hipotensão e bradicardia intensa e persistente. Uma vez que, vários produtos naturais estudados que promovem hipotensão, o fazem de maneira rápida, entretanto, o efeito induzido pelo extrato demonstra perfil hemodinâmico de promissora atividade para os estudos do mesmo, em modelos de hipertensão. Ambos os efeitos foram reversíveis, sendo que a ação hipotensora foi revertida no tempo menor quando comparada com a ação bradicárdica. (Gráfico 2).

Em coração de mamíferos, a função cardíaca é controlada pelo sistema nervoso simpático e parassimpático. A regulação autonômica primária da função do nodo sinoatrial é por ação parassimpática (vagal) devido a liberação de ACh e

consequente estimulação de receptores muscarínicos cardíacos, que modula a condução atrioventricular, diretamente no átrio ou indiretamente a força de contração nos ventrículos (DHEIN; VAN KOPPEN; BRODDE, 2001). O controle da frequência cardíaca é largamente mediado pelo receptor muscarínico do subtipo M_2 (BRODDE; MICHEL, 1999; ROSSKOPF; MARTIN, 2008). Os receptores muscarínicos M_2 são seletivamente acoplados a proteína G_i/G_o , quando ativados induzem bradicardia intensa seguida de hipotensão, decorrente da queda do débito cardíaco (HULME; BIRDSALL; BUCKLEY, 1990; CAULFIELD, 1993; WESS, 1996). Uma possibilidade de mecanismo de ação para o EEAT seria a ativação dos receptores muscarínicos cardíacos. Com o intuito de verificar a participação destes receptores, utilizou-se atropina, um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (MITCHELSON, 1984). Em ratos normotensos não anestesiados na presença de atropina, as respostas hipotensora e bradicárdica induzidas por EEAT não foram modificadas de maneira significativa (Gráfico 3), sugerindo que o efeito hipotensor e bradicárdico induzido por EEAT não é devido à ativação de receptores muscarínicos.

Algumas drogas clássicas na terapêutica como os bloqueadores de canais de Ca^{2+} , são amplamente utilizados para o tratamento de doenças do sistema cardiovascular, como hipertensão, arritmias cardíacas e desordens vasculares. Como protótipos deste grupo estão: diltiazem (uma benzotiazepina), nifedipina (uma diidropiridina) e verapamil (fenilalquilamina). As diidropiridinas são caracterizados como bloqueadores relativamente seletivos de canais para Ca^{2+} tipo-L no músculo liso vascular, apresentando maior afinidade ao estado inativado do canal, promove hipotensão e taquicardia reflexa (TRIGGLE, 2007). Já as fenilalquilaminas como o verapamil e análogos, são caracterizados como bloqueadores de canais de Ca^{2+} não seletivos, induzem efeitos anti-hipertensivos, promovendo hipotensão e bradicardia, sendo este último atribuído ao efeito cronotrópico negativo induzido por esta droga (HOLLAND, et al., 1999). Com o intuito de avaliar se o EEAT teria uma ação direta no músculo cardíaco, foi utilizado o modelo de átrio direito isolado de rato. Neste modelo verificou-se que o extrato promoveu efeito cronotrópico negativo de maneira dependente de concentração (Gráfico 4). Os resultados obtidos relacionam-se provavelmente com o efeito bradicárdico observado nos experimentos *in vivo*, corroborando, portanto, com a hipótese de um efeito cardíaco direto.

Com o objetivo de verificar se a atividade hipotensora induzida pelo extrato seria pela diminuição da resistência vascular periférica, avaliou-se o efeito do EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos. Este modelo de vaso foi utilizado, por apresentar maior resistência ao fluxo sanguíneo, portanto mais amplamente implicado regulação da PA e perfusão de órgãos, refletindo as alterações da resistência periférica global (MULVANY; AALKJAER, 1990). Constatou-se que, o EEAT promoveu um efeito vasorelaxante de maneira dependente de concentração na presença do endotélio funcional, em anéis pré-contraídos com FEN um agonista α - adrenérgico.

O endotélio vascular é responsável pelo controle de diversas funções celulares e moleculares, incluindo atividade contrátil e proliferativa da musculatura lisa vascular. Portanto, as células endoteliais vasculares têm função vital na regulação e manutenção da homeostase do sistema vascular, exercendo potente efeito regulatório sobre pressão arterial e fluxo sanguíneo local, este processo é mediado via liberação fatores vasoconstritores e FRDEs (GARLAND, et al., 1995; BUSSE et al., 2002). Dentre os fatores relaxantes derivados do endotélio atualmente descritos na literatura, temos o óxido nítrico (NO), prostaglandinas, como as prostaciclina PGI_2 (metabólito do ácido araquidônico), e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio ainda não caracterizado – FHDE, (FELETOU; VANHOUTTE, 2006). Devido à importante influência na modulação da vasodilatação induzida pelos FRDEs, foram realizados experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, na ausência do endotélio funcional, com o intuito de verificar a dependência dos FRDEs no efeito vasorelaxante induzido pelo EEAT. Após a remoção mecânica do endotélio, o efeito vasorelaxante induzido por EEAT não foi alterado de maneira significativa, demonstrando que o vasorelaxamento induzido é independente do endotélio funcional e provavelmente devido a uma ação direta do extrato no músculo liso vascular (Gráfico 5).

Como os resultados anteriores mostraram que o efeito do EEAT independe do endotélio vascular, todos os experimentos *in vitro* seguintes foram realizados em anéis na ausência do endotélio vascular.

Os canais para K^+ contribuem para a regulação do tônus vascular e a ativação destes canais promove vasorelaxamento por hiperpolarização de membrana, devido à diminuição da probabilidade de abertura dos Ca_v e diminuição

dos níveis de Ca^{2+} intracelular. (TANAKA et al., 2000; WELLMAN, et al., 2006). Em contraste, a inibição dos canais para K^+ conduz a uma despolarização de membrana e vasoconstricção. Quatro tipos distintos de canais para K^+ têm sido identificados em músculo liso vascular: o canal para K^+ dependente de voltagem (K_v), canal para K^+ ativado por Ca^{2+} (K_{Ca}), canal para K^+ sensível ao ATP (K_{ATP}), e o canal para K^+ retificador de entrada (Kir) (NELSON; QUAYLE, 1995; STANDEN; QUAYLE, 1998; KO et al., 2008). Cada canal listado anteriormente pode ser modulado por vasoconstritores e vasodilatadores, que podem agir diretamente no canal, ou por meio de proteínas cinases como: proteína cinase C (PKC) e proteína cinase A (PKA), respectivamente. Alterações nas funções dos canais para K^+ estão relacionadas a várias condições patológicas que podem levar à vasoconstricção e desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares (KO et al., 2008).

Com o intuito de se verificar a participação dos canais para K^+ na resposta vasorelaxante induzida pelo EEAT, foi promovido uma curva concentração-resposta, em preparações pré-contraídas com FEN, após o bloqueio parcial do efluxo de K^+ , que foi promovido por uma solução moduladora deste efluxo, KCl 20 mM, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato (CAMPBELL et al., 1996; MENEZES et al., 2007). De acordo com a literatura, drogas que promovam o vasorelaxamento por abertura de canais para K^+ , são menos eficientes, quanto maior for a concentração externa de K^+ , proporcionado pela diminuição do efluxo deste íon na membrana da célula muscular lisa, desta forma atenuando o relaxamento de drogas que promovam a abertura de canais para K^+ (GURNEY, 1994; CLARK; FUCHS, 1997). O gráfico 6 mostra que o vasorelaxamento induzido por EEAT não foi atenuado de forma significativa na presença do KCl 20 mM, quando comparado com o resultado obtido com FEN, sugerindo que provavelmente os canais para K^+ não participam do efeito vasorelaxante induzido pelo extrato.

A fenilefrina (FEN) é um agonista seletivo dos receptores α_1 -adrenérgicos. Estes receptores estão acoplados a proteína $\text{G}_{q/11}$ e promovem a ativação da PLC. Esta enzima catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) em IP_3 e DAG, o IP_3 ativa os receptores do retículo sarcoplasmático (compartimento intracelular de estoque de Ca^{2+}), promovendo a liberação de Ca^{2+} no do citosol. O DAG juntamente com a elevação do Ca^{2+} promove a ativação da PKC. Tal ativação aumenta promove a fosforilação de enzimas envolvidas no processo contrátil, como

a MLCP inibindo. Todos estes eventos levam a contração do músculo liso vascular (MCCARRON et al., 2003; THORNELOE; NELSON, 2005; SALAMANCA; KHALIL, 2005).

Com a finalidade de avaliar o efeito do EEAT sobre as contrações induzidas por FEN, o extrato foi pré-incubado antes da contração cumulativa induzida por este agonista. Observou-se que o EEAT inibiu a contração induzida por este agonista em anéis de artéria mesentérica, de maneira dependente de concentração. Este efeito pode ser atribuído a uma possível inibição do processo contrátil induzido por FEN ou devido à ação antagonista do extrato sobre os receptores α_1 -adrenérgicos (Gráfico 7).

Para verificar uma possível ação antagonista do extrato sobre os receptores α_1 -adrenérgicos, considerando esta uma hipótese para a inibição das contrações induzidas pela adição cumulativa de FEN, foi utilizado outro agente contracturante, o $\text{PGF}_{2\alpha}$, um agonista dos receptores prostanóides que são acoplados a proteína $G_{q/11}$ e promove contração via ativação da via da PLC (SAITO et al., 1999; BOLLA et al., 2004; BOS et al., 2004). Nestas condições experimentais, observou-se que o relaxamento produzido por EEAT em tecidos pré-contraídos com $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi similar ao obtido nos tecidos pré-contraídos com FEN (Gráfico 8). Demonstrando que o extrato promove vasorelaxamento de maneira não seletiva. Possivelmente o efeito relaxante induzido pelo EEAT não está necessariamente associado ao bloqueio α_1 -adrenérgico.

Uma vez caracterizado que o EEAT promove vasorelaxamento frente a diferentes agentes contracturantes, buscou-se avaliar a ação do mesmo, sobre uma despolarização celular. De acordo com a literatura a elevação da concentração de K^+ nas células de músculo liso, promove despolarização de membrana, por abertura dos Ca_v e conseqüente aumento do influxo de Ca^{2+} , promovendo uma contração sustentada (SOMLYO; SOMLYO, 1994; GODFRAIN, 1983; GODFRAIN, 2005). É relatado também que antagonistas que promovam seu efeito por inibição dos Ca_v promovem redução da resposta contrátil e vasorelaxamento nestas condições (GODFRAIN, 2005). Avaliou-se portanto, o efeito do EEAT em anéis pré-contraídos com a solução despolarizante de KCl 80 mM e nestas condições, observou-se que o extrato promoveu relaxamento de maneira dependente de concentração (Gráfico 9). Este resultado é semelhante ao obtido com os demais agentes contracturantes (FEN e $\text{PGF}_{2\alpha}$). Sendo, portanto, um forte indício de que a vasodilatação, possa envolver

um passo comum na via de sinalização celular, visto que os outros agentes contracturantes empregados também promovem aumento citosólico dos níveis de Ca^{2+} (GALICIA et al., 2008). Possivelmente, o mecanismo vasodilatador do EEAT envolva a inibição do influxo de Ca^{2+} através do bloqueio dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem ou inibição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares.

Os Ca_v regulam diversas funções fisiológicas nos sistema cardiovascular e nervoso. Canais para Ca^{2+} são considerados importantes alvos para o tratamento de condições patológicas como epilepsia e hipertensão, além de que significantes esforços estão aumentando para descobrir modernos moduladores de Ca_v (BELARDETTI; ZAMPONI, 2008). Os Ca_v tipo L são bastante relevantes no processo de contração nas células musculares lisas. Caracterizam-se como canais iônicos, os quais uma vez ativados permitem o influxo de Ca^{2+} . A regulação da concentração $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é responsável pela ativação de proteínas que levam a contração muscular (URENA; RODRIGUEZ; BARNEO, 2007; BERRIDGE, 2008). A modulação destes canais induzidas por drogas, torna-se um importante evento no estudo do relaxamento do músculo liso vascular.

Dentre os Ca_v , encontram-se os canais para cálcio ativados por alta voltagem, Ca_v 1.1-1.4 (tipo-L), Ca_v 2.1-2.3 (tipo P/ Q, N e R, respectivamente), e os Ca_v ativados por baixa voltagem Ca_v 3.1-3.3 (tipo-T). Entretanto na célula muscular lisa vascular (CMLV), os subtipos encontrados são os Ca_v -L e o Ca_v -T, dentre os quais o Ca_v -L, é o subtipo dominante na atividade do sistema cardiovascular, enquanto Ca_v -T pouco contribui (McDONOUGH, 2004; DOERING, et al 2006; TRIGGLE, 2007). Dentre os subtipos de Ca_v -L, o tipo Ca_v 1.2 é o principal Ca_v encontrado na célula muscular lisa vascular (CATTERALL et al., 2005; SONKUSARE et al., 2006; TRIGGLE, 2007).

Para verificar a hipótese de que o extrato estaria inibindo o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v , avaliou-se o efeito induzido por EEAT, em diferentes concentrações, sobre contrações induzidas pela adição cumulativa de CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} . Nestas condições, observou-se que o EEAT efetivamente promoveu uma inibição do influxo de Ca^{2+} , pois antagonizou de maneira dependente de concentração, as curvas concentrações-respostas induzidas pelo CaCl_2 , havendo um deslocamento das mesmas para a direita de maneira não-paralela, e com inibição do efeito máximo (Gráfico 10). Este resultado sugere

que o efeito inibitório do influxo de Ca^{2+} induzido pelo EEAT em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pode ser atribuído, em parte, a um bloqueio dos Ca_v na membrana do músculo liso vascular.

Com o intuito de avaliar o subtipo de Ca_v envolvido na inibição do influxo de Ca^{2+} promovido pelo EEAT, realizou-se experimentos na presença do BayK 8644 (0,1 μM) um ativador de Ca_v1 tipo-L (McDONALD et al., 1994; YAMAGUCHI et al., 2003) que induz contração do músculo liso de maneira dependente de concentração relativamente pequena, entretanto tornam-se mais pronunciadas, por meio da moderada elevação do potencial de membrana, podendo esta modulação ocorrer na presença de uma solução de potássio KCl 20 mM. (BARRÚS et al., 1996; DAVIE; KUBO; STANDEN, 1998). O gráfico 11 mostra que o EEAT promoveu vasorelaxamento dependente de concentração, em anéis mesentéricos pré-contraídos com Bay K8644. Esses dados sugerem o envolvimento dos Ca_v tipo-L na resposta vasorelaxante induzida pelo EEAT. Sendo resultados relevantes, pois corroboram com os resultados obtidos com KCl 80 mM e CaCl_2 que evidenciam a influência do EEAT sobre os Ca_v . Entretanto a possibilidade do extrato promover inibição do influxo de Ca^{2+} por agir diretamente ou indiretamente no Ca_v é um questionamento que requer futuras investigações.

Um mecanismo universal de sinalização do Ca^{2+} é a liberação dos compartimentos intracelulares, sendo o RS o compartimento primordial, a partir do qual, o Ca^{2+} pode ser liberado em muitas células excitáveis. A ativação destes estoques ocorre via dois tipos de canais iônicos, rianodina (RyR) e o sensível ao IP_3 - IP_3R (LAPORTE; HUI; LAHER, et al., 2004; FLOYD; WRAY, 2007). O IP_3R é o canal de liberação de Ca^{2+} predominante no RS do músculo liso (CHALMERS et al., 2007). Importantes processos envolvidos no acoplamento da atividade contrátil são atribuídos a modulação da liberação de Ca^{2+} pelos estoques. (LAPORTE; HUI; LAHER, et al., 2004).

O envolvimento da possível inibição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis a IP_3 no vasorelaxamento induzido pelo EEAT foi verificado, através de experimentos em meio livre de Ca^{2+} , nos quais foram promovidas contrações transientes induzidas por FEN. Nestas condições, estas contrações são mediadas apenas pela liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. A ativação dos receptores α_1 na célula do músculo liso vascular, induzida pela FEN, promove a

formação de IP₃ via PLC. O IP₃ liga-se aos receptores do retículo sarcoplasmático IP₃R (compartimento intracelular de estoque de Ca²⁺), que são canais catiônicos não seletivos que conduzem íons Ca²⁺, uma vez ativados podem promover a liberação de Ca²⁺ no citosol (KARAKI, et al., 1997; CALPHAM, 2007). Na presença do EEAT, observou-se que as contrações transientes induzidas por FEN em meio livre de Ca²⁺ foram inibidas de maneira dependente de concentração, sugerindo que o EEAT promove inibição da liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares sensíveis a IP₃, ou por ação direta nos estoques sensíveis a IP₃ e/ou por modulação na formação do IP₃ da via da PLC. Podendo este mecanismo está contribuindo para o efeito vasorelaxante induzido pelo extrato. (Gráfico 12).

O aumento na concentração de Ca²⁺ liberado pelo retículo sarcoplasmático, pode ativar um canal de Ca²⁺ distinto, o canal operado por receptor de rianodina que quando ativado promove a liberação adicional do íon Ca²⁺ do RS (CALPHAM, 2007). Os receptores de rianodina podem ser ativados por cafeína, que promove um aumento da sensibilidade deste receptor ao Ca²⁺ (LAPORTE et al., 2004).

Sabendo-se da contribuição do canal de rianodina na liberação de Ca²⁺ do RS, realizaram-se experimentos, promovendo contrações transientes pela ativação dos receptores de rianodina, utilizando a CAF um agonista do receptor de rianodina, em meio livre de Ca²⁺. Este experimento foi realizado na ausência (controle) e presença de EEAT e observou-se que o extrato na maior concentração (300 µg/ml), não foi capaz de inibir a contração transiente induzida por CAF em meio livre de Ca²⁺ (Gráfico 13). Dessa forma, provavelmente, o EEAT não promove a inibição da liberação de Ca²⁺ dos estoques sensíveis a rianodina, sugerindo que a inibição da liberação de Ca²⁺ dos estoques induzida pelo EEAT é seletiva aos receptores sensíveis ao IP₃.

Os efeitos promovidos pelo EEAT no sistema cardiovascular em ratos estão de acordo com alguns dados da literatura que reportam ação hipotensora e vasorelaxante de espécies do gênero *Aspidosperma* e de substâncias isoladas desta espécie. Em relação aos compostos encontrados no extrato etanólico desta planta, pode-se inferir que a expressiva presença de flavonóides pode estar contribuindo para a atividade apresentada. É relatado que flavonóides como rutina, quercetina e apigenina promovem vasorelaxamento por inibição do influxo de Ca²⁺ e flavonóides do tipo flavonas e flavonóis inibem a liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares (CHAN, et al., 2000).

Estes resultados obtidos sugerem que o EEAT promove efeito hipotensor e bradicárdico, sendo o efeito hipotensor atribuído a redução da resistência vascular periférica por inibição do influxo de Ca^{2+} e diminuição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis a IP_3 . O estudo das atividades biológicas de *Aspidosperma tomentosum* Mart. sobre o sistema cardiovascular é inédito, e a relevância destes resultados contribui de forma significativa para os estudos do gênero *Aspidosperma* e da família Apocynaceae.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES:

No estudo dos efeitos cardiovasculares em ratos induzido pelo extrato etanólico bruto, obtidos das cascas do caule de *Aspidosperma tomentosum* Mart, conclui-se que:

- O EEAT possui atividade hipotensora e bradicárdica em ratos normotensos não-anestesiados, sendo este efeito independente da participação dos receptores muscarínicos, e a bradicardia devido ao efeito cronotrópico negativo.
- O EEAT promove vasorelaxamento em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, provavelmente devido ao bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos $\text{Ca}_v\text{-L}$.
- O outro fator que contribui para o efeito vasorelaxante é a inibição da liberação de Ca^{2+} através dos estoques intracelulares sensíveis à IP_3 .

PERSPECTIVAS



8 PERSPECTIVAS

- Avaliar os efeitos induzidos pelo EEAT, frações, fases e substâncias isoladas:

Em estudos *in vivo*:

- Estudos de toxicidade
- O Efeito em animais Hipertensos (SHR e/ou 2R-1C)
- O Efeito do tratamento crônico em animais hipertensos.

Em estudos *in vitro*:

- Avaliar o efeito inotrópico
- A participação das proteínas cinases PKA, PKG, PKC
- Avaliar a participação em outras vias de sensibilização do aparato contrátil.
- A participação da SERCA
- A participação da Na/K ATPase
- Caracterizar por meio de técnicas eletrofisiológicas, o efeito sobre as correntes de Ca^{2+} através dos Ca_v-L , e o potencial de membrana, em miócitos de rato, utilizando para tanto a técnica de Patch-Clamp.
- Experimentos bioquímicos para medida intracelular de Ca^{2+} , utilizando a técnica fluorimétrica de determinação de Ca^{2+} (FURA2-AM).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AIMI, N.; UCHIDA, N.; OHYA, N.; HOSOKAWA, H.; TAKAYAMA, H.; SAKAI, S. Novel indole alkaloids from cell suspension cultures of *Aspidosperma quebracho blanco* schlecht. **Tetrahedron Lett**, v. 32, n.37, p. 4949-4952, 1991.
- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **Amerian Journal of Physiology**, v. 219, p. 1698-1705, 1970.
- ATLAS, S. A. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. **Supplement to Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 13, n. 8, p. s9-s20, 2007.
- BARRÚS, M. T.; REVIRIEGO, J.; MARÍN, J. Effect of the Ca²⁺-channel agonist Bay K 8644 on the contractile responses in human placental veins. **Journal Auton Pharmacology**, v. 16, n.3, p. 161-167, 1996.
- BELARDETTI, F.; ZAMPONI, G. W. Calcium-channel isoforms to potential therapies. **Current opinion in investigational drugs**, v. 9, n. 7, p. 707-715, 2008.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Hemodinâmica Cardíaca**. In: BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STATION, B. A. Fisiologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. Cap. 14, p. 275-286 2004.
- BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of Physiology**, n. 21, p. 5047-5061, 2008.
- BOLLA, M.; YOU, D.; LOUFRANI, L.; LEVY, B. I.; TOLEDANO, S. L.; HABIB, A.; HENRION, D. Cyclooxygenase involvement in thromboxane-dependent contraction in rat mesenteric resistance arteries. **Hypertension**, v. 43, n.6, p.1264–1269, 2004.
- BOS, C. L.; RICHEL, D. J.; RITSEMA, T.; PEPPELENBOSCH, M. P.; VERSTEEG, H. H. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. **The Internacional Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v. 36, p. 1187-1205, 2004.
- BOURDY, G.; OPORTO, P.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 269–277, 2004.

BRANDÃO, M. G. L.; GRANDI, T. S. M.; ROCHA, E. M. M.; SAWYER, D. R.; KRETTLI, A. U. Survey of medicinal plantas used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p.175, 1992.

BRODDE, O. E.; MICHEL, M. C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. **Pharmacology Reviews**, v. 51, p.651-690, 1999.

BUSSE, R.; EDWARDS, G.; FELETOU, M.; FLEMING, I.; VANHOUTTE, P. M.; WESTON, A. H. EDHF: bringing the concepts together. **Trends Pharmacology of Science**, v. 23, p. 374–380, 2002.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 22, p.162-195, 2008.

CAIN, A. E.; KHALIL, R. A. Pathophysiology of essential hypertension: role of the pump, the vessel, and the kidney. **Semin Nephrology**, v. 22, n.1, p. 3-16, 2002.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131-134, 2005.

CALPHAM, D. E. Calcium signaling. **Cell**, v. 14, p. 1047-1058, 2007.

CAMARGO, A. C. M. DROGA Mercadoria ou medicamento?. **Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n 4, p. 30-45, 2005.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos caridovasculares e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, 8: 30-40, 2001.

CAMPBELL, D. G.; HAMMOND, H. D.; Floristic Inventory of Tropical Countries: The Status of Plant systematics, Collections, and Vegetation, plus Recommendations for the Future, NY **Botanical Garden**: New York, 1989.

CAMPBELL, W.B.; GEBREMEDHIN, D.; PRAIT, P. F.; HERDER, D. R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circulation Research**, v. 78, p. 415-423, 1996.

CAMPOS, A. R.; LIMA JR, R.C.P.; UCHOA, D. E.A.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 104 p. 240–244, 2006.

CARVALHO, A. P.; COSTA, A. F. **Circulação e respiração: Fundamentos de Biofísica e Fisiologia**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1979.

CATERRALL, W. A.; PERES-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. **Pharmacological Reviews**, v.57, n.4, p. 411-425, 2005.

CAULFIELD, M. P. Muscarinic receptors: characterization, coupling and function. **Pharmacology Therapeutics**, v.58, p. 323-31, 1993.

CHALMERS, S.; OLSON, M. L.; MACMILLAN, D.; RAINBOW, R. D.; McCARRON, J. G. Ion channels in smooth muscle: Regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria. **Cell Calcium**, v. 42, p. 447-466, 2007.

CHAN, E. C.; PANNANGPETCH, P.; WOODMAN, O. I. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 35, p. 326-333, 2000.

CHIN, Y. W.; BALAUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. **Journal of Automated Methods & Management in Chemistry**, v. 8, p.E239-E253, 2006.

CHOBANIAN, A. V. *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.

CLARK, S. G.; FUCHS, L. C. Role of nitric oxide and Ca⁺⁺-dependent K⁺ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, n. 3, p. 1473-1479, 1997.

CODY, R. J. The sympathetic nervous system and the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiovascular disease. **American Journal of Cardiology**, v. 80, p. 9J-14J, 1997.

COELHO, F. B. R.; DALBELO, C. A.; LOLIS, S. Levantamento Etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 52-55, 2005.

COLLIER, M. L.; WANG, Ji. Y.; KOTLIKOFF, M. I. Calcium induced calcium release in smooth muscle: loose coupling between the action potential and calcium release. **The Journal of General Physiology**, v. 115, n.5, p. 653-662, 2000.

CORRÊA, M. P.; **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1926.

CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; SERUR, L. M. Alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. **Phytochemistry**, v.22, n.6, p. 1526-1528, 1983.

DAVIE C.S.; KUBO, M.; STANDEN, N.B. Potassium channel activation and relaxation by nicorandil in rat small mesenteric arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, p. 1715-1725, 1998.

DEFER, N.; BEST-BELPOMME, M.; HANOUNE, J. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 279, p. F400-F416, 2000.

DEUTSCH, H. F.; EVENSON, M. A.; DRESCHER, P.; SPARWASSER, C.; MADSEN, P. O. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source **Journal of Pharmaceutical and Biomedecinal Analysis**, v. 12, n.10, p.1283-1287, 1994.

DHEIN, S.; VAN KOPPEN, C. J.; BRODDE, O-E. Muscarinic receptors in the mammalian heart. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 3, p. 161-132, 2001.

DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. **Journal Science Food Agriculture**, v. 80, n.12, p. 1744-1756, 2000.

DOERING, C.; ZAMPONI, G.; CALCIUM CHANNELS. IN: TRIGGLE DJ, GOPALAKRISHNAN M, RAMPE D, ZHENG W, editors. Overview of voltage-gated calcium channels. Voltage-gated ion channels as drug targets. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, p. 65-83, 2006.

DORWARD, P. K.; RIEDEL, W.; BURKE, S. L.; GIPPS, J.; KORNER, P. J. The renal sympathetic baroreflex in the rabbit. Arterial and cardiac baroreceptor influences, resetting, and effects of anesthesia. **Circulation Research**, v. 57, p. 618-633, 1985.

ELISABETSKY, E. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre, Florianópolis: Editora da UFRGS, Editora da UFSC, cap. 6, p.91-99, 2001.

EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; DISCIGIL, B.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Endotélio e óxido nítrico: História, fisiologia e as primeiras observações relacionadas com a hipertensão arterial. **Hiper. Ativo**, v. 2, n. 2, p. 1-20, 1995.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTE. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. Where Are We Now?. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.29, n.6, p.1-11, 2006.

FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; GOBBI-FILHO, L.; PINTO, L. H. B.; OLIVEIRA, A. J. B.; **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 325, 2004.

FLOYD, R.; WRAY, S. Calcium transporters and signaling in smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 42, p. 467-476, 2007.

FLUCKIGER, J. P.; SONNAY, M.; BOILLAT, N.; ATKINSON, J. Attenuation of baroreceptor reflex by general anesthetic agent in the normotensive rat. **European Journal of Pharmacology**, v.109, p. 105-109, 1985.

FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A., **Principles of Medicinal Chemistry**, 4th ed., Williams & Wilkins: Media, 1995.

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

GALICIA, V. J.; ORTIZ-ANDRADE, R.; CASTILLO-ESPAÑA, P.; IBARRA-BARAJAS, M.; GALLARDO-ORTIZ, I.; VILLALOBOS-MOLINA, R.; ESTRADA-SOTO, S. Antihypertensive and vasorelaxant activities of *Laelia autumnalis* are mainly through calcium channel blockade. **Vascular Pharmacology**, v. 49, p. 26–31, 2008.

GARLAND, C.; PLANE, F.; KEMP, B.; COCKS, T. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16, p. 23-30, 1995.

GILBERT, B. Um estudo fitoquímico do gênero *Aspidosperma*. **Annais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 38, p. 315-319. INPA, 1966.

GODFRAIN, T. Actions of nifedipine on calcium fluxes and contraction in isolated rat arteries. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 224, n.2, p. 443-450, 1983.

GODFRAIN, T. Antioxidant effects and the therapeutic mode of action calcium channel blockers in hypertension and atherosclerosis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B**, v. 360, p. 2259-2272, 2005.

GOMES, S. M. *Aspidosperma* Mart. et Zucc. (Apocynaceae) no Distrito Federal, Brasil e caracteres para o aprimoramento da taxonomia do gênero, 1997. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 1997.

GRYNBERG, A. Hypertension prevention: from nutrients to (fortified) foods to dietary patterns. Focus on fatty acids. **Journal of Human Hypertension**, v. 19, p. S25–S33, 2005.

GURNEY, A. M. Mechanisms of Drug-induced vasodilation. **The of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n.4, p. 242-251, 1994.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of pressure. **Nature**, v. 7, p. 335-346, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**, 10 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002.

HARVEY A. Strategies for the discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 294-300, 2000.

HARVEY, A. L. *Natural Product Pharmaceuticals: A Diverse Approach to Drug Discovery* Richmond, Surrey, UK: PJB Publications; 2001.

HARVEY, A. L. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.11, p.480-484, 2007.

HILL M, A.; DAVIS, M. J.; MEININGER, G. A.; POTOČNIK, S. J.; MURPHY, T. V. Arteriolar myogenic signalling mechanisms: Implications for local vascular function. **Clinical Hemorheology Microcirculation**, v. 34, p. 67–79, 2006.

HOLLAND, L. H.; GU, J. X.; ORALLO, F.; CAMINA, M.; FABEIRO, P.; WILLETTS, J. A. Enantioselective synthesis and pharmacological evaluation of a new type of verapamil analog with hypotensive and calcium antagonist activities. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 2, p. 281-288, 1999.

HULME, E. C.; BIRDSALL, N. J. M.; BUCKLEY, N. J. Muscarinic receptor subtypes. **Ann Review Pharmacology and Toxicology**, v.30, p.633-673, 1990.

ISHIKAWA, Y.; HOMCY, C. J. The adenylyl cyclases as intergrators of transmembrane signal transduction. **Circulation Research**, v. 80, p. 297–304, 1997.

KANNEL, W. B. Elevated Systolic Blood Pressure as a Cardiovascular Risk Factor. **The American journal of cardiology**, v. 81, p.251-255, 2000.

KANSAL, V. K.; POTIER, P. The biogenetic, synthetic and biochemical aspects of ellipticine, an antitumor alkaloid. **Tetrahedron**, v. 42, n.9, p. 2389-2408, 1986.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.-I.; HARADA, K.-I.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K.-J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacology Reviews**, v. 49, n. 2, p. 157-230, 1997.

KAREMAKER, J. M.; WESSELING, K. H. Variability in cardiovascular control: the baroreflex reconsidered. **Cardiovascular Eng**, v. 8, p. 23-29, 2008.

KEARNEY, P. M. *et al.* Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, n. 9455, p.217-223, 2005.

KO, E. A.; HAN, J.; JUNG, I. D.; PARK, W. S. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells, **Journal of Smooth Muscle Res**, v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008.

KOHN, L. K. ; PIZÃO, P. E. ; FOGLIO, M. A. ; ANTÔNIO, M. A. ; AMARAL, M. C. E. ; BITTRIC, V. ; CARVALHO, J. E. Antiproliferative activity of crude extract and fractions obtained from *Aspidosperma tomentosum* Mart. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 8, p.110-115, 2006.

KORNER, P. I.; LANGSFORD, G.; STARR, D.; UTHER, J. B.; WARD, W.; WHITE, S. W. The effects of chloralose-urethane and sodium pentobarbitone anesthesia on the local and autonomic components of the circulatory response to arterial hypoxia. **Journal of Physiology. (Land)**, v.199, p. 283-302, 1968.

LAPORTE, R.; HUI, A.; LAHER, I. Pharmacological Modulation of Sarcoplasmic Reticulum Function in Smooth Muscle. **Pharmacology Review**, v. 56, p. 439–513, 2004.

LEDOUX J.; WERNER, M.E.; BRAYDEN, J .E.; NELSON, M.T. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. **Physiology**, v. 21, p. 69-78, 2006.

LOTUFO, P. A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 123, n. 1, p. 3-4, 2005.

LOPES, J. N. C.; LOPES, J. L. C.; VICHNEWSKI, W.; NASI, A. M. T. T. & SOUZA, C. P. Preliminary screening of brasilian plant extracts for molluscicidal activity. **Planta Medica**, v. 55, n.4, p. 388, 1989.

LYON, R. L.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; SVOBODA, G. H. Biological and phytochemical evaluation of plants. XI. Isolation of aspidospermine, quebrachidine, rhazinilam, (-)-pyrifolidine, and akuammidine from *Aspidosperma quebracho-blanco* (Apocynaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.62, n 11, p. 218-221, 1973a.

LYON R, L.; FONG, H. H.; FARNSWORTH, N. R. Biological and phytochemical evaluation of plants. XII. Isolation of acetylakuammidine from *Aspidosperma quebracho-blanco* leaves. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.62, n. 5, p.833, 1973b.

LUCAS, K. A.; PITARI, G. M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K. P.; WALDMAN, S. A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacology Review**, v. 52, p. 375-414, 2000.

MARCONDES-FERREIRA, W.; KINOSHITA, L. S. Uma nova divisão infragenérica para *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 19, n.2, p. 203-214, 1996.

MARK, D. B.; VAN DE WERF, F. J.; SIMES, R. J.; WHITE, H. D.; WALLENTIN, L. C.; CALIFF, R. M. Cardiovascular disease on a global scale: defining the path forward for research and practice. **European Heart Journal**, v. 28, p. 2678–2684, 2007.

MCCARRON, J. G.; BRADLEY, K. N.; MACMILLAN, D.; MUIR, T. C. Sarcolemma agonist induced interactions between InsP_3 and ryanodine receptors in Ca^{2+} oscillations and waves in smooth muscle. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 920–924, 2003.

MCDONOUGH, S. I. Editor. Calcium channel pharmacology. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2004.

MCHALE, N.; HOLLYWOOD, M.; SERGEANT, G.; THORNBURY, K. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. **Journal of Physiology**, v. 570, p.23-28, 2006.

MCNEILL, R. R.; JURGENS, T. N. A systematic review of mechanisms by which natural products of plant origin evoke vasodilatation. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 84, p. 803-821, 2006.

MCDONALD, T.F.; PELZER, S.; TRAUTWEIN, W.; PELZER, D.J. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. **Physiology Review**, v. 74, p. 365–507, 1994.

MATSUMOTO, T.; KOBAYASHI, T.; KAMATA, K. Phosphodiesterases in the vascular system. **Journal Smooth Muscle Research**, v. 39, p. 67–86, 2003.

MATSUMOTO, T.; WAKABAYASHI, K.; KOBAYASHI, T.; KAMATA, K. Functional changes in adenylyl cyclases and associated decreases in relaxation responses in mesenteric arteries from diabetic rats. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n.5, p. H2234–H2243, 2005.

MAURICE, D. H.; PALMER, D.; TILLEY, D. G.; DUNKERLEY, H. A.; NETHERTON, S. J.; RAYMOND, D. R.; ELBATARNY, H. S.; JIMMO, S. L. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. **Molecular Pharmacology**, 64: 533–546, 2003.

MENEZES, I. A.C.; MOREIRA, I. J. A.; CARVALHO, A, A.; ANTONIOLLI, A, R.; SANTOS M. R. V. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, v. 47, p.41-47, 2007.

MESQUITA M.L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 110, p. 165–170, 2007.

MISSIAEN, L.; WUYTACK, F.; RAEYMAEKERS, L.; DE SMEDT, H.; DROOGMANS, G.; DECLERCK, I.; CASTEELS, R. Ca^{2+} extrusion across plasma membrane and Ca^{2+} uptake by intracellular stores. **Pharmacology and Therapeutics**, v.50, p.191-232, 1991.

MITAINE-OFFER, A.-C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLI'E, M.; Z'ECHES- HANROT, M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. **Phytomedicine**, v. 9, p. 142-145, 2002.

MITCHELSON, F. Heterogeneity in muscarinic receptors: evidence from pharmacological studies with antagonists. **Trends Pharmacology Science**, v. 5, p. 12-16, 1984.

MULVANY, M. J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. **Physiology Research**, v. 70, p.921-951, 1990.

NASA, Y.; ICHIHARA, K.; YOSHIDA, R.; ABIKO, Y. Positive inotropic and negative chronotropic effects of (-)-cis-diltiazem in rat isolated atria. **British Journal of Pharmacology**, v. 105, n. 3, p. 696-702, 1992.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. C799–C822, 1995.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **Journal Natural Products**, v. 66, p.1022-1037, 2003.

OATES, J. A.; BROWN, N. J. **Anti-hipertensivos e terapia farmacológica da hipertensão**. In: Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: Editora McGraw-Hill. Cap. 32, p.657-678, 2003.

OLIVEIRA, F. Q.; JUNQUEIRA, R. G.; STEHMANN, J. R.; BRANDÃO, M. G. L. Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na bibliografia etnomédica brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.5, n.2, p. 23-31, 2003.

OLIVEIRA, M.J.R.; SIMÕES, M.J.S.; SASSI, C.R.R. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.2, p.39-41, 2006.

PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P., ALCÂNTARA, A. F. DE C., ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (APOCYNACEAE). **Quimica Nova**, v. 30, n. 4, p. 970-983, 2007.

PFITZER, G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle, **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 497-503, 2001.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Quimica Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.

PUSGLEY, M. K.; TABRIZCHI, R. The vascular system an overview of structure and function. **Journal of Pharmacological and toxicological Methods**, v. 40, p. 333-340, 2000.

RAFFAUF, R. F. Some chemotaxonomic considerations. **Lloydia**, v. 27, n.4, p. 286-298, 1964.

REMBOLD, C. M. Eletromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány, M. Biochemistry of smooth contraction. San Diego: **Academic Press**, p. 227-239, 1996.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C.; Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central, INPA: Manaus, 1999.

ROBERT, G. M. T.; AHOND, A.; POUPAT, C.; POTIER, P.; JOLLES, C.; JOUSSELIN, A. *Aspidosperma* de Guyane: alcaloides d'*Aspidosperma markgravianum*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n.5, p. 694-707, 1983.

RODRIGUES, C. R. B.; OLIVEIRA, I. L.; KOVALESKY, L. Conhecimento tradicional associado, patrimônio genético e pesquisa de novos fármacos. **Congresso Internacional**, Ponta Grossa, 2007.

ROSSKOPF, D.; MICHEL, M. C. Pharmacogenomics of G Protein-Coupled Receptor Ligands in Cardiovascular Medicine. **Pharmacology Review**, v. 60, p. 513–535, 2008.

SAITO, R.; HANDA, K.; TANAKA, S.; FUKUMITSU, A.; HONDA, K.; TAKANO, Y.; KAMYIA, H. Biphasic relaxation caused by electrical field stimulation of the mesenteric arteries of rats. **Japan journal of Pharmacology**, v. 80, p. 169-172, 1999.

SALAMANCA, D. A.; KHALIL, R. A. Protein kinase C as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, p. 1537-1547, 2005.

SAKATA, K.; KARAKI, H., Effects of a novel smooth muscle relaxant, KT-362, on contraction on cytosolic Ca^{2+} level in the rat aorta. **British Journal of Pharmacology**, v. 102, p. 147-178, 1991.

SCHUBERT, R.; LINDINGTON, D.; BOLZ, S. S. The emerging role of Ca^{2+} sensitivity regulation in promoting myogenic vasoconstriction. **Cardiovascular Research**, v. 77, p. 8-18, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 89, n.3, p.e24-e79, 2007.

SNEADER, W. Drug Prototypes and their Exploitation. Chichester, UK: Wiler, 1996.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II : modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiology Review**, v. 83, p. 1325-1358, 2003.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **Journal of Physiology**, v. 522, p. 177-185, 2000.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Smooth muscle: excitation-contraction coupling, contractile regulation, and the cross-bridge cycle. **Alcohol Clinical Experimental Research**, v.18, p.138-143, 1994.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A.V. Signal transduction and regulation im smooth muscle. **Nature**, v. 372, p. 231-236, 1994.

SONKUSARE, S.; PALADE, P. T.; MARSH, J. D.; TELEMAQUE, S.; PESIC, A.; RUSCH, N. J. Vascular calcium channels and high blood pressure: **Pathophysiology and therapeutic implications a Vascular Pharmacology**, v. 44, p. 131-142, 2006.

SPERLING, H.; LORENZ, A.; KREGE, S.; ARNDT, R.; MICHEL, M.C. An extract from the bark of *Aspidosperma quebracho blanco* binds to human penile alpha-adrenoceptors. **Journal of Urology**, n. 168, p. 160–163, 2002.

STANDEN, N.B.; QUAYLE, J. M. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. **Acta Physiol.Scand**, v.164, p.549–557, 1998.

STEVENS, P. F., 2001. **Angiosperm Phylogeny Website. Version 7**. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em Fevereiro de 2009.

TANAKA, Y.; IGARASHI, T.; KANEKO, H.; YAMAKI, F.; MOCHIZUKI, Y.; AIDA, M.; TANIGUCHI, H.; TANAKA, H.; SHIGENOBU, K. NO-mediated Maxi K (Ca) channel activation produces relaxation of guinea pig aorta independently of voltage-dependent L-type Ca²⁺ channels. **General Pharmacology**, v. 34, p. 159–165, 2000.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; SHIGENOBU, K. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 1602-1608, 1999.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, p. 215–242, 2005.

TÖRÖK, J. Participation of Nitric Oxide in Different Models of Experimental Hypertension. **Physiology Research**, v.57, p. 813-825, 2008.

TRIGGLE, D. J. Calcium channel antagonists: Clinical uses—Past, present and future. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, p.1-9, 2007.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, 2006.

URENA, J.; VALLE-RODRIGUEZ, A.; BARNEO, J. L. Metabotropic Ca^{2+} channel-induced calcium release in vascular smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 42, p. 513-520, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MARCIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v.28, n.3, 2005.

VORA, C. K.; MANSOOR, G. A. Herbs and alternative therapies: relevance to hypertension and cardiovascular diseases. **Current Hypertension Reports**, v. 7, n.4, p.275-280, 2005.

WALDMAN, S. A.; MURAD, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacology Review**, v. 39, p. 163-196, 1987.

WANG, C.; YU, Y.; LAI, L.; CUI, Y.; WANG, X.; WANG, R. Cardiovascular responses to intrathecal administration of endomorphins in anesthetized rats. **Peptides**, v. 28, n 4, p. 871-877, 2007.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, p. 201-206, 2003.

WELLMAN, G. C. Ion channels and calcium signaling in cerebral arteries following subarachnoid hemorrhage. **Neurology Research**, v. 28, p. 690-702, 2006.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plantas. **Journal Ethnopharmacology**, v.78, n.2-3, p. 193-200, 2001.

WESS J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. **Critical Review Neurobiology**, v. 10, p. 69-99, 1996.

WHITE, S. W.; McRITCHIE, R. J. Nasopharyngeal reflexes: Integrative analysis of evoked respiratory and cardiovascular effects. **The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 51, p. 17-31, 1973.

ZIMPFER, M.; MANDERS, W. T.; BARGER, A. C.; VATNER, S. F. Pentobarbital alters compensatory neryribak humoral mechamism in response to hemorrhage. **American Journal of Physiology**, v. 243, p. H713-H721, 1982.

YAMAGUCHI, S.; ZHOROV, B. S.; YOSHIOKA, K.; NAGAO, T.; ICHIJO, H.;ADACHI-AKAHANE, S. Key roles of Phe1112 and Ser1115 in the pore-forming IIIS5-S6 linker of L-type Ca^{2+} channel α_{1C} subunit (Ca_V 1.2) in binding of dihydropyridines and action of Ca^{2+} channel agonists. **Molecular Pharmacology**, v. 64, p. 235–248, 2003.

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](#)