

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

**MARIA ANGÉLICA SÁTYRO GOMES**

**ESTUDO DOS EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE  
*Ruellia asperula* Lindau. SOBRE O SISTEMA  
CARDIOVASCULAR EM RATOS**

**JOÃO PESSOA – PB  
2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**MARIA ANGÉLICA SÁTYRO GOMES**

**ESTUDO DOS EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE  
*Ruellia asperula* Lindau. SOBRE O SISTEMA  
CARDIOVASCULAR EM RATOS**

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadja de Azevêdo Correia**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**

**João Pessoa – PB**  
**2009**

**MARIA ANGÉLICA SÁTYRO GOMES**

**ESTUDO DOS EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE  
*Ruellia asperula* Lindau. SOBRE O SISTEMA  
CARDIOVASCULAR EM RATOS**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadja de Azevêdo Correia  
Orientadora**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Katy Lisias Gondim Dias  
Examinadora externa**

---

**Prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos  
Examinador externo**

# *Dedicatória*

*Minha dedicatória é não só para aqueles que estiveram comigo durante a realização deste trabalho, mas a todas aquelas pessoas que me fizeram a pessoa que sou hoje:*

*Aos meus amados avós maternos **Miguel** (*in memoriam*) e **Dasdores** (*in memoriam*) que foram e serão sempre para mim os maiores exemplos de amor.*

*À minha família, **Marcos** e **Maria Helena** pela compreensão, amor e atenção que tiveram comigo, sempre me apoiando em todos os momentos e me dando alegria e força para superar os obstáculos.*

*Aos meus pais, **Lúcia** e **Gutemberg**, que me formaram com muito amor, ensinando-me sempre o caminho certo para seguir e me acolhendo e confortando nos momentos mais difíceis.*

*Ao meu irmão, **Allan**, pelo companheirismo e amor a mim dedicados.*

*Aos meus lindos avós paternos, **Shirley** e **José de Souza**, por me ensinarem tantas lições de vida e me incentivarem sempre a buscar o crescimento.*

*Às minhas amadas tias **Maria de Lourdes**, **Sirleide** e **Marta**, sem as quais eu não teria chegado até aqui.*

# *Agradecimientos*

A Deus que me criou e por amor me concedeu as graças de ter saúde, paz e felicidade e colocou ao meu lado pessoas que sempre me ajudaram a trilhar os caminhos certos. Com seu amor infinito me faz sempre olhar para frente e enxergar as maravilhas do mundo e a graça de viver em seu amor. Eu te agradeço Senhor pela minha vida, por tudo que sou e tenho.

À Islania Giselia Albuquerque Araújo, minha grande amiga e companheira que esteve sempre ao meu lado com carinho e dedicação, me ajudando e dando força para continuar. Você é exemplo não só de pesquisadora, mas de ser humano.

À minha orientadora, Nadja de Azevêdo Correia por ter me acolhido como sua orientanda e contribuído para a realização deste trabalho, orientando-me no desenvolvimento do mesmo fazendo com que se tornasse realidade. Agradeço por ser a pessoa tão justa, competente e honesta.

Ao meu co-orientador, Isac Almeida de Medeiros que desde a iniciação científica me recebeu em seu laboratório e me ensinou os primeiros passos da pesquisa, formando-me como pesquisadora, com honestidade, dedicação e carinho.

À Ericelle, Carminha e Kívia que com dedicação participaram diretamente deste trabalho, ajudando-me sempre. Vocês foram peças fundamentais para que este trabalho se concretizasse.

À professora Darízy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos pelas contribuições neste trabalho e pela amizade e atenção.

A Daniel Marcelo Silva Magalhães pela participação na realização deste trabalho, pela amizade e pelo exemplo de amor à profissão e respeito ao ser humano.

Ao professor José Maria Barbosa pelo extrato cedido.



À professora Maria de Fátima Agra pela identificação da planta.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: Abraão, Aldeídia, Ápio, Aurylene, Bruna, Camila, Carol, Couras, Fabíola, George, Júnior, Karla, Leônidas, Melissa, Mônica, Raline, Renata, Robson, Thaís Jôsy, Thaís Porto, Tiago, pela amizade, companheirismo e pelas contribuições científicas.

À minha turma de mestrado Aaron, Ana Lúcia, Ana Karina, Daniel, Fábio, Fabíola, Gláucia, Kelly, Mariane, Meri Emili, Naiana, Solange, Vicente, pela amizade, pelos sorrisos, e pelas discussões e pelas dificuldades superadas em grupo.

A José Crispim Duarte pela amizade, pela força e pela disposição de estar sempre pronto a ajudar, não importa a situação.

A Luís Cordeiro da Silva e Adriano Cordeiro pelo trabalho realizado no biotério nos dando suporte para trabalhar.

A Tânia Alves por estar sempre pronta a ajudar e pela amizade e competência.

Aos professores Bagnólia, Barbosa, Bruno, Celidarque, Emídio, Jacicarlos, Leônia, Luiz Fernando, Margareth, Maria de Lourdes, Rui e Temilce pela competência e amizade.

À coordenação e aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela competência.

Ao CNPq e a Capes, pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos!!!

Maria Angélica Sátyro Gomes

Março, 2009

*Resumo e Abstract*

## Resumo

Os efeitos cardiovasculares do extrato hidroalcoólico de *Ruellia asperula* (EHRA), uma planta pertencente à família *Acanthaceae*, foram estudados em ratos através de abordagens combinadas *in vivo* e *in vitro*. Em animais normotensos, a administração do EHRA (1, 5, 10, 20 e 40 mg/Kg, i.v., randomicamente) produziu hipotensão (% PAM =  $-4,40 \pm 1,14$ ;  $-11,3 \pm 0,96$ ;  $-13,6 \pm 1,54$ ;  $-15,7 \pm 1,6$  e  $-16,8 \pm 1,6$ , respectivamente) acompanhado por resposta taquicárdica (FC =  $2,5 \pm 1,3$ ;  $11,0 \pm 1,8$ ;  $13,6 \pm 1,4$ ;  $19,2 \pm 2,0$  e  $17,1 \pm 1,3$ , respectivamente). Em anéis de artéria mesentérica isolados com endotélio intacto, EHRA (1 - 300  $\mu\text{g/mL}$ ) induziu relaxamento de maneira dependente de concentração frente a contrações induzidas por fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ) [ $\text{CE}_{50}$  = 51,47 (44,48 – 59,56),  $\mu\text{g/mL}$ ,  $E_{\text{máx}}$  =  $98,8 \pm 10,68\%$ , n=4]. O efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por fenilefrina não foi atenuado após a remoção do endotélio [ $\text{CE}_{50}$  = 50,34 (44,07 – 57,51)  $\mu\text{g/mL}$ , 98,43,  $E_{\text{máx}}$  =  $\pm 5,65\%$ , n=6]. Esses resultados demonstram que o endotélio vascular, provavelmente, não está participando da resposta vasorelaxante induzida pelo EHRA. Todos os protocolos experimentais que seguiram foram realizados em anéis mesentéricos sem endotélio. Em preparações pré-incubadas com KCl 20 mM, a atividade vasorelaxante não foi modificada em relação ao resultado com fenilefrina [ $\text{CE}_{50}$  = 61,74 (55,41 – 68,79)  $\mu\text{g/mL}$ ,  $E_{\text{máx}}$  =  $105,76 \pm 7,39\%$ , n = 6]. Resultados similares foram obtidos com EHRA (1 - 300  $\mu\text{g/mL}$ ) frente as contrações sustentadas induzidas por KCl 80 mM [ $\text{CE}_{50}$  = 44,65 (40,32 – 49,44)  $\mu\text{g/mL}$  n = 4) e  $E_{\text{max}}$  =  $98,34 \pm 2,67\%$ ], estes resultados não foram significativamente diferentes daqueles obtidos na presença de fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ). Em meio despolarizante nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  EHRA (100 e 300  $\mu\text{g/mL}$ ) reduziu as contrações induzidas por  $\text{CaCl}_2$ . O extrato (1 – 300  $\mu\text{g/mL}$ ) induziu relaxamento de maneira dependente de concentração frente as contrações promovidas pelo ativador dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, S(-)-Bay K 8644 [ $\text{CE}_{50}$  = 101,3 (93,08 – 110,1)  $\mu\text{g/mL}$  e  $E_{\text{máx}}$  =  $106,69 \pm 11,93\%$ , n=5]. No entanto, EHRA não alterou as contrações transientes induzidas por fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ) em meio livre de cálcio, nem modificou a contração induzida pelo ortovanadato. Esses resultados em conjunto sugerem que o EHRA exerce um efeito relaxante independente de endotélio e esse efeito parece ser devido a uma inibição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem. No entanto, o EHRA causou relaxamento nas contrações induzidas por fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ) na presença de KCl 60mM e nifedipina (1 $\mu\text{M}$ ), indicando que um segundo mecanismo pode estar envolvido no efeito relaxante do extrato. EHRA (100 mg/Kg, v.o. 2 vezes ao dia durante 28 dias) promoveu inibição da instalação da hipertensão pulmonar no modelo de hipertensão pulmonar induzido pela monocrotalina (60 mg/Kg, s.c.) sem modificar a pressão arterial sistêmica, mas levando a uma redução no ganho de peso desses animais. Além disso, EHRA não modificou a pressão pulmonar em ratos normotensos na sua administração intravenosa aguda.

Palavras-chave: *Ruellia asperula*, efeito vasorelaxante, canais para cálcio operados por voltagem, hipertensão pulmonar.

GOMES, M. A. S.

STUDY OF THE EFFECTS OF HYDROALCOHOLIC  
EXTRACT OF *Ruellia asperula* Lindau ON THE  
CARDIOVASCULAR SYSTEM IN RATS

### Abstract

The cardiovascular effects of the hydroalcoholic extract of *Ruellia asperula* Lindau (EHRA), a plant belonging to *Acanthaceae* family, were studied in rats through a combined in vivo and in vitro approaches. In normotensive rats, EHRA (1, 5, 10, 20 and 40 mg/Kg, i.v., randomly) injections produced hypotension (% PAM =  $-4.40 \pm 1.14$ ;  $-11.3 \pm 0.96$ ;  $-13.6 \pm 1.54$ ;  $-15.7 \pm 1.6$  and  $-16.8 \pm 1.6$ , respectively) accompanied by a tachycardic response (% HR =  $2.5 \pm 1.3$ ;  $11.0 \pm 1.8$ ;  $13.6 \pm 1.4$ ;  $19.2 \pm 2.0$  and  $17.1 \pm 1.3$ , respectively). In isolated rat mesenteric artery rings with intact endothelium, EHRA (1 - 300  $\mu\text{g/mL}$ ) induced concentration-dependent relaxation of the contractions evoked by phenylephrine (10  $\mu\text{M}$ ) [ $\text{EC}_{50} = 51.47$  (44.48 - 59.56),  $\mu\text{g/mL}$ ,  $E_{\text{max}} = 98.8 \pm 10.68\%$ ,  $n=4$ ]. The effect of EHRA on phenylephrine-induced contractions was not attenuated by removal of the vascular endothelium [ $\text{EC}_{50} = 50.34$  (44.07 - 57.51)  $\mu\text{g/mL}$ , 98.43,  $E_{\text{max}} = \pm 5.65\%$ ,  $n=6$ ]. These results demonstrated that the vascular endothelium, probably, is not participating in the vasorelaxant response induced by EHRA. Therefore all the experimental protocols were carried out in endothelium-denuded mesenteric rings. In preparations pre-incubated with KCl 20 mM, the vasorelaxant activity was not altered in comparison with results with FEN [ $\text{EC}_{50} = 61.74$  (55.41 - 68.79)  $\mu\text{g/mL}$ ,  $E_{\text{max}} = 105.76 \pm 7.39\%$ ,  $n = 6$ ]. EHRA (1 - 300  $\mu\text{g/mL}$ ) relaxed the sustained contractions induced by KCl 80 mM [ $\text{EC}_{50} = 44.65$  (40.32 - 49.44)  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 4$ ] and  $E_{\text{max}} = 98.34 \pm 2.67\%$ , this effect was not significantly different from those obtained in the presence of phenylephrine 10  $\mu\text{M}$ . In depolarizing nominally without  $\text{Ca}^{2+}$  medium, EHRA (100 and 300  $\mu\text{g/mL}$ ) antagonized  $\text{CaCl}_2$ -induced contractions. This extract (1 - 300  $\mu\text{g/mL}$ ) induced relaxation concentration-dependent on the contractions elicited by the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel agonist, S(-)-Bay K 8644 [ $\text{EC}_{50} = 101.3$  (93.08 - 110.1)  $\mu\text{g/mL}$  and  $E_{\text{max}} = 106.69 \pm 11.93\%$ ,  $n=5$ ]. EHRA did not alter the transient contraction induced by phenylephrine (10  $\mu\text{M}$ ) in without calcium medium. EHRA did not modify the induced contraction for the ortovanadate. These results suggest that EHRA exerts an endothelium-independent relaxant effect and this effect may be due to  $\text{Ca}^{2+}$  influx inhibition through voltage operated calcium channels. Moreover, EHRA caused relaxation in the induced contractions induced by phenylephrine (10  $\mu\text{M}$ ) in the presence of KCl 60mM and nifedipine (1 $\mu\text{M}$ ), indicating that another mechanism can be involved in the vasorelaxant effect of the extract. EHRA (100 mg/Kg, p.o. 2 times on day during 28 days) promoted inhibition of the installation of the pulmonary hypertension in the model induced by the monocrotaline (60 mg/Kg, s.c.) without modifying the systemic arterial pressure, but leading to a reduction in the profit of weight of these animals. Moreover, EHRA did not modify the pulmonary arterial pressure in normotensive rats in acute intravenously administration.

Key-words: *Ruellia asperula*, vasorelaxant effect, voltage-gated calcium channels, pulmonary hypertension.

## LISTA DE ABREVIATURAS

b.p.m.	batimentos por minuto
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub>	concentração de cálcio citosólica
Ca <sub>v</sub>	canal para cálcio sensível à voltagem
CE <sub>50</sub>	concentração efetiva que produz 50% do efeito máximo
E <sub>máx</sub>	efeito máximo
e.p.m.	erro padrão da média
FC	freqüência cardíaca
Hz	hertz
IP <sub>3</sub>	trifosfato de inositol
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenoso
K <sub>Ca</sub>	canais para potássio sensíveis ao cálcio
MCT	monocrotalina
μL	microlitro
μg	micrograma
μM	micromolar
n	número de experimentos
nM	nanomolar
nm	nanômetro
PA	pressão arterial
PAD	pressão arterial diastólica
PAM	pressão arterial média
PAS	pressão arterial sistólica
PAP	pressão arterial pulmonar
PAPM	pressão arterial pulmonar média

s.c. subcutânea

v.o via oral

vs versus

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

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Foto da <i>Ruellia asperula</i> .....	26
<b>Figura 2:</b> Desenho esquemático da estrutura molecular dos $Ca_v$ .....	29
<b>Figura 3:</b> Rato Wistar ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	36
<b>Figura 4:</b> Aparato utilizado para aquisição de dados de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não anestesiados.....	44
<b>Figura 5:</b> Aparato utilizado para os experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	47
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do EHRA (1-300 $\mu\text{g/mL}$ ) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN (10 $\mu\text{M}$ ). <b>(A)</b> Anéis com endotélio funcionalmente intacto. <b>(B)</b> Anéis com o endotélio removido.....	48
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de canais para $K^+$ na resposta vasorelaxante induzida por EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional.....	49
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do EHRA (1-300 $\mu\text{g/mL}$ ) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 80 mM).....	50
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de $\text{CaCl}_2$ ( $10^{-6}$ – $3 \times 10^{-2}$ M) em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem $\text{Ca}^{2+}$ .....	52

<b>Figura 10:</b> Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do EHRA (1-300 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem o endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (200 nM).....	53
<b>Figura 11:</b> Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações isoladas do EHRA (100 e 300 µg/mL) sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 µM) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem o endotélio funcional.....	54
<b>Figura 12:</b> Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentração isolada do EHRA (300 µg/mL) sobre contrações induzidas por ortovanadato ( $10^{-5}$ - $3 \times 10^{-3}$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem o endotélio funcional.....	55
<b>Figura 13:</b> Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do EHRA (1-300 µg/mL) sobre contrações induzidas por FEN (10 µM) na presença de KCl 60 mM e de nifedipina 1 µM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem o endotélio funcional.....	56
<b>Figura 14:</b> Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do EHRA (100 mg/Kg, v.o.) sobre a PAMP em ratos anestesiados.....	59
<b>Figura 15:</b> Registro original representativo ilustrando o efeito de doses crescentes do EHRA (1; 5; 10; 20 e 40 mg/Kg, i.v.) sobre a PAS, PAM, PAD (A) e FC (B) em rato normotenso não anestesiado. As setas indicam o momento da administração do EHRA.....	61
<b>Figura 16:</b> Efeitos do EHRA sobre a Pressão Arterial Média (PAM, %) (A) e Frequência Cardíaca (FC, %) (B) em ratos normotensos não anestesiados.....	62
<b>Figura 17:</b> Registro original representativo ilustrando o efeito de concentrações crescentes do EHRA (1 - 300 µg/mL) sobre a contração induzida por FEN 10 µM.....	64



<b>Figura 18:</b> Curvas concentração-resposta para o EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN (10 µM).....	64
<b>Figura 19:</b> Curvas concentração-resposta para o EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional na presença de [K <sup>+</sup> ] = 4 mM ou [K <sup>+</sup> ] = 20 mM pré-contraídos com FEN (10 µM).....	65
<b>Figura 20:</b> Curvas concentração-resposta para o EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina (10 µM) ou KCl 80 mM.....	66
<b>Figura 21:</b> Curvas concentração-resposta para CaCl <sub>2</sub> em solução despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca <sup>2+</sup> em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, na ausência (controle) e na presença de concentrações isoladas do EHRA (30, 100 e 300 µg/mL) (A) e valores de E <sub>máx</sub> (B).....	68
<b>Figura 22:</b> Curva concentração-resposta para o EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional pré-contraídos com S(-)-Bay k 8644 (200 nM).....	69
<b>Figura 23:</b> Valores de CE <sub>50</sub> para o EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato em diferentes condições experimentais.....	70
<b>Figura 24:</b> Efeito do EHRA (30, 100 e 300 µg/mL) sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 µM) em anéis de artéria mesentérica superior de rato, sem endotélio funcional.....	71
<b>Figura 25:</b> Curvas concentração-resposta para ortovanadato (10 <sup>-5</sup> – 3x10 <sup>-3</sup> M) na ausência (controle) e presença do EHRA (300 µg/mL), em artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional.....	72

- Figura 26:** Curvas concentração-resposta para o EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN (10  $\mu$ M) na ausência (controle) e na presença de KCl 60 mM e nifedipina 1  $\mu$ M.....73
- Figura 27:** Efeitos da administração aguda do EHRA (1, 5, 10, 20 e 40 mg/Kg, i.v.) sobre a Pressão Arterial Pulmonar Média (PAPM, mmHg) em ratos normotensos anestesiados.....74
- Figura 28:** Efeito do tratamento crônico (28 dias) com EHRA (100 mg/Kg, v.o.) sobre a Pressão Arterial Pulmonar Média (PAPM, mmHg) de animais tratados com monocrotalina (60 mg/Kg; s.c.....75
- Figura 29:** Efeito do tratamento crônico (28 dias) com EHRA (100 mg/Kg, v.o.) sobre a Pressão Sistêmica Arterial Média (PAM, mmHg) de animais tratados com monocrotalina (60 mg/Kg s.c.).....76
- Figura 30:** Efeito do tratamento crônico (28 dias) com EHRA (100 mg/Kg, v.o.) sobre a variação do peso corpóreo de animais tratados com monocrotalina (60 mg/Kg s.c.)....77

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do EHRA (1; 5; 10; 20 e 40 mg/Kg, randomicamente, i.v.) sobre a PAM e FC em ratos normotensos e não anestesiados.....	45
---	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição da solução de Tyrode (pH=7,4).....	38
<b>Tabela 2:</b> Composição da solução de Tyrode livre de cálcio (pH=7,4).....	38
<b>Tabela 3:</b> Composição da solução de Tyrode nominalmente sem cálcio (pH=7,4).....	39
<b>Tabela 4:</b> Composição da solução despolarizante de Tyrode com KCl à 20 mM (pH=7,4).....	39
<b>Tabela 5:</b> Composição da solução despolarizante de Tyrode com KCl à 60 mM (pH=7,4).....	40
<b>Tabela 6:</b> Composição da solução despolarizante de Tyrode com KCl à 60 mM nominalmente sem cálcio (pH=7,4).....	40
<b>Tabela 7:</b> Composição da solução despolarizante de Tyrode com KCl à 80 mM (pH=7,4).....	41

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	24
2 OBJETIVOS .....	34
2.1 Geral.....	34
2.2 Específicos .....	34
3 MATERIAL .....	36
3.1 Animais.....	36
3.2 Drogas utilizadas.....	36
3.3 Preparação das soluções de EHRA .....	37
3.4 Soluções Fisiológicas .....	37
4 MÉTODOS .....	43
4.1 Ensaio Farmacológicos .....	43
4.2 Estudo do efeito do EHRA sobre a PA e FC .....	43
4.2.1 Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos não-anestesiados .....	43
4.2.2 ...Protocolo experimental utilizado nos estudos da PA e FC.....	44
4.2.2.1 ..Avaliação do efeito do EHRA sobre PAM e FC em ratos não anestesiados.....	44
4.3 Estudos em artéria mesentérica.....	45
4.3.1 Preparações de artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio funcional .....	45
4.3.2 Protocolos Experimentais utilizando artéria mesentérica superior isolada de rato	47
4.3.2.1 Efeito do EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídos com FEN (10 µM) .....	47
4.3.2.2 Avaliação da participação de canais para K <sup>+</sup> na resposta vasorelaxante induzida por EHRA em anéis de artéria mesentérica isolados de ratos .....	49
4.3.2.3 Avaliação do efeito de EHRA em anéis mesentéricos pré-contraídos com solução despolarizante de KCl 80 mM .....	50
4.3.2.4 Avaliação do efeito de EHRA sobre o influxo de Ca <sup>2+</sup> .....	51

4.3.2.5 Avaliação do efeito do EHRA sobre o influxo de $\text{Ca}^{2+}$ através dos canais para cálcio sensíveis a voltagem do tipo-L ( $\text{Ca}_v$ -tipoL).....	52
4.2.2.6 Avaliação do efeito do EHRA sobre a liberação de $\text{Ca}^{2+}$ dos estoques intracelulares sensíveis ao $\text{IP}_3$ .....	53
4.2.2.7 Avaliação do efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por $\text{Na}_3\text{VO}_4$ em artéria mesentérica superior isolada de rato .....	54
4.2.2.8 Avaliação do efeito do EHRA sobre a contração induzida por FEN na presença nifedipina 1 $\mu\text{M}$ e KCl 60 mM. ....	56
4.4 Estudo dos efeitos do extrato de <i>Ruellia asperula</i> sobre a pressão arterial pulmonar média (PAPM) .....	57
4.4.1 Medida direta da PAM e PAPM em ratos anestesiados .....	57
4.4.2 ..Protocolo experimental utilizado nos estudos agudos.....	58
4.4.2.1 Avaliação do efeito do EHRA sobre PAPM em ratos não anestesiados .....	58
4.4.3Avaliação do efeito do tratamento crônico com o EHRA sobre a PAPM em animais com hipertensão pulmonar induzida por MCT .....	58
4.5 .. Análise estatística.....	59
5 RESULTADOS .....	61
5.1Efeitos do EHRA sobre a Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) em ratos normotensos não anestesiados.....	61
5.2Efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença ou ausência do endotélio funcional.	63
5.3Efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por FEN na presença de KCl 20 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional .....	65
5.4Efeito do EHRA sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, pré-contraídos com KCl 80 mM .....	66
5.5Efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por $\text{CaCl}_2$ em meio despolarizante e nominalmente sem $\text{Ca}^{2+}$ em anéis de artéria mesentérica isolada de rato, sem endotélio funcional .....	67
5.6Efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional.....	69

5.7 Efeito do EHRA sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 $\mu$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato .....	70
5.8 Efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ( $10^{-5}$ – $3 \times 10^{-5}$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato .....	71
5.9 Efeito do EHRA sobre a contração induzida por fenilefrina na presença nifedipina e KCl 60 mM.....	72
5.10 Efeito da administração aguda EHRA sobre a PAPM em animais normotensos anestesiados .....	73
5.11 Efeito da administração crônica do EHRA sobre a Pressão Arterial Pulmonar Média em animais anestesiados pré-tratados com monocrotalina .....	74
5.12 Efeito da administração crônica do EHRA sobre a Pressão Arterial Sistêmica Média em animais anestesiados pré-tratados com monocrotalina.....	75
5.13 Efeito da administração crônica do EHRA sobre o peso corpóreo de animais pré-tratados com monocrotalina .....	76
6 DISCUSSÃO .....	79
7 CONCLUSÕES .....	88
8 PERSPECTIVAS .....	90
REFERÊNCIAS.....	92

# Introdução



## 1 INTRODUÇÃO

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

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

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

Várias espécies vegetais já foram amplamente estudadas e muitas substâncias foram isoladas, identificadas e, posteriormente, utilizadas no tratamento de várias doenças. O ácido acetil salicílico é um bom exemplo. Amplamente prescrito por suas ações analgésicas, antipiréticas e antiinflamatórias, é um simples derivado do composto de origem natural, o ácido salicílico, obtido originalmente da árvore Salgueiro (*Salix* spp) (VANE, 1994). Baseado nisto, a busca por novas substâncias químicas presentes em espécies vegetais, que possam ser utilizadas na terapêutica, são de extrema importância para preservação da vida.

Uma base mais racional para o uso de espécies vegetais como medicamentos foi lançada, quando estas espécies começaram a ser estudadas de forma sistemática, com o objetivo de extrair, isolar e identificar as substâncias cujas propriedades

farmacológicas são em última análise, responsáveis pelas propriedades curativas atribuídas à planta como um todo. Esta metodologia serviu para fornecer o fundamento científico para o uso das plantas medicinais na terapêutica, mas, além disso, serviu para enriquecer consideravelmente o arsenal terapêutico disponível, o qual ainda hoje se compõe de muitos produtos de origem natural, grande número deles desenvolvidos por método de síntese orgânica tendo como protótipo uma substância de ocorrência natural (ELIZABETSKY, 1986).

Apesar de muitas plantas e substâncias delas isoladas já serem alvo de estudos, ainda existem muitas espécies que não foram estudadas e podem ser promissoras na busca por novas alternativas de tratamento das doenças. Uma dessas é a espécie *Ruellia asperula* pertencente à família Acanthaceae. Essa família possui cerca de 230 gêneros e 2200 espécies, nas regiões tropicais e subtropicais de todo mundo, sendo o Brasil um dos centros de diversidade da família Acanthaceae. São plantas de hábito herbáceo a arbustivo, raramente arbóreo (PONTES, 1998).

Um dos gêneros dessa família, o gênero *Ruellia*, é considerado um dos maiores e mais complexos da família Acanthaceae, possuindo cerca de 250 espécies, com distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo o Brasil um dos seus centros de diversidade (PONTES, 1999). Várias atividades já foram descritas para diferentes espécies do gênero *Ruellia* dentre elas: contração do músculo liso traqueal por ativação de receptor muscarínico (SALAH et al., 2000), propriedades estrogênicas (SALAH et al., 2002), inibição da enzima conversora de angiotensina (SALAH et al., 2001). No entanto algumas espécies do gênero *Ruellia* não apresentam relatos na literatura sobre suas possíveis atividades biológicas.

Uma dessas espécies é a *Ruellia asperula* (Nees) Lindau (Figura 1), também conhecida como candeia ou câmara-candeia e melosa-roxa cujas folhas, flores e raízes são usadas na medicina popular para o tratamento de bronquites, inflamações uterinas, cansaço, gripe e febre (ALMEIDA, 2004). *Ruellia asperula* é um subarbusto lenhoso que mede entre 1,5-2,0 m de altura encontrado em altitudes entre 500 e 700 m em áreas abertas, ocorrendo em solos argilo-pedregosos, florescendo e dando frutos nos meses de janeiro, abril, setembro, outubro e dezembro. Em pesquisas realizadas em

GOMES, M. A. S - Avaliação dos efeitos do Extrato Hidroalcoólico de *Ruellia asperula* Lindau, sobre o sistema cardiovascular em ratos

diversos bancos de dados como Web of Science, Pubmed e NAPRALERT (Natural Products ALERT) não foram descritas atividades para esta espécie.



**Figura 1:** Foto da *Ruellia asperula*. fonte: MOURA, M. D.

Como o gênero *Ruellia* já foi alvo de vários estudos, nos quais pelos mecanismos descritos anteriormente, pode haver indícios de atividade sobre o sistema cardiovascular, estudos com a espécie *Ruellia asperula* (Nees) Lindau poderiam ser de grande importância, já que, segundo a Sociedade Brasileira de Hipertensão em 2005, apesar da diversidade terapêutica para o tratamento da hipertensão arterial, que é um dos problemas cardiovasculares com maior incidência, os percentuais de controle de pressão arterial são muito baixos. Logo, faz-se necessária a busca de novas

alternativas medicamentosas para o tratamento desta patologia. Aliado a este fato, substâncias originadas de produtos naturais tem sido uma importante fonte de obtenção de novos fármacos.

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

O sistema circulatório é um componente importante do sistema cardiovascular, que apresenta função de suprir suficientemente os tecidos e órgãos periféricos de acordo com suas demandas metabólicas. Esta função é alcançada por alterações hemodinâmicas ocorrendo continuamente, envolvendo alterações no débito cardíaco, na resistência vascular e na regulação renal dos fluidos corporais (INOUE et al., 2006). O resultado das variações do débito cardíaco multiplicado pela resistência vascular periférica total (RVPT) determina a pressão arterial (PA) que pode ser influenciada pela ação de drogas sobre um ou ambos os parâmetros (OASTES et al., 1996 apud HARDMAN et al., 1996). A RVPT é influenciada por modificações tensionais no músculo liso vascular e está diretamente envolvida no controle da pressão arterial.

É bem reportado na literatura que o tônus vascular das pequenas artérias e arteríola e o estado de contratilidade das células musculares lisas vasculares (CMLV), são os maiores determinantes da resistência ao fluxo sanguíneo na circulação (JACKSON, 2000) e conseqüentemente da pressão sanguínea sistêmica (CRIBBS, 2006). Assim, o tônus vascular tem um importante papel na regulação da pressão arterial e distribuição do fluxo sanguíneo entre os tecidos e órgãos do corpo (JACKSON, 2000).

A regulação do tônus vascular é dependente de uma interação entre substâncias vasodilatadores e vasoconstritores geradas por estímulos variados, tais como: hormônios circulantes, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio, sinais elétricos e/ou mecânicos, como a própria pressão sanguínea (JACKSON, 2000; CRIBBS, 2006). Todos estes sinais são integrados no miócito vascular para determinar a atividade contrátil do músculo, estabelecendo assim o diâmetro e a resistência dos vasos sanguíneos (JACKSON, 2000).

É bem descrito que o estado de contratilidade vascular das células musculares lisas, dentro da parede dos vasos sanguíneos, é regulado pela concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ). Os vasoconstrictores agem elevando a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , bem como, aumentando a aparente sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  dos processos contráteis na célula muscular lisa. Por outro lado, os vasodilatadores exercem efeitos opostos na  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (LEDOUX et al., 2006). Os canais iônicos, principalmente os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem ( $\text{Ca}_v$ ), desempenham um papel central neste processo.

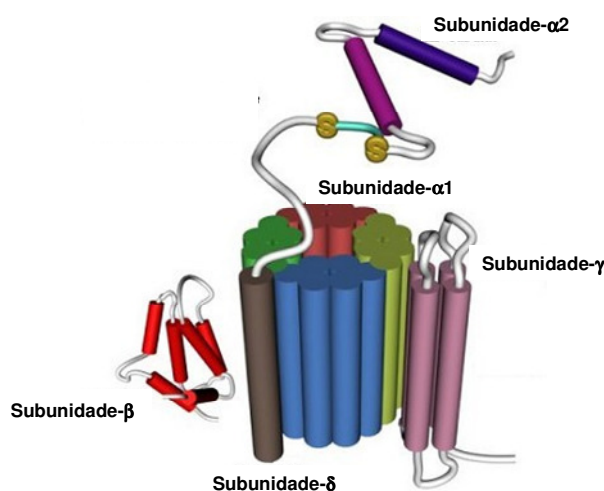
Os canais iônicos são importantes reguladores da contratilidade do músculo liso, pois funcionam como moduladores do potencial de membrana plasmática e das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio intracelular. (KEVIN; NELSON, 2005).

As principais vias que levam ao aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  em miócitos são canais para cálcio sensíveis a voltagem ( $\text{Ca}_v$ ) e canais catiônicos não-seletivos, localizados na membrana plasmática, além de canais que levam a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, tais como receptores sensíveis à rianodina (RYRs) ou receptores sensíveis ao trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ ), encontrado na membrana do retículo sarcoplasmático (LEDOUX et al., 2006).

É importante salientar que a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático através dos  $\text{IP}_3\text{Rs}$  e RYRs, em células de músculo liso, pode gerar ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ , o qual é sugestivo de mediar vasoconstrição (JAGGAR et al., 2000; THORNELOE; NELSON, 2005). Paradoxalmente, os transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  gerados pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos  $\text{IP}_3\text{Rs}$  e RYRs, na forma de “puffs” e “sparks” de  $\text{Ca}^{2+}$ , respectivamente, em células de músculo liso, podem ativar os canais para  $\text{K}^+$  ativados pelo  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) promovendo hiperpolarização de membrana limitando a contratilidade do músculo liso (JAGGAR et al., 2000; THORNELOE; NELSON, 2005).

Os canais  $\text{Ca}_v$  são considerados a principal via de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular para as células musculares lisas vasculares (CMLV) (CRIBBS, 2006). Eles consistem em um grande complexo multimérico composto por uma subunidade  $\alpha_1$  formadora do poro e outras subunidades menores ( $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$  e  $\gamma$ ). A subunidade  $\alpha_1$  apresenta quatro domínios (I-IV) homólogos, contendo cada um seis segmentos em  $\alpha$ -helice transmembranares (S1 a S6). Cada domínio contém um sensor de voltagem localizado no segmento S4 que contém resíduos de aminoácidos carregados

positivamente. Alças que entram para região transmembrana entre o segmento S5 e S6, contêm quatro resíduos de aminoácidos Glu-Glu-Glu-Glu (EEEE), formando o filtro de seletividade iônica, na parte extracelular do poro (YU; CATTERALL, 2004; SONKUSARE et al., 2006) (figura 2).



**Figura 2:** Desenho esquemático da estrutura molecular dos  $Ca_v$ . Fonte: [www.chemsoc.org/.../channels/calcium/calcium.jpg](http://www.chemsoc.org/.../channels/calcium/calcium.jpg).

São dez genes humanos que codificam a subunidade  $\alpha_1$  do  $Ca_v$  (subunidade formadora do poro) que se agrupam em três subfamílias distintas, são elas: canais  $Ca_v$  1 ( $Ca_v$  1.1 – 1.4), que conduzem correntes tipo-L; canais  $Ca_v$  2 (2.1 – 2.3), que conduzem correntes tipo-N, P/Q e R; Canais  $Ca_v$  3 ( $Ca_v$  3.1-3.3), que conduzem corrente tipo-T (figura 2) (LIPSCOMBE et al., 2004; YU; CATTERALL, 2004; CRIBBS, 2006).

As células musculares lisas vasculares expressam dois tipos de canais  $Ca_v$ , os  $Ca_v$  1 (tipo-L) e os  $Ca_v$  3 (tipo-T). Os canais para  $Ca^{2+}$  tipo-L são caracterizados por gerar correntes de  $Ca^{2+}$  ativadas por altos valores de voltagens, além de apresentarem sensibilidade às diidropiridinas. Quando as CMLV despolarizam, ocorrem abertura dos

canais para  $Ca^{2+}$  tipo-L levando ao aumento de  $[Ca^{2+}]_C$ , contração celular e vasoconstrição (CRIBBS, 2006). Entretanto, a hiperpolarização induz fechamento destes canais levando a vasodilatação (JACKSON, 2000).

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

Nelson et al. (1995) relataram que a composição das subunidades formadoras dos canais  $Ca_v$  vasculares é um determinante do tônus vascular e dos níveis de pressão sanguínea. Além disso, estes canais inativam lentamente durante despolarizações sustentadas, de maneira que o influxo de  $Ca^{2+}$  através de uma fração de canais  $Ca_v$  é suficiente para mediar a contração induzida por pressão em pequenas artérias, contribuindo desta maneira para auto-regulação dinâmica dos vários leitos vasculares (NELSON et al., 1995, SONKUSARE et al., 2006).

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

Várias doenças estão associadas a distúrbios no sistema cardiovascular, dentre as quais temos a hipertensão pulmonar, que de acordo com a Sociedade Brasileira de Hipertensão Arterial em 2005, é uma condição patológica que está presente quando a pressão sistólica pulmonar e pressão média excedem 30 e 25 mmHg, respectivamente, em repouso ou quando a pressão sistólica pulmonar excede 35 mmHg e a pressão média pulmonar é superior a 30 mmHg durante o esforço. Cabe ressaltar que em idosos a pressão arterial pulmonar pode ser mais elevada, principalmente durante o esforço, mesmo na ausência de qualquer patologia. Por se tratar de um diagnóstico hemodinâmico, a sua interpretação e valorização tem que ser considerada nesta perspectiva, pelas suas implicações patológicas. A hipertensão pulmonar é habitualmente classificada segundo a etiologia em primária e secundária, sendo esta

última conseqüência de uma doença associada. Esta classificação é limitada e nem sempre útil na prática clínica. A Organização Mundial de Saúde, em 1998, propôs uma classificação de hipertensão pulmonar mais ampla, levando-se em consideração o diagnóstico etiológico e a orientação.

A hipertensão pulmonar causa problemas vasculares como constrição das células musculares lisas, crescimento e diferenciação das células endoteliais e trombose (FARBER, LOSCALZO, 2004). Além disso, o paciente acometido por esta doença sofre vários transtornos como: insuficiência ventricular direita, fadiga, dispnéia, edema, palpitações, dores e síncope que comprometem a qualidade de vida dos mesmos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2005).

Diante disto há uma busca incessante por drogas que sejam eficazes para o tratamento desta patologia e dos transtornos por ela causados, sendo as terapias vasodilatadoras, anticoagulantes, antiinflamatórias as principais ferramentas utilizadas. Atualmente as principais classes de fármacos empregadas para tal fim são os inibidores de fosfodiesterase, análogos de prostaciclina, antagonista do receptor de endotelina, anti-agregantes plaquetários, doadores de óxido nítrico e os bloqueadores dos canais para cálcio (FARBER, 2004). Vários estudos sugerem que a administração a longo prazo de altas doses de bloqueadores de canais para cálcio em pacientes com hipertensão pulmonar aumenta a sobrevida dos pacientes que respondem ao tratamento (HUMBERT, 2004).

Em animais, a hipertensão pulmonar pode ser induzida pela monocrotalina (MCT), um alcalóide pirrolizidínico isolado de espécies de *Crotalaria*, dentre elas a *Crotalaria retusa*. Essa classe de alcalóides causa doenças no pulmão (hipertensão pulmonar), fígado (veno-oclusão e cirrose) e rins (bloqueio das arteríolas aferentes e mesangiólise) por induzir um fenótipo megalocítico nas células endoteliais e parenquimatosas. Uma exposição aguda do alcalóide resulta dentro de 2 a 3 dias em uma ampliação das células com ampliação do núcleo, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, enquanto as células permanecem bloqueadas em G<sub>2</sub>/M e nas células endoteliais das artérias pulmonares ainda causam inibição da síntese de DNA. A administração de monocrotalina é amplamente utilizada como modelo para estudo da patogênese da



GOMES, M. A. S - Avaliação dos efeitos do Extrato Hidroalcoólico de *Ruellia asperula* Lindau. sobre o sistema cardiovascular em ratos

hipertensão pulmonar. Esses alcalóides necessitam da ativação da via do citocromo P<sub>450</sub>, sendo, portanto, metabolizados pelo fígado (SHAH et al., 2005).

Com o intuito de contribuir para melhor descrição das atividades biológicas do gênero *Ruellia*, além do fato de não haver na literatura trabalhos que relatassem qualquer atividade da *Ruellia asperula*, como também da necessidade da busca de novas alternativas terapêuticas para problemas cardiovasculares, buscamos investigar a possível atividade cardiovascular do EHRA e os mecanismos de ação envolvidos nos seus efeitos.

Objetivos

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade cardiovascular do extrato hidroalcoólico de *Ruellia asperula* (EHRA) e os mecanismos de ação envolvidos nas atividades observadas, bem como o efeito da sua administração sobre a pressão pulmonar em animais normotensos e em um modelo de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina.

### 2.2 Específicos

- Investigar o efeito da administração intravenosa do EHRA sobre pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos não anestesiados;
- Avaliar a atividade vasorelaxante do EHRA sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato;
- Investigar o mecanismo de ação envolvido na atividade vasorelaxante do EHRA;
- Avaliar a participação dos canais para  $Ca^{2+}$  e  $K^{+}$  na atividade vasorelaxante do EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato;
- Avaliar o efeito da administração intravenosa aguda do EHRA sobre a pressão arterial pulmonar (PAP);
- Avaliar o efeito da administração oral do EHRA sobre a pressão arterial pulmonar em animais com hipertensão pulmonar induzida pela monocrotalina.

*Material*

### 3 MATERIAL

#### 3.1 Animais

Foram utilizados para todos os experimentos ratos wistar machos (Figura 3) pesando entre 250-300 gramas, os quais foram provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes Medeiros da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Estes animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $21 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas (6 – 18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água.



**Figura 3:** Rato Wistar (*Rattus norvegicus*)

#### 3.2 Drogas utilizadas

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

) fenilefrina (Sigma), cloridrato de acetilcolina (Sigma), EGTA (Sigma), monocrotalina (cedida pelo prof. Dr. José Maria Barbosa Filho do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica). Para a preparação das soluções estoques do S(-)-Bay K 8644 o mesmo foi dissolvido em etanol absoluto e diluído em água destilada, de modo a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental.

### 3.3 Preparação das soluções de EHRA

O EHRA foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho. Para preparação das soluções estoques do EHRA, o mesmo foi solubilizado em cremofor<sup>®</sup> (50 µL por mL de solução) e diluído em água destilada (experimentos *in vitro*) ou em NaCl 0,9% (experimentos *in vivo*) de modo a serem obtidas as concentrações e doses, respectivamente, desejadas para cada protocolo experimental. As concentrações de cremofor<sup>®</sup> em solução nunca excederam 0,01% e foram previamente testadas, apresentando ausência de efeito farmacológico.

### 3.4 Soluções Fisiológicas

Para a preparação das soluções fisiológicas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl) (MERCK), cloreto de potássio (KCl) (MERCK), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) (MERCK), cloreto de magnésio hexa-hidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) (MERCK), glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (MERCK), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (VETEC), fosfato de sódio mono-hidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) (VETEC) e fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (VETEC).

As tabelas a seguir mostram as composições das várias soluções utilizadas:

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

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

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl <sub>2</sub>	2,0
MgCl <sub>2</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42
Glicose	5,6

Fonte: TANAKA et al., 1999.

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

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
NaCl	158,3
KCl	4,0
MgCl <sub>2</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42
Glicose	5,6
EGTA	1,0

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

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

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
MgCl <sub>2</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

**Tabela 4:** Composição da solução despolarizante de Tyrode com KCl à 20 mM (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	142,3
KCl	20,0
CaCl <sub>2</sub>	2,0
MgCl <sub>2</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.



**Tabela 5:** Composição da solução despolarizante de Tyrode com KCl à 60 mM (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
CaCl <sub>2</sub>	2,0
MgCl <sub>2</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

**Tabela 6:** Composição da solução despolarizante de Tyrode com KCl à 60 mM nominalmente sem cálcio (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
MgCl <sub>2</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

**Tabela 7:** Composição da solução despolarizante de Tyrode com KCl à 80 mM (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	82,3
KCl	80,0
CaCl <sub>2</sub>	2,0
MgCl <sub>2</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

*Métodos*

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Ensaios Farmacológicos

Foram utilizadas duas diferentes formas de abordagem, uma com ensaios farmacológicos *in vivo* e outra *in vitro*, esta última utilizando artéria mesentérica superior de rato. Os ensaios *in vivo* consistiram na medida direta da pressão arterial sistêmica e frequência cardíaca em ratos não anestesiados e na medida direta da pressão pulmonar em animais normotensos e hipertensos anestesiados. Todos os animais foram submetidos à eutanásia, seguindo as normas de cuidados com animais, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB sob parecer nº 0207/08, o qual está contido nos anexos.

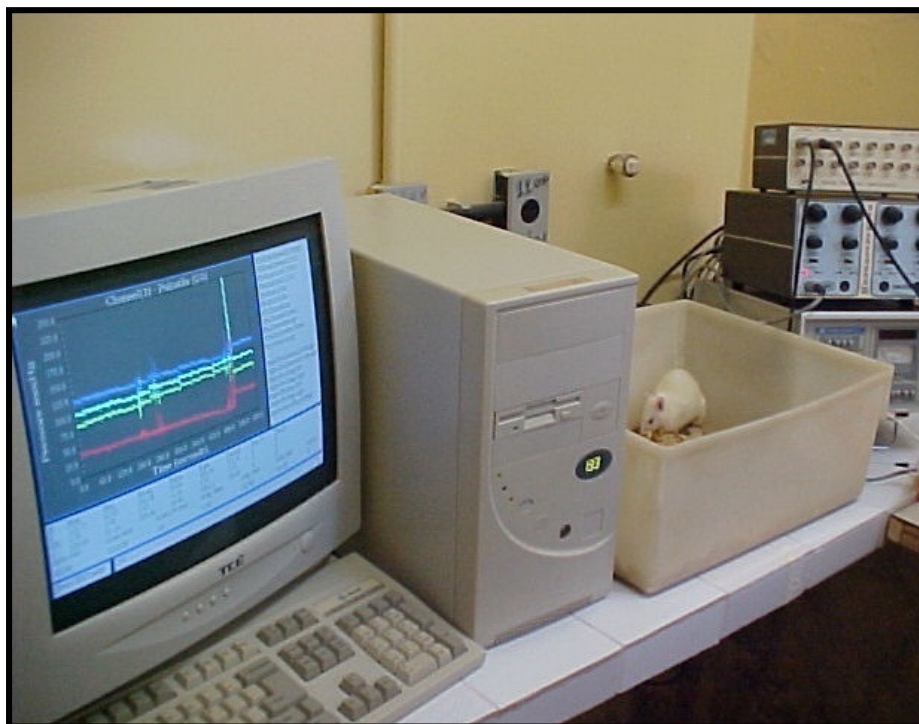
### 4.2 Estudo do efeito do EHRA sobre a PA e FC - Estudos *in vivo*

#### 4.2.1 Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos não-anestesiados

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.), e cateteres de polietileno (PE), segmentos de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), fixados 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 femorais esquerdas, respectivamente. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (*scapulae*).

A PA e FC foram medidas 24 h após o procedimento cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (Statham P23 ID; Gould, Cleveland, OH, EUA) acoplado a um amplificador (Modelo TBM-

4M, WPI, Sarasota, FL, EUA), conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital (CIO-DAS16/JR, Computer Boards, Inc., Mansfield, MA, EUA) contendo o programa CVMS (WPI, Sarasota, FL, EUA) (Figura 4). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou a pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), e o intervalo de pulso, referido como FC. O cateter venoso foi implantado para a administração das drogas.



**Figura 4:** Aparato utilizado para aquisição de dados de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não anestesiados.

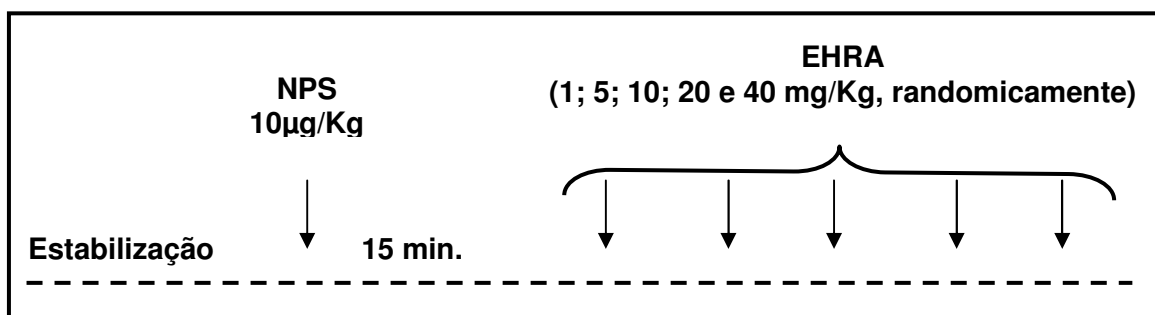
#### **4.2.2 Protocolo experimental utilizado nos estudos *In Vivo* da PA e FC**

##### **4.2.2.1 Avaliação do efeito do EHRA sobre PAM e FC em ratos não anestesiados**

Para obtenção de uma curva dose-resposta, os animais foram mantidos em aclimatação por um período de no mínimo 30 min., para estabilização dos parâmetros cardiovasculares, e em seguida administrou-se

nitroprussiato de sódio (NPS) (10 µg/kg, i.v.), um clássico doador de óxido nítrico, para verificar a eficácia da implantação do cateter venoso. Após 15 min., doses diferentes do EHRA (1; 5; 10; 20 e 40 mg/Kg, i.v.) foram administradas randomicamente com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores da linha de base (Quadro 1). Os valores de PAM e FC foram computados antes (valores da linha de base) e após a administração do EHRA, e suas variações foram expressas em percentagem dos valores em delta ( $\Delta$ ) em relação à linha de base.

**Quadro 1** : Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do EHRA (1; 5; 10; 20 e 40 mg/Kg, randomicamente, i.v.) sobre a PAM e FC em ratos normotensos e não anestesiados.



### 4.3 Estudos em artéria mesentérica - Estudos *In Vitro*

#### 4.3.1 Preparação de artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio funcional

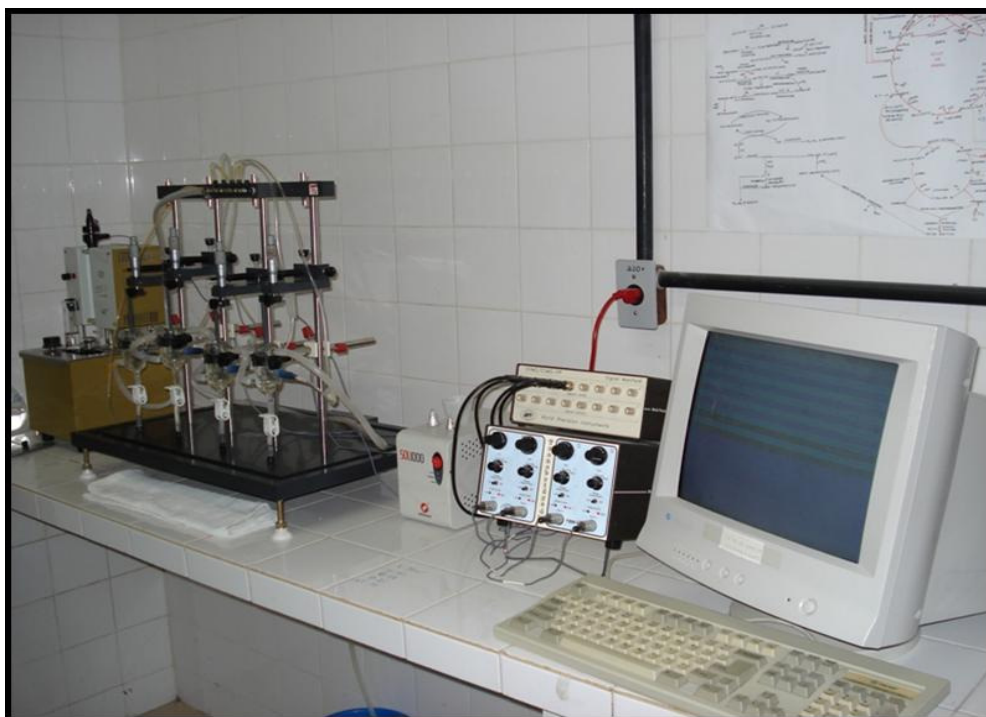
Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical seguido por secção dos vasos cervicais. Através de uma incisão no abdome do animal, retirou-se a artéria mesentérica superior. Anéis do primeiro segmento da artéria (1 - 2 mm) foram obtidos livres de tecido conjuntivo e adiposo. Os anéis foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode, a 37<sup>o</sup> C e gaseificada com uma mistura de 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub> (carbogênio). A seguir os 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 5). Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de 60 minutos de estabilização. Durante este tempo, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 min. para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Duas contrações tônicas submáximas a felinefrina (FEN) 10  $\mu$ M, as quais se estabilizam em torno de 30 minutos, foram registradas. Uma terceira contração foi obtida e, após a estabilização desta, o EHRA (1 – 300  $\mu$ g/mL) foi adicionado cumulativamente à cuba. Os resultados foram expressos em percentagem do tônus induzido, levando em consideração que a contração induzida por FEN corresponde a 100 % e que a tensão de repouso é igual a 0%.

Para realização dos experimentos com anéis na ausência do endotélio funcional, os anéis foram submetidos ao leve atrito mecânico entre as paredes internas do vaso com uma haste de metal.

A presença de endotélio funcional foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de 10  $\mu$ M de acetilcolina (Ach). Foram considerados com endotélio, os anéis com relaxamento superior a 90% sobre a pré-contração com fenilefrina. Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10%, foram considerados sem endotélio. Anéis com relaxamentos entre 10 e 90% foram desprezados dos protocolos experimentais (FURCHGOTT, ZAWADZKY, 1980).



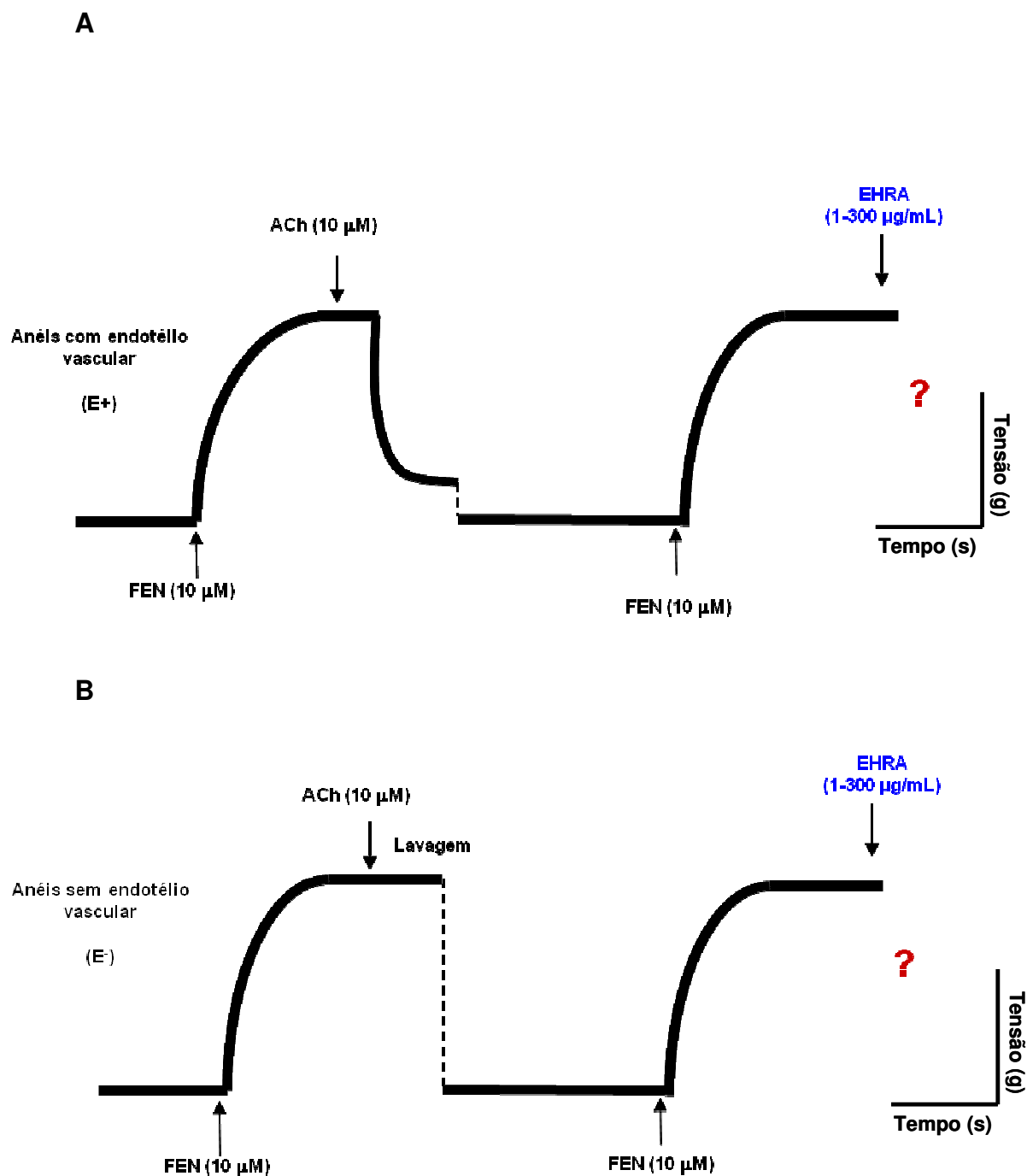
**Figura 5:** Aparato utilizado para os experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

#### **4.3.2 Protocolos Experimentais utilizando artéria mesentérica superior isolada de rato**

##### **4.3.2.1 Efeito do EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídos com FEN (10 $\mu$ M)**

Após um período de 60 min. de estabilização das preparações, concentrações crescentes do EHRA (1 – 300  $\mu$ g/mL), foram adicionadas cumulativamente aos anéis pré-contraídos com FEN (10  $\mu$ M). O efeito vasorelaxante do EHRA foi avaliado em anéis com o endotélio funcional intacto e em anéis com o endotélio funcionalmente removido (Figuras 6 A e 6 B, respectivamente). Após a obtenção das curvas concentração-resposta, foram calculados os valores de  $CE_{50}$  (concentração efetiva responsável por 50% do efeito máximo) e  $E_{max}$  (efeito máximo) das curvas individuais na presença e na ausência do endotélio funcional.

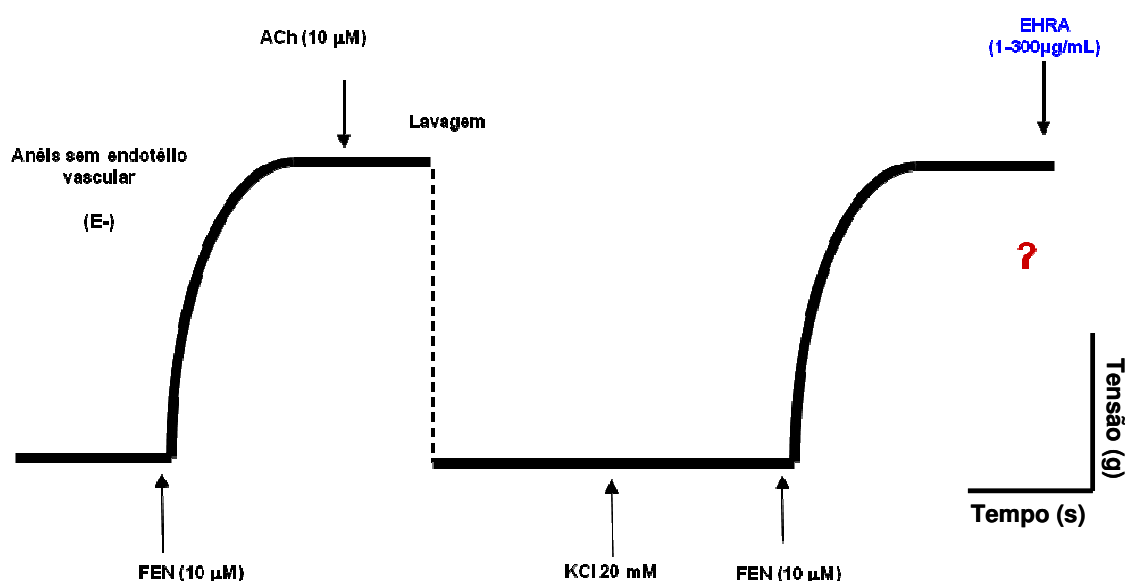




**Figura 6:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do EHRA (1-300 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contráidos com FEN (10 µM). **(A)** Anéis com endotélio funcionalmente intacto. **(B)** Anéis com o endotélio removido.

#### 4.3.2.2 Avaliação da participação de canais para K<sup>+</sup> na resposta vasorelaxante induzida por EHRA em anéis de artéria mesentérica de ratos

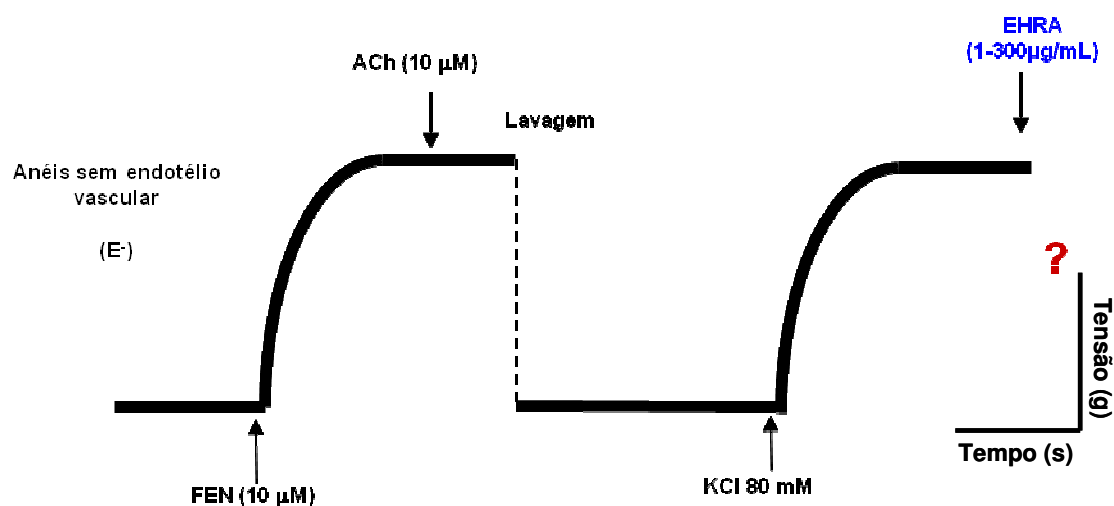
Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, a solução de Tyrode (Tabela 1) das cubas foi trocada pela solução de Tyrode com KCl 20 mM (KCl 20) (Tabela 3) e as preparações permaneceram nesta solução até o final do experimento. Este procedimento impede parcialmente o efluxo de K<sup>+</sup> e atenua relaxamentos mediados por abertura de canais para K<sup>+</sup> (CLARK; FUCHS, 1997; CAMPBELL, 1999). Decorridos 30 minutos da incubação da solução de KCl 20 mM, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (10 μM) e, em seguida, uma curva concentração-resposta para EHRA foi obtida. Os valores CE<sub>50</sub> e E<sub>max</sub> foram obtidos e comparados na ausência (controle) ou na presença de KCl 20 mM (Figura 7).



**Figura 7:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de canais para K<sup>+</sup> na resposta vasorelaxante induzida por EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional.

#### 4.3.2.3 Avaliação do efeito de EHRA em anéis mesentéricos pré-contraídos com solução despolarizante de KCl 80 mM

Este protocolo foi desenvolvido para avaliar o efeito de EHRA em anéis mesentéricos pré-contraídos com um agente contracturante que apresenta um mecanismo de ação diferente do mecanismo da fenilefrina para gerar aumento de tensão. Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, EHRA (1 – 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi adicionado cumulativamente aos anéis pré-contraídos com KCl (80 mM) (Tabela 5) isolados de ratos. A porcentagem de relaxamento induzida por EHRA foi calculada pela comparação da resposta antes e após a adição do extrato. Os valores de  $\text{CE}_{50}$  e  $\text{E}_{\text{max}}$  também foram obtidos como foi descrito anteriormente. (Figura 8).

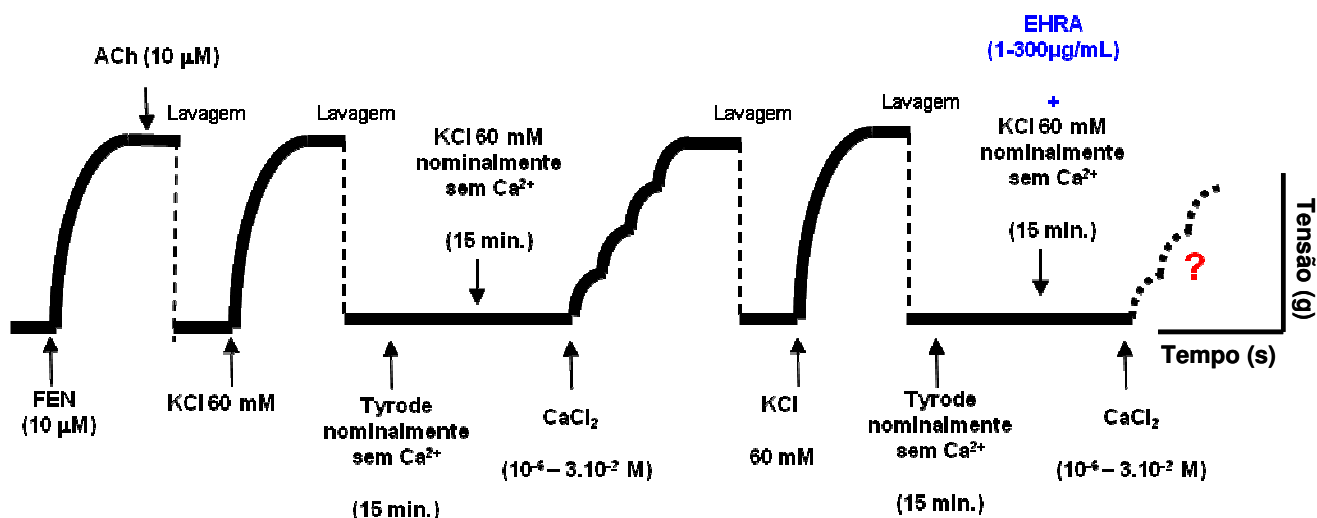


**Figura 8:** Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliação do efeito de concentrações crescentes do EHRA (1-300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 80 mM).

#### 4.3.2.4 Avaliação do efeito de EHRA sobre a contração induzida por $\text{CaCl}_2$

Este protocolo foi realizado para investigar o efeito do EHRA sobre a contração induzida pelo  $\text{CaCl}_2$ , com o objetivo de avaliar se a diminuição do influxo de cálcio para célula muscular lisa seria um mecanismo utilizado pelo EHRA para causar efeito vasorelaxante. Para avaliar esta hipótese, anéis mesentéricos foram expostos a uma solução despolarizante de KCl 60 mM (CUNHA, 2004) (Tabela 4) e em seguida foram lavados com solução de Tyrode nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  (Tabela 2), onde permaneceram nesse meio por 15 minutos. Após esse período, o meio foi permutado por uma solução despolarizante de KCl 60 mM, nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$ . A ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  foi inferida pela falha da solução despolarizante nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  em produzir vasoconstrição. Posteriormente, foi obtida uma curva concentração-resposta ao  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-2}$  M) (curva controle).

O protocolo foi repetido, sendo que concentrações isoladas do EHRA (30  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , ou 300  $\mu\text{g/mL}$ ) foram incubadas as preparações juntamente com a solução despolarizante de KCl 60 mM, nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  e uma nova curva concentração resposta ao  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-2}$  M) foi obtida. O efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por  $\text{CaCl}_2$  foi avaliado comparando-se as curvas de  $\text{CaCl}_2$  na ausência (controle) e na presença do extrato (Figura 9).



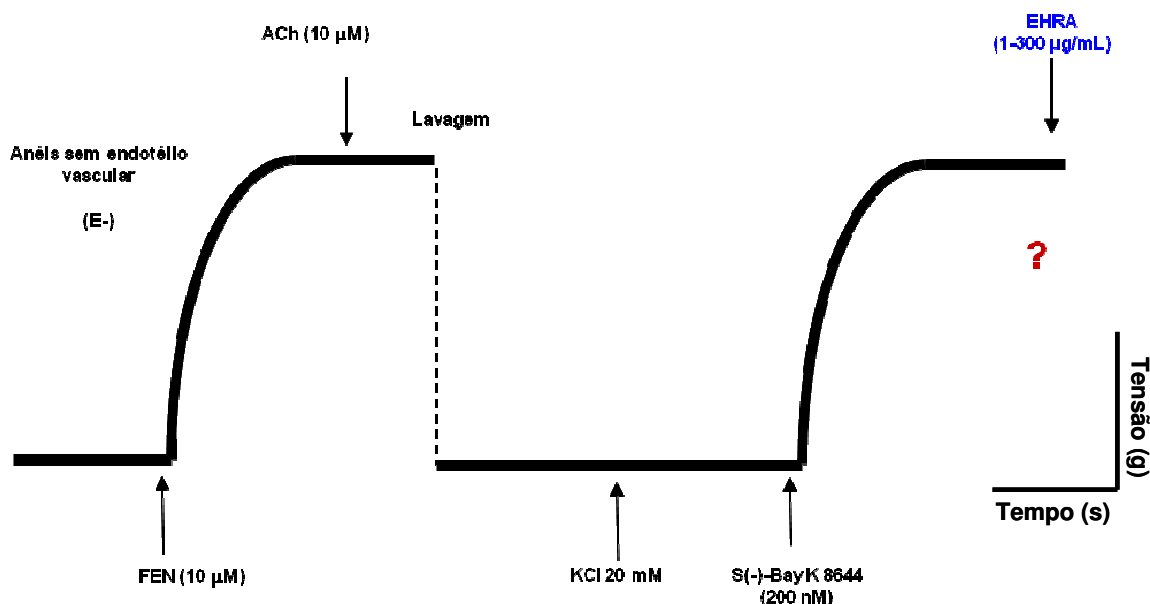
**Figura 9:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de CaCl<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> – 3 x 10<sup>-2</sup> M) em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca<sup>2+</sup>

#### 4.3.2.5 Avaliação do efeito do EHRA sobre o influxo de Ca<sup>2+</sup> através dos canais para cálcio sensíveis a voltagem do tipo-L (Ca<sub>v</sub>-tipo L)

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

Após a verificação da ausência de endotélio, as preparações foram expostas a uma solução despolarizante de KCl 20 mM durante 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado o S(-)-Bay K 8644 (200 nM) e após a contração

sustentada ter sido alcançada, concentrações crescentes de EHRA (1-300 µg/mL) foram adicionadas à cuba de maneira cumulativa (Figura 10).



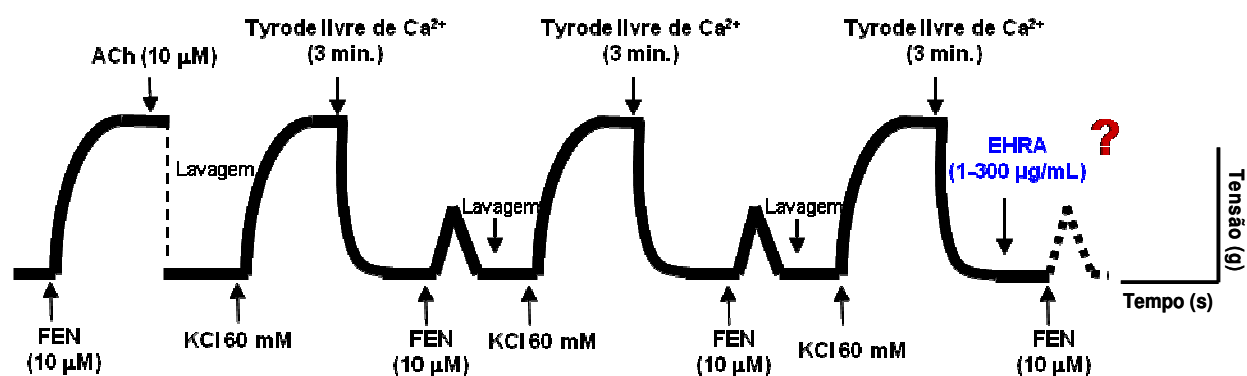
**Figura 10:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do EHRA (1-300 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem o endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (200 nM).

#### 4.2.2.6 Avaliação do efeito do EHRA sobre a liberação de $Ca^{2+}$ dos estoques intracelulares sensíveis ao $IP_3$

O efeito de EHRA (100; 300 µg/mL) sobre as contrações transientes promovidas pelo  $Ca^{2+}$  liberado dos estoques intracelulares sensíveis a  $IP_3$ , um segundo mensageiro mobilizante de cálcio via  $IP_3R$  (ZHANG;LI, 2006) foi avaliado em anéis desprovidos do endotélio funcional.

As preparações foram expostas à solução despolarizante de  $K^+$  60mM (Tabela 4) durante 3 min. O tecido foi então lavado com solução de Tyrode livre de  $Ca^{2+}$  (Tabela 2), decorridos 3 min., a resposta contrátil à FEN (10 µM) foi

induzida na ausência do EHRA. Os anéis foram lavados e mantidos em solução nutritiva de Tyrode com níveis fisiológicos de  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) (Tabela 1) durante quinze minutos, para retorno às condições basais e reestocagem dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . O processo descrito foi repetido até a obtenção de duas contrações transientes de magnitude similar. Em seguida, EHRA, em concentrações isoladas foi incubado juntamente com solução de Tyrode livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , durante 3 minutos e finalmente, a resposta contrátil à FEN (10  $\mu\text{M}$ ) na presença do EHRA, foi obtida. O efeito do EHRA foi calculado comparando-se a média das amplitudes das contrações na ausência (controle) e na presença do EHRA (Figura 11).

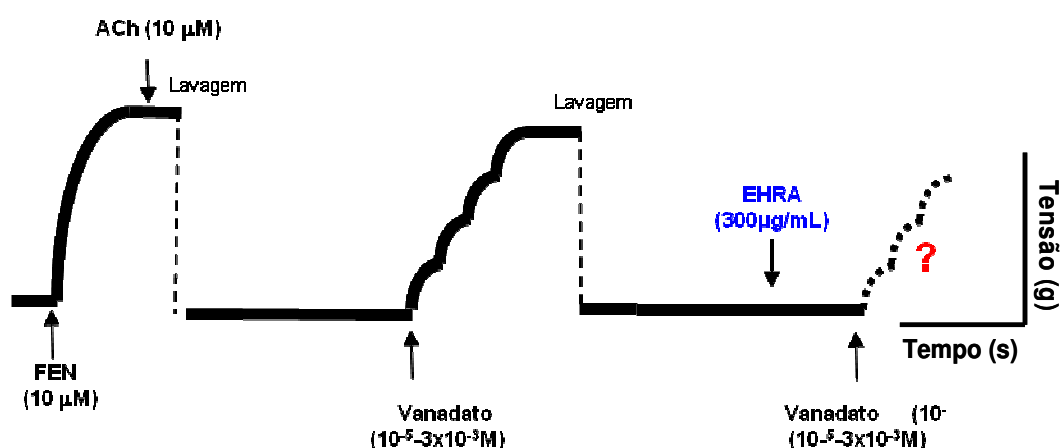


**Figura 11:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações isoladas do EHRA (100 e 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre as contrações transientes induzidas por fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem o endotélio funcional.

#### 4.2.2.7 Avaliação do efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por $\text{Na}_3\text{VO}_4$ em artéria mesentérica superior isolada de rato

Esse protocolo foi realizado com o intuito de avaliar a possível ação do EHRA sobre a via RhoA- Rho cinase, na sensibilização da maquinaria contrátil.

Após a verificação da ausência de endotélio, as preparações passaram por um período de estabilização de 30 minutos. A seguir foi induzida uma curva concentração-resposta para o  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ( $10^{-5}$ - $3 \times 10^{-3}$  M) (ALCÓN, 2000) um potente ativador da via RhoA-Rho cinase a qual leva à inibição da fosfatase da cadeia leve da miosina (ALCÓN, 2000). A contração pelo  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ocorre por uma sensibilização da maquinaria contrátil, pela manutenção do estado fosforilado da cadeia leve de miosina. A seguir, a preparação foi lavada e passou por um novo período de estabilização de 1 hora. Em seguida foi adicionada uma concentração do EHRA (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e, após um novo intervalo de tempo, uma nova curva concentração-resposta para o  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  foi obtida e o efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  foi avaliado comparando-se as curvas para este na ausência (controle) e na presença do extrato (Figura 12).

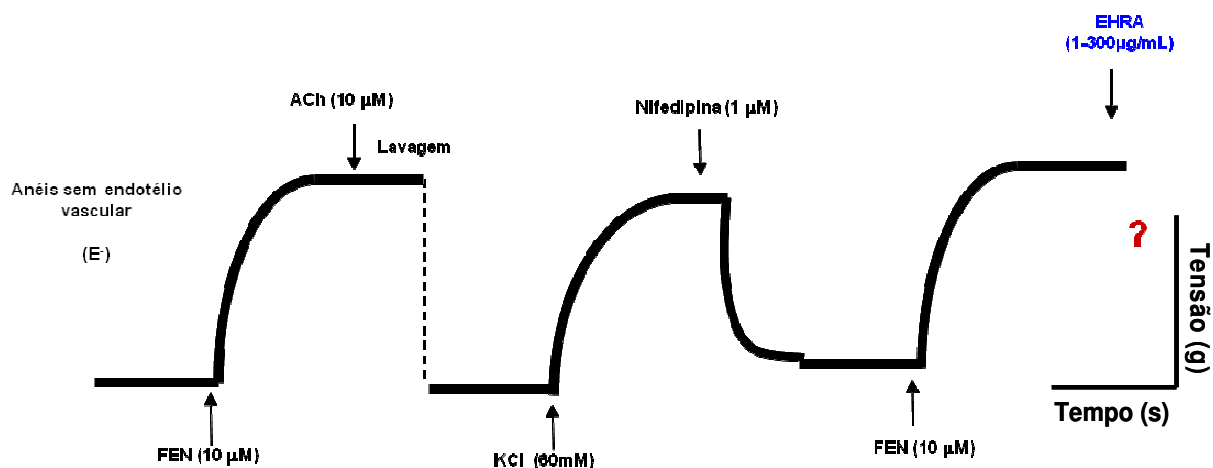


**Figura 12:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentração isolada do EHRA (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre contrações induzidas por ortovanadato ( $10^{-5}$ - $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem o endotélio funcional.



#### 4.2.2.8 Avaliação do efeito do EHRA sobre a contração induzida por fenilefrina na presença de nifedipina 1 $\mu$ M e KCl 60 mM.

Após a verificação da ausência do endotélio, uma contração foi induzida utilizando KCl 60 mM que causa contração por induzir a despolarização da membrana e assim, abrir os canais para cálcio sensíveis à voltagem. A seguir foi adicionada nifedipina 1  $\mu$ M para bloquear os canais para cálcio sensíveis à voltagem e induzir relaxamento. Esses protocolos experimentais minimizam a participação dos canais para potássio e dos canais para cálcio sensíveis à voltagem no relaxamento (TSANG et al., 2003). Após isso, foi adicionada fenilefrina (10  $\mu$ M) para induzir uma nova contração. No componente tônico da contração foi obtida uma curva concentração-resposta para o EHRA (1 – 300  $\mu$ g/mL) para observar possíveis relaxamentos mediados por mecanismo diferente do bloqueio dos canais para cálcio sensíveis à voltagem e da ativação dos canais para potássio (Figura 13).



**Figura 13:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do EHRA (1-300  $\mu$ g/mL) sobre contrações induzidas por FEN (10  $\mu$ M) na presença de KCl 60 mM e de nifedipina 1  $\mu$ M em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem o endotélio funcional.

#### **4.4 Estudo dos efeitos do extrato do Extrato Hidroalcoólico de *Ruellia asperula* sobre a pressão arterial pulmonar média (PAPM)**

Duas diferentes abordagens foram utilizadas para avaliar o efeito do EHRA sobre a PAPM, um estudo agudo e um crônico. No estudo agudo o EHRA foi administrado intravenosamente em animais normotensos para avaliar seus efeitos sobre a PAPM. No estudo crônico o EHRA foi administrado via oral em animais com hipertensão arterial pulmonar induzida pela MCT sendo avaliados os efeitos sobre o ganho ponderal, a PAM e sobre a PAPM.

##### **4.4.1 Medida direta da PAM e PAPM em ratos anestesiados**

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação de catéteres na artéria e veia femorais esquerdas para a medida da PAM, como descrito no item 4.2.1 Em seguida os animais foram traqueostomizados e ventilados mecanicamente utilizando um cateter intravenoso medindo 4,8 cm e cujo diâmetro interno é de 2,1 mm (jelco<sup>®</sup> nº 14). Após isso, a cavidade torácica foi aberta e a artéria pulmonar dissecada. Um cateter intravenoso medindo 1,9 cm e cujo diâmetro interno é de 0,7mm (jelco<sup>®</sup> nº 24), foi inserido na artéria pulmonar via ventrículo direito. O cateter da artéria pulmonar foi conectado ao transdutor de pressão, o mesmo utilizado para a medida direta da pressão arterial sistêmica, e foram registrados os valores da PAPM.

#### **4.4.2 Protocolo experimental utilizado nos estudos agudos**

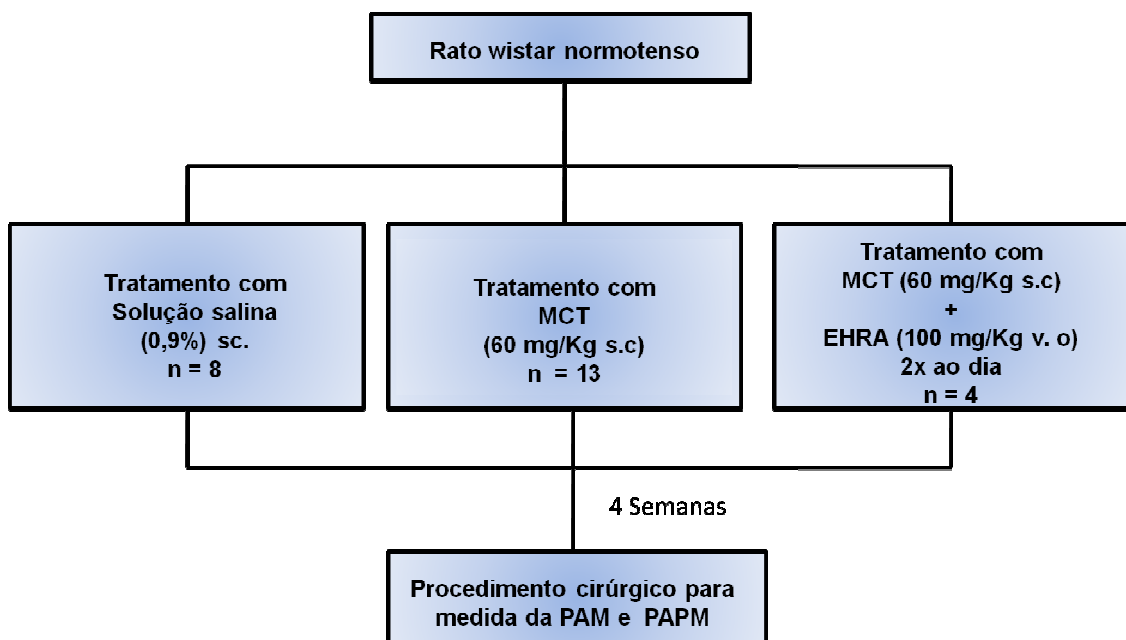
##### **4.4.2.1 Avaliação do efeito do EHRA sobre PAPM em ratos não anestesiados**

A pressão arterial pulmonar foi medida utilizando o procedimento descrito no item 4.4.1. Em seguida doses do EHRA (1, 5, 10, 20 e 40 mg/Kg) foram administradas randomicamente e os efeitos sobre a pressão pulmonar foram observados e registrados, com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores da linha de base. Os valores de PAPM foram computados antes (valores da linha de base) e após a administração do EHRA, foram expressos em valores absolutos.

##### **4.4.3 Avaliação do efeito do tratamento crônico com o EHRA sobre a PAPM em animais com hipertensão pulmonar induzida por MCT**

Os animais foram divididos em três grupos. Um grupo recebeu a injeção de solução salina (NaCl 0,9%) subcutânea. Num segundo grupo os animais receberam a injeção de MCT subcutaneamente (60 mg/Kg) em uma dose única e num terceiro grupo os animais tratados com MCT subcutaneamente receberam o EHRA via oral por gavagem orogástrica na dose de 100 mg/Kg duas vezes ao dia por 4 semanas. Nesse estudo os animais foram pesados semanalmente para avaliação do ganho ponderal.

Após um período de 4 semanas todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para a medida da PAM, como descrito anteriormente (Figura 14) Foram avaliados também os efeitos sobre a PAM nesses grupos.



**Figura 14:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do EHRA (100 mg/Kg, v.o.) sobre a PAM e a PAMP em ratos anestesiados.

#### 4.5 Análise estatística

Os valores de  $CE_{50}$  (concentração efetiva que produz 50% da resposta máxima) foram expressos como média (intervalo de confiança) e os valores de  $E_{máx}$  (resposta máximo induzida pelo extrato) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). Foram realizados os testes “t” de *Student* (pareado e não pareado) e análise de variância “one-way” (ANOVA) com o pós-teste de Bonferroni e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

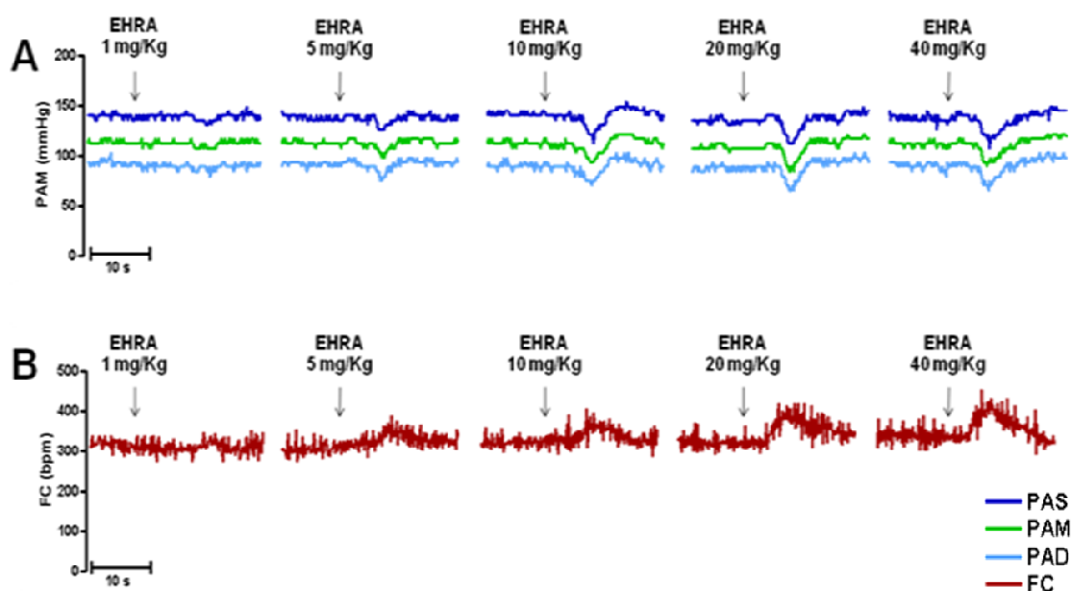
Os valores de  $CE_{50}$  foram obtidos através de regressão não-linear das curvas individuais traçadas a partir dos valores percentuais das respostas induzidas pelo EHRA para cada experimento. Para estudar o efeito vasorelaxante induzido pelo EHRA, dois parâmetros farmacológicos foram analisados: o  $E_{máx}$  e  $CE_{50}$ .

# Resultados

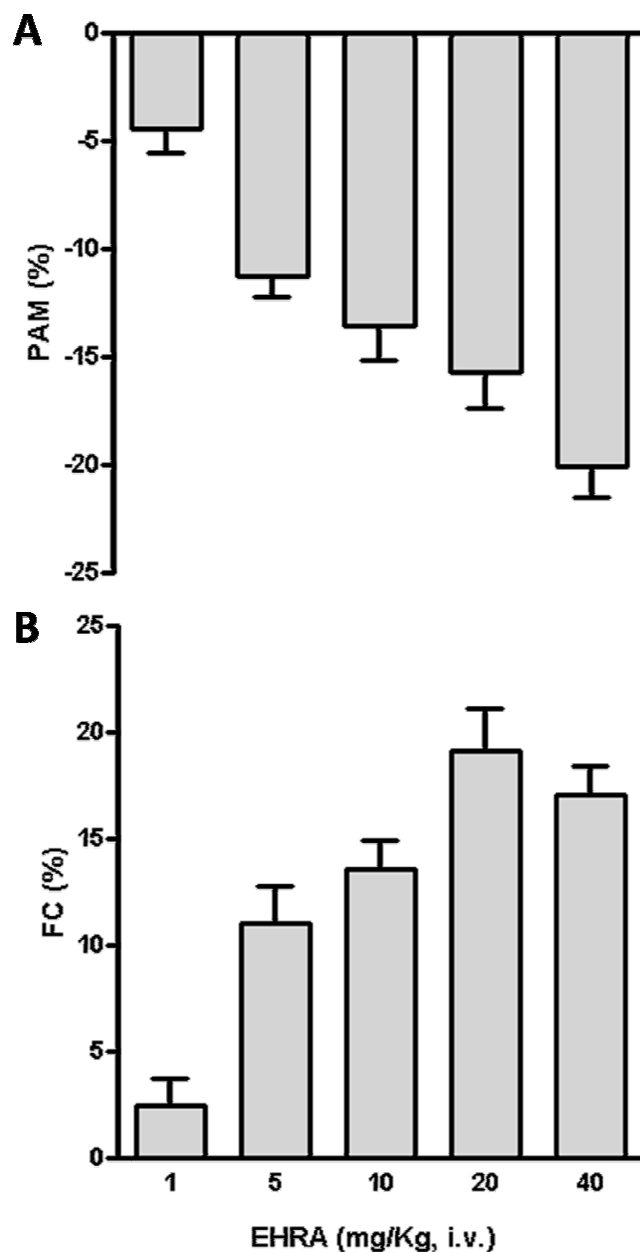
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeitos do EHRA sobre a Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) em ratos normotensos não anestesiados

Os valores basais de PAM e FC dos animais antes da administração do EHRA foram respectivamente de  $124 \pm 4$  mmHg e  $366 \pm 13$  bpm. A administração do EHRA (1; 5; 10; 20 e 40 mg/kg, i.v.) induziu uma resposta transiente caracterizada por hipotensão (% PAM =  $-4,40 \pm 1,14$ ;  $-11,3 \pm 0,96$ ;  $-13,6 \pm 1,54$ ;  $-15,7 \pm 1,6$  e  $-16,8 \pm 1,6$ , respectivamente) associada a uma taquicardia (% FC =  $2,5 \pm 1,3$ ;  $11,0 \pm 1,8$ ;  $13,6 \pm 1,4$ ;  $19,2 \pm 2,0$  e  $17,1 \pm 1,3$ , respectivamente) de maneira dependente de dose (foi realizado o teste anova “one-way” para a comparação entre os valores encontrados de % de PAM e % de FC) (n=7) (Figuras 15 A, 15 B, 16 A e 16 B).



**Figura 15:** Registro original representativo ilustrando o efeito de doses crescentes do EHRA (1; 5; 10; 20 e 40 mg/Kg, i.v.) sobre a PAS, PAM, PAD (A) e FC (B) em rato normotenso não anestesiado. As setas indicam o momento da administração do EHRA



**Figura 16:** Efeitos do EHRA sobre a Pressão Arterial Média (PAM, %) (A) e Frequência Cardíaca (FC, %) (B) em ratos normotensos não anestesiados. Os valores foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 7 experimentos.

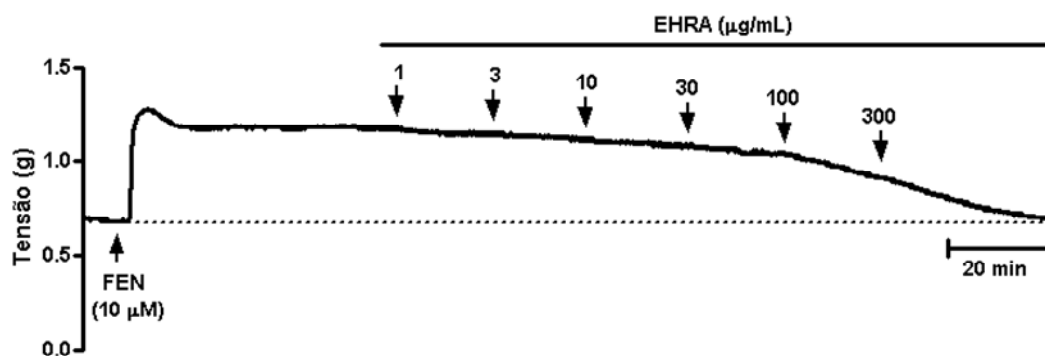
## 5.2 Efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença ou ausência do endotélio funcional

A administração cumulativa do EHRA (1 – 300 µg/mL) induziu um vasorelaxamento dependente de concentração em anéis intactos de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN (10 µM) (Figuras 17 e 18). A remoção do endotélio não alterou a resposta vasorelaxante induzida pelo EHRA, com demonstrado pelos valores de  $CE_{50}$  obtidos de artérias com endotélio intacto ( $CE_{50} = 51,47$  (44,48 - 59,56), µg/mL n=4) e artérias em que o endotélio foi removido ( $CE_{50} = 50,34$  (44,07 – 57,51) µg/mL, n=6). Também, a percentagem de relaxamento máximo ( $E_{máx}$ ) induzida pelo EHRA não foi alterada pela remoção do endotélio, os valores de  $E_{máx}$  foram  $98,8 \pm 10,68\%$  e  $98,43 \pm 5,65\%$  para artérias com ou sem o endotélio funcional, respectivamente (Figura 18).

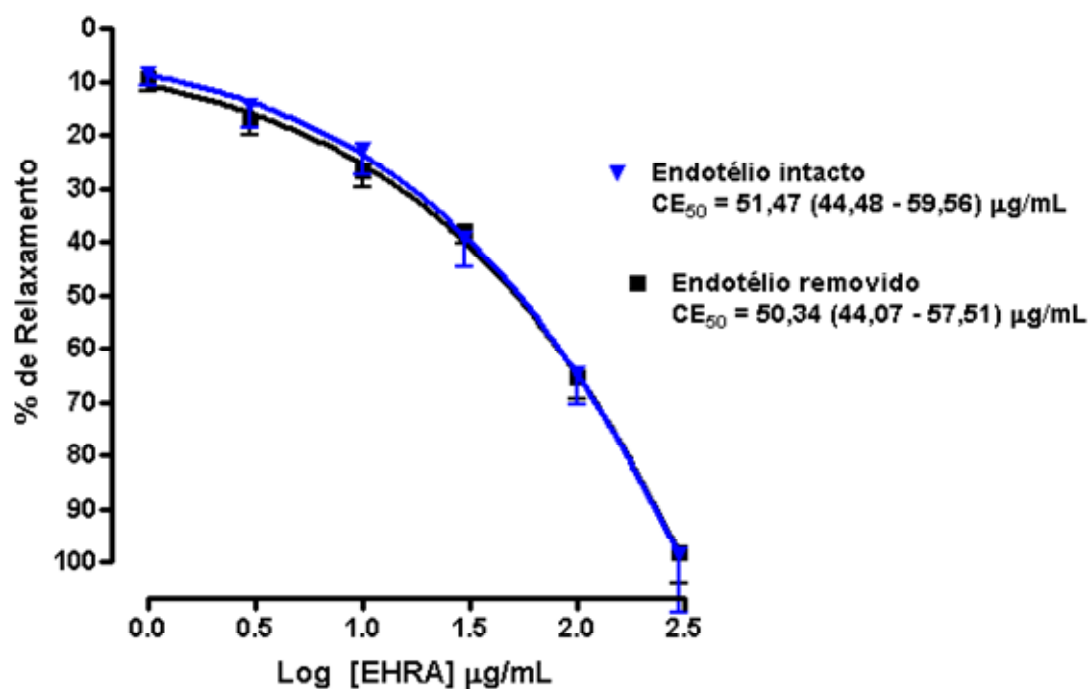
O tempo necessário para que fossem obtidas as respostas máximas para cada concentração do EHRA variou entre 15 e 20 min. No final dos experimentos, a reversão do relaxamento produzido pelo EHRA foi obtida após 1 hora de sua retirada das cubas através da troca de solução de Tyrode e verificação da responsividade do tecido a FEN (10 µM). A reversibilidade foi rotineiramente observada para assegurar que o relaxamento não foi devido a alterações na contractilidade do tecido (dados não mostrados).

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





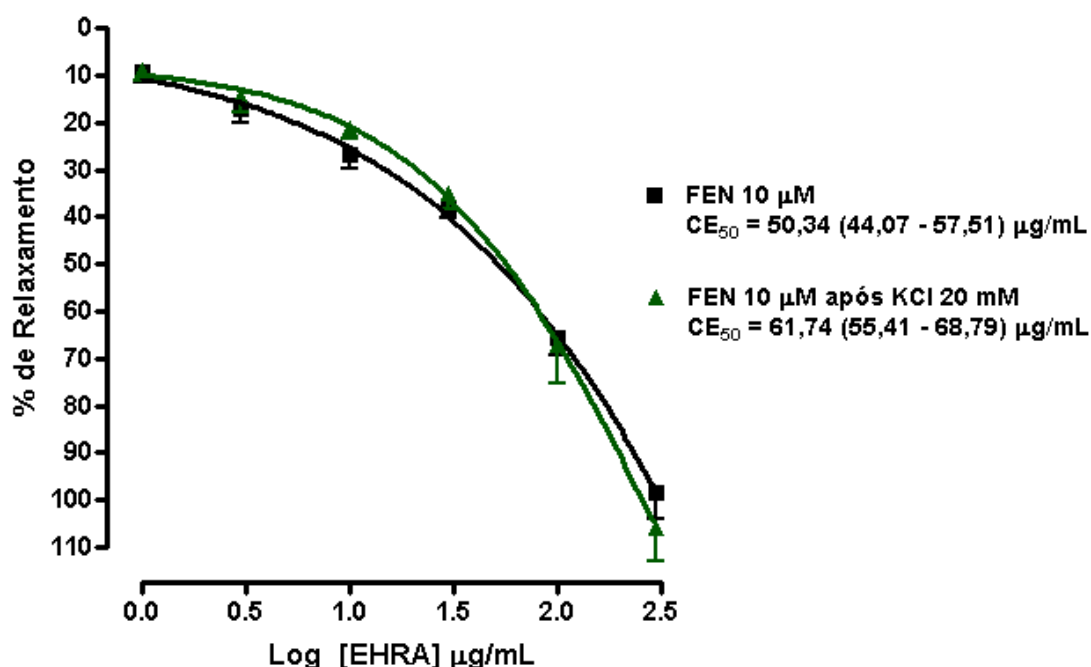
**Figura 17:** Registro original representativo ilustrando o efeito de concentrações crescentes do EHRA (1 - 300 µg/mL) sobre a contração induzida por FEN 10 µM.



**Figura 18:** Curvas concentração-resposta para o EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN (10 µM). Os valores de CE<sub>50</sub> estão expressos como média (intervalo de confiança), n = 4 - 6.

### 5.3 Efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por FEN na presença de KCl 20 mM em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional

Para avaliarmos a participação de canais para  $K^+$  na resposta vasorelaxante induzida pelo EHRA realizamos estudos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN ( $10 \mu\text{M}$ ), na presença de solução de KCl 20 mM. A curva concentração-resposta para EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-tratados com KCl 20 mM está representada na figura 19. O bloqueio parcial do efluxo de  $K^+$  com o aumento da concentração  $K^+$  extracelular ( $[K^+]_e$ ) para 20 mM não alterou significativamente o vasorelaxamento dependente de concentração induzido pelo EHRA ( $1 - 300 \mu\text{g/mL}$ ) ( $CE_{50} = 61,74 (55,41 - 68,79) \mu\text{g/mL}$  e  $E_{m\acute{a}x} = 105,76 \pm 7,39 \% n = 6$ ).

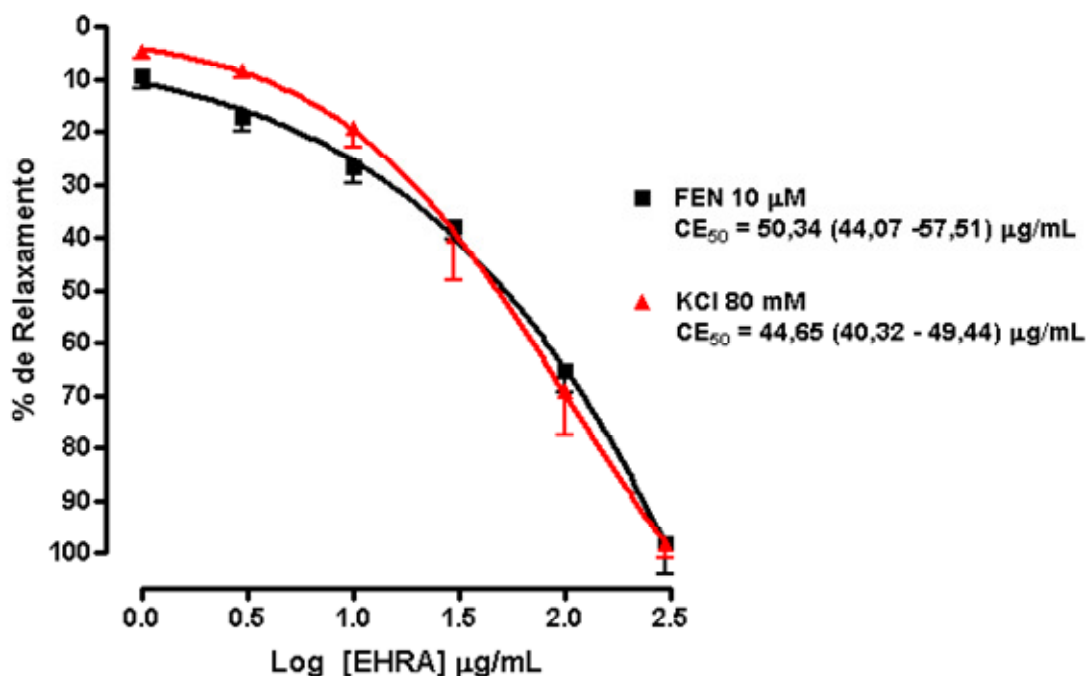


**Figura 19:** Curvas concentração-resposta para o EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional na presença de  $[K^+] = 4$

mM ou  $[K^+] = 20$  mM pré-contraídos com fenilefrina ( $10 \mu\text{M}$ ). Os valores de  $CE_{50}$  estão expressos como média (intervalo de confiança),  $n = 6$ .

#### 5.4 Efeito do EHRA sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, pré-contraídos com KCl 80 mM

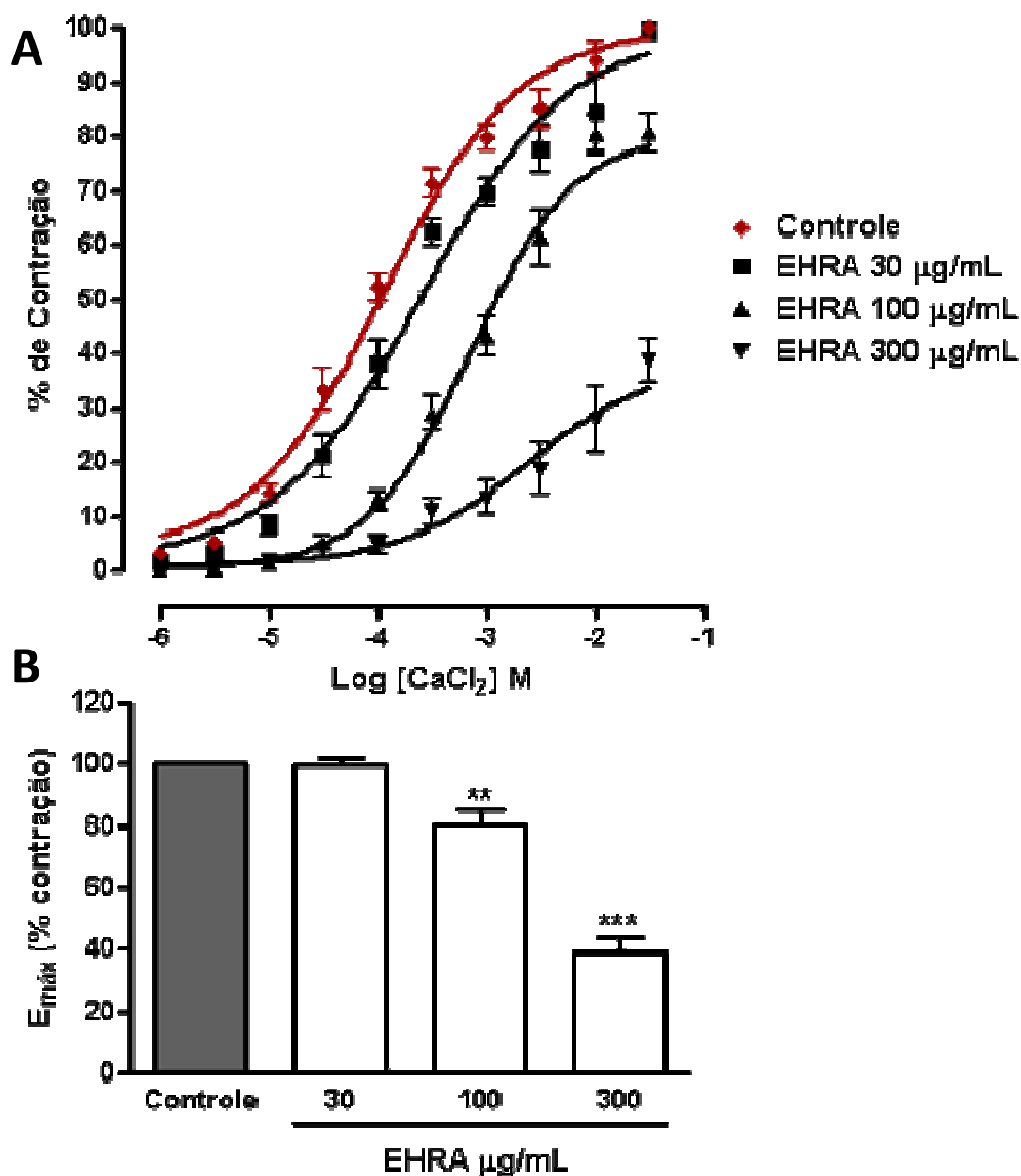
EHRA ( $1 - 300 \mu\text{g/mL}$ ) induziu vasorelaxamento dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 80 mM). A curva concentração-resposta para EHRA, em anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com KCl 80 mM não foi alterada na presença desse agente contracturante como pode ser observado na figura 20 ( $CE_{50} = 44,65 (40,32 - 49,44) \mu\text{g/mL}$   $n = 4$ ) e  $E_{\text{máx}} = 98,34 \pm 2,67 \%$ ), quando comparado aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN ( $10 \mu\text{M}$ ) ( $CE_{50} = 50,34 (44,07 - 57,51) \mu\text{g/mL}$ ,  $n=6$ ) e  $E_{\text{máx}} = 98,43 \pm 5,65 \%$ .



**Figura 20:** Curvas concentração-resposta para o EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina ( $10 \mu\text{M}$ ) ou KCl 80 mM. Os valores de  $CE_{50}$  estão expressos como média (intervalo de confiança),  $n = 4 - 6$ .

### **5.5 Efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por CaCl<sub>2</sub> em meio despolarizante e nominalmente sem Ca<sup>2+</sup> em anéis de artéria mesentérica isolada de rato, sem endotélio funcional**

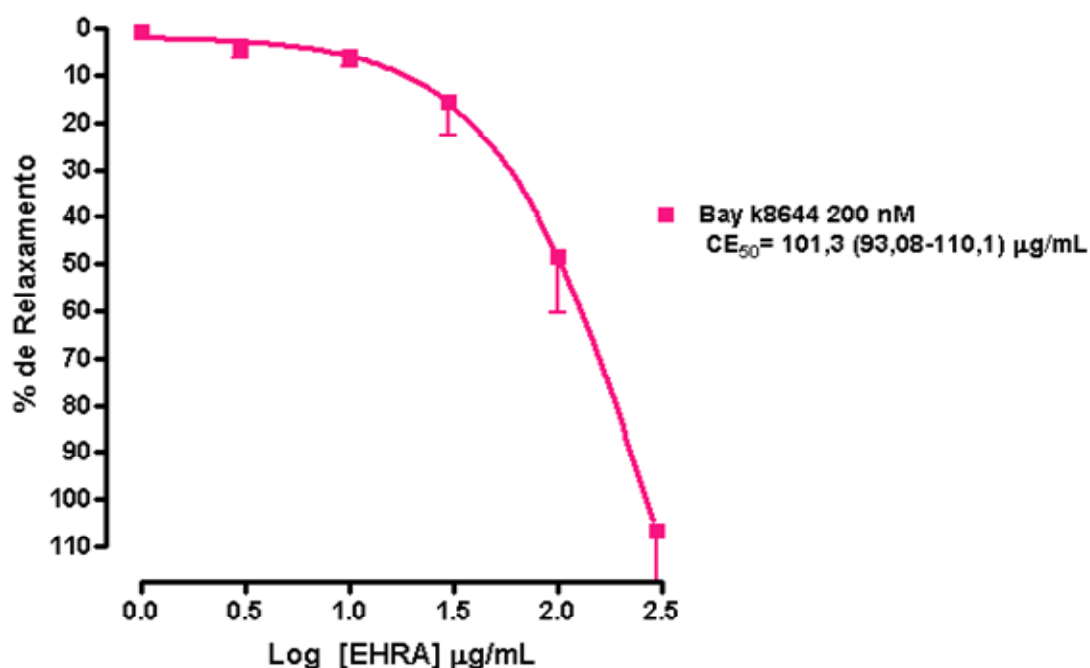
A administração cumulativa de CaCl<sub>2</sub> ( $10^{-6}$  -  $3 \times 10^{-2}$  M) promoveu uma contração dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional incubados com solução despolarizante (KCl 60 mM) e nominalmente sem Ca<sup>2+</sup>. Quando os anéis foram incubados com EHRA (100 ou 300 µg/mL) a contração induzida por CaCl<sub>2</sub> foi significativamente reduzida de maneira dependente de concentração. No entanto, concentração de 30 µg/mL não foi capaz de inibir as contrações induzidas por CaCl<sub>2</sub> (Figura 21A). EHRA na concentração de 300 µg/mL inibiu cerca de 62% da contração induzida por CaCl<sub>2</sub>, sendo este o efeito máximo observado com o extrato em estudo (Figura 21B).



**Figura 21:** Curvas concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$  em solução despolarizante (KCl 60mM) nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, na ausência (controle) e na presença de concentrações isoladas do EHRA (30, 100 ou 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (A) e valores de  $E_{\text{máx}}$  (B) para os resultados obtidos na ausência (controle) e na presença do extrato. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. ,  $n = 8-11$ .

### 5.6 Efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional

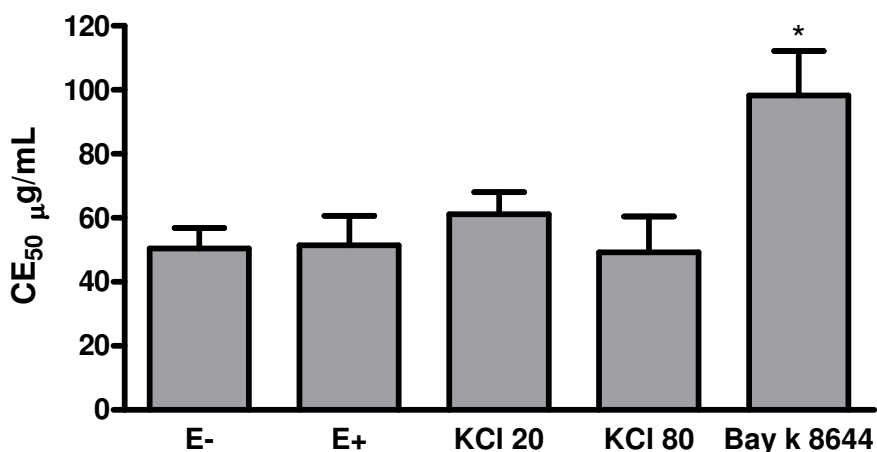
A administração cumulativa do EHRA (1 – 300 µg/mL) induziu um vasorelaxamento dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (200 nM) ( $CE_{50} = 101,3 (93,08 - 110,1) \mu\text{g/mL}$  e  $E_{\text{máx}} = 106,69 \pm 11,93 \%$ , n=5) (Figura 22).



**Figura 22:** Curva concentração-resposta para o EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional pré-contraídos com S(-)-Bay k 8644 (200 nM). Os valores de  $CE_{50}$  estão expressos como média (intervalo de confiança), n = 5.

Quando comparamos os valores de  $CE_{50}$  observamos que não há diferença nos resultados encontrados para o relaxamento induzido pelo EHRA

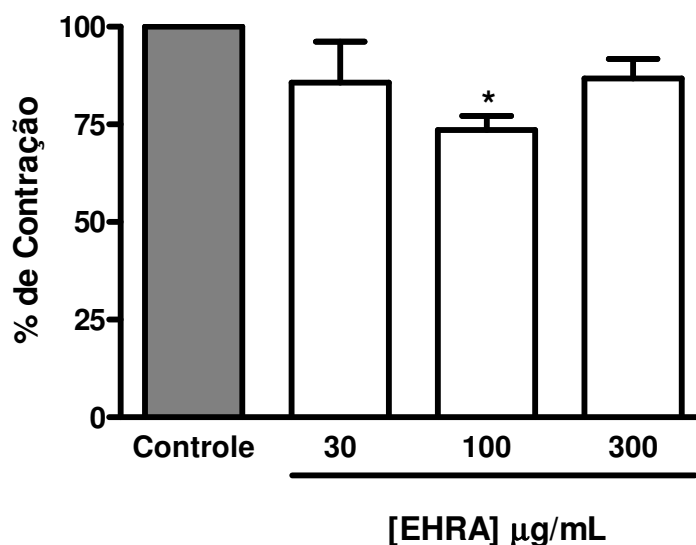
nas diferentes condições experimentais, com exceção do Bay k 8644 que é diferente significativamente dos demais grupos (Figura 23).



**Figura 23:** Valores de CE<sub>50</sub> para o EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato em diferentes condições experimentais, \*p< 0,05 vs demais grupos.

### 5.7 Efeito do EHRA sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 µM) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Em meio livre de Ca<sup>2+</sup>, as contrações transientes induzidas por FEN (10 µM) não foram modificadas na presença de concentrações isoladas de EHRA (30 e 300 µg/mL). No entanto, houve diferença estatística na concentração de 100 µg/mL do EHRA (Figura 24).

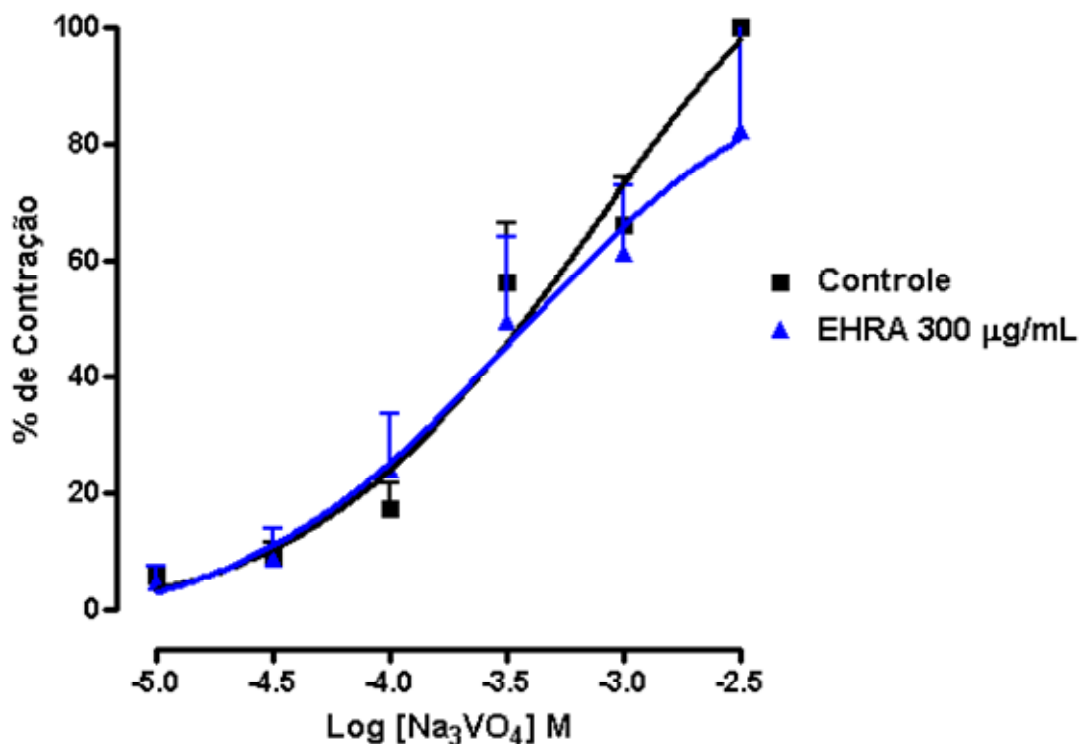


**Figura 24:** Efeito do EHRA (30, 100 e 300 µg/mL) sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 µM) em anéis de artéria mesentérica superior de rato, sem endotélio funcional. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. n = 4 - 6

### 5.8 Efeito do EHRA sobre as contrações induzidas por $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ( $10^{-5}$ – $3 \times 10^{-5}$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

A adição cumulativa de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ( $10^{-5}$  –  $3 \times 10^{-5}$  M) induziu contração de maneira dependente de concentração. Após as lavagens, uma segunda contração foi obtida (experimento controle), obtendo-se o mesmo nível de contração, (dados não mostrados). A reversão aconteceu após um período de 1 hora. Nos experimentos realizados na presença do EHRA (300 µg/mL), não houve alteração do efeito máximo para a contração induzida pelo ortovanadato. (Figura 25).

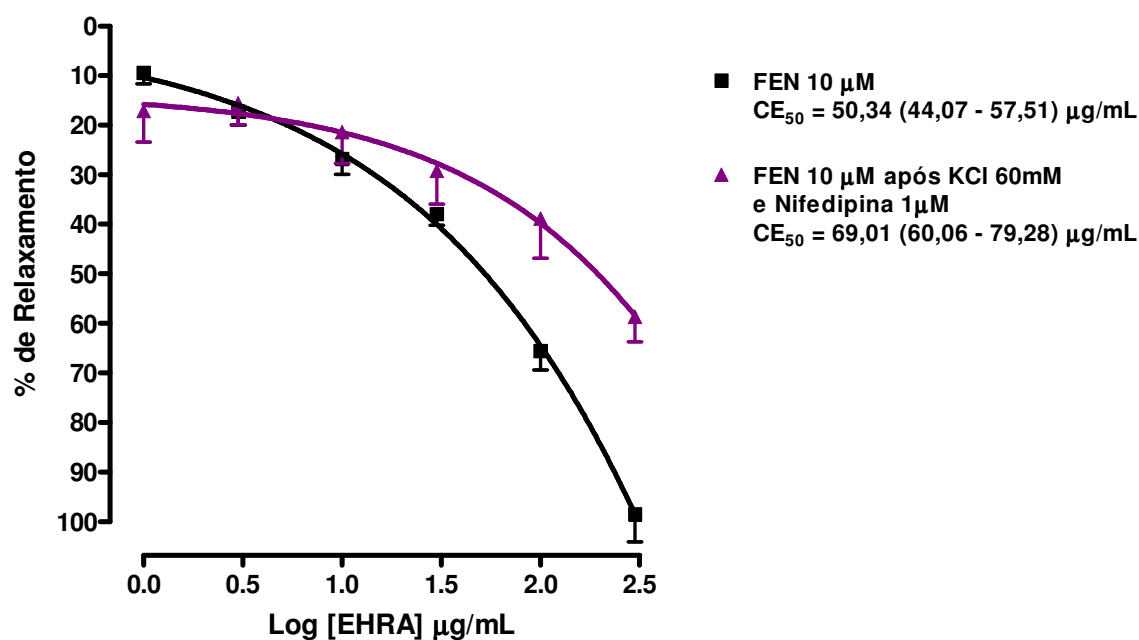




**Figura 25:** Curvas concentração-resposta para ortovanadato ( $10^{-5}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) na ausência (controle) e presença do EHRA (300  $\mu\text{g/mL}$ ), em artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m, n= 5.

### 5.9 Efeito do EHRA sobre a contração induzida por fenilefrina na presença nifedipina e KCl 60 mM.

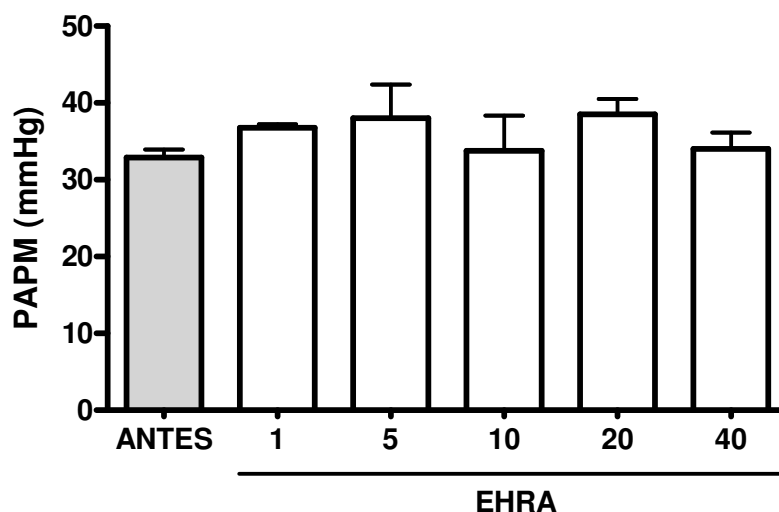
O relaxamento induzido pelo EHRA em anéis pré-contraídos com FEN (10  $\mu\text{M}$ ) na presença de solução de KCl 60 mM e nifedipina (1 $\mu\text{M}$ ) foi significativamente atenuado com diferenças significantes nos valores da  $CE_{50}$  ( $p < 0,05$ ) e  $E_{m\acute{a}x}$  ( $p < 0,001$ ) ( $CE_{50} = 69,01$  (60,06 – 79,28  $\mu\text{g/mL}$ ) ( $E_{m\acute{a}x} = 58,69 \pm 5,04$  %) quando comparado ao resultado encontrado nos experimentos realizados apenas na presença da FEN (10  $\mu\text{M}$ ) ( $CE_{50} = 50,34$  (44,07 – 57,51)  $\mu\text{g/mL}$ , n=6) e  $E_{m\acute{a}x} = 98,43 \pm 5,65$  % (Figura 26).



**Figura 26:** Curvas concentração-resposta para o EHRA em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina (10 µM) na ausência (controle) e na presença de KCl 60 mM e nifedipina 1 µM. Os valores de CE<sub>50</sub> estão expressos como média (intervalo de confiança), n = 6.

### 5.10 Efeito da administração aguda de EHRA sobre a PAPM em animais normotensos anestesiados

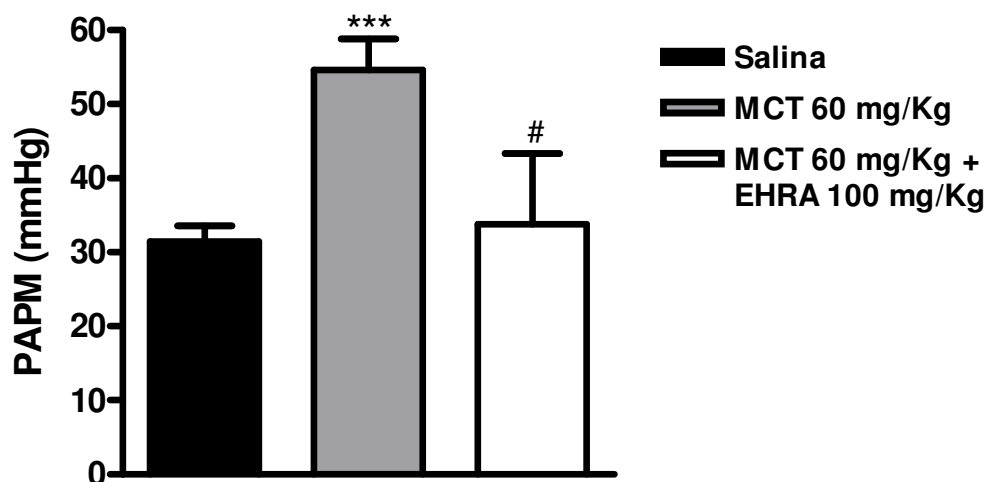
Nesse experimento foi avaliada a PAPM em animais normotensos anestesiados antes e após a administração intravenosa aguda do EHRA. Com a adição do EHRA (1, 5, 10, 20 e 40 mg/Kg) não houve alterações significantes sobre a PAPM dos ratos (PAPM mmHg = 37 ± 0,47; 38 ± 4,7; 34 ± 4,5; 38 ± 2 e 34 ± 2, respectivamente) quando comparados com os valores antes da administração do extrato (PAPM mmHg = 33 ± 1), (Figura 27).



**Figura 27:** Efeitos da administração aguda do EHRA (1, 5, 10, 20 e 40 mg/Kg, i.v.) sobre a Pressão Arterial Pulmonar Média (PAPM, mmHg) em ratos normotensos anestesiados. Os valores foram expressos como média  $\pm$  e.p.m.,  $n = 4$ .

### 5.11 Efeito da administração crônica do EHRA sobre a Pressão Arterial Pulmonar Média em animais anestesiados pré-tratados com monocrotalina

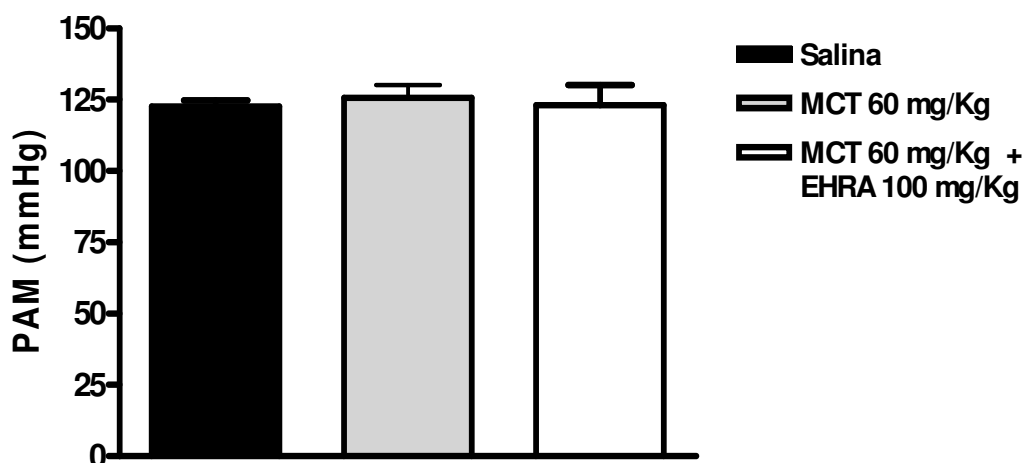
A MCT foi capaz de induzir hipertensão pulmonar, como observado nos valores da PAPM encontrados para os animais tratados com MCT ( $54,6 \pm 4,2$  mmHg), comparados com aqueles encontrados para os animais com PAPM normais ( $31,4 \pm 2,1$  mmHg). Os resultados foram significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ). O tratamento crônico com o EHRA na dose de 100 mg/kg via oral 2 vezes ao dia durante 28 dias foi capaz de diminuir significativamente ( $p < 0,05$ ) a PAPM ( $33,7 \pm 9,57$  mmHg) quando comparado com os resultados dos animais com hipertensão pulmonar induzida pela MCT (60 mg/kg s.c.) (Figura 28).



**Figura 28:** Efeitos do tratamento crônico (28 dias) com EHRA (100 mg/Kg, v.o.) sobre a Pressão Arterial Pulmonar Média (PAPM, mmHg) de animais tratados com monocrotalina (60 mg/ Kg s.c.). Os valores foram expressos como média  $\pm$  e.p.m., n = 4 (\*\*p < 0,001 vs salina; #p < 0,05 vs MCT).

### 5.12 Efeito da administração crônica do EHRA sobre a Pressão Arterial Sistêmica Média em animais anestesiados pré-tratados com monocrotalina

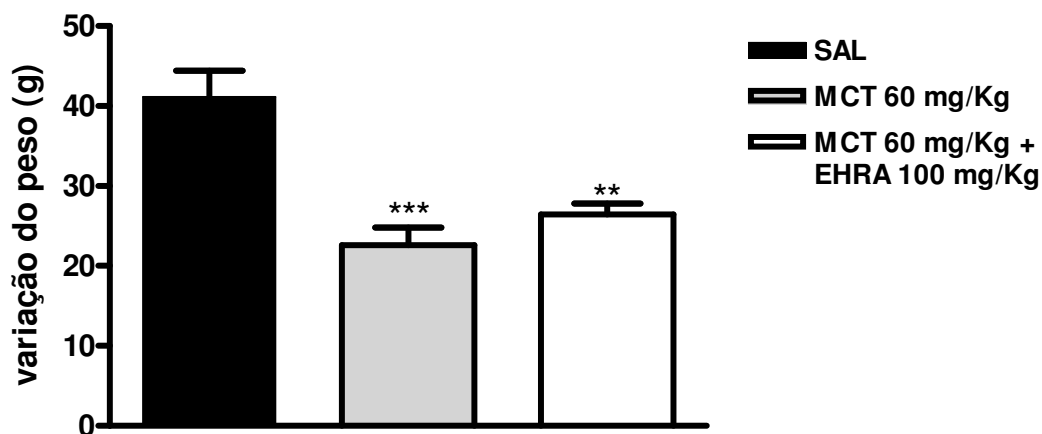
A MCT não causou alterações na PAM ( $125,7 \pm 4,5$  mmHg) quando comparados com os valores da PAM dos animais tratados com salina ( $122,7 \pm 2,12$  mmHg). O tratamento crônico com o EHRA na dose de 100 mg/kg via oral 2 vezes ao dia durante 28 dias não foi capaz de alterar significativamente a PAM ( $123,0 \pm 7,1$  mmHg) quando comparado com os resultados dos animais dos demais grupos (Figura 29).



**Figura 29:** Efeito do tratamento crônico (28 dias) com EHRA (100 mg/Kg, v.o.) sobre a Pressão Sistêmica Arterial Média (PAM, mmHg) de animais tratados com monocrotalina (60 mg/ Kg s.c.). Os valores foram expressos como média  $\pm$  e.p.m., n = 4.

### 5.13 Efeito da administração crônica do EHRA sobre o peso corpóreo de animais pré-tratados com monocrotalina

Os animais tratados com salina tiveram um ganho de peso durante os 28 dias de observação de  $41,2 \pm 3,2$  g. O tratamento com uma única dose de MCT (60 mg/Kg, s.c.) induziu uma diminuição do ganho de peso ( $22,6 \pm 2,2$  g) em relação ao grupo tratado com salina. No grupo tratado com MCT (60 mg/Kg, s.c.) que recebeu o EHRA na dose de 100 mg/kg via oral 2 vezes ao dia durante 28 dias também houve um menor ganho ponderal ( $26,5 \pm 1,3$  g), não sendo extrato capaz de inibir o efeito da MCT sobre esse parâmetro (Figura 30).



**Figura 30:** Efeito do tratamento crônico (28 dias) com EHRA (100 mg/Kg, v.o.) sobre a variação do peso corpóreo de animais tratados com monocrotalina (60 mg/ Kg s.c.). Os valores foram expressos como média  $\pm$  e.p.m., n = 4 (\*\*p < 0,05 vs salina; \*\*\*p < 0,001 vs salina).

# Discussão

## 6 DISCUSSÃO

Os principais resultados deste estudo foram que o extrato hidroalcoólico de *Ruellia asperula* tem atividade hipotensora em ratos normotensos não anestesiados, induz vasorelaxamento em artéria mesentérica superior isolada de rato e promove inibição da instalação da hipertensão pulmonar no modelo de hipertensão pulmonar induzida pela monocrotalina através do tratamento crônico via oral, sem alterar a pressão arterial média sistêmica, mas levando a uma diminuição no ganho de peso desses animais. Além disso o EHRA não altera a pressão arterial pulmonar média em animais normotensos de maneira aguda pela administração intravenosa. O efeito relaxante induzido pelo EHRA parece ser mediado por uma inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  através dos  $Ca_v$ , levando a uma diminuição da  $[Ca^{2+}]_i$  e conseqüente relaxamento do músculo liso vascular, além disso, os resultados sugerem que não só esse mas, um segundo mecanismo pode ainda ter participação no efeito vasorelaxante, o qual ainda deve ser elucidado, haja vista que o EHRA promoveu relaxamento em anéis previamente tratados com bloqueador desses canais. Estudos posteriores serão necessários para melhor esclarecer esse mecanismo.

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

Em animais normotensos não anestesiados a administração aguda do EHRA levou a uma resposta transiente de maneira dependente de dose,



caracterizada por uma hipotensão associada a uma taquicardia provavelmente de origem reflexa, assim, possivelmente, o EHRA estaria agindo sobre a resistência periférica, através do relaxamento vascular para causar hipotensão.

Como a pressão arterial média é o produto da resistência periférica vascular pelo débito cardíaco, resolvemos avaliar se a hipotensão induzida pelo EHRA envolveria a participação do relaxamento vascular no modelo de artéria mesentérica superior isolada de rato. Como resultado tivemos que o EHRA foi capaz de induzir relaxamento desse vaso na presença da fenilefrina (10  $\mu$ M) (um agonista  $\alpha$ -1 adrenérgico), sugerindo que a hipotensão causada pelo EHRA provavelmente ocorre através da diminuição da resistência periférica vascular.

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

liberados pelo endotélio vascular, mas provavelmente devido a um efeito direto do extrato sobre o músculo liso arterial.

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

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

Baseado na importância dos canais para  $K^+$  na regulação de funções vasculares resolvemos avaliar a participação destes canais na resposta vasorelaxante induzida pelo EHRA utilizando preparações incubadas com KCl 20 mM, condição em que promove bloqueio parcial do efluxo de  $K^+$  e atenua desta forma relaxamentos mediados por abertura de canais para  $K^+$  (GURNEY, 1994; CLARK; FUCHS, 1997). O EHRA causou vasorelaxamento nas preparações onde os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato foram pré-contraídos com FEN na presença de KCL 20 mM. O fato do efeito vasorelaxante induzido pelo EHRA não ter sido alterado nessa condição sugere que a resposta relaxante induzida pelo EHRA parece não envolver estes canais.

Com a finalidade de observar a resposta do EHRA frente a contrações geradas por um diferente estímulo, passamos a avaliar o efeito do EHRA em preparações pré-contraídas com solução despolarizante de KCl 80 mM. Já é bem descrito na literatura que contrações induzidas por altas concentrações de

K<sup>+</sup>, nas células de músculo liso, são mediadas por uma despolarização de membrana e um aumento do influxo de Ca<sup>2+</sup> através dos Ca<sub>v</sub> (GODFRAND; KABA, 1969; SOMLYO; SOMLYO, 1994). Este é um passo em comum da contração gerada por agonistas de receptores acoplados a proteína Gq/11 (ex. FEN), em células de musculo liso, onde a contração é resultado da mobilização de ambos Ca<sup>2+</sup> intracelular e extracelular (KITAZAWA; MASUO; SOMLYO, 1991; KARAKI et al., 1997). O EHRA foi capaz de relaxar as contrações induzidas por altas concentrações de K<sup>+</sup> de maneira semelhante à contração induzida por FEN. Esse resultado sugere que o efeito vasorelaxante induzido pelo EHRA possa envolver o bloqueio de canais para Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem.

Para verificar a hipótese de que o EHRA estaria bloqueando o influxo de Ca<sup>2+</sup> através dos Ca<sub>v</sub>, avaliou-se o efeito do extrato frente às contrações induzidas por CaCl<sub>2</sub>, em meio despolarizante nominalmente sem Ca<sup>2+</sup>. Este protocolo experimental baseia-se no fato de que as contrações são geradas, quase que exclusivamente, pelo influxo de Ca<sup>2+</sup>, já que a despolarização promovida por concentração elevada de K<sup>+</sup> extracelular induz a abertura dos Ca<sub>v</sub>. O EHRA antagonizou de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por CaCl<sub>2</sub> nas duas maiores concentrações.

Esses resultados em conjunto, sugerem que o efeito vasorelaxante induzido pelo EHRA pode ser devido a uma possível inibição dos Ca<sub>v</sub> resultando em uma diminuição no influxo de Ca<sup>2+</sup> no músculo liso de artéria mesentérica superior de rato.

As células musculares lisas vasculares expressam dois tipos principais de Ca<sub>v</sub>, os Ca<sub>v</sub>1 (tipo-L) e os Ca<sub>v</sub>3 (tipo-T). Os Ca<sub>v</sub>1 (tipo-L), mais recentemente referidos como Ca<sub>v</sub> 1.2 (CATERRAL et al., 2005), são os mais expressos, desta forma, exercendo um papel importante na determinação da pressão sanguínea sendo seus bloqueadores uma importante classe de drogas anti-hipertensivas (CRIBBS, 2006).

Com o intuito de avaliar o subtipo de Ca<sub>v</sub> envolvido na resposta vasorelaxante induzida pelo EHRA, analisou-se seu efeito sobre as contrações tônicas induzidas pelo derivado diidropiridínico S(-)-Bay K 8644, um ativador seletivo dos Ca<sub>v</sub>1 tipo-L (SCHRAMM et al., 1983). EHRA causou relaxamento das contrações tônicas induzidas por S(-)-Bay K 8644 de maneira dependente

de concentração, entretanto com potência menor do que aquelas obtidas quando as contrações foram induzidas por FEN ou KCl 80 mM. Esses dados sugerem o envolvimento dos  $Ca_v$  tipo-L na resposta vasorelaxante induzida pelo EHRA, porém, não descartando o envolvimento de outros mecanismos nesta resposta.

Vários produtos naturais derivados de plantas causam vasodilatação por alterar o metabolismo do  $Ca^{2+}$  nas células de músculo liso vascular (MCNEILL; JURGENS, 2006). De fato, o aumento e a diminuição da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular são os principais sinais que iniciam respectivamente, a contração e o relaxamento musculares. O aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  em células de músculo liso vascular é principalmente controlada pelo influxo de  $Ca^{2+}$  e a mobilização de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares (KARAKI et al., 1997).

O bloqueio dos  $Ca_v$  é apenas um dos mecanismos que podem levar ao relaxamento. Como foi observado, o efeito vasorelaxante do EHRA é mediado pela inibição do influxo de cálcio através desses canais e que a ativação dos canais para potássio não está envolvida nessa resposta. No entanto pôde ser observado nos resultados que este não era o único mecanismo de vasorelaxamento do EHRA. Resolvemos avaliar se outros mecanismos estariam envolvidos no efeito vasorelaxante de EHRA. Para isso realizamos um experimento no qual a participação desses mecanismos está inibida utilizando para isto uma solução de alto potássio que leva à inibição dos canais para potássio e em seguida utilizamos a nifedipina para inibir a participação dos  $Ca_v$ . Este último procedimento levou a um relaxamento mediado pela inibição desses canais. A solução de KCl 60 mM teve como objetivo adicional evidenciar a atividade da nifedipina que foi confirmada com o relaxamento da contração induzida pelo KCl 60 mM. Em seguida foi testado o EHRA sob essas condições frente a uma contração induzida pela fenilefrina. Como resultado observamos que o EHRA foi capaz de induzir relaxamento, mas com uma menor potência. Isto sugere que o relaxamento induzido pelo EHRA envolve outros mecanismos além da inibição do influxo de cálcio.

Tem sido bem documentado que a mobilização de  $Ca^{2+}$  está envolvida na resposta vascular de muitas substâncias vasoativas. O inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ) foi reconhecido como o primeiro mensageiro secundário a mediar

respostas vasculares de vários agonistas tais como noradrenalina, angiotensina II, vasopressina, endotelina, tromboxano A<sub>2</sub> e outros (ZHANG; LI, 2006). Nesta via de sinalização, agonistas atuando através dos seus respectivos receptores levam à ativação da fosfolipase C<sub>β</sub>, via da proteína G<sub>q/11</sub>, a qual converte fosfatidilinositol-4, 5,-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em IP<sub>3</sub> e diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> induz a liberação de Ca<sup>2+</sup> através dos receptores sensíveis ao IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) no retículo sarcoplasmático levando a um aumento do [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (THORNELOE; NELSON, 2005). Os eventos de liberação de Ca<sup>2+</sup> mediados por IP<sub>3</sub>R são chamados “puffs” de Ca<sup>2+</sup> (THORNELOE; NELSON, 2005).

Existem muitos agonistas ou estímulos que induzem a liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares independente da via do IP<sub>3</sub>, por exemplo a cafeína, a rianodina e o próprio Ca<sup>2+</sup>, que induzem a mobilização de Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático através da ativação dos receptores de rianodina (RYR). Os RYRs são canais para Ca<sup>2+</sup>, análogos aos IP<sub>3</sub>Rs, presentes na membrana do retículo sarcoplasmático que são abertos por ligação do Ca<sup>2+</sup> em um sítio citoplasmático do canal (THORNELOE; NELSON, 2005). Os eventos de liberação de Ca<sup>2+</sup> mediados por RYRs são chamados “sparks” de Ca<sup>2+</sup> (JAGGAR et al., 2000).

Baseado na importância dos sinais de Ca<sup>2+</sup> gerados por IP<sub>3</sub>Rs e RYRs para as funções vasculares resolvemos avaliar a participação da mobilização de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares sensíveis a IP<sub>3</sub> na resposta vasorelaxante induzida pelo EHRA. Para isso, foram geradas contrações transientes induzidas por 10 μM FEN em meio livre de Ca<sup>2+</sup>. Nestas condições, essas contrações são mediadas apenas via a liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares. A incubação do EHRA, nas mesmas condições, não alterou as contrações transientes induzidas por FEN, havendo diferença estatística apenas na concentração de 100 μg/mL o que não é sugestivo de mecanismo de vasorelaxamento já que ocorreu numa concentração isolada do EHRA. Esses resultados sugerem que o EHRA provavelmente não interfere com a mobilização de Ca<sup>2+</sup> induzida por IP<sub>3</sub> (ativada pela FEN). Em estudos posteriores serão realizados experimentos para avaliar o efeito do EHRA sobre os RYRs.

A ativação da cinase da cadeia leve de miosina dependente de cálcio e o estado de fosforilação da cadeia leve de miosina são regulados pela fosfatase da cadeia leve de miosina, que remove a ligação fosfato de alta energia da cadeia leve de miosina para promover o relaxamento do músculo liso. São três subunidades da fosfatase da cadeia leve de miosina: uma de 37 kDa, que é a subunidade catalítica, uma de 20 kDa, que é uma subunidade variável, e uma de 110 a 130 kDa, que é a subunidade de ligação à miosina. A subunidade de ligação à miosina, quando fosforilada, inibe a atividade enzimática da fosfatase da cadeia leve de miosina, permitindo que a cadeia leve de miosina permaneça fosforilada, deste modo promovendo contração. A pequena proteína G RhoA e seu alvo abaixo na cascata, Rho cinase, têm um importante papel na regulação da atividade da fosfatase da cadeia leve de miosina. Rho cinase, uma cinase de resíduos de serina e treonina, fosforila a subunidade de ligação da fosfatase da cadeia leve de miosina, inibindo sua atividade e assim promovendo o estado fosforilado da cadeia leve de miosina. A inibição da Rho cinase induz relaxamento em segmentos de músculo liso contraídos com diferentes agonistas. No animal intacto, os inibidores farmacológicos da Rho cinase causam relaxamento do músculo liso arterial, resultando na diminuição da pressão arterial. Inibidores farmacológicos seletivos dessas proteínas têm sido desenvolvidos e são agora amplamente utilizados experimentalmente para investigar o papel dessa via de sinalização na função vascular. Rho e Rho-cinase têm atraído crescente interesse como um resultado de emergentes evidências para seus papéis na patogênese de várias desordens cardiovasculares, incluindo hipertensão, vasoespasmos coronariano e cerebral, aterosclerose e diabetes, e são agora considerados importantes alvos terapêuticos para o futuro. Drogas que interferem com a via Rho-Rho cinase são amplamente utilizadas na pesquisa de novas drogas (BUDZIN *et al.*, 2006).

Para avaliar a participação do EHRA na via Rho- Rho cinase realizamos experimento na presença do ortovanadato, que leva à inibição da fosfatase da cadeia leve de miosina. Como resultado tivemos que o EHRA não foi capaz de inibir a contração induzida pela sensibilização da maquinaria contrátil, sugerindo assim que o relaxamento induzido pelo EHRA não envolve a participação da via RhoA-Rho cinase.

As drogas que bloqueiam os canais para  $Ca^{2+}$  têm sido usadas clinicamente no tratamento de uma variedade de desordens cardiovasculares, incluindo a hipertensão (VAN ZWIETEN; JONGE; TIMMERMANS, 1983) e a hipertensão pulmonar (MOREL et al., 2003). Como o EHRA apresentou efeitos relaxantes que parecem ser mediados pela inibição desses canais, resolvemos avaliar se o extrato poderia ter efeitos sobre a pressão pulmonar em animais normotensos através da administração intravenosa do mesmo e naqueles animais com hipertensão induzida no modelo de hipertensão pulmonar induzida pela MCT, os quais receberam o extrato via oral. Admitindo-se que o volume de líquido tecidual de um rato é de 0,55 L/Kg e que o peso dos animais como de 300 g, calculamos a dose do extrato via oral de forma que estando disponíveis 10% dessa dose teríamos valores de concentração teciduais muito semelhantes aos valores de  $CE_{50}$  encontrados nas cubas nos experimentos em artéria mesentérica superior isolada de rato. Para isso, a dose escolhida foi de 100 mg/Kg do extrato, sendo administrada 2 vezes ao dia.

Nos experimentos onde o EHRA foi administrado agudamente intravenosamente, a pressão arterial pulmonar média não foi significativamente alterada. Nos animais tratados com MCT houve um aumento nos níveis da PAPM levando a um quadro de hipertensão pulmonar, sem aumento da pressão arterial média sistêmica e com diminuição no ganho de peso desses animais. Os animais tratados com MCT s.c., nos quais o EHRA foi administrado via oral, a instalação da hipertensão pulmonar foi inibida, sem alterar a pressão arterial média sistêmica, mas também houve diminuição do ganho de peso corpóreo.

Por fim, esses resultados em conjunto sugerem que o EHRA induz efeito vasorelaxante em anéis de artéria mesentérica superior de rato mediado em parte pelo bloqueio dos  $Ca_v$ , no entanto, outro mecanismo pode estar envolvido e esse efeito vasorelaxante pode ser responsável pelo efeito hipotensor observado nos experimentos *in vivo*. Além disso, EHRA causa inibição da implantação da hipertensão pulmonar no modelo de hipertensão induzida pela MCT sem alterar a PAPM nos animais normotensos tratados agudamente.

*Conclusões*



## 7 CONCLUSÕES

Como conclusões deste estudo tivemos que:

- 1) O EHRA induz hipotensão e taquicardia em ratos normotensos não anestesiados de maneira dependente da dose;
- 2) O EHRA causa vasorelaxamento, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, de maneira independente do endotélio vascular;
- 3) Parece não haver envolvimento direto de canais para  $K^+$  no relaxamento induzido pelo EHRA;
- 4) O EHRA não alterou a mobilização de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares sensíveis ao  $IP_3$ ;
- 5) O vasorelaxamento induzido pelo EHRA parece envolver inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  através dos  $Ca_v$ ;
- 6) Parte do relaxamento induzido pelo EHRA pode estar sendo mediado por outros mecanismos diferentes daqueles já investigados;
- 7) O EHRA administrado cronicamente v.o. promoveu inibição da instalação da hipertensão pulmonar no modelo induzido pela MCT, sem alterar, no entanto, a pressão pulmonar em animais normotensos tratados agudamente com o EHRA i.v.
- 8) O EHRA administrado cronicamente v.o. não causou alterações sobre a PAM, no entanto, não foi capaz de inibir a diminuição do ganho ponderal que ocorreu pelo tratamento com a MCT.

*Perspectivas*

## 8 PERSPECTIVAS

- Investigar o efeito do EHRA sobre modelos de hipertensão arterial utilizando animais espontaneamente hipertensos;
- Avaliar o efeito do EHRA sobre canais para cálcio operados por receptor e canais para cálcio operados por estoque;
- Avaliar o efeito do EHRA sobre as contrações transientes induzidas pela cafeína;
- Avaliar o efeito do EHRA sobre os  $Ca_v$  utilizando técnicas eletrofisiológicas;
- Investigar o efeito do EHRA sobre artéria pulmonar isolada de rato;
- Caracterizar o mecanismo de inibição da implantação da hipertensão pulmonar em artéria pulmonar isolada de rato;
- Testar outras doses do EHRA em animais com hipertensão pulmonar induzida pela MCT;
- Investigar os efeitos cardiovasculares dos constituintes químicos isolados do EHRA;

## Referências

## REFERÊNCIAS

ADACHI-AKAHANE, S.; CLEEMANN, L.; MORAD, M. BAY K 8644 modifies  $Ca^{2+}$  cross signaling between DHP and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. **American Journal of Physiology**, v. 276, p. H1178-H1189, 1999.

ALCÓN, S. et al. Activation of tyrosine kinase pathway by vanadate in gallbladder smooth muscle. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 1077-1089, 2000.

ALMEIDA, C. F. C. B. R. **Etnobotânica nordestina: estratégia de vida e composição química como preditores do uso de plantas medicinais por comunidades locais na caatinga**. 2004. 81f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, p.1698-1705, 1970.

BERG, T. Analysis of the pressor response to the  $K^+$  channel inhibitor 4-aminopyridine. **European Journal of Pharmacology**, v. 452, p. 325-337, 2002.

BUDZYN, K.; MARLEY, P. D.; SOBEY, C. G. Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease, **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, p. 97-104, 2006.

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

CAMPBELL, W. B. et al. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circulation Research**, v. 78, p. 415-423, 1996.

CATTERALL, W. A. et al. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. **Pharmacol Reviews**, v. 57, p. 411-425, 2005.

CHAUHAN, S. et al. NO contributes to EDHF-like responses in rat small arteries: a role for NO stores. **Cardiovascular Research**, v. 57, p. 207-216, 2003.

CLARK, S. G.; FUCHS, L. C. Role of nitric oxide and Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **J Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, p. 1473-1479, 1997.

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

CRAVO, A. B. **Frutas e ervas que curam**. 10<sup>a</sup> ed. São Paulo: Húmus, 1999.

CRIBBS, L. L. T-type Ca<sup>2+</sup> channels in vascular smooth muscle: multiple functions. **Cell Calcium**, v. 40, p. 221-230, 2006.

CUNHA, R. M. **Efeitos do óleo essencial de *Ocatea duckei* vattimo (Lauraceae) sobre parâmetros cardiovasculares de ratos**. 2004. 106f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

DAVIE, C. S. et al. Potassium channel activation and relaxation by nicorandil in rat small mesenteric arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, p. 1715-1725, 1998.

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

DORWARD, P. K. et al. 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.

ELIZABETSKY, E. New directions in ethnopharmacology. **Journal of Ethnobiology**, v. 6, p. 121, 1986.

FARBER, H. W.; LOSCALZO, J. Pulmonary Arterial Hypertension. **New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 1655-1665, 2004.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 93, p. 515-524, 1988.

GOMES, M. A. S - *Avaliação dos efeitos do Extrato Hidroalcoólico de Ruellia asperula Lindau. sobre o sistema cardiovascular em ratos*

FLUCKIGER, J. P. et al. Attenuation of baroreceptor reflex by general anesthetic agent in the normotensive rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 109, p. 105-109, 1985.

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.

GODFRAIND, T.; KABA, A. Blockade or reversal of the contraction induced by calcium and adrenaline in depolarized arterial smooth muscle, **British journal of Pharmacology** v. 36, p. 549-560, 1969.

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilatation. The **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 242-251, 1994.

HUMBERT, M.; SITBON, O.; SIMONNEAU, G. Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. The **New England Journal of Medicine**, v. 35, p. 1425-1436, 2004.

INOUE, R. et al. Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. **Circulation Research**, v. 99, p. 119-131, 2006.

JACKSON, W. F. Ion channel and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, p. 173-178, 2000.

JAGGAR, J. H. et al. Calcium sparks in smooth muscle. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 278, p. C235-C256, 2000.

KARAKI, H. et. al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 49, p. 157-230, 1997.

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

KITAZAWA, T.; MASUO, M.; SOMLYO, A. P. G protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 9307-9310, 1991.

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

LEDOUX, J. et al. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p. 69-78, 2006.

LIPSCOMBE, D.; HELTOM, T. D.; XU, W. L-type calcium channels: the low down. **Journal of Neurophysiology**, v. 92, p. 2633-2641, 2004.

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

MOREL, O. E. et. al. Effects of nifedipine-induced pulmonary vasodilatation on cardiac receptors and protein kinase C isoforms in the chronically hypoxic rat. **European Journal of Physiology**, v. 446, p. 356-364, 2003.

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

OASTES, J. A. Antihypertensive agents and the drug therapy of hypertension. In: HARDMAN, J. G. et al. **The pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. USA: McGraw-Hill, 1996. 781p.

PEREZ-REYES, E. Molecular Physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 117-161, 2003.

PONTES, R. A. S.; KAMEYAMA, C. AGRA, M. F. Flora Fanerógâmica do Pico do Jabre, Paraíba: *Acanthaceae* Juss. In: **VI ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 6, 1998, João Pessoa. Anais... João Pessoa: UFPB, 1998.

PONTES, R. A. S.; AGRA, M. F. Distribuição das espécies do gênero *Ruellia* L. (Acanthaceae) nos estados da Paraíba e Pernambuco, Brasil. In: **VII ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 7, 1999, João Pessoa. Anais... João Pessoa: UFPB, 1999.



SALAH, A. M.; DONGMO, A. B.; KAANYI, A. et al. In vitro purgative effect of *Ruellia praetermissa*. Scieinf. ex. Lindau (Acanthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, p. 269-272, 2000.

SALAH, A. M. et al. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory effect by *Ruellia praetermissa*, **Pharmaceutical Biology**, v. 39, p. 16-19, 2001.

SALAH, A. M. et al. Estrogenic and cholinergic properties of the methanol extract of *Ruellia praetermissa* Scieinf. ex. Lindau (Acanthaceae) in female rats. **Phytomedicine**, v. 9, p. 52-55, 2002.

SHAH, M.; PATEL, K.; SEGHGAL, P. Monocrotaline pyrrole-induced endothelial cell megalocytosis involves a golgi blockade mechanism. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 288, p. C850-C862, 2005.

SCHRAMM, M. et al. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of  $Ca^{2+}$  channels. **Nature**, v. 303, p. 535-537, 1983.

SMITH, T. L.; HUTCHINS, P. M. Anesthetic effects on hemodynamics of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **The American Journal of Physiology**, v. 238, p. H539-H544, 1980.

DIRETRIZES da Sociedade Brasileira de Hipertensão, 2005. Disponível em [www.publicacoes.cardiol.br/consenso/sbc-palm/diretrizes.asp](http://www.publicacoes.cardiol.br/consenso/sbc-palm/diretrizes.asp). Acesso em: 10 jun. 2008.

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

SONKUSARE, S. et. al. Vascular calcium channel and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications. **Vascular Pharmacol**, v. 44, p. 131-142, 2006.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; TANAKA, H. et. al. 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.

GOMES, M. A. S - *Avaliação dos efeitos do Extrato Hidroalcoólico de Ruellia asperula Lindau. sobre o sistema cardiovascular em ratos*

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

TSANG, S. et al. Contribution of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger to pinacidil-induced relaxation in the rat mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 138, p. 453-460, 2003.

VANE, J. Towards a better aspirin. **Nature**, v. 367, p. 215-216, 1994.

VAN ZWIETEN, P. A.; DE JONGE, A.; TIMMERMANS, P. B. Inhibitors of the angiotensin I converting enzyme as antihypertensive drugs. **Pharmaceutisch Weekblad. Scientific edition**, v. 21, p. 197-204, 1983.

YU, F. H.; CATTERALL, W. A. The VGL-kanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. **Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment**, v. 253, p. 15, 2004.

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.

ZHANG, A. Y.; LI, P. Vascular physiology of a Ca<sup>2+</sup> mobilizing second messenger – cyclic ADP – ribose. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, p. 407-422, 2006.

ZIMPFER, M. et al. Pentobarbital alters compensatory neural and humoral mechanisms in response to hemorrhage. **The American Journal of Physiology**, v. 243, p. H713-H721, 1982.

*Anexo*



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL**

**CERTIDÃO**

João Pessoa, 29 de agosto de 2008

CEPA Nº. 0207/08

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadores: Profa. Dra. Nadja de A. Correia (orientadora); Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros (co-orientador); Maria Angélica Sátyro Gomes (mestranda).

Departamento/Setor:

Ref.: Projeto de Pesquisa: “Avaliação das atividades farmacológicas do extrato hidroalcoólico de *Ruellia asperula* (Ness) Lindau (Acanthaceae), sobre o sistema cardiovascular- estudos *in vivo* e *in vitro*.”.

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Atenciosamente,

Prof. Dr. DEMÉTRIUS ANTÔNIO MACHADO DE ARAÚJO  
Presidente em Exercício do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB

# 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](#)