

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

ÁPIO CLÁUDIO DE LIMA ASSIS

**Avaliação das ações vasculares induzidas por
warifteína em rato: estudos *in vitro***

JOÃO PESSOA – PB
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ÁPIO CLÁUDIO DE LIMA ASSIS

**Avaliação das ações vasculares induzidas por
warifteína em rato: estudos *in vitro***

Dissertação apresentada ao
**Programa de Pós Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos do CCS/ 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**

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

JOÃO PESSOA – PB
2008

ÁPIO CLÁUDIO DE LIMA ASSIS

**Avaliação das ações vasculares induzidas por warifteína em
rato:
estudos *in vitro***

Aprovado em _____ de _____ de _____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
Orientador

Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Examinadora Interna

Prof^a. Dr^a. Maria Regina de Freitas
Examinadora Externa

DEDICATÓRIA

A meus pais, **José Salgado de Assis**
e **Marli de Lima Assis**, por todo amor
que me dão!

A minha irmã, **Larissa de Lima Assis**,
pelo carinho e apoio!

A minha namorada, **Renata Pereira**
Costa de Lima, por estar sempre ao
meu lado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, a **Deus**, por estar sempre comigo, iluminando minha vida, enchendo-a de amor, paz e conquistas!

A meus amados pais, **José Salgado de Assis e Marli de Lima Assis**, pessoas estas que me amam profundamente e que fazem de tudo para me ver feliz!

A minha querida irmã, **Larissa de Lima Assis**, que está sempre me incentivando a crescer e a ser feliz e com quem posso contar sempre!

A minha avó (in memorium), **Maria do Bom Sucesso Salgado de Assis**, que me apoiou e me incentivou a fazer este mestrado!

A minha querida aluna de Iniciação Científica e namorada, **Renata Pereira Costa de Lima**, que está sempre ao meu lado, dividindo alegrias e tristezas e fazendo-me muito feliz!

Aos meus sogros, **Edilza Pereira e Antônio Lourenço**, pela confiança e apoio que sempre me dão!

A **profª Drª. Darizy Flávia**, por toda ajuda prestada neste trabalho!

A minha outra aluna de Iniciação Científica, **Mônica Moura de Almeida**, que não poupou esforços para me ajudar!

Às professoras **Dra. Margareth de Fátima e Maria Regina de Freitas**, pela colaboração que me deram para meu trabalho se tornar melhor!

A todos os alunos da **minha turma de mestrado**, pelos bons momentos que passamos juntos!

A todos os que compõem o **laboratório de Farmacologia Cardiovascular**, pela ajuda, compreensão e amizade!

Ao **Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho**, pelo fornecimento da minha substância e por estar sempre disposto a ajudar no que fosse preciso.

A **José Crispim Duarte**, por toda a ajuda que me foi prestada!

A **Luis Cordeiro de Lima**, pelo trabalho realizado no Biotério do LTF!

A **Mônica**, responsável pela limpeza do LTF, por todo o trabalho desenvolvido nos laboratórios!

A **Tânia Alves**, pelo seu trabalho realizado na secretaria do LTF, realizado com empenho e dedicação!

A todos os **professores e funcionários** do LTF, que colaboraram para uma boa execução do meu trabalho!

A CAPES/CNPQ e a UFPB pelo apoio financeiro!

E, finalmente, ao meu orientador **Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**, que abriu as portas do seu laboratório, confiou em mim e me deu a oportunidade de atingir meu objetivo de ser mestre!

A todos, o meu muito obrigado!!!

Avaliação das ações vasculares induzidas por warifteína em rato: estudos *in vitro*. (Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/CCS/LTF-UFPB). **Ápio Cláudio de Lima Assis**

RESUMO

Os efeitos vasculares de warifteína, um alcalóide isolado da raiz do *Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae), foram estudados em ratos, usando técnicas *in vitro*. Em anéis de aorta torácica de rato, com endotélio funcional, a warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) induziu relaxamento das contrações induzidas por noradrenalina (10 nM - 100 μ M) ($pD_2 = 9,40 \pm 0,06$, $E_{m\acute{a}x} = 97,33 \pm 1,28$, $n = 5$) de maneira dependente de concentração e esse efeito não foi atenuado pela remoção do endotélio vascular ($pD_2 = 9,18 \pm 0,10$, $E_{m\acute{a}x} = 88,41 \pm 3,83$, $n = 5$). Esses resultados sugerem que a resposta vasorelaxante induzida pela warifteína é independente do endotélio vascular. Em preparações incubadas com KCl 80 mM, o efeito vasorelaxante induzido por warifteína foi bastante atenuado ($E_{m\acute{a}x} = 13,95 \pm 2,87$, $n = 6$), embora o pD_2 não ter apresentado diferença significativa ($pD_2 = 8,09 \pm 0,53$). A warifteína não deslocou, nem reduziu a contração máxima da curva de $CaCl_2$ ($E_{m\acute{a}x} = 95,62 \pm 2,69$). Na presença de KCl 20mM, o efeito máximo de warifteína foi reduzido ($p < 0,0001$) significativamente ($E_{m\acute{a}x} = 41,77 \pm 4,08$; $n = 5$), sugerindo a participação de canais para potássio neste efeito vasorrelaxante. Em preparações incubadas com TEA (1mM, 3mM e 5mM), 4-AP (1mM), Glibenclamida (10 μ M) e $BaCl_2$ (1mM), apenas na presença de $BaCl_2$, não houve alteração do efeito da warifteína ($pD_2 = 8,00 \pm 0,35$; $pD_2 = 6,57 \pm 0,17$; $pD_2 = 8,07 \pm 0,30$; $pD_2 = 8,37 \pm 0,19$; $pD_2 = 8,14 \pm 0,12$; $pD_2 = 8,85 \pm 0,16$), respectivamente. Estes resultados sugerem uma participação dos canais para potássio K_v , BK_{Ca} e K_{ATP} no relaxamento promovido por warifteína. Este alcalóide não reduziu o influxo de cálcio em solução, nominalmente, sem Ca^{2+} e teve o efeito reduzido ($p < 0,01$) em anéis pré-contraídos com $PGF_{2\alpha}$, sugerindo que a warifteína produz um relaxamento maior, quando a via do receptor α_1 -adrenérgico está ativada. Não houve atenuação da contração induzida por ortovanadato de sódio, o que sugere que a warifteína não interage com a via de sinalização RhoA – Rho cinase. Em conclusão, esses resultados sugerem que o efeito vasorrelaxante induzido por warifteína é, provavelmente, devido à ativação de canais de potássio (K_v , BK_{Ca} e K_{ATP}) e que este alcalóide tem um maior efeito relaxante quando o receptor α_1 -adrenérgico está ativado.

Palavras Chaves: Warifteína, aorta torácica, canais para potássio, sinalização RhoA – Rho cinase.

Evaluation of the vascular actions induced by warifteine in rat: studies in vitro. (Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/CCS/LTF-UFPB). **Ápio Cláudio de Lima Assis**

ABSTRACT

The vascular effects of warifteine, an alkaloid isolated from the root of the *Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae), were studied in rats through techniques *in vitro*. The warifteine (10^{-12} - 10^{-5} M) induced relaxation of the contractions induced by noradrenaline (10 nM - 100 μ M) ($pD_2 = 9,40 \pm 0,06$, $E_{max} = 97,33 \pm 1,28$, $n = 5$) in a dependent way of concentration in rings of thoracic aorta of rats, with functional endothelium and this effect was not lessened by the removal of the vascular endothelium ($pD_2 = 9,18 \pm 0,10$, $E_{max} = 88,41 \pm 3,83$, $n = 5$). These results suggest that the vascular relaxation induced by the warifteine is independent of the vascular endothelium. In preparations incubated with KCl 80 mM, the vascular relaxation induced by warifteine was quite lessened ($E_{max} = 13,95 \pm 2,87$, $n = 6$), although the pD_2 didn't present significant difference ($pD_2 = 8,09 \pm 0,53$). The warifteína didn't move nor reduce the maximum contraction of the curve of $CaCl_2$ ($E_{max} = 95,62 \pm 2,69$). In the presence of KCl 20mM, the maximum effect of warifteine had a significant ($p < 0,0001$) reduction ($E_{max} = 41,77 \pm 4,08$), suggesting the participation of potassium channels in this vascular relaxation effect. In preparations incubated with TEA (1mM, 3mM and 5mM), 4-AP (1mM), Glibenclamide (10 μ M) and $BaCl_2$ (1mM), just in the presence of $BaCl_2$ there was not alteration of the effect of the warifteine ($pD_2 = 8,00 \pm 0,35$; $pD_2 = 6,57 \pm 0,17$; $pD_2 = 8,07 \pm 0,30$; $pD_2 = 8,37 \pm 0,19$; $pD_2 = 8,14 \pm 0,12$; $pD_2 = 8,85 \pm 0,16$), respectively. These results suggest a participation of the potassium channels K_v , BK_{Ca} and K_{ATP} in the relaxation promoted by warifteine. This alkaloid didn't reduce the calcium influx in solutions, nominal, without Ca^{2+} and its effect was reduced ($p < 0,01$) in rings pre-constricted with $PGF_{2\alpha}$, suggesting that the warifteine produces a bigger relaxation when the α_1 -adrenergic way is activated. There was no reduction of the contraction induced by sodium orthovanadate, what suggests the warifteine doesn't interact with the signalling RhoA - Rho cinase. In conclusion, these results suggest that the vascular relaxation induced by warifteine is probably due to the activation of potassium channels (K_v , BK_{Ca} and K_{ATP}) and that this alkaloid has a bigger relaxant effect when the the α_1 -adrenergic is activated.

Key words: Warifteine, thoracic aorta, potassium channels, RhoA - Rho cinase signalling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema demonstrando a contração muscular lisa dependente de cálcio	20
Figura 2: Esquema demonstrando a contração muscular lisa independente do aumento de concentração intracelular de Ca^{2+}	21
Figura 3: Ilustração do <i>Cissampelos sympodialis</i>	23
Figura 4: Rato Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)	28
Figura 5: Aparato utilizado para os experimentos com aorta torácica de rato.....	35
Figura 6: Representação esquemática do protocolo experimental para a avaliação do efeito induzido por concentrações crescentes de warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica de rato pré-contraídos com NOR (10^{-8} – 10^{-4} M) (A) Anéis com endotélio vascular intacto (B) Anéis com endotélio vascular removido	36
Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental para a avaliação do efeito induzido por concentrações crescentes de warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica de rato pré-contraídos com PGF 2 α (1 μ M – 10 μ M)	37
Figura 8: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar o efeito de concentrações crescentes de warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com solução despolarizante de KCl 80mM	38
Figura 9: Representação esquemática do protocolo experimental para a avaliação do efeito induzido pela warifteína sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de Na_3VO_4 (10^{-5} – 3×10^{-3} M)	39
Figura 10: Representação esquemática do protocolo experimental para investigar a influência do aumento de K^{+} extracelular na resposta vasorelaxante induzida por concentrações crescentes de warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional	40
Figura 11: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar a influência de TEA (1mM, 3mM e 5mM) nas respostas vasorelaxantes induzidas por warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional	41

Figura 12: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar a influência de 4-AP (1mM) nas respostas vasorelaxantes induzidas por warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional	42
Figura 13: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar a influência de Glibenclamida (10 μ M) nas respostas vasorelaxantes induzidas por warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional	43
Figura 14: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar a influência de BaCl ₂ (10 μ M) nas respostas vasorelaxantes induzidas por warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional	44
Figura 15: Representação esquemática do protocolo experimental para a avaliação do efeito da warifteína sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de CaCl ₂ (10^{-6} – 3×10^{-2} M) em meio despolarizante (KCl 60mM), nominalmente, sem cálcio	45
Figura 16: Representação esquemática do protocolo experimental para a avaliação do efeito da warifteína sobre as contrações induzidas por CaCl ₂ (2mM) em solução, nominalmente, sem cálcio	46
Figura 17: Curva concentração-resposta para o efeito relaxante de Warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica de rato com endotélio intacto ($n=5$) e removido ($n=5$), pré-contraídos com noradrenalina (10^{-8} – 10^{-4} M). Os valores estão expressos com média $\pm$ e.p.m	49
Figura 18: Curva concentração-resposta para o efeito relaxante de warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) sobre contrações induzidas por noradrenalina (10^{-8} – 10^{-4} M) e por PGF 2 α (10^{-6} – 10^{-5} M). Os valores estão expressos com média $\pm$ e.p.m. para 8 experimentos; ** $p < 0,01$ versus anéis com endotélio removido e pré-contraídos com noradrenalina	50
Figura 19: Curva concentração-resposta para o efeito relaxante de warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) sobre contrações induzidas por noradrenalina (10^{-8} – 10^{-4} M) e KCl 80mM em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio vascular. Os	

valores estão expressos com média $\pm$ e.p.m de 6 experimentos; $p < 0,0001$ versus anéis com endotélio removido	51
Figura 20: Curva concentração-resposta para Na_3VO_4 em anéis de aorta torácica de rato desprovidos de endotélio funcional (controle) e na presença de concentração isolada de warifteína (10^{-5} M). Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 9 experimentos	52
Figura 21: Curva concentração-resposta para o efeito relaxante de warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional pré-contráídos com noradrenalina na presença e na ausência de KCl 20 mM. Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 5 experimentos; **** $p < 0,0001$ versus anéis com endotélio removido	53
Figura 22: Efeito vasorelaxante de warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) sobre contrações induzidas por noradrenalina (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional na presença e na ausência de TEA (1mM, 3mM e 5mM). Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 6 experimentos para cada concentração; *** $p < 0,001$ versus anéis com endotélio removido; **** $p < 0.0001$ versus anéis com endotélio removido	55
Figura 23: Efeito vasorelaxante de warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) sobre contrações induzidas por noradrenalina (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional na presença e na ausência de 4-AP (1mM). Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 7 experimentos	56
Figura 24: Efeito vasorelaxante de warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) sobre contrações induzidas por noradrenalina (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional na presença e na ausência de Glibenclamida (10 μ M). Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 5 experimentos	57
Figura 25: Efeito vasorelaxante de warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) sobre contrações induzidas por noradrenalina (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional na presença e na ausência de BaCl_2 (1mM). Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 5 experimentos	58
Figura 26: Curvas concentração-resposta para CaCl_2 em solução despolarizante (KCl 60 mM), nominalmente, sem Ca^{2+} em anéis de aorta torácica de rato desprovidos de endotélio funcional e na presença de concentração isolada de warifteína (10^{-5} M). Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 5 experimentos	59

Figura 27: Efeito de warifteína sobre as contrações induzidas por CaCl_2 na presença de noradrenalina (10^{-4}M) em solução, nominalmente, sem Ca^{2+} em anéis de aorta torácica de rato desprovidos de endotélio funcional e na presença de concentração isolada de warifteína (10^{-5} M). Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 5 experimentos 60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Aspectos químicos da warifteína	25
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da solução de Krebs – Henseleit (pH=7,4	30
Tabela 2: Composição da solução despolarizante de Krebs – Henseleit com cloreto de potássio a 80 mM(pH=7,4)	30
Tabela 3: Composição da solução de Krebs – Henseleit com cloreto de potássio a 20 mM (pH=7,4)	31
Tabela 4: Composição da solução despolarizante de Krebs – Henseleit com cloreto de potássio a 60mM (pH=7,4)	31
Tabela 5: Composição da solução de Krebs – Henseleit, nominalmente, sem cálcio (pH=7,4)	32
Tabela 6: Composição da solução despolarizante de Krebs – Henseleit com cloreto de potássio a 60 mM, nominalmente, sem cálcio (pH=7,4)	32
Tabela 7: Composição da solução de Krebs – Henseleit livre de cálcio (pH=7,4)	33
Tabela 8: Valores do $E_{máx}$ e de pD_2 para a warifteína em anéis de aorta torácica de rato em diferentes condições experimentais	61

LISTA DE ABREVIATURAS

2R-1C	2 rim um clip
ACh	Acetilcolina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
$C_6H_{12}O_6$	Glicose
Ca^{2+} -ATPase	Bomba de cálcio dependente de trifosfato de adenosina
Ca_v	Canais de cálcio dependentes de voltagem
DMSO	Dimetil sulfóxido
$E_{máx}$	Efeito máximo
e.p.m.	Erro padrão da média
FEN	Fenilefrina
FC	Frequência cardíaca
BK_{Ca}	Canais de potássio ativados por Ca^{2+} de grande condutância
GEF	Fator de troca de nucleotídeos ganina
GDP	Difosfato de guanina
GTP	Trifosfato de guanina
K_{ATP}	Canais de potássio dependentes de ATP
K_{Ca}	Canais de potássio ativados por Ca^{2+}
KH_2PO_4	Bifosfato de potássio
K_{ir}	Canais de potássio retificadores de entrada
K_v	Canais de potássio sensíveis à voltagem
KCl	Cloreto de potássio
Log	Logaritmo
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina
MLCP	Fosfatase da cadeia leve da miosina
MLC	Cadeia leve da miosina
NOR	Noradrenalina
PGF 2 α	Prostaglandina F 2 α
PKC	Proteína cinase C
min	Minutos
n	número de experimentos
Na_3VO_4	Ortovanadato de sódio
nM	nanomolar
PAM	pressão arterial média

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	27
2.1 Geral	27
2.2 Específicos	27
3 MATERIAL	28
3.1 Animais.....	28
3.2 Drogas e Reagentes	29
3.3 Soluções Nutritivas.....	29
4 MÉTODOS	34
4.1 Ensaios farmacológicos <i>in vitro</i>	34
4.1.1 Estudos, utilizando anéis de aorta torácica de rato	34
4.1.2 Protocolos experimentais empregados nos estudos <i>in vitro</i>	35
4.1.2.1 Curva concentração-resposta para warifteína, em anéis de aorta torácica de rato pré-contraídas com noradrenalina.....	35
4.1.2.2 Curva concentração-resposta para warifteína, em anéis de aorta torácica de rato, na ausência de endotélio funcional e pré-contraídos com PGF _{2α}	37
4.1.2.3 Curva concentração-resposta para warifteína, em anéis de aorta torácica de rato pré-contraídos com KCl 80 mM	38
4.1.2.4 Verificação do efeito de warifteína sobre a curva concentração-resposta para o Ortovanadato de Sódio, em anéis de aorta torácica de rato, sem endotélio funcional	39
4.1.2.5 Verificação da participação de canais para K ⁺ na resposta relaxante, induzida por warifteína, em anéis de aorta torácica de rato	40
4.1.2.6 Verificação da resposta relaxante, induzida por warifteína, na presença de diferentes concentrações de TEA.....	41
4.1.2.7 Verificação da participação de canais para potássio sensíveis à voltagem (K _v) nas respostas relaxantes induzidas por warifteína	42
4.1.2.8 Verificação da participação de canais para potássio sensíveis a ATP (K _{ATP}), nas respostas, induzidas por warifteína	43

4.1.2.9 Verificação da participação de canais de potássio retificadores de voltagem (K_{ir}), nas respostas relaxantes, induzidas por warifteína	44
4.1.2.10 Verificação do efeito de warifteína sobre a curva concentração-resposta para $CaCl_2$, em anéis de aorta torácica de rato	45
4.1.2.11 Verificação do efeito de warifteína sobre o influxo de Ca^{2+} , em anéis de aorta torácica de rato	46
4.2 Análise Estatística	47
5. RESULTADOS	48
5.1 Ensaios farmacológicos <i>in vitro</i>	48
5.1.1 Efeito da warifteína sobre anéis de aorta torácica de rato com endotélio e sem endotélio funcional pré-contraídos com noradrenalina	48
5.1.2 Efeito de warifteína sobre anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional pré-contraídos com Prostaglandina 2 α (PGF 2 α).....	50
5.1.3 Efeito da warifteína sobre a contração, induzida por KCl 80mM, em anéis sem endotélio funcional da aorta torácica de rato	51
5.1.4 Efeito de warifteína sobre a curva concentração-resposta para o ortovanadato de sódio em anéis de artéria aorta torácica de rato sem endotélio	52
5.1.5 Participação dos canais para K^+ no efeito vasorelaxante induzido pela warifteína, em anéis sem endotélio vascular de aorta torácica de rato	53
5.1.6 Efeito vasorelaxante, induzido por warifteína, em anéis de aorta torácica sem endotélio de rato, na presença de diferentes concentrações de Cloreto de Tetraetilamônio (TEA)	54
5.1.7 Participação dos K_v no efeito vasorelaxante, induzido por warifteína, em anéis da artéria aorta torácica sem endotélio de rato	56
5.1.8 Participação dos K_{ATP} no efeito vasorelaxante, induzido por warifteína, em anéis da artéria aorta torácica sem endotélio de rato.....	57
5.1.9 Participação dos K_{ir} no efeito vasorelaxante, induzido por warifteína, em anéis da artéria aorta torácica sem endotélio de rato.....	58

5.1.10	Efeito de warifteína sobre a curva concentração-resposta para CaCl_2 , em anéis sem endotélio funcional de aorta torácica de rato	59
5.1.11	Efeito de warifteína sobre o influxo de cálcio induzido por contração com noradrenalina, em anéis sem endotélio funcional de aorta de rato.....	60
6.	DISCUSSÃO	62
7.	CONCLUSÕES	69
8.	PERSPECTIVAS	70
	REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular é responsável pela manutenção da pressão arterial, necessitando da ação integrada de outros sistemas, como o neural, renal e endócrino (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001).

A pressão arterial corresponde ao produto do débito cardíaco (DC) pela resistência vascular periférica total (RVPT), podendo ser influenciada pela ação de drogas sobre um ou ambos os parâmetros (OASTES, apud HARDMAN et al., 1996).

O tônus vascular é o principal determinante da resistência ao fluxo sangüíneo na circulação (JACKSON, 2000; SANTOS et al., 2007). Ele regula a pressão arterial e distribuição do fluxo sangüíneo entre os tecidos e órgãos do corpo e é regulado pelos hormônios circulantes, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio, sinais elétricos e/ou mecânicos, como a própria pressão sanguínea, além dos canais iônicos (JACKSON, 2000). Em algumas patologias, ele apresenta-se elevado, como na hipertensão arterial (KOROVKINA; ENGLAND, 2002).

Os canais para potássio (K^+) e os canais para cloreto (Cl^-) são bastante importantes para a manutenção do potencial de membrana (COX, 2002; ZANG et al., 2005) e regulação do tônus vascular (JACKSON, 2000), embora, admita-se que, no repouso, o único movimento de íons que ocorre na membrana citoplasmática é difusão de íons potássio, mantendo o potencial de repouso da membrana (KOROVKINA; ENGLAND, 2002).

As células musculares lisas têm quatro tipos principais de canais de potássio: os retificadores de entrada (k_{ir}), os sensíveis a ATP (k_{ATP}), os sensíveis à voltagem (K_v) e os ativados por cálcio de grande condutância (BK_{ca}) (COX, 2002).

A ativação destes canais induz a hiperpolarização da membrana, promovendo o fechamento dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (COX, 2002), produzindo uma redução da concentração deste íon no meio intracelular (BAKER, 2000), levando à vasodilatação (JACKSON, 2000). Desta forma, provoca relaxamento arteriolar, podendo reduzir a pressão sangüínea (COGOLLUDO et al., 2005). Portanto, as correntes de potássio apresentam

um papel importante no controle do potencial de repouso da membrana e no tônus vascular (NIU et al., 2008).

Os canais para Ca^{2+} , também, exercem um papel importante na manutenção do tônus vascular, haja vista que um influxo de cálcio extracelular ou liberação deste íon pelos estoques intracelulares, com elevação dos níveis de cálcio intracelular, provoca contração da musculatura lisa vascular (SOMLYO; SOMLYO, 1994; COGOLLUDO et. al., 2005; CAO et al., 2006).

As células musculares lisas vasculares apresentam dois tipos de canais para cálcio dependentes de voltagem (Ca_v): os Ca_v 1 (tipo-L) e os Ca_v 3 (tipo-T). Os canais para Ca^{2+} tipo-L se caracterizam por produzir correntes de Ca^{2+} ativadas por elevados valores de voltagens, além de apresentarem sensibilidade às diidropiridinas. Quando as células do músculo liso vascular despolarizam, ocorre abertura dos canais para Ca^{2+} tipo-L, provocando o aumento de Ca^{2+} intracelular (CRIBBS, 2006). No músculo liso vascular, este tipo de canal é considerado como principal via de influxo de Ca^{2+} (KARAKI et al., 1997).

Os canais para Ca^{2+} tipo T são ativados e desativados mais rapidamente do que os o tipo L, além de não serem regulados por nucleotídeos cíclicos e fosforilação, diferentemente dos canais do tipo-L (XIONG; SPERELAKIS, 1995). Além disso, são ativados por baixos valores de voltagem (CRIBBS, 2006).

A elevação dos níveis de cálcio intracelular favorece a ligação dos íons Ca^{2+} à calmodulina e subsequente interação desta com a cinase da cadeia leve de miosina (OGUT; BROZOVICH, 2003), que fosforila a cadeia leve da miosina II a qual interage com os filamentos de actina (CHITALEY et al., 2001) e promove a contração do músculo liso vascular (BUDZYN et al., 2006; CRIBBS, 2006).

A Figura 1 esquematiza a via de contração do músculo vascular, através da ativação do receptor α 1-adrenérgico acoplado a uma proteína G. No entanto, existem outras vias que geram a contração do músculo vascular. Um exemplo é quando o músculo liso vascular entra em contato com a prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$). Esta prostaglandina ativa receptores de membrana (receptores prostanóides F) ligados à proteína G (ABREU et al., 2008). Quando estes receptores são ativados ocorre mobilização de Ca^{2+}

intracelular, (OLSON, 2003), causando vasoconstrição (VILLAZÓN et al., 2002).

Quando o cálcio volta aos seus níveis basais, ocorre a desativação da MLCK. A fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP) desfosforila o sítio regulatório da cadeia leve de miosina (MLC). Este processo ocorre de forma lenta, justificando a contração de o músculo liso ser mais sustentada e manter-se por um período de tempo superior à contração do músculo estriado (GARRET; GRISHAM, 1995).

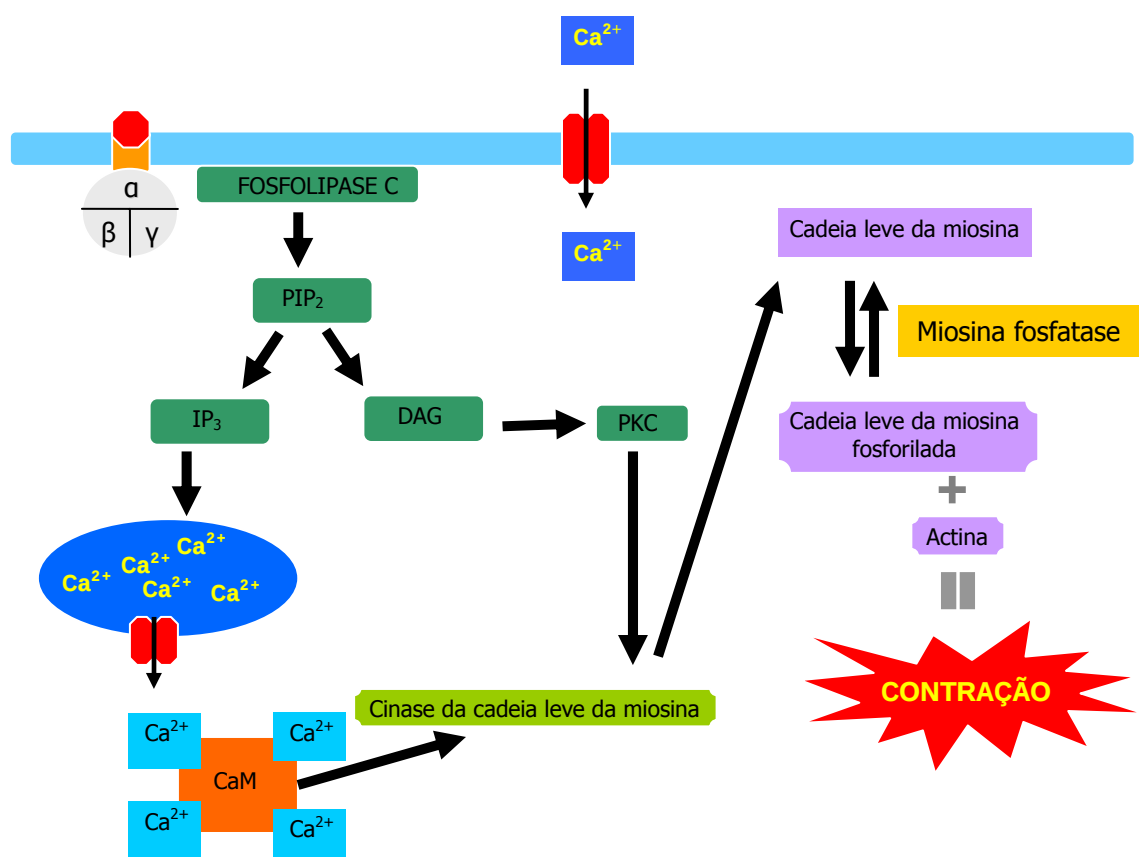


Figura 1: Esquema demonstrando a contração muscular lisa dependente de cálcio

A contração do músculo liso vascular também pode ocorrer de forma independente ao aumento da concentração intracelular de cálcio, resultando um aumento na fosforilação da MLC (KHALIL, 2001 JEON et al., 2006) (Figura 2).

Esta via pode ser ativada, por exemplo, quando um agonista se liga ao receptor que tem uma proteína G acoplada a ele, cuja subunidade α é capaz de ativar o fator de troca de nucleotídeos guanina. Ocorre ativação desta proteína G, a subunidade α se dissocia e ativa o fator de troca de nucleotídeos

guanina (GEF), o qual catalisa a troca de GDP pelo GTP na RhoA. (FUKATA et al., 2001; SUMMERS et al., 2008). Para que aconteça a ativação da Rho-quinase, ela e a RhoA-GTP migram para a membrana, onde ocorre a ativação (WARD et al., 2004). Quando ativa, a Rho-quinase fosforila a subunidade regulatória da fosfatase da cadeia leve de miosina, inibindo-a (SOMLYO; SOMLYO, 2000), o que preserva o estado de fosforilação da cadeia leve de miosina (SUMMERS et al., 2008), aumentando a sensibilidade do músculo liso vascular ao Ca^{2+} (LOIRAND et al., 2006).

Um agente capaz de provocar a contração do músculo liso não afetando a mobilização intracelular de cálcio é o vanadato, que é um potente inibidor da atividade da fosfotirosina fosfatase (ALCÓN, 2000). Ele ainda induz a agregação plaquetária, tem efeito inotrópico positivo no músculo ventricular, inibe a atividade de muitas enzimas, como a Ca^{2+} -ATPase e a fosfotirosina fosfatase. (PARIENTE et al., 1999; ALCÓN et al., 2000).

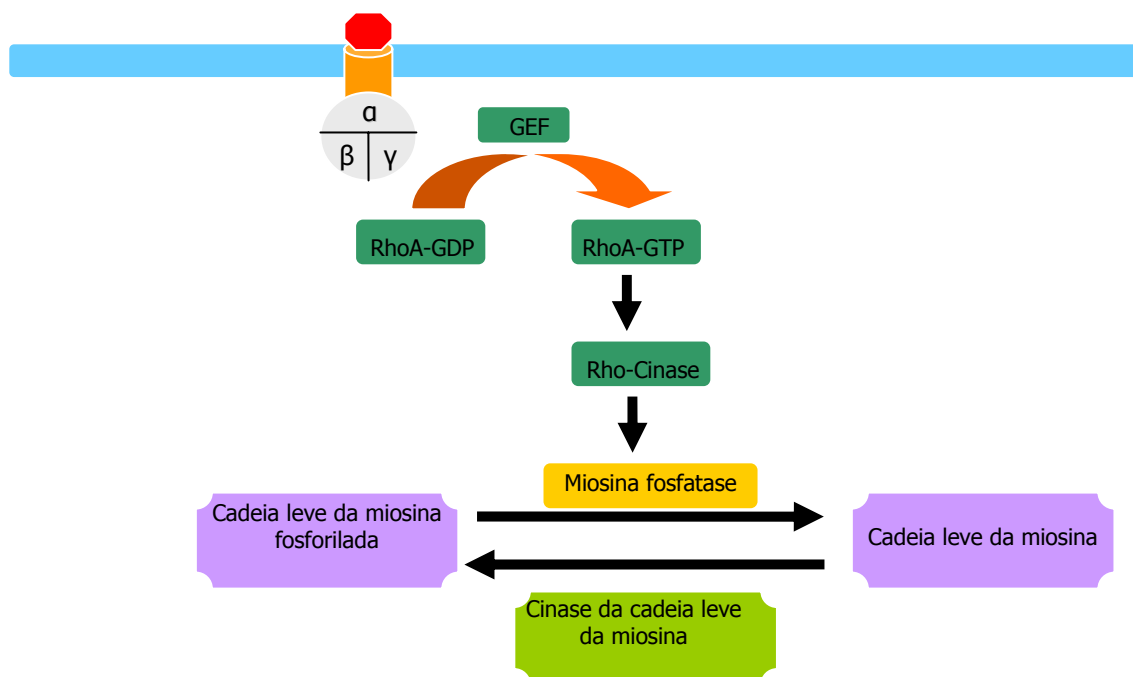


Figura 2: Esquema demonstrando a contração muscular lisa independente do aumento de concentração intracelular de Ca^{2+}

Tendo-se em vista que o aumento do tônus vascular pode ter repercussões graves no organismo, como o surgimento de hipertensão arterial, buscam-se novas drogas que sejam potentes, eficazes e com menos efeitos colaterais para o tratamento destas patologias.

A utilização de plantas medicinais ocorre desde o início da civilização, com o objetivo de tratamento e cura de doenças (DI STASI, 1996). Alguns produtos naturais derivados destas plantas apresentam muitos efeitos benéficos no tratamento da hipertensão, entre os quais podemos citar o vasorelaxamento por antagonismo de canais de cálcio (SUN et al. 2002).

Um exemplo de planta medicinal é a *Mammea africana*, cujo extrato demonstrou ter efeito de inibir a hipertensão arterial e hipertrofia cardíaca (NGUELEFACK-MBUYO et al.; 2008). Outro exemplo é a *Hibiscus sabdariffa* Linn., que, já demonstrou ter efeito vasodilatador, em aorta de ratos espontaneamente hipertensos e tem sido usada pelos índios para o tratamento da hipertensão (AJAY et al., 2007)

Há muitas plantas utilizadas como alimentos, como frutas e verduras, que são ricas em polifenóis e benéficos para o sistema cardiovascular, (SCHULDT, 2005). Há também bebidas derivadas de plantas, como o chá verde (HUANG, 1999) que podem representar uma dieta benéfica para a proteção cardiovascular.

O uso destes vegetais ocorre até os dias atuais. São amplamente utilizados com fins terapêuticos, mesmo sem serem prescritos, para o tratamento das mais diversas patologias, como asma, doenças genitais e urinárias (BEZERRA-SANTOS et al., 2004).

Os efeitos que as plantas medicinais produzem variam de espécie para espécie. Podem apresentar efeito antiinflamatório, analgésico e anti-hipertensivo, entre outros, tornando os estudos sobre os efeitos destas plantas muito relevantes, já que elas aumentam o arsenal terapêutico para o tratamento de muitas doenças. (SANTOS et al., 2007).

A família Menispermaceae possui muitos representantes com diversas atividades farmacológicas, entre as quais podemos citar a propriedade antimalárica (BERTANI et. al., 2005; POUPLIN et al., 2007; EKOMBA et al., 2004), anti-bacteriana (AMRESH et al., 2007b) , imunomodulatória (DIWANAY

et al., 2004), anti-hipertensiva (WET et al., 2005; AMRESH et al., 2008), antimicrobiana e sedativa (WET et al., 2005).

A grande presença de alcalóides é uma característica marcante desta família. Eles possuem propriedades anti-reumática (ZENG et al., 2007), anti-hiperglicêmica, (NOOR; ASHCROFT, 1998), anti-viral (MOODY et al., 2006) e antiinflamatória (AMRESH et al., 2007a; MOODY et al., 2006), entre outras.

Esta família apresenta muitos alcalóides bisbenzylisoquinolina. (EKOMBA et al., 2004). Os derivados de alcalóides bisbenzylisoquinolina apresentam efeitos cardiovasculares importantes. A tetrandrina é um alcalóide bisbenzylisoquinolina derivado da *Stephenia tetrandra* S Moore, capaz de reduzir a pressão arterial sistólica e diastólica em humanos. (KWAN; ACHIKE, 2002). A dauricina e a daurisolina também são exemplos deste tipo de alcalóides e têm efeito antiarrítmico (QIAN, 2002).

Cissampelos sympodialis Eichl é uma espécie pertencente à família Menispermaceae, incluindo 19 espécies, sendo que 9 delas podem ser encontradas no Brasil. É popularmente conhecida no Brasil como jarrinha, orelha de onça, abuteira e milona, tendo ampla utilização tanto na medicina popular quanto na indígena para o tratamento de várias patologias, como a diarreia, doenças urinárias e genitais, (SANTOS et al. 2004), asma, (SANTOS et al., 2006), bronquite e reumatismo (MOREIRA et al., 2003).



Figura 3: Ilustração do *Cissampelos sympodialis*

A fração aquosa do extrato etanólico das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl produziu efeito antidepressivo em camundongos, possivelmente devido ao efeito inibitório da isoenzima fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico central, aumentando os níveis de AMPc no cérebro (ALMEIDA et al.; 1998).

A fração aquosa do extrato etanólico de raiz e de folhas do *Cissampelos sympodialis* Eichl promove relaxamento na musculatura lisa traqueal de cobaia, com elevação dos níveis de monofosfato de adenosina cíclica. Esta planta possui também propriedades imunomodulatórias, promovendo a inibição da resposta proliferativa de células T do baço e induzindo um aumento na produção de interleucina-10 (SANTOS et al., 2004; 2006), potente citocina antiinflamatória que age inibindo a produção de citocinas pelas células. (PIUVEZAM et al. 1999).

Ensaio toxicológicos pré-clínicos agudos e crônicos, os quais foram realizados com a fração aquosa do extrato hidroalcoólico das cascas das raízes de *Cissampelos sympodialis*, por via oral, não demonstraram efeitos tóxicos nem em camundongos nem em ratos em doses até 20 vezes maiores do que a dose usada na terapêutica popular no tratamento de patologias respiratórias (DINIZ et al., 1995). Estudos realizados com esta mesma fração

Estudos utilizando a fração aquosa do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissampelos sympodialis*, em testes de toxicidade aguda em camundongos albinos, demonstraram que este extrato apresenta uma DL₅₀ de 1819 mg/Kg via intra-peritoneal (DINIZ et al., 1998). Em cães, uma dose 5 vezes maior do que a de uso popular demonstrou baixa toxicidade (DINIZ, 2000).

Muitos alcalóides foram detectados no *Cissampelos sympodialis*: São eles: milonina (FREITAS et al., 1994), roraimina, coclaurina e liriodenina (LIRA, 2001), laurifolina e dompodialina (ALENCAR, 1994), metilwarifteína e warifteína (CÔRTEZ, 1992).

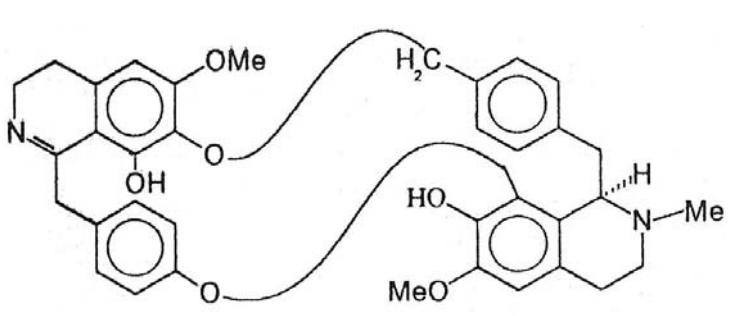
A warifteína é um alcalóide bisbenzylisoquinolina, sendo o principal componente isolado do extrato etanólico da raiz do *Cissampelos sympodialis* Eichl, (MELO et al. 2003), com um rendimento de 1,4% (MARINHO, 2008). A warifteína também é encontrada nas folhas desta planta, no entanto, em proporções bem menores (cerca de 100 vezes menos) (THOMAS et al., 1997).

Este alcalóide causa bloqueio neuromuscular, tem atividade anestésica local e promove antagonismo não-competitivo e não específico em músculo liso, (CORTÊS et al. 1995), tendo também efeito antialérgico (SANTOS et al., 2006).

Verificou-se, em aorta de coelho, que este alcalóide inibe os canais para cálcio dependentes de voltagem, os canais para cálcio operados por receptor e a liberação e reestocagem de cálcio dos estoques intracelulares sensíveis à noradrenalina (FREITAS et al. 1996).

Avaliações de citotoxicidade de warifteína em culturas de hepatócitos e fibroblastos demonstraram a IC_{50} variando em torno de 10 – 35 mM (MELO, 2003). A DL_{50} em camundongos da warifteína, quando administrada através da via intra-peritoneal, foi de 511 mg/Kg. Doses de até 1000 mg/Kg, por via oral, não produziu mortalidade nos animais durante as 48h de observação (CÔRTEZ, 1992).

Algumas propriedades químicas importantes da warifteína estão representadas no quadro 1.

ASPECTOS QUÍMICOS
Nome: Warifteína Classe de metabólito secundário: Alcalóide bisbenzylisoquinolina Fórmula Molecular: $C_{36}H_{36}N_2O_6$ Estrutura Molecular:  Peso Molecular: 592.68 Aspecto: Pó amorfo de colocação amarelada Solubilidade: Cremofor

Quadro 1: Aspectos químicos da warifteína

Como estudos anteriores já tinham sido realizados em aorta de coelho (FREITAS et al., 1996), mas não tinham elucidado completamente o mecanismo de ação da warifteína, decidimos estudar os efeitos vasculares deste alcalóide em aorta torácica de rato, utilizando metodologias in vitro, a fim de esclarecer melhor este mecanismo.

2. OBJETIVOS

Geral

Investigar o efeito vasorelaxante da warifteína em aorta torácica de ratos normotensos, procurando esclarecer o possível mecanismo de ação desta substância, utilizando para isso metodologias *in vitro*.

Específicos

- Estudar o efeito de warifteína sobre anéis de aorta torácica de rato, avaliando:
 - A existência de uma especificidade de warifteína para um determinado agente contracturante utilizado;
 - O influxo de cálcio
 - O papel dos canais de potássio na resposta relaxante induzida por warifteína.
 - A interação da warifteína com a via de sinalização RhoA – Rho cinase.

3. MATERIAL

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com peso entre 250-300 gramas, provenientes do Biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - 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 4: Rato Wistar (*Rattus norvegicus*)

3.2 Drogas e Reagentes

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN), cloridrato de acetilcolina (ACh), noradrenalina, Cloreto de Tetraetilamônio (TEA), Glibenclamida, 4-aminopiridina (4-AP), cremofor, ortovanadato de sódio, prostaglandina F 2 α (todos da Sigma) e Cloreto de Bário (BaCl₂) (Vertec).

Todas as soluções foram mantidas a 0° C. Para a preparação das concentrações desejadas, as drogas foram diluídas em água destilada, exceto a glibenclamida, a qual foi solubilizada em DMSO a 100%, com uma concentração de 0,1% na cuba.

A warifteína foi isolada das raízes do *Cissampelos sympodialis* e cedida pelo professor José Maria Barbosa Filho do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da UFPB. Para a realização dos ensaios farmacológicos, a warifteína foi solubilizada em cremofor (0,01% na cuba) e diluída em água destilada de modo que foram obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental.

3.3 Soluções Nutritivas

Para a preparação das soluções nutritivas foram utilizadas as seguintes substâncias: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl₂.2H₂O), sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄.7H₂O), glicose (C₆H₁₂O₆) (todos da MERCK), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e bifosfato de potássio (KH₂PO₄) (todos da VETEC).

As Tabelas a seguir mostram as composições das soluções fisiológicas:

Tabela 1: Composição da solução de Krebs – Henseleit (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	118
KCl	4,7
CaCl ₂	2,5
MgSO ₄	1,2
NaHCO ₃	25
KH ₂ PO ₄	1,2
Glicose	11,1

Tabela 2: Composição da solução despolarizante de Krebs – Henseleit com cloreto de potássio a 80 mM (pH=7,4).

Substância	Concentração (mM)
NaCl	57
KCl	80,0
CaCl ₂	2,5
MgSO ₄	1,2
NaHCO ₃	25
KH ₂ PO ₄	1,2
Glicose	11,1

Tabela 3: Composição da solução de Krebs – Henseleit com cloreto de potássio a 20 mM (pH=7,4).

Substância	Concentração (mM)
NaCl	102,55
KCl	20,0
CaCl ₂	2,5
MgSO ₄	1,2
NaHCO ₃	25
KH ₂ PO ₄	1,2
Glicose	11,1

Tabela 4: Composição da solução despolarizante de Krebs – Henseleit com cloreto de potássio a 60mM (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	62,55
KCl	60
CaCl ₂	2,5
MgSO ₄	1,2
NaHCO ₃	25
KH ₂ PO ₄	1,2
Glicose	11,1

Tabela 5: Composição da solução de Krebs – Henseleit, nominalmente, sem cálcio (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	118
KCl	4,7
MgSO ₄	1,2
NaHCO ₃	25
KH ₂ PO ₄	1,2
Glicose	11,1

Tabela 6: Composição da solução despolarizante de Krebs – Henseleit com cloreto de potássio a 60 mM, nominalmente, sem cálcio (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	62,55
KCl	60
MgSO ₄	1,2
NaHCO ₃	25
KH ₂ PO ₄	1,2
Glicose	11,1

Tabela 7: Composição da solução de Krebs – Henseleit livre de cálcio para (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	118
KCl	4,7
MgSO ₄	1,2
NaHCO ₃	25
KH ₂ PO ₄	1,2
Glicose	11,1
EGTA	1,0

4. MÉTODOS

Foram realizados ensaios farmacológicos *in vitro*, utilizando artéria aorta torácica de rato.

4.1 Ensaios Farmacológicos *in vitro*

4.1.1 Estudos, utilizando anéis de aorta torácica de rato

Os ratos foram sacrificados por concussão cerebral seguida por secção dos vasos cervicais. Através de uma incisão no abdome e tórax do animal, foi retirada a porção torácica da artéria aorta. Anéis do primeiro segmento da artéria (1 - 2 mm) foram obtidos livres de tecido conectivo e adiposo. Os anéis foram mantidos em cubas que continham 10 mL de solução de Krebs (Tabela 1) a 37° C e gaseificada com uma mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂ (carbogênio). Os anéis foram suspensos por hastes de metal e fixadas a um transdutor de força, o qual estava acoplado a um sistema de aquisição (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA) para o registro das contrações isométricas. Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 2 g por um período de 60 min. Durante este tempo, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 min. para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

O endotélio vascular dos anéis de aorta foi removidos mecanicamente através do atrito entre as paredes internas do vaso com hastes de metal.

A presença ou ausência de endotélio foi verificada pela adição, na cuba, de 1 µM de acetilcolina (ACh) nos anéis pré-contraídos com fenilefrina. Foram considerados com endotélio (E+), os anéis com relaxamento superior a 70% sobre a pré-contracção com FEN. Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10 %, foram considerados sem endotélio. (LÓPEZ et al., 2004; FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Anéis com relaxamentos entre 10 e 70 % foram descartados.



Fonte: Foto tirada no laboratório de Farmacologia Cardiovascular

Figura 5: Aparato utilizado para os experimentos com aorta torácica de rato

4.1.3 Protocolos experimentais empregados nos estudos *in vitro*

4.1.2.1 Curva concentração-resposta para warifteína, em anéis de aorta torácica de rato pré-contraídas com noradrenalina

Após um período de estabilização de 60 min, foi verificada a presença ou ausência de endotélio funcional. Em seguida, foi realizada uma curva cumulativa para noradrenalina (NOR 10^{-8} – 10^{-4} M) (SHEN, 2008) e, após um período de 40 minutos para a estabilização da contração tônica, concentrações crescentes de warifteína (10^{-12} - 10^{-5} M) foram adicionadas à cuba, de maneira cumulativa na fase tônica e sustentada, em anéis com endotélio ou sem endotélio funcional, a fim de observar o efeito vasorelaxante da warifteína. Os valores de pD_2 e efeito máximo ($E_{máx}$) foram calculados e comparados para anéis com endotélio intacto e com endotélio removido.

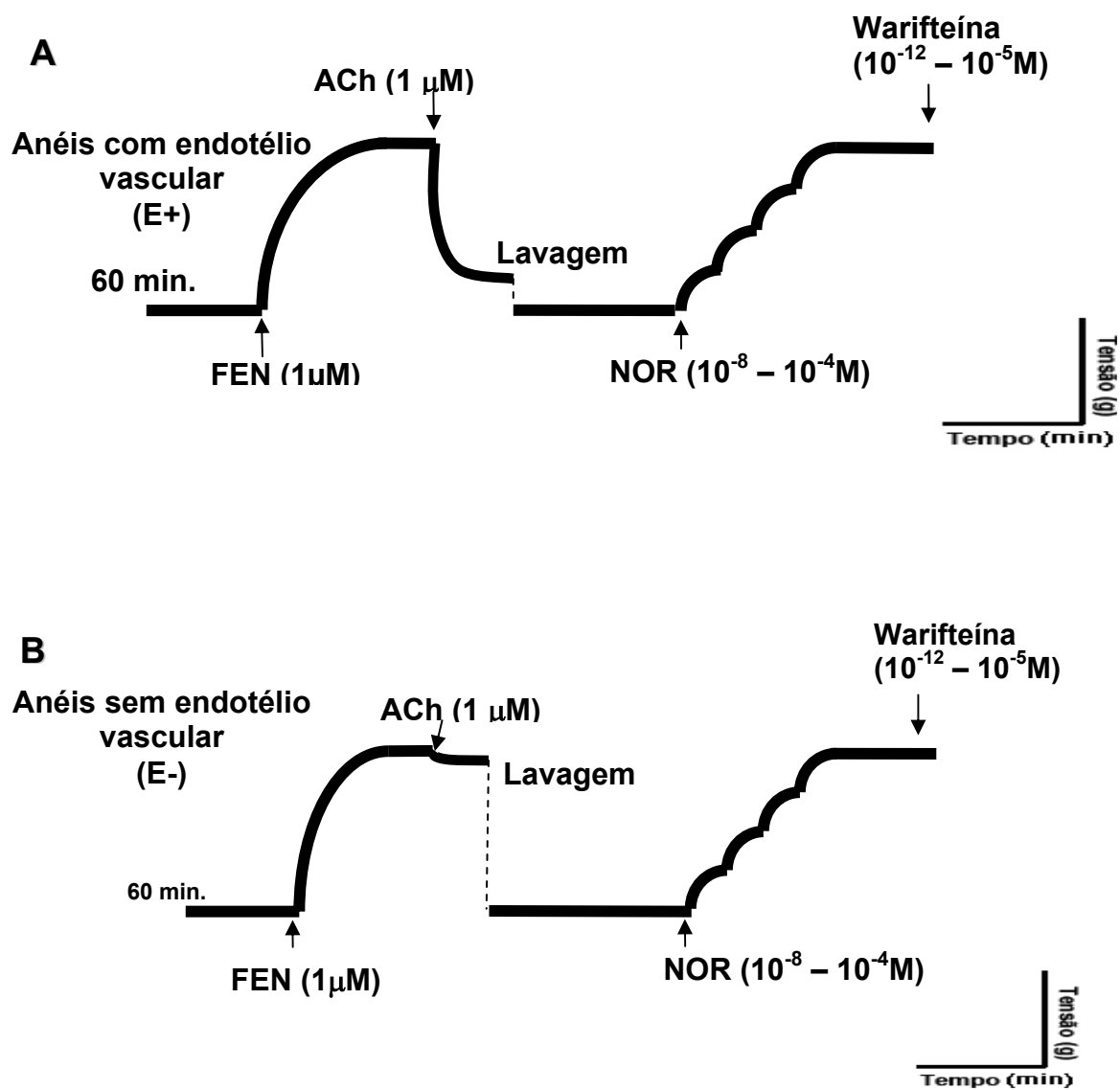


Figura 6: Representação esquemática do protocolo experimental para a avaliação do efeito induzido por concentrações crescentes de warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica de rato pré-contraídos com NOR (10^{-8} – 10^{-4} M) (A) Anéis com endotélio vascular intacto (B) Anéis com endotélio vascular removido.

4.1.2.2 Curva concentração-resposta para warifteína, em anéis de aorta torácica de rato, pré-contráídos com $\text{PGF}_{2\alpha}$

Após a verificação da ausência do endotélio funcional, como descrito anteriormente, os anéis foram contraídos com $\text{PGF } 2\alpha$ ($10\mu\text{M}$) (BANG, 1998). Esta concentração foi obtida através de uma curva cumulativa para a $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($1\mu\text{M} - 10\mu\text{M}$) e, após um período de 40 minutos para a estabilização da contração tônica, concentrações crescentes de warifteína ($10^{-12} - 10^{-5} \text{ M}$) foram adicionadas à cuba, de maneira cumulativa na fase tônica e sustentada, em anéis sem endotélio funcional, a fim de observarmos o efeito vasorelaxante da warifteína.

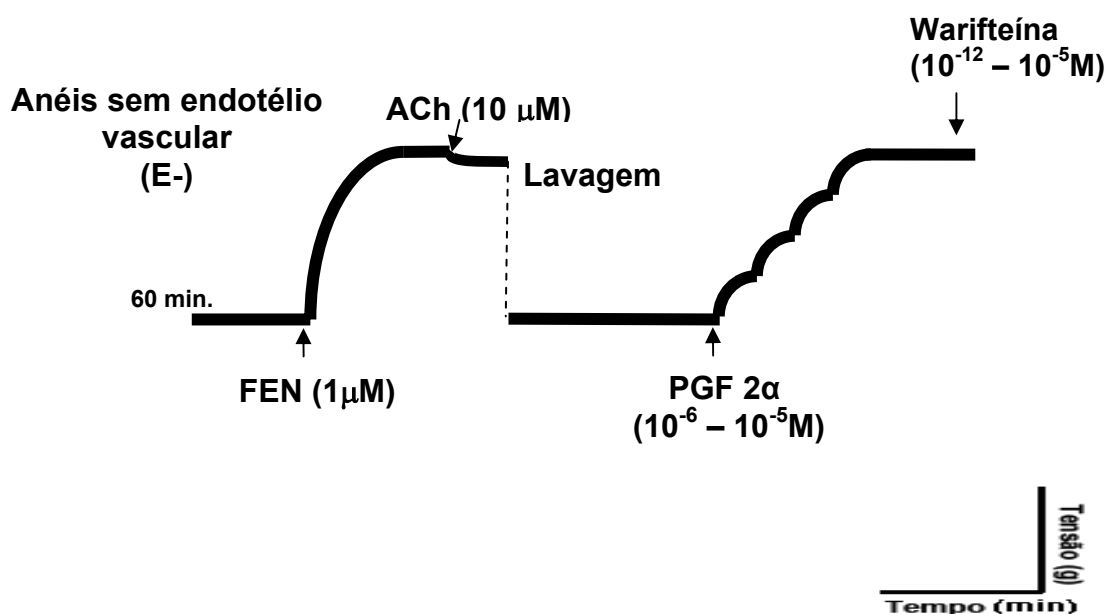


Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental para a avaliação do efeito induzido por concentrações crescentes de warifteína ($10^{-12} - 10^{-5} \text{ M}$) em anéis de aorta torácica de rato pré-contráídos com $\text{PGF } 2\alpha$ ($1\mu\text{M} - 10\mu\text{M}$).

4.1.2.3 Curva concentração-resposta para warifteína, em anéis de aorta torácica de rato pré-contraídos com kcl 80 mm.

Após a verificação da ausência do endotélio funcional, como descrito anteriormente, a solução de Krebs da cuba foi trocada pela solução despolarizante de KCl 80 mM (LÓPEZ, 2004). Foram induzidas duas contrações similares com KCl 80 mM (Tabela 2) e, após a estabilização da segunda contração, concentrações crescentes de warifteína (10^{-12} - 10^{-5} M) foram adicionadas na fase tônica da segunda contração induzida por KCl 80 mM, com a finalidade de investigar uma possível especificidade de warifteína para um determinado agente contracturante utilizado, em anéis sem endotélio funcional. As preparações permaneciam nesta solução até o final do experimento.

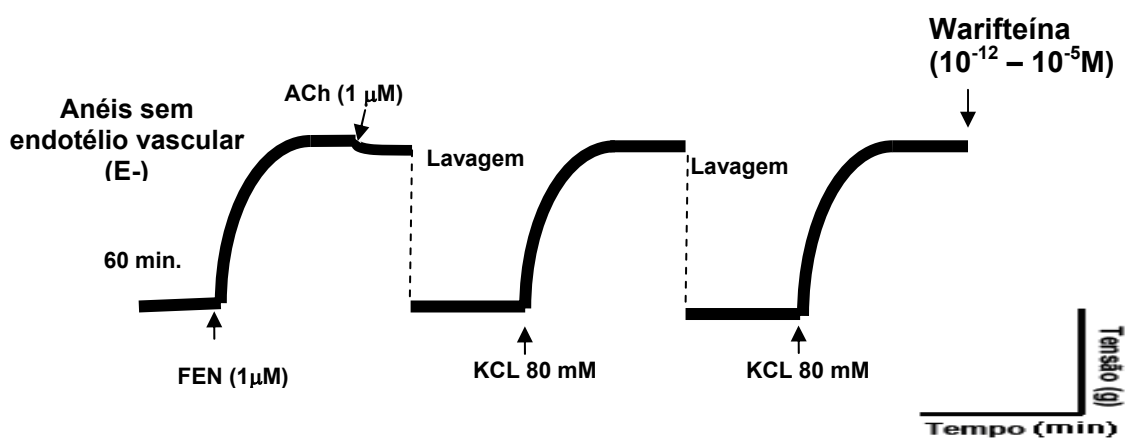


Figura 8: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar o efeito de concentrações crescentes de warifteína (10^{-12} - 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com solução despolarizante de KCl 80mM.

4.1.2.4 Verificação do efeito de warifteína sobre a curva concentração-resposta para o Ortovanadato de Sódio, em anéis de aorta torácica de rato, sem endotélio funcional

Após a verificação da ausência do endotélio funcional, foi obtida uma curva concentração-resposta ao ortovanadato de sódio (10^{-5} - 3×10^{-3} M), um potente inibidor da atividade da fosfotirosina fosfatase (ALCÓN, 2000) (curva controle). Em seguida, as preparações foram lavadas com solução de Krebs e mantidas por um período de estabilização de 60 minutos (ALCÓN, 2000). O líquido nutritivo foi trocado a cada 15 minutos. Posteriormente, a warifteína foi adicionada, em concentrações isoladas, às cubas e uma nova curva concentração resposta ao ortovanadato de sódio (10^{-5} – 3×10^{-3} M) foi obtida. O efeito de warifteína foi calculado, comparando-se as curvas de ortovanadato de sódio na ausência (controle) e na presença do alcalóide.

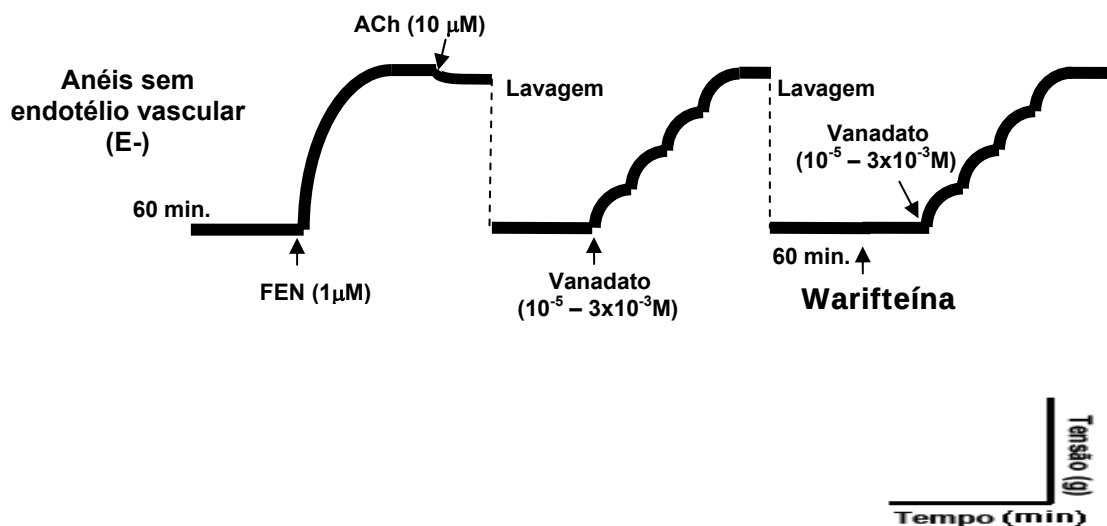


Figura 9: Representação esquemática do protocolo experimental para a avaliação do efeito induzido pela warifteína sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de Na_3VO_4 (10^{-5} – 3×10^{-3} M).

4.1.2.5 Verificação da participação de canais para K^+ na resposta relaxante, induzida por warifteína, em anéis de aorta torácica de rato

Logo em seguida à verificação da ausência do endotélio vascular, como descrito anteriormente, a solução de Krebs da cuba foi trocada pela solução de Krebs com 20 mM de KCl (Tabela 3) e as preparações permaneciam, nesta solução, até o final do experimento. Este procedimento impede, parcialmente, o efluxo de K^+ e atenua relaxamentos mediados por abertura de canais para K^+ (CAMPBELL et al., 1996; CLARK; FUCHS, 1997). Decorridos 30 minutos, uma nova contração tônica foi induzida com NOR ($10^{-8} - 10^{-4}$ M) (SHEN, 2008) e, em seguida, uma curva concentração-resposta para warifteína ($10^{-12} - 10^{-5}$ M) foi obtida, para investigar a participação de canais de potássio no vasorelaxamento provocado pelo alcalóide.

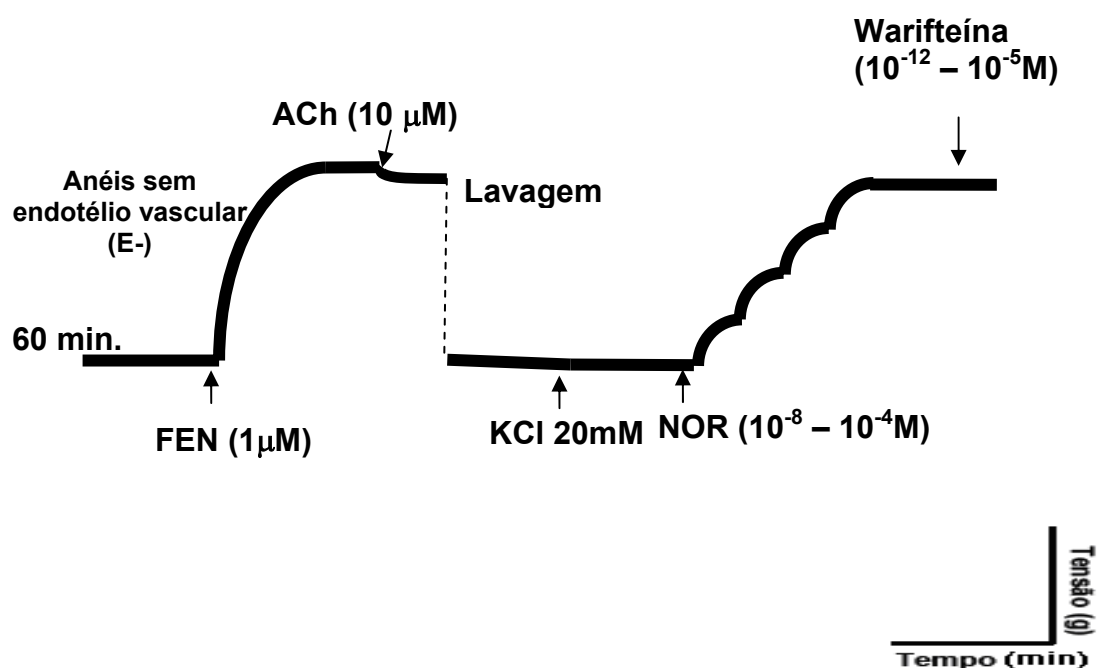


Figura 10: Representação esquemática do protocolo experimental para investigar a influência do aumento de K^+ extracelular na resposta vasorelaxante induzida por concentrações crescentes de warifteína ($10^{-12} - 10^{-5}$ M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional.

4.1.2.6 Verificação da resposta relaxante, induzida por warifteína, na presença de diferentes concentrações de TEA

Depois de verificar a ausência do endotélio funcional, como descrito, anteriormente, foi adicionado, a cubas distintas, 1mM, 3mM e 5mM de cloreto de tetraetilamônio (TEA). Na concentração de 1mM o TEA é um bloqueador de canais BK_{Ca} (BANG et al., 1998; JACKSON, 2000). Na concentração de 5mM, o TEA também bloqueia canais para K^+ ativados por cálcio (CHO et al., 2007). Foi realizada, após um período de 30 minutos, uma curva cumulativa para noradrenalina (NOR $10^{-8} - 10^{-4}$ M) (SHEN, 2008) e, após a estabilização desta curva (40 min), concentrações crescentes de warifteína ($10^{-12} - 10^{-5}$ M) foram adicionadas à cuba, de maneira cumulativa na fase tônica e sustentada da curva, a fim de verificarmos o efeito vasorelaxante induzido por warifteína na presença de diferentes concentrações de TEA.

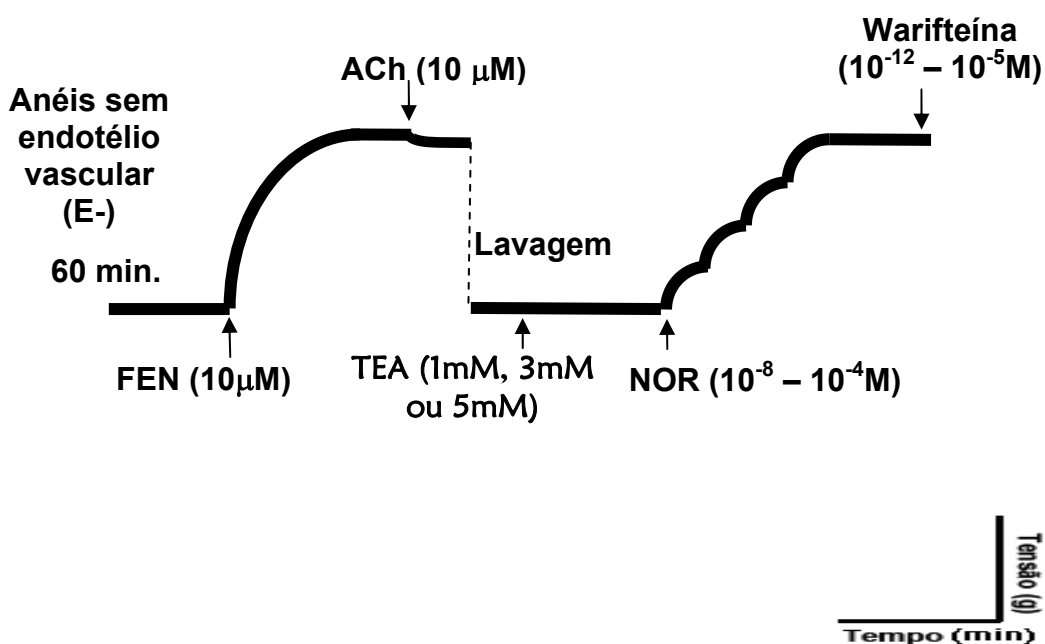


Figura 11: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar a influência de TEA (1mM, 3mM e 5mM) nas respostas vasorelaxantes induzidas por warifteína ($10^{-12} - 10^{-5}$ M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional.

4.1.2.7 Verificação da participação de canais para potássio sensíveis à voltagem (K_v), nas respostas relaxantes, induzidas por warifteína

Após a verificação da ausência do endotélio funcional, foi adicionado, à cuba, 1mM de 4-aminopiridina (4-AP) (NIU et al., 2008), um bloqueador de canais para potássio sensíveis à voltagem (JACKSON, 2000). Após 30 minutos da adição de 4-AP, uma curva cumulativa de noradrenalina (NOR 10^{-8} – 10^{-4} M) (SHEN, 2008) foi realizada e concentrações crescentes de warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) foram adicionadas à cuba, de maneira cumulativa na fase tônica e sustentada da curva, para observarmos se havia participação dos canais K_v no efeito vasorelaxante induzido por warifteína.

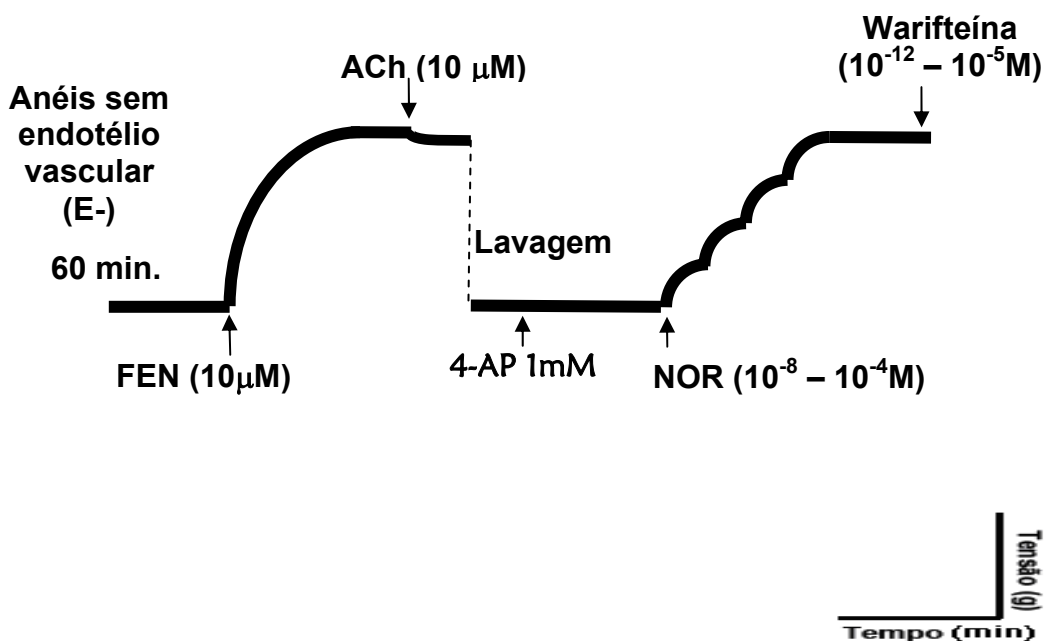


Figura 12: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar a influência de 4-AP (1mM) nas respostas vasorelaxantes induzidas por warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional.

4.1.2.8 Verificação da participação de canais para potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}), nas respostas, induzidas por warifteína

Depois da verificação da ausência do endotélio funcional, foi adicionado à cuba $10\mu\text{M}$ de glibenclamida, (NIU et al., 2008) um bloqueador específico de canais de potássio sensíveis a ATP (BANG, 1998; JACKSON, 2000). Foi realizada, após um período de 30 minutos, uma curva cumulativa para noradrenalina (NOR $10^{-8} - 10^{-4} \text{ M}$) (SHEN, 2008) e, após a estabilização desta curva (40 min), concentrações crescentes de warifteína ($10^{-12} - 10^{-5} \text{ M}$) foram adicionadas à cuba, de maneira cumulativa na fase tônica e sustentada da curva, para que observássemos se havia participação dos canais K_{ATP} nas respostas vasorelaxantes induzidas por warifteína.

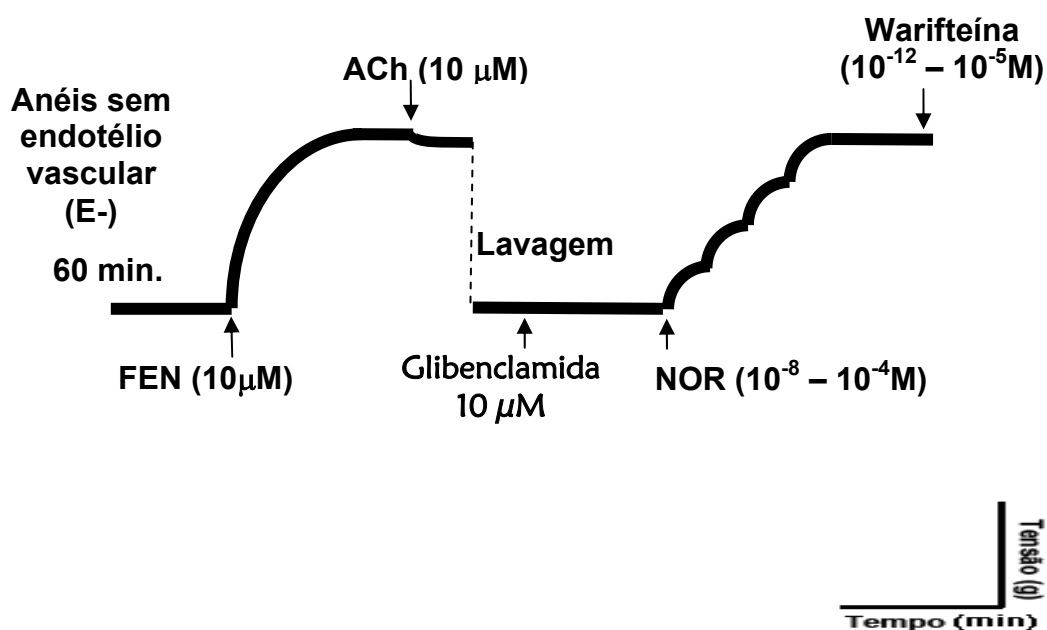


Figura 13: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar a influência de Glibenclamida ($10\mu\text{M}$) nas respostas vasorelaxantes induzidas por warifteína ($10^{-12} - 10^{-5} \text{ M}$) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional.

4.1.2.9 Verificação da participação de canais de potássio retificadores de voltagem (K_{ir}), nas respostas relaxantes, induzidas por warifteína

Após a verificação da ausência do endotélio funcional, foi adicionado, à cuba, 1mM de cloreto de bário, um bloqueador de canais de potássio retificadores de voltagem (NIU et al., 2008). Foi realizada, após um período de 30 minutos, uma curva cumulativa para noradrenalina (NOR 10^{-8} – 10^{-4} M) (SHEN, 2008) e, após a estabilização desta curva (40 min), concentrações crescentes de warifteína (10^{-12} - 10^{-5} M) foram adicionadas à cuba, de maneira cumulativa na fase tônica e sustentada da curva, a fim de que observássemos se havia participação dos canais K_{ir} nas respostas vasorelaxantes induzidas por warifteína.

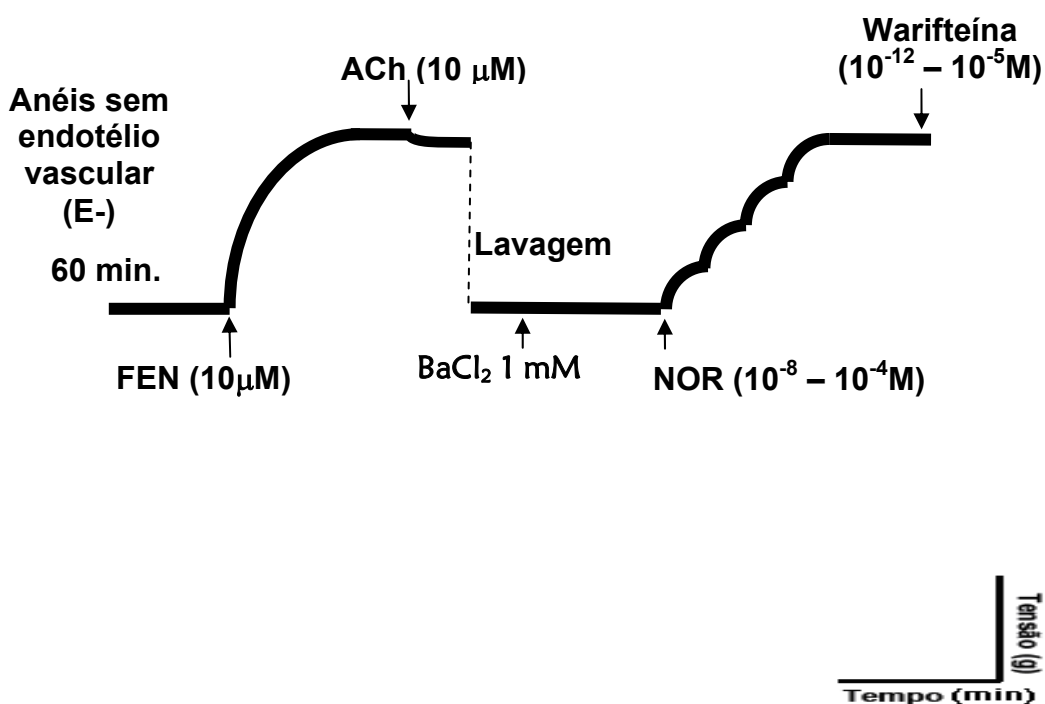


Figura 14: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliar a influência de BaCl₂ (10µM) nas respostas vasorelaxantes induzidas por warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional.

4.1.2.10 Verificação do efeito de warifteína sobre a curva concentração-resposta para CaCl_2 , em anéis de aorta torácica de rato.

Após a verificação da ausência do endotélio funcional, as preparações foram expostas a uma solução despolarizante de KCl 60 mM (Tabela 4). Em seguida, elas foram lavadas com solução de Krebs, nominalmente, sem Ca^{2+} (Tabela 5) e mantidas nesse meio por um período de 15 min. Após isto, a solução de banho dos tecidos foi trocada por uma solução despolarizante de KCl 60 mM, nominalmente, sem Ca^{2+} (Tabela 6). Posteriormente, foi obtida uma curva concentração-resposta ao CaCl_2 (10^{-6} - 3×10^{-2} M) (curva controle).

O processo foi repetido, sendo concentrações isoladas de warifteína incubadas às preparações juntamente com a solução despolarizante de KCl 60 mM, nominalmente, sem Ca^{2+} e uma nova curva concentração resposta ao CaCl_2 (10^{-6} - 3×10^{-2} M) foi obtida. O efeito de warifteína sobre o influxo de Ca^{2+} , através dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem, foi analisado, comparando-se as curvas de CaCl_2 na ausência (controle) e na presença do alcalóide (SANTOS, 2007).

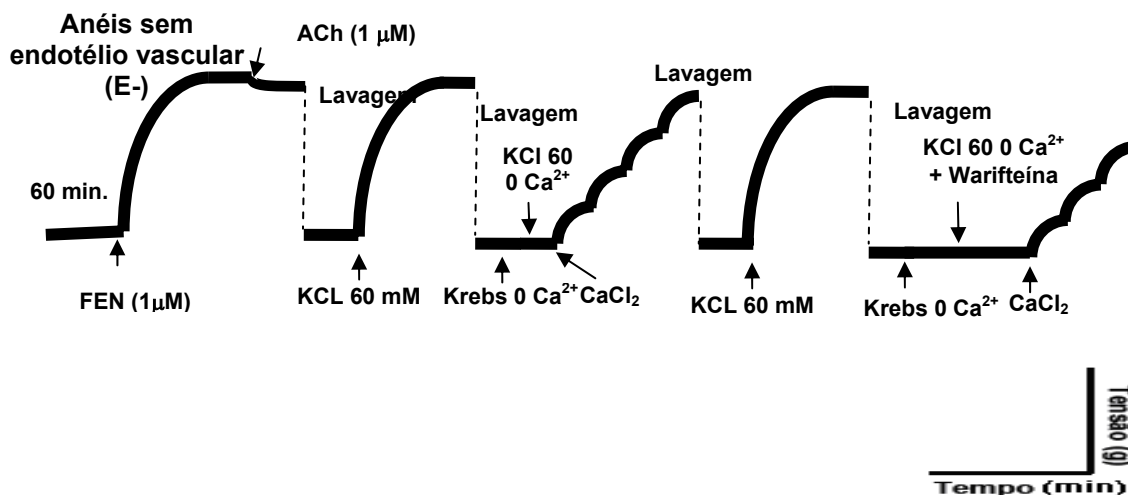


Figura 15: Representação esquemática do protocolo experimental para a avaliação do efeito da warifteína sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de CaCl_2 (10^{-6} - 3×10^{-2} M) em meio despolarizante (KCl 60mM), nominalmente, sem cálcio.

4.1.2.11 Verificação do efeito de warifteína sobre o influxo de Ca^{2+} , em anéis de aorta torácica de rato.

Depois de verificar a ausência do endotélio funcional, as preparações foram lavadas com Krebs livre de Ca^{2+} (Tabela 7). Após um período de estabilização de 20 minutos, foi induzida uma contração com NOR (10^{-4}M), para depletar o Ca^{2+} dos estoques intracelulares de Ca^{2+} . Este procedimento foi realizado até que não fosse observada nenhuma contração quando a NOR foi adicionada às cubas. Em seguida, as preparações tiveram o líquido nutritivo trocado por Krebs, nominalmente, sem cálcio. Decorridos 15 minutos, foi adicionada, às cubas, uma concentração de 10^{-4}M de NOR e 5 minutos depois, foi acrescentada às preparações uma concentração de 2mM de CaCl_2 (DONG, 1997) obtendo-se uma contração controle. Após este processo, as preparações foram lavadas e o procedimento repetido na presença de concentrações isoladas de warifteína, que foram adicionadas às cubas logo após o Krebs, nominalmente, sem Ca^{2+} ser colocado. As curvas induzidas pelo CaCl_2 , na ausência da droga e na presença dela, foram comparadas para verificar se a warifteína foi capaz de reduzir a segunda curva induzida pelo CaCl_2 .

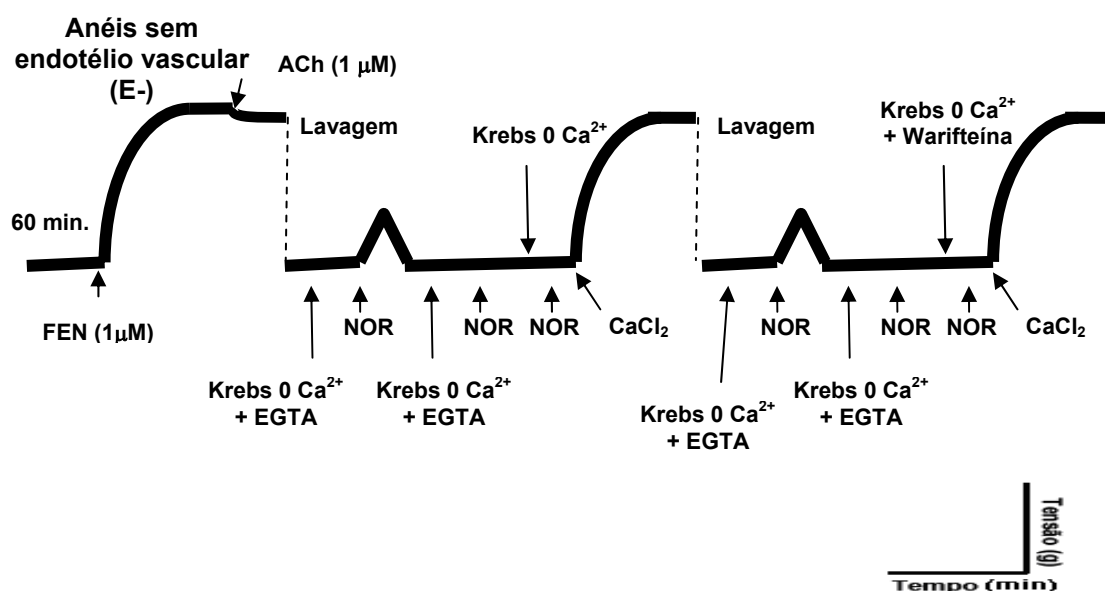


Figura 16: Representação esquemática do protocolo experimental para a avaliação do efeito da warifteína sobre as contrações induzidas por CaCl_2 (2mM) em solução, nominalmente, sem cálcio.

4.2 Análise Estatística

Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. As curvas concentração-resposta foram analisados por regressão não-linear, de onde foram calculados os valores de pD_2 ($-\log CE_{50}$) a partir dos valores percentuais das respostas induzidas pela warifteína para os experimentos. As diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste *t-Student* para amostras independentes, procedimento que comparou as médias de dois grupos de casos. Os dados foram considerados significantes para $p < 0,05$. Em todos estes procedimentos, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 4.2.

5. RESULTADOS

5.1 Ensaios farmacológicos *in vitro*

5.1.1 Efeito da warifteína sobre anéis de aorta torácica de rato com endotélio e sem endotélio funcional pré-contraídos com noradrenalina

A warifteína produziu um efeito vasorelaxante de maneira concentração dependente em anéis pré-contraídos com noradrenalina, tanto na presença quanto na ausência do endotélio funcional (Figura 17). Alterações significativas não foram observadas entre os valores de pD_2 e $E_{máx}$ obtidos na presença do endotélio funcional ($pD_2 = 9,40 \pm 0,06$ e $E_{máx} = 97,33 \pm 1,28$; $n = 5$) ou na ausência dele ($pD_2 = 9,18 \pm 0,10$ e $E_{máx} = 88,41 \pm 3,83$; $n = 5$). Não houve diferença entre efeito máximo ($p = 0,052$) e o pD_2 ($p = 0,1$) para anéis com endotélio funcional e sem este (Tabela 8, p.61). O efeito máximo de cada concentração foi atingido de 10 a 15 minutos após administração daquela concentração. O efeito vasorelaxante induzido por warifteína foi revertido após 30 minutos de sucessivas lavagens com Krebs normal. A adição de warifteína na ausência de um agente contracturante também não induziu qualquer alteração significativa do tônus basal (Dados não mostrados).

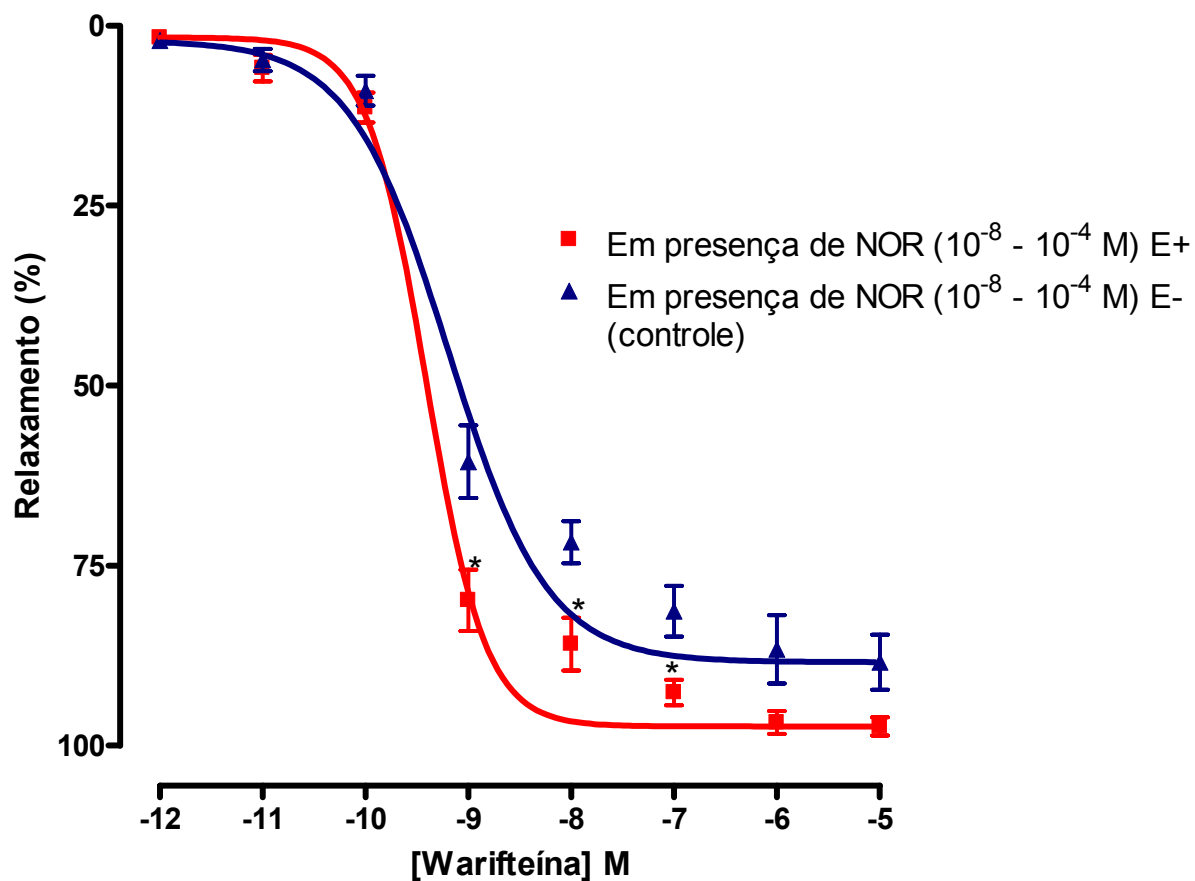


Figura 17: Curva concentração-resposta para o efeito relaxante de Warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) em anéis de aorta torácica de rato com endotélio intacto ($n=5$) e removido ($n=5$), pré-contráídos com noradrenalina (10^{-8} – 10^{-4} M). Os valores estão expressos com média $\pm$ e.p.m.

5.1.2 Efeito de warifteína sobre anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional pré-contraídos com Prostaglandina F 2 α (PGF 2 α)

A warifteína teve seu $E_{m\acute{a}x}$ reduzido ($p < 0,01$) em anéis de aorta torácica sem endotélio funcional pré-contraídos com PGF 2 α ($E_{m\acute{a}x} = 64,40 \pm 4,50$), embora não tenha ocorrido alteração significativa ($p = 0,95$) do pD_2 ($pD_2 = 9,17 \pm 0,19$) (Figura 18).

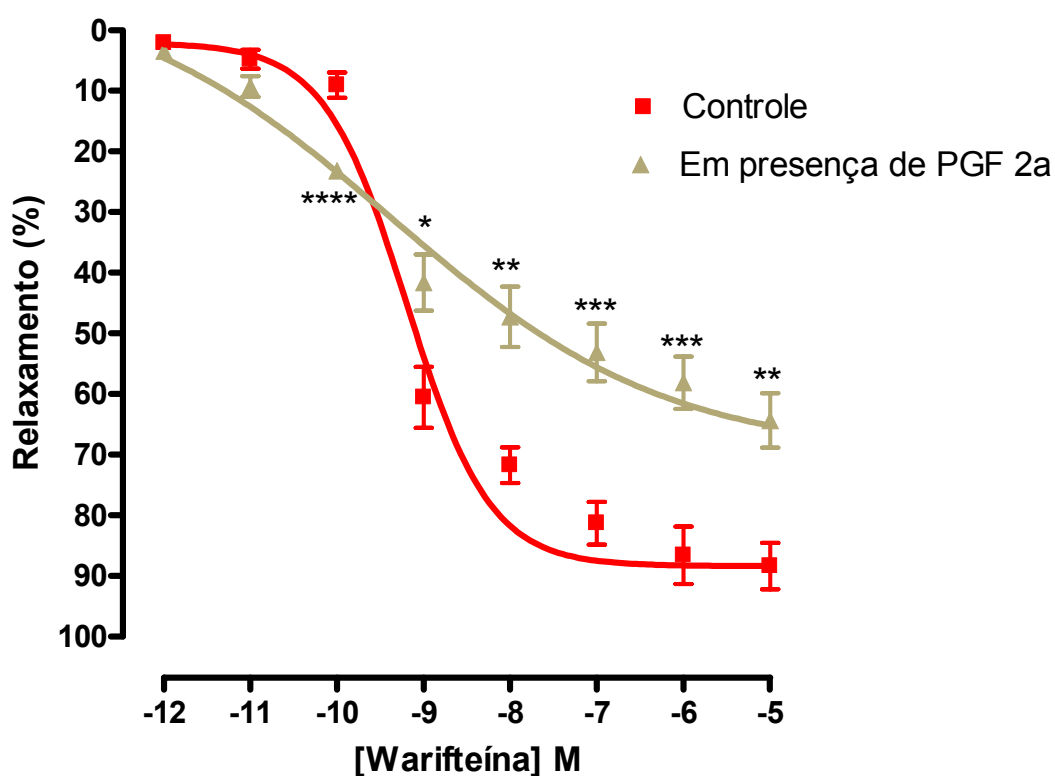


Figura 18: Curva concentração-resposta para o efeito relaxante de warifteína ($10^{-12} - 10^{-5}$ M) sobre contrações induzidas por noradrenalina ($10^{-8} - 10^{-4}$ M) e por PGF 2 α ($10^{-6} - 10^{-5}$ M). Os valores estão expressos com média $\pm$ e.p.m. para 8 experimentos; ** $p < 0,01$ versus anéis com endotélio removido e pré-contraídos com noradrenalina

5.1.3 Efeito da warifteína sobre a contração induzida, por KCl 80mM, em anéis sem endotélio funcional da aorta torácica de rato

Na presença da solução despolarizante de KCL 80mM, o efeito da warifteína em anéis sem endotélio funcional de aorta torácica de rato foi significativamente atenuado (Figura 19), com redução ($p < 0,0001$) do efeito máximo ($E_{\text{máx}} = 13,95 \pm 2,87$; $n = 6$) embora o pD_2 ($pD_2 = 8,09 \pm 0,53$) não tenha apresentado diferença estatística ($p = 0,14$) em relação aos anéis, sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina (Tabela 8).

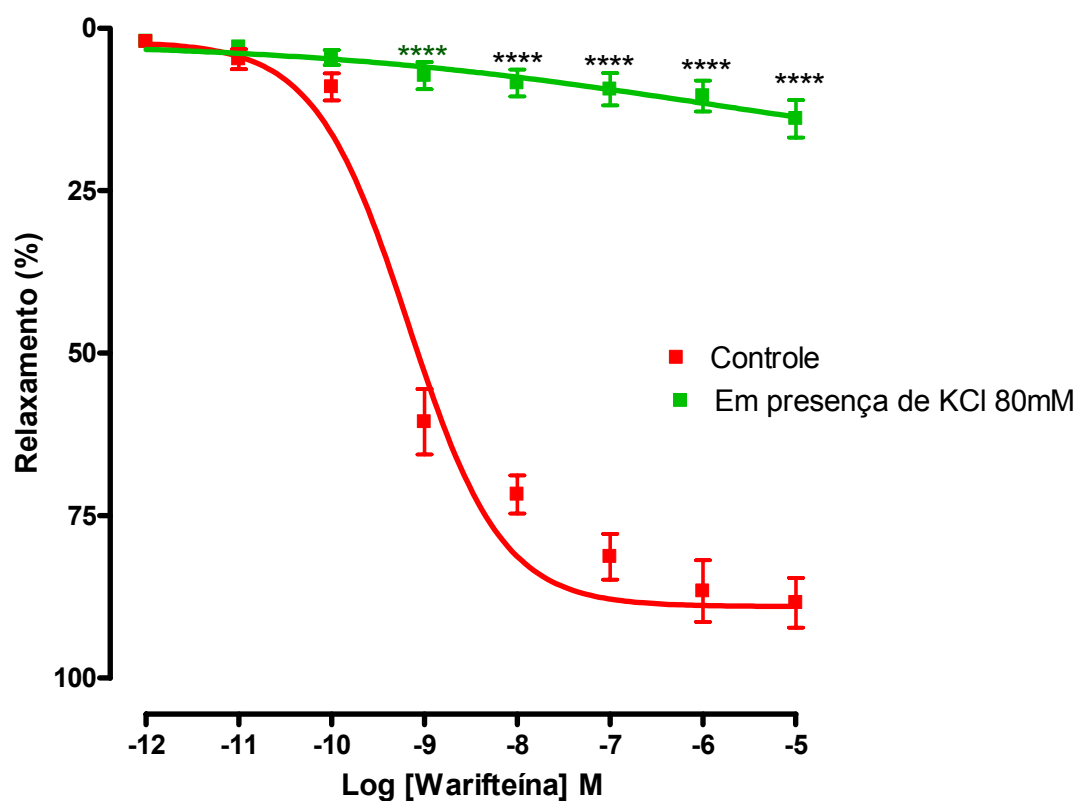


Figura 19: Curva concentração-resposta para o efeito relaxante de warifteína ($10^{-12} - 10^{-5}$ M) sobre contrações induzidas por noradrenalina ($10^{-8} - 10^{-4}$ M) e KCl 80mM em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio vascular. Os valores estão expressos com média $\pm$ e.p.m de 6 experimentos; $p < 0,0001$ versus anéis com endotélio removido.

5.1.4 Efeito de warifteína sobre a curva concentração-resposta para o ortovanadato de sódio em anéis de artéria aorta torácica de rato sem endotélio.

A administração cumulativa de Na_3VO_4 (10^{-6} – $3 \times 10^{-3}\text{M}$) produziu uma contração dependente de concentração em anéis de aorta torácica sem endotélio funcional de rato. Quando a concentração de 10^{-5}M de warifteína foi incubada nas preparações, a contração induzida por Na_3VO_4 não sofreu deslocamento nem redução de amplitude ($p=0,056$). A contração máxima na presença da concentração de 10^{-5}M de warifteína foi de $92,51\% \pm 4,50$ ($n=9$). (Figura 20).

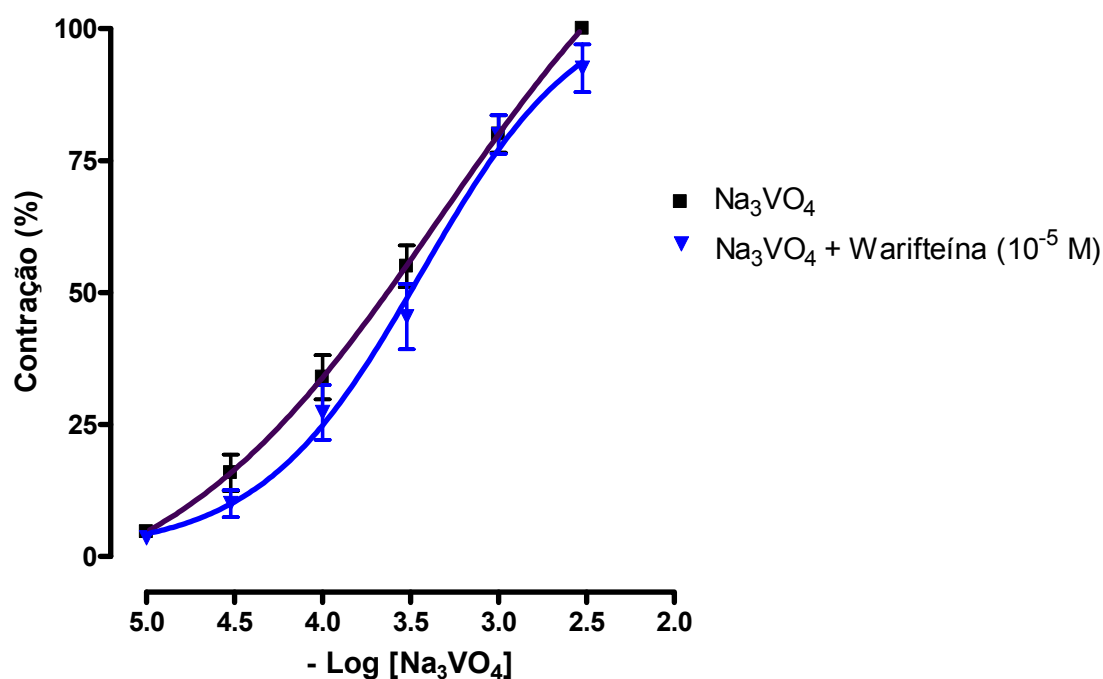


Figura 20: Curva concentração-resposta para Na_3VO_4 em anéis de aorta torácica de rato desprovidos de endotélio funcional (controle) e na presença de concentração isolada de warifteína (10^{-5}M). Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 9 experimentos.

5.1.5 Participação dos canais para K^+ no efeito vasorelaxante induzido pela warifteína, em anéis sem endotélio vascular de aorta torácica de rato

Na presença da solução despolarizante de KCL 20mM, a curva concentração-resposta para warifteína em anéis de aorta torácica de rato foi deslocada significativamente para a direita (Figura 21), com redução ($p < 0,0001$) de efeito máximo ($E_{\text{máx}} = 41,77 \pm 4,08$; $n = 5$) e de pD_2 ($p < 0,01$) em relação aos anéis, sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina ($pD_2 = 6,75 \pm 0,63$) (Tabela 8).

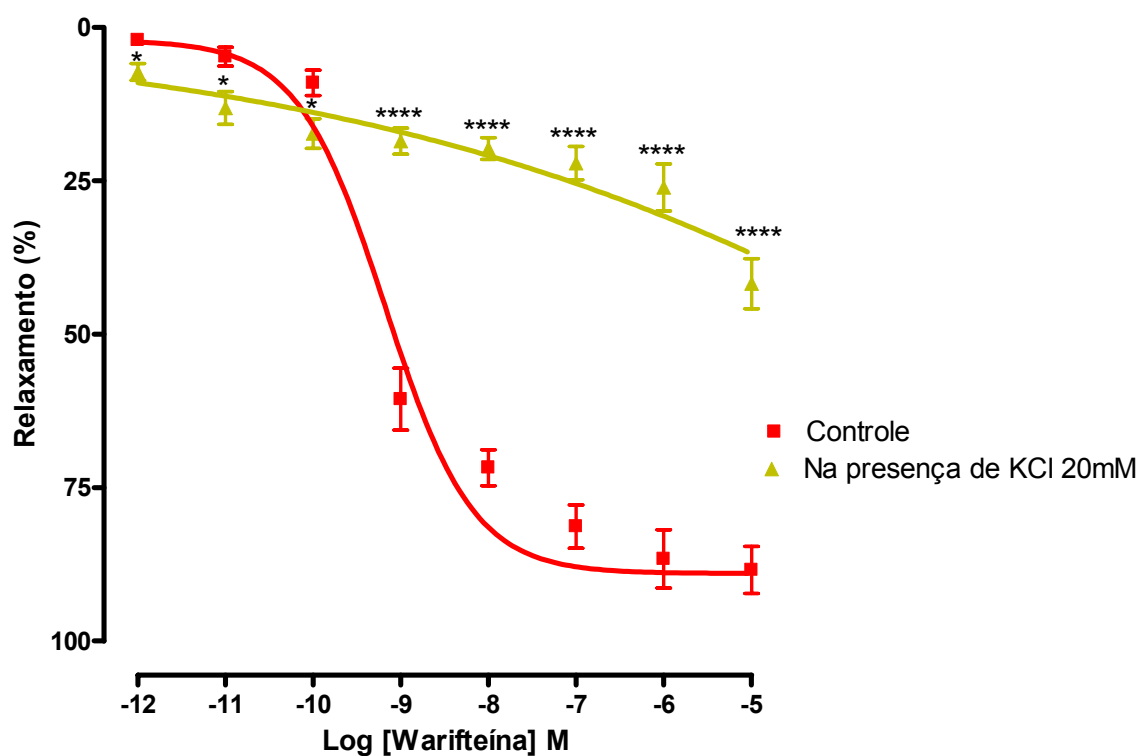


Figura 21: Curva concentração-resposta para o efeito relaxante de warifteína ($10^{-12} - 10^{-5}$ M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional pré-contraídos com noradrenalina na presença e na ausência de KCl 20 mM. Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 5 experimentos; **** $p < 0,0001$ versus anéis com endotélio removido

5.1.6 Efeito vasorelaxante, induzido por warifteína, em anéis de aorta torácica sem endotélio de rato, na presença de diferentes concentrações de Cloreto de Tetraetilamônio (TEA)

Na presença de 1mM de TEA, a curva concentração-resposta para warifteína em anéis de aorta torácica, sem endotélio vascular, isolada de rato foi deslocada para a direita, apresentando redução ($p<0,05$) de pD_2 ($pD_2 = 8,00 \pm 0,35$) sem apresentar redução ($p=0,23$) de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x} = 76,23 \pm 8,89$; $n=6$).

Quando a concentração de TEA foi aumentada para 3mM, a curva, também, foi deslocada para a direita e o efeito máximo da warifteína foi menor ($p<0,001$) do que em anéis pré-contraídos com noradrenalina e sem bloqueador (controle) ($E_{m\acute{a}x} = 48,75 \pm 5,26$; $n=5$). Houve redução ($p<0,0001$) de pD_2 ($pD_2=6,57 \pm 0,17$).

Aumentando ainda mais a concentração de TEA para 5mM, a curva, igualmente, foi deslocada para a direita e o efeito máximo da warifteína foi menor ($p<0,0001$) do que em anéis controle ($E_{m\acute{a}x} = 37,70 \pm 3,71$; $n=5$). Houve redução ($p<0,01$) de pD_2 ($pD_2=8,07 \pm 0,30$) (Tabela 8). (Figura 22).

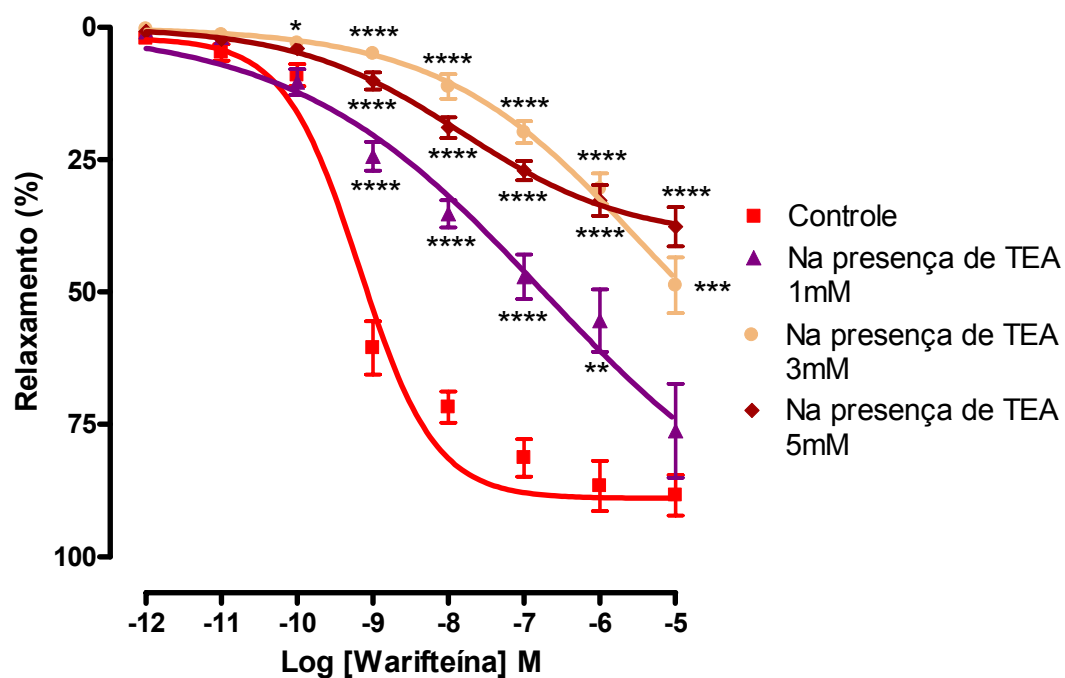


Figura 22: Efeito vasorelaxante de warifteína (10^{-12} – 10^{-5} M) sobre contrações induzidas por noradrenalina (10^{-8} – 10^{-4} M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional na presença e na ausência de TEA (1mM, 3mM e 5mM). Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 6 experimentos para cada concentração; *** $p < 0,001$ versus anéis com endotélio removido; **** $p < 0.0001$ versus anéis com endotélio removido.

5.1.7 Participação dos K_v no efeito vasorelaxante, induzido por warifteína, em anéis da artéria aorta torácica sem endotélio de rato

Na presença de 4-aminopiridina (1mM), a curva concentração-resposta para warifteína em anéis de aorta torácica isolada de rato foi deslocada, significativamente, para a direita. Houve redução ($p < 0,01$) de pD_2 ($pD_2 = 8,37 \pm 0,19$) sem ocorrer alteração significativa ($p = 0,34$) de efeito máximo ($E_{máx} = 93,33 \pm 3,22$; $n = 7$) (Tabela 8) (Figura 23).

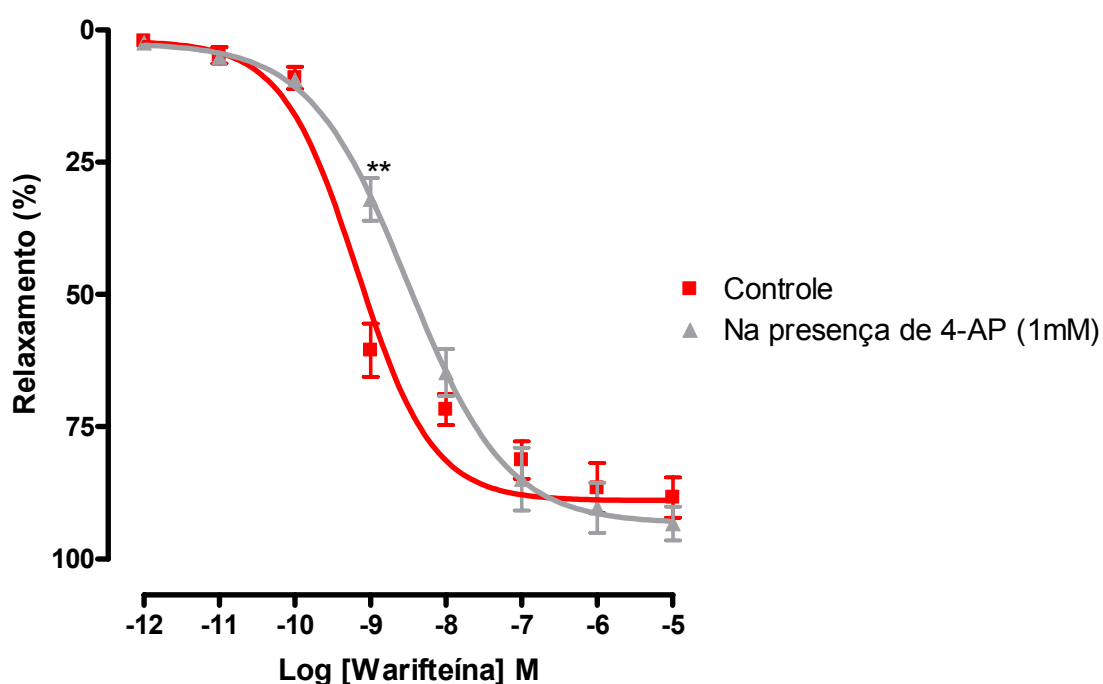


Figura 23: Efeito vasorelaxante de warifteína ($10^{-12} - 10^{-5}$ M) sobre contrações induzidas por noradrenalina ($10^{-8} - 10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional na presença e na ausência de 4-AP (1mM). Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 7 experimentos.

5.1.8 Participação dos K_{ATP} no efeito vasorelaxante induzido por warifteína em anéis da artéria aorta torácica sem endotélio de rato

Na presença de glibenclamida ($10\mu\text{M}$), a curva concentração-resposta para warifteína em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio foi deslocada, de modo significativo, para a direita. Houve redução ($p < 0,001$) de pD_2 ($pD_2 = 8,14 \pm 0,12$) sem alteração ($p = 0,14$) de efeito máximo ($E_{\text{máx}} = 96,44 \pm 3,17$; $n = 5$) (Tabela 8). (Figura 24)

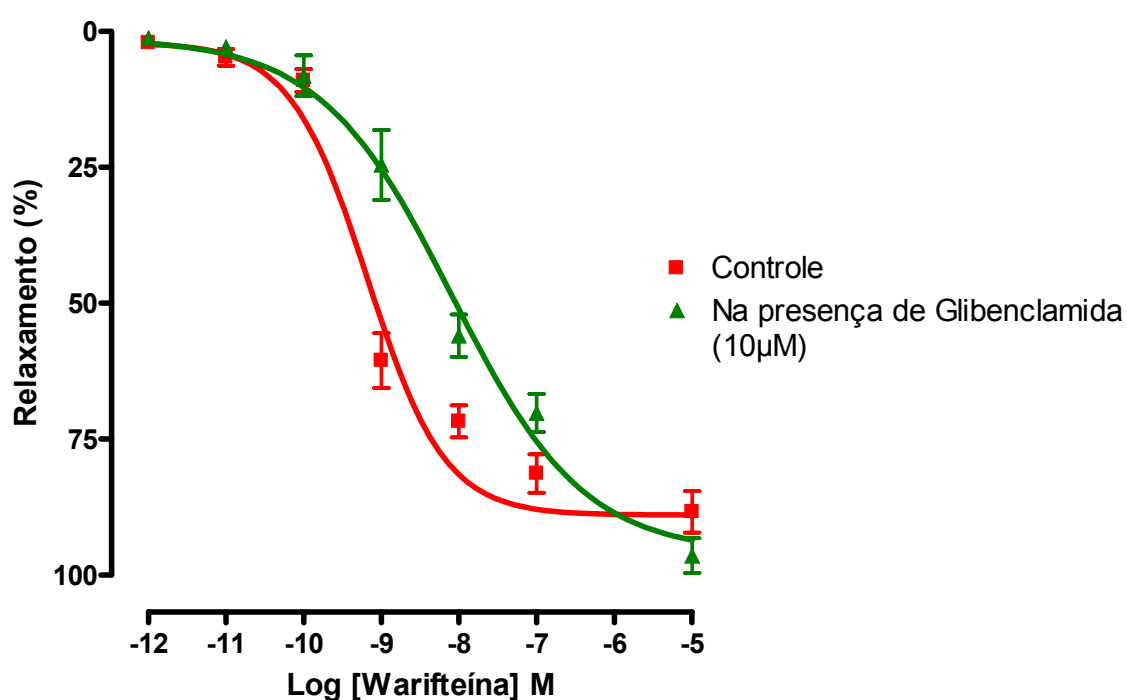


Figura 24: Efeito vasorelaxante de warifteína ($10^{-12} - 10^{-5}$ M) sobre contrações induzidas por noradrenalina ($10^{-8} - 10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional na presença e na ausência de Glibenclamida ($10\mu\text{M}$). Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 5 experimentos.

5.1.9 Participação dos K_{ir} no efeito vasorelaxante induzido por warifteína em anéis da artéria aorta torácica sem endotélio de rato

Na presença de cloreto de bário (BaCl_2), 1mM, a curva concentração-resposta para warifteína em anéis de aorta torácica sem endotélio isolada de rato não foi deslocada para a direita (Figura 25). Não houve alteração nem de efeito máximo ($p = 0,38$) nem de pD_2 ($p = 0,11$) ($E_{\text{máx}} = 93,86 \pm 4,58$; $pD_2 = 8,85 \pm 0,16$; $n = 5$) (Tabela 8).

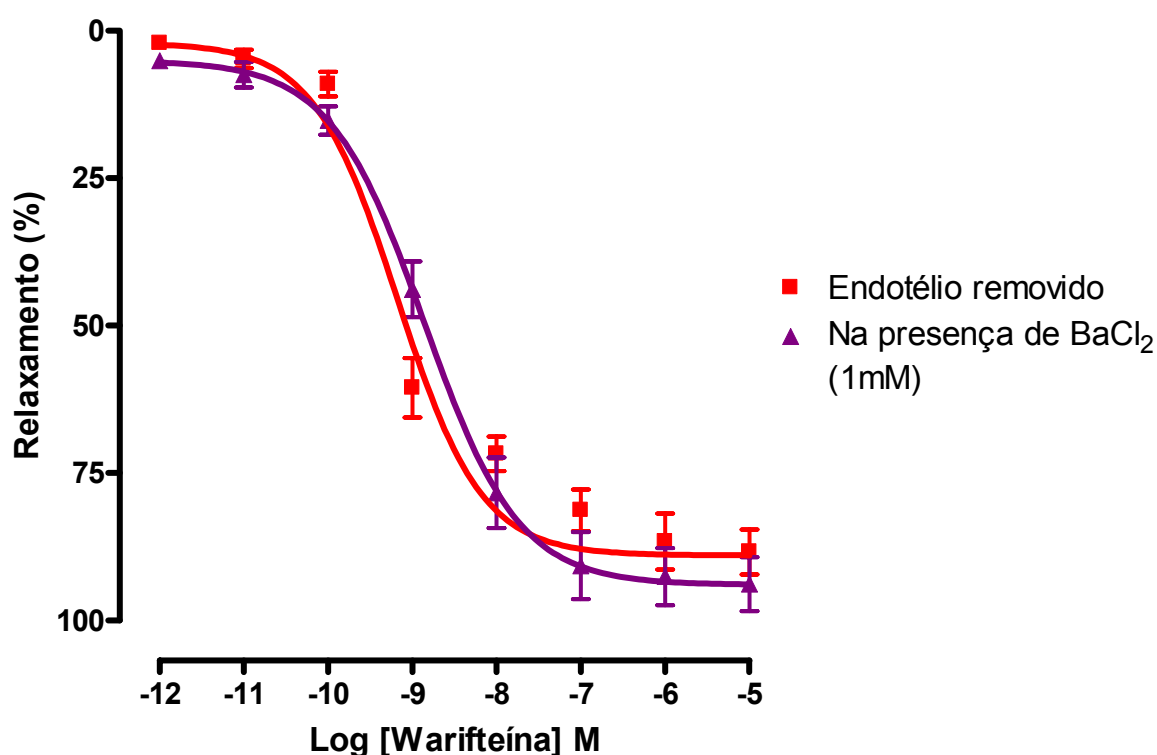


Figura 25: Efeito vasorelaxante de warifteína ($10^{-12} - 10^{-5}$ M) sobre contrações induzidas por noradrenalina ($10^{-8} - 10^{-4}$ M) em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio funcional na presença e na ausência de BaCl_2 (1mM). Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 5 experimentos.

5.1.10 Efeito de warifteína sobre a curva concentração-resposta para CaCl_2 , em anéis sem endotélio funcional de aorta torácica de rato.

A administração cumulativa de CaCl_2 (10^{-6} – $3 \times 10^{-2}\text{M}$) produziu uma contração dependente de concentração em anéis de aorta torácica sem endotélio funcional de rato. Quando a concentração de 10^{-5}M de warifteína foi incubada nas preparações, a contração induzida por CaCl_2 não sofreu deslocamento, nem redução de amplitude ($p=0,12$). A contração máxima na presença da concentração de 10^{-5}M de warifteína foi de $99,54\% \pm 0,37$ ($n=5$). (Figura 26).

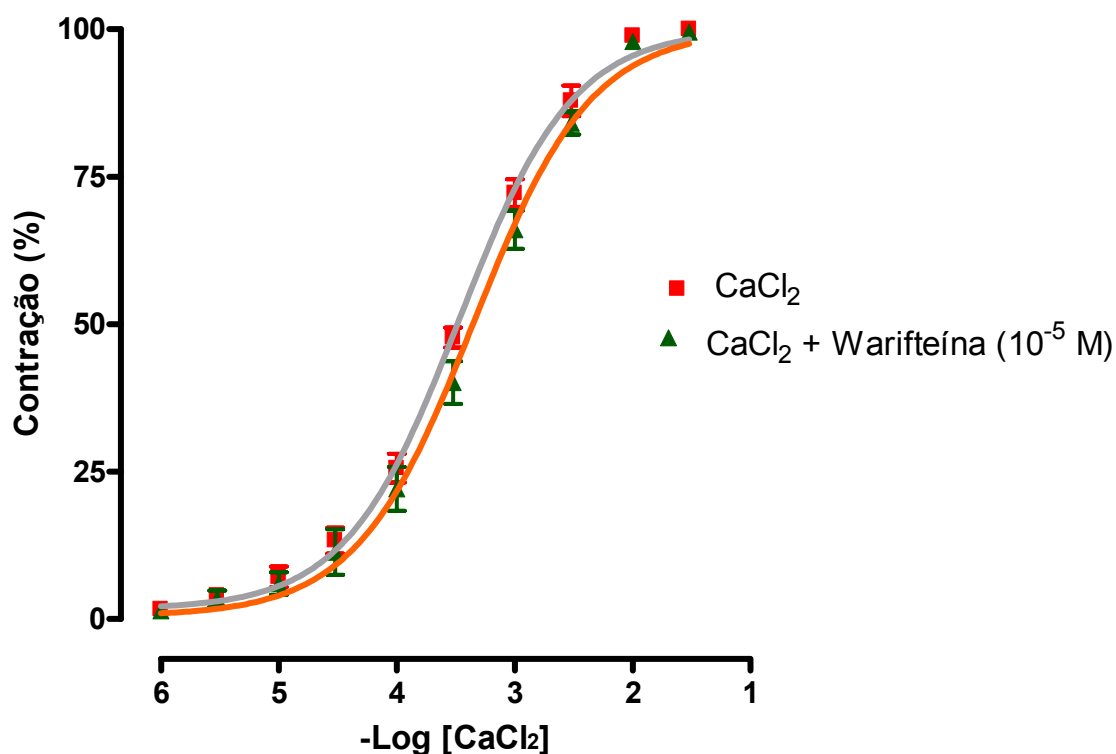


Figura 26: Curvas concentração-resposta para CaCl_2 em solução despolarizante (KCl 60 mM), nominalmente, sem Ca^{2+} em anéis de aorta torácica de rato desprovidos de endotélio funcional e na presença de concentração isolada de warifteína (10^{-5}M). Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 5 experimentos.

5.1.11 Efeito de warifteína sobre o influxo de cálcio induzido por contração com noradrenalina, em anéis sem endotélio funcional de aorta de rato

A warifteína não produziu inibição do influxo de cálcio induzido pela contração com CaCl_2 na presença de noradrenalina em anéis sem endotélio funcional de aorta de rato, em solução, nominalmente, sem Ca^{2+} ($p=0,10$). A contração máxima na presença da concentração de 10^{-5} M de warifteína foi de $95,62 \pm 2,69$ ($n=5$) (Figura 27).

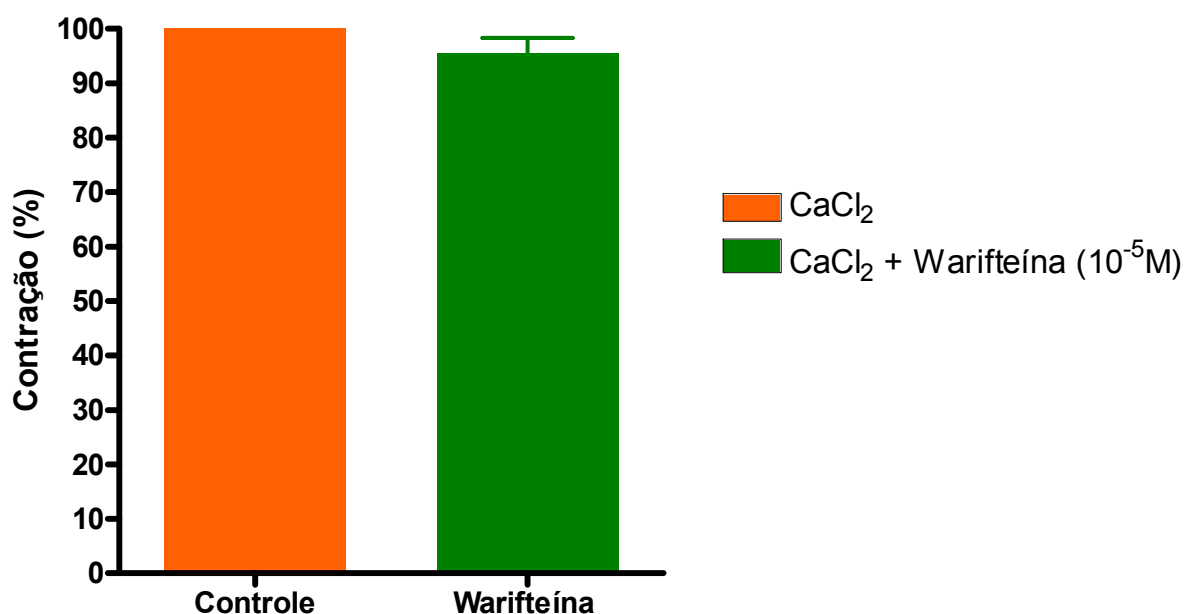


Figura 27: Efeito de warifteína sobre as contrações induzidas por CaCl_2 na presença de noradrenalina (10^{-4}M) em solução, nominalmente, sem Ca^{2+} em anéis de aorta torácica de rato desprovidos de endotélio funcional e na presença de concentração isolada de warifteína (10^{-5} M). Os valores estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de 5 experimentos.

Condição Experimental	$E_{\text{máx}}$ (%) de relaxamento	pD_2 (-Log CE_{50})	n
Pré contraídos com NOR (com endotélio)	$97,33 \pm 1,28$	$9,40 \pm 0,06$	5
Pré contraídos com NOR (sem endotélio)	$88,41 \pm 3,83$	$9,18 \pm 0,10$	5
Pré contraídos com KCl 80Mm (sem endotélio)	$13,95 \pm 2,87^{****}$	$8,09 \pm 0,53$	6
Pré contraídos com PGF 2α (sem endotélio)	$64,40 \pm 4,50^{**}$	$9,17 \pm 0,19$	8
Após KCl 20mM	$41,77 \pm 4,08^{****}$	$6,75 \pm 0,63^{**}$	5
Após TEA 1mM	$76,23 \pm 8,89$	$8,00 \pm 0,35^*$	6
Após TEA 3mM	$48,75 \pm 5,26^{***}$	$6,57 \pm 0,17^{****}$	6
Após TEA 5mM	$37,70 \pm 3,71^{****}$	$8,07 \pm 0,30^{**}$	6
Após 4-AP	$93,33 \pm 3,22$	$8,37 \pm 0,19^{**}$	7
Após Glibenclamida	$96,44 \pm 3,17$	$8,14 \pm 0,12^{***}$	5
Após $BaCl_2$	$93,86 \pm 4,58$	$8,85 \pm 0,16$	5

Os valores estão expressos com média $\pm$ e.p.m * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Todos os resultados destes protocolos foram comparados com o controle (anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com NOR).

Tabela 8: Valores do $E_{\text{máx}}$ e de pD_2 para a warifteína em anéis de aorta torácica de rato em diferentes condições experimentais.

6. DISCUSSÃO

Em aorta torácica isolada de rato, obtivemos, como principal resultado, que a warifteína produz um relaxamento independente de endotélio vascular, provavelmente, através da ativação de canais para potássio. Este alcalóide produz um vasorelaxamento maior, quando age em anéis em que a contração vascular ocorre através da ativação do receptor α_1 adrenérgico.

A warifteína provocou um relaxamento vascular em aorta de coelho em estudos anteriores (FREITAS, 1996), no entanto, o mecanismo pelo qual este vasorelaxamento acontece não foi, totalmente, esclarecido. Diante destes resultados prévios, resolvemos aprofundar os estudos com a warifteína, utilizando aorta torácica de rato, através de metodologias *in vitro*, para tentarmos elucidar melhor o seu mecanismo de ação.

A warifteína é um alcalóide bis-benzilisoquinolina. Muitos alcalóides e derivados sintéticos deste grupo apresentam efeito anti-hipertensivo, como a tetrandrina, que reduz a pressão arterial em humanos. (KWAN; ACHIKE, 2002). Este grupo de alcalóides tem sido bastante utilizado no estudo de mecanismos de sinalização pelo cálcio (KWAN e ACHIKE, 2002). Outros alcalóides deste grupo, também, possuem atividade cardiovascular, como a dauricina, que apresenta efeito anti-arrítmico (QIAN, 2002). Nossos resultados mostraram que o vasorelaxamento induzido por warifteína, em aorta torácica de rato, não envolve a diminuição do influxo de cálcio em meio com altas concentrações de KCl.

A literatura dispõe de poucos estudos sobre o efeito vasorelaxante induzido pela warifteína. Estudos realizados por Freitas et al. (1996) mostram que a warifteína é capaz de promover um relaxamento vascular em aorta de coelho pré-contraída com noradrenalina, através da inibição de canais de cálcio dependentes de voltagem e dos operados por receptor, além de interferir na liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. Diante de resultados tão interessantes, uma vez que substâncias que atuem bloqueando os canais para Ca^{2+} são importantes para o controle das funções cardiovasculares, decidimos aprofundar os estudos com a warifteína, a fim de tentarmos elucidar melhor o mecanismo de ação deste alcalóide. Utilizamos aorta torácica de rato para

verificar se a warifteína seria capaz de produzir um vasorelaxamento neste vaso.

Inicialmente, constatamos que a warifteína apresentou efeito vasorelaxante concentração-dependente, em anéis de aorta torácica de rato pré-contraídas com noradrenalina.

O efeito relaxante deste alcalóide não foi alterado após o endotélio funcional ter sido removido mecanicamente, mostrando que o efeito vasorelaxante de warifteína independe do endotélio funcional (Figura 17). Desta forma, todos os protocolos posteriores a este foram realizados na ausência de endotélio funcional.

A fim de verificarmos se o relaxamento induzido por warifteína depende da ativação de um receptor α_1 -adrenérgico, trocamos o agente contracturante pelo PGF- 2α , que provoca vasoconstrição (VILLAZÓN et al., 2002) através da ativação de receptores prostanoídes F (ABREU et al., 2008).

Quando os anéis de aorta, na ausência de endotélio funcional, foram pré-contraídos com a PGF $_{2\alpha}$ (BANG et al., 1998) observamos que, o efeito máximo da warifteína apresentou uma redução significativa, embora não tenham ocorrido alterações significantes nos valores de pD_2 , comparando-se estes anéis com os que foram pré-contraídos com noradrenalina. Esta redução de efeito máximo sugere que o efeito relaxante da warifteína depende parcialmente da ativação do receptor α_1 -adrenérgico (Figura 18).

Sabendo que o relaxamento induzido por warifteína em anéis de aorta torácica de rato foi maior quando o receptor α_1 -adrenérgico está ativado, utilizamos outro agente contracturante para verificarmos se a warifteína estaria necessitando da ativação de um receptor acoplado a proteína G para provocar um vasorelaxamento. Para isto, utilizamos o KCL 80mM, um agente despolarizante (SANTOS, 2007) que abre os canais de cálcio sensíveis a voltagem, promovendo um influxo de cálcio e, conseqüentemente, contração muscular (LÓPEZ et al., 2004), mecanismo este denominado de acoplamento eletromecânico (VOGALIS et al., 1991).

Quando os anéis de aorta torácica foram pré-contraídos com KCl 80mM, o relaxamento induzido por warifteína foi bastante atenuado em relação ao provocado por este alcalóide em anéis de aorta torácica pré-contraídos com

noradrenalina (Figura 17). No entanto, o relaxamento observado foi significativo.

Diante do resultado com o protocolo de KCl 80mM, pudemos sugerir algumas hipóteses: a warifteína poderia estar interagindo com a via de sinalização RhoA Rho-cinase, uma vez que o KCl, além de promover uma despolarização da membrana com abertura de canais para cálcio, também promove uma ativação da via de sinalização RhoA-Rho cinase, (RATZ, 2005), uma via independente de cálcio (SOMLYO; SOMLYO, 2000). Para isto, utilizamos o ortovanadato de sódio, o qual estimula a via de sinalização da tirosina cinase (ALCÓN ET al., 2000).

Quando um agonista se liga a um receptor acoplado a uma proteína G, a contração produzida por ele é devido a um aumento nas concentrações citosólicas de cálcio ou a uma elevação na sensibilização do aparato contrátil ao cálcio (LOIRAND et al., 2006). A RhoA é um importante modulador desta sensibilidade, sendo ativada quando o GEF catalisa a formação de RhoA-GTP a partir da RhoA-GDP. A RhoA-GTP ativa a Rho cinase, a qual inibe a fosfatase da cadeia leve de miosina (WARD et al., 2004), preservando a fosforilação da cadeia leve de miosina (SUMMERS et al., 2008), o que aumenta esta sensibilização ao cálcio (OGUT; BROZOVICH, 2003).

Constatamos que a warifteína não foi capaz de atenuar a contração induzida pelo ortovanadato de sódio. Estes dados sugerem que a warifteína não interage com a via RhoA-Rho cinase. Provavelmente, o relaxamento observado no protocolo de KCl 80mM não foi decorrente de uma possível interação entre a warifteína e a via RhoA-Rho cinase (Figura 27).

A warifteína poderia estar ativando canais para K^+ , efeito este não observado por causa da grande concentração de íons K^+ no meio extracelular ou poderia estar bloqueando canais para Ca^{2+} , e assim, promovendo o pequeno relaxamento observado. Decidimos então, investigar se ela estaria atuando de forma a ativar canais para potássio e assim promover o relaxamento vascular.

Os canais para K^+ têm um papel importante na determinação e na regulação do potencial de membrana e do tônus vascular (JACKSON, 2000). No músculo liso, os mais prevalentes são os BK_{Ca} e os K_v , enquanto que os K_{ATP} e os K_{ir} são menos prevalentes (KOROVKINA; ENGLAND, 2002). A via de

relaxamento decorrente do efluxo de K^+ é bastante comum e importante no músculo liso, provocando o relaxamento da musculatura lisa vascular através da hiperpolarização da membrana citoplasmática (BAKER, 2000).

Para verificar se a warifteína estaria ativando canais para K^+ , foi utilizada uma solução de Krebs modificado, contendo 20mM de KCl (KCL 20mM), que, nesta concentração, é um modulador do efluxo de potássio (GURNEY, 1994).

Na presença do KCl 20mM, a curva concentração-resposta para warifteína foi significativamente deslocada para a direita, sugerindo que este alcalóide produz vasorelaxamento através da ativação dos canais para potássio (Figura 20). Diante destes resultados, decidimos verificar quais os canais de potássio poderiam estar sendo ativados para provocar o vasorelaxamento induzido pela warifteína. Para isto, utilizamos, inicialmente, 1mM de tetraetilamônio (TEA), um bloqueador de canais BK_{Ca} .

Os canais BK_{Ca} estão bastante presentes nas células do músculo vascular liso. Eles influenciam o potencial de membrana e regulam o tônus vascular (KOROVKINA; ENGLAND, 2002). São ativados quando ocorre uma elevação da concentração de cálcio intracelular e despolarização da membrana, realizando um feedback negativo para o controle do nível de contração e despolarização dela (BANG et al, 1998; WANG et al, 2005).

Quando bloqueamos os canais BK_{Ca} , verificamos que a curva concentração-resposta para warifteína foi deslocada, significativamente, para direita. Além disso, o pD_2 mostrou-se menor do que o pD_2 de anéis de aorta sem endotélio funcional pré-contraídos com noradrenalina, embora não tenha havido alteração de efeito máximo. Estes resultados demonstraram uma redução na potência da warifteína quando estes canais estão bloqueados. Frente a estes resultados, podemos sugerir que os canais BK_{Ca} estão envolvidos no efeito vasorelaxante da warifteína em aorta torácica de rato. A concentração de 5mM de TEA bloqueia canais de K^+ ativados por Ca^{2+} . (CHO et al, 2007). Quando a concentração de TEA foi aumentada para 3mM ou 5mM, observamos que a curva concentração-resposta para a warifteína sofreu um deslocamento para a direita, ocorrendo ainda uma redução da potência dela, observada, através de uma redução de pD_2 em relação aos anéis controle. Estes resultados reforçam os obtidos com TEA na concentração de 1mM,

sugerindo a participação dos canais BK_{Ca} na resposta relaxante induzida por warifteína (Figura 21).

Outro tipo de canal para K^+ importante é o K_v , que, juntamente, com o BK_{Ca} têm mostrado grande influência nas respostas contráteis, o que justifica o foco de grande número de pesquisas sobre canais vasculares e hipertensão ser nestes dois subtipos de canais para potássio (COX, 2002).

Para investigarmos a participação dos canais K_v , utilizamos 1mM de 4-aminopiridina, um bloqueador de K_v (NIU et al, 2008; JACKSON, 2000). Observamos que, na presença deste bloqueador, houve um deslocamento da curva concentração-resposta da warifteína para a direita nos anéis de aorta torácica na ausência de endotélio funcional. Não obstante o efeito máximo ser semelhante em ambas as curvas, o pD_2 teve uma redução significativa quando este bloqueador foi utilizado, indicando uma redução da potência da warifteína assim que os canais de potássio sensíveis à voltagem estão bloqueados. Estes resultados sugerem que a warifteína está ativando os K_v para induzir o vasorelaxamento nos anéis de aorta torácica de rato (Figura 22).

Os canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}) e os retificadores de entrada (K_{ir}) são menos prevalentes nas células do músculo liso vascular do que os K_v e os BK_{Ca} (KOROVKINA; ENGLAND, 2002).

Os K_{ATP} são regulados pelo ATP intracelular e encontram-se pouco abertos em condições normais, tendo uma pequena influência na manutenção do potencial de repouso. Todavia, em condições patológicas que reduzam a concentração de ATP, limitem a influência negativa dele na abertura do canal ou quando ocorre aumento do AMPc, estes canais são ativados e produzem uma potente vasodilatação (LIU; GUTTERMAN, 2002).

Sendo assim, resolvemos verificar se os canais K_{ATP} estariam envolvidos na resposta relaxante vascular da warifteína. Constatamos que houve um desvio significativo da curva concentração resposta para a warifteína na presença de 10 μ M de glibenclamida, um inibidor dos canais de potássio sensíveis a ATP (JACKSON, 2000). O valor de pD_2 apresentou uma redução significativa. O efeito máximo foi semelhante para as curvas concentração-resposta para a warifteína na presença da glibenclamida e na ausência dela. Estes dados sugerem que os K_{ATP} estão envolvidos no relaxamento provocado pela warifteína em aorta torácica de rato (Figura 23).

Como os canais K_{ir} estão presentes no músculo liso vascular e são responsáveis pela hiperpolarização da membrana e vasodilatação provocadas por pequenos aumentos na concentração extracelular de potássio, (EDWARDS; WESTON, 2004; ORIE et al., 2006) contribuindo para o potencial de repouso da membrana (ORIE et al, 2006), verificamos se estes canais também estariam envolvidos no efeito vasorelaxante induzido por warifteína em anéis de aorta torácica na ausência de endotélio funcional. Para isto utilizamos o cloreto de bário na concentração de 1mM, que é um bloqueador de K_{ir} (NIU et al., 2008)

Quando bloqueamos os K_{ir} , com 1mM de cloreto de bário, verificamos que não houve desvio da curva concentração-resposta da warifteína, nem alteração significativa de pD_2 nem de efeito máximo, sugerindo uma não participação destes canais no relaxamento provocado por warifteína (Figura 24).

A warifteína é capaz de bloquear os canais para Ca^{2+} cálcio voltagem-dependentes em aorta de coelho (FREITAS et al., 1996). Assim, decidimos investigar se o pequeno relaxamento observado quando a warifteína foi adicionada em concentrações crescentes nos anéis pré-contraídos com KCl 80mM ocorria por causa de um bloqueio de canais para Ca^{2+} na aorta torácica de rato. Para isto, realizamos o protocolo de influxo de Ca^{2+} , no qual realizamos uma curva concentração resposta para o $CaCl_2$ em um meio despolarizante livre de cálcio.

Os resultados obtidos com a execução deste protocolo demonstraram que a warifteína não é capaz nem de promover um deslocamento da curva concentração-resposta para o $CaCl_2$ nem de reduzir a contração máxima induzida por $CaCl_2$ em meio com elevada concentração de K^+ . (Figura 19). Estes dados sugerem que o relaxamento induzido por warifteína, em aorta de rato, não é devido a bloqueio de canais para Ca^{2+} .

Embora seja o mesmo vaso sanguíneo, as aortas de coelho e de rato apresentam diferenças entre si em relação à inervação simpática, utilização do cálcio celular e extracelular para a contração (BLAYLOCK; WILSON, 1995) e características farmacológicas dos receptores α -adrenérgicos (YAMAGISHI et al., 1996; BLAYLOCK; WILSON, 1995).

Este vaso apresenta respostas diferentes ao peptídeo relacionado ao gene calcitonina, já que, na presença deste neuropeptídeo, a produção de AMPc é maior em cultura de células do músculo liso vascular de ratos do que em cultura de células do músculo liso vascular de coelho (LI et al, 1997), mostrando que este vaso pode ter resultados diferentes frente ao mesmo protocolo. As divergências entre este vaso em animais distintos, possivelmente, justificam resultados diferentes.

O efluxo de K^+ hiperpolariza a membrana celular e provoca um fechamento dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem com redução da concentração de cálcio no meio intracelular (BAKER, 2000).

Sabendo disso, decidimos, então, verificar se a ativação de canais para K^+ reduziria o influxo de cálcio através do fechamento dos canais para Ca^{2+} . Para isto, os anéis de aorta foram contraídos com $CaCl_2$ em meio, nominalmente, sem Ca^{2+} . Para a realização deste protocolo, a concentração extracelular de K^+ estava normal.

Observamos que a warifteína não foi capaz de reduzir a contração em meio com concentrações fisiológicas de K^+ . Estes resultados sugerem que este alcalóide não fecha os canais para Ca^{2+} indiretamente, através da ativação dos canais para K^+ , quando o tônus vascular está normal. Possivelmente, a ativação dos canais para K^+ ocorre, quando a warifteína age na aorta com o tônus vascular aumentado e o efeito desta ativação é visto desde que não haja concentrações de K^+ que impeçam o efluxo deste íon (Figura 25).

Diante de todos estes resultados, podemos sugerir possíveis atuações da warifteína no músculo liso vascular de aorta de rato, produzindo o vasorelaxamento. Este mecanismo de relaxamento vascular independe de endotélio funcional. O principal mecanismo de ação deste alcalóide envolve, principalmente, a ativação de canais para potássio. Além disso, a warifteína produz um vasorelaxamento maior quando a via do receptor $\alpha 1$ -adrenérgico é estimulada.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, podemos concluir que a warifteína provoca relaxamento de aorta torácica de rato de forma independente de endotélio funcional. Este mecanismo relaxante vascular parece envolver a ativação dos canais para potássio do tipo K_v , K_{ATP} e BK_{Ca} . Além disso, concluímos que warifteína apresenta um relaxamento vascular maior quando a via do receptor α_1 -adrenérgico está ativa.

8. PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos com esta pesquisa, faze-se necessária a realização de novos estudos sobre o mecanismo vasorelaxante induzido pela warifteína, os quais busquem:

1. Ampliar os estudos sobre a influência da warifteína na via do receptor α_1 -adrenérgico.
2. Avaliar o efeito deste alcalóide sobre a PAM e a FC em ratos normotensos e hipertensos.
3. Estudar a influência da warifteína sobre a PAM e FC em diferentes modelos de animais hipertensos, como a hipertensão induzida pelo mecanismo 2R-1C.
4. Investigar o efeito deste alcalóide em aorta torácica de animais espontaneamente hipertensos.
5. Verificar o efeito da warifteína sobre a corrente total de potássio em miócitos isolados de aorta de rato, usando a técnica de patch-clamp.
6. Estudar a toxicidade da warifteína em ratos hipertensos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, R. C. F.; ESTEVES, L. ALTENBURG, S. P. "Inibidores seletivos de COX-2: mitos e verdades". Disponível em: <http://www.uff.br/mfl/outras_disciplinas/med_integral_infancia_adolescente/cox2.htm> Acesso em: 14 de agosto de 2008.
- AJAY, M.; CHAI, H. J.; MUSTAFA, A. M.; GILANI, A.H.; MUSTAFA, M. R. Mechanisms of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. **Journal of Ethnopharmacology**. 109: 388–393, 2007
- ALCÓN, S CAMELLO, P. J.; GARCÍA, L. J. POZOT, M. J. Activation of Tyrosine Kinase Pathway by Vanadate in Gallbladder Smooth Muscle. **Biochemical Pharmacology**. 59: 1077–1089, 2000.
- ALENCAR, J. L. **Isolamento e estudos das atividades relaxantes em musculatura lisa e esquelética de novos alcalóides de *Cissampelos sympodialis* Eichl.** 1994, 108f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.
- ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; ASSIS, T.S. de.; MEDEIROS, I.A de. THOMAS, G. Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology** 63: 247–252, 1998.
- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **The American Journal of Physiology**. 219: 1698-1705, 1970.
- AMRESH, G.; REDDY, G. D.; RAO, C. V.; SINGH, P.N. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Cissampelos pareira* root in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 110: 526–531, 2007a.
- AMRESH G.; SINGH, P. N.; RAO, C. V. Antinociceptive and antiarthritic activity of *Cissampelos pareira* roots. **Journal of Ethnopharmacology**. 111: 531–536, 2007b.
-
- _____. Toxicological screening of traditional medicine Laghupatha (*Cissampelos pareira*) in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology** (2008).
- BANG, L.; NIELSEN-KUDSK, J. E.; GRUHN, N.; TRAUTNER, S.; THEILGAARD, S. A., OLESEN S-P.; BOESGAARD, S.; ALDERSHVILE, J. Hydralazine-induced vasodilation involves opening of high conductance Ca^{2+} activated K^{+} channels. **European Journal of Pharmacology**. 361: 43–49, 1998
- BAKER, E. H. Ion channels and the control of blood pressure. **British Journal of Clinical Pharmacology**. 49, 185-198, 2000.

BLAYLOCK, N. A.; WILSON, V. G. Pharmacological characterization of noradrenaline-induced contractions of the porcine isolated palmar lateral vein and palmar common digital artery. **British Journal of Pharmacology**, 114: 694-702, 1995.

BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J.C.; ESTERRE, PH.; DEHARO, E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**. 98: 45–54, 2005.

BEZERRA-SANTOS, C. R.; BALESTIERI F. M. P.; B. ROSSI-BERGMANN, PEÇANHA, L. M. T.; PIUVEZAM, M. R. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae): oral treatment decreases IgE levels and induces a Th1-skewed cytokine production in ovalbumin-sensitized mice. **Journal of Ethnopharmacology**. 95: 191–197, 2004.

BUDZYN, K.; MARLEY, P. D.; SOBEY, C, G. Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease. **Trends in Pharmacological Sciences**. 27 (2): 97-104, February 2006.

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

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

CAO, Y. X.; ZHANG, W.; HE, J. Y.; HE, L. C.; XU, C. B. Ligustilide induces vasodilatation via inhibiting voltage dependent calcium channel and receptor-mediated Ca^{2+} influx and release. **Vascular Pharmacology**. 45: 171-176, 2006.

CHITALEY, K.; WEBER, D. S.; WEBB, C. RhoA / Rho – kinase. Vascular Changes and Hypertension. **Current Hypertension Reports**. 3: 139-144, 2001.

CHO, Y, E.; AHN, D. S.; KIM, Y. H.; TAGGART, M. J.; LEE, Y. H. Changes in stretch-induced tone induced by intracellular acidosis in rabbit basilar artery: Effects on BKCa channel activity. **Vascular Pharmacology** 47: 74–82, 2007.

CLARK, S. G.; FUCHS, L. C. Role of Nitric Oxide and Ca^{++} -Dependent K^{+} Channels in Mediating Heterogeneous Microvascular Responses to Acetylcholine in Different Vascular Beds. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**. 282(3): 1473-1479, 1997.

COGOLLUDO, A.; VIZCAÍNO, F. P.; TAMARGO, J. New insights in the pharmacological therapy of arterial hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**. 14: 423-427, 2005.

CÔRTEZ, S. F.; **Ação espasmolítica de warifteína Um alcalóide bisbenzilisoquinolínico isolado de *Cissampelos sympodialis* Eichl.** 1992.

108f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

CORTÊS, S. F.; ALENCAR, J. L.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J. M. Spasmolytic Actions of Warifteine, a Bisbenzylisoquinoline Alkaloid Isolated from the Root of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Phytotherapy Research**. 9: 579-583, 1995.

COX, R H. Changes in the expression and function of arterial potassium channels during hypertension **Vascular Pharmacology** 38 13– 23, 2002.

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

DINIZ, M. F. F. M., et al. Ensaio toxicológicos pré-clínicos de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) in: Smeinário Internacional de Farmacêuticos. Cfr. **Resumos**, p. 108. São Paulo, 1995.

_____ Ensaio toxicológicos pré-clínicos de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. **Resumos**. Águas de Lindóia, São Paulo – 13 a 14 de outubro de 1998.

_____ Ensaio toxicológicos pré-clínicos com as folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). 2000, 147f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

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

DIWANAY, S.; CHITRE, D. B, PATWARDHAN, B. Immunoprotection by botanical drugs in cancer chemotherapy. **Journal of Ethnopharmacology**. 90 49–55, 2004.

DONG, H.; EARLE, M.; L.; JIANG, Y.; LOUTZENHISER, K. A.; TRIGGLE, C. R. Cardiovascular effects of CPU-23, a novel L-type calcium channel blocker with a unique molecular structure. **British Journal of Pharmacology** 122: 1271 – 1278, 1997.

EDWARDS, G.; WESTON, A. H. Potassium and potassium clouds in endothelium-dependent hyperpolarizations **Pharmacological Research**. 49: 535–541, 2004

EKOMBA, M. L. L., OKUSA, P. N.; PENGE, O.; KABONGO, C.; CHOUDHARY, M. I.; KASENDE, O. E. Antibacterial, antifungal, antiplasmodial, and cytotoxic activities of *Albertia villosa*. **Journal of Ethnopharmacology**. 93 331–335, 2004.

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

FREITAS, M. R. **Alcalóides isolados das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl: Elucidação estrutural de milonina, um novo alcalóide morfinandienônico e estudo do mecanismo de ação de warifteína**. 1994. 92f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa – PB.

FREITAS, M. R. de.; CORTÊS, S. de. F.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J. M. Modification of Ca^{2+} Metabolism in the Rabbit Aorta as a Mechanism of Spasmolytic Action of Warifteine, a Bisbenzylisoquinoline Alkaloid Isolated from the Leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 48: 332-336, 1996.

FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in Pharmacological Sciences**. 22: (1), 2001.

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Muscle contraction. In: **Molecular Aspects of Cell Biology**. Phyladelphia: Saunders. 1156-1179, 1995.

GURNEY, A. M. Mechanisms of drugs-induced vasodilatation. **The Journal of pharmacy and pharmacology**. 46: 242-251, 1994.

HUANG, Y.; CHAN, N. W. K.; LAU, C. W.; YAO, X. Q.; CHAN, F. L.; CHEN, Z. Y. Involvement of endothelium/nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea (-) epicatechin. **Biochinica et Biophysica Acta**. 1427: 322-328, 1999.

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

JEON, S. B.; JIM, F.; KIM, J. I.; KIM, S. H.; SUK, K.; CHAE, S. C.; JUN, J. E.; PARK, W. H., KIM, I. K. A role for Rho kinase in vascular contraction evoked by sodium fluoride. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. 343: 27-33, 2006.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.; HARADA, K.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K.; SATO, K. Calcium moviments, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacological Reviews**. 49 (2): 1997.

KHALIL, R. A. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction in Hypertension. **High Blood Pressure Council Newsletter**. 2 (1): Spring, 2001.

KOROVKINA V, P.; ENGLAND S. K. Detection and implications of potassium channel alterations. **Vascular Pharmacology**. 38: 3– 12, 2002.

KWAN, C. Y.; ACHIKE, F. Tetrandrine and related bis-benzylisoquinoline alkaloids from medicinal herbs: cardiovascular effects and mechanisms of action. **Acta pharmacologica Sinica**. Dec; 23 (12): 1057 -1068, 2002.

LI, Y.; FISCUST, R. R.; WU, J.; YANG, L.; WANG, X. The antiproliferative effects of calcitonin gene-related peptide in different passages of cultured vascular smooth muscle cells. **Neuropeptides**. 31 (5): 503-509, 1997.

LIRA, G. A. **Novos Alcalóides de *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae)**, 2001. 114f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

LIU, Y.; GUTTERMAN, D. D. The coronary circulation in diabetes: Influence of reactive oxygen species on K⁺ channel-mediated vasodilation. **Vascular Pharmacology** 38: 43– 49, 2002.

LÓPEZ, R. M.; ORTÍZ, C. S. RUIZ, A.; VÉLEZ, J. M., Castillo, C.; Castillo, Enrique F. Impairment of smooth muscle function of rat thoracic aorta in an endothelium-independent manner by long-term administration of NG-nitro-L-arginine methyl ester. **Fundamental & Clinical Pharmacology** 18: 669– 677, 2004.

LOIRAND G.; GUÉRIN, P.; PACAUD, P. Rho Kinases in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology. **Circulation Research**. 98: 322-334, 2006.

MARINHO, A. F. **Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação da warifteína em extrato de *Cissampelos sympodialis* Eichl (Milona)**. 2008. 159f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

MELO, P. S.; CAVALCANTE, H. M. de. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. de. F. F. M.; MEDEIROS, I. A. de.; HAUN, M. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Letters**. 142: 143- 151, 2003.

MOODY, J.O.; ROBERT, V.A.; CONNOLLY, J. D.; HOUGHTON, P.J. Anti-inflammatory activities of the methanol extracts and an isolated furanoditerpene constituent of *Sphenocentrum jollyanum* Pierre (Menispermaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. 104: 87–91, 2006.

MOREIRA, M. S. A.; C.G. LIMA, F.; TRINDADE, M. N.; H.C. FARIA-NETO, C.; PIUVEZAM, M. R.; PEÇANHA, L. M. T. *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) leaf extract induces interleukin-10-dependent inhibition of *Trypanosoma cruzi* killing by macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 36: 199-205, 2003.

NGUELEFACK-MBUYO, P. E.; NGUELEFACK, T. B.; DONGMO, A. B.; AFKIR, S.; AZEBAZE, A. G. B.; DIMO T.; LEGSSYER, A.; KAMANYI, A.; ZIYYAT, A. Anti-hypertensive effects of the methanol/methylene chloride stem

bark extract of *Mammea africana* in I-NAME-induced hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology* 117: 446–450, 2008

NIU, L-G.; ZHANG, M-S.; LIU, Y.; XUE, W-X.; LIU, D-B.; ZHANG, J.; LIANG, Y-Q. Vasorelaxant effect of taurine is diminished by tetraethylammonium in rat isolated arteries. *European Journal of Pharmacology*. 580 169–174, 2008.

NOOR, H.; ASHCROFT, S. J.H. Pharmacological characterisation of the antihyperglycaemic properties of *Tinospora crispa* extract. *Journal of Ethnopharmacology* 62: 7–13, 1998.

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

OGUT O.; BROZOVICH F. Regulation of force in vascular smooth muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 35: 347–355, 2003.

OLSON, D. M.; ZARAGOZA, D. B.; SHALLOW, M. C.; COOK, J. L.; MITCHELL, B. F.; GRIGSBY, P.; HIRST, J. Myometrial Activation and Preterm Labour: Evidence Supporting a Role for the Prostaglandin F Receptor—A Review. *Placenta* 24 Supplement A **Trophoblast Research**. 17, S 47–S 54.

ORIE, N. N.; FRY, C. H.; CLAPP, L. H. Evidence that inward rectifier K⁺ channels mediate relaxation by the PGI₂ receptor agonist cicaprost via a cyclic AMP-independent mechanism. *Cardiovascular Research* 69: 107 – 115, 2006.

PARIENTE, J. A.; LAJAS, ANA I.; POZO, M. J.; CAMELLO, P. J.; SALIDO, G. M. Oxidizing effects of vanadate on calcium mobilization and amylase release in rat pancreatic acinar cells. *Biochemical Pharmacology*. [58 \(1\)](#): 77-84, 1999.

PIUVEZAM, M. R.; PEÇANHA, L.M.T.; ALEXANDER. J.; THOMAS, G. *Cissampelos sympodialis* Eichl. leaf extract increases the production of IL-10 by concanavalin-A-treated BALB/c spleen cells *Journal of Ethnopharmacology* 67: 93–101, 1999.

POUPLIN, J. N.; TRAN, H.; TRAN, H.; PHAN, T. A.; DOLECEK, C.; FARRAR J.; TRAN, T. H.; CARON, P.; BODO, B.; GRELLIER, P. Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam. *Journal of Ethnopharmacology*. 109: 417–427, 2007.

QIAN Jia-Qing. Cardiovascular pharmacological effects of bisbenzylisoquinoline alkaloid derivatives. *Acta pharmacologica Sinica*. 23 (12): 1086 -1092, Dec 2002.

RATZ, P. H.; BERG, K. M.; URBAN, N. H.; MINER, A. S. Regulation of

smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus

American journal of physiology. Cell physiology. **288: C769-C783, 2005.**

SANTOS, C. R. B.; BALESTIERIA, F. M. P.; B. R. BERGMANNB.; PEÇANHA, L.M.T.; PIUVEZAM, M. R. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae): oral treatment decreases IgE levels and induces a Th1-skewed cytokine production in ovalbumin-sensitized mice. **Journal of Ethnopharmacology** 95: 191–197, 2004.

SANTOS, C. R. B.; ABREU, A. V. de.; BARBOSA-FILHO, J. M .; MELO, C. B.; Piuvezam, M. R.; Bozza, P. T. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology** 6: 1152–1160, 2006.

SANTOS, M. R. V.; CARVALHO, A. A.; MEDEIROS, I. A.; ALVES, P. B.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R. Cardiovascular effects of Hyptis fruticosa essential oil in rats. **Fitoterapia** 78: 186–191, 2007.

SCHULDT, E. Z.; BET, A. C.; HORT, M. A.; IANSSEN, C.; MARASCHIN, M.; CKLESS, K.; VALLE, R. M. R. An ethyl acetate fraction obtained from a Southern Brazilian red wine relaxes rat mesenteric arterial bed through hyperpolarization and NO-cGMP pathway. **Vascular Pharmacology** 43: 62 – 68, 2005.

SHEN, K. P.; CHU, L. W.; HSIEH, S. L.; AN, L.-M.; CHEN, I. J.; WU, B. N. **Journal of Cardiovascular Pharmacology.** 51(2): 154-161, February 2008.

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

_____ **Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. The Journal of Physiology, 522 (2): 177-185, 2000.**

SUMMERS, S. M.; NGUYEN, S. V.; PURDY, R. E. Hindlimb unweighting induces changes in the RhoA-Rho-kinase pathway of the rat abdominal aorta. **Vascular Pharmacology** 48: 208–214, 2008

SUN, J.; KH TAN, B.; HUANG, S.; WHITEMAN, M.; ZHU, Y. Effects of natural products on ischemic heart diseases and cardiovascular system. **Acta pharmacologica Sinica.** Dec; 23 (12): 1142 -1151, 2002

THOMAS, G.; ARAÚJO, C. C.; DUARTE, J. C.; SOUZA, D. P. Bronchodilator activity of na aqueous fraction of na ethanol extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) in the guinea pig. **Phytomedicine.** V. 4 (3): 233-238, 1997.

VILLAZÓN, M.; PADÍN, J. F.; CADAVID, M. I.; ENGUIX, M. J.; TRISTÁN, H.; ORALLO, F.; LOZA, M. I. Functional Characterization of Serotonin Receptors in Rat Isolated Aorta. **Biological & pharmaceutical bulletin**. 25 (5): 584—590, 2002.

VOGALIS, F.; PUBLICOVER, N. G.; HUME, J. R.; SANDERS, K. M. Relationship between calcium current and cytosolic calcium in canine gastric smooth muscle cells. **The American Journal of Physiology**. 260 (1): C1012-C1018, 1991.

WANG, J.; SHEN, B.; GUO, M.; LOU, X.; DUAN, Y.; CHENG, X. P.; TENG, M.; NIU, L.; LIU, Q.; HUANG, Q.; HAO, Q. Blocking Effect and Crystal Structure of Natrin Toxin, a Cysteine-Rich Secretory Protein from *Naja atra* Venom that Targets the BKCa Channel. **Biochemistry**. 44: 10145-10152, 2005.

WARD, J. P.T.; KNOCK, G. A.; SNETKOV, V. A.; AARONSON, P. I. Protein kinases in vascular smooth muscle tone — role in the pulmonary vasculature and hypoxic pulmonary vasoconstriction **Pharmacology & Therapeutics** 104: 207– 231, 2004.

WET, H.; HEERDEN, F. R. V.; WYK, B. E. V. Alkaloids of *Antizoma miersiana* (Menispermaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. 33 799-807, 2005.

XIONG, Z.; SPERELAKIS, N. Regulation of L-Type Calcium Channels of Vascular Smooth Muscle Cells **Journal of molecular and cellular cardiology**. 27: 75-91, 1995.

YAMAGISHI, R.; AKIYAMA, K.; NAKAMURA, S.; HORA, M.; MASUDA, N.; MATSUZAWA, A.; MURATA, S.; UJIIE, A.; KURASHINA, Y. IIZUKA, K.; KITAZAWA, M. Effect of KMD-3213, an α_1 -adrenoceptor-selective antagonist, on the contractions of rabbit prostate and rabbit and rat aorta **European Journal of Pharmacology**. 315: 73-79, 1996.

ZENG, Y.; GU, B.; JI, X.; DING, X.; SONG, C.; WU, F. Sinomenine, an Antirheumatic Alkaloid, Ameliorates Clinical Signs of Disease in the Lewis Rat Model of Acute Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Biological & pharmaceutical bulletin**. 30 (8): 1438-1444, 2007.

ZHANG, Y.; GAO, Y. J.; ZUO, J.; LEE, R. M. K. W.; JANSSEN, L. J. Alteration of arterial smooth muscle potassium channel composition and BKCa current modulation in hypertension. **European Journal of Pharmacology** 514: 111 – 119, 2005.

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](#)