

**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**

**DARÍZY FLÁVIA SILVA AMORIM DE VASCONCELOS**

**Caracterização do Mecanismo de Ação  
Molecular Envolvido nos Efeitos  
Cardiovasculares Induzidos por  
Rotundifolona em ratos**

**JOÃO PESSOA – PB  
2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**DARÍZY FLÁVIA SILVA AMORIM DE VASCONCELOS**

**Caracterização do Mecanismo de Ação  
Molecular Envolvido nos Efeitos  
Cardiovasculares Induzidos por  
Rotundifolona em ratos**

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

**Orientadores:**

**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadja de Azêvedo Correia**

**João Pessoa – PB**  
**2007**

V331c Vasconcelos, Darízy Flávia Amorim de.

Caracterização do mecanismo de ação molecular envolvido nos efeitos cardiovasculares induzidos por rotundifolona em ratos/ Darízy Flavia Silva Amorim de Vasconcelos - João Pessoa, 2008.

205p.:il.

Orientadores: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nadja de Azevedo Correia

Tese (Doutorado)-UFPB/CCS/LTF.

1 Rotundifolona 2. Hipotensão 3. Efeito vasorelaxante 4. Canais BK<sub>ca</sub> 5. Canais TRP.

UFPB/BC

CDU: 547.9 (043)

**DARÍZY FLÁVIA SILVA AMORIM DE VASCONCELOS**

**Caracterização do Mecanismo de Ação Molecular Envolvido  
nos Efeitos Cardiovasculares Induzidos por Rotundifolona  
em ratos**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros  
Orientador**

---

**Profa. Dra. Nadja de Azêvedo Correia  
Co-Orientadora**

---

**Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz  
Examinador Externo (UFMG)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Regina de Freitas  
Examinadora Externo (UFPB)**

---

**Profa. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte  
Examinador Externo (UFPE)**

---

**Profa. Dra. Ângela de Castro Resende  
Examinador Externo (UERJ)**

*"O espaço infinito entre  
uma idéia e sua realização  
ideal somente pode ser  
ocupado pelo insaciável  
desejo humano de  
transgredir"*

*Maxwell Nascimento*

***Dedicatória***

---

**Aos meus amados pais, Assis e Guia**, pelo amor, carinho e dedicação fornecida ao longo da minha vida, visando sempre o melhor para minha formação pessoal.

**A minha linda família, Miguel e Milena**, pelos sorrisos incansáveis e pelas doces brincadeiras que tornaram os meus dias muito mais coloridos.

Amo muito vocês!

# Agradecimientos

**A Deus**, por ter me dado o sopro da vida, a família linda que tenho, os amigos, as alegrias, as tristezas, os desafios, as oportunidades, o perdão, a benção, o amor, a luz e a coragem para vencer esta e outras batalhas. Obrigado Senhor por estar ao meu lado nos momentos bons ou ruins, por mais esta vitória em minha vida e pelo seu amor infinito.

A queridíssima amiga **Islânia Gisélia** por ter sido parte de mim neste trabalho, pela sua amizade incondicional, sua solidariedade constante e seu lindo coração humano. Com certeza um símbolo de competência e dedicação. Sem você Lani este trabalho não teria vingado.

Ao admirável **Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**, pela oportunidade e confiança no meu potencial como pesquisadora; pela consideração, respeito, honestidade, incentivo e seriedade durante todo desenvolvimento deste trabalho.

A minha querida amiga, **Prof. Dra. Nádja de Azevedo Correia**, pela atenção, amizade, dignidade, apoio nos momentos difíceis, dedicação e incentivo durante todo desenvolvimento deste trabalho.

Aos alunos **George Albuquerque (meu querido “George Tomas”)** e **Dayanne Lopes Porto**, pelo carinho, presteza, companheirismo e dedicação durante a realização deste trabalho, sendo de fundamental importância para que eu conquistasse esta vitória.

As minhas queridas amigas **Karla Marques Cavalcante** e **Katy Lísias Gondim Dias** pela amizade, incentivo, carinho, discussão e esclarecimentos dos protocolos experimentais, pelo exemplo de verdadeira amizade e companheirismo que foram essenciais para execução deste trabalho.

Ao meu querido amigo e conselheiro científico, **Jader dos Santos Cruz**, pela acolhida e orientação nos experimentos eletrofisiológicos, por ser essa pessoa maravilhosa, solidário, que não sabe dizer um NÃO. Com certeza um exemplo clássico de pesquisador e competência imensurável.

Ao meu querido **Prof. Dr. Gustavo Ballejo**, por ter sido luz nos momentos de dúvida. Seus valores incorruptíveis e sua competência inigualável com certeza seviram e servirão de alicerce para minha vida de pesquisadora.

Ao **Prof. Dr. Demetrius Araújo** pelos valorosos ensinamentos, acolhida em seu laboratório, atenção e amizade inestimável.

Ao **Prof. Dr. Paulo Beirão** pela atenção, acolhida e receptividade em seu laboratório e pelo seu exemplo de determinação e serenidade.

À **Profa. Dra. Maria de Fátima Leite**, e a **aluna Viviane Andrade** pela calorosa recepção, ajuda e incentivo durante a realização dos protocolos experimentais com microscopia Confocal, na UFMG.

Ao **Prof Dr. Diego Nunes Guedes** pelas excelentes considerações feitas no exame de qualificação e pela amizade.

A **Profa. Xirley Pereira** e ao **Prof Dr. José Maria Barbosa Filho**, pelo isolamento da substância de estudo deste trabalho, como também pelo empenho e incentivo para que este sonho se concretizasse sempre disponíveis à colaboração científica.

Aos **Professores participantes da banca examinadora** deste trabalho, pela gentileza e presteza com que aceitaram colaborar para o enriquecimento desta tese.

Ao técnico e amigo, **José Crispim Duarte**, pela força, coragem, honestidade, disposição infinita, competência e desempenho com dedicação e qualidade, não só deste, mas de todos os trabalhos do LTF.

Aos amigos pós-graduandos, **Aldeídia, Ápio, Alessandra, Horacina, Raline, Naiara, Robson, Socorro, Fabíola, Junior, Aurilene, Thais Porto, Angélica**, aos amigos do laboratório de Farmacologia Cardiovascular, **Carminha, Tiago, Renata Couras, Abraão, Camila, Bruna, Carol, Ericelle e Mônica**, e ao pós-doutorando **Tosin Adaramoye**, pela atenção especial, amizade, esclarecimento científico e pelo sorriso nos momentos difíceis.

Aos amigos do **Laboratório de membranas excitáveis da UFMG (LAMEX)** pela calorosa receptividade, tornando meus dias de ausência da família muito mais proveitosos e animados. Adorei conhecer todos vocês!

Aos amigos do **Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia (LABIME)**, especialmente a **Marcos Medeiros** pela amizade, carinho e auxílio nos estudos com eletrofisiologia.

Aos meus grandes e melhores amigos, **Edinha, Jully, Lis e Niedja**, pela amizade constante, força e apoio nos momentos difíceis, sorrisos e carinhos nos momentos alegres, dedicação, companheirismo e fidelidade em muitos momentos da minha vida. Adoro vocês!!!!

À **Luís Cordeiro da Silva**, pelo dedicado trabalho realizado no Biotério do LTF.

À **Coordenação, Funcionários** e a todos os **Professores** do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela competência, seriedade, honestidade, incentivo e apoio.

Ao **CNPq** e a **UFPB** pelo apoio financeiro.

E a todos que fazem parte da grande família LTF.

**Meu muitíssimo obrigada!!!!**

*Resumo e Abstract*

## Caracterização do Mecanismo de Ação Molecular Envolvido nos Efeitos Cardiovasculares Induzidos por Rotundifolona em Ratos

### RESUMO

Os efeitos farmacológicos de rotundifolona, uma cetona monoterpênica isolada das partes aéreas da *Mentha x villosa* Hudson (Labiatae), sobre o sistema cardiovascular, foram estudados em ratos SD, normotensos (LN) e hipertensos de Lyon (LH), usando técnicas combinadas *in vivo* e *in vitro*. Em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato, com endotélio funcional, rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) induziu relaxamento das contrações induzidas por fenilefrina (0,1 - 10  $\mu$ M) ( $pD_2 = 4,0 \pm 0,02$ ;  $E_{m\acute{a}x} = 98,9 \pm 3,1\%$ ,  $n = 11$ ) de maneira dependente de concentração e esse efeito foi significativamente atenuado pela remoção do endotélio vascular ( $pD_2 = 3,6 \pm 0,03$ ,  $E_{m\acute{a}x} = 100,3 \pm 3,8\%$ ,  $n = 12$ ), sugerindo o envolvimento de um mecanismo dependente e outro independente do endotélio. Em preparações sem endotélio funcional incubadas com KCl 20 mM, caribdotoxina (0,1  $\mu$ M) ou TEA (1 e 3mM) o efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona foi significativamente atenuado ( $pD_2 = 2,97 \pm 0,01$ ,  $n=7$ ;  $3,2 \pm 0,01$ ,  $n=5$ ;  $3,6 \pm 0,03$ ,  $n=5$  e  $3,27 \pm 0,05$ ,  $n=5$ , respectivamente). No entanto, na presença de BaCl<sub>2</sub> (30  $\mu$ M), apamina (0,1  $\mu$ M) ou glibenclamida (10  $\mu$ M), o efeito vasodilatador do monoterpene foi potencializado ( $pD_2 = 4,2 \pm 0,03$ ,  $n=9$ ;  $4,2 \pm 0,03$ ,  $n=9$ ;  $3,9 \pm 0,03$ ,  $n=5$ , respectivamente). Em experimentos com medida de corrente macroscópica (whole cell), rotundifolona ( $10^{-5}$  –  $10^{-4}$  M) aumentou significativamente as correntes de K<sup>+</sup> em miócitos de artéria mesentérica de ratos SD [ $29,9 \pm 4,3$  pA/pF ( $n=7$ ) e  $28,7 \pm 2,9$  pA/pF ( $n=3$ ) na presença de  $10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M de rotundifolona, respectivamente; +60 mV], quando comparado aos valores controle [ $14,7 \pm 1,6$  pA/pF ( $n=6$ ) e  $15,8 \pm 0,5$  pA/pF ( $n=3$ ), respectivamente, +60 mV]. Estes efeitos foram abolidos na presença de TEA (1 mM). Adicionalmente, rotundifolona ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M) antagonizou, as contrações induzidas por CaCl<sub>2</sub> em meio despolarizante nominalmente sem Ca<sup>2+</sup>, induziu relaxamento das contrações induzidas pelo S(-)-Bay K 8644 e em miócitos isolados atenuou as correntes de Ba<sup>2+</sup> por canais Ca<sub>v</sub> tipo-L ( $24,0 \pm 2,0$ ;  $48,0 \pm 3,0$ ;  $75,0 \pm 2,0$  e  $78,0 \pm 6,0\%$ , para rotundifolona  $10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M, respectivamente,  $n=5$ ), sugerindo que rotundifolona inibe o influxo de Ca<sup>2+</sup> por estes canais. Em estudos com microscopia confocal, o monoterpene ( $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M) aumentou os transientes de Ca<sup>2+</sup> citosólicos em miócitos de artéria mesentérica carregados com Fluo-4/AM ( $46,6 \pm 7,8\%$ ;  $n=9$ ,  $111,5 \pm 19,3\%$ ;  $n=5$ ,  $242 \pm 31,8\%$ ;  $n=11$ , respectivamente) quando comparado aos valores de fluorescência ao Ca<sup>2+</sup> basais ( $18,9 \pm 3,4\%$ ;  $n=12$ ). Estes efeitos foram atenuados na presença de EGTA (2 mM), CPA (20  $\mu$ M) ou CPZ (20  $\mu$ M), sugerindo que rotundifolona induz aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular por estimular o influxo de Ca<sup>2+</sup> por canais TRP e liberar Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares. Além disso, rotundifolona potencializou a ação da temperatura (25 e 18°C). Nos estudos *in vivo*, em ratos LH, não anestesiados, rotundifolona (1; 5; 10; 20 e 30 mg.kg<sup>-1</sup> i.v., randomicamente) produziu uma hipotensão ( $\Delta$  PAM (%) =  $-2,5 \pm 1,4$ ;  $0,7 \pm 5,1$ ;  $-7,8 \pm 4,2$ ;  $-28,7 \pm 4,9$  e  $-35,6 \pm 3,8$  mmHg, respectivamente) e bradicardia ( $\Delta$  FC =  $0,6 \pm 1,7$ ;  $5,6 \pm 8,4$ ;  $-10,5 \pm 5,9$ ;  $-68,4 \pm 4,1$  e  $-77,9 \pm 6,6$  bpm, respectivamente) de maneira dependente de dose ( $n=5$ ). Em anéis de artéria mesentérica de rato LH, rotundifolona induziu relaxamento das contrações induzidas por CaCl<sub>2</sub> em meio despolarizante nominalmente sem Ca<sup>2+</sup>, das contrações induzidas por KCl (80 mM) e S(-)-Bay K 8644, sugerindo que também em animais hipertensos, rotundifolona inibe o influxo de Ca<sup>2+</sup>. Em conclusão, esses resultados sugerem que rotundifolona induz efeito vasorelaxante em anéis da artéria mesentérica superior de rato normotenso por ativar provavelmente os canais TRP, levando ao aumento da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Este evento induziria ativação de BK<sub>ca</sub> e inativação dos canais Ca<sub>v</sub>, culminando na diminuição do influxo de Ca<sup>2+</sup> e relaxamento. Além disso, os efeitos induzidos por rotundifolona em animais espontaneamente hipertensos parece envolver mecanismo de ação semelhante ao observado em animais normotensos.

**Palavras-chave:** Rotundifolona. Vasorelaxamento. Anéis mesentéricos. Canais para K<sup>+</sup>. Canais para Ca<sup>2+</sup>. Canais TRP.

## Characterization of the molecular mechanism of action involved in the cardiovascular effects induced by rotundifolone in rats

### ABSTRACT

The pharmacological effects of rotundifolone, a ketone monoterpenic isolated from *Mentha x villosa* Hudson (Labiatae) on the cardiovascular system, were studied in SD, normotensive (LN) and hypertensive (LH) rats using a combined *in vivo* and *in vitro* approach. In isolated rat mesenteric artery rings, with endothelium intact, rotundifolone ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) induced concentration-dependent relaxation of the contractions induced by phenylephrine (0.1 - 10  $\mu$ M) ( $pD_2 = 4.0 \pm 0.02$ ;  $E_{max} = 98.9 \pm 3.1\%$ ,  $n = 11$ ) and removal of functional endothelium significantly attenuated the rotundifolone-induced relaxation, without affecting the maximum relaxant response ( $pD_2 = 3.6 \pm 0.03$ ,  $E_{max} = 100.3 \pm 3.8\%$ ,  $n = 12$ ). In preparations without endothelium, pretreatment with  $K^+$  channels blockers, such as KCl 20 mM, charybdotoxin (0.1  $\mu$ M) or TEA (1 and 3 mM) the vasorelaxant effect induced by rotundifolone was attenuated significantly ( $pD_2 = 2.97 \pm 0.01$ ,  $n=7$ ;  $3.2 \pm 0.01$ ,  $n=5$ ;  $3.6 \pm 0.03$ ,  $n=5$  and  $3.27 \pm 0.05$ ,  $n=5$ , respectively). However, in the presence of  $BaCl_2$  (30  $\mu$ M), apamin (0.1  $\mu$ M) or glibenclamide (10  $\mu$ M) this effect was potentiated ( $pD_2 = 4.2 \pm 0.03$ ,  $n=9$ ;  $4.2 \pm 0.03$ ,  $n=9$ ;  $3.9 \pm 0.03$ ,  $n=5$ , respectively). In addition, in experiments of the current-measurements using whole-cell patch clamp, rotundifolone ( $10^{-5}$  and  $10^{-4}$  M) significantly increase  $K^+$  currents in freshly dispersed SD rat mesenteric artery myocytes [ $29.9 \pm 4.3$  pA/pF ( $n=7$ ) and  $28.7 \pm 2.9$  pA/pF ( $n=3$ ) in the presence of  $10^{-5}$  and  $10^{-4}$  M of the rotundifolone, respectively; +60 mV], when compared to the basal values [ $14.7 \pm 1.6$  pA/pF ( $n=6$ ) and  $15.8 \pm 0.5$  pA/pF ( $n=3$ ), respectively, +60 mV]. This effect was abolished by TEA (1 mM). Additionally, in depolarizing nominally without  $Ca^{2+}$  medium, rotundifolone ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  and  $3 \times 10^{-3}$  M) antagonized  $CaCl_2$ -induced contractions in a concentration-dependent manner, induced relaxation of the contraction elicited by S(-)-Bay K 8644 and rotundifolone ( $10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M) decreased the L-type  $Ba^{2+}$  currents ( $24.0 \pm 2.0$ ;  $48.0 \pm 3.0$ ;  $75.0 \pm 2.0$  e  $78.0 \pm 6.0\%$ , respectively,  $n=5$ ), suggesting  $Ca^{2+}$ -influx inhibition by rotundifolone. Studies using confocal laser scanning microscope, the monoterpene ( $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M) increased the intracellular calcium concentration in rat mesenteric artery myocytes loaded with Fluo-4/AM ( $46.6 \pm 7.8\%$ ;  $n=9$ ,  $111.5 \pm 19.3\%$ ;  $n=5$ ,  $242 \pm 31.8\%$ ;  $n=11$ , respectively) when compared to the basal values of  $Ca^{2+}$ -fluorescence intensity ( $18.9 \pm 3.4\%$ ;  $n=12$ ). These effects were attenuated by EGTA (2 mM), CPA (20  $\mu$ M) ou CPZ (20  $\mu$ M). Furthermore, rotundifolone potentiated the temperature response (25 e 18°C) in mesenteric artery rings, suggesting that monoterpene probably TRP channels. In addition, in LH non-anaesthetized rats, rotundifolone injections (1; 5; 10; 20 e 30  $mg \cdot kg^{-1}$  i.v., randomly) produced a hypotension ( $\Delta$  MAP (%) =  $-2.5 \pm 1.4$ ;  $0.7 \pm 5.1$ ;  $-7.8 \pm 4.2$ ;  $-28.7 \pm 4.9$  e  $-35.6 \pm 3.8$  mmHg, respectively) and bradycardic effect ( $\Delta$  FC =  $0.6 \pm 1.7$ ;  $5.6 \pm 8.4$ ;  $-10.5 \pm 5.9$ ;  $-68.4 \pm 4.1$  e  $-77.9 \pm 6.6$  bpm, respectively). In isolated LH rat mesenteric artery rings, without endothelium, rotundifolone produced a relaxation of the  $CaCl_2$ -induced contractions in a concentration-dependent manner and induced relaxation the contraction elicited by KCl (80 mM) or S(-)-Bay K 8644, suggesting that in LH rats too, rotundifolone inhibited the calcium-influx. In conclusion, these results suggest that rotundifolone induce vasorelaxant effect in isolated rat mesenteric artery involving, probably, TRP channels activation and increase intracellular  $Ca^{2+}$  concentration. This effect contributed to  $BK_{ca}$  channels activation and  $Ca_v$  channels inactivation, culminating in relaxation response. Furthermore, the effects induced by rotundifolone in spontaneously hypertensive rats seem to involve a similar action mechanism to the observed in normotensive rats.

**Key words:** Rotundifolone. Vasorelaxament. Mesenteric rings.  $K^+$  channels.  $Ca^{2+}$  channels. TRP channels.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
bpm	batimentos por minuto
BKca	canais para K <sup>+</sup> sensíveis ao Ca <sup>2+</sup> de grande condutância
Ca <sub>v</sub>	canais para cálcio sensíveis a voltagem
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	concentração de cálcio intracelular
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CE <sub>50</sub>	concentração efetiva 50%
CPA	ácido ciclopiazônico
CPZ	capsazepina
DMSO	dimetil sulfóxido
E <sub>máx</sub>	efeito máximo
e.p.m.	erro padrão da média
FC	freqüência cardíaca
Hz	hertz
IP <sub>3</sub>	trifosfato de inositol [1,4,5]
IKca	canais para K <sup>+</sup> sensíveis ao Ca <sup>2+</sup> de intermediária condutância
i.p.	intra-peritoneal
i.v.	intra-venoso
K <sub>Ca</sub>	canais para K <sup>+</sup> sensíveis ao Ca <sup>2+</sup>
K <sub>v</sub>	canais para K <sup>+</sup> sensíveis a voltagem
K <sub>ATP</sub>	canais para K <sup>+</sup> sensíveis a ATP
min.	minuto
mmHg	milímetro de mercúrio
mm	milímetros
ms	milisegundo
μL	microlitro
μg	micrograma

μM	micromolar
nM	nanomolar
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
PA	pressão arterial
PAD	pressão arterial diastólica
PAM	pressão arterial média
PAS	pressão arterial sistólica
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa
SD	Sprague Dawley ratos
SKca	canais para K <sup>+</sup> sensíveis ao Ca <sup>2+</sup> de pequena condutância
SOC	canal de Ca <sup>2+</sup> operado por estoque
TRP	canais potencial receptor transiente
TRPC	receptor TRP clássico
TRPM	receptor TRP melastatinas
TRPV	receptores TRP de vanilóide
TRPML	receptores TRP muculipinas
TRPA1	receptores TRP proteínas transmembranas ancrinas 1

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

Figura 1: Canais Cav. (A) Disposição topológica do canal Cav na membrana. (B) Organização estrutural dos canais $Ca_v$ . .....	38
Figura 2: Representação esquemática da estrutura molecular dos TRPs. A, Disposição das subunidades (S1-S6) na membrana plasmática. B, Visão superior do canal TRP heterotetramérico. ....	40
Figura 3: Representação esquemática da estrutura molecular dos $BK_{Ca}$ . A, Subunidade $\beta_1$ consiste em 2 domínios transmembrana e a subunidade $\alpha$ em 11 domínios hidrofóbicos (S0-S10) com S0-S6 localizado na membrana plasmática e a região do poro entre S5-S6. B, Associação das 4 subunidades $\alpha$ e $\beta_1$ formam o canal $BK_{Ca}$ funcional. ....	43
Figura 4: <i>Mentha x villosa</i> Hudson .....	52
Figura 5: Cromatograma do óleo essencial isolado das partes aéreas da <i>Mentha x villosa</i> Hudson (Fonte: BARBOSA-FILHO et al., 1999).....	53
Figura 6: Organograma das espécies vegetais que originaram a <i>Mentha x villosa</i> Hudson, em relação às percentagens do seu constituinte químico majoritário (rotundifolona), isolado dos respectivos óleos essenciais.....	55
Figura 7: Ratos Sprague Dawley.....	62
Figura 8: Aparato utilizado para os experimentos com anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato .....	73
Figura 9: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de rotundifolona ( $10^{-7}$ – $3 \times 10^{-3}$ M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN e LH, pré-contraídos com FEN (0,1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M). (A) Anéis com endotélio intacto. (B) Anéis com o endotélio removido...	75

Figura 10: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de canais para K <sup>+</sup> na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN e LH, sem endotélio funcional.....	76
Figura 11: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de diferentes canais para K <sup>+</sup> na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional. ....	78
Figura 12: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da rotundifolona (10 <sup>-7</sup> – 3x10 <sup>-3</sup> M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN e LH sem endotélio funcional, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 80 mM). ....	79
Figura 13: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de rotundifolona sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de CaCl <sub>2</sub> (10 <sup>-6</sup> – 3 x 10 <sup>-2</sup> M) em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca <sup>2+</sup> .....	80
Figura 14: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da rotundifolona (10 <sup>-7</sup> – 3x10 <sup>-3</sup> M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN e LH, sem o endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (200 nM).....	81
Figura 15: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da rotundifolona (10 <sup>-7</sup> – 3x10 <sup>-3</sup> M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com capsaicina (10 μM). ....	82
Figura 16: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influência de rotundifolona (3 mM) nos efeitos induzidos pela temperatura (25°C e	

18°C) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem o endotélio funcional.....	83
Figura 17: Aparato utilizado para os experimentos de eletrofisiologia com miócitos de artéria mesentérica isolada de ratos .....	86
Figura 18: Esquema representativo mostrando o protocolo experimental para avaliação do efeito de rotundifolona (10 µM e 100 µM) sobre as correntes de K <sup>+</sup> dependentes de voltagem em miócitos da artéria mesentérica superior de rato SD. ....	87
Figura 19: Esquemas representativos mostrando em A, protocolo experimental para avaliação do efeito de rotundifolona (100 µM, 300 µM, 1mM e 3mM) sobre as correntes de Ba <sup>2+</sup> , em miócitos da artéria mesentérica superior de rato e em B, procedimento para análise das correntes de cálcio no pico das correntes e no final do pulso.....	88
Figura 20: Esquema representativo mostrando o protocolo experimental para obtenção da curva corrente-voltagem em canais estimulados com S(-)-Bay K 8644 (1µM), antes e após perfusão de rotundifolona 300 µM ou 1 mM. ....	89
Figura 21: Esquema representativo mostrando o protocolo experimental para obtenção da curva de inativação estacionária em canais estimulados com Bay K 8644 1µM, antes e após perfusão de rotundifolona 300 µM ou 1 mM. ....	90
Figura 22: Aparato utilizado para os experimentos com microscopia confocal com miócitos de artéria mesentérica isolado de rato normotenso. ....	91
Figura 23: Aparato utilizado para aquisição de dados de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não anestesiados.....	96
Figura 24: Representação esquemática do protocolo para avaliação dos valores de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos LN e LH não-anestesiados. ....	97

Figura 25: Efeito de rotundifolona em anéis da artéria mesentérica superior isolada de ratos LN. Na parte inferior, curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN com o endotélio intacto (▲) ou endotélio removido (■), pré-contraídos com FEN (0,1 a 10  $\mu$ M). As alterações nas tensões induzidas pela administração do veículo (água destilada + cremofor) foram mostradas juntamente com a curva concentração-resposta de rotundifolona. Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio intacto e endotélio removido. Os valores estão expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 11 e 12 experimentos, respectivamente. \*\*\*  $p < 0,0001$  vs Endotélio Intacto. .... 101

Figura 26: Traçado original mostrando o efeito de rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato, com o endotélio intacto e pré-contraídos com FEN 10  $\mu$ M. As setas indicam o momento da adição das substâncias. .... 102

Figura 27: Traçado original mostrando o efeito de rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) no tônus basal de anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato, com o endotélio intacto. .... 102

Figura 28: Influência da solução de Tyrode com 20mM de KCl no efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona. No gráfico inferior, curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional na presença de  $[K^+]_e = 4$  mM (●) ou  $[K^+]_e = 20$  mM (■). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio removido na presença de  $[K^+]_e = 4$  mM ou  $[K^+]_e = 20$  mM. Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 7 experimentos, respectivamente. \*\*\*  $p < 0,0001$  vs FEN (0,1-10  $\mu$ M)..... 104

Figura 29: Influência do TEA (3 mM), um bloqueador não-específico dos canais para K+ nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona. No gráfico inferior, Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria

mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (0,1-10  $\mu\text{M}$ ) na ausência (●) e na presença de TEA (3 mM) (■). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{\text{max}}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio removido na presença ou na ausência de TEA (3 mM). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 5 experimentos, respectivamente. \*\*  $p < 0,01$  vs FEN (0,1-10  $\mu\text{M}$ ). ..... 106

Figura 30: Influência dos  $\text{BK}_{\text{Ca}}^{2+}$  no efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN, sem endotélio intacto, pré-contraídos com FEN (0,1-10  $\mu\text{M}$ ). A, curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) na ausência (●) ou na presença de TEA (1 mM) (n=7) (■). B, curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) na ausência (●) ou na presença de caribdotoxina (0,1  $\mu\text{M}$ ) (n=5) (■). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 5 experimentos, respectivamente. \* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  vs FEN (0,1-10  $\mu\text{M}$ ). .. 108

Figura 31: Influência canais para  $\text{K}^+$  retificadores de entrada nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona. No gráfico inferior, Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (0,1-10  $\mu\text{M}$ ) na ausência (●) e na presença de  $\text{BaCl}_2$  (30  $\mu\text{M}$ ) (■). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{\text{max}}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio removido na presença ou na ausência de  $\text{BaCl}_2$  (30  $\mu\text{M}$ ). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 9 experimentos, respectivamente. \*\*\*  $p < 0,0001$  vs FEN (0,1-10  $\mu\text{M}$ ). ..... 110

Figura 32: Influência canais para  $\text{K}^+$  sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  de pequena condutância nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona. No gráfico inferior, Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, com endotélio removido, pré-contraídos com FEN (0,1-10  $\mu\text{M}$ ) na ausência (●) e na presença de apamina (0,1  $\mu\text{M}$ ) (■). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{\text{max}}$  e  $pD_2$  para os resultados

obtidos com endotélio removido na presença ou na ausência de apamina (0,1  $\mu$ M). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 9 experimentos, respectivamente. \*\*\*  $p < 0,0001$  vs FEN (0,1-10  $\mu$ M)..... 111

Figura 33: Influência canais para  $K^+$  retificador retardado nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona. No gráfico inferior, Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (0,1-10  $\mu$ M) na ausência (●) e na presença de 4-aminopiridina (1 mM) (■). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio removido na presença ou na ausência de 4-aminopiridina (1 mM). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 9 experimentos, respectivamente. .... 113

Figura 34: Influência canais para  $K^+$  sensíveis a ATP nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona. No gráfico inferior, Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, com endotélio removido, pré-contraídos com FEN (0,1-10  $\mu$ M) na ausência (●) e na presença de glibencamida (10  $\mu$ M) (■). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio removido na presença ou na ausência de glibencamida (10  $\mu$ M). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 5 experimentos, respectivamente. \*\*\*  $p < 0,001$  vs FEN (0,1-10  $\mu$ M)..... 114

Figura 35: Traçado original representativo do efeito de rotundifolona nas correntes de  $K^+$  em miócitos de artéria mesentérica isolada de rato SD. Na parte superior protocolo experimental realizado em miócitos vasculares. .... 116

Figura 36: Efeito de rotundifolona nas correntes de  $K^+$  em miócitos de artéria mesentérica isolada de rato SD. A, Gráfico de barras mostrando as variações do pico das correntes normalizadas (pA/pF), registradas nas condições controle e após a exposição a  $10^{-5}$  M de rotundifolona sozinha ou em conjunto com TEA (1 mM). B, Gráfico de barras semelhante ao gráfico A, no entanto na presença de  $10^{-4}$  M de

rotundifolona. C, decurso-temporal das respostas de rotundifolona ( $10^{-5}$  M) e TEA (1 mM) nas correntes de  $K^+$  em miócitos mesentéricos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 7 ( $10^{-5}$ ) e 3 experimentos ( $10^{-4}$ ), respectivamente. \* $P < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs controle e # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs rotundifolona. .... 117

Figura 37: Efeito de rotundifolona em anéis mesentéricos pré-contraídos com solução de alto  $K^+$  extracelular (80 mM). Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (0,1 - 10  $\mu$ M) (●) ou com KCl 80 mM (■). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 8 experimentos, respectivamente. \*\*  $p < 0,01$  vs FEN (0,1 - 10  $\mu$ M) ..... 118

Figura 38: Influência de rotundifolona sobre o influxo de  $Ca^{2+}$ . Na parte inferior, curvas concentração-resposta para  $CaCl_2$  em solução despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem  $Ca^{2+}$  em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional, na ausência (Controle) e na presença de concentrações isoladas de rotundifolona ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{max}$  para os resultados obtidos na ausência (controle) e na presença de rotundifolona ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 5 experimentos para cada concentração. \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle. .... 120

Figura 39: Efeito de rotundifolona nas contrações induzidas por S(-)-Bay k 8644. Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem o endotélio vascular, pré-contraídos com FEN (0,1 a 10  $\mu$ M) (●) ou S(-)-Bay K 8644 (200 nM) (■). Os valores estão expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 5 experimentos, respectivamente. \* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  vs FEN (0,1 a 10  $\mu$ M). .... 122

Figura 40: Efeito de rotundifolona em anéis mesentéricos pré-tratados com capsaicina. Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional, pré-contraídos com

FEN (0,1 - 10 $\mu$ ), não tratados (●) ou tratados com capsaicina 10  $\mu$ M (■). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 4 experimentos, respectivamente. ...123

Figura 41: Efeito de rotundifolona nas correntes de Ba<sup>2+</sup> por canais de Ca<sup>2+</sup> sensíveis a voltagem do tipo-L. A, Traçado representativo mostrando o efeito de rotundifolona (10<sup>-4</sup>, 3x10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup> e 3x10<sup>-3</sup>M) sobre as correntes de entrada de Ba<sup>2+</sup>, obtidas por pulsos despolarizantes a +10 mV, partindo de um potencial de holding de -70 mV, em miócitos recém dispersos de artéria mesentérica superior isolada de ratos SD. B, Curva concentração-resposta para rotundifolona (10<sup>-4</sup>, 3x10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup> e 3x10<sup>-3</sup>M) mostrando a inibição dependente de concentração das correntes de Ba<sup>2+</sup>, tanto no pico, quanto no final do pulso. C, Traçado representativo mostrando o efeito da nicardipina (10  $\mu$ M) sobre as correntes de Ba<sup>2+</sup> em miócitos de artéria mesentérica de rato, essas correntes foram obtidas na presença de S(-)-Bay K 8644 (1 $\mu$ M). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 5 experimentos para cada concentração.....125

Figura 42: Efeito de rotundifolona sobre a relação corrente-voltagem das correntes de Ba<sup>2+</sup> em miócitos recém dispersos de artéria mesentérica isolada de ratos SD. A, Inibição dependente de concentração induzida por rotundifolona (3x10<sup>-4</sup> e 3x10<sup>-3</sup> M) da relação corrente-voltagem, obtida por pulsos-teste de 500 ms de duração, em incrementos de 10 mV, que despolarizou a célula até +60 mV. A curva foi obtida a partir da equação  $I=(g_{max}*(V-V_r))/(1+\exp((V_{act}-x)/s))$  onde, V é o potencial teste; V<sub>r</sub> é potencial de reversão; V<sub>act</sub> é o valor de potencial que os canais começam a se ativar e s é o slope. B, Traçado original representativo da relação corrente-voltagem das correntes de Ba<sup>2+</sup> antes (Controle). C, e após a adição de rotundifolona 3x10<sup>-4</sup> M. Todas as correntes foram obtidas na presença de S(-)-Bay K 8644 (1  $\mu$ M). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 11, 9 e 5 experimentos, respectivamente. ....127

Figura 43: Efeito de rotundifolona sobre a curva de ativação estacionária ( $m_{\infty}$ ) dos canais Ca<sub>v</sub> tipo-L em miócitos da artéria mesentérica superior de ratos SD. As curvas de ativação estacionária foram obtidas a partir dos valores condutância normalizada e

ajustadas pela equação de Boltzmann (ver Métodos) na ausência (Controle) (■) e na presença de rotundifolona  $3 \times 10^{-4}$  M (◆). O gráfico em barra acima mostra o deslocamento do  $V_{1/2}$  induzido por rotundifolona ( $3 \times 10^{-4}$  M). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 5 experimentos. \*  $p < 0,05$  vs Controle..... 128

Figura 44: Efeito de rotundifolona ( $3 \times 10^{-4}$  M) sobre a curva de inativação estacionária ( $h_{\infty}$ ) para os canais  $Ca_v$  tipo-L em miócitos da artéria mesentérica superior de ratos SD. As curvas de inativação estacionária foram obtidas usando o protocolo de duplo-pulso e ajustadas pela equação de Boltzmann (ver Métodos) na ausência (Controle) (■) e na presença de rotundifolona  $3 \times 10^{-4}$  M (◆). As amplitudes relativas das correntes de  $Ba^{2+}$  foram mostradas em função dos potenciais no pré-pulso. O gráfico de barras acima mostra o deslocamento do  $V_{1/2}$  induzido por rotundifolona ( $3 \times 10^{-4}$  M). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 5 experimentos. \*\*\*  $p < 0,0001$  vs Controle..... 130

Figura 45: Identificação das células musculares lisas de artéria mesentérica. A, Imagens transmitidas de miócitos de artéria mesentérica SD. B, Miócitos carregados com anticorpo anti- $\alpha$ -actina conjugados com anticorpo secundário Alexa-568 fluorescente. .... 131

Figura 46: Rotundifolona aumenta a concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico em miócitos de artéria mesentérica de rato SD. A, Registro original do efeito de rotundifolona ( $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  ou  $3 \times 10^{-3}$  M) sobre a intensidade de fluorescência ao  $Ca^{2+}$  em miócito da artéria mesentérica superior de rato carregados com Fluo-4/AM. B, O Gráfico de barras mostra o aumento na intensidade de fluorescência relativa normalizado pela fluorescência mínima para cada célula ( $\Delta F(\%) = (F - F_0 / F_0) * 100$ ) induzido por rotundifolona ( $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M). C) Imagem dos miócitos fluorescentes carregados com Fluo-4/AM, antes (Controle) e durante a estimulação com rotundifolona ( $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12, 9, 5 e 11 experimentos, respectivamente. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  vs Controle..... 133

Figura 47: Rotundifolona potencializou o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico induzido por S(-)-Bay K 8644 em miócitos de artéria mesenterica de rato SD. A, Na parte superior, registro original representativo mostrando o efeito de rotundifolona ( $3 \times 10^{-3}$  M) sobre o aumento de intensidade de fluorescência ao  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por S(-)-Bay K 8644 ( $1 \mu\text{M}$ ) em miócito de artéria mesentérica isolada de rato, carregado com Fluo-4/AM. Na parte inferior, gráfico de barras mostrando o aumento na intensidade de fluorescência ao  $\text{Ca}^{2+}$ , normalizada pela fluorescência mínima ( $\Delta F(\%) = (F - F_0 / F_0) * 100$ ), induzido por S(-)-Bay K 8644 ( $1 \mu\text{M}$ ) na ausência e presença de rotundifolona  $3 \times 10^{-3}$  M. B, Imagem dos miócitos fluorescentes carregados com Fluo-4/AM, antes (controle) e durante a estimulação com Bay k 8644 sozinho ou concomitantemente a rotundifolona (3mM). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  vs Controle e ###  $p < 0,001$  vs S(-)-Bay K 8644. .... 135

Figura 48: Influência do EGTA sobre o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico induzido por rotundifolona em miócitos de artéria mesenterica de rato SD. A, Na parte superior registro original do efeito de rotundifolona ( $3 \times 10^{-3}$  M) sobre a intensidade de fluorescência na ausência e na presença de EGTA 2 mM. Na parte inferior o gráfico em barras mostrando o aumento na intensidade de fluorescência normalizada pela fluorescência mínima ( $\Delta F(\%) = (F - F_0 / F_0) * 100$ ) induzido rotundifolona ( $3 \times 10^{-3}$  M) na ausência e presença de EGTA 2 mM. B, Imagem dos miócitos de artéria mesenterica de rato carregados com Fluo-4/AM, antes (Controle) e durante a estimulação com rotundifolona ( $3 \times 10^{-3}$  M) na presença de EGTA 2 mM. Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 8, 11 e 14 experimentos, respectivamente. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  vs Controle e ### $p < 0,001$  vs Rotundifolona  $3 \times 10^{-3}$  M. .... 137

Figura 49: Influência do BAPTA/AM sobre o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico induzido por rotundifolona em miócitos de artéria mesenterica de rato SD. A, gráfico em barras mostrando as alterações nas intensidades de fluorescência normalizada pela fluorescência mínima ( $\Delta F(\%) = (F - F_0 / F_0) * 100$ ) induzidas por FEN ( $1 \mu\text{M}$ ) e BAPTA/AM ( $50 \mu\text{M}$ ), na ausência e na presença de Rotundifolona (3 mM). B, Imagem dos miócitos de artéria mesenterica de rato carregados com Fluo-4/AM, antes (Controle) e durante a estimulação com fenilefrina e BAPTA/AM ( $50 \mu\text{M}$ ), na presença e na

ausência de rotundifolona (3 mM). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 8, 11 e 14 experimentos, respectivamente. \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle e ### $p < 0,001$  vs fenilefrina. .... 139

Figura 50: Influência do CPA sobre o aumento do  $Ca^{2+}$  citosólico induzido por rotundifolona em miócitos de artéria mesenterica de rato SD. A, gráfico de barras mostrando as alterações nas intensidades de fluorescência normalizada pela fluorescência mínima ( $\Delta F(\%) = (F - F_0 / F_0) * 100$ ) induzidas por fenilefrina (1  $\mu M$ ), na ausência e na presença de CPA, e rotundifolona (3 mM), na ausência e na presença de CPA (20  $\mu M$ ). B, Imagens dos miócitos de artéria mesenterica de rato carregados com Fluo-4/AM, estimulados com fenilefrina ou Rot (3 mM) na ausência ou na presença de CPA (20  $\mu M$ ). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 8, 11 e 14 experimentos, respectivamente. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs basal e ### $p < 0,001$  vs fenilefrina. .... 141

Figura 51: Influência da capsazepina sobre o aumento do  $Ca^{2+}$  citosólico induzido por rotundifolona em miócitos de artéria mesenterica de rato SD. A, Registro original do efeito de rotundifolona ( $3 \times 10^{-3}$  M) sobre a intensidade de fluorescência na ausência e na presença de capsazepina (50  $\mu M$ ). (B) O Gráfico de barras mostra o aumento na intensidade de fluorescência relativa a fluorescência mínima ( $\Delta F(\%) = (F - F_0 / F_0) * 100$ ) induzido rotundifolona ( $3 \times 10^{-3}$  M) na ausência e presença de capsazepina (20  $\mu M$ ). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 8, 11 e 14 experimentos, respectivamente. \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle e ###  $p < 0,001$  vs Rotundifolona  $3 \times 10^{-3}$  M. .... 143

Figura 52: Efeito de rotundifolona ( $3 \times 10^{-3}$  M) sobre as alterações na tensão de repouso induzidas pelas temperaturas de 25° C e 18° C em anéis da artéria mesentérica superior de rato LN, sem o endotélio funcional. Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 8 experimentos. \*\*\* $p < 0,001$  vs preparações a 25°C, ### $p < 0,001$  vs Rotundifolona  $3 \times 10^{-3}$  M (37 °C) e  $\psi\psi\psi p < 0,0001$  vs preparações a 18°C. .... 145

Figura 53: Registro original representativo ilustrando o efeito de doses crescentes de rotundifolona (1; 5; 10; 20 e 30 mg/Kg, i.v.) sobre a PAS, PAM, PAD e FC em rato normotenso (A) e em ratos hipertensos (B).....146

Figura 54: Efeitos da administração intravenosa de rotundifolona (1, 5, 10, 20 e 30 mg/Kg, i.v. randomicamente) sobre a Pressão Arterial Média (PAM, %) e Frequência Cardíaca (FC, %) em ratos LN ou LH não anestesiados. Gráfico em barras mostrando o efeito de rotundifolona sobre a PAM e FC em ratos normotensos e hipertensos não anestesiados. Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 5 experimentos. ....147

Figura 55: Efeito de rotundifolona em anéis da artéria mesentérica superior isolada de ratos LH. Na parte inferior, curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$ M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LH com o endotélio intacto ( $\blacktriangle$ ) ou endotélio removido ( $\blacklozenge$ ), pré-contraídos com FEN (0,1 a 10  $\mu$ M). Os valores estão expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 7 e 7 experimentos, respectivamente. \*\*\*  $p < 0,0001$  vs Endotélio Intacto. Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio intacto e endotélio removido.....149

Figura 56: Influência da solução de tyrode com 20mM de KCl no efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona em animais hipertensos. No gráfico inferior, curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LH, sem endotélio funcional na presença de  $[K^+]_e = 4$  mM ( $\blacklozenge$ ) ou  $[K^+]_e = 20$  mM ( $\blacktriangle$ ). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio removido na presença de  $[K^+]_e = 4$  mM ou  $[K^+]_e = 20$  mM.Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 6 e 7 experimentos, respectivamente. \*\*\*  $p < 0,0001$  vs FEN (0,1 -10  $\mu$ M). ....150

Figura 57: Efeito de rotundifolona em anéis mesentéricos de animais hipertensos pré-contraídos com solução de alto  $K^+$  extracelular (80 mM). Curva concentração-resposta

para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LH, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (0,1 - 10  $\mu$ M) (◆) ou com KCl 80 mM (▲). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 7 e 6 experimentos, respectivamente. \*\*  $p < 0,01$  vs FEN (0,1 - 10  $\mu$ M)..... 152

Figura 58: Influência de rotundifolona sobre o influxo de  $Ca^{2+}$  de anéis mesentéricos de ratos hipertensos. Curvas concentração-resposta para  $CaCl_2$  em solução despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem  $Ca^{2+}$  em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LH, sem endotélio funcional, na ausência (Controle) e na presença de concentrações isoladas de rotundifolona ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 5 experimentos para cada concentração. \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle..... 154

Figura 59: Efeito de rotundifolona nas contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644. Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LH, sem o endotélio vascular, pré-contraídos com FEN 10  $\mu$ M (◆) ou S(-)-Bay K 8644 (200 nM) (▲). Os valores estão expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 7 e 4 experimentos, respectivamente. \* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  vs FEN (0,1 - 10  $\mu$ M)..... 156

Figura 60: Estrutura química do mentol e de rotundifolona, dois monoterpenos originários de produtos naturais. .... 174

Figura 61: Mecanismo de ação proposto envolvido nas respostas cardiovasculares induzidas por rotundifolona em artéria mesentérica..... 180

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação da pressão arterial para adultos.....	45
Quadro 2: Aspectos químicos que caracterizam a rotundifolona.....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição da solução de Tyrode (pH=7,4).....	65
<b>Tabela 2:</b> Composição da solução de Tyrode nominalmente sem cálcio (pH=7,4).....	65
<b>Tabela 3:</b> Composição da solução de Tyrode despolarizante com KCl à 20mM (pH=7,4).....	66
<b>Tabela 4:</b> Composição da solução de Tyrode despolarizante com KCl à 60mM (pH=7,4).....	66
<b>Tabela 5:</b> Composição da solução de Tyrode despolarizante com KCl à 80mM (pH=7,4).....	67
<b>Tabela 6:</b> Composição da solução salina fisiológica (SSF) para dissociação das células de artéria mesentérica (pH=7,4).....	67
<b>Tabela 7:</b> Composição da SSF com baixa concentração de cálcio para dissociação das células de artéria mesentérica (pH=7,4).....	68
<b>Tabela 8:</b> Composição da solução interna utilizada para medir as correntes de Ba <sup>2+</sup> (pH=7,2).....	68
<b>Tabela 9:</b> Composição da solução externa utilizada para medir as correntes de Ba <sup>2+</sup> (pH=7,4).....	69
<b>Tabela 10:</b> Composição da solução de Hanks utilizada como solução externa para medir correntes de K <sup>+</sup> (pH=7,4).....	69
<b>Tabela 11:</b> Composição da solução de interna/pipeta utilizada como solução interna para medir correntes de K <sup>+</sup> (pH=7,2).....	70
<b>Tabela 12:</b> Composição da solução de perfusão para os experimentos de microscopia confocal (pH=7,4).....	70

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	35
2. OBJETIVOS.....	60
2.1 Gerais.....	60
2.2 Específicos.....	60
3. MATERIAL.....	62
3.1. Animais.....	62
3.2. Drogas utilizadas.....	63
3.3. Isolamento, identificação e preparação das soluções de rotundifolona.....	63
3.4. Soluções Fisiológicas.....	64
4. MÉTODOS.....	72
4.1. Estudos <i>In Vivo</i> .....	72
4.1.1. Preparações com artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio funcional.....	72
4.1.2. Protocolos Experimentais utilizando artéria mesentérica superior isolado de rato.....	73
4.1.2.1. Efeito de rotundifolona em anéis da artéria mesentérica superior isolada de ratos LN e LH, pré-contraídos com FEN (0,1 $\mu$ M – 10 $\mu$ M).....	73
4.1.2.2. Avaliação da participação de canais para K <sup>+</sup> na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN e LH.....	76
4.1.2.3. Influência de bloqueadores para diferentes canais para K <sup>+</sup> na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em animais normotensos.....	77
4.1.2.4. Avaliação do efeito de rotundifolona em anéis mesentéricos pré-contraídos com solução despolarizante de alto K <sup>+</sup> .....	78
4.1.2.5. Avaliação do efeito de rotundifolona sobre as contrações induzidas por CaCl <sub>2</sub> .....	79
4.1.2.6. Avaliação do efeito de rotundifolona sobre as contrações induzidas por S(-)- Bay K 8644, um ativador dos canais para cálcio sensíveis a voltagem do tipo-L (Ca <sub>v</sub> -tipoL).....	80

4.1.2.7. Investigação da participação dos receptores potencial-transiente de vaniloide (TRPV) e peptídeo relacionado ao gen da calcitonina (CGRP) na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona.....	81
4.1.2.8. Investigação da influência de rotundifolona sobre os efeitos vasculares induzidos pela temperatura.....	82
4.1.3. Estudo com miócitos da artéria mesentérica superior isolada de rato SD.....	83
4.1.3.1. Isolamento das células musculares lisas da artéria mesentérica superior isolada de rato.....	83
4.1.4. Estudos eletrofisiológicos.....	84
4.1.5. Protocolos experimentais empregados nos ensaios eletrofisiológicos.....	86
4.1.5.1. Avaliação do efeito de rotundifolona sobre os canais para potássio em miócitos da artéria mesentérica superior de rato.....	86
4.1.5.2. Avaliação do efeito de rotundifolona sobre os canais para cálcio sensíveis a voltagem em miócitos da artéria mesentérica superior de rato.....	87
4.1.5.3. Avaliação do efeito de rotundifolona sobre a curva corrente-voltagem (I/V) para os Cav em miócitos da artéria mesentérica superior de rato normotenso.....	88
4.1.5.4. Avaliação do efeito de rotundifolona sobre a cinética de inativação dos canais para Ca <sup>2+</sup> sensíveis a voltagem.....	89
4.1.6. Estudos com microscopia confocal.....	90
4.1.7. Protocolos realizados nos estudos com microscopia confocal.....	91
4.1.7.1. Análise da presença de α-actina por imunofluorescência.....	91
4.1.7.2. Avaliação dos efeitos de rotundifolona sobre a fluorescência ao Ca <sup>2+</sup> basal em miócitos de artéria mesentérica .....	92
4.1.7.3. Avaliação dos efeitos de rotundifolona sobre a fluorescência ao Ca <sup>2+</sup> em miócitos de artéria mesentérica de ratos normotensos estimulados com S(-)-Bay K 8644.....	93
4.1.7.4. Investigação da fonte de Ca <sup>2+</sup> mobilizada por rotundifolona em miócitos de artéria mesentérica de ratos normotensos.....	93

4.1.7.5. Influência do $Ca^{2+}$ proveniente do retículo sarcoplasmático nos efeitos de rotundifolona em miócitos de artéria mesentérica de ratos normotensos.....	94
4.1.7.6. Influência do antagonista dos receptores TRPM8, capsazepine, nos efeitos de rotundifolona em miócitos de artéria mesentérica de ratos normotensos.....	94
4.2. Estudos <i>In Vivo</i> .....	95
4.2.1. Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos não-anestesiados.....	95
4.2.2. Protocolo experimental utilizado nos estudos <i>in vivo</i> .....	96
4.2.2.1. Avaliação do efeito de rotundifolona sobre PAM e FC em ratos LN e LH não anestesiados.....	96
4.3. Análise Estatística.....	97
5. RESULTADOS.....	100
5.1. Efeitos vasculares de rotundifolona em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN.....	100
5.2. Influência dos canais para $K^+$ na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN.....	103
5.3. Influência de um bloqueador não-específico dos canais para $K^+$ na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN.....	105
5.4. Influência dos $BK_{Ca}$ na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN.....	107
5.5. Influência dos $K_{ir}$ na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN.....	109
5.6. Influência dos $SK_{Ca}$ na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN.....	110
5.7. Influência dos canais para $K^+$ retificadores retardados na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN.....	112
5.8. Influência dos canais para $K^+$ sensíveis a ATP na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN.....	113

5.9. Efeito de rotundifolona sobre os canais para potássio em miócitos da artéria mesentérica superior isolada de rato SD.....	115
5.10. Efeito da rotundifolona sobre anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, pré-contraídos com KCl 80 mM.....	118
5.11. Influência de rotundifolona sobre o influxo de Cálcio.....	119
5.12. Efeito da rotundifolona sobre as contrações induzidas por um agonista dos canais para $Ca^{2+}$ sensíveis a voltagem do Tipo-L.....	121
5.13. Influência dos receptores potencial-transiente de vaniloide (TRPV) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona.....	122
5.14. Efeito de rotundifolona sobre os canais para cálcio sensíveis a voltagem em miócitos da artéria mesentérica superior de rato normotenso.....	124
5.15. Efeito de rotundifolona sobre a curva I/V para os Cav em miócitos da artéria mesentérica superior de rato normotenso.....	126
5.16. Efeito de rotundifolona na cinética de ativação dos canais para cálcio sensíveis a voltagem.....	128
5.17. Efeito de rotundifolona na curva de inativação estacionária para os canais Cav tipo-L.....	129
5.18. Identificação da célula muscular lisa de artéria mesentérica.....	130
5.19. Efeito de rotundifolona nos transiente de $Ca^{2+}$ em miócitos de artéria mesentérica isolada de rato normotenso.....	131
5.20. Efeito de rotundifolona na concentração de $Ca^{2+}$ intracelular em miócitos estimulados com agonista dos canais para $Ca^{2+}$ sensíveis a voltagem.....	134
5.21. Importância do $Ca^{2+}$ extracelular no aumento dos níveis intracelulares de $Ca^{2+}$ induzidos por rotundifolona .....	136
5.22. Influência do BAPTA no aumento dos níveis intracelulares de $Ca^{2+}$ induzidos por rotundifolona.....	138
5.23. Participação do $Ca^{2+}$ estocado no retículo sarcoplasmático nas alterações nos transientes intracelulares de $Ca^{2+}$ induzidas por rotundifolona.....	140
5.24. Participação dos canais TRP nos efeitos de rotundifolona em miócitos de artéria mesentérica de ratos normotensos.....	142

5.25. Influência de rotundifolona nos efeitos vasculares induzidos pela temperatura.....	144
5.26. Efeito de rotundifolona na pressão arterial e frequência cardíaca de ratos normotensos e hipertensos de Lyon.....	145
5.27. Efeito de rotundifolona em anéis de artéria mesentérica isolada de rato LH.....	148
5.28. Influência dos canais para K <sup>+</sup> na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LH.....	149
5.29. Efeito da rotundifolona sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais hipertensos, pré-contraídos com KCl 80 mM.....	151
5.30. Influência de rotundifolona sobre o influxo de Cálcio em artéria mesentérica de ratos hipertensos.....	153
5.31. Efeito da rotundifolona sobre as contrações induzidas por um agonista dos canais para Ca <sup>2+</sup> sensíveis a voltagem do Tipo-L em anéis mesentéricos de ratos hipertensos.....	155
6. DISCUSSÃO.....	158
7. CONCLUSÕES.....	182
8. PERSPECTIVAS.....	184
REFERÊNCIAS.....	186

# *Introdução*

---

## 1. INTRODUÇÃO

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

Um Componente importante do sistema cardiovascular é o sistema circulatório, que apresenta função de suprir suficientemente os tecidos e órgãos periféricos de acordo com suas demandas metabólicas. Esta função é alcançada por alterações hemodinâmicas ocorrendo continuamente, envolvendo alterações no débito cardíaco, na resistência vascular e na regulação renal dos fluidos corporais (INOUE et al., 2006).

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

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

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

É bem descrito que o estado de contratilidade vascular das células musculares lisas, dentro da parede dos vasos sanguíneos, é regulado pela concentração de  $Ca^{2+}$

intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Os vasoconstrictores agem elevando a  $[Ca^{2+}]_i$ , bem como, aumentando a aparente sensibilidade ao  $Ca^{2+}$  dos processos contráteis na célula muscular lisa. Por outro lado, os vasodilatadores exercem efeitos opostos na  $[Ca^{2+}]_i$  (LEDOUX et al., 2006). Os canais iônicos, principalmente os canais para  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ), desempenham um papel central neste processo.

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

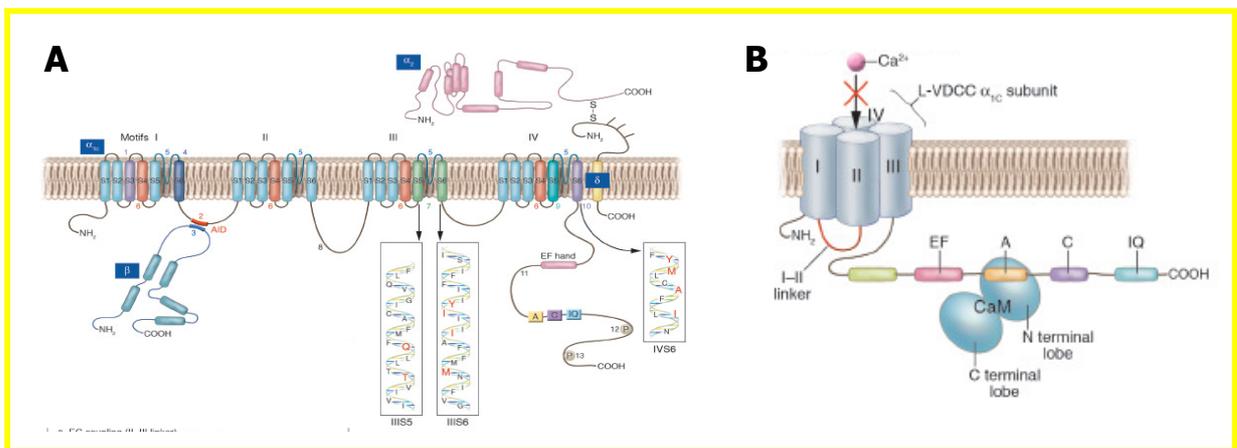
As principais vias que levam ao aumento na  $[Ca^{2+}]_i$  em miócitos são canais para cálcio sensíveis a voltagem ( $Ca_v$ ) e canais catiônicos não-seletivos, localizados na membrana plasmática, além de canais que levam a liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares, tais como os receptores de rianodina e/ou receptores de trifosfato de inositol ( $IP_3$ ), encontrados na membrana do retículo sarcoplasmático (LEDOUX et al., 2006).

É importante salientar que a mobilização de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático através da ativação de  $IP_3$ Rs e RYRs, em células de músculo liso, pode gerar ondas de  $Ca^{2+}$ , o qual é sugestivo de mediar vasoconstrição (JAGGAR et al., 2000; THORNELOE; NELSON, 2005). Paradoxalmente, os transientes de  $Ca^{2+}$  gerados pela liberação de  $Ca^{2+}$  através de  $IP_3$ Rs e RYRs, na forma de “puffs” e “sparks” de  $Ca^{2+}$ , respectivamente, em células de músculo liso, podem ativar os canais para  $K^+$  ativados pelo  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ) promovendo hiperpolarização de membrana limitando a contratilidade do músculo liso (JAGGAR et al., 2000; THORNELOE; NELSON, 2005).

Estes eventos de liberação de  $Ca^{2+}$  altamente localizados, “puffs” e “sparks” de  $Ca^{2+}$ , só foram amplamente entendidos após desenvolvimento da técnica de microscopia confocal, pois a alta resolução espacial desta técnica em conjunto com o uso de sondas fluorescentes indicadoras de  $Ca^{2+}$ , ofereceu oportunidades de estudos detalhados de imagem em um aspecto temporal e espacial da sinalização de  $Ca^{2+}$  intracelular (CALLAMARAS; PARKER, 1999).

Os canais  $Ca_v$  são considerados a principal via de entrada de  $Ca^{2+}$  do meio extracelular para as CMLV (CRIBBS, 2006). Eles consistem em um grande complexo multimérico composto por uma subunidade  $\alpha_1$  que contém a região formadora do poro

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



**Figura 1:** Canais Cav. (A) Disposição topológica do canal  $Ca_v$  na membrana. (B) Organização estrutural dos canais Cav. Fonte: Modificada de BODI et al., 2003.

Foram identificados 10 genes que codificam as subunidades  $\alpha 1$  do  $Ca_v$  (subunidade que contém o poro) que se agrupam em três subfamílias distintas, são elas: canais  $Ca_v$  1 ( $Ca_v$  1.1 – 1.4), que conduzem correntes tipo-L; canais  $Ca_v$  2 (2.1 – 2.3), que conduzem correntes tipo-N, P/Q e R; Canais  $Ca_v$  3 ( $Ca_v$  3.1-3.3), que conduzem corrente tipo-T (figura 2) (LIPSCOMBE et al., 2004; YU; CATTERALL, 2004; CRIBBS, 2006).

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

ocorrem abertura dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L levando ao aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, contração celular e vasoconstrição (CRIBBS, 2006). Entretanto, a hiperpolarização induz fechamento destes canais levando a vasodilatação (JACKSON, 2000).

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

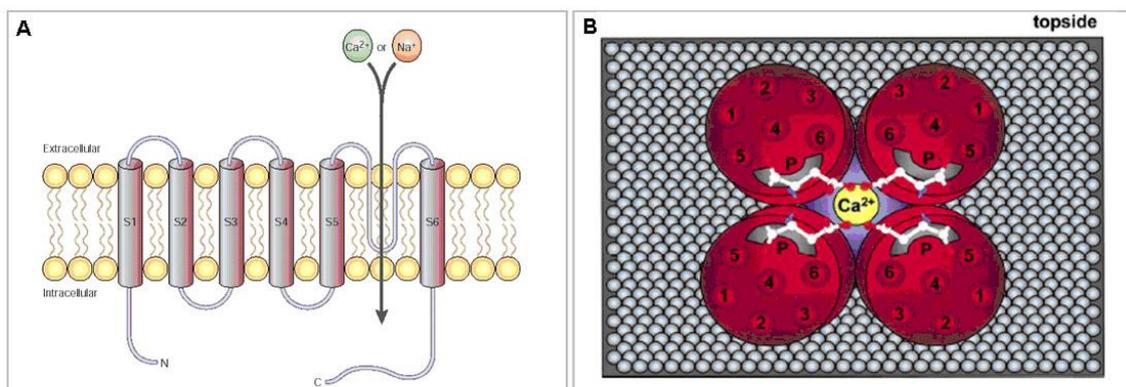
Nelson e colaboradores (1990) relataram que a composição das subunidades formadoras dos canais  $\text{Ca}_v$  vasculares é um determinante do tônus vascular e dos níveis de pressão sanguínea. Além disso, estes canais inativam lentamente durante despolarizações sustentadas, de maneira que o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através de uma fração de canais  $\text{Ca}_v$  é suficiente para mediar a contração induzida por pressão em pequenas artérias, contribuindo desta maneira para auto-regulação dinâmica dos vários leitos vasculares (NELSON et al., 1990, SONKUSARE et al., 2006).

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

Além das funções bem estabelecidas dos canais  $\text{Ca}_v$ , existe atualmente uma nova família de canais permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  conhecida por proteínas de potencial receptor transiente (TRP). Desde sua descoberta inicialmente no sistema visual de *Drosophila* (COSENS; MANNING, 1969 Apud MINKE, 2006), os TRPs tem atraído uma crescente atenção como únicos canais de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados por estímulos variados e associados a diversas funções fisiológicas.

Seis famílias de proteínas compreendem a superfamília de TRPs em mamíferos: Os TRPs clássicos (TRPC), os TRPs receptores de vanilóide (TRPV), os TRPs melastatinas (TRPM), os TRPs muculipinas (TRPML) e os TRPs proteínas transmembranas ancrinas 1 (TRPA1) (CLAPHAM et al., 2005). Estes canais apresentam em sua estrutura seis domínios transmembranas com um poro entre o

quinto segmento (S5) e sexto segmento (S6). Além de apresentar as regiões N e C-terminais localizados intracelularmente (CLAPHAM et al., 2005; VANIER et al., 1998). Esta arquitetura assemelha-se com a superfamília dos canais catiônicos dependentes de voltagem, no entanto os resíduos de aminoácidos carregados positivamente, característica dos canais sensíveis a voltagem, não estão preservados na maioria dos membros desta família (INOUE, et al., 2006) (Figura 2).



**Figura 2:** Representação esquemática da estrutura molecular dos TRPs. A, representação esquemática mostrando a disposição das subunidades (S1-S6) na membrana plasmática. B, Visão superior do canal TRP homotetramérico. (Fonte: [http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/kaiser-simone-2004-06-10/HTML/kaiser2\\_html\\_m1ba71d5c.png](http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/kaiser-simone-2004-06-10/HTML/kaiser2_html_m1ba71d5c.png)).

Vários fatores podem ativar os TRPs tais como: receptores acoplados a proteína G, agentes picantes, por exemplo, capsaicina, lipídeos, ácidos, calor, estresse de cisalhamento e hipoosmolaridade (TRPs receptores de vanilóide). Outros podem ser ativados por estresse oxidativo, elevação de Ca<sup>2+</sup> intracelular, exposição à temperaturas baixas ou agentes resfriantes, tais como mentol e icilin (TRPs melastatinas) (ver revisão: INOUE, et al., 2006; CLAPHAM et al., 2005).

Os TRPs são conhecidos pela sensibilidade a temperatura. São 7 membros da superfamília dos TRPs termo-sensíveis: quatro membros dos receptores de vanilóide que são sensíveis à temperaturas maiores que 25°C (TRPV4, 25°C; TRPV3, 31°C; TRPV1, 43°C e TRPV2, 52°C), 3 membros da família dos TRPs melastatinas, TRPM4 e

TRPM5 que são ativados na faixa de temperatura de 15 a 35°C e TRPM8 estimulado na faixa de temperatura de 8 a 25°C (SMITH et al., 2002; MCKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002; BODDING; WISSENBACH; FLOCKERZI, 2007; INOUE, et al., 2006; CLAPHAM et al., 2005)

Estes canais estão amplamente distribuídos nos tecidos e podem participar de diversas funções tais como: funções visuais, auditivas, táteis, transdução dos sinais dolorosos, regulação da circulação sanguínea, motilidade intestinal, hipersensibilidade das vias aéreas, crescimento e morte celular (MINKE, 2006; INOUE, et al., 2006).

Até então, foram detectados mais de 10 membros distintos da superfamília dos TRPs nas células musculares lisas vasculares, por exemplo, os TRPV1, TRPV4, TRPM4, TRPC6, TRPC1, e mais recentemente, TRPM8 em aorta e artéria pulmonar e cerebral de rato (Ver revisão: INOUE, et al., 2006; YANG et al., 2006). São variadas as funções que estes receptores desempenham no sistema cardiovascular tais como vasoconstrição, proliferação das células musculares lisa, possíveis candidatos a canal operado por estoque (SOC) e canais de  $Ca^{2+}$  mecanossensíveis (MSCC), produção de NO pelas células endoteliais, respostas miogênicas, vasodilatação via liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), entre outras. (Ver revisão: INOUE, et al., 2006).

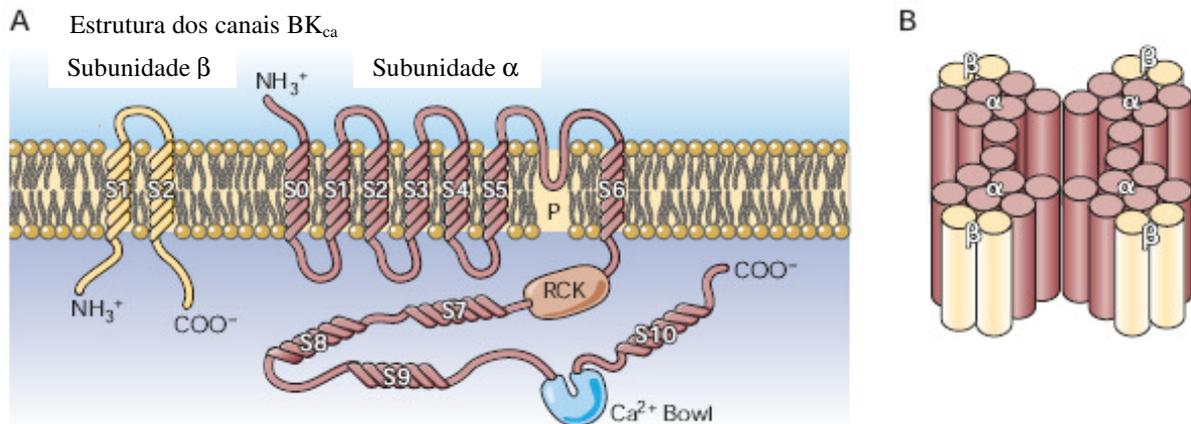
Além da importância dos canais permeáveis ao  $Ca^{2+}$ , como  $Ca_v$  e TRPs, para manutenção de várias funções celulares, incluindo as cardiovasculares, outros canais, tais como os canais para  $K^+$ , também são essenciais no controle cardiovascular.

Os canais para  $K^+$  são reguladores importantes do tônus arterial e com isso, do diâmetro dos vasos sanguíneos. A abertura dos canais para  $K^+$  nas células musculares lisas levam ao aumento no efluxo de  $K^+$ , causando repolarização ou hiperpolarização do potencial de membrana. Estes eventos culminam com o fechamento dos canais para  $Ca^{2+}$ , podendo levar a vasodilatação (NELSON; QUAYLE, 1995; THORNELOE; NELSON, 2005). Os canais para  $K^+$  são classificados em quatro subgrupos segundo as normas de nomenclatura da União Internacional de Farmacologia: Canais sensíveis a voltagem ( $K_v$ ), canais ativados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{ca}$ ), canais retificadores de entrada ( $K_{ir}$ ) e canais de dois poros ( $K_{2p}$ ). Estes canais estão distribuídos em vários tecidos, incluindo

o músculo liso vascular (WEI, et al., 2005; GUTMAN et al, 2005; KUBO et al., 2005; GOLDSTEIN et al., 2005).

Os canais  $K_{ca}$  são divididos em canais  $K_{ca}$  de pequena condutância ( $SK_{ca}$ ), canais  $K_{ca}$  de intermediária condutância ( $IK_{ca}$ ) e canais  $K_{ca}$  de grande condutância ( $BK_{ca}$ ). Os canais  $SK_{ca}$  e  $IK_{ca}$  são insensíveis a voltagem, ativados por baixas concentrações de  $Ca^{2+}$  ( $<1,0 \mu M$ ) e desempenham importante papel em muitos processos de sinalização dependente de  $Ca^{2+}$  tanto em células excitáveis como em células não-excitáveis (WEI et al., 2005). Estes canais não se ligam diretamente ao  $Ca^{2+}$ , eles detectam a presença deste íon em virtude da calmodulina que está constitutivamente ligada à região C-terminal do canal. A ligação do cálcio a calmodulina resulta em mudanças conformacionais que são responsáveis pela abertura do canal (FANGER et al., 1999; XIA et al, 1998).

Diferentemente dos  $SK_{ca}$  e  $IK_{ca}$ , os canais  $BK_{ca}$  são ativados por ambos, voltagem e  $Ca^{2+}$  intracelular (WEI et al., 2005). Estes canais têm sido identificados em todos os tipos de músculo liso, bem como em uma variedade de outros tipos celulares. (NELSON; QUAYLE, 1995). O canal  $BK_{ca}$  é formado por 4 subunidades  $\alpha$  e quatro subunidades  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  contém a porção formadora do poro e consiste em 11 domínios (S0 a S10). Os domínios S0 a S6 são transmembrânicos hidrofóbicos, enquanto que de S7 a S10 estão localizados no citoplasma formando a cauda C-terminal da proteína. Similar a outros canais ativados por voltagem, o domínio S4 contém diversos aminoácidos carregados positivamente e deve representar o sensor de voltagem do canal (LEDOUX et al., 2006). Dados na literatura reportam que a subunidade  $\alpha$  também contém uma sensibilidade intrínseca  $[Ca^{2+}]_i$  e isto pode ser conferido a uma “bowl” de  $Ca^{2+}$  localizado na região caudal da proteína (BAO t al., 2004) (figura 3).



**Figura 3:** Representação esquemática da estrutura molecular dos BK<sub>ca</sub>. A, Subunidade  $\beta$ 1 consiste de 2 segmentos transmembrana e a subunidade  $\alpha$  em 11 domínios (S0-S10) com S0-S6 localizado na membrana plasmática e a região do poro entre S5-S6. B, Associação das 4 subunidades  $\alpha$  e 4  $\beta$ 1 formam o canal BK<sub>ca</sub> funcional. Fonte: LEDOUX et al., 2006.

Nos BK<sub>ca</sub> a ligação do Ca<sup>2+</sup> desloca a ativação do canal para valores de potencial de membrana mais negativos, dentro da faixa fisiológica do músculo liso (COX; ALDRICH, 2000). Estes canais são extremamente importantes na regulação do tônus miogênico (NELSON; QUAYLE, 1995). Apresentam função dinâmica no controle do potencial de membrana das células musculares lisas, servindo como moduladores negativos das vias que levam a despolarização de membrana e vasoconstrictores (ASANO; MASUZAWA-ITO; MATSUDA, 1993; NELSON; QUAYLE, 1995).

Os BK<sub>ca</sub> podem ser espontaneamente ativados por eventos de liberação de Ca<sup>2+</sup> localizados, as “sparks” de Ca<sup>2+</sup>, pelos canais sensíveis a rianodina no retículo sarcoplasmático. A ativação dos canais BK<sub>ca</sub> pelas sparks de Ca<sup>2+</sup> leva a produção de grandes correntes que hiperpolarizam e relaxam as células musculares lisas, causando vasodilatação (NELSON et al., 1995)

Devido a estas importantes funções dos canais iônicos no controle do tônus vascular, anormalidades nos mesmos são consideradas como parte da extensiva adaptação biológica e morfológica que caracteriza a hipertensão. Inicialmente, durante aumentos agudos na pressão sanguínea, pequenas artérias e arteríolas mostram uma

imediate despolarização dependente de estiramento e contração, comumente referida como resposta miogênica. Esta resposta depende da abertura dos canais  $Ca_v$  tipo-L nas células musculares lisas vasculares para induzir contração (NELSON et al. 1990 apud SONKUSARE et al., 2006). A resposta miogênica, nas pequenas artérias e arteríolas, pode amplificar o aumento inicial na pressão sanguínea, devido ao maior aumento da RVPT, podendo levar a hipertensão (SONKUSARE et al., 2006).

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

Já alterações na expressão da subunidade  $\beta$  dos canais  $BK_{ca}$  levaram a uma menor sensibilidade ao  $Ca^{2+}$  por estes canais, em animais hipertensos (SHR), incapacitando os mesmos de responderem normalmente as “sparks” de  $Ca^{2+}$  (AMBERG; SANTANA, 2003). Estes dados ajudaram a aumentar a lista de fatores que podem estar relacionados à hipertensão arterial.

A hipertensão arterial pode ser definida como um aumento dos níveis pressóricos acima do recomendado para uma determinada faixa etária e condição clínica. Os níveis estabelecidos encontram respaldo científico em grandes estudos epidemiológicos que correlacionam valores de pressão arterial aos riscos de morbidade e mortalidade cardiovascular (MACMAHON et al., 1990). A publicação do “*Seventh Joint National Committee*” (JCN-7) (CHOBANIAM et al., 2003) forneceu uma nova classificação da hipertensão arterial. Os valores de pressão sanguínea, em indivíduos adultos, foram classificados como normais, pré-hipertensão, hipertensão estágio 1 e hipertensão estágio-2 (quadro 1).

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

**Quadro 1:** Classificação da pressão arterial para adultos. Fonte: CHOBANIAM et. al., 2003.

A hipertensão arterial é seguramente um grande problema de saúde pública mundial. Sendo universalmente aceita como um importante prognóstico para doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e mortalidade prematura (ELLIOTT, 2007). No Brasil, segundo a V Deretizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2006), em 2003, esta condição clínica foi o principal fator de risco para 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 27,4% dos óbitos registrados no país foram decorrentes de doenças cardiovasculares, atingindo 37% quando são excluídos os óbitos por causas mal definidas e a violência. Inquéritos de base populacional mostram que a prevalência de hipertensão arterial ( $\geq 140/90$  mmHg) é de cerca 22,3% podendo atingir 43,9% em algumas cidades do Brasil (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2006).

O estado hipertensivo está associado a inúmeras condições patológicas relacionadas, tais como: hipertrofia ventricular, disfunção endotelial, síndrome metabólica, estado pró-coagulativo, estresse oxidativo, inflamação entre outras (JULIUS, 2007). As doenças relacionadas a esse estado e suas complicações são responsáveis por uma alta frequência de internações hospitalares, representando, desta forma, um custo sócio econômico muito elevado. No Brasil, em 2005, ocorreram 1.180.184 internações por doenças cardiovasculares, custando para os cofres públicos cerca de 1 bilhão de reais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2006).

As alterações observadas na hipertensão arterial decorrem, em parte, do aumento na contractilidade da camada muscular lisa que forma a parede da artéria e algumas substâncias químicas do próprio organismo é que promovem a contração das artérias. Em situações de desequilíbrio dessas substâncias, ou da alteração dessa

camada muscular ocorre o aumento da pressão do sangue dentro dos vasos (KAPLAN, 2001).

Existem dois tipos de modelos de hipertensão experimental, o modelo de hipertensão primária, que corresponde a alterações genéticas e outro modelo de hipertensão secundária, induzida por manipulações farmacológicas ou cirúrgicas (FREITAS, 2003).

Dentre os vários modelos de ratos geneticamente hipertensos, a linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), selecionada por Okamoto e Aoki (1963) a partir da espécie Wistar Kyoto, é sem dúvida a espécie mais estudada. Outro modelo de ratos geneticamente hipertensos são os ratos hipertensos de Lyon (LH) que apresentam origem da espécie Sprague Dawley e foram obtidos por cruzamento consanguíneo entre ratos apresentando diferentes níveis de pressão arterial (DUPONT et al., 1973).

É relatado que a hipertensão essencial humana é um complexo de doenças que resulta da interação de diversos genes com fatores ambientais (HARRAP et al., 1994) e os animais hipertensos de Lyon se enquadram neste modelo de hipertensão essencial, sendo caracterizado por níveis baixos de renina e elevada sensibilidade renal para angiotensina II (SASSARD; MING; KIAO-LING, 2003).

A linhagem LH apresenta um modelo de hipertensão moderada caracterizado por peso corporal elevado em comparação a linhagem de ratos normotensos de Lyon (LN) (SASSOLAS et al., 1981). Além disso, foi relatada a existência de alterações na função endotelial em aorta e artéria mesentérica (ramo de 2º e 3º ordem) de LH comparados a LN (FREITAS et al., 2003). Freitas (2003) relatou que os ratos LH apresentam uma maior reatividade a agonistas vasoconstritores, bem como uma sensibilização aumentada ao  $Ca^{2+}$ , provavelmente envolvendo uma expressão aumentada de Rho-kinase.

A terapia medicamentosa para hipertensão dispõe de diversas substâncias as quais incluem vários grupos de drogas tais como: os inibidores da enzima conversora da angiotensina (LUND-JOHANSEN; TOMHS, 1991; SCHIFFRIN et al., 1994), bloqueadores dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos (AALKJAER et al., 1987; SCHIFFRIN et al., 1994, KUROEDOV et al., 2004), diuréticos (AALKJAER et al., 1987; FREIS, 1983;

WELSH; FERRO et al., 2004), antagonistas dos receptores da angiotensina II (AZIZI, 2004), antagonistas dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos (BRUNNER et al., 1993; KARLBERG, 1993; INSEL, 1996) e os bloqueadores dos canais para  $Ca^{2+}$  (TOMHS, 1991; MROCZEK et al., 1991).

Apesar da diversidade terapêutica para o tratamento da hipertensão arterial, os percentuais de controle de pressão arterial são muito baixos. No Brasil, estudos apontam que apenas 20% a 40% dos hipertensos têm um controle efetivo da pressão arterial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2006).

Então, se faz necessário a busca de novas alternativas medicamentosas para o tratamento desta patologia que apresenta uma incidência relativamente alta na população. Aliado a este fato, substâncias originadas de produtos naturais tem sido uma importante fonte de obtenção de novos fármacos.

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

Muitas evidências apontam as plantas medicinais como a mais antiga e principal forma de medicação difundida no mundo. Até o último século, a maioria dos medicamentos foi derivado de plantas ou de fonte animal (MCNEILL; JURGENS, 2006). Desta forma, as plantas pelas suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, adquiriram fundamental importância na medicina popular. A flora brasileira é riquíssima em exemplares que são utilizados pela população para fins medicinais. Toda planta que é administrada de alguma forma e, por qualquer via ao homem ou animal exercendo sobre eles uma ação farmacológica qualquer, é denominada de planta medicinal (CRAVO, 1999). Além do mais, as plantas medicinais sempre foram objeto de estudo na tentativa de descobrir novas fontes de obtenção de princípios ativos.

O isolamento de substâncias de origem vegetal foi, e continua sendo uma importante fonte de obtenção de fármacos. Estima-se que cerca de vinte e cinco mil

espécies de plantas são usadas em todo o mundo para produção de medicamentos (LANDINI, 1997). Este interesse pelos vegetais tem justificativa econômica e mercadológica, pois as plantas, entre outros fatores, anulam a fase de síntese, já que elas próprias sintetizam os compostos que produzem, reduzindo assim os custos das pesquisas em novas drogas (GALVÃO, 1987).

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

Uma base mais racional para o uso de espécies vegetais como medicamentos foi lançada, quando estas espécies começaram a ser estudadas de forma sistemática, com o objetivo de extrair, isolar e identificar as substâncias cujas propriedades farmacológicas são em última análise, responsáveis pelas propriedades curativas atribuídas à planta como um todo. Esta metodologia serviu para fornecer o substrato científico para o uso das plantas medicinais na terapêutica, mas, além disso, serviu para enriquecer consideravelmente o arsenal terapêutico disponível, o qual ainda hoje se compõe de muitos produtos de origem natural, grande número deles desenvolvidos por método de síntese orgânica tendo como protótipo uma substância de ocorrência natural (ELIZABETSKY, 1986).

Dentre os vários constituintes das plantas, os óleos essenciais, essências vegetais ou óleos voláteis, são caracterizados como misturas de compostos orgânicos que apresentam como principais propriedades a volatilidade, aroma intenso, imiscibilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos (COSTA, 1975). O termo óleo essencial é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte quase sempre agradável, extraídos de plantas por alguns processos específicos, sendo mais freqüente a destilação por arraste em vapor d'água (CRAVEIRO *et al.*, 1981).

Durante investigações acerca da composição química dos óleos essenciais, descobriu-se hidrocarbonetos isoméricos de fórmula  $C_{10}H_{16}$  designados de terpenos (ALLINGER *et al.*, 1978), constatando-se uma grande diversidade destes constituintes relacionados com atividades farmacológicas das mais diversas (COSTA, 1975).

Os óleos essenciais apresentam-se constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos, fenil-propanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular (CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993). Os monoterpenos e sesquiterpenos dos óleos essenciais, que são formados por duas e três unidades isoprênicas respectivamente, são encontrados normalmente em sementes, frutos, cascas, folhas e flores de muitas espécies vegetais, e são considerados, em muitos casos, como responsáveis pelos odores de plantas aromáticas. Estas substâncias voláteis podem atuar como elementos atrativos de agentes polinizadores, como elementos tóxicos em algumas plantas ou ainda como substâncias que servem de defesa contra insetos, devido a repelência olfativa e toxicidade direta (CHAVEZ, 1991).

As plantas aromáticas e seus óleos essenciais vêm sendo muito utilizadas na medicina popular, sob a forma de infusatos, como sedativos, estomáquicos, antiespasmódicos, antidiarréicos (FREISE, 1935; ITOKAWA *et al.*, 1981; KIUCHI *et al.*, 1992; BEZERRA, 1994; COELHO-DE-SOUSA *et al.*, 1997 e 1998; MAGALHÃES *et al.*, 1998), antiparasitários, antimicrobianos, analgésicos, diuréticos e hipotensores (LUZ *et al.*, 1984; MENDONÇA, 1989; MENDONÇA *et al.*, 1991), antimaláricos (KLAYMAN, 1985), anti-hemorroidários (PRUDENT *et al.*, 1993), anti-sifilíticos (MENDONÇA, 1989) e no tratamento da rinite alérgica (BEZERRA, 1994).

Os óleos essenciais certamente constituem substâncias com atividades diversas, terapeuticamente e cientificamente comprovadas (SHUBINA *et al.*, 1990), fato que tem gerado vários estudos relacionados com as propriedades farmacológicas destes compostos.

Os constituintes voláteis, especialmente terpenos, tornaram-se importantes instrumentos na caracterização taxonômica de plantas de quase todos os grupos superiores. Os avanços em técnicas, como a cromatografia gasosa de alta resolução acoplada ao espectrômetro de massa, favoreceram a análise dos óleos essenciais que

compõe características ideais para estes propósitos sistemáticos (FLAKE; TURNER, 1973).

Os óleos essenciais, em geral são produtos do metabolismo secundário do vegetal produzidos como resultado das exigências impostas pelo meio ambiente. Fatores como solo, situações climáticas, umidade e luminosidade, entre outros, limitam ou maximizam o fenótipo para produção de um composto químico pela planta. Foi constatado que plantas cultivadas em solos secos e com baixos índices de nitrogênio, geralmente produzem maior quantidade de óleos essenciais, ao passo que aquelas cultivadas em condições de maior umidade e com bom suprimento de nitrogênio, apresentam uma maior produção de alcalóides (AMOROZO, 1989).

Em se tratando da composição química dos óleos essenciais, produzidos, por exemplo, pela *Mentha piperita* L., existe uma variação quanto a concentração de princípio ativo de mentol para mentofurano, em decorrência de uma incidência de luminosidade de 8 a 12 horas diária (GARNERO, 1985). Os agentes biológicos externos também interferem na composição do óleo essencial, ao exemplo do ácaro (*Eriophyes menthae*) que, quando parasita a *Mentha piperita* francesa, eleva consideravelmente sua composição de mentofurano (GARNERO, 1985). Portanto, para o estudo dos óleos essenciais e seus constituintes deve ser considerado desde o material botânico do qual se origina, até a obtenção do produto final e sua respectiva composição química.

Os óleos essenciais quimicamente constituem uma combinação de terpenos, sesquiterpenos, fenóis, aldeídos, álcoois, ácidos, ésteres, cetonas, nitrogênio e enxofre (LAVABRE, 1993). Devido à complexidade de sua composição química apresentam diversidades de ações farmacológicas para as quais tem crescido o interesse vislumbrando o desenvolvimento de novas drogas.

No Brasil, alguns trabalhos vêm sendo realizados com a utilização de óleos essenciais e seus constituintes:

Em músculo sartório de sapo, o eugenol promoveu contrações que podem ser provocadas pela liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático e secundariamente à presença de alguns cátions divalentes no espaço extracelular (LEAL-CARDOSO *et al.*, 1994). Um análogo do eugenol, o benzileugenol, bloqueou as contrações induzidas pelo eugenol através de uma ação específica (LEAL-CARDOSO *et al.*, 1988).

Estudos dos efeitos do óleo essencial de *Croton zehntneri* (OECz) e seus constituintes sobre músculos esqueléticos de sapo e rato, foram sugestivos de que estas substâncias poderiam ter dois sítios de ação sobre as fibras musculares: membrana pós-juncional, por bloqueio da transmissão neuromuscular, e sobre o retículo sarcoplasmático (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995). Coelho-de-Sousa e colaboradores (1997) mostraram que no músculo liso de íleo de cobaia o OECz e seu principal constituinte o estragol, apresentaram efeito antiespasmódico. Além disso, foi demonstrado que o OECz exerceu efeitos modulatórios diferenciados em outros tipos de musculaturas lisas.

Estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando o óleo essencial de *Croton nepetaefolius* (OECn) e seus constituintes cineol, metileugenol e terpineol mostraram que o OECn possui propriedade antiespasmódica intestinal (MAGALHÃES *et al.*, 1998).

Além disso, Guedes e colaboradores (2004) relataram a atividade hipotensora e vasorelaxante induzida pelo óleo essencial de *mentha x villosa* Hudson (OEMV) em ratos normotensos.

O nome do gênero *Mentha* deriva do nome grego Mintha, filha de Cocylus que segundo os poetas, foi transformada nesta planta. O gênero *Mentha* L. é originário da região mediterrânea e parte da Ásia, estando atualmente distribuída em quase todo mundo especialmente nas regiões temperadas (HARLEY, 1973).

A planta *Mentha x villosa* Hudson, geralmente relatada na literatura como *M. crispata* ou *M. rotundifolia*, pertence à família Lamiaceae sendo conhecida popularmente como hortelã-da-folha-miúda, hortelã-rasteira e hortelã-de-panela (MATOS, 1991; MATOS, 1994). A identificação feita pelo Dr. R. Harley, do Royal Botanic Garden, Kew (U. k), demonstrou que a *Mentha x villosa* Hudson trata-se de um híbrido da *Mentha spicata* e *Mentha suaveolens*. No entanto, anteriormente a mesma havia sido classificada equivocadamente de *Mentha aff. Crispa*. As variedades, linhagens e híbridos das espécies de *Mentha* oferecem perspectivas bem interessantes no âmbito da pesquisa biológica e fitoquímica. Possuindo estas espécies uma ampla plasticidade morfológica, rica variedades de genótipos, bem como variadas reações a fatores climáticos e edáficos (Alencastro *et al.*, 1965a).

*Mentha x villosa* Hudson (Figura 4), é uma planta herbácea, rasteira, com raiz fibrosa, caule avermelhado, ereto, ramoso, com folhas aromáticas opostas variando de 2-5 cm de tamanho, o limbo é ovado-lanceolado com borda serrilhada e superfície rugosa e glabra, apresenta pecíolo de 2-3 mm e não são observadas inflorescências (MATOS, 1994).

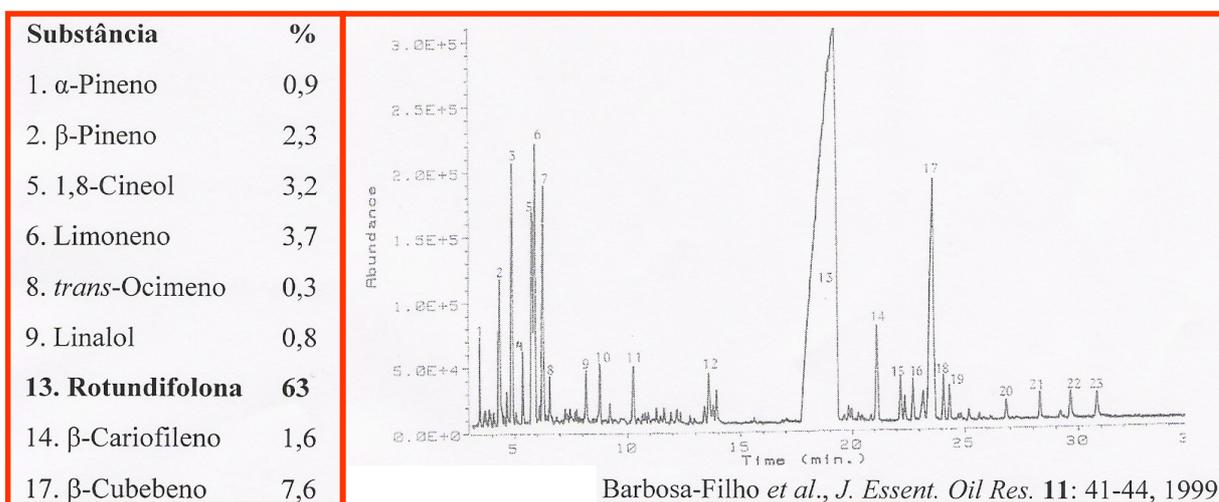


**Figura 4:** *Mentha x villosa* Hudson

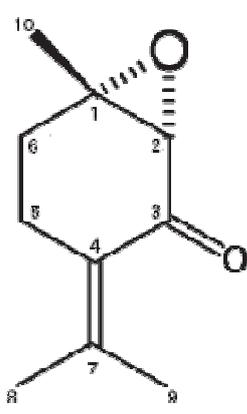
Do ponto de vista químico, foram isolados: glicosídeo, sitosterol, ácido ursólico e um flavonóide do extrato hexânico e etanólico da *Mentha x villosa* Hudson (MONTE et al., 1988). Do extrato butanólico de *Mentha x villosa* Hudson foram isolados ácido rosmarínico, luteolina, duas flavonas e uma flavanona glicosilada (BARBOSA FILHO et al., 1992).

Do óleo essencial obtido das folhas de *Mentha x villosa* Hudson (OEMV) foram detectados 23 constituintes químicos, dentre os quais temos: limoneno,  $\beta$ -cariofileno,  $\gamma$ -muroleno (CRAVEIRO et al., 1990),  $\beta$ -cubebeno, 1,8-cineol,  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, linalol, trans-ocimeno, cis-cariofileno,  $\beta$ -farneseno,  $\gamma$ -elemeno, e um composto principal (63,47%) que é o óxido de piperitenona, também denominado de rotundifolona (figura 5, quadro 2) (HIRUMA, 1992, BARBOSA-FILHO et al., 1999). Rotundifolona trata-se de uma cetona monoterpênica de peso molecular igual a 166,219 g (BUCKINGHAM, 1994). Nas diversas espécies de *Mentha*, a percentagem de rotundifolona varia entre 11 a 81% (HARLEY & REYNOLDS, 1992). Rotundifolona foi identificada pela primeira vez nas folhas da *Mentha rotundifolia* por Shimizu (1956), cujo óleo essencial obtido desta

planta continha uma concentração de 87,3% de rotundifolona em sua composição (HANDA *et al.*, 1964).

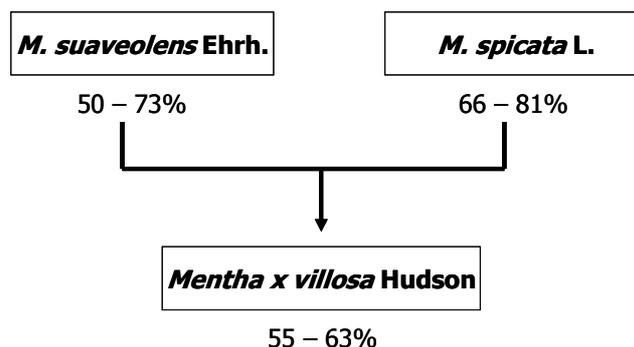


**Figura 5:** Cromatograma do óleo essencial isolado das partes aéreas da *Mentha x villosa* Hudson (Fonte: BARBOSA-FILHO *et al.*, 1999).

ASPECTOS QUÍMICOS:	
- <b>Nome:</b>	Rotundifolona ou óxido de piperitenona
- <b>Classe de metabólico secundário:</b>	Cetona monoterpênica
- <b>Fórmula Molecular:</b>	$C_{10}H_{15}O_2$
- <b>Estrutura Molecular:</b>	
- <b>Peso Molecular:</b>	166,2
- <b>Aspecto:</b>	líquido viscoso de coloração amarela
- <b>Solubilidade:</b>	Hexano

**Quadro 2:** Aspectos químicos que caracterizam a rotundifolona

A literatura demonstra que as espécies *Mentha spicata* L. e a *Mentha suaveolens* Ehrh, também apresentam um elevado teor de rotundifolona (LAWRENCE, 1992; MISRA *et al.*, 1989) (Figura 5). Portanto, são evidentes as informações obtidas sobre composições químicas dos óleos essenciais das diferentes espécies de *Mentha* existentes, especificamente quanto ao teor de rotundifolona, foram fundamentais à elucidação e confirmação sistemática da *Mentha x villosa* Hudson, um híbrido originário do cruzamento da *Mentha spicata* L. e a *Mentha suaveolens* Ehrh.



**Figura 6:** Organograma das espécies vegetais que originaram a *Mentha x villosa* Hudson, em relação às percentagens do seu constituinte químico majoritário (rotundifolona), isolado dos respectivos óleos essenciais (Fonte: LAWRENCE, 1992; MISRA et al., 1989; HIRUMA, 1992; BARBOSA-FILHO et al., 1999).

Muitas são as espécies de *Mentha* que são utilizadas na medicina popular de todo o mundo. O óleo essencial de *Mentha x piperita* (OEMp), cujo principal constituinte é o mentol, é de vasta utilização. O OEMp foi estudado farmacologicamente e demonstrou um efeito espasmolítico em músculo liso intestinal, cujo mecanismo de ação parece ser predominantemente devido ao bloqueio dos canais para  $Ca^{2+}$  presentes na membrana citoplasmática (HILLS & ARONSO, 1991).

No Nordeste Brasileiro, a *Mentha x villosa* Hudson é amplamente usada na medicina popular e na indústria fitoterápica. As folhas de *Mentha x villosa* Hudson são usadas na culinária como condimento. Na medicina popular são utilizadas como estomáquico, ansiolítico, contra cólicas menstruais e diarréias (MATOS, 1994). São também utilizadas no tratamento de afecções parasitárias como a amebíase, giardíase e tricomoníase (BORBA et al., 1990a e b; BORBA & MELO, 1988; BORBA et al., 1991).

Alguns estudos farmacológicos têm sido realizados com propósito de se tentar confirmar as ações terapêuticas relatadas pelo uso popular referente à *Mentha x villosa* Hudson, bem como acrescentar informações acerca desta planta e seus principais componentes. E neste sentido, tanto o OEMV quanto a rotundifolona vêm sendo avaliados farmacologicamente em diferentes trabalhos.

As propriedades antiparasitárias da *Mentha x villosa* Hudson foram investigadas por BORBA e colaboradores (1988), em cultura de *Entamoeba histolytica*, cepa SAW

1627, que obtiveram resultados significativos com frações do extrato bruto de suas folhas. Em estudos clínicos, o extrato hidroetanólico das folhas de *Mentha x villosa* Hudson apresentou comprovada atividade amebicida e giardicida. Em testes com 93 pacientes portadores de *Entamoeba histolytica* e 29 pacientes portadores de *Giardia lamblia*, foi obtida cura de 91% do primeiro grupo e 68% do segundo grupo (SANTANA *et al.*, 1992). Também foi observado uma efetividade no tratamento de tricomoníase urogenital (MELO *et al.*, 1992). Resultados pré-clínicos obtidos por Borba e colaboradores (1989a; 1989b) demonstraram que o extrato bruto da *Mentha x villosa* Hudson também possui efetividade no tratamento da esquistossomose mansônica. Além disso, Barbosa e colaboradores (1991) constataram uma atividade antibacteriana do OEMV, em testes com *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* e *Aspergillus parasiticus*.

Hiruma (1992) em uma avaliação da toxicidade aguda do OEMV e Rotundifolona em camundongos e ratos, obteve os seguintes valores de DL<sub>50</sub>: para OEMV os valores obtidos respectivamente para camundongos e ratos foram de 472 (387-557) mg.Kg<sup>-1</sup>, i.p., e 410 (355-465) mg.Kg<sup>-1</sup>, i.p. Neste estudo a rotundifolona foi testada até a dose de 500 mg.Kg<sup>-1</sup>, i.p. e não foram constatados efeitos letais durante 48 horas de observação. Por outro lado, Sousa (1999) realizou um estudo da toxicidade aguda em camundongos e sub-aguda em ratos para o OEMV e para rotundifolona, onde obtiveram valores de DL<sub>50</sub> iguais a 550 ± 49 para OEMV e 400 ± 49 mg.Kg<sup>-1</sup>, i.p., para rotundifolona, respectivamente. Além disso, foi detectado neste estudo, que a administração de OEMV (400 mg.Kg<sup>-1</sup>) ou rotundifolona (355 mg.Kg<sup>-1</sup>) através da veia caudal dos camundongos, induziu morte em 50% dos animais nas primeiras 24 horas. Contudo, no que se refere ao estudo da toxicidade sub-aguda feito em ratos, tanto OEMV quanto a rotundifolona apresentaram uma baixa toxicidade, sem alterar significativamente os parâmetros hematológicos e bioquímicos destes animais.

Almeida e colaboradores (1996) mostraram que OEMV e rotundifolona promoveram uma atividade analgésica em camundongos e ratos, cujo mecanismo de ação estaria relacionado com o sistema opióide. Entretanto, Sousa (1999) sugeriu que esta atividade analgésica dar-se-ia de maneira indireta, estando preferencialmente relacionada com um efeito antiinflamatório por parte destas substâncias.

Fogaça e colaboradores (1997) ao estudarem os efeitos do OEMV sobre o músculo esquelético de sapo, sugeriram que em uma faixa de 1-6 mg.mL<sup>-1</sup> o OEMV induziu contração através da liberação de Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático, ao passo que concentrações menores 1-10 µg.mL<sup>-1</sup> bloquearam as respostas induzidas pelo K<sup>+</sup> e potencializaram aquelas induzidas pela cafeína.

Sousa e colaboradores (1997) observaram que rotundifolona promoveu um efeito relaxante em íleo de cobaia, e esse efeito, pelo menos em parte, parece ser mediado por interferência na mobilização do Ca<sup>2+</sup> intracelular.

Sousa (1999), relatou que OEMV e rotundifolona promoveram efeito hipotensor e bradicárdico em ratos anestesiados com uretana, sem alteração significativa na frequência respiratória e em índices como pH, hematócrito e gasometria. Lahlou e colaboradores (2001) em estudo com ratos anestesiados com pentobarbital, também evidenciaram um efeito hipotensor e bradicárdico promovidos por OEMV e rotundifolona, os quais não foram atenuados pela vagotomia bilateral ou pelo pré-tratamento com metil-atropina.

Além disso, Sousa (1999) observou que rotundifolona foi capaz de inibir as contrações induzidas por K<sup>+</sup> (60 mM) em um estudo realizado com leito mesentérico de rato perfundido. Este trabalho mostrou também, que em aorta isolada de cobaia, tanto o OEMV quanto o monoterpene inibiram as contrações promovidas por K<sup>+</sup> (60 mM) e PDB (dibutirato de forbol) em meio livre de Ca<sup>2+</sup>.

Em estudos realizados em nosso laboratório Guedes e colaboradores (2002; 2004) observaram que rotundifolona, em estudos *in vivo*, promoveu efeito hipotensor e bradicárdico em ratos normotensos e em ratos com hipertensão induzida (animais com hipertensão secundária). Em estudos *in vitro* rotundifolona promoveu efeito vasorelaxante em aorta de rato, de maneira dependente e independente do endotélio vascular. A via dependente do endotélio envolveu participação da via muscarínica e dos EDRF, principalmente NO e prostaglandinas. Já a via independente do endotélio, envolveu uma inibição do influxo de Ca<sup>2+</sup>, através dos Ca<sub>v</sub> e de uma interferência na mobilização de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares sensíveis ao IP<sub>3</sub>.

Desse modo, fundamentamos a nossa proposta de trabalho, com base nos estudos até o momento realizados concernentes as atividades farmacológicas da

*Mentha x villosa* Hudson e seus constituintes, tendo em vista que a literatura disponível, não aborda trabalhos efetivamente direcionados ao entendimento dos mecanismos moleculares utilizados pelo constituinte majoritário desta espécie, rotundifolona, nos efeitos atribuídos a ela sobre o sistema cardiovascular.

*Objetivos*

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral :

O presente estudo objetivou avaliar o mecanismo de ação molecular envolvido nos efeitos cardiovasculares induzidos por rotundifolona, substância isolada do óleo essencial das partes aéreas da *Mentha x villosa* Hudson, em animais normotensos e hipertensos, utilizando para este fim uma abordagem *in vivo* e *in vitro*.

### 2.2 Específicos

- Caracterizar o efeito vasodilatador de rotundifolona em artéria mesentérica superior isolada de rato através de medidas de tensão isométrica;
- Avaliar a participação dos canais para  $K^+$  e dos canais para  $Ca^{2+}$  nos efeitos induzidos por rotundifolona;
- Investigar as influências de rotundifolona nas correntes de  $K^+$  e nas correntes de  $Ca^{2+}$  em miócitos recém dispersos de artéria mesentérica de rato, utilizando técnica de fixação de voltagem;
- Investigar as influências de rotundifolona nos transientes de  $Ca^{2+}$  intracelular em miócitos recém dispersos de artéria mesentérica, utilizando microscopia confocal;
- Avaliar a ação de rotundifolona nos canais TRP;
- Investigar os efeitos induzidos por rotundifolona sobre a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), bem como suas ações em artéria mesentérica superior isolada de ratos espontaneamente hipertensos.

*Material*

---

### 3. MATERIAL

#### 3.1. Animais

Foram utilizados para todos os experimentos ratos machos Sprague Dawley (Figura 6), bem como ratos machos geneticamente hipertensos de Lyon (Lyon Hypertensive rats – LH) e seus respectivos controles (Lyon normotensive rats – LN), também da mesma linhagem, com idade entre 10-14 semanas, pesando entre 260-300 gramas, os quais foram provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes Medeiros da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 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 7:** Ratos Sprague Dawley (fonte: [www.scanbur.eu/images/products/Lab\\_animals\\_sp](http://www.scanbur.eu/images/products/Lab_animals_sp), 25/12/2007)

### **3.2. Drogas utilizadas**

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas: tiopental sódico (Cristália), sal sódico de heparina (Roche), S(-)-Bay K 8644 (RBI/Sigma), nicardipina (Sigma), nitroprussiato de sódio (Sigma), cloridrato de L (-) fenilefrina (Sigma), cloridrato de acetilcolina (Sigma), EGTA (Sigma), albumina sérica bovina (Sigma), capsazepine (Sigma), apamina, (RBI), caribdotoxina (sigma), 4-aminopiridina(Sigma), ácido ciclopiazônico (Sigma), 1,2-bis(2-aminofenox)-etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético (Bapta-AM), fluo 4-AM (invitrogen), colagenase tipo II (worthington biochemical corporation), hialuronidase tipo II (Sigma), quimopapaína (Sigma), DL-ditiotreitól (Sigma), triton (Sigma), paraformaldeído (Sigma), soro de cabra (Invitrogen), anticorpo monoclonal anti alfa-actina de camundongo (Sigma), anticorpo secundário Anti-camundongo Alexa flúor 568 (sigma). Para a preparação das soluções estoques o S(-)-Bay K 8644 foi dissolvido em etanol absoluto e diluído em água destilada, de modo a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental. O fluo 4-AM, nicardipina, ácido ciclopiazônico e capsazepina foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). As demais drogas foram dissolvidas em água destilada.

### **3.3. Isolamento, identificação e preparação das soluções de Rotundifolona**

Este trabalho foi desenvolvido, utilizando-se as folhas frescas da espécie *Mentha x villosa* Hudson, da família Lamiaceae, coletadas no horto de plantas medicinais do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB), durante o período de março a janeiro dos anos de 2005 a 2007. O material vegetal utilizado era idêntico ao previamente identificado pelo Dr. Raymond Harley do Royal Botanic Gardens, Kew (Inglaterra), e uma exsicata encontra-se depositada no herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob o nº 27.286.

Os processos de isolamento e identificação de rotundifolona, o objeto do nosso estudo, foram realizados conforme descrito por Hiruma, 1992 e Guedes et al., 2002.

Brevemente, o óleo essencial obtido das folhas da *Mentha x villosa* Hudson (OEMV) foi submetido a uma Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), utilizando-se como eluente o hexano P.A. (Vetec-Química Fina S.A). As placas cromatográficas foram reveladas através de lâmpada ultravioleta  $\lambda$  254 nm (Modelo UV LS-25), que mostravam a presença de um constituinte majoritário, a rotundifolona, a qual se apresentava como uma extensa faixa logo acima do ponto de aplicação do OEMV. A Rotundifolona foi então removida das placas cromatográficas e posteriormente recuperada da sílica gel por extração em clorofórmio P.A. (Vetec-Química Fina S.A). Numa última etapa, a Rotundifolona (quadro 1) tinha suas propriedades físicas e espectrais comparadas com as de amostras-padrões disponíveis no Laboratório de Química do LTF/UFPB.

Para preparação das soluções estoques de rotundifolona, a mesma foi solubilizada em cremofor (50 $\mu$ L por mL de solução) e diluída em água destilada (experimentos *in vitro*) ou em NaCl 0,9% (experimentos *in vivo*) de modo a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental. As concentrações de cremofor em solução nunca excederam 0.01% e foram previamente testadas, apresentando ausência de efeito farmacológico.

### 3.4 Soluções Fisiológicas

Para a preparação das soluções fisiológicas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl) (MERCK), cloreto de potássio (KCl) (MERCK), cloreto de cálcio di-hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (MERCK), sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (MERCK), cloreto de magnésio hexa-hidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (MERCK), glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) (MERCK), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) (VETEC), fosfato de sódio mono-hidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (VETEC) e fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (VETEC), cloreto de céσιο (CsCl), cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2$ ), HEPES (USB corporation), EGTA (Sigma).

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

**A) Soluções fisiológicas para anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato****Tabela 1:** Composição da solução de Tyrode (pH=7,4)

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

Fonte: TANAKA et al., 1999.

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

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

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

**Tabela 3:** Composição da solução de Tyrode despolarizante com KCl à 20mM (pH=7,4)

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

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

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

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

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

**Tabela 5:** Composição da solução de Tyrode despolarizante com KCl à 80mM (pH=7,4)

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

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

**B) Soluções fisiológicas para dissociação das células da artéria mesentérica superior isolada de rato**

**Tabela 6:** Composição da solução salina fisiológica (SSF) para dissociação das células de artéria mesentérica (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	137
KCl	5,6
CaCl <sub>2</sub>	2,6
MgCl <sub>2</sub>	1,0
NaHCO <sub>3</sub>	4,17
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,44
Glicose	5,0
HEPES	10

Fonte: XU et al., 1999.

**Tabela 7:** Composição da SSF com baixa concentração de cálcio para dissociação das células de artéria mesentérica (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	137
KCl	5,6
CaCl <sub>2</sub>	0,05
MgCl <sub>2</sub>	3,55
NaHCO <sub>3</sub>	4,17
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,44
Glicose	5,0
HEPES	10

Fonte: Adaptado de XU et al., 1999.

### C) Soluções fisiológicas para os experimentos em eletrofisiologia

**Tabela 8:** Composição da solução interna/pipeta utilizada para medir as correntes de Ba<sup>2+</sup> (pH=7,2)

Substância	Concentração (mM)
CsCl	130
MgCl <sub>2</sub>	4,0
EGTA	10,0
TEA	10,0
HEPES	10

Fonte: CRUZ; MATSUDA; 1994.

**Tabela 9:** Composição da solução externa utilizada para medir as correntes de  $Ba^{2+}$  (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
BaCl <sub>2</sub>	10
NaCl	126,0
CsCl	5,4
Glicose	10,0
HEPES	10

Fonte: CRUZ; MATSUDA; 1994.

**Tabela 10:** Composição da solução de Hanks utilizada como solução externa para medir correntes de  $K^+$  (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	145
KCl	5,0
CaCl <sub>2</sub>	1,6
MgCl <sub>2</sub>	1,0
HEPES	5,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
Glicose	10,0

Fonte: SGUILLA et al., 2003.

**Tabela 11:** Composição da solução de pipeta utilizada como solução interna para medir correntes de  $K^+$  (pH=7,2)

Substância	Concentração (mM)
KCl	140,0
EGTA	10
MgCl <sub>2</sub>	1,0
HEPES	10
Glicose	5

Fonte: CAI et al., 2007.

#### D) Soluções fisiológicas para os experimentos em microscopia confocal

**Tabela 12:** Composição da solução de perfusão para os experimentos de microscopia confocal (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	137
KCl	5,6
CaCl <sub>2</sub>	2,0
MgCl <sub>2</sub>	3,55
NaHCO <sub>3</sub>	4,17
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,44
Glicose	5,0
HEPES	10

Fonte : LEITE et al., 2003.

*Métodos*

---

## 4. MÉTODOS

### Ensaio Farmacológicos

Foram utilizadas duas diferentes formas de abordagem, uma com ensaios farmacológicos *in vivo*, utilizando animais normotensos e hipertensos de Lyon, e outra *in vitro*, utilizando órgãos isolados e miócito da artéria mesentérica superior de rato SD ou LN e LH. Todos os animais foram sacrificados, seguindo as normas de cuidados com animais, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB, parecer nº 0307/06.

#### 4.1. Estudos *In Vitro*

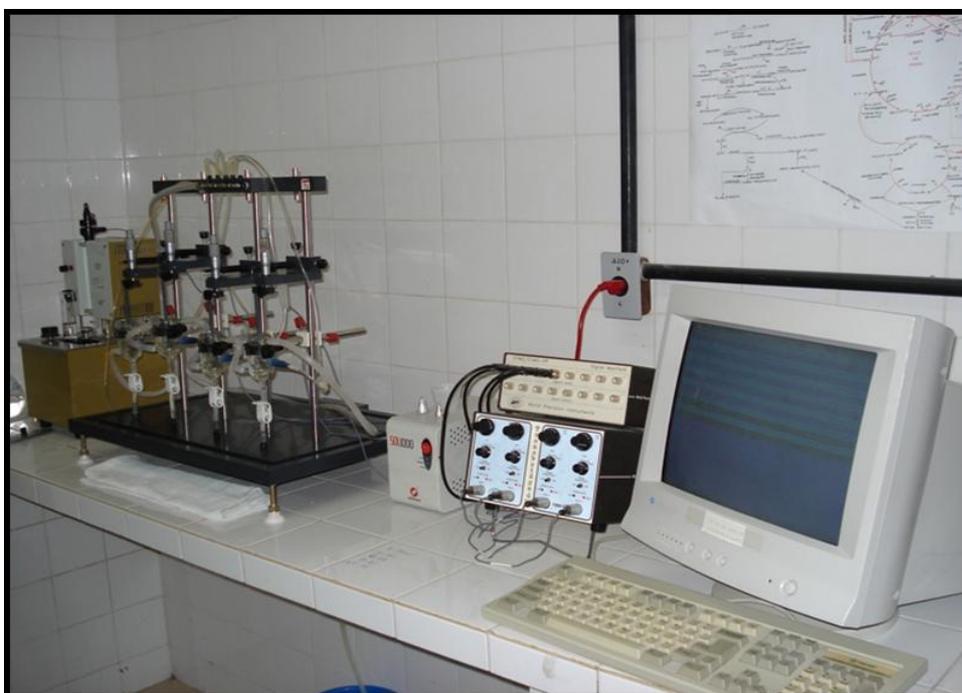
##### 4.1.1. Preparações com artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio funcional

Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical seguida por secção dos vasos cervicais. Através de uma incisão no abdome do animal, retirou-se a artéria mesentérica superior. Anéis do primeiro segmento da artéria (1 - 2 mm) foram obtidos livres de tecido conectivo e adiposo. Os anéis foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode, a 36,9° C e gaseificada com uma mistura de 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub> (carbogênio). Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA) para o registro das tensões isométricas (figura 7). Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de 60 minutos de estabilização. Durante este tempo, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 min. para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA e ALTURA, 1970).

Duas contrações tônicas submáximas a Felinefrina (FEN) 10µM, as quais se estabilizam em torno de 25 minutos, foram registradas. Uma terceira resposta foi obtida e rotundifolona ( $10^{-7}$  a  $3 \times 10^{-3}$ M) foi adicionado cumulativamente à cuba. Os resultados foram expressos levando em consideração que a contração induzida por FEN corresponde a 100 % e que a tensão de repouso é igual a 0 %.

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

A presença de endotélio funcional foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de 10  $\mu\text{M}$  de acetilcolina (Ach). Foram considerados com endotélio, os anéis com relaxamento superior a 80 % sobre a pré-contração com fenilefrina. Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10 %, foram considerados sem endotélio. Anéis com relaxamentos entre 10 e 80 % foram desprezados dos protocolos experimentais.



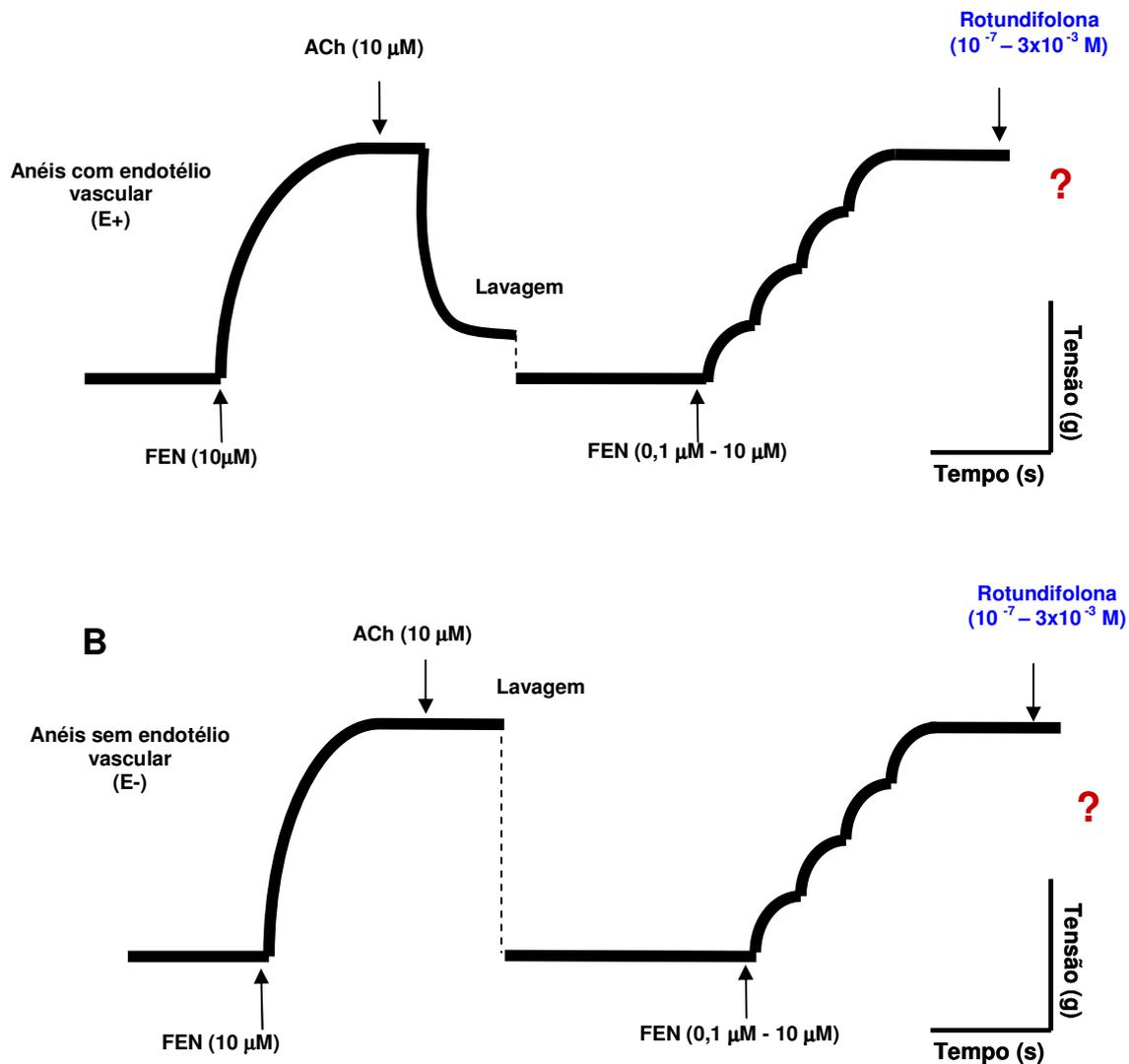
**Figura 8:** Aparato utilizado para os experimentos com anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato

#### **4.1.2. Protocolos Experimentais utilizando artéria mesentérica superior isolado de rato**

##### **4.1.2.1. Efeito de rotundifolona em anéis da artéria mesentérica superior isolada de ratos LN e LH, pré-contraídos com FEN (0,1 $\mu\text{M}$ - 10 $\mu\text{M}$ )**

Após um período de 60 minutos de estabilização das preparações, concentrações crescentes de rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M), foram adicionadas

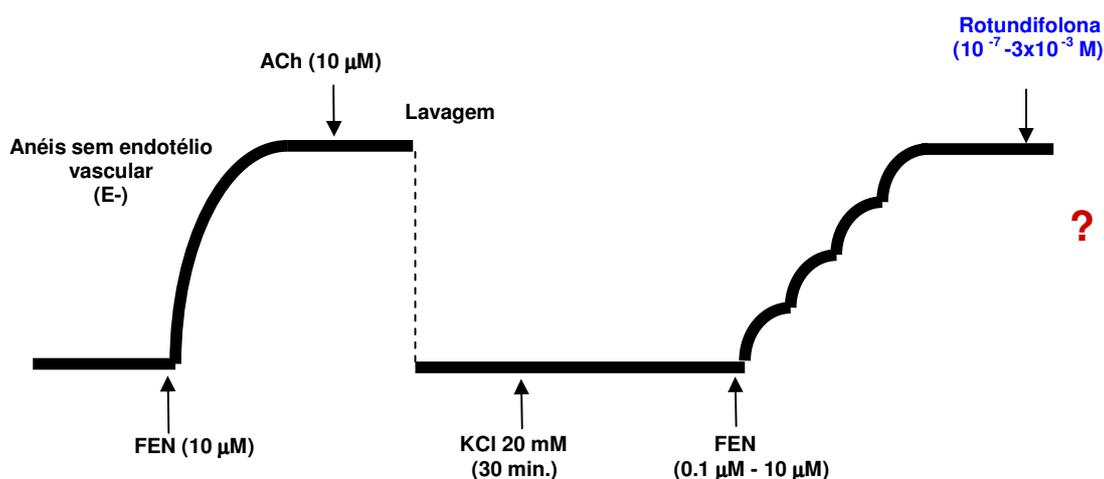
cumulativamente aos anéis pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu\text{M}$  - 10  $\mu\text{M}$ ) tanto para animais normotensos como em animais hipertensos (Figura 8). O efeito vasorelaxante de rotundifolona foi avaliado em anéis com o endotélio funcional intacto e anéis com o endotélio funcionalmente removido, em ambas as preparações a concentração de FEN (0,1  $\mu\text{M}$  - 10  $\mu\text{M}$ ) foi ajustada para obtenção de contrações de magnitude semelhante. Após a obtenção das curvas concentração-resposta, foram analisados os valores de  $\text{pD}_2$  ( $-\log \text{CE}_{50}$ ) e  $E_{\text{max}}$  (efeito máximo) das curvas individuais na presença e na ausência do endotélio funcional (para detalhes, ver tópico referente a análise estatística).



**Figura 9:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de rotundifolona ( $10^{-7} - 3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN e LH, pré-contraídos com FEN (0,1 μM - 10 μM). **(A)** Anéis com endotélio funcionalmente intacto. **(B)** Anéis com o endotélio removido

#### 4.1.2.2. Avaliação da participação de canais para $K^+$ na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN e LH

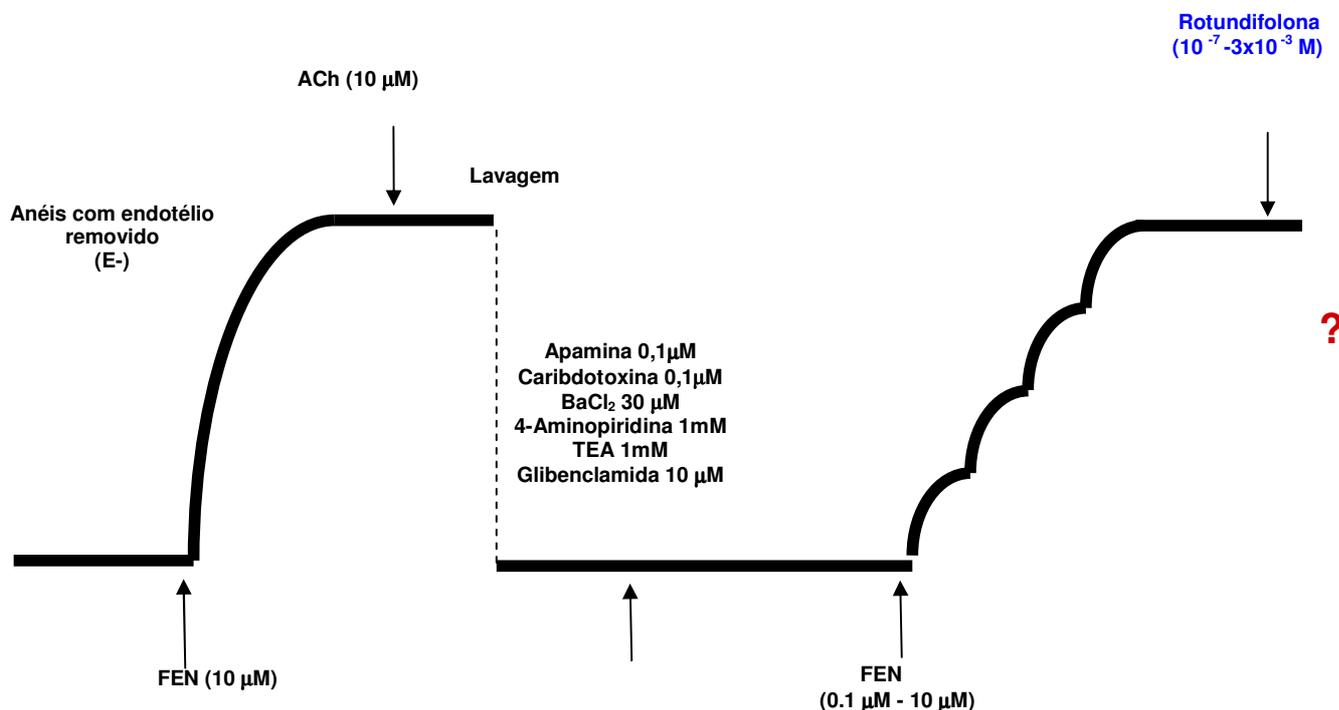
Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, a solução de Tyrode (Tabela 1) das cubas foi trocada pela solução despolarizante de Tyrode com KCl 20 mM (KCl 20) (Tabela 3) e as preparações permaneceram nesta solução até o final do experimento. Este procedimento impede parcialmente o efluxo de  $K^+$  e atenua relaxamentos mediados por abertura de canais para  $K^+$  (CLARK; FUCHS, 1997; CAMPBELL; HARDER, 1999). Decorridos 30 minutos da incubação da solução de KCl 20 mM, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (0,1  $\mu$ M - 10  $\mu$ M) e, em seguida, uma curva concentração-resposta para rotundifolona foi obtida. Os valores  $pD_2$  e  $E_{max}$  foram obtidos e comparados na presença (controle) ou na ausência de KCl 20 mM (Figura 9).



**Figura 10:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de canais para  $K^+$  na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN e LH, sem endotélio funcional.

#### **4.1.2.3. Influência de bloqueadores para diferentes canais para K<sup>+</sup> na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em animais LN**

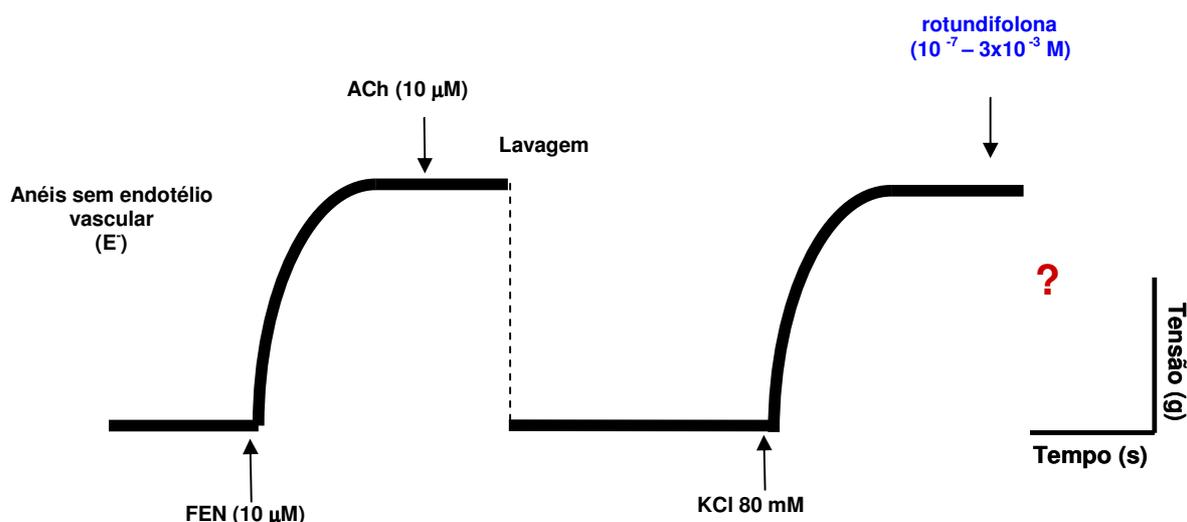
Neste protocolo desejou-se avaliar a real participação dos diferentes tipos de canais para K<sup>+</sup> na resposta vasodilatadora induzida por rotundifolona. Neste intuito, após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, foram administradas, em preparações diferentes TEA (3 mM), nesta concentração é um bloqueador não seletivo dos canais para K<sup>+</sup> (WANG et al, 2007), TEA (1 mM), bloqueador dos canais para K<sup>+</sup> sensíveis ao Ca<sup>2+</sup> de larga condutância - BK<sub>Ca</sub> (COX, 2001), caribdotoxina (0,1µM), um bloqueador BK<sub>Ca</sub> e bloqueador dos canais para K<sup>+</sup> sensíveis ao Ca<sup>2+</sup> de intermediária condutância - IK<sub>Ca</sub>, apamina (0,1µM), bloqueador dos canais para K<sup>+</sup> sensíveis ao Ca<sup>2+</sup> de pequena condutância - SK<sub>Ca</sub> (GHISDAL; MOREL, 2001), glibenclamida (10µM), um bloqueador dos canais para K<sup>+</sup> sensíveis a ATP (WANG et al, 2007), 4-aminopiridina (1mM), bloqueador dos canais para K<sup>+</sup> retificador retardado (GHISDAL; MOREL, 2001) e BaCl<sub>2</sub> (30µM) , bloqueador dos canais para K<sup>+</sup> retificador de entrada (EDWARDS et al, 1998; KAWABATA et al., 2004), permanecendo com os mesmos até o final do experimento. Decorridos 30 minutos da incubação com os bloqueadores, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (0,1 µM - 10 µM) e, em seguida, uma curva concentração-resposta para rotundifolona foi obtida. Os valores pD<sub>2</sub> e E<sub>max</sub> foram obtidos e comparados na situação controle e na presença de cada bloqueador dos canais para K<sup>+</sup> (Figura 11).



**Figura 11:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de diferentes canais para  $K^+$  na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional.

#### 4.1.2.4. Avaliação do efeito de rotundifolona em anéis mesentéricos pré-contráídos com solução despolarizante de alto $K^+$

Este protocolo foi desenvolvido para avaliar o efeito de rotundifolona em anéis mesentéricos pré-contráídos com um agente contracturante diferente, cujo mecanismo de ação difere do induzido por fenilefrina para gerar aumento de tensão. Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) foi adicionada cumulativamente aos anéis pré-contráídos com KCl (80 mM) isolados de ratos LN e LH (Tabela 5). A percentagem de relaxamento induzida por rotundifolona foi calculada pela comparação da resposta antes e após a adição do monoterpene. Os valores de  $pD_2$  e  $E_{max}$  também foram obtidos como foi descrito anteriormente. (Figura 12).



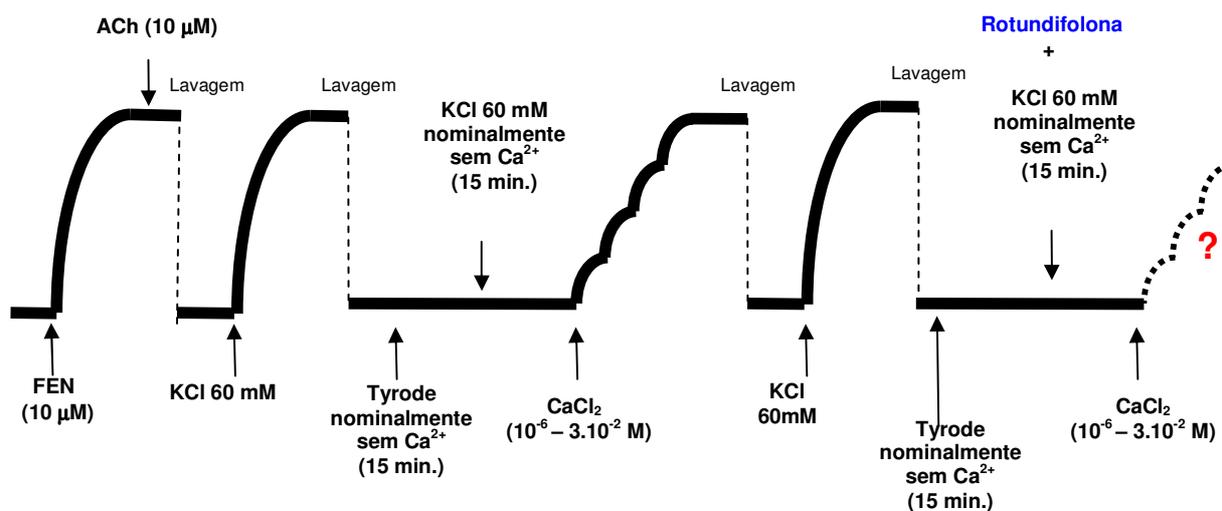
**Figura 12:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da rotundifolona ( $10^{-7} - 3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN e LH sem endotélio funcional, pré-contraindidos com solução despolarizante (KCl 80 mM).

#### 4.1.2.5. Avaliação do efeito de rotundifolona sobre as contrações induzidas por $\text{CaCl}_2$

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

O processo foi novamente repetido, sendo que uma concentração isolada de rotundifolona (100 μM, 300 μM, 1 mM ou 3 mM) foi incubada as preparações juntamente com a solução despolarizante de KCl 60 mM, nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  e

uma nova curva concentração resposta ao  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-6} - 3 \times 10^{-2}$  M) foi obtida. O efeito de rotundifolona sobre as contrações induzidas por  $\text{CaCl}_2$  foi avaliado comparando-se as curvas de  $\text{CaCl}_2$  na ausência (controle) e na presença do monoterpeno (Figura 13).

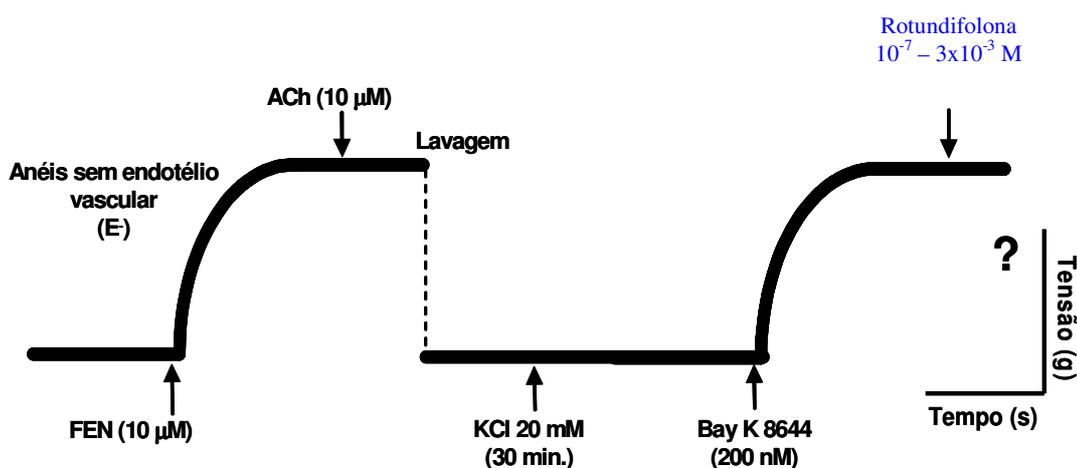


**Figura 13:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de rotundifolona sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-6} - 3 \times 10^{-2}$  M) em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 4.1.2.6. Avaliação do efeito de rotundifolona sobre as contrações induzidas por S(-)- Bay K 8644, um ativador dos canais para cálcio sensíveis a voltagem do tipo-L ( $\text{Ca}_v$ -tipoL)

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

Após a verificação da ausência de endotélio, as preparações foram expostas a uma solução despolarizante de KCl 20 mM durante 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado o S(-)-Bay K 8644 (200 nM) e após a contração sustentada ter sido alcançada, concentrações crescentes de rotundifolona ( $10^{-7} - 3 \times 10^{-3}$  M) foram adicionadas à cuba de maneira cumulativa (Figura 14).

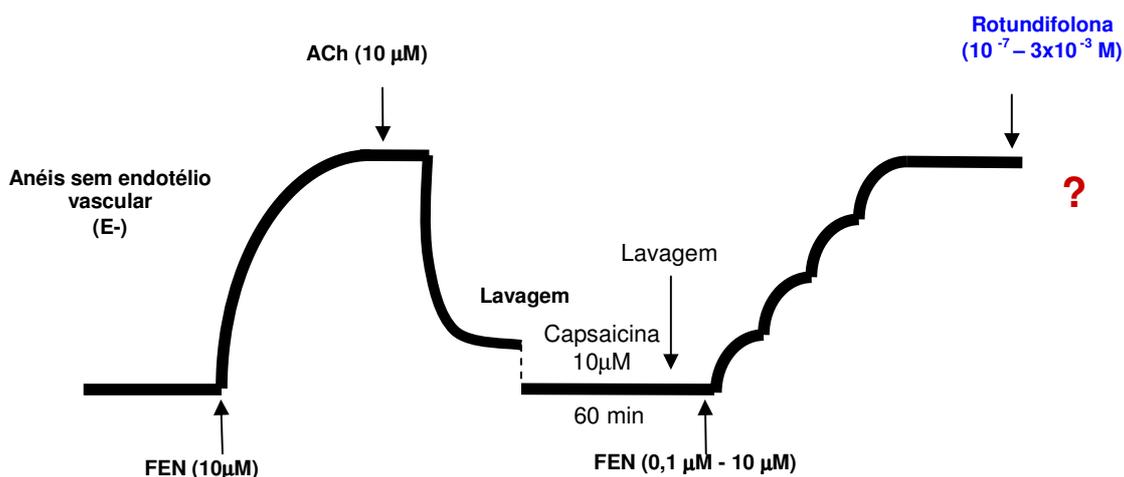


**Figura 14:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da rotundifolona ( $10^{-7} - 3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN e LH, sem o endotélio funcional, pré-contráidos com S(-)-Bay K 8644 (200 nM).

#### 4.1.2.7. Investigação da participação dos receptores potencial-transiente de vaniloide (TRPV) e peptídeo relacionado ao gen da calcitonina (CGRP) na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona

Para avaliarmos a importância dos TRPV e CGRP no efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona, utilizamos anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, desensibilizados pelo pré-tratamento com capsaicina  $10 \mu\text{M}$  (DANNERT et al., 2007). Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, os anéis mesentéricos de ratos LN foram pré-tratados, por um período de 60 min, com capsaicina  $10 \mu\text{M}$  para desensibilizar os TRPV. Em seguida, os anéis foram lavados com solução de Tyrode (tabela 1) e depois de estabilizados, uma nova contração tônica com FEN ( $0,1 \mu\text{M} - 10 \mu\text{M}$ ) foi obtida. Posteriormente, rotundifolona

( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) foi adicionada cumulativamente aos anéis pré-contraídos e obteve-se uma curva concentração-resposta. Os valores  $pD_2$  e  $E_{max}$  foram obtidos e comparados na situação controle e após exposição a capsaicina (Figura 15).

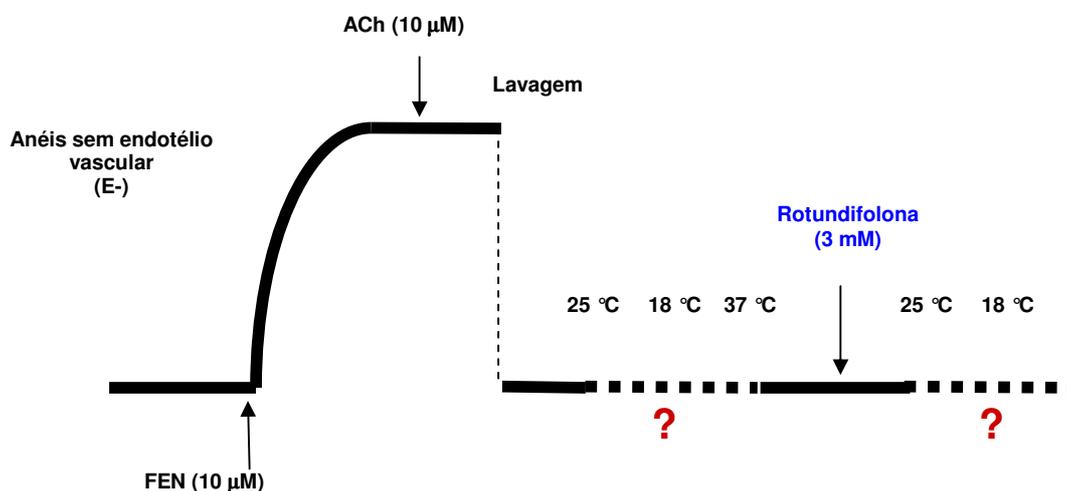


**Figura 15:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com capsaicina (10 μM).

#### 4.1.2.8. Investigação da influência de rotundifolona sobre os efeitos vasculares induzidos pela temperatura

Para avaliarmos a influência de rotundifolona sobre os efeitos induzidos pela ação da temperatura nos TRPM8, realizamos experimentos alterando a temperatura de banho dos anéis de artéria mesentérica isolada de ratos LN. Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, os anéis mesentéricos de ratos LN foram mantidos, por um período de 20 min, a uma temperatura de 37°C. Em seguida, a temperatura de banho foi diminuída para 25°C e os efeitos da mudança de temperatura nos anéis mesentéricos registrados. Posteriormente, a temperatura foi diminuída para 18°C, os valores de tensão quantificados e a temperatura retornada à 37°C. Em seguida, os anéis foram tratados com rotundifolona (3 mM) por um período de 20 min e as alterações na temperatura de banho repetidas como descritas anteriormente, no entanto, na presença de rotundifolona. Os valores de tensão (g)

registrados para as temperaturas analisadas (25 e 18 °C) foram comparados na presença e na ausência de rotundifolona (Figura 16).



**Figura 16:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influência de rotundifolona (3 mM) nos efeitos induzidos pela temperatura (25 °C e 18 °C) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem o endotélio funcional.

#### 4.1.3. Estudo com miócitos da artéria mesentérica superior isolada de rato SD

##### 4.1.3.1. Isolamento das células musculares lisas da artéria mesentérica superior isolada de rato

As células musculares lisas dissociadas enzimaticamente foram provenientes da artéria mesentérica superior de rato SD. O segmento depois de removido do mesentério permaneceu numa placa de Petri a 4 °C contendo solução salina fisiológica com baixo  $[Ca^{2+}]$  (tabela 7) onde se procedeu a dissecação. Após esse procedimento, foram obtidos segmentos de artérias medindo aproximadamente 1 cm de comprimento desprovidos de tecido conjuntivo e adiposo, e cortado longitudinalmente para remoção do endotélio com o auxílio de uma pinça.

O procedimento para dissociação enzimática dos miócitos foi realizado segundo CAI et al., 2007 com algumas adaptações detalhadas a seguir. Uma vez dissecado, o tecido foi cortado longitudinalmente e transferido para um tubo Falcon (15mL) contendo quimo-papaína (0,7 mg/mL - Sigma), albumina sérica bovina (BSA - 1 mg/mL - Sigma) e

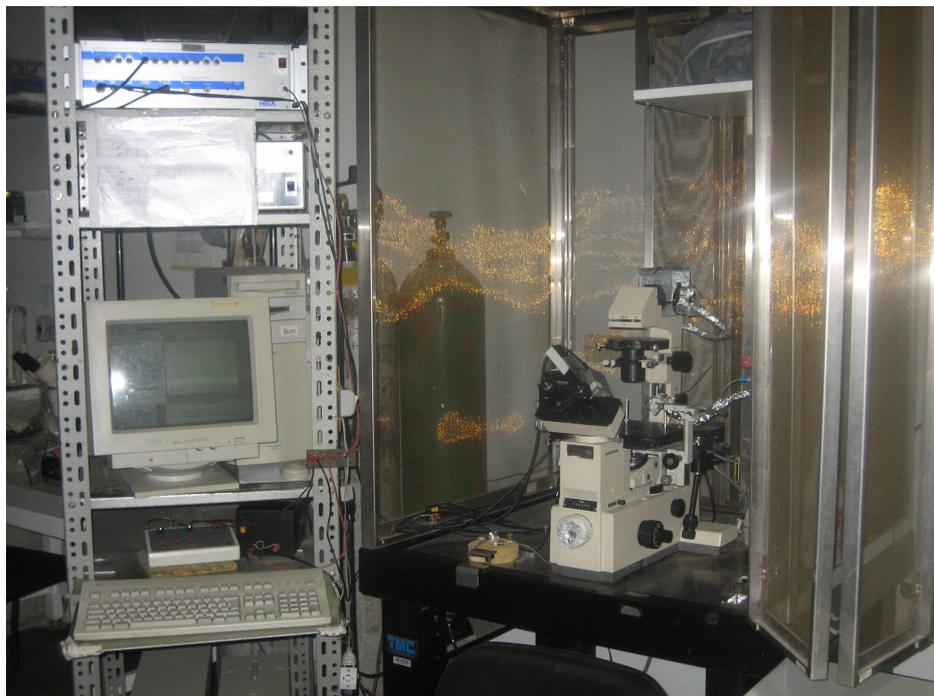
ditiotreitól (DTT- 1 mg/mL - Sigma) que foram diluídas em SSF (tabela 6), permanecendo por 20 a 30 minutos nesta solução a uma temperatura de 37°C. Em seguida as amostras de tecido foram transferidas para a SSF baixo-Ca<sup>2+</sup> contendo colagenase (1 mg/ml - Worthington), hialuronidase (0,9 mg/mL - Sigma) e BSA - 1 mg/mL – Sigma) para digerir o tecido na temperatura acima citada, durante aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, para separar a solução enzimática das células mesentéricas, procedeu-se a centrifugação (2000 rpm) e lavagem do tecido 2 vezes com SSF baixa [Ca<sup>2+</sup>] a 4°C. Por fim, as células foram redispersas em SSF normal e com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, fez-se a agitação mecânica. Após a redispersão, 300µL do homogenato foi colocado em lamínulas contidas em placas de seis poços, específicas para cultura celular e os miócitos deixados para aderir às lamínulas por, no mínimo, 20 minutos antes dos experimentos de eletrofisiologia e microscopia confocal.

#### **4.1.4. Estudos eletrofisiológicos**

Os miócitos da artéria mesentérica foram estudados sob a platina de um microscópio invertido (Olympus IMT-2, Japão). O conjunto é montado sobre uma mesa pneumática antivibratória (TMC, EUA). Um micromanipulador eletromecânico foi usado para movimentação do eletrodo responsável pelo registro das correntes da membrana celular. Outro micromanipulador mecânico foi usado para posicionar a pipeta de perfusão contendo soluções controle ou rotundifolona em concentrações diferentes. As correntes foram medidas com a ajuda de um amplificador (HEKA, EPC9, Alemanha) controlado pelo “software” PULSE (figura 16). As correntes registradas foram filtradas por um filtro passa baixa a 2,5 kHz, convertidas em sinais digitais numa frequência de 10 kHz e armazenadas em computador para posterior análise. Correntes de vazamento (“leakage”) foram removidas, usando-se um protocolo do tipo P/4 no qual quatro pulsos de amplitude igual a ¼ do pulso teste foram aplicados e a resposta de corrente foram somada e subtraída da corrente do pulso teste (BEZANILLA; ARMSTRONG, 1977). Os transientes capacitivos foram anulados em todos os experimentos. As células que apresentaram valores altos para a resistência em série (acima de 10 MΩ) ou que não

se mantiveram estável não foram utilizados na análise. Os registros das correntes macroscópicas foram armazenados em um computador MacPC ou PC compatível usando-se o “software” Pulse (HEKA, Alemanha).

As pipetas (PERFECTA, Brasil), feitas de vidro comum neutro, foram confeccionadas por meio de um estirador vertical de 2 estágios (Narishige, PP 83, Japão). As resistências das pipetas, quando preenchidas com solução interna/pipeta, assumiram valores entre 2-5 M $\Omega$ . Um fino fio de Ag/AgCl era introduzido na pipeta e o conjunto foi acoplado a um pré-amplificador (“headstage”) que, por sua vez, está conectado à entrada do amplificador EPC9 (HEKA Instruments, Alemanha). As correntes macroscópicas de cálcio ou de potássio foram medidas usando a configuração de “whole cell” – “voltage-clamp”. Todas as soluções utilizadas, passaram por um filtro millipore com porosidade (“mesh”) de 0,22  $\mu$ m. Os “gigaselos” foram obtidos por meio de uma suave sucção feita no interior da micropipeta para obtenção do configuração “whole cell” (HAMILL et al., 1981), foi realizada uma sucção mais vigorosa para romper o pequeno fragmento de membrana que separa a solução interna, contida na pipeta, do citoplasma da célula em estudo. O aumento brusco do transiente capacitivo indicou a formação do “whole cell”. Todos os registros foram feitos em células submetidas a um sistema de perfusão que consistiu de uma pipeta de vidro com aproximadamente 100  $\mu$ m de diâmetro interno, conectada à saída de uma válvula solenóide, alimentada por dois reservatórios de 5 mL cada. A válvula solenóide serviu para selecionar qual dos compartimentos estaria diretamente ligada à pipeta de perfusão, estabelecendo, assim, controle da solução a ser perfundida. O fluxo (0,6 mL/min) era impulsionado pela gravidade. Rotundifolona foi perfundida nas concentrações desejadas. Os dados foram coletados e processados usando o software pulse fit da HEKA. Todos os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente (22 -24 °C).



**Figura 17:** Aparato utilizado para os experimentos de eletrofisiologia com miócitos da artéria mesentérica isolado de rato

#### 4.1.5. Protocolos experimentais empregados nos ensaios eletrofisiológicos

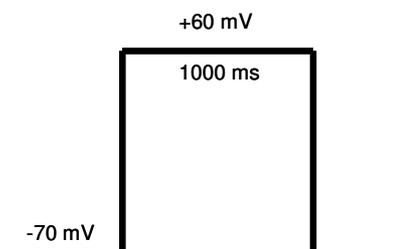
##### 4.1.5.1. Avaliação do efeito de rotundifolona sobre os canais para potássio em miócitos da artéria mesentérica superior de rato

Este estudo foi realizado para avaliar a influência de rotundifolona sobre o efluxo de potássio por canais para  $K^+$  em miócitos mesentéricos isolados de ratos normotensos.

Para o registro das correntes de potássio, as pipetas foram preenchidas com solução salina, cuja composição iônica está mostrada na tabela 12.

Para avaliarmos o efeito de rotundifolona sobre as correntes de  $K^+$ , os miócitos foram mantidos em um potencial de “holding” de  $-70$  mV e em seguida, foram aplicados pulsos-teste à  $+60$  mV, com duração de 1000 ms, em intervalos de 20 s (Figura 17). As correntes de  $K^+$  foram medidas na situação controle, com a célula perfundida por solução extracelular e na situação teste, com a célula perfundida com solução

extracelular contendo rotundifolona (10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ). Os dados foram expressos como porcentagem de inibição do pico das correntes de  $\text{K}^+$  em função da concentração de rotundifolona na forma de um gráfico de barras.



**Figura 17:** Esquema representativo mostrando o protocolo experimental para avaliação do efeito de rotundifolona (10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ) sobre as correntes de  $\text{K}^+$  em miócitos da artéria mesentérica superior de rato normotenso.

#### 4.1.5.2. Avaliação do efeito de rotundifolona sobre os canais para cálcio sensíveis a voltagem em miócitos da artéria mesentérica superior de rato

Este experimento foi realizado para avaliar a real influência de rotundifolona sobre o influxo de cálcio por canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem de miócitos mesentéricos isolados de ratos normotensos.

Para o registro das correntes de cálcio, as pipetas foram preenchidas com solução salina, cuja composição iônica está mostrada na tabela 8. O CsCl substitui o íon potássio, e, junto com o TEA, teve a função de bloquear as correntes de potássio. As células foram banhadas por uma solução externa, cuja composição está mostrada na tabela 9. Ao invés do  $\text{Ca}^{2+}$ , o bário ( $\text{Ba}^{2+}$ ) foi usado como carreador, pois os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo-L apresentam uma maior condutância para o bário em relação ao  $\text{Ca}^{2+}$ , facilitando assim a identificação destas correntes.

Para avaliarmos o efeito de rotundifolona sobre as correntes de  $\text{Ba}^{2+}$ , os miócitos foram mantidos em um potencial de “holding” de  $-70$  mV e em seguida, foram aplicados pulsos-testes de 50 ms de duração, despolarizando a célula para  $+10$  mV, em intervalos de 20 s (UCHIDA et al. 2001). As correntes de  $\text{Ba}^{2+}$  foram medidas na situação controle, com a célula perfundida por solução extracelular e na situação teste, com a célula perfundida com solução extracelular contendo rotundifolona (100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 1

mM e 3 mM) (figura 19). Os dados foram expressos em percentagem de inibição do pico da corrente de  $Ba^{2+}$  e da corrente no final do pulso, normalizados pelos valores de corrente máxima, em função da concentração de rotundifolona.

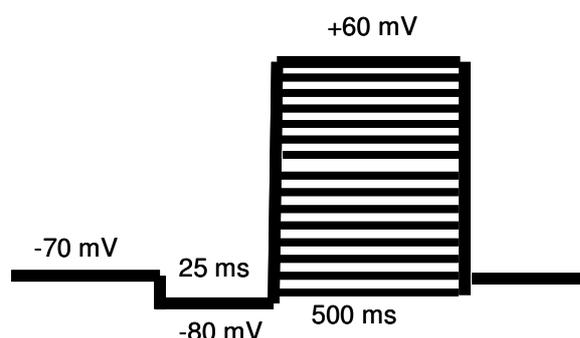


**Figura 19:** Esquemas representativos mostrando em A, protocolo experimental para avaliação do efeito de rotundifolona (100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 1mM e 3mM) sobre as correntes de  $Ba^{2+}$ , em miócitos da artéria mesentérica superior de rato e em B, procedimento para análise das correntes de cálcio no pico das correntes e no final do pulso despolarizante.

#### 4.1.5.3. Avaliação do efeito de rotundifolona sobre a curva corrente-voltagem (I/V) para os Cav em miócitos da artéria mesentérica superior de rato SD

Para avaliarmos a magnitude da dependência de voltagem do bloqueio, exercido por rotundifolona, dos canais para  $Ca^{2+}$ , foram realizados experimentos baseados nos protocolos descrito por BARDAI et al., 2003. Brevemente, os miócitos foram mantidos em um potencial de “holding” de -70 mV e antes de aplicar o pulso teste, foi aplicado um pré-pulso para -80 mV por 50 ms e em seguida foram aplicados pulso-teste de 500 ms de duração, em incrementos de 10 mV, que despolarizou a célula até +60mV (Figura 19). As correntes de bário foram medidas na situação controle, solução externa contendo Bay K8644 (1 $\mu$ M) para aumentar a probabilidade de abertura dos canais para  $Ca^{2+}$  sensíveis às diidropiridinas, ou na situação teste, perfundindo-se a célula com solução extracelular contendo 300  $\mu$ M ou 1 mM de rotundifolona. Os resultados foram expressos com média  $\pm$  e.p.m. e os gráficos expressos em densidade de corrente (amplitude do pico da corrente normalizada pela capacitância da célula) em função dos valores de potencial de membrana. Para determinar a curva de ativação estacionária, os valores de condutância foram mostrados em função dos potenciais testes. A curva

foi ajustada segundo a equação de Boltzmann:  $G/G_{max} = \{1 + \exp[(V_{0.5} - V)/k]\}^{-1}$ , onde  $G/G_{max}$  é a condutância normalizada pela condutância máxima,  $V_{0.5}$  é o valor do potencial de membrana requerido para obter 50% da condutância máxima e  $k$  é o fator de inclinação (TAO et al., 2006; HILLE, 1992). Os valores de condutância foram obtidos a partir dos valores de corrente (pA) usando-se a equação de Ohm:  $I = G(V_{teste} - V_{rev})$ , onde  $G$  é condutância,  $V_{teste}$  é o valor de potencial em cada pulso teste e  $V_{rev}$  é o valor do potencial de reversão para o  $Ba^{2+}$ . O  $V_{rev}$  para o  $Ba^{2+}$  aqui utilizado deveria ter sido calculado a partir da equação de Nernst ( $V = (RT/ZF) \ln ([Ba^{2+}]_e/[Ba^{2+}]_i)$ ), onde  $R$  é o valor da constante dos gases,  $T$  é o valor da temperatura absoluta (K),  $Z$  é a valência iônica do íon  $Ba^{2+}$  e  $F$  é o valor da constante de Faraday, porém como não se pôde determinar a concentração de  $Ba^{2+}$  no meio intracelular, o mesmo foi estimado por extrapolação da região linear da curva corrente/voltagem.

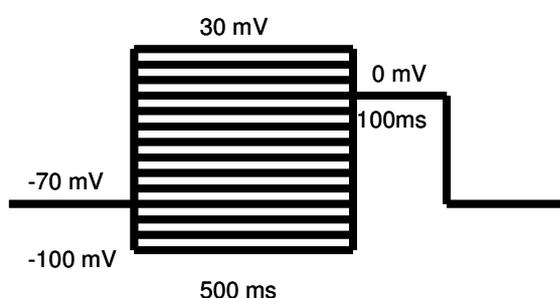


**Figura 20:** Esquema representativo mostrando o protocolo experimental para obtenção da curva corrente-voltagem em canais estimulados com S(-)-Bay K 8644 (1  $\mu$ M), antes e após perfusão de rotundifolona 300  $\mu$ M ou 1 mM.

#### 4.1.5.4. Avaliação do efeito de rotundifolona sobre a cinética de inativação dos canais para $Ca^{2+}$ sensíveis a voltagem

Para investigar o efeito de rotundifolona sobre a dependência de voltagem da inativação dos canais para  $Ca^{2+}$ , foi obtida uma curva de inativação estacionária a partir do protocolo de pulso-duplo como descrito em UCHIDA et al. 2001. Brevemente, um pré-pulso condicionante de vários potenciais entre -100 mV e +30 mV, em incrementos

de 10 mV, durante um período de 500 ms, foi aplicado antes do pulso teste para 0 mV com duração de 100 ms (figura 21). As correntes de pico foram normalizadas pelos valores de corrente máxima. A amplitude relativa das correntes de  $Ba^{2+}$  produzida pelo pulso teste (de 0 mV com 100 ms de duração) foi mostrado em função dos potenciais pré-condicionantes na ausência (curva controle) e na presença de rotundifolona (300  $\mu$ M). A curva de inativação estacionária ( $h_{\infty}$ ) foi obtida a partir da equação de Boltzmann:  $I/I_{max}=1/\{1+\exp[(V - V_{0.5})/k]\}$  onde  $V_{0.5}$  é o valor de potencial onde uma fração de 50% dos canais está no estado não inativado.



**Figura 21:** Esquema representativo mostrando o protocolo experimental para obtenção da curva de inativação estacionária em canais estimulados com Bay K 8644 1 $\mu$ M, antes e após perfusão de rotundifolona 300  $\mu$ M ou 1 mM.

#### 4.1.6. Método utilizado nos estudos com microscopia confocal

A quantificação e visualização em tempo real das alterações intracelulares de  $Ca^{2+}$  em miócitos da artéria mesentérica isolada de rato SD, em reposta a rotundifolona, foram obtidas por microscopia confocal.

A intensidade de fluorescência ao cálcio foi determinada com a sonda sensível ao  $Ca^{2+}$ , Fluo-4, absorção em 488 nm e emissão máxima em 516 nm ([www.molecularprobes.com](http://www.molecularprobes.com)), na forma de acetoximetil éster sendo permeável a membrana plasmática (Fluo-4/AM - 6 $\mu$ M). Inicialmente, seguindo método descrito por Rodrigues e colaboradores (2007) com modificações, os miócitos de artéria mesentérica foram carregados com fluo-4/AM por 40 minutos e em seguida montados em câmaras experimentais de perfusão onde foram continuamente perfundidos por uma solução extracelular, ver tabela 12, a temperatura ambiente. As alterações nas concentrações de

$\text{Ca}^{2+}$  intracelular em resposta aos estímulos induzidos por concentrações diferentes de rotundifolona (300  $\mu\text{M}$ , 1mM e 3mM) foram captadas por microscópio confocal de fluorescência por varredura a laser BioRad MRC-1024 (Hercules, CA). As imagens foram monitoradas por espaço de tempo pré-determinado no aparelho. As células foram observadas usando objetiva 63x (imersão à óleo) e abertura numérica de 1,4. A faixa de 488nm de um laser krypton/argon foi usada para excitar a sonda e os sinais de emissões entre 505 e 550 nm foram coletadas (figura 22).



**Figura 22:** Aparato utilizado para os experimentos com microscopia confocal com miócitos de artéria mesentérica isolado de rato normotenso.

#### 4.1.7. Protocolos realizados nos estudos com microscopia confocal

##### 4.1.7.1. Análise da presença de $\alpha$ -actina por imunofluorescência

Os experimentos de imunofluorescência foram realizados segundo Leite e colaboradores (2003). Brevemente, após isolamento das células musculares lisas de

artéria mesentérica como descrito anteriormente e sua adesão em lamínulas, as mesmas foram lavadas três vezes, cuidadosamente, com solução de tampão fosfato (PBS). Em seguida, as células foram tratadas por um período de 15 min com 4% de paraformaldeído diluído em PBS, para estabilizar e fixar melhor as mesmas nas lamínulas. Posteriormente lavou-se com solução de PBS contendo triton 0,5%, três vezes, por um período de 5min, para permeabilizar a membrana plasmática e permitir a entrada do anticorpo no meio intracelular. Em seguida, as células foram tratadas com solução de bloqueio celular contendo albumina (BSA-1%), triton (0,5%) e soro de cabra (normal goat serum-5%), permanecendo nesta solução por 1 hora em câmara úmida, protegida da luminosidade e à temperatura ambiente. As células foram incubadas “overnight”, em câmara úmida, com o anticorpo primário anti- $\alpha$ -actina de camundongo, na proporção de 1:200 para os ensaios teste, e com o veículo, sem o anticorpo primário, para os ensaios controle. No dia seguinte, as células foram lavadas três vezes com PBS por 5 min e incubadas com o anticorpo secundário Anti-camundongo (Alexa fluo 568), na proporção 1:500 por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS, montadas em lâminas histológicas e posteriormente analisadas sob microscopia confocal em comprimento de onda de excitação/emissão de 568/603 nm. Todas as soluções de anticorpos preparadas, primário e secundário, foram diluídas na solução de bloqueio com a finalidade de manutenção das células em uma mesma solução de veículo.

#### **4.1.7.2. Avaliação dos efeitos de rotundifolona sobre a fluorescência ao $\text{Ca}^{2+}$ basal em miócitos de artéria mesentérica**

Este protocolo foi realizado para avaliarmos a influência de rotundifolona sobre a fluorescência basal ao  $\text{Ca}^{2+}$  em miócitos de artéria mesentérica de animais normotensos. Inicialmente, após o período de incubação de 40 min com fluo 4-AM, as células foram estimuladas com rotundifolona (10  $\mu\text{M}$ , 1 mM ou 3 mM) diluídas na solução de perfusão (tabela 12) e as imagens adquiridas a uma frequência de 2-10/s. Ao final dos experimentos, foram avaliados os valores de pH das soluções de perfusão contendo o monoterpene, para observarmos se os efeitos induzidos por rotundifolona em

miócitos vasculares poderiam ser decorrentes de uma possível alteração no pH. Os valores foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. e as intensidades de fluorescência foram normalizadas pela fluorescência mínima segundo a equação  $\Delta F(\%) = (F - F_0 / F_0) * 100$  onde F é a fluorescência teste e F<sub>0</sub> fluorescência mínima.

#### **4.1.7.3. Avaliação dos efeitos de rotundifolona sobre a fluorescência ao Ca<sup>2+</sup> em miócitos de artéria mesentérica de ratos normotensos estimulados com Bay K 8644**

No intuito de investigar as influências de rotundifolona nas concentrações de Ca<sup>2+</sup> intracelular em miócitos previamente estimulados com um agente contracturante, semelhante ao procedimento realizado nos ensaios funcionais com artéria mesentérica superior isolada de rato, as células musculares lisas foram estimuladas com um agonista dos canais para cálcio sensíveis as diidropiridinas, o Bay K 8644 (1 $\mu$ M) (TAO et al., 2006). Previamente as células foram estimuladas com Bay K 8644 que foi diluído na solução de perfusão (tabela 12). Em seguida, as células foram estimuladas com rotundifolona (3mM) na presença de Bay K 8644. Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM e as intensidades de fluorescência foram normalizadas como descrito anteriormente.

#### **4.1.7.4. Investigação da fonte de Ca<sup>2+</sup> mobilizada por rotundifolona em miócitos de artéria mesentérica de ratos normotensos**

Este protocolo foi realizado para investigar a fonte de cálcio utilizada por rotundifolona para alterar a fluorescência ao Ca<sup>2+</sup>, no meio intracelular, em miócitos de artéria mesentérica de ratos normotensos. Previamente as células foram estimuladas com fenilefrina (1 $\mu$ M), para observarmos as células responsivas ao estímulo e em seguida, estimuladas com Rotundifolona (3 mM) para avaliarmos as alterações na fluorescência ao Ca<sup>2+</sup> induzidas pelo monoterpene. Posteriormente as mesmas foram tratadas com EGTA (2 mM), um quelante de cálcio impermeável a membrana (MUKHAMEDYARONV et al., 2006), por um período de 2 min, ou BAPTA-AM (50  $\mu$ M), um quelante de cálcio intracelular (MUKHAMEDYARONV et al., 2006) por um período

de 30min. Passado o período de incubação com os quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , um novo estímulo foi induzido com rotundifolona (3 mM). Os valores foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. e as intensidades de fluorescência foram normalizadas como descrito anteriormente. As soluções de fenilefrina (1 $\mu\text{M}$ ), rotundifolona (3 mM), EGTA (2mM) e BAPTA-AM (50 $\mu\text{M}$ ) foram preparadas com a solução de perfusão (tabela 12).

#### **4.1.7.5. Influência do $\text{Ca}^{2+}$ proveniente do retículo sarcoplasmático nos efeitos de rotundifolona em miócitos de artéria mesentérica de ratos normotensos**

Neste protocolo, foi analisado a importância do cálcio sarcoplasmático nas alterações de fluorescência ao  $\text{Ca}^{2+}$  induzidas por rotundifolona em miócitos da artéria mesentérica de ratos normotensos. Inicialmente as células foram estimuladas com fenilefrina (1 $\mu\text{M}$ ), para observarmos as células responsivas ao estímulo e em seguida, estimuladas com rotundifolona (3mM) para avaliarmos as alterações na fluorescência ao  $\text{Ca}^{2+}$  induzidas pelo monoterpene. Posteriormente as mesmas foram tratadas com ácido ciclopiazônico (CPA) (20  $\mu\text{M}$ ), inibidor da ATPase de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático por um período de 30 min, responsável por depletar os estoques de cálcio citosólicos (LIU et al., 2006). Em seguida, as células foram perfundidas com solução contendo fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) e CPA (20  $\mu\text{M}$ ) ou rotundifolona (3 mM) e CPA (20  $\mu\text{M}$ ). Os valores foram expressos como média  $\pm$  SEM e as intensidades de fluorescência foram normalizadas como descrito anteriormente. As soluções de fenilefrina (1 $\mu\text{M}$ ), rotundifolona (3 mM), CPA (20  $\mu\text{M}$ ) foram preparadas com a solução de perfusão (tabela 12).

#### **4.1.7.6. Influência do antagonista dos receptores TRPM8, capsazepine, nos efeitos de rotundifolona em miócitos de artéria mesentérica de ratos normotensos**

Nestes experimentos foi testado a influência do antagonista tio-ureia competitivo dos receptores TRPV1, capsazepine (20  $\mu\text{M}$ ) (BEVAN et al., 1992), do qual tem sido relatado como um fraco inibidor de TRPM8 em camundongos, isto devido sua capacidade em reduzir as elevações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em células TRPM8-HEK-293 (BEHRENTS et al., 2004). Inicialmente, as células foram estimuladas com rotundifolona

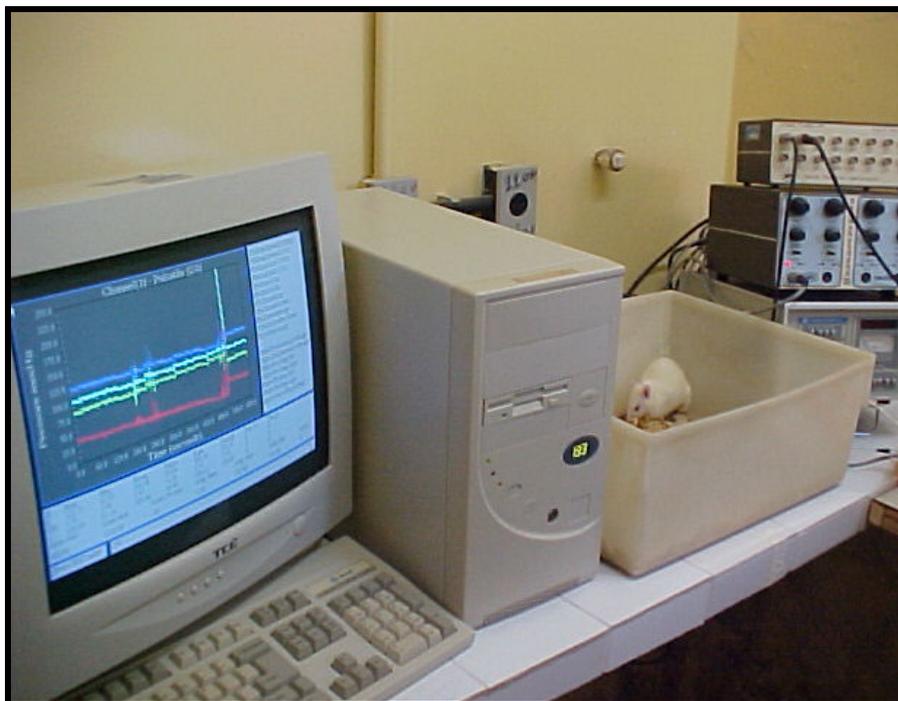
(3 mM) e as alterações na fluorescência ao  $\text{Ca}^{2+}$  induzidas pelo monoterpene foram observadas e quantificadas. Posteriormente, as mesmas foram tratadas com capsazapine ( $20\mu\text{M}$ ) por um período de 30 min e um novo estímulo foi dado com a mesma concentração prévia de rotundifolona. Os valores foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. e as intensidades de fluorescência foram normalizadas como descrito anteriormente, sendo analisadas as variações nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular induzidos por rotundifolona na ausência e na presença do antagonista.

## 4.2. Estudos *in vivo*

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

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

A PA e FC foram medidas 24 h após o procedimento cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (Statham P23 ID; Gould, Cleveland, OH, EUA) acoplado a um amplificador (Modelo TBM-4M, WPI, Sarasota, FL, EUA), conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital (CIO-DAS16/JR, Computer Boards, Inc., Mansfield, MA, EUA) contendo o programa CVMS (WPI, Sarasota, FL, EUA) (Figura 22). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, foi determinado a pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), e o intervalo de pulso, referido como FC. O cateter venoso foi implantado para a administração das drogas.

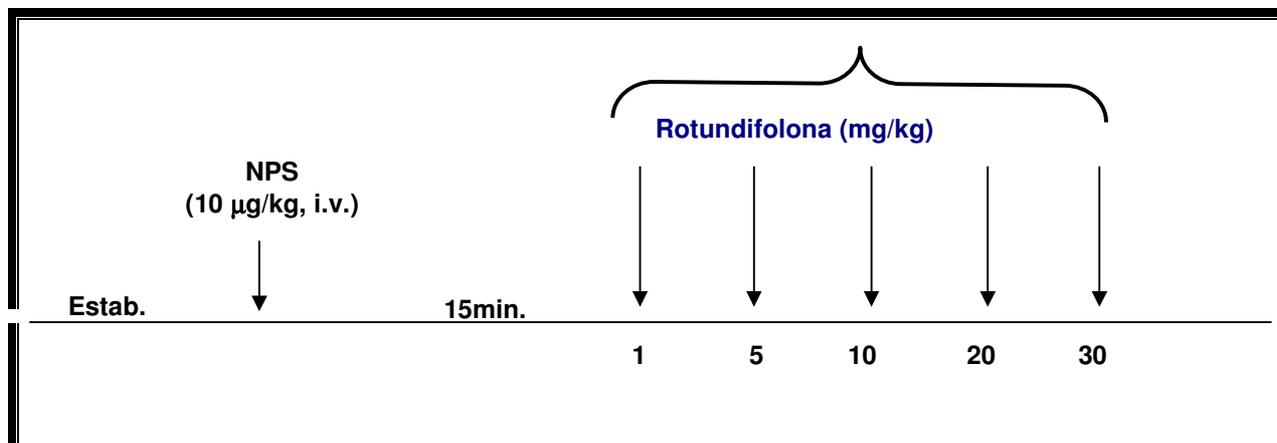


**Figura 22:** Aparato utilizado para aquisição de dados de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não anestesiados.

#### 4.2.2. Protocolo experimental utilizado nos estudos *in vivo*

##### 4.2.2.1. Avaliação do efeito de rotundifolona sobre PAM e FC em ratos LN e LH não anestesiados

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



**Figura 24:** Representação esquemática do protocolo para avaliação dos valores de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos LN e LH não-anestesiados.

### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). As curvas concentração-resposta foram ajustadas segundo equação logística de quatro parâmetros ou equação de Hill abaixo descrita, onde:  $Y$  é a variável dependente, correspondente a percentagem (%) de relaxamento,  $Y_{\text{mínimo}}$  é o valor de % de relaxamento mínimo,  $Y_{\text{máximo}}$  é o valor de % de relaxamento máximo,  $\log CE_{50}$  é o logaritmo da concentração de uma substância que induz 50% do efeito máximo,  $X$  é a variável independente, correspondente a concentração de rotundifolona e  $s$  corresponde a inclinação de Hill:

$$Y = Y_{\text{mínimo}} + \frac{Y_{\text{máximo}} - Y_{\text{mínimo}}}{1 + (10^{\log CE_{50}} / 10^X)^s}$$

Para estudar o efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona, dois parâmetros farmacológicos foram analisados: A eficácia farmacológica ( $E_{\text{max}}$ , resposta máximo induzida pela substância) e a potência farmacológica ( $pD_2$ , logaritmo negativo da concentração de uma substância que induz 50% do efeito máximo,  $-\log CE_{50}$ ). As

análises estatísticas foram feitas utilizando teste *t* de *Student* ou análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido de teste de Bonferroni, quando apropriado. Foram considerados significantes os valores de  $p < 0,05$ . Os programas utilizados para análise dos dados foram Graph Pad Prism 4.02, pulse-pulsefit 8.54 e confocal assistant 4.02.

*Resultados*

---

## 5. RESULTADOS

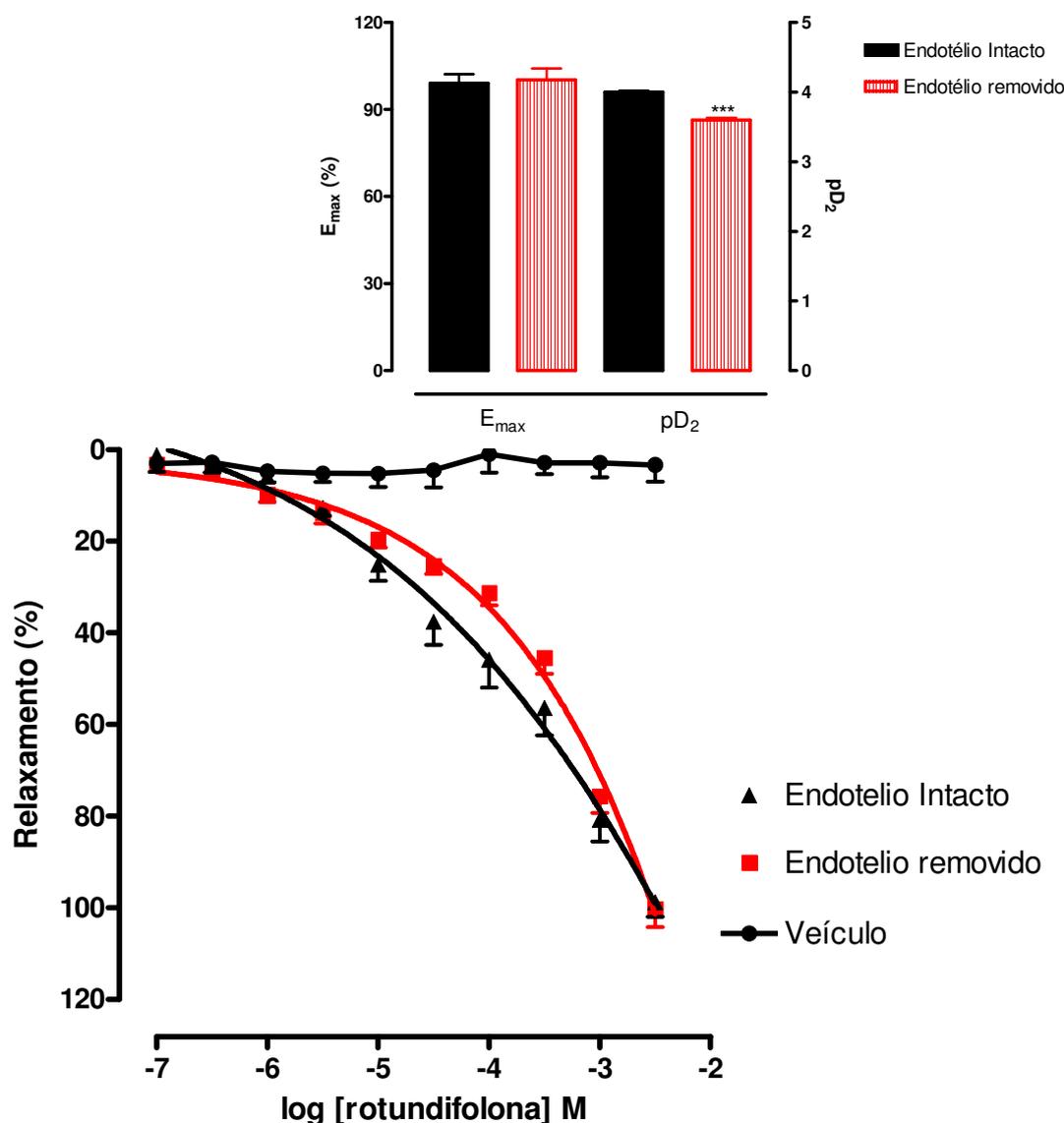
### 5.1. Efeitos vasculares de rotundifolona em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN

A administração cumulativa de rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de ratos LN, com endotélio funcional íntegro e pré-contraídos com FEN ( $0,1 \mu\text{M}$  -  $10 \mu\text{M}$ ), induziu um vasorelaxamento dependente de concentração com  $E_{\text{max}} = 98,9 \pm 3,1 \%$  e  $\text{pD}_2 = 4,0 \pm 0,02$  (Figura 25).

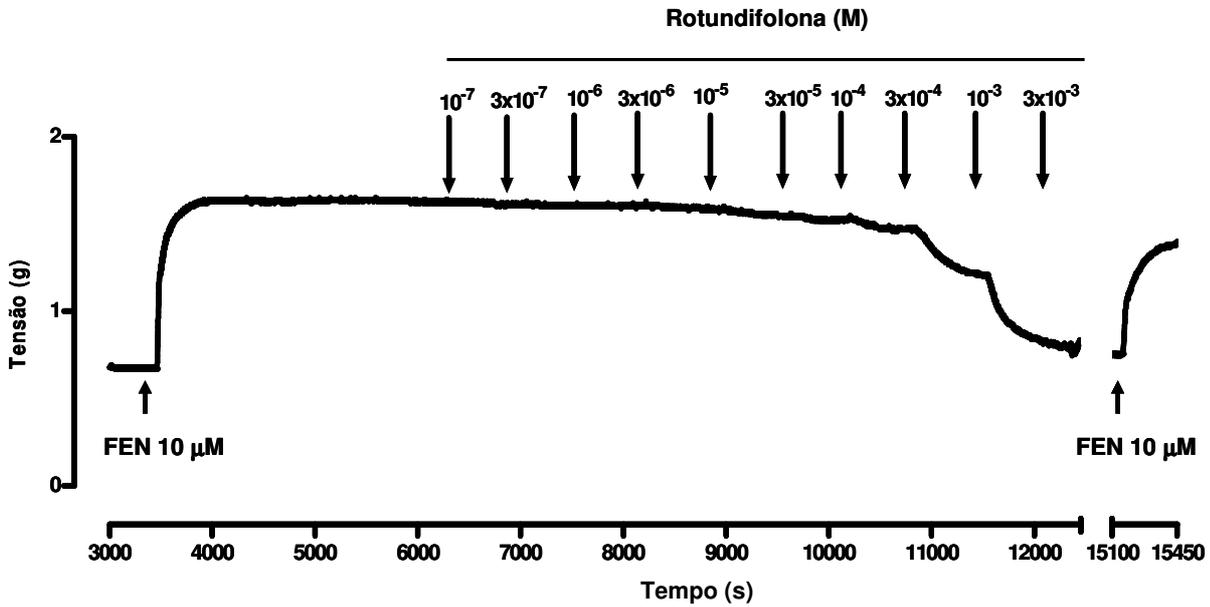
A remoção do endotélio vascular deslocou de maneira significativa ( $p < 0,001$ ), a resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona, como demonstrado pelos valores de  $\text{pD}_2$  obtidos ( $\text{pD}_2 = 3,6 \pm 0,03$ ,  $n=12$ , respectivamente). No entanto, a percentagem de relaxamento máximo ( $E_{\text{max}}$ ) induzida por rotundifolona não foi alterada após remoção do endotélio vascular ( $E_{\text{max}} = 100,3 \pm 3,8 \%$ ,  $n=12$ ) (Figura 25).

O tempo necessário para que fossem obtidas as respostas máximas para cada concentração de rotundifolona variou entre 8 a 12 min. No final dos experimentos, a reversão do relaxamento produzido por rotundifolona foi conseguido após 40 minutos de sua retirada das cubas por meio da troca de solução de Tyrode e verificação da reposta do tecido a FEN ( $10 \mu\text{M}$ ). A reversibilidade foi sistematicamente observada, como mostrado no registro original, para assegurar que o relaxamento não foi devido a alterações na contractilidade e responsividade do tecido (Figura 26).

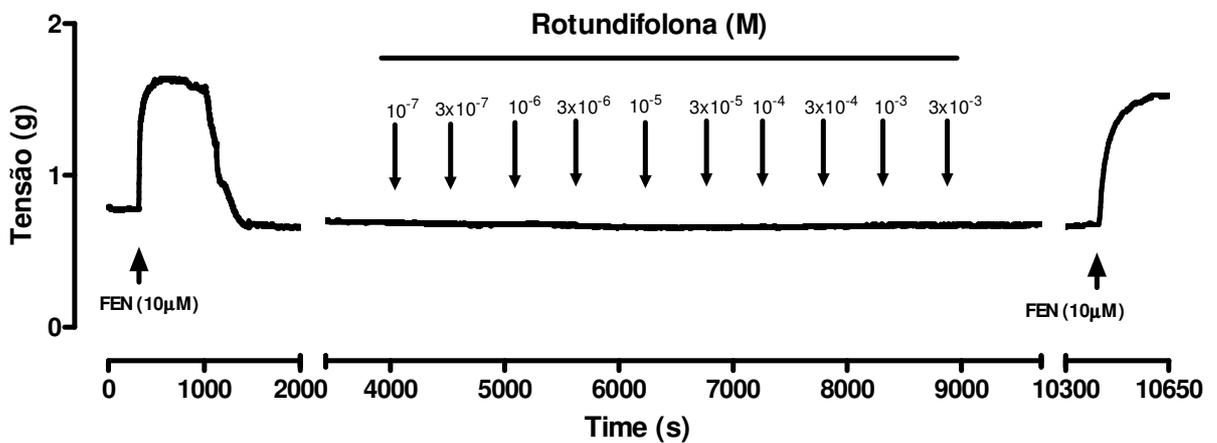
A adição de rotundifolona não foi capaz de modificar, de maneira significativa, o tônus basal em anéis com endotélio funcional intacto como observado no registro original (figura 27).



**Figura 25:** Efeito de rotundifolona em anéis da artéria mesentérica superior isolada de ratos LN. Na parte inferior, curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN com o endotélio intacto ( $\blacktriangle$ ) ou endotélio removido ( $\blacksquare$ ), pré-contraídos com FEN (0,1 a 10  $\mu$ M). As alterações nas tensões induzidas pela administração do veículo (água destilada + cremofor) foram mostradas juntamente com a curva concentração-resposta de rotundifolona. Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio intacto e endotélio removido. Os valores estão expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 11 e 12 experimentos, respectivamente. \*\*\*  $p < 0,0001$  vs Endotélio Intacto.



**Figura 26:** Traçado original mostrando o efeito de rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato, com o endotélio intacto e pré-contráidos com FEN 10  $\mu$ M. As setas indicam o momento da adição das substâncias.

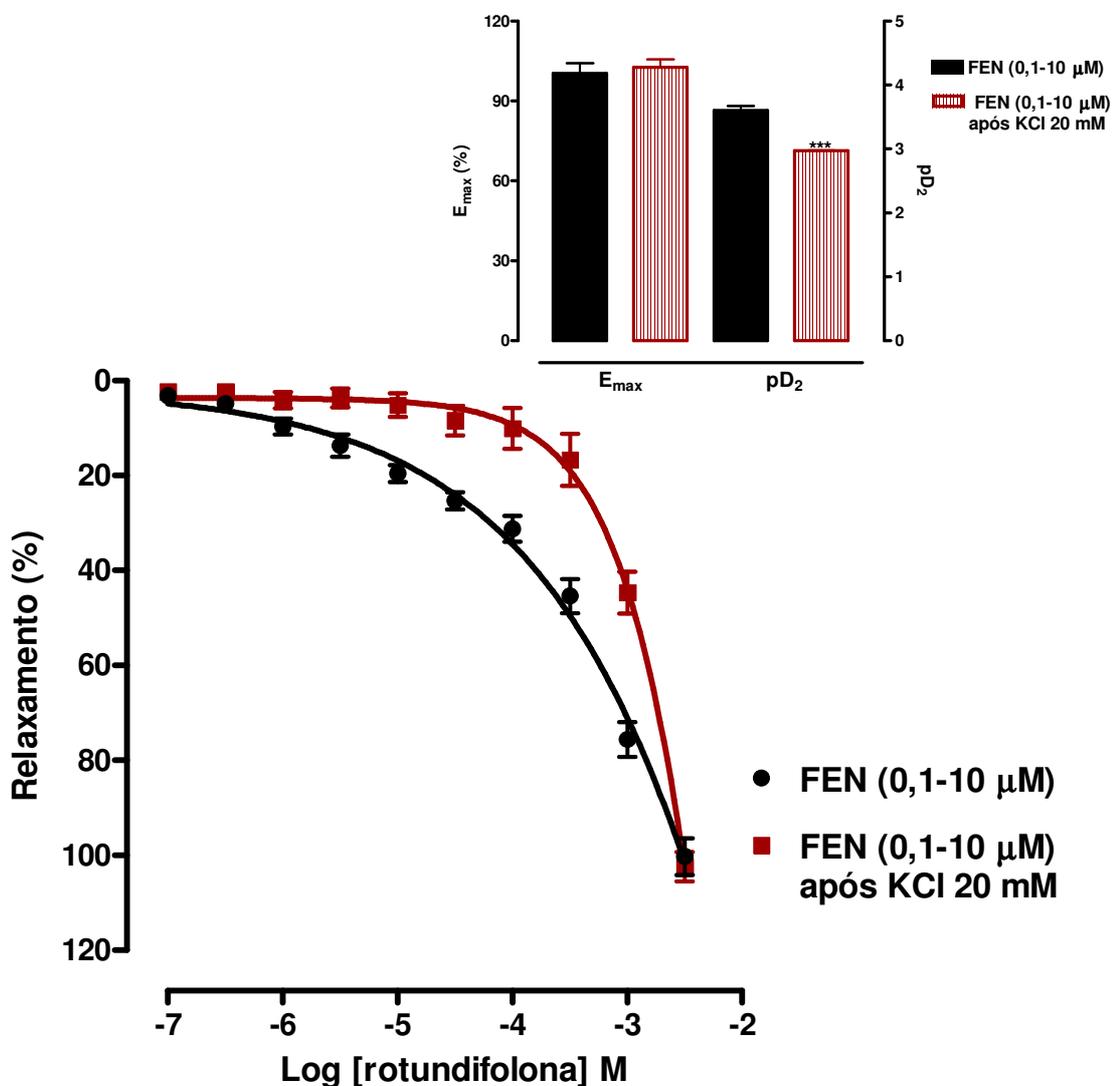


**Figura 27:** Traçado original mostrando o efeito de rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) no tônus basal de anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato, com o endotélio intacto.

## 5.2. Influência dos canais para $K^+$ na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis da artéria mesentérica superior de ratos LN

Para avaliar a participação de canais para  $K^+$  na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona, foram realizados experimentos com anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu$ M - 10  $\mu$ M), na presença de uma solução de tyrode com 20 mM de KCl. O bloqueio parcial do efluxo de  $K^+$  com o aumento da concentração  $K^+$  extracelular ( $[K^+]_e$ ) para 20 mM induziu um deslocamento significativo ( $p < 0,0001$ ) da curva concentração-resposta de rotundifolona para direita ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) ( $pD_2 = 2,97 \pm 0,01$ ,  $n=7$ ) sem alterações nos valores de efeito máximo ( $E_{m\acute{a}x} = 102,5 \pm 3,1$  %,  $n=7$ ) (Figura 28).

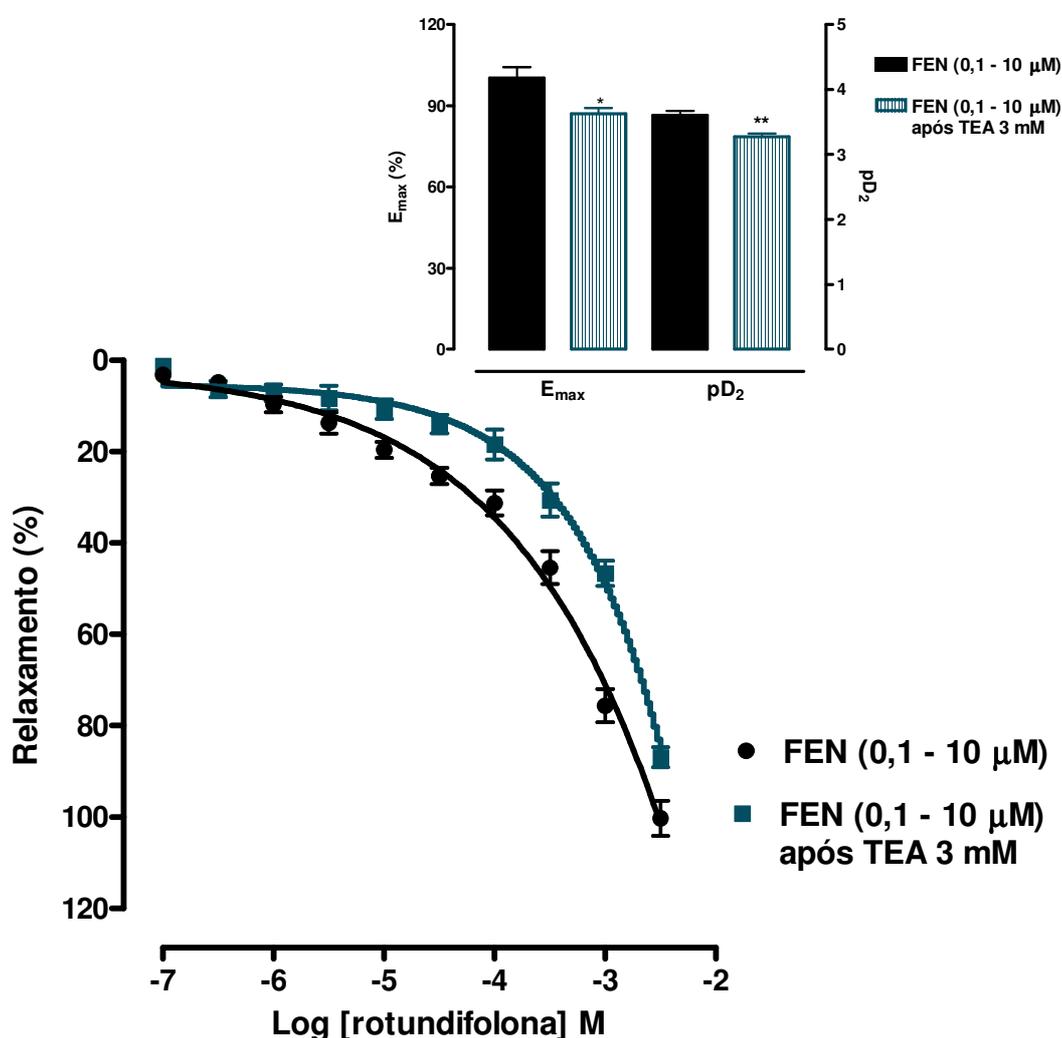
Como pode ser observado na figura 28, 20 mM de  $K^+$  extracelular aboliu a resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona na faixa de concentração de  $10^{-7}$  –  $10^{-4}$  M.



**Figura 28:** Influência da solução de tyrode com 20mM de KCl no efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona. No gráfico inferior, curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7} - 3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional na presença de  $[K^+]_e = 4$  mM (●) ou  $[K^+]_e = 20$  mM (■). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio removido na presença de  $[K^+]_e = 4$  mM ou  $[K^+]_e = 20$  mM. Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 7 experimentos, respectivamente. \*\*\*  $p < 0,0001$  vs FEN (0,1-10  $\mu$ M).

### **5.3. Influência de um bloqueador não-específico dos canais para K<sup>+</sup> na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN**

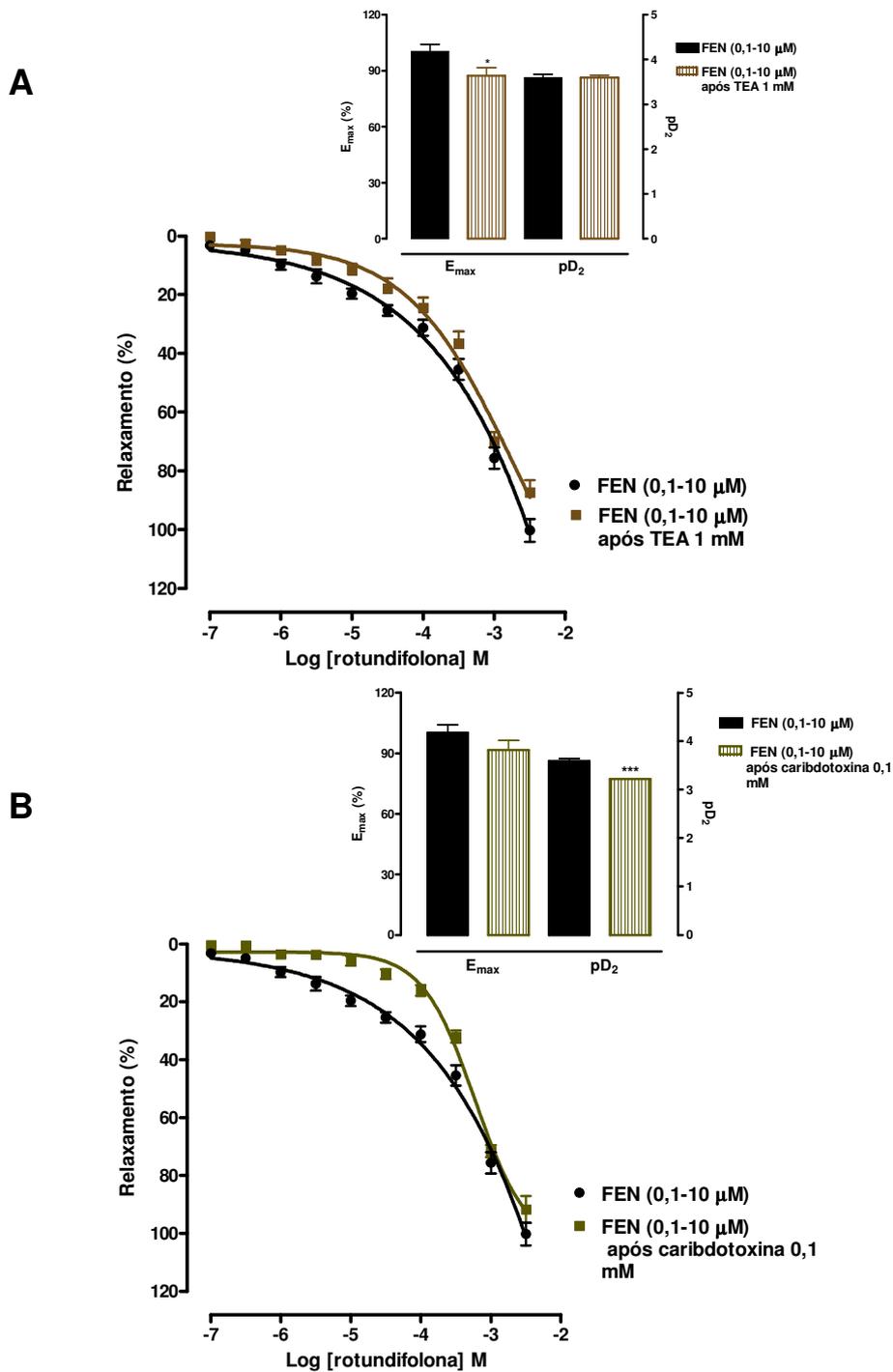
Para reforçar a evidência funcional da participação dos canais para K<sup>+</sup> no efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona, realizamos experimentos na presença de TEA 3 (mM), que nesta concentração é responsável por bloquear de maneira não-específica os canais para K<sup>+</sup> (WANG et al, 2007). Nesta condição, a curva concentração-resposta do efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, foi deslocada para direita, com alterações significativas nos valores de pD<sub>2</sub> ( $3,27 \pm 0,05$ ) e E<sub>max</sub> ( $86,9 \pm 2,2$ ) (Figura 29).



**Figura 29:** Influência de TEA (3 mM), um bloqueador não-específico dos canais para  $K^+$  nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona. No gráfico inferior, Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7} - 3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (0,1-10  $\mu$ M) na ausência (●) e na presença de TEA (3 mM) (■). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio removido na presença ou na ausência de TEA (3 mM). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 5 experimentos, respectivamente. \*\*  $p < 0,01$  vs FEN (0,1-10  $\mu$ M).

#### 5.4. Participação dos canais $BK_{Ca}$ na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN

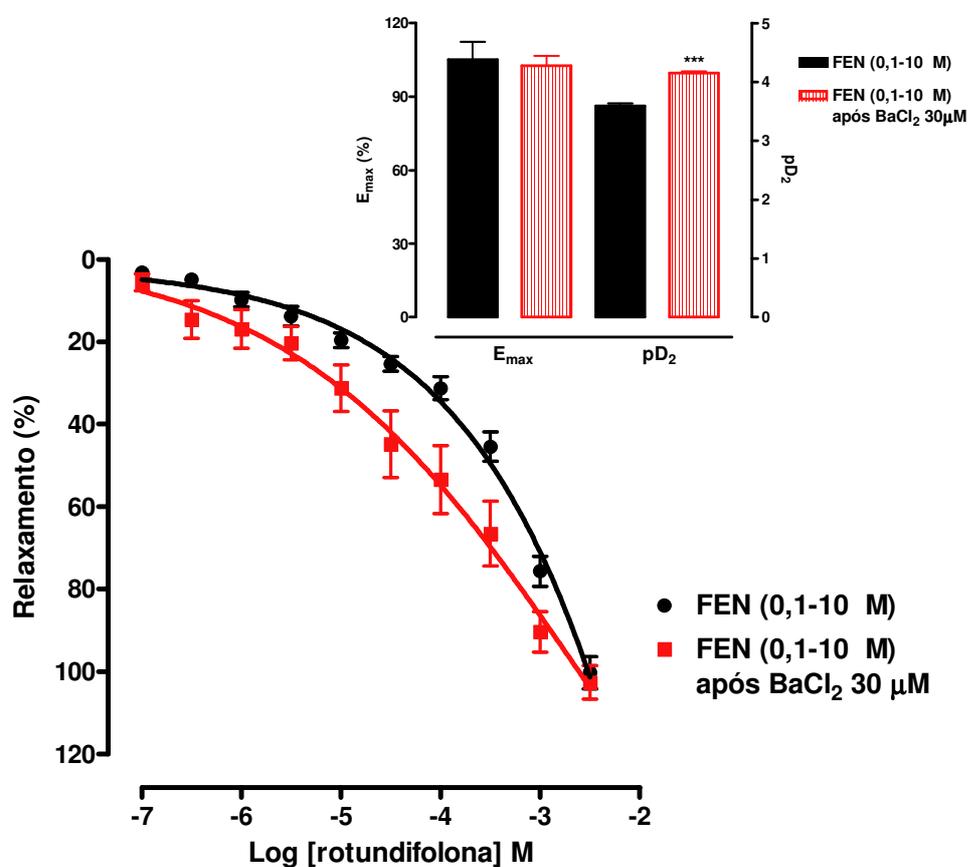
Para investigar a participação dos  $BK_{Ca}^{2+}$  nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona, foram realizados experimentos na presença de TEA 1mM, que nesta concentração é considerado um bloqueador seletivo dos  $BK_{Ca}^{2+}$  (COX, 2001), ou na presença de caribdotoxina (0,1  $\mu$ M), um bloqueador  $BK_{Ca}^{2+}$  e dos  $IK_{Ca}^{2+}$  (GHISDAL; MOREL, 2001). Nestas condições, a curva concentração-resposta de rotundifolona foi deslocada para direita com alterações significativas nos valores de  $E_{max}$  ( $87,3 \pm 4,2$  %), mas não nos valores de  $pD_2$  ( $3,6 \pm 0,03$ ) para os ensaios na presença de TEA 1 mM (figura 30A), já nos estudos com caribdotoxina 0,1  $\mu$ M, alterações significativas foram observadas nos valores de  $pD_2$  ( $3,2 \pm 0,01$ ), mas não nos valores de  $E_{max}$  ( $91,71 \pm 4,7$ ) quando comparados aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu$ M - 10  $\mu$ M) ( $pD_2 = 3,6 \pm 0,03$  e  $E_{m\grave{a}x} = 100,3 \pm 3,8$  %, n=9) (Figura 30B).



**Figura 30:** Influência dos  $BK_{Ca}^{2+}$  no efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN, sem endotélio intacto, pré-contraídos com FEN (0,1-10  $\mu$ M). A, curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7} - 3 \times 10^{-3}$  M) na ausência ( $\bullet$ ) ou na presença de TEA (1 mM) ( $n=7$ ) ( $\blacksquare$ ). B, curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7} - 3 \times 10^{-3}$  M) na ausência ( $\bullet$ ) ou na presença de caribdotoxina (0,1  $\mu$ M) ( $n=5$ ) ( $\blacksquare$ ). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 5 experimentos, respectivamente. \* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  vs FEN (0,1-10  $\mu$ M).

### **5.5. Influência dos canais $K_{Ir}$ na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN**

Para avaliar a participação dos canais para  $K^+$  retificador de entrada nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona, foram realizados experimentos na presença de  $BaCl_2$   $30\mu M$ , bloqueador destes canais (EDWARDS et al, 1998; KAWABATA et al., 2004). Nestas condições, a curva concentração-resposta de rotundifolona foi deslocada para esquerda com alterações significativas nos valores de  $pD_2$  ( $4,2 \pm 0,03$  %)  $p < 0,0001$ , mas não nos valores de  $E_{m\grave{a}x}$  ( $102,7 \pm 4,07$ ), quando comparados aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN ( $0,1 \mu M$  -  $10 \mu M$ ) ( $pD_2 = 3,6 \pm 0,03$  e  $E_{m\grave{a}x} = 100,3 \pm 3,8$  %,  $n=12$ ) (Figura 31).

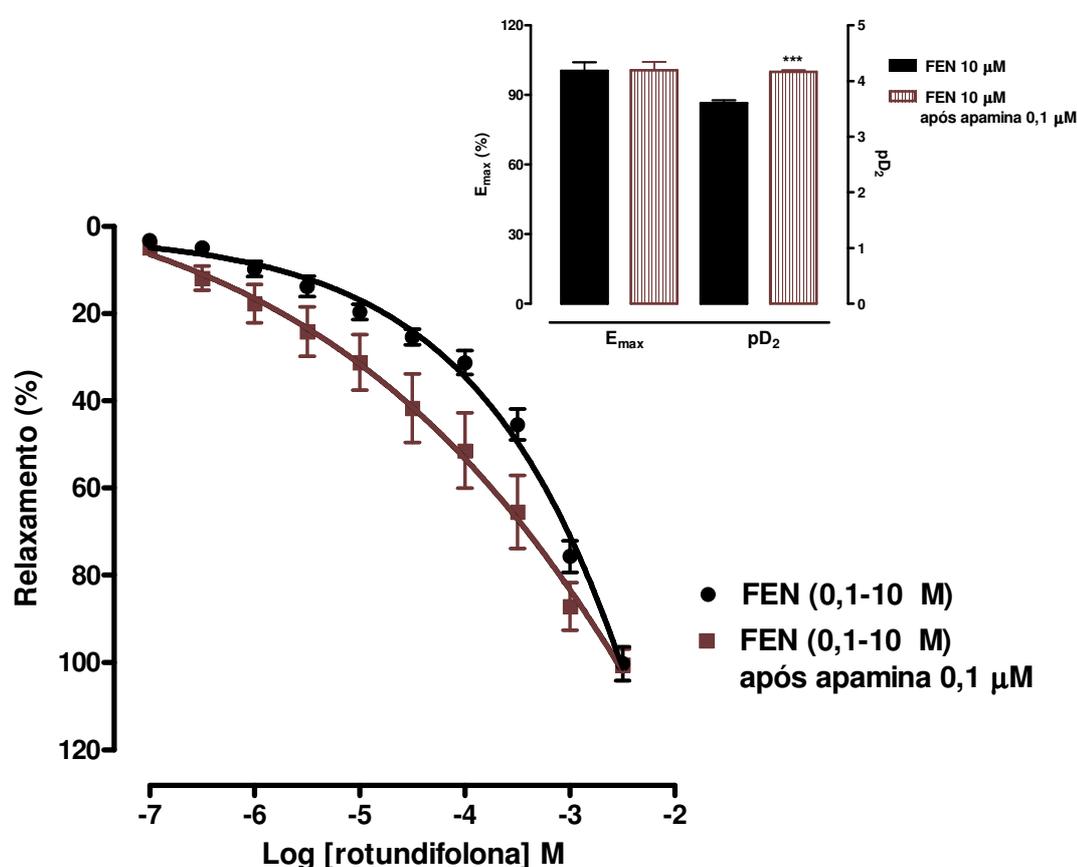


**Figura 31:** Influência canais para K<sup>+</sup> retificadores de entrada nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona. No gráfico inferior, Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (0,1-10 μM) na ausência (●) e na presença de BaCl<sub>2</sub> (30 μM) (■). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de E<sub>max</sub> e pD<sub>2</sub> para os resultados obtidos com endotélio removido na presença ou na ausência de BaCl<sub>2</sub> (30 μM). Os valores estão expressos como média ± e.p.m. de 12 e 9 experimentos, respectivamente. \*\*\* p<0,0001 vs FEN (0,1-10 μM).

### 5.6. Influência dos SK<sub>Ca</sub><sup>2+</sup> na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN

Para investigar a participação dos canais para K<sup>+</sup> sensíveis ao Ca<sup>2+</sup> de pequena condutância - SK<sub>Ca</sub><sup>2+</sup> nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona, foram realizados experimentos na presença de apamina (0,1 μM), bloqueador destes canais

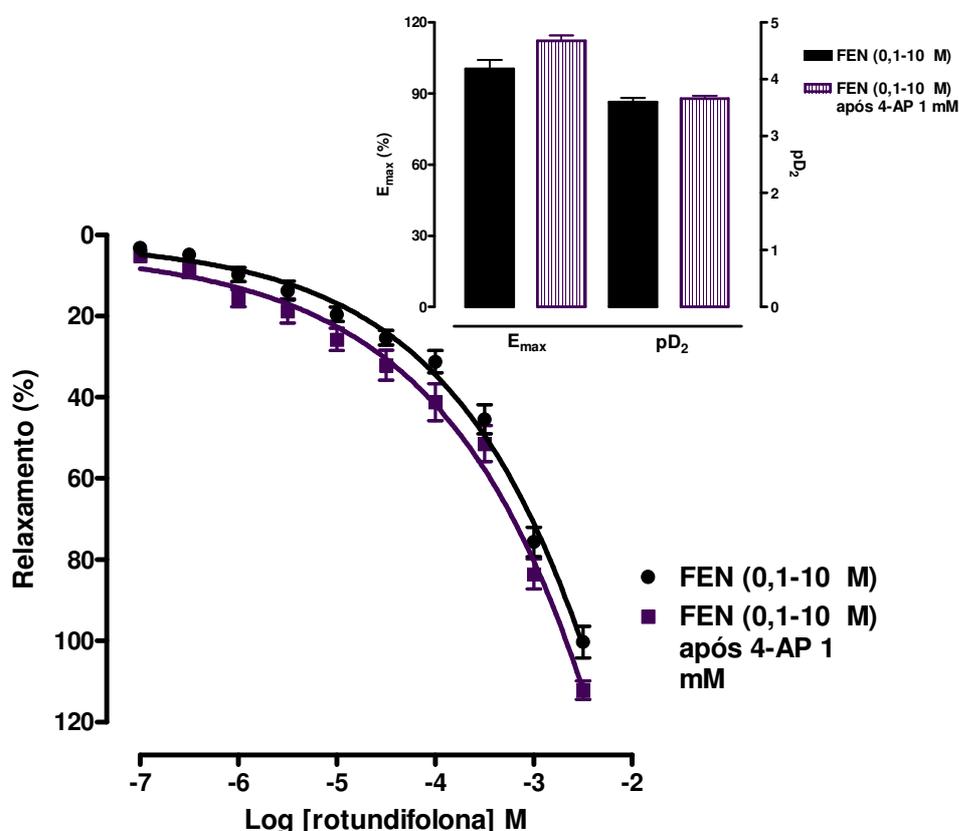
(GHISDAL; MOREL, 2001). Nestas condições, a curva concentração-resposta de rotundifolona também foi deslocada para esquerda com alterações significativas nos valores de  $pD_2$  ( $4,2 \pm 0,03$  %)  $p < 0,0001$ , mas não nos valores de  $E_{m\grave{a}x}$  ( $100,6 \pm 3,6$ ), quando comparados aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN ( $0,1 \mu\text{M} - 10 \mu\text{M}$ ) ( $pD_2 = 3,6 \pm 0,03$  e  $E_{m\grave{a}x} = 100,3 \pm 3,8$  %,  $n=12$ ) (Figura 32).



**Figura 32:** Influência canais para  $K^+$  sensíveis ao  $Ca^{2+}$  de pequena condutância nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona. No gráfico inferior, Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7} - 3 \times 10^{-3} \text{M}$ ) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN ( $0,1-10 \mu\text{M}$ ) na ausência (●) e na presença de apamina ( $0,1 \mu\text{M}$ ) (■). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio removido na presença ou na ausência de apamina ( $0,1 \mu\text{M}$ ). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 9 experimentos, respectivamente. \*\*\*  $p < 0,0001$  vs FEN ( $0,1-10 \mu\text{M}$ ).

### **5.7. Influência dos canais para K<sup>+</sup> retificadores retardados na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN**

Para investigar a participação dos canais para K<sup>+</sup> retificador retardado nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona, foram realizados experimentos na presença de 4-aminopiridina (1 mM), bloqueador destes canais (GHISDAL; MOREL, 2001). Nestas condições, nenhuma alteração significativa foi observada na curva concentração-resposta de rotundifolona, bem como nos valores de pD<sub>2</sub> ( $4,2 \pm 0,03$  %) e nos valores de E<sub>máx</sub> ( $100,6 \pm 3,6$ ), quando comparados aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN (0,1 μM - 10 μM) (pD<sub>2</sub> =  $3,6 \pm 0,03$  e E<sub>máx</sub> =  $100,3 \pm 3,8$  %, n=12) (Figura 33).

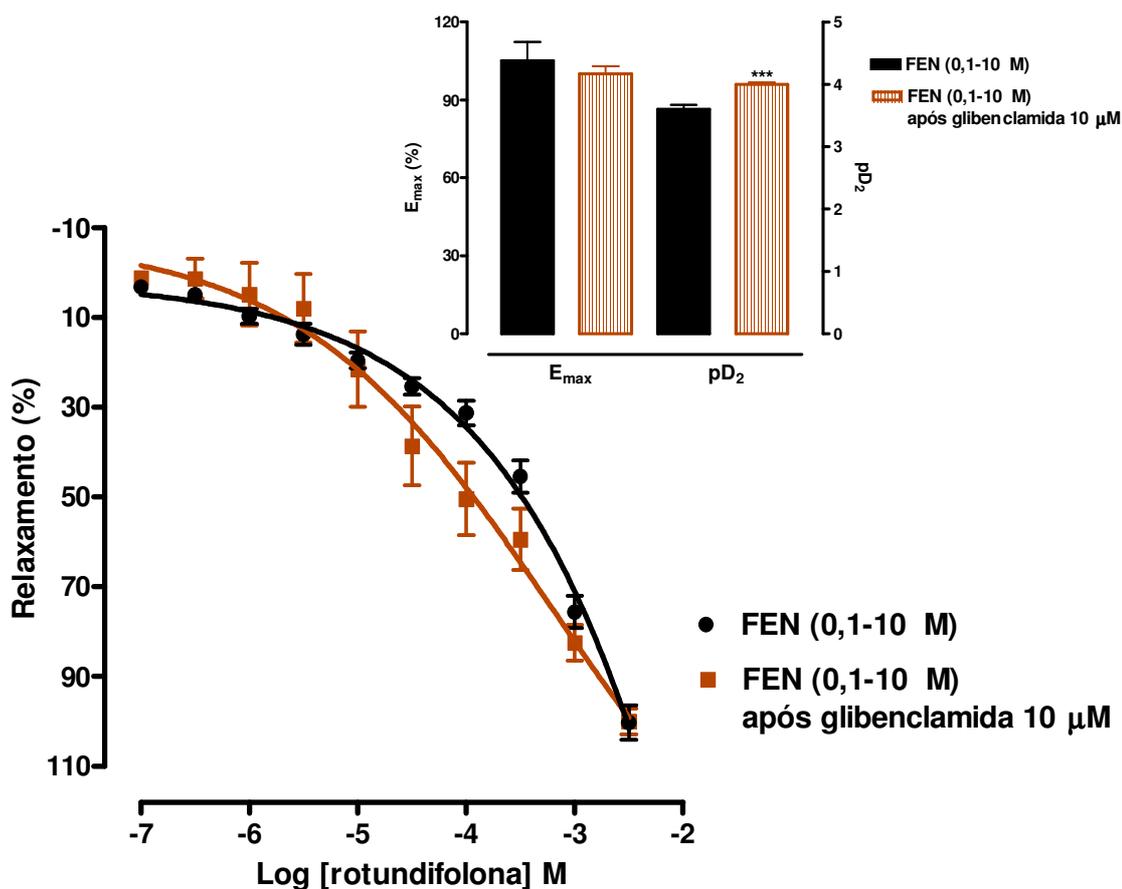


**Figura 33:** Influência canais para  $K^+$  retificador retardado nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona. No gráfico inferior, Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (0,1-10  $\mu$ M) na ausência (●) e na presença de 4-aminopiridina (1 mM) (■). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio removido na presença ou na ausência de 4-aminopiridina (1 mM). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 9 experimentos, respectivamente.

### 5.8. Influência dos canais para $K^+$ sensíveis a ATP na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LN

Para investigar a participação dos canais para  $K^+$  sensíveis a ATP nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona, foram realizados experimentos na presença de glibenclamida (10  $\mu$ M), um bloqueador destes canais (WANG et al, 2007). Nestas condições, curva concentração-resposta de rotundifolona foi deslocada para esquerda,

apresentando alterações significativas ( $p < 0,01$ ) nos valores de  $pD_2$  ( $3,9 \pm 0,03$  %), mas não nos valores de  $E_{max}$  ( $100,6 \pm 2,9$ ), quando comparados aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN ( $0,1 \mu\text{M} - 10 \mu\text{M}$ ) ( $pD_2 = 3,6 \pm 0,03$  e  $E_{max} = 100,3 \pm 3,8$  %,  $n=12$ ) (Figura 34).



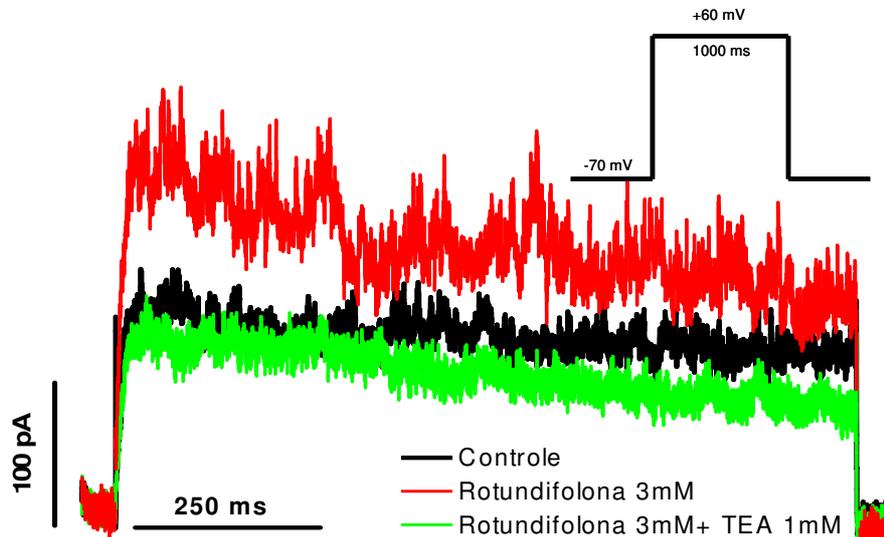
**Figura 34:** Influência canais para  $K^+$  sensíveis a ATP nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona. No gráfico inferior, Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7} - 3 \times 10^{-3} \text{M}$ ) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN ( $0,1-10 \mu\text{M}$ ) na ausência (●) e na presença de glibenclamida ( $10 \mu\text{M}$ ) (■). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio removido na presença ou na ausência de glibenclamida ( $10 \mu\text{M}$ ). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 5 experimentos, respectivamente. \*\*\*  $p < 0,001$  vs FEN ( $0,1-10 \mu\text{M}$ ).

### 5.9. Efeito de rotundifolona sobre os canais para potássio em miócitos da artéria mesentérica superior isolada de rato SD

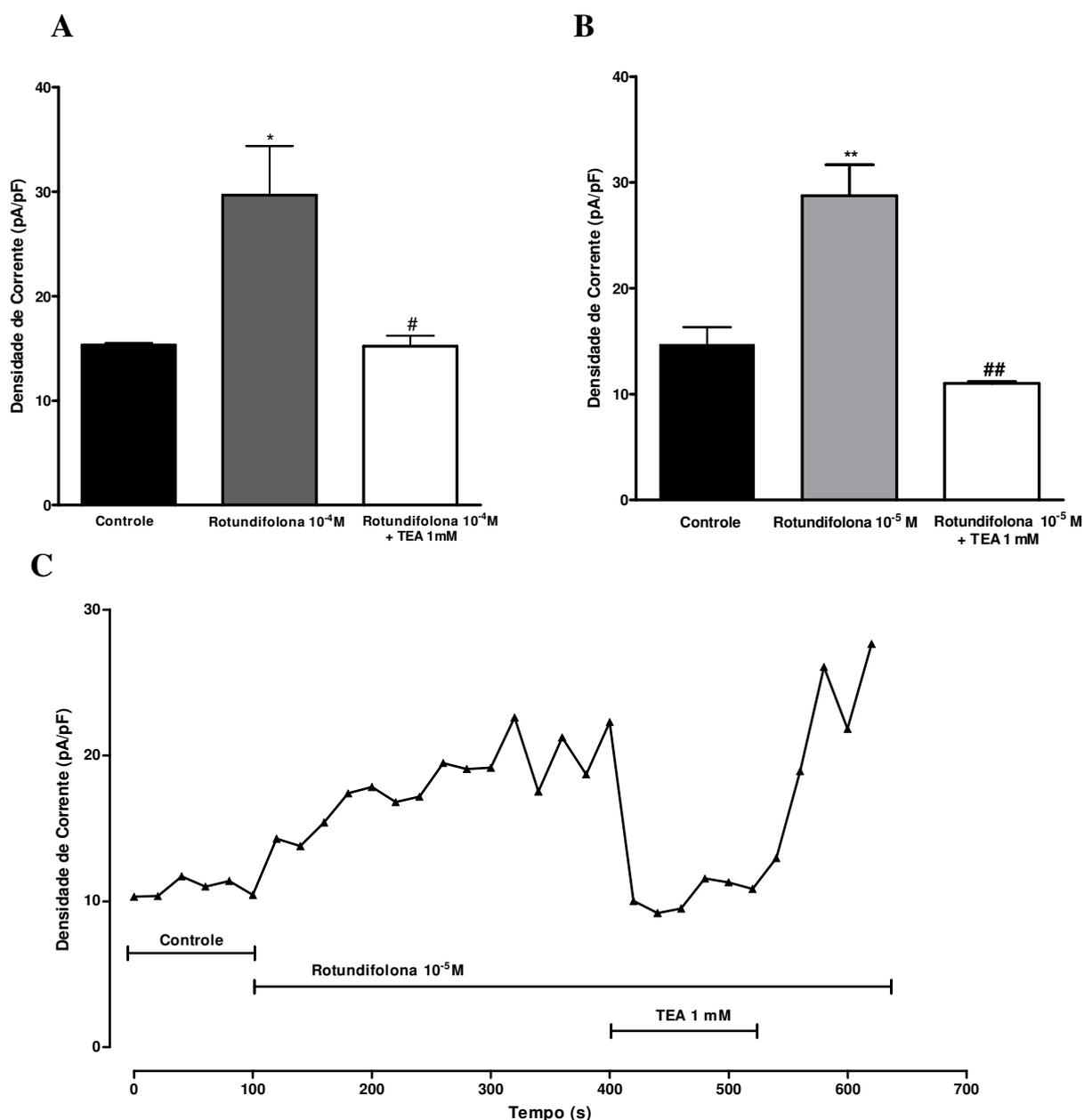
Com objetivo de avaliarmos as evidências funcionais que indicam o envolvimento dos canais para  $K^+$  na resposta vasorelaxante induzido por rotundifolona, foram realizados experimentos de fixação de voltagem usando a técnica de patch clamp. Os canais para  $K^+$  foram estimulados por pulsos de voltagem despolarizantes partindo do potencial de holding (-70 mV) para +60 mV por um período de 1000 ms. Utilizando células musculares lisas recém dispersas de artéria mesentérica isolada de ratos normotensos, foram registradas correntes de  $K^+$  na ausência e na presença de rotundifolona ( $10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M). A amplitude do pico das correntes de entrada à +60 mV variaram entre 98 à 420 pA, sendo o valor médio igual a  $216,1 \pm 33$  pA ( $n=10$ ) (figura 35).

Como apresentado na figura 36 A que mostra o gráfico de barras dos valores de pico das correntes de potássio, normalizadas pela capacitância das células (pA/pF), rotundifolona ( $10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M) aumentou, de maneira significativa ( $p<0,01$ ) as correntes de  $K^+$  em miócitos da artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso [ $29,9 \pm 4,3$  pA/pF ( $n=7$ ) e  $28,7 \pm 2,9$  pA/pF ( $n=3$ ) na presença de  $10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M de rotundifolona, respectivamente; +60 mV], quando comparado aos valores controle [ $14,7 \pm 1,6$  pA/pF ( $n=6$ ) e  $15,8 \pm 0,5$  pA/pF ( $n=3$ ), respectivamente, +60 mV].

TEA (1mM), um bloqueador dos  $BK_{Ca}^{2+}$  (COX, 2001) foi utilizado para investigar a relação entre estes canais e as alterações eletrofisiológicas em miócitos vasculares induzidas por rotundifolona. Ao perfundir as células com rotundifolona ( $10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M) juntamente com TEA 1mM, o efeito do monoterpeno sobre as correntes de potássio foram abolidas [ $(11,0 \pm 0,18$  pA/pF ( $n=3$ ) e  $15,8 \pm 0,5$  pA/pF ( $n=3$ ), respectivamente, +60 mV] (Figura 36 B). O período de tempo necessário para que rotundifolona exercesse o seu efeito máximo, sobre as correntes de  $K^+$ , em miócitos mesentéricos, foi de aproximadamente 4 min, como mostrado no gráfico 36 C que mostra o decurso-temporal do efeito de rotundifolona nas correntes de  $K^+$ .



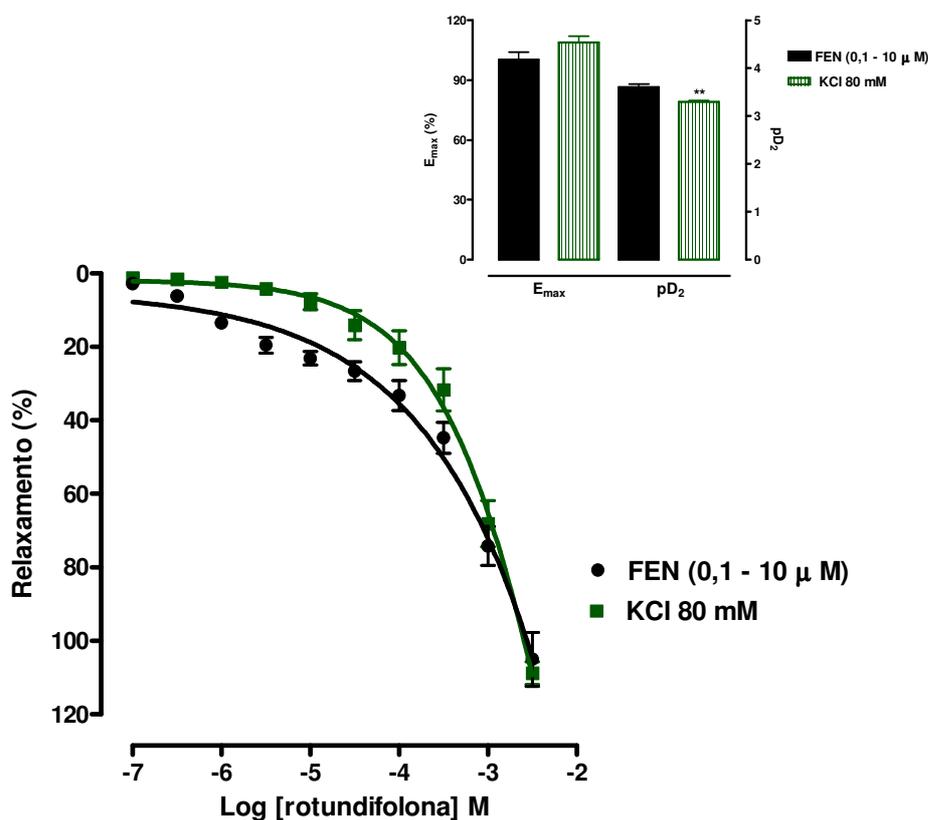
**Figura 35:** Traçado original representativo do efeito de rotundifolona nas correntes de K<sup>+</sup> em miócitos de artéria mesentérica isolada de rato SD. Na parte superior protocolo experimental realizado em miócitos vasculares.



**Figura 36:** Efeito de rotundifolona nas correntes de  $K^+$  em miócitos de artéria mesentérica isolada de rato SD. A, Gráfico de barras mostrando as variações do pico das correntes normalizadas (pA/pF), registradas nas condições controle e após a exposição a  $10^{-5}$  M de rotundifolona sozinha ou em conjunto com TEA (1 mM). B, Gráfico de barras semelhante ao gráfico A, no entanto na presença de  $10^{-4}$  M de rotundifolona. C, decurso-temporal das respostas de rotundifolona ( $10^{-5}$  M) e TEA (1 mM) nas correntes de  $K^+$  em miócitos mesentéricos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 7 ( $10^{-5}$ ) e 3 experimentos ( $10^{-4}$ ), respectivamente. \* $P < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs controle e # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs rotundifolona.

### 5.10. Efeito da rotundifolona sobre anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, pré-contraídos com KCl 80 mM

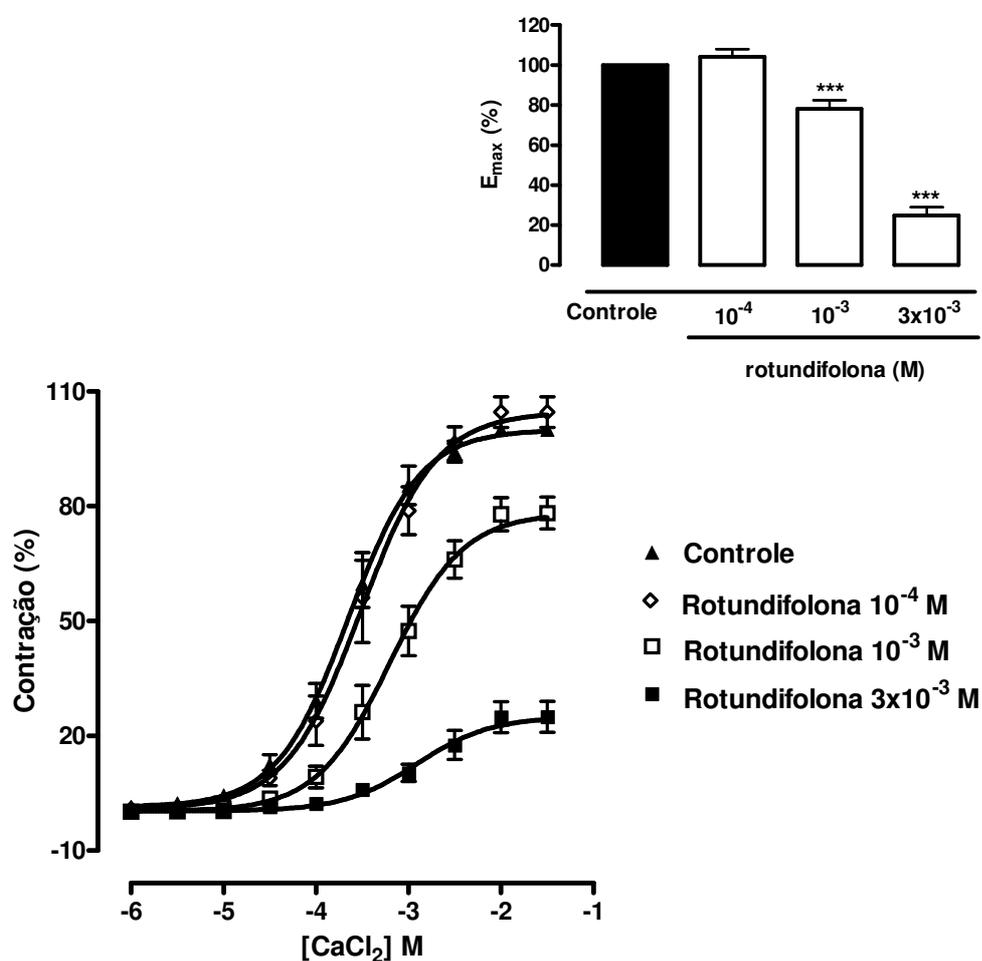
Rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) induziu vasorelaxamento dependente de concentração em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 80 mM). Interessantemente, a curva concentração-resposta para rotundifolona, em anéis sem endotélio, foi deslocada para direita como indicado pela significativa diminuição no  $pD_2 = 3,3 \pm 0,02$  ( $p < 0,01$ ) porém, sem alterar o valor do  $E_{m\grave{a}x} = 108,0 \pm 3,1$  % ( $n=8$ ) quando comparado aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN ( $0,1 \mu M$  -  $10 \mu M$ ) ( $pD_2 = 3,6 \pm 0,03$  e  $E_{m\grave{a}x} = 100,3 \pm 3,8$  %,  $n=12$ ) (Figura 37).



**Figura 37:** Efeito de rotundifolona em anéis mesentéricos pré-contraídos com solução de alto  $K^+$  extracelular (80 mM). Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN ( $0,1$  -  $10 \mu M$ ) (●) ou com KCl 80 mM (■). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 8 experimentos, respectivamente. \*\*  $p < 0,01$  vs FEN ( $0,1$  -  $10 \mu M$ )

**5.11. Influência de rotundifolona sobre o influxo de Cálcio**

Para avaliar se rotundifolona estaria influenciando no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para promover efeito vasorelaxante em anéis de artéria mesentérica, foram realizados experimentos induzindo contrações com  $\text{CaCl}_2$  em meio despolarizante, mas ausente de  $\text{Ca}^{2+}$ . A administração cumulativa de  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-6}$  -  $3 \times 10^{-2}$  M) promoveu uma contração, dependente de concentração, em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio funcional (Figura 38). Quando os anéis foram incubados com rotundifolona ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M) a curva concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$  foi significativamente atenuada de maneira dependente de concentração e com perfil não-competitivo, como mostra as alterações nos valores de  $E_{\text{max}}$  ( $100.0 \pm 0.0$ ;  $104 \pm 4.0$ ;  $78,2 \pm 4,2$  e  $24,9 \pm 4,1$  %, respectivamente) (Figura 38).



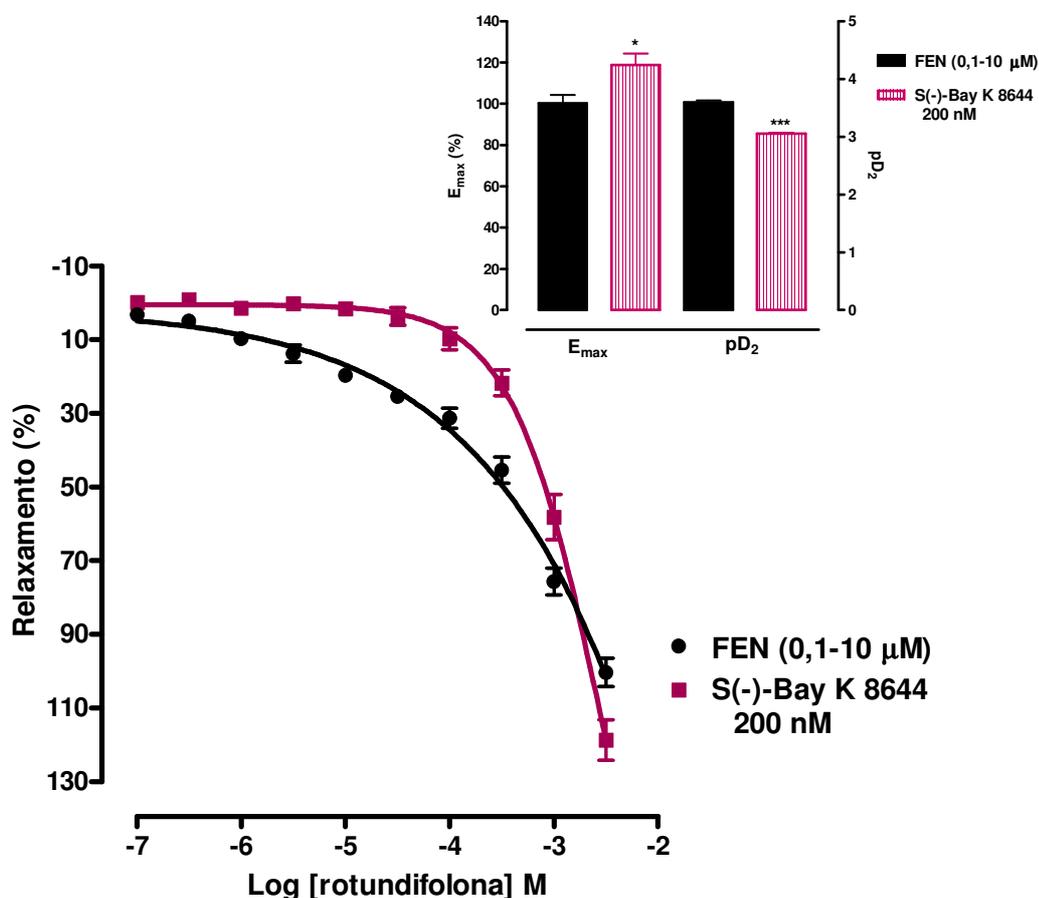
**Figura 38:** Influência de rotundifolona sobre o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Na parte inferior, curvas concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$  em solução despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional, na ausência (Controle) e na presença de concentrações isoladas de rotundifolona ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{\text{max}}$  para os resultados obtidos na ausência (controle) e na presença de rotundifolona ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 5 experimentos para cada concentração. \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle.

### 5.12. Efeito da rotundifolona sobre as contrações induzidas por um agonista dos canais para $\text{Ca}^{2+}$ sensíveis a voltagem do Tipo-L

Para avaliar se rotundifolona influencia no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem ( $\text{Cav}$ ) do tipo-L foi utilizado S(-)-Bay K 8644, um agonista destes canais (DONG et al., 1997), para induzir desenvolvimento de força nos anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN.

Ao ser administrada cumulativamente na fase tônica da contração induzida por S(-)-Bay K 8644 (200 nM), rotundifolona ( $10^{-7}$  -  $3 \times 10^{-3}$  M) induziu um vasorelaxamento dependente de concentração em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, com alterações significativas tanto nos valores de  $\text{pD}_2 = 3,05 \pm 0,02$  ( $p < 0,0001$ ), como nos valores de  $E_{\text{máx}} = 118,7 \pm 5,5$  ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN ( $0,1 \mu\text{M}$  -  $10 \mu\text{M}$ ) ( $\text{pD}_2 = 3,6 \pm 0,03$  e  $E_{\text{máx}} = 100,3 \pm 3,8$  %,  $n=12$ ) (Figura 39).

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

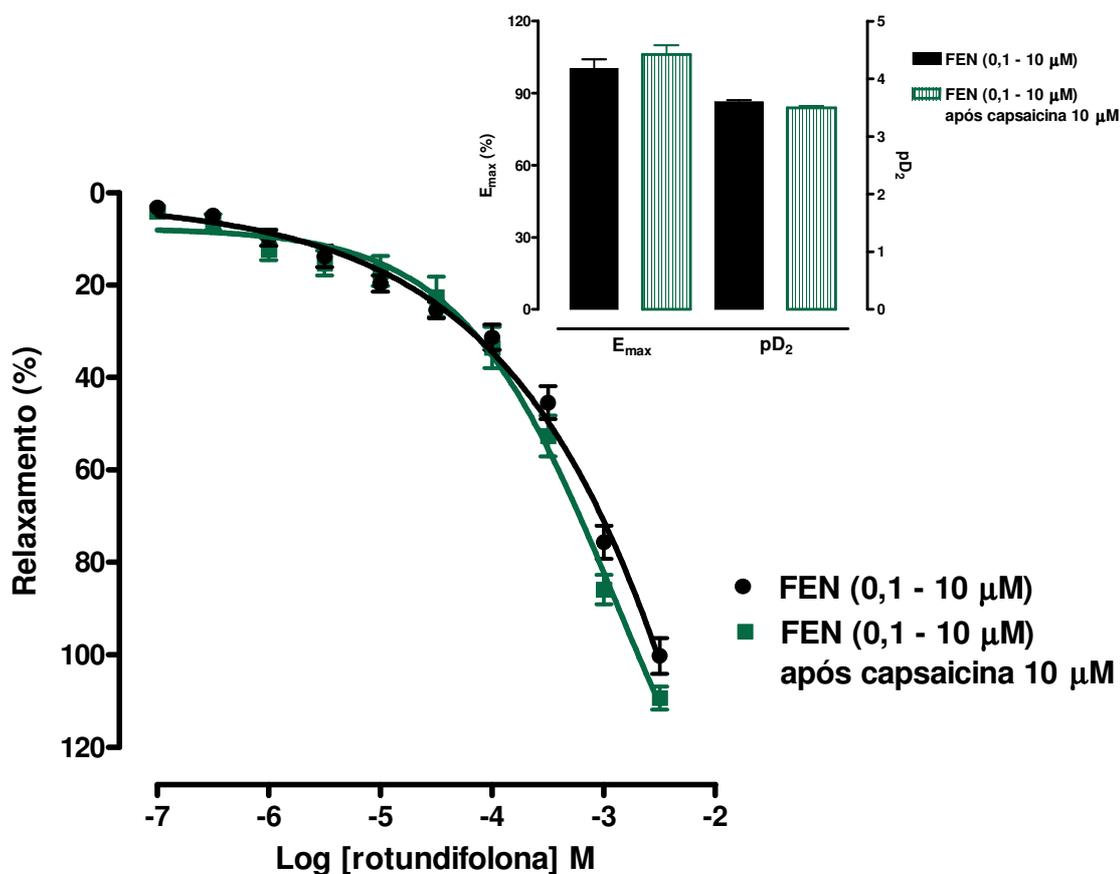


**Figura 39:** Efeito de rotundifolona nas contrações induzidas por S(-)-Bay k 8644. Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem o endotélio vascular, pré-contraídos com FEN (0,1 a 10  $\mu$ M) (●) ou S(-)-Bay K 8644 (200 nM) (■). Os valores estão expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 5 experimentos, respectivamente. \* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  vs FEN (0,1 a 10  $\mu$ M).

### 5.13. Influência dos receptores potencial-transiente de vaniloide (TRPV) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona

Para avaliar se rotundifolona poderia estimular os receptores vanilóides no nervo sensorial, levando ao vasorelaxamento por induzir a liberação do neurotransmissor vasoativo, o peptídeo relacionado ao gen da calcitonina (ZYG MUNT et al., 1999; DANNERT et al., 2007), foram realizados experimentos com anéis

mesentéricos pré-tratados com capsaicina. Nestas condições, curva concentração-resposta de rotundifolona não foi alterada significativamente, como mostrado pelos valores de  $pD_2$  ( $3,5 \pm 0,07$  %) e de  $E_{m\grave{a}x}$  ( $106,1 \pm 3,8$ ), quando comparados aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN ( $0,1 \mu\text{M} - 10 \mu\text{M}$ ) ( $pD_2 = 3,6 \pm 0,03$  e  $E_{m\grave{a}x} = 100,3 \pm 3,8$  %,  $n=12$ ) (Figura 40).



Fi

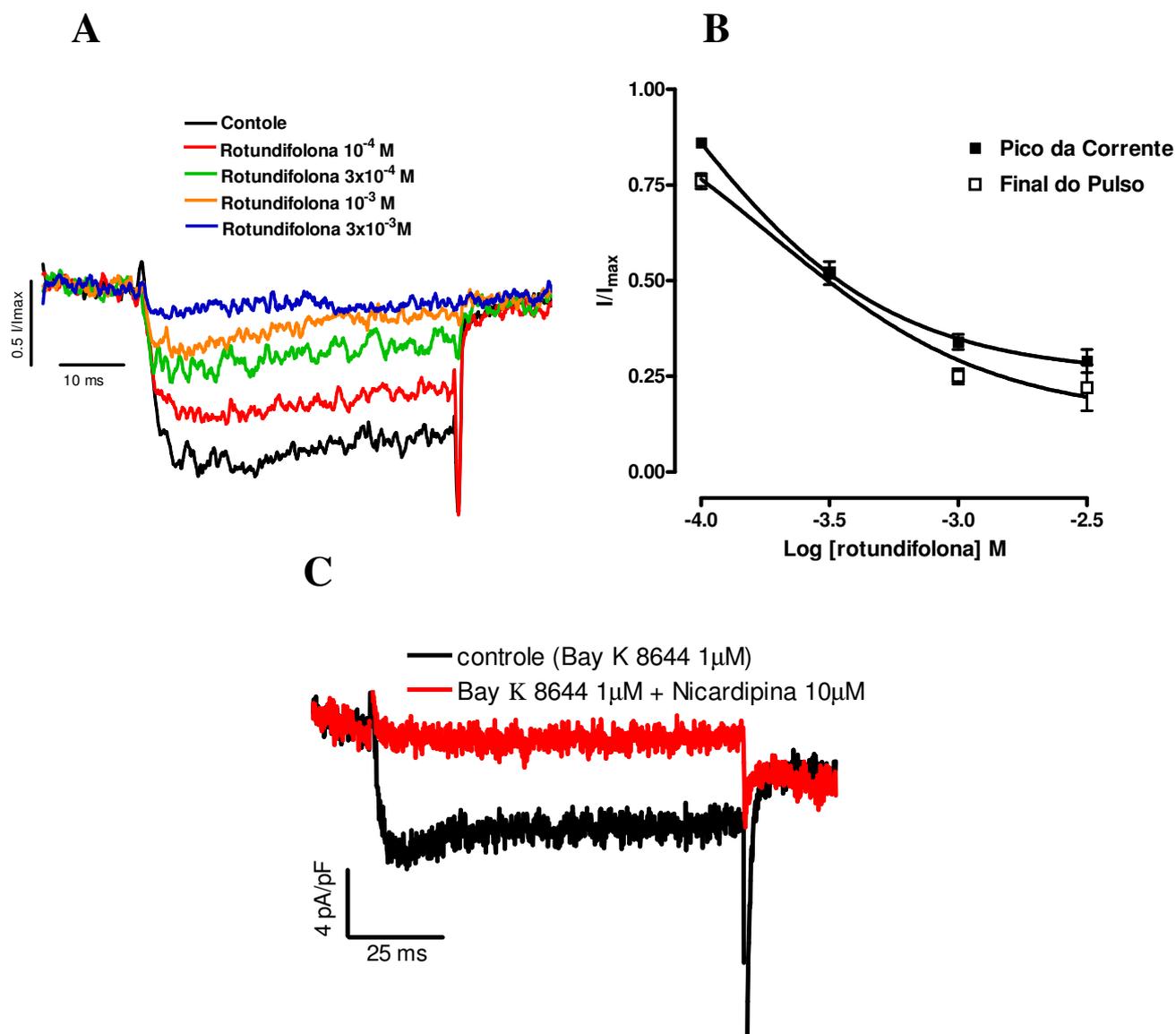
**Figura 40:** Efeito de rotundifolona em anéis mesentéricos pré-tratados com capsaicina. Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7} - 3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LN, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN ( $0,1 - 10 \mu\text{M}$ ), não tratados (●) ou tratados com capsaicina  $10 \mu\text{M}$  (■). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12 e 4 experimentos, respectivamente.

#### **5.14. Efeito de rotundifolona sobre os canais para cálcio sensíveis a voltagem em miócitos da artéria mesentérica superior de rato SD**

Para avaliar o efeito de rotundifolona sobre os  $Ca_v$ , foram realizados experimentos de fixação de voltagem usando a técnica de “patch clamp”. Utilizando células musculares lisas recém dispersas de artéria mesentérica isolada de ratos normotensos, foram registradas correntes de  $Ba^{2+}$  na ausência e na presença de rotundifolona ( $10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3} M$ ). O valor médio das capacitâncias das células estudadas neste protocolo foi  $11,5 \pm 0,14$  pF ( $n=24$ ), semelhante aos valores encontrados por PUCOVSKY, MOSS e BOLTON (2003). Em relação à amplitude do pico das correntes de entrada à +10 mV, verificou-se uma variação de corrente entre -20,1 a -93,05 pA, sendo o valor médio igual a  $-43,7 \pm 6,4$  pA ( $n=20$ ).

Em todas as concentrações de rotundifolona estudadas ( $10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3} M$ ) foi observado diminuição, de maneira concentração-dependente, das correntes de entrada de  $Ba^{2+}$ . A figura 41A mostra um registro representativo obtido na situação controle e durante a exposição de  $10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3} M$  de rotundifolona. Na figura 41B que mostra a curva concentração-resposta de rotundifolona, nas concentrações acima citadas, sobre as correntes de  $Ba^{2+}$ , pode ser observada uma diminuição, dependente de concentração, das correntes (normalizadas  $I/I_{max}$ ) de entrada de  $Ba^{2+}$ , tanto nos valores de corrente analisadas no pico ( $24,0 \pm 2,0$ ;  $48,0 \pm 3,0$ ;  $75,0 \pm 2,0$  e  $78,0 \pm 6,0$  %, respectivamente,  $n=5$ ), quanto no final do pulso ( $14,0 \pm 1,0$ ;  $48,0 \pm 3,0$ ;  $66,0 \pm 2,0$  e  $71,0 \pm 3,0$  %, respectivamente,  $n=5$ ). Esta análise foi realizada para observar se rotundifolona apresentava uma possível ação bloqueante dependente de estado (UCHIDA et al., 2001).

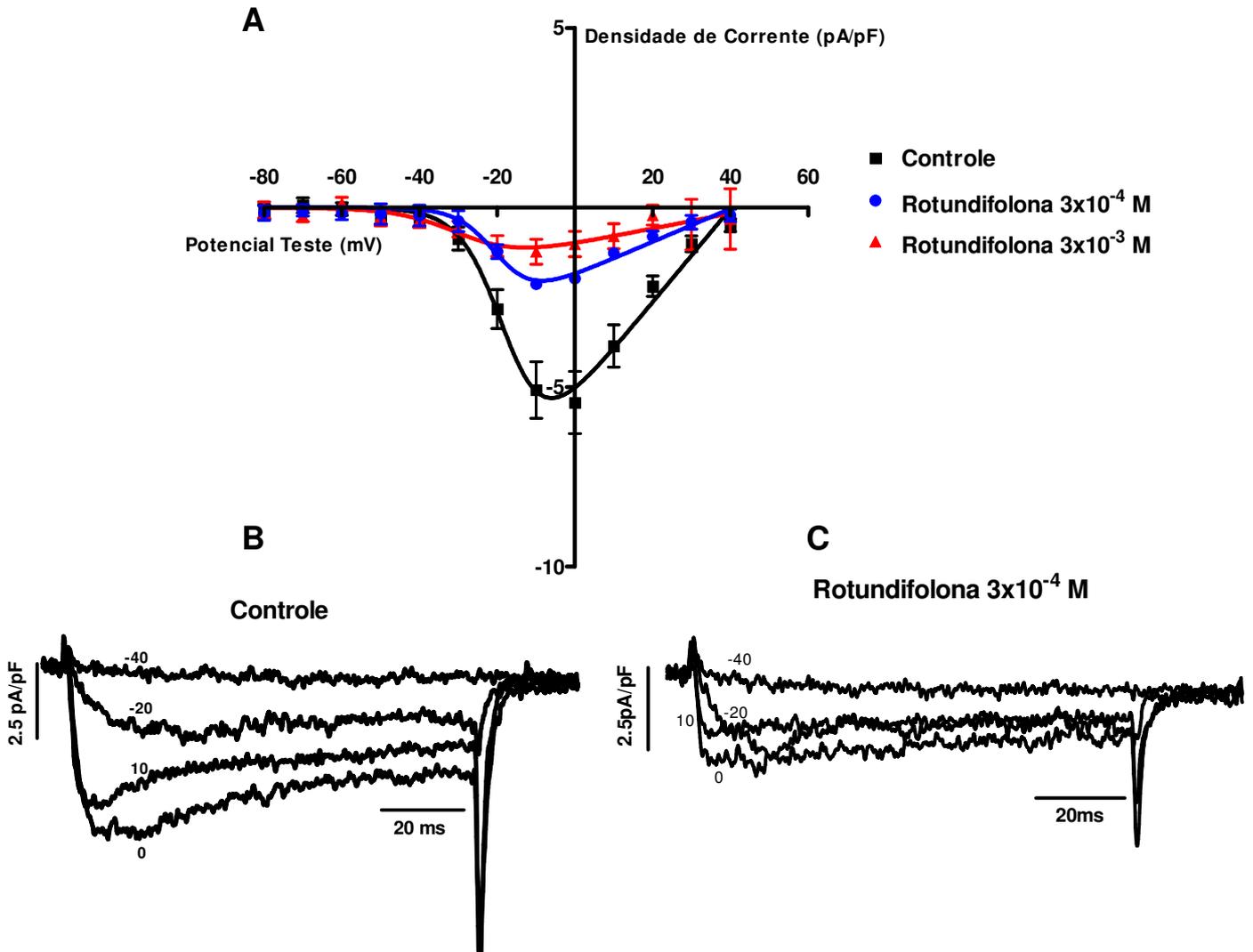
As correntes de entrada de  $Ba^{2+}$  apresentaram característica típica de correntes através dos canais para  $Ca^{2+}$  sensíveis a voltagem do tipo-L, além disso, estas correntes foram potencializadas com o ativador dos canais para  $Ca^{2+}$  sensíveis a dihidropiridinas, S(-)-Bay K 8644 ( $1 \mu M$ ) (pico das correntes =  $100,6 \pm 26,4$ ;  $n=11$ , a +10 mV) e totalmente abolidas pela exposição à um bloqueador destes canais, a nicardipina ( $10 \mu M$ ) (figura 41C).



**Figura 41:** Efeito de rotundifolona nas correntes de  $\text{Ba}^{2+}$  por canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem do tipo-L. **A**, Traçado representativo mostrando o efeito de rotundifolona ( $10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M) sobre as correntes de entrada de  $\text{Ba}^{2+}$ , obtidas por pulsos despolarizantes a +10 mV, partindo de um potencial de holding de -70 mV, em miócitos recém dispersos de artéria mesentérica superior isolada de rato SD. **B**, Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M) mostrando a inibição dependente de concentração das correntes de  $\text{Ba}^{2+}$ , tanto no pico, quanto no final do pulso. **C**, Traçado representativo mostrando o efeito da nicardipina ( $10 \mu\text{M}$ ) sobre as correntes de  $\text{Ba}^{2+}$  em miócitos de artéria mesentérica de rato, essas correntes foram obtidas na presença de S(-)-Bay K 8644 ( $1 \mu\text{M}$ ). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 5 experimentos para cada concentração.

### **5.15. Efeito de rotundifolona sobre a curva I/V para os Cav em miócitos da artéria mesentérica superior de rato normotenso**

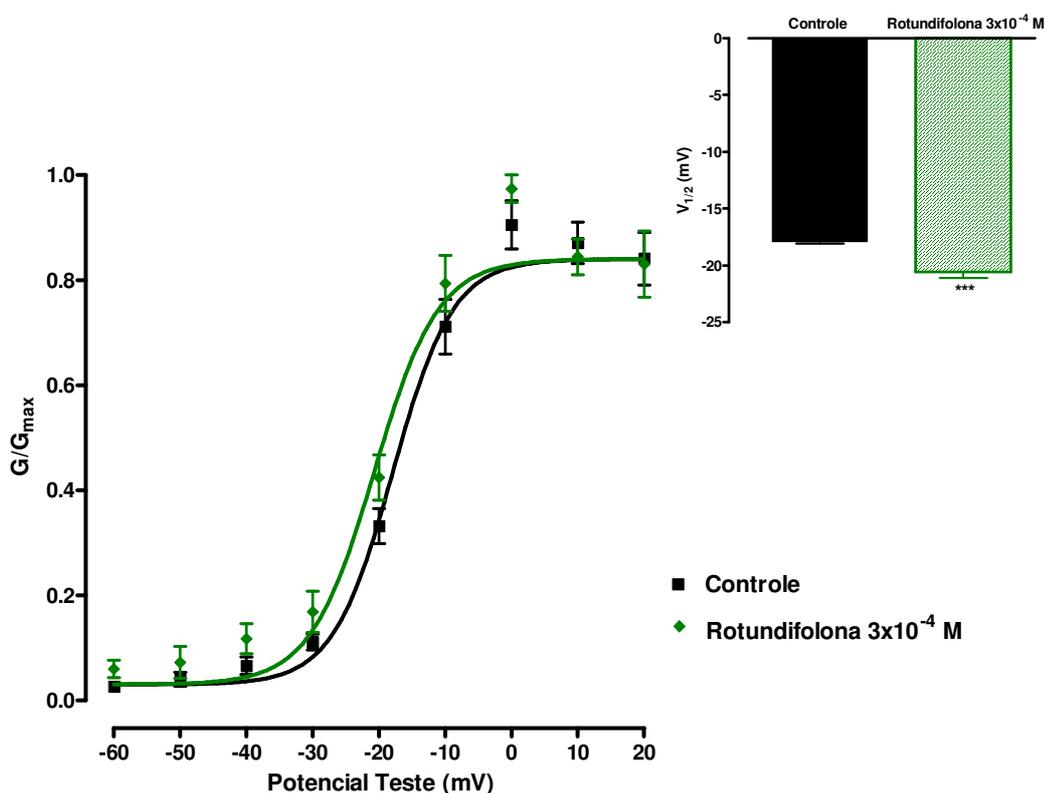
A relação corrente voltagem (I/V) foi obtida por estímulos despolarizantes como descrito anteriormente em métodos, na situação controle, solução externa contendo Bay K 8644 (1  $\mu$ M) ou na situação teste, perfundindo-se a célula com solução extracelular contendo S(-)-Bay K 8644 (1  $\mu$ M) e rotundifolona ( $3 \times 10^{-4}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M). Rotundifolona reduziu a amplitude da curva I/V de maneira significativa (pico das correntes =  $-2,13 \pm 0,08$  pA/pF; n=5;  $-1,23 \pm 0,4$  pA/pF; n=9, respectivamente) quando comparada a situação controle (pico das correntes =  $-5,43 \pm 0,9$  pA/pF; n=11), com um aparente desvio da voltagem na qual o pico das correntes foi observado (Figura 42A). A figura 42B e 42C mostra o registro representativo das correntes de  $Ba^{2+}$  em pulsos de voltagem diferentes (-40, -20, 0 e +10 mV), na ausência ou na presença de  $3 \times 10^{-4}$  M de rotundifolona, respectivamente.



**Figura 42:** Efeito de rotundifolona sobre a curva corrente-voltagem das correntes de  $\text{Ba}^{2+}$  em miócitos recém dispersos de artéria mesentérica isolada de rato SD. **A**, Inibição dependente de concentração induzida por rotundifolona ( $3 \times 10^{-4}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M) da relação corrente-voltagem, obtida por pulsos-teste de 500 ms de duração, em incrementos de 10 mV, que despolarizou a célula até +60 mV. A curva foi obtida a partir da equação  $I/I_{\text{max}} = (g_{\text{max}} \cdot (V - V_r)) / (1 + \exp((V_{\text{act}} - x)/s))$  onde,  $V$  é o potencial teste;  $V_r$  é potencial de reversão;  $V_{\text{act}}$  é o valor de potencial que os canais começam a se ativar e  $s$  é o slope. **B**, Traçado original representativo da relação corrente-voltagem das correntes de  $\text{Ba}^{2+}$  antes (Controle). **C**, e após a adição de rotundifolona  $3 \times 10^{-4}$  M. Todas as correntes foram obtidas na presença de S(-)-Bay K 8644 (1  $\mu\text{M}$ ). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 11, 9 e 5 experimentos, respectivamente.

### 5.16. Efeito de rotundifolona sobre a cinética de ativação dos canais para cálcio sensíveis a voltagem

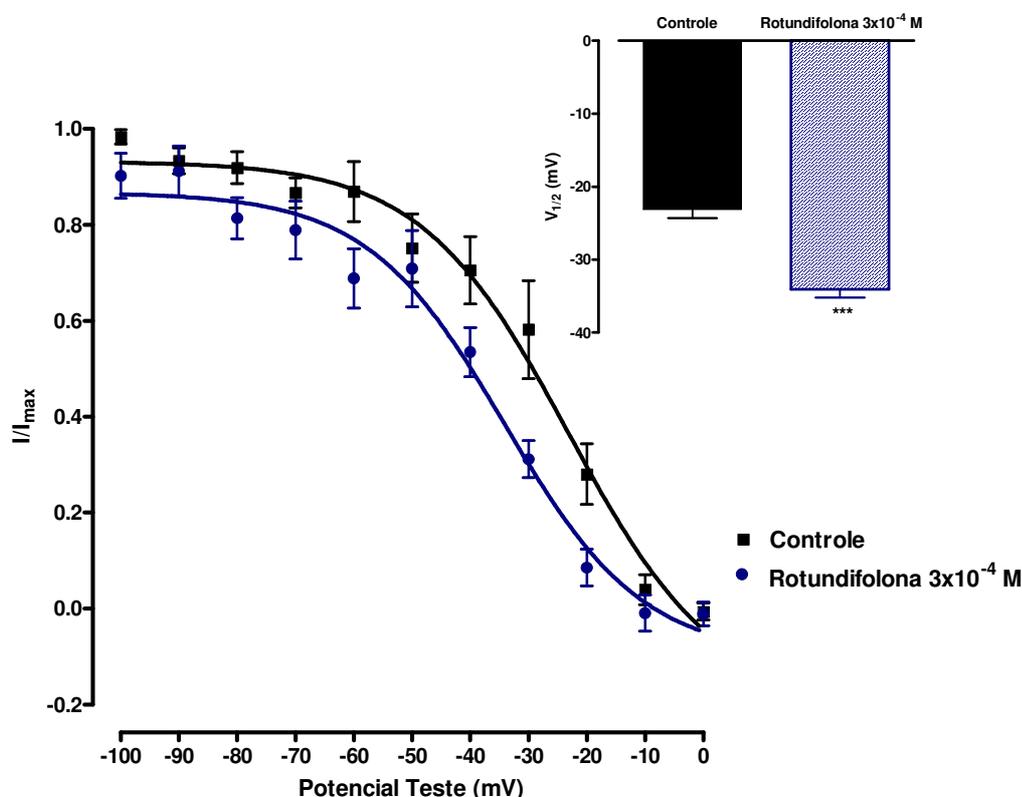
O efeito de rotundifolona sobre a cinética de ativação dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem foi analisado a partir dos valores normalizados de condutância, em função dos potenciais testes. A curva de ativação estacionária, ajustada segundo a equação de Boltzmann como descrita em métodos, foi deslocada para esquerda na presença de  $3 \times 10^{-4} \text{ M}$  de rotundifolona, com alteração significativa ( $p < 0,001$ ) dos valores de  $V_{1/2}$  ( $-20,6 \pm 0,5 \text{ mV}$ ,  $n=5$ ) quando comparado aos valores controle ( $-17,9 \pm 0,2 \text{ mV}$ ,  $n=5$ ). Porém, alterações significativas não foram observadas nos valores de inclinação das curvas ( $4,53 \pm 0,2$  e  $4,53 \pm 0,5$ ; respectivamente). (Figura 43)



**Figura 43:** Efeito de rotundifolona sobre a curva de ativação estacionária ( $m_{\infty}$ ) dos canais  $\text{Ca}^V$  tipo-L em miócitos da artéria mesentérica superior de rato SD. As curvas de ativação estacionária foram obtidas da relação corrente-voltagem (fig. 22) e ajustadas segundo equação de Boltzmann (ver Métodos) na ausência (Controle) (■) e na presença de rotundifolona  $3 \times 10^{-4} \text{ M}$  (◆). O gráfico em barra acima mostra o deslocamento do  $V_{1/2}$  induzido por rotundifolona ( $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 5 experimentos. \*  $p < 0,05$  vs Controle.

### **5.17. Efeito de rotundifolona sobre a curva de inativação estacionária para os canais $Ca_v$ tipo-L**

Neste experimento foi avaliada a disponibilidade de canais  $Ca_v$  tipo-L. Um longo pré-pulso condicionante de vários potenciais entre  $-100$  mV e  $+30$  mV, com incrementos de  $10$  mV, durante um período de  $500$  ms, foi aplicado antes do pulso teste para  $0$  mV, com duração de  $100$  ms. Observou-se nesta situação que a amplitude das correntes de  $Ba^{2+}$  obtidas no pulso teste diminuía quando a amplitude do pré-pulso aumentava. A perfusão com  $3 \times 10^{-4}$  M de rotundifolona deslocou a curva de inativação estacionária para esquerda, com alteração significativa nos valores de  $V_{0.5}$  ( $-34,07 \pm 1,1$  mV,  $n=5$ ) quando comparado aos valores controle ( $-23,1 \pm 1,2$  mV,  $n=5$ ). Porém, alterações significativas não foram observadas nos valores de inclinação das curvas ( $11,87 \pm 1,0$  e  $12,70 \pm 1,0$ ; respectivamente) (Figura 44).

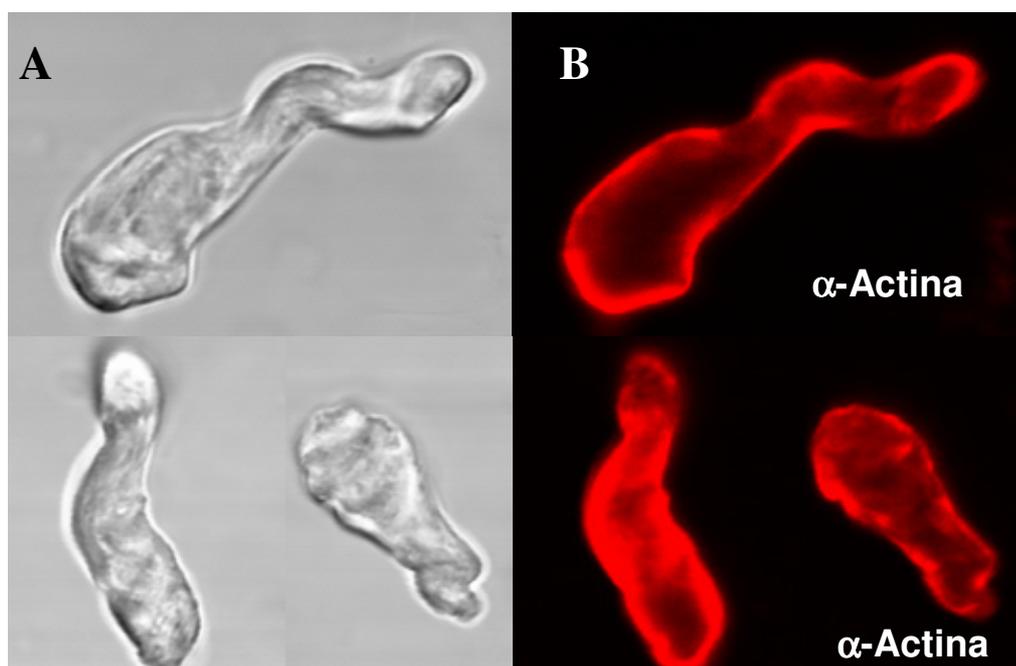


**Figura 44:** Efeito de rotundifolona ( $3 \times 10^{-4}$  M) sobre a curva de inativação estacionária ( $h_{\infty}$ ) para os canais Cav tipo-L em miócitos da artéria mesentérica superior de rato SD. As curvas de inativação estacionária foram obtidas usando o protocolo de duplo-pulso e ajustadas pela equação de Boltzmann (ver Métodos) na ausência (Controle) (■) e na presença de rotundifolona  $3 \times 10^{-4}$  M (●). As amplitudes relativas das correntes de  $Ba^{2+}$  foram mostradas em função dos potenciais no pré-pulso. O gráfico de barras acima mostra o deslocamento do  $V_{1/2}$  induzido por rotundifolona ( $3 \times 10^{-4}$  M). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 5 experimentos. \*\*\*  $p < 0,0001$  vs Controle.

### 5.18. Identificação da célula muscular lisa de artéria mesentérica

Para identificação das células musculares lisas no homogenato de células recém dispersas de artéria mesentérica isolada de ratos normotensos, foram realizados experimentos de imunofluorescência, utilizando anticorpo primário anti- $\alpha$ -actina de camundongo conjugado com anticorpo secundário contendo a sonda fluorescente, para identificação da proteína  $\alpha$ -actina, presente em células musculares. As células foram examinadas com microscopia confocal, como descrito em métodos.

A figura 45A mostra a imagem transmitida das células musculares lisas recém dispersas de artéria mesentérica isolada de rato. Em 45B, as mesmas células após excitadas em 568 nm pelo laser do confocal, emitindo fluorescência vermelha (603 nm). As células musculares lisas de artéria mesentérica utilizadas neste trabalho apresentavam as mesmas características morfológicas das observadas por Pucovsky e colaboradores, 2003.

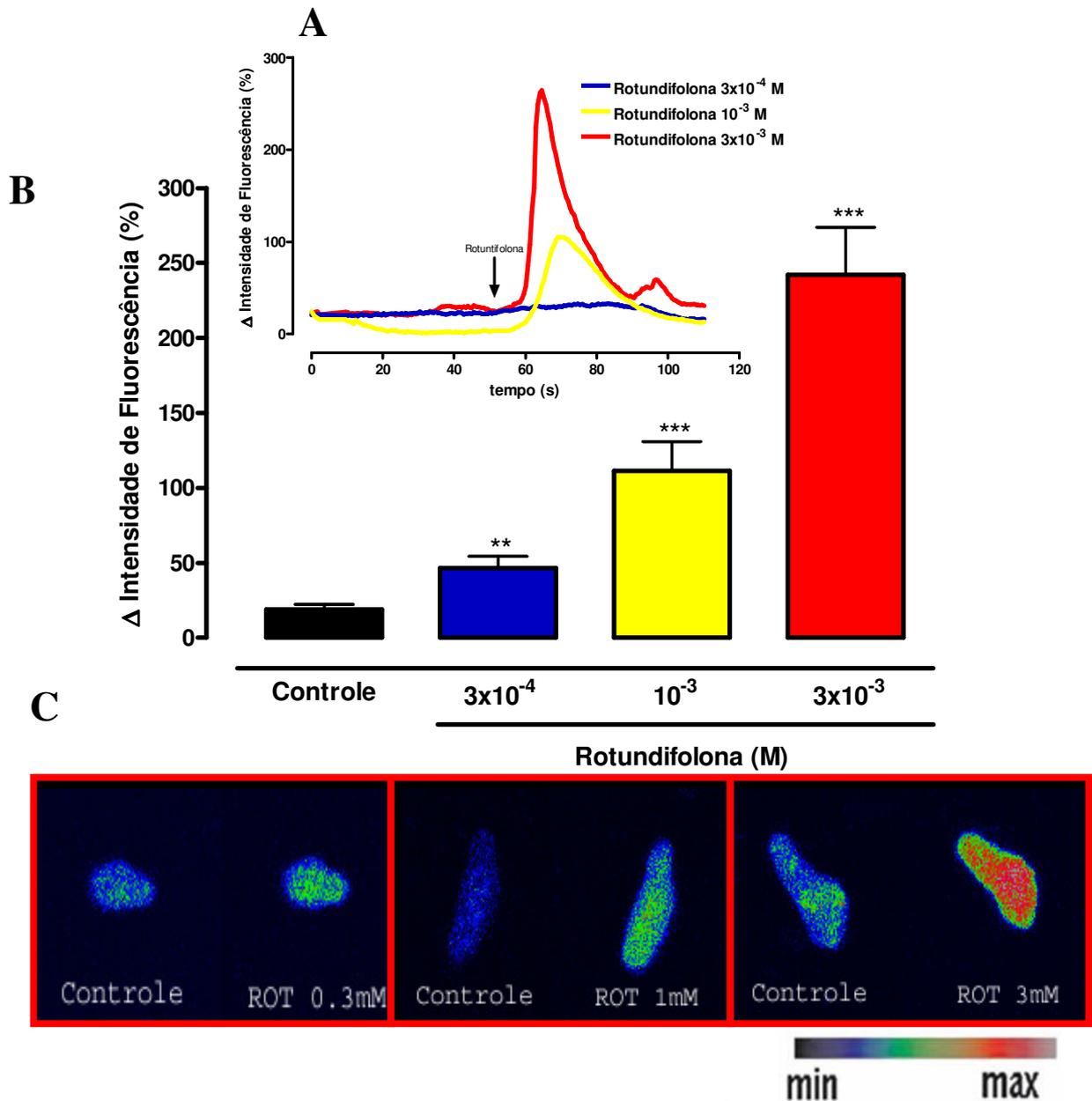


**Figura 45:** Identificação das células musculares lisas de artéria mesentérica. A, Imagens transmitidas de miócitos de artéria mesentérica SD. B, Miócitos carregados com anticorpo anti- $\alpha$ -actina conjugados com anticorpo secundário Alexa-568 fluorescente.

#### 5.19. Efeito de rotundifolona nos transiente de $\text{Ca}^{2+}$ em miócitos de artéria mesentérica isolada de rato SD

Para estudar as mudanças nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, os miócitos foram carregados com uma sonda sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$ , fluo-4, e visualizadas usando microscopia confocal de varredura a laser.

Rotundifolona ( $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3} \text{M}$ ) aumentou significativamente a intensidade de fluorescência ao  $\text{Ca}^{2+}$  em miócitos recém dispersos de artéria mesentérica carregados com Fluo-4/AM, de maneira concentração-dependente ( $46,6 \pm 7,8 \%$ ;  $n=9$ ,  $111,5 \pm 19,3 \%$ ;  $n=5$ ,  $242 \pm 31,8 \%$ ;  $n=11$ , respectivamente) quando comparado aos valores de fluorescência ao  $\text{Ca}^{2+}$  basal ( $18,9 \pm 3,4 \%$ ;  $n=12$ ). O aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  global observado durante estimulação com rotundifolona, aconteceu de maneira transiente e rápida, em torno aproximadamente de 25 s, como pode ser observado na parte superior da figura 46A.

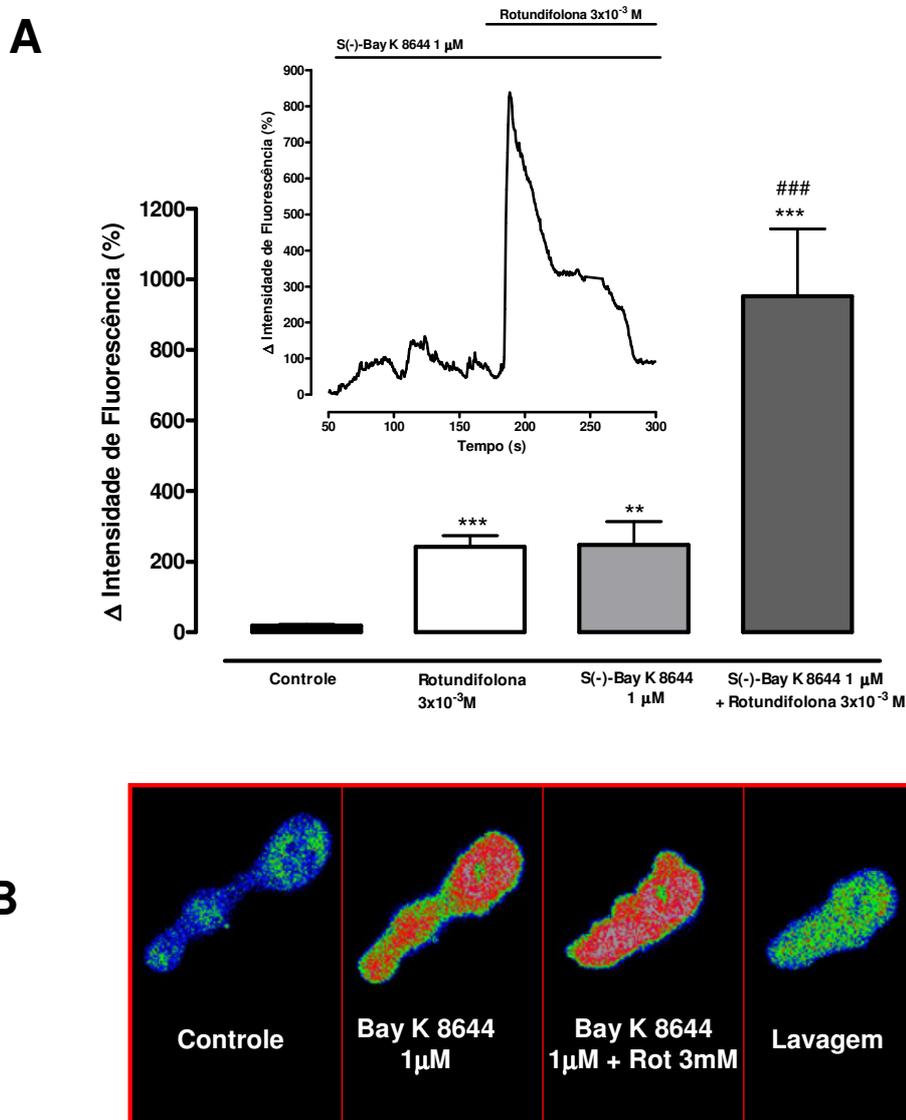


**Figura 46:** Rotundifolona aumenta a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico em miócitos de artéria mesentérica de rato SD. **A**, Registro original do efeito de rotundifolona ( $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  ou  $3 \times 10^{-3}$  M) sobre a intensidade de fluorescência ao  $\text{Ca}^{2+}$  em miócito da artéria mesentérica superior de rato carregados com Fluo-4/AM. **B**, O Gráfico de barras mostra o aumento na intensidade de fluorescência relativa normalizado pela fluorescência mínima para cada célula ( $\Delta F(\%) = (F - F_0 / F_0) * 100$ ) induzido por rotundifolona ( $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M). **C** Imagem dos miócitos fluorescentes carregados com Fluo-4/AM, antes (Controle) e durante a estimulação com rotundifolona ( $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 12, 9, 5 e 11 experimentos, respectivamente. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  vs Controle.

### **5.20. Efeito de rotundifolona na concentração de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular em miócitos estimulados com agonista dos canais para $\text{Ca}^{2+}$ sensíveis a voltagem**

Para avaliar a influência de rotundifolona em miócitos previamente estimulados com um agente contracturante, como realizado nos estudos funcionais, S(-)-Bay K 8644 (1  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado à solução de perfusão antes da exposição dos miócitos à rotundifolona.

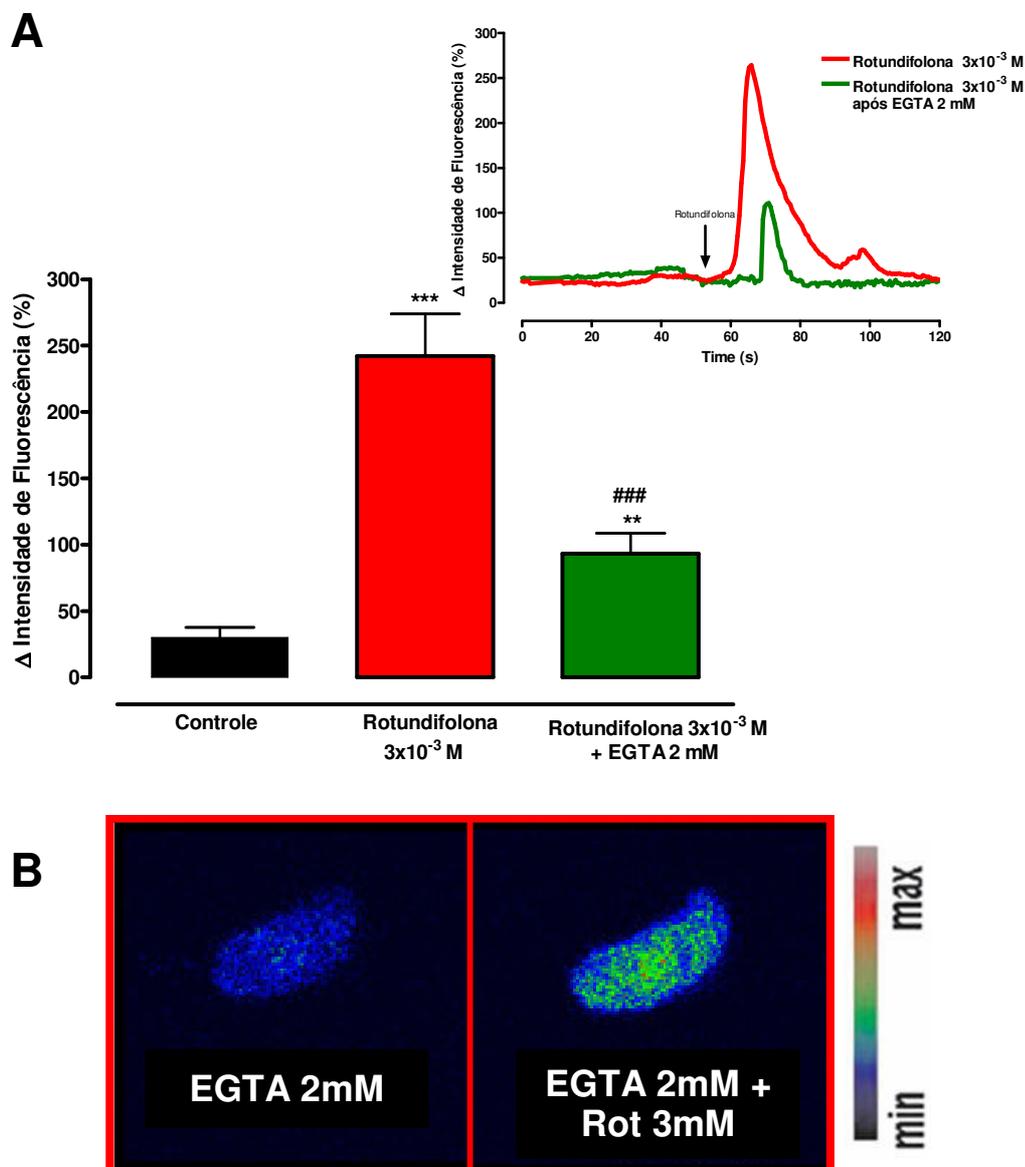
O agonista dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem, S(-)-Bay K 8644 (1 $\mu\text{M}$ ), aumentou significativamente os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  em miócitos recém dispersos da artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos, ( $247,4 \pm 66,5$  %;  $n=10$ ,  $p<0,01$ ) quando comparados aos valores de fluorescência basais ( $18,9 \pm 3,4$  %;  $n=12$ ). A adição de rotundifolona (3 mM) juntamente com S(-)-Bay K 8644 (1 $\mu\text{M}$ ) a solução de perfusão celular potencializou o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular induzido pelo ativador dos Cav tipo-L ( $951,5 \pm 191$ %;  $n=10$ ,  $p<0,0001$ ) (Figura 47).



**Figura 47:** Rotundifolona potencializou o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico induzido por S(-)-Bay K 8644 em miócitos de artéria mesentérica de rato SD. **A**, Na parte superior, registro original representativo mostrando o efeito de rotundifolona ( $3 \times 10^{-3}$  M) sobre o aumento de intensidade de fluorescência ao  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por S(-)-Bay K 8644 ( $1 \mu\text{M}$ ) em miócito de artéria mesentérica isolada de rato, carregado com Fluo-4/AM. Na parte inferior, gráfico de barras mostrando o aumento na intensidade de fluorescência ao  $\text{Ca}^{2+}$ , normalizada pela fluorescência mínima ( $\Delta F(\%) = (F - F_0 / F_0) * 100$ ), induzido por S(-)-Bay K 8644 ( $1 \mu\text{M}$ ) na ausência e presença de rotundifolona  $3 \times 10^{-3}$  M. **B**, Imagem dos miócitos fluorescentes carregados com Fluo-4/AM, antes (controle) e durante a estimulação com Bay k 8644 sozinho ou concomitantemente a rotundifolona (3mM). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  vs Controle e ### $p < 0,001$  vs S(-)-Bay K 8644.

### **5.21. Participação do $\text{Ca}^{2+}$ extracelular no aumento dos níveis intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ induzidos por rotundifolona**

Para avaliar a fonte de cálcio utilizada por rotundifolona para aumentar a fluorescência ao  $\text{Ca}^{2+}$ , no meio intracelular, em miócitos de artéria mesentérica de ratos normotensos, foram realizados experimentos na presença do quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  impermeável a membrana, EGTA (MUKHAMEDYAROV et al., 2006; KERAMIDAS et al., 1999). O aumento nos transientes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  induzidos por rotundifolona (3 mM) foi atenuado significativamente ( $p < 0,001$ ), porém não abolido, após exposição dos miócitos de artéria mesentérica a 2 mM de EGTA, permanecendo um aumento de cálcio intracelular residual. Os valores médios de intensidade de fluorescência normalizados para rotundifolona (3 mM) na ausência e presença de EGTA (2 mM) foram:  $242 \pm 31,8 \%$ ;  $n=11$  e  $93,3 \pm 15,4 \%$ ;  $n=14$ , respectivamente (Figura 48).

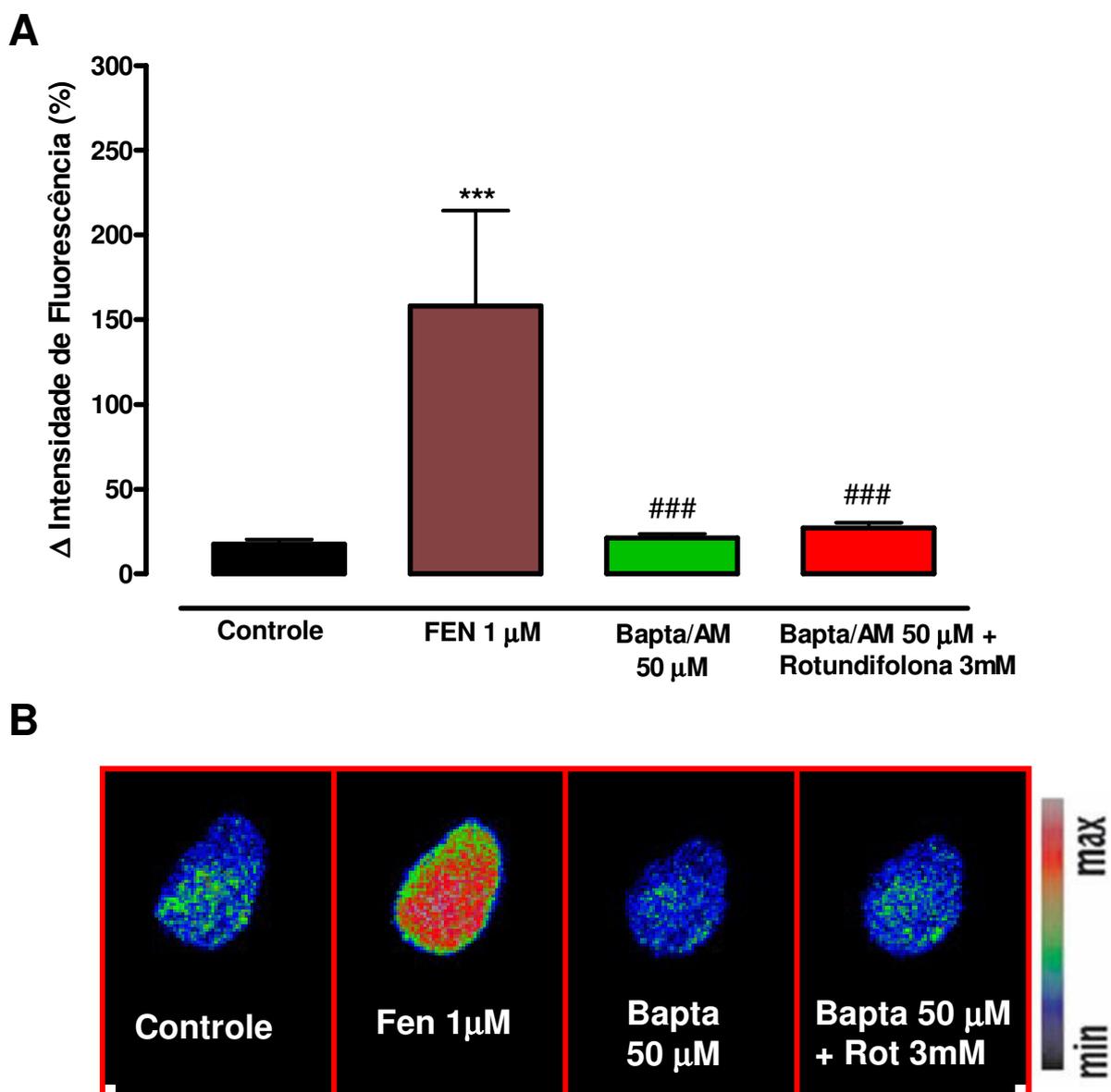


**Figura 48:** Influência do EGTA sobre o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico induzido por rotundifolona em miócitos de artéria mesenterica de rato SD. **A**, Na parte superior registro original do efeito de rotundifolona ( $3 \times 10^{-3}$  M) sobre a intensidade de fluorescência na ausência e na presença de EGTA 2 mM. Na parte inferior o gráfico em barras mostrando o aumento na intensidade de fluorescência normalizada pela fluorescência mínima ( $\Delta F(\%) = (F - F_0 / F_0) * 100$ ) induzido rotundifolona ( $3 \times 10^{-3}$  M) na ausência e presença de EGTA 2 mM. **B**, Imagem dos miócitos de artéria mesenterica de rato carregados com Fluo-4/AM, antes (Controle) e durante a estimulação com rotundifolona ( $3 \times 10^{-3}$  M) na presença de EGTA 2 mM. Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 8, 11 e 14 experimentos, respectivamente. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  vs Controle e ### $p < 0,001$  vs Rotundifolona  $3 \times 10^{-3}$  M.

### **5.22. Influência do BAPTA no aumento dos níveis intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ induzidos por rotundifolona**

Para avaliar se o aumento residual dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ , no meio intracelular, em miócitos de artéria mesentérica de ratos normotensos, observados na presença EGTA (2 mM), seria proveniente de uma fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, foram realizados experimentos na presença do quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, BAPTA-AM (50  $\mu\text{M}$ ) (MUKHAMEDYARONV et al., 2006).

Inicialmente a responsividade dos miócitos foi observada com fenilefrina (1 $\mu\text{M}$ ) (158,1  $\pm$  56,4 %; n=4). Os aumentos nos transientes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  induzidos por rotundifolona (3 mM) foram abolidos após tratamento por 30 min dos miócitos de artéria mesentérica com 50  $\mu\text{M}$  de BAPTA-AM. Os valores médios de intensidade de fluorescência normalizada para BAPTA-AM (50  $\mu\text{M}$ ) na ausência e na presença de rotundifolona (3 mM) foram: 21,2  $\pm$  2,6 %; n=17 e 27,1  $\pm$  2,6 %; n=17, respectivamente (Figura 49).



**Figura 49:** Influência do BAPTA/AM sobre o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico induzido por rotundifolona em miócitos de artéria mesenterica de rato SD. **A**, gráfico em barras mostrando as alterações nas intensidades de fluorescência normalizada pela fluorescência mínima ( $\Delta F(\%) = (F - F_0 / F_0) * 100$ ) induzidas por FEN ( $1 \mu\text{M}$ ) e BAPTA/AM ( $50 \mu\text{M}$ ), na ausência e na presença de Rotundifolona ( $3 \text{mM}$ ). **B**, Imagem dos miócitos de artéria mesenterica de rato carregados com Fluo-4/AM, antes (Controle) e durante a estimulação com fenilefrina e BAPTA/AM ( $50 \mu\text{M}$ ), na presença e na ausência de rotundifolona ( $3 \text{mM}$ ). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 8, 11 e 14 experimentos, respectivamente. \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle e ### $p < 0,001$  vs fenilefrina.

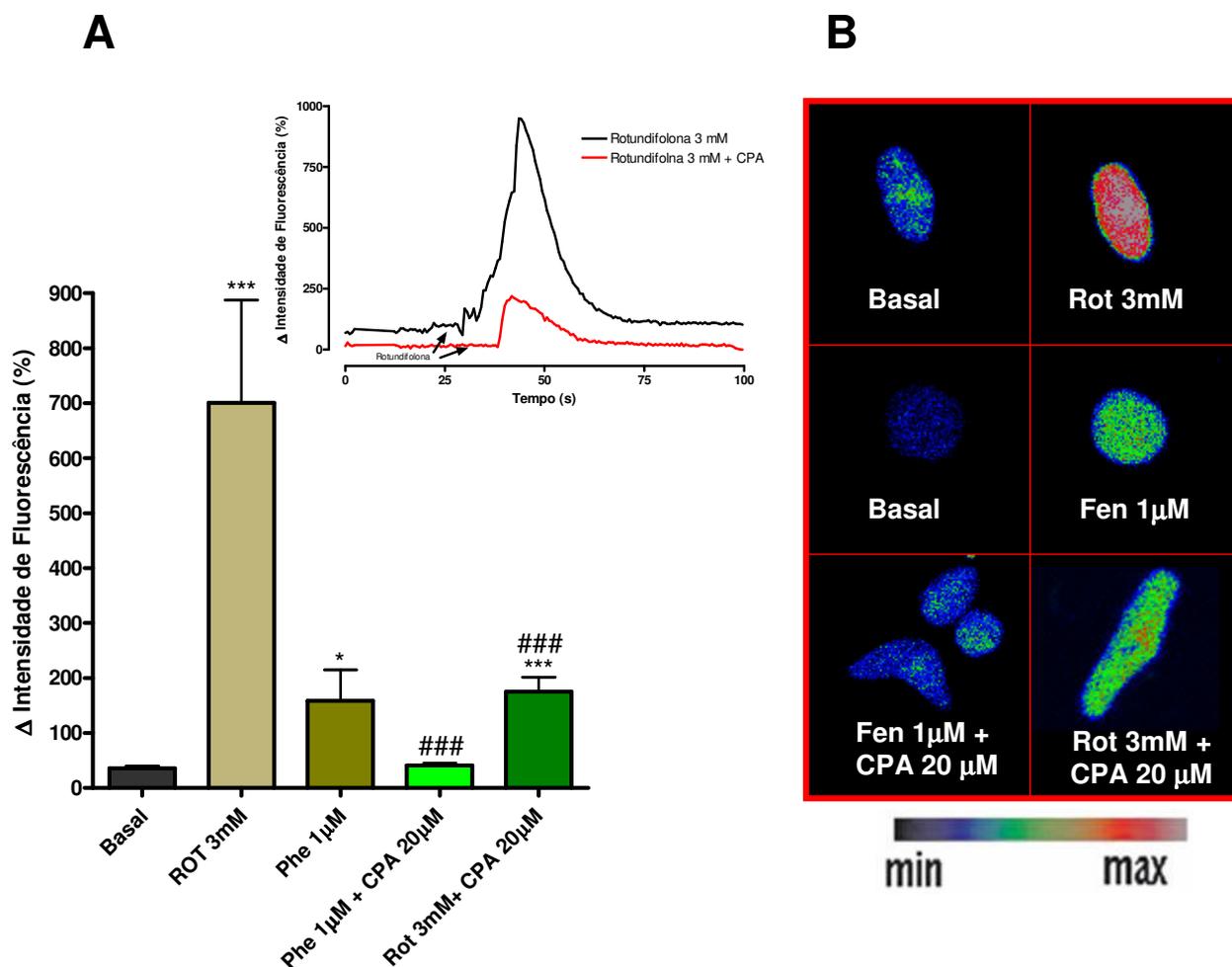
### **5.23. Participação do $\text{Ca}^{2+}$ estocado no retículo sarcoplasmático nas alterações nos transientes intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$ induzidas por rotundifolona**

Para avaliar se o aumento residual dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos em miócitos de artéria mesentérica de ratos normotensos, observados na presença de EGTA (2 mM), seria proveniente do retículo sarcoplasmático, foram realizados experimentos na presença do inibidor da ATPase de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (SERCA), ácido ciclopiazônico (CPA - 20  $\mu\text{M}$ ) (LIU et al., 2006).

Inicialmente a responsividade dos miócitos foi observada com fenilefrina (1 $\mu\text{M}$ ) ( $35,4 \pm 4,1$  %; n=17, para o basal e  $158,1 \pm 56,4$  %; n=4, para FEN). A depleção do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular foi confirmada pelo fato que 1 $\mu\text{M}$  de FEN não promoveu alteração significativa no transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica.

Os aumentos nos transientes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  induzidos por FEN (1 $\mu\text{M}$ ) foram abolidos após tratamento por 30 min dos miócitos de artéria mesentérica com 20  $\mu\text{M}$  mM de CPA ( $40,4 \pm 4,6$  %; n=17,  $p < 0,001$ ). O tratamento dos miócitos com inibidor da SERCA alterou, significativamente, os aumentos nos transientes citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  induzidos por rotundifolona.

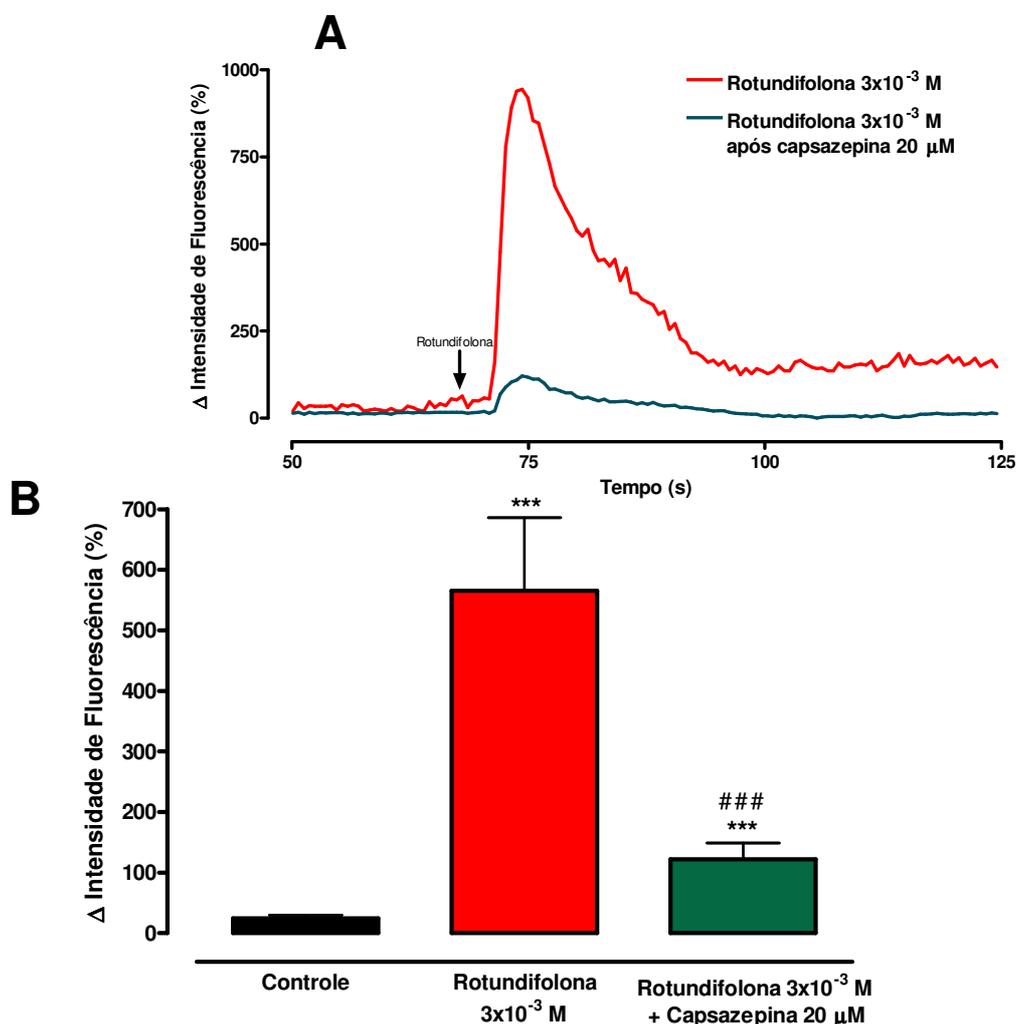
Os valores médios de intensidade de fluorescência normalizada para rotundifolona (3 mM) na ausência e na presença de CPA (20  $\mu\text{M}$ ) foram:  $700,7 \pm 187,4,8$  %; n=6 e  $175,3 \pm 26,1$  %; n=17, respectivamente (Figura 50).



**Figura 50:** Influência do CPA sobre o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico induzido por rotundifolona em miócitos de artéria mesenterica de rato SD. **A**, gráfico de barras mostrando as alterações nas intensidades de fluorescência normalizada pela fluorescência mínima ( $\Delta F(\%) = (F - F_0 / F_0) * 100$ ) induzidas por fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ), na ausência e na presença de CPA, e rotundifolona ( $3 \text{ mM}$ ), na ausência e na presença de CPA ( $20 \mu\text{M}$ ). **B**, Imagens dos miócitos de artéria mesenterica de rato carregados com Fluo-4/AM, estimulados com fenilefrina ou Rot ( $3 \text{ mM}$ ) na ausência ou na presença de CPA ( $20 \mu\text{M}$ ). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 8, 11 e 14 experimentos, respectivamente. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs basal e ### $p < 0,001$  vs fenilefrina.

#### **5.24. Participação dos canais TRP nos efeitos de rotundifolona em miócitos de artéria mesentérica de ratos normotensos**

Nestes experimentos foi observada a influência do antagonista competitivo dos receptores TRPV1 e TRPM8, capsazepina (CPZ-20 $\mu$ M) (BEVAN et al., 1992; BEHRENDT et al., 2004) nas alterações nos transientes de Ca<sup>2+</sup> citosólicos induzidos por rotundifolona. O aumento nos transientes intracelulares de Ca<sup>2+</sup> induzidos por rotundifolona (3 mM) foi atenuado significativamente ( $p < 0,0001$ ), porém não abolido, após exposição dos miócitos de artéria mesentérica a 50 $\mu$ M de CPZ, permanecendo um aumento de cálcio intracelular residual. Os valores médios de intensidade de fluorescência normalizada no basal, estimulada com rotundifolona (3 mM) na ausência e na presença de CPZ (20  $\mu$ M) foram:  $24,7 \pm 5,1$  %;  $n=17$ ;  $564,7 \pm 121,0$  %;  $n=5$  e  $121,7 \pm 27,5$  %;  $n=11$ , respectivamente (Figura 51).

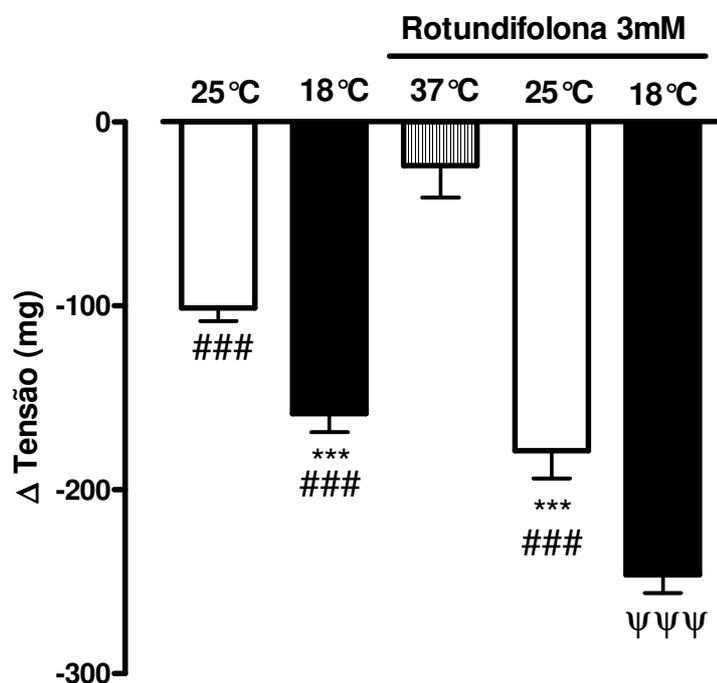


**Figura 51:** Influência da capsazepina sobre o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico induzido por rotundifolona em miócitos de artéria mesentérica de rato SD. **A**, Registro original do efeito de rotundifolona ( $3 \times 10^{-3}$  M) sobre a intensidade de fluorescência na ausência e na presença de capsazepina ( $50 \mu\text{M}$ ). **B**) O Gráfico de barras mostra o aumento na intensidade de fluorescência relativa a fluorescência mínima ( $\Delta F(\%) = (F - F_0 / F_0) \cdot 100$ ) induzido rotundifolona ( $3 \times 10^{-3}$  M) na ausência e presença de capsazepina ( $20 \mu\text{M}$ ). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 8, 11 e 14 experimentos, respectivamente. \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle e ###  $p < 0,001$  vs Rotundifolona  $3 \times 10^{-3}$  M.

### **5.25. Influência de rotundifolona nos efeitos vasculares induzidos pela temperatura**

Para avaliar a influência de rotundifolona nos efeitos ocasionados pela ação da temperatura nos TRPM8, foram realizados experimentos alterando a temperatura de banho dos anéis de artéria mesentérica isolada de ratos LN.

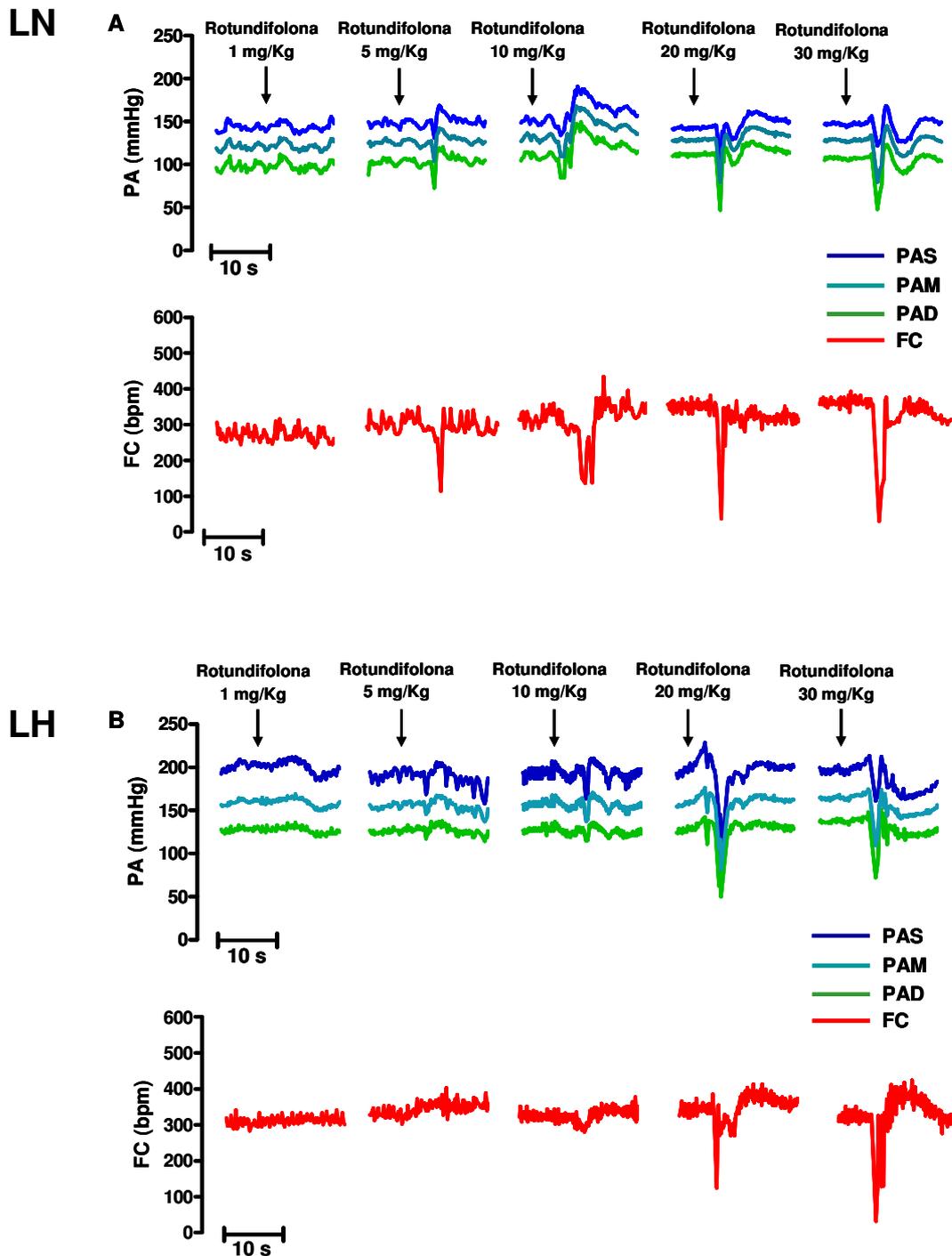
A variação da temperatura para valores a baixo de 37°C alterou de maneira significativa a tensão basal submetida aos anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso. À 25°C, a tensão diminuiu significativamente quando comparado aos valores basais ( $-101,3 \pm 7,2$  mg; n=8). A administração de rotundifolona às preparações mantidas no tônus basal e a 37°C não alterou de maneira significativa os valores de tensão ( $-23,4 \pm 17,4$  mg; n=8). Porém, ao baixar a temperatura para 25°C, ainda na presença de rotundifolona, foi observada uma diminuição ainda mais proeminente da tensão basal ( $-178,8 \pm 15,1$  mg; n=8), como pode ser avaliado na figura 52. À 18°C, na ausência ou na presença de rotundifolona, o efeito da temperatura no tônus basal foi significativamente maior ( $-158,8 \pm 9,9$  mg;  $-246,3 \pm 10,0$  mg; n=8, respectivamente), quando comparado as preparações mantidas a 25°C (figura 52).



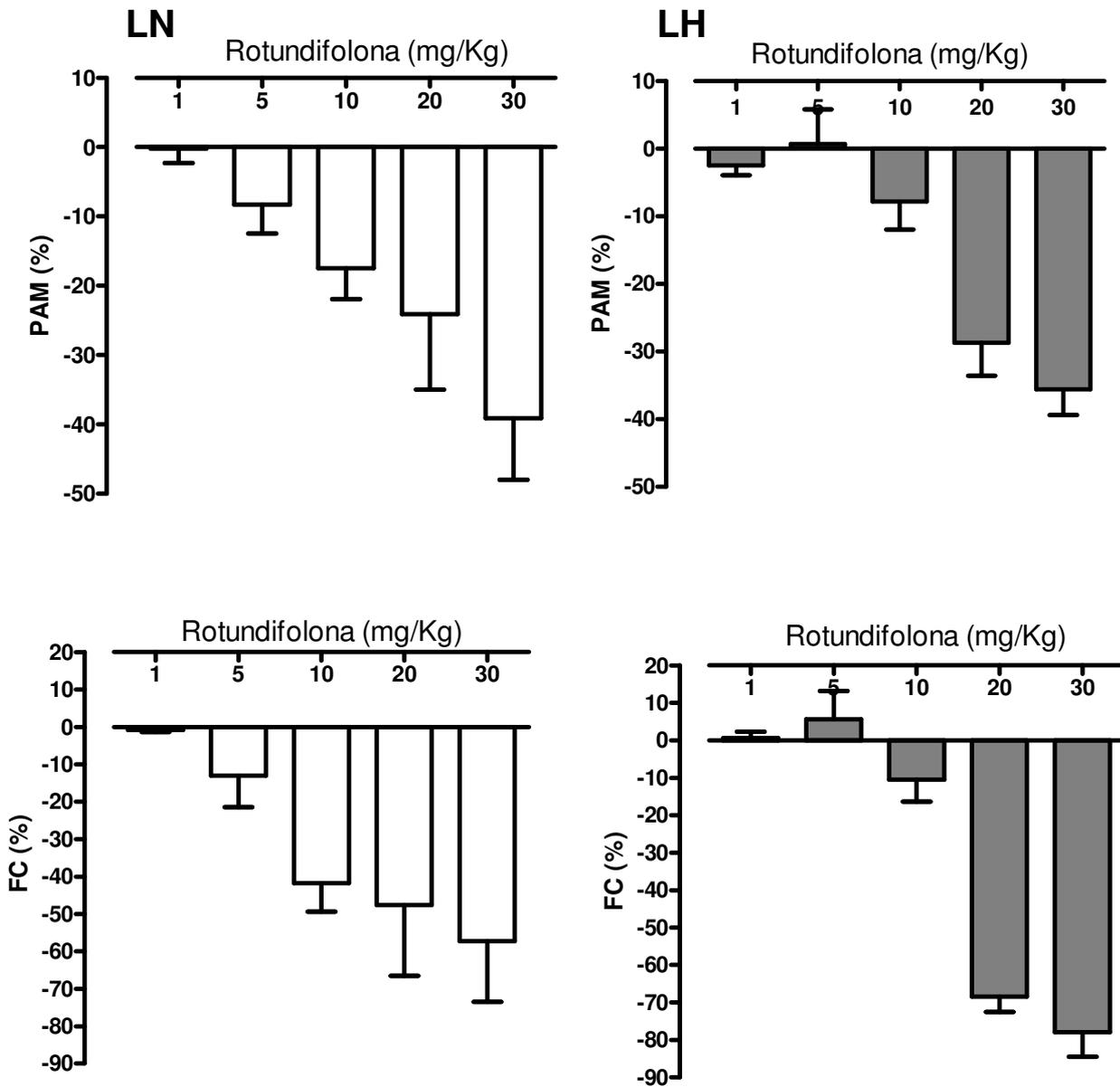
**Figura 52:** Efeito de rotundifolona ( $3 \times 10^{-3}$  M) sobre as alterações na tensão de repouso induzidas pelas temperaturas de  $25^{\circ}\text{C}$  e  $18^{\circ}\text{C}$  em anéis da artéria mesentérica superior de rato LN, sem o endotélio funcional. Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 8 experimentos. \*\*\* $p < 0,001$  vs preparações a  $25^{\circ}\text{C}$ , ### $p < 0,001$  vs Rotundifolona  $3 \times 10^{-3}$  M ( $37^{\circ}\text{C}$ ) e ψψψ $p < 0,0001$  vs preparações a  $18^{\circ}\text{C}$ .

### 5.26. Efeito de rotundifolona na pressão arterial e frequência cardíaca de ratos normotensos e hipertensos de Lyon.

Os valores basais de PAM e FC dos animais LN e LH antes da administração de rotundifolona foram respectivamente de  $104 \pm 2,5$  mmHg e  $338,4 \pm 12,2$  bpm para animais normotensos e  $147,5 \pm 3,1$  mmHg e  $350,7 \pm 12,3$  bpm. A administração de rotundifolona (1; 5; 10; 20 e 30 mg/kg, i.v.) induziu uma resposta transiente em animais LN e LH caracterizada por hipotensão ( $\Delta$  PAM (%) =  $-0,2 \pm 2,1$ ;  $-8,3 \pm 4,2$ ;  $-17,5 \pm 4,4$ ;  $-24,1 \pm 10,9$  e  $-39,1 \pm 8,9$  (LN) e ( $\Delta$  PAM (%) =  $-2,5 \pm 1,4$ ;  $0,7 \pm 5,1$ ;  $-7,8 \pm 4,2$ ;  $-28,7 \pm 4,9$  e  $-35,6 \pm 3,8$  (LH) mmHg, respectivamente) associada a uma bradicardia ( $\Delta$  FC =  $-0,8 \pm 0,5$ ;  $-13,0 \pm 8,4$ ;  $-41,7 \pm 7,7$ ;  $-47,6 \pm 18,9$  e  $-57,3 \pm 16,2$  (LN) e ( $\Delta$  FC =  $0,6 \pm 1,7$ ;  $5,6 \pm 8,4$ ;  $-10,5 \pm 5,9$ ;  $-68,4 \pm 4,1$  e  $-77,9 \pm 6,6$  (LH) bpm, respectivamente) de maneira dependente de dose (n=5) (Figura 53 e 54).



**Figura 53:** Registro original representativo ilustrando o efeito de doses crescentes de rotundifolona (1; 5; 10; 20 e 30 mg/Kg, i.v.) sobre a PAS, PAM, PAD e FC em rato normotenso (A) e em ratos hipertensos (B).

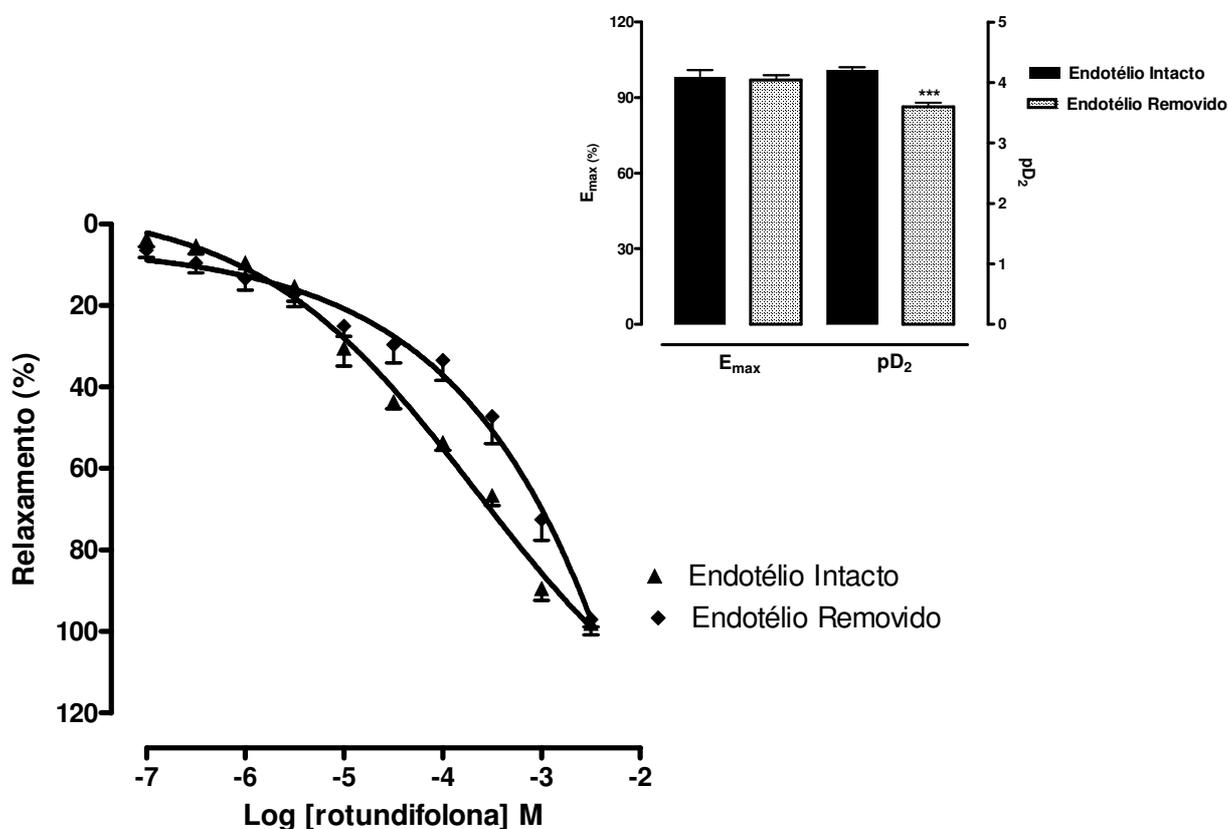


**Figura 54:** Efeitos da administração intravenosa de rotundifolona (1, 5, 10, 20 e 30 mg/Kg, i.v. randomicamente) sobre a Pressão Arterial Média (PAM, %) e Frequência Cardíaca (FC, %) em ratos LN ou LH não anestesiados. Gráfico em barras mostrando o efeito de rotundifolona sobre a PAM e FC em ratos normotensos e hipertensos não anestesiados. Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 5 experimentos.

### **5.27. Efeito de rotundifolona em anéis de artéria mesentérica isolada de rato LH**

A administração cumulativa de rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis de em anéis da artéria mesentérica superior isolada de ratos LH, com endotélio funcional íntegro e pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu$ M - 10  $\mu$ M), induziu um vasorelaxamento dependente de concentração com mesma potência farmacológica ( $pD_2 = 4,2 \pm 0,05$ ,  $n=7$ ;  $4,0 \pm 0,02$ ;  $n=11$ , respectivamente) e magnitude de efeito máximo dos anéis mesentéricos de ratos LN ( $97,9 \pm 2,9$ ;  $98,9 \pm 3,1$ , respectivamente).

A remoção do endotélio vascular deslocou de maneira significativa ( $p < 0,0001$ ) e semelhante aos anéis mesentéricos de ratos normotensos, a resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos, com demonstrado pelos valores de  $pD_2$  obtidos em anéis em que o endotélio foi removido de LH e LN ( $pD_2 = 3,6 \pm 0,07$ ,  $n=7$ ;  $3,6 \pm 0,03$ ,  $n=12$ , respectivamente). No entanto, a percentagem de relaxamento máximo ( $E_{m\acute{a}x}$ ) induzida por rotundifolona não foi alterada após remoção do endotélio vascular ( $97,02 \pm 1,9$  %;  $n=7$ ) (Figura 55).

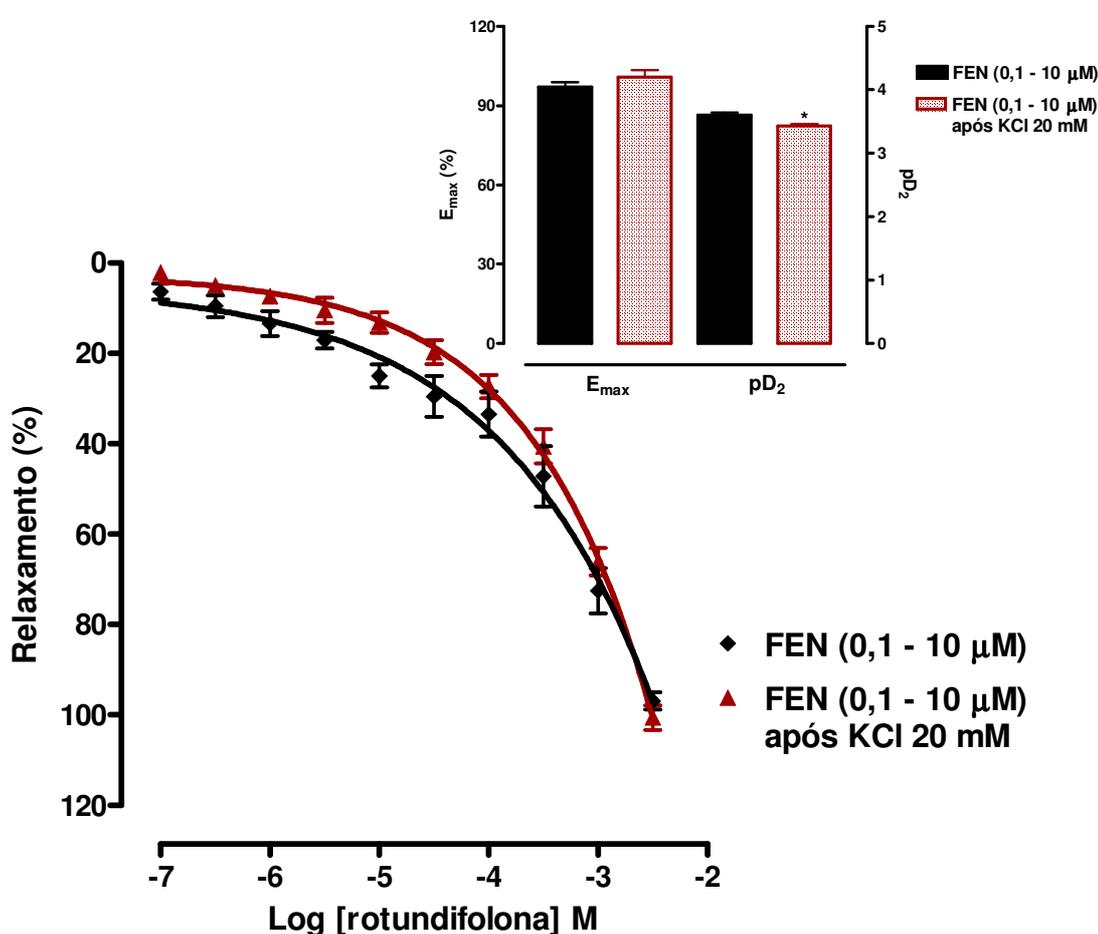


**Figura 55:** Efeito de rotundifolona em anéis da artéria mesentérica superior isolada de ratos LH. Na parte inferior, curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LH com o endotélio intacto (▲) ou endotélio removido (◆), pré-contraídos com FEN (0,1 a 10  $\mu$ M). Os valores estão expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 7 e 7 experimentos, respectivamente. \*\*\*  $p < 0,0001$  vs Endotélio Intacto. Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio intacto e endotélio removido.

### 5.28. Influência dos canais para $K^+$ na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos LH

Para avaliar a participação de canais para  $K^+$  na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona em animais hipertensos, foram realizados experimentos com anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LH, sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu$ M - 10  $\mu$ M), na presença de uma solução de tyrode com 20 mM de KCl. O bloqueio parcial do efluxo de  $K^+$  com o aumento da concentração  $K^+$

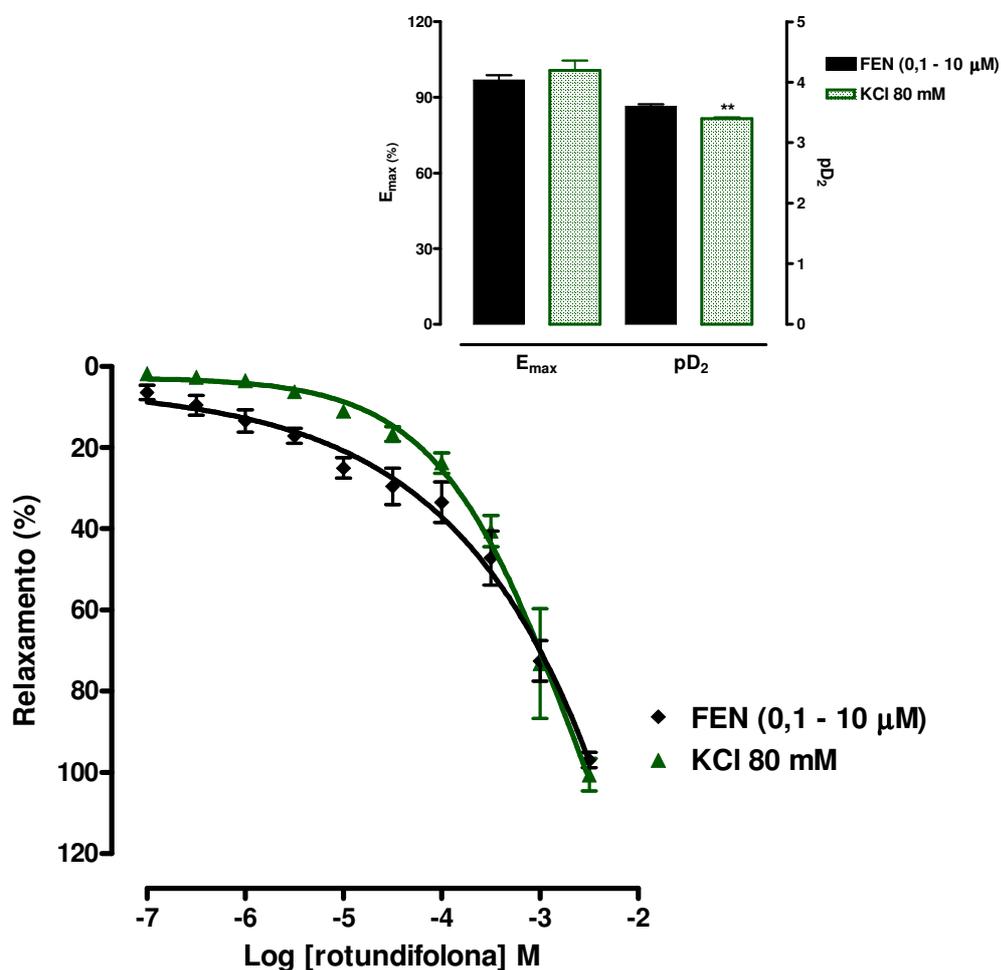
extracelular ( $[K^+]_e$ ) para 20 mM induziu um deslocamento significativo ( $p < 0,05$ ) da curva concentração-resposta de rotundifolona para direita ( $10^{-7} - 3 \times 10^{-3}$  M) ( $pD_2 = 3,4 \pm 0,03$ ,  $n=6$ ) sem alterações nos valores de efeito máximo ( $E_{m\acute{a}x} = 100,7 \pm 2,7$  %,  $n=6$ ) quando comparados aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN (0,1  $\mu$ M - 10  $\mu$ M) ( $pD_2 = 3,6 \pm 0,07$  e  $E_{m\acute{a}x} = 97,02 \pm 1,9$  %,  $n=7$ ) (Figura 56).



**Figura 56:** Influência da solução de tyrode com 20 mM de KCl no efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona em animais hipertensos. No gráfico inferior, curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7} - 3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LH, sem endotélio funcional na presença de  $[K^+]_e = 4$  mM (◆) ou  $[K^+]_e = 20$  mM (▲). Na parte superior, gráfico de barras mostrando valores de  $E_{max}$  e  $pD_2$  para os resultados obtidos com endotélio removido na presença de  $[K^+]_e = 4$  mM ou  $[K^+]_e = 20$  mM. Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 6 e 7 experimentos, respectivamente. \*\*\*  $p < 0,0001$  vs FEN (0,1 - 10  $\mu$ M).

**5.29. Efeito da rotundifolona sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais hipertensos, pré-contraídos com KCl 80 mM**

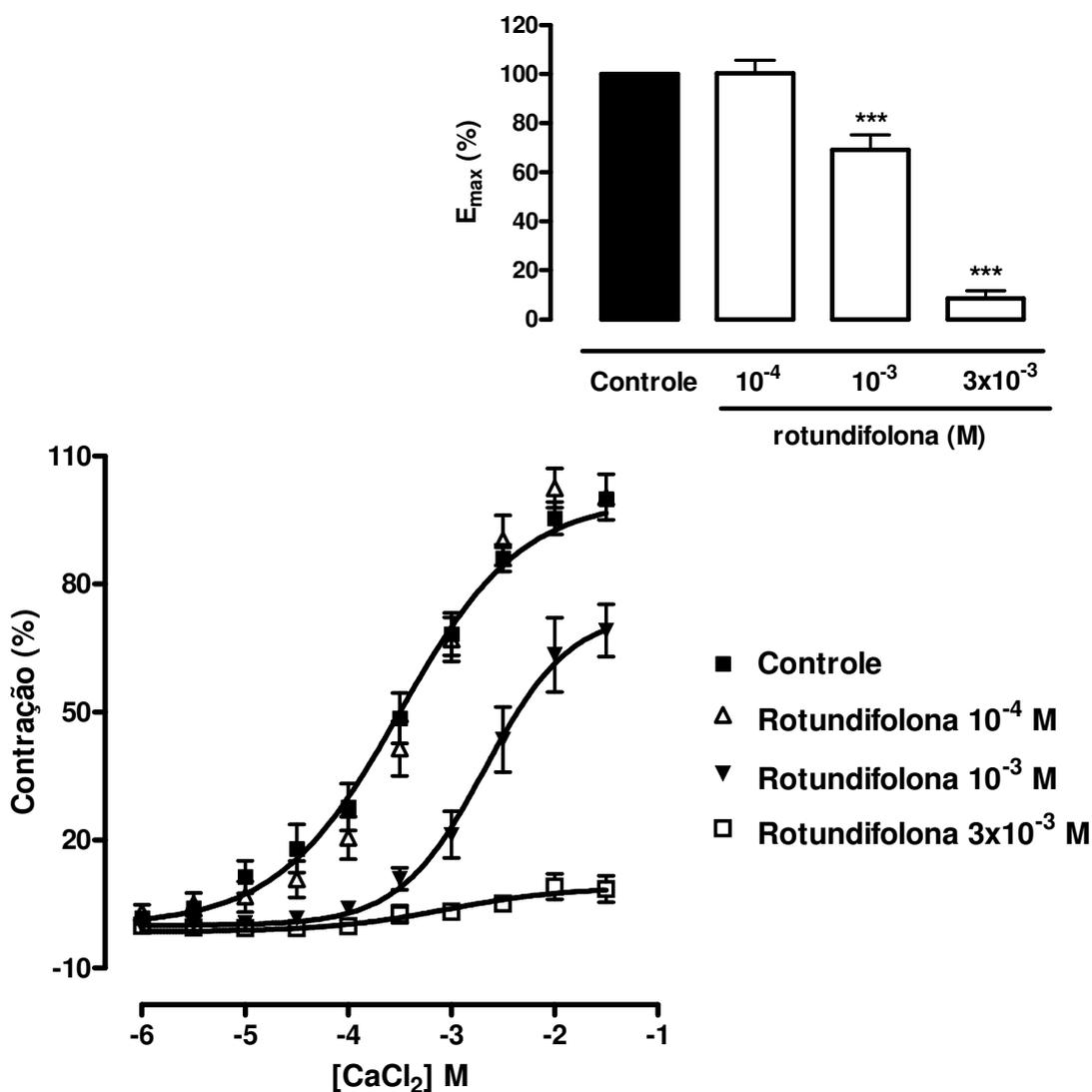
Rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) induziu vasorelaxamento dependente de concentração em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LH pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 80 mM). Interessantemente, a curva concentração-resposta para rotundifolona, em anéis sem endotélio, apresentou alterações significativas nos valores de  $pD_2 = 3,4 \pm 0,02$ , mas não nos valores de  $E_{m\grave{a}x} = 100,7 \pm 4,3$  % (n=6) quando comparado aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN ( $0,1 \mu\text{M}$  -  $10 \mu\text{M}$ ) ( $pD_2 = 3,6 \pm 0,07$  e  $E_{m\grave{a}x} = 97,02 \pm 1,9$  %, n=7) (Figura 57).



**Figura 57:** Efeito de rotundifolona em anéis mesentéricos de animais hipertensos pré-contraídos com solução de alto  $K^+$  extracelular (80 mM). Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LH, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (0,1 - 10 μM) (◆) ou com KCl 80 mM (▲). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 7 e 6 experimentos, respectivamente. \*\*  $p < 0,01$  vs FEN (0,1 - 10 μM).

### **5.30. Influência de rotundifolona sobre o influxo de Cálcio em artéria mesentérica de ratos hipertensos**

Para avaliar se rotundifolona estaria influenciando no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para promover efeito vasorelaxante em anéis de artéria mesentérica isoladas de ratos hipertensos, foram realizados experimentos induzindo contrações com  $\text{CaCl}_2$  em meio despolarizante, mas ausente de  $\text{Ca}^{2+}$ . A administração cumulativa de  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-6}$  -  $3 \times 10^{-2}$  M) promoveu uma contração, dependente de concentração, em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LH, sem endotélio funcional, incubados com solução despolarizante (KCl 60 mM) e nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 56). Quando os anéis foram incubados com rotundifolona ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M) a curva concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$  foi significativamente atenuada maneira dependente de concentração e com perfil não-competitivo, como mostra as alterações nos valores de  $E_{\text{max}}$  ( $100.0 \pm 0.0$ ;  $104 \pm 5,3$ ;  $69,2 \pm 6,1$  e  $8,5 \pm 3,2$  %, respectivamente) (Figura 58).



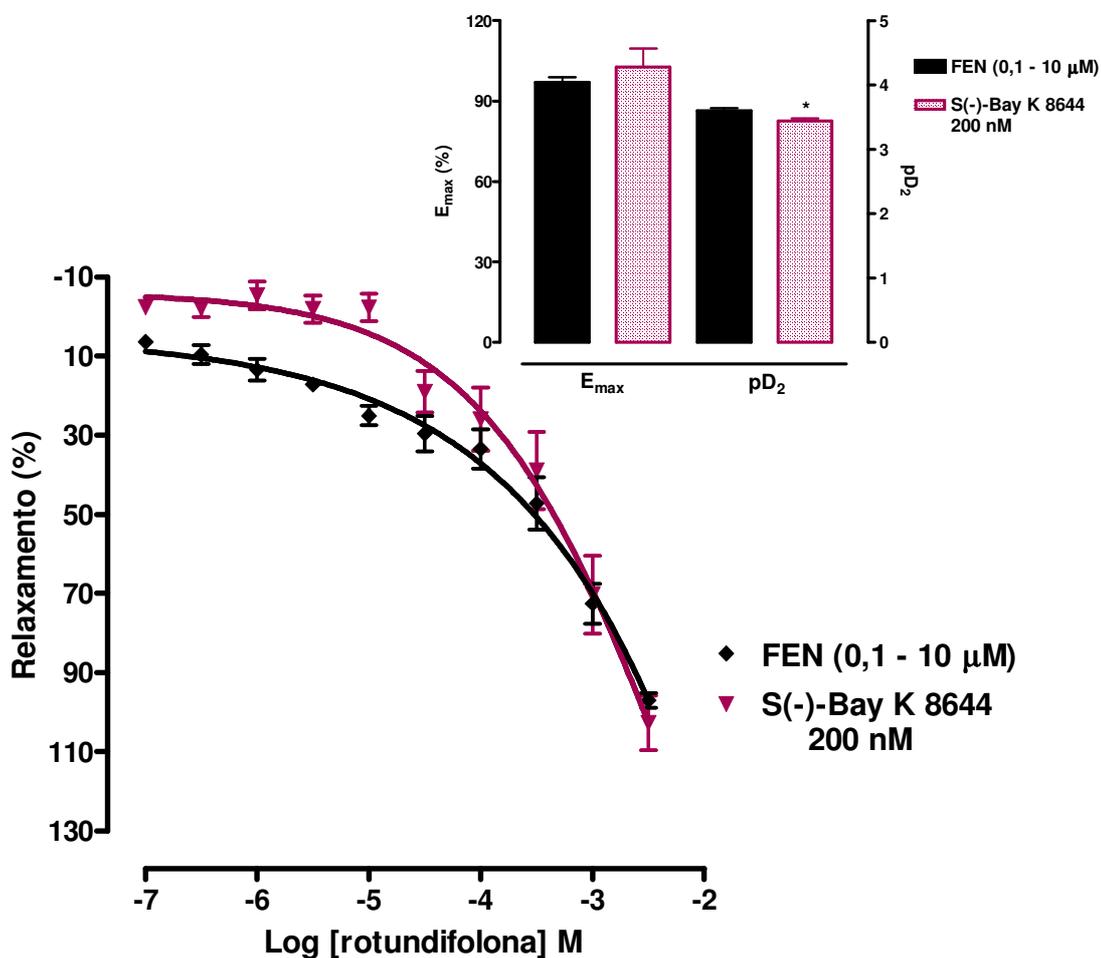
**Figura 58:** Influência de rotundifolona sobre o influxo de  $Ca^{2+}$  de anéis mesentéricos de ratos hipertensos. Curvas concentração-resposta para  $CaCl_2$  em solução despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem  $Ca^{2+}$  em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LH, sem endotélio funcional, na ausência (Controle) e na presença de concentrações isoladas de rotundifolona ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3}$  M). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 5 experimentos para cada concentração. \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle.

### **5.31. Efeito da rotundifolona sobre as contrações induzidas por um agonista dos canais para $\text{Ca}^{2+}$ sensíveis a voltagem do Tipo-L em anéis mesentéricos de ratos hipertensos**

Para avaliar se rotundifolona influencia no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem ( $\text{Cav}$ ) do tipo-L, em animais hipertensos, foi utilizado Bay K 8644, um agonista destes canais (DONG et al., 1997), para induzir desenvolvimento de força nos anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LH.

Ao ser administrada cumulativamente na fase tônica da contração induzida por S(-)-Bay K 8644 (200 nM), rotundifolona ( $10^{-7}$  -  $3 \times 10^{-3}$  M) induziu um vasorelaxamento dependente de concentração em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LH, sem endotélio funcional, com alterações significativas nos valores de  $\text{pD}_2 = 3,4 \pm 0,04$  ( $\text{p} < 0,05$ ), mas não nos valores de  $E_{\text{máx}} = 102,7 \pm 6,9$  quando comparado aos anéis mesentéricos, sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN ( $0,1 \mu\text{M}$  -  $10 \mu\text{M}$ ) ( $\text{pD}_2 = 3,6 \pm 0,07$  e  $E_{\text{máx}} = 97,02 \pm 1,9 \%$ ,  $n=7$ ).

O tempo necessário para que fossem obtidas as respostas máximas para cada concentração de rotundifolona variou entre 10 a 15 min. (dados não mostrados) (Figura 59)



**Figura 59:** Efeito de rotundifolona nas contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644. Curva concentração-resposta para rotundifolona ( $10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato LH, sem o endotélio vascular, pré-contraídos com FEN 10  $\mu$ M (◆) ou S(-)-Bay K 8644 (200 nM) (▲). Os valores estão expressos com média  $\pm$  e.p.m. de 7 e 4 experimentos, respectivamente. \* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  vs FEN (0,1 - 10  $\mu$ M).

*Discussão*

---

## 6. DISCUSSÃO

Este trabalho foi realizado com intuito de caracterizar o mecanismo de ação molecular utilizado por rotundifolona, um monoterpene isolado do óleo essencial das partes aéreas da *Mentha x villosa* Hudson, para induzir efeito vasorelaxante em artéria mesentérica superior isolada de rato, bem como avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo monoterpene em um modelo de hipertensão essencial. As principais constatações foram a atividade vasorelaxante em artéria mesentérica superior isolada de rato LN, envolvendo provavelmente mobilização de  $Ca^{2+}$  extra e intracelular, culminando na ativação de  $BK_{Ca}$  e inativação dos canais para  $Ca^{2+}$  sensíveis a voltagem na membrana plasmática. Estes eventos, provavelmente ocorridos pela estimulação de canais catiônicos TRP por rotundifolona, promoveriam repolarização e diminuição do influxo de  $Ca^{2+}$  na célula muscular lisa de artéria mesentérica, induzindo o efeito vasorelaxante. Além disso, constatou-se a atividade hipotensora e bradicárdica em animais geneticamente hipertensos de Lyon.

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório com ratos wistar normotensos, foram constatadas atividades hipotensora e bradicárdica induzida pelo óleo essencial de *Mentha x villosa* e por rotundifolona, decorrente de uma ação cardíaca direta, associada a uma provável diminuição da resistência vascular periférica (estudos em aorta de rato). A diminuição da resistência vascular periférica envolveu dois mecanismos distintos: Um dependente e outro independente do endotélio vascular. O mecanismo endotélio dependente envolveu a participação da via muscarínica e dos EDRF's, principalmente NO e prostaglandinas (GUEDES et al., 2002; 2004). Já o mecanismo independente do endotélio vascular envolveu inibição do influxo de  $Ca^{2+}$ , através dos Cav, e interferência na mobilização de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares sensíveis ao  $IP_3$  (GUEDES et al., 2004). No entanto, nenhum estudo investigando o efeito de rotundifolona em outro tecido vascular havia sido realizado.

É importante salientar que as respostas farmacológicas obtidas após administração de determinadas substâncias podem variar devido a vários fatores, como por exemplo, a especificidade desta por determinado sítio de ação, a densidade da molécula-alvo sobre a qual age a substância, como também o tecido em qual a molécula-alvo se encontre. Em relação às diferenças entre tecidos, os leitos vasculares são distintos no que diz respeito à

fisiologia, a densidade e tipo de receptores que expressam como também a maneira que responde as várias substâncias. (VANHEEL et al., 2000, GURNEY, 1994, COX, 2002, BYLUND, 1994; INSEL, 1996)

Exemplo destas diferenças foi observado em artéria coronária de cobaia que não demonstrou relaxamento em resposta as prostaciclina (KILPATRICK et al., 1994). Além disto, foi também observado que alguns antagonistas de canais para  $Ca^{2+}$  são mais seletivos para determinados tecidos, como, por exemplo, o verapamil (cardioseletivo) e as dihidropiridinas (capazes de relaxar o músculo liso vascular) (GURNEY, 1994). Outro exemplo destas diferenças entre os tecidos foi observado em artéria mesentérica e aorta, onde ambas responderam diferentemente a serotonina e estas diferenças estavam relacionadas aos subtipos ou densidade dos receptores para serotonina (ADEGUNLOYE et al., 1997). Já Cox (2002) relatou a variabilidade existente na expressão de canais para  $K^+$  entre os diferentes leitos vasculares, bem como entre os vasos de calibres diferentes. Estes dados da literatura em conjunto fundamentaram este estudo em outro tecido vascular, utilizando neste caso, artéria mesentérica isolada de rato.

Em estudos anteriores foi observado que rotundifolona induziu um vasorelaxamento dependente de concentração em anéis da artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos, com endotélio intacto, pré-contraídos com FEN, um agonista  $\alpha 1$ -adrenérgico. Este efeito apresentou maior potência farmacológica quando comparados aos resultados obtidos por Guedes e colaboradores (2002; 2004), em estudos com aorta de rato wistar, como pode ser observado pelos valores de  $pD_2$  obtidos em anéis aórticos ( $pD_2 = 3,3 \pm 0,1$ ) quando comparados as valores observados em anéis mesentéricos ( $pD_2 = 4,0 \pm 0,02$ ). Estes resultados acerca da variabilidade das respostas farmacológicas entre aorta de rato e artéria mesentérica reforçaram as premissas que determinaram a realização deste estudo com artéria mesentérica isolada de rato.

Vários trabalhos na literatura têm mostrado o importante papel desempenhado pelo endotélio no controle do tônus vascular e pressão sangüínea (VANHEEL et al., 2000), assim como, a participação do mesmo nos relaxamentos induzidos por uma variedade de substâncias químicas, endógenas e exógenas (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980; COHEN e VANHOUTTE, 1995; CHAUHAN et al, 2003). As células endoteliais, em resposta a uma variedade de estímulos fisiológicos tais como a bradicinina, acetilcolina, histamina,

substância P, estresse de cisalhamento, entre outros, liberam substâncias vasodilatadoras (VANHEEL et al., 2000). Dentre estas temos o óxido nítrico e outras substâncias sintetizadas no endotélio, como as prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (MONCADA e VANE, 1979; FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980; FÉLÉTOU e VANHOUTTE, 1988). Diante destes dados, passamos a investigar a influência do endotélio funcional na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona.

Nestas condições, a curva concentração-resposta induzida por concentrações crescentes de rotundifolona foi deslocada significativamente para direita, sem alterações em seus valores de efeito máximo, levando-nos a sugerir que mediadores vasoativos liberados pelo endotélio vascular parecem favorecer o efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona. Além disto, pôde-se constatar que o efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona envolve dois mecanismos básicos, um dependente do endotélio vascular e outro independente do mesmo. No entanto, o mecanismo independente do endotélio apresentou-se majoritário em relação ao dependente de endotélio vascular, provavelmente devido a um efeito direto de rotundifolona sobre a musculatura lisa arterial. A partir destes resultados resolvemos investigar o mecanismo de ação independente do endotélio vascular utilizado por rotundifolona para induzir vasorelaxamento.

Uma via de sinalização celular que pode ser ativada para promover vasorelaxamento independente do endotélio vascular é a ativação de canais para  $K^+$  diretamente no músculo liso vascular. Estes canais são determinantes importantes da pressão sanguínea e do tônus vascular, estado contrátil das células musculares lisas presente na parede dos vasos sanguíneos (LEDOUX et al., 2006). Os canais para  $K^+$  ajudam a determinar o potencial de membrana no repouso, bem como regulam o volume celular. Como as células apresentam uma concentração elevada de  $K^+$  no meio intracelular, em relação ao meio extracelular, a abertura de canais para  $K^+$  na membrana plasmática induz uma mudança do potencial de membrana para valores mais negativos (repolarização ou hiperpolarização) devido ao efluxo desses íons, levando conseqüentemente a vasodilatação (GURNEY, 1994; NELSON; QUAYLE, 1995; HADDY et al., 2006).

As manifestações funcionais da ativação ou inibição dos canais para  $K^+$  tem sido analisadas por mudanças no potencial de membrana, por exemplo, medidas com microeletrodos convencionais ou mudanças na força isométrica de segmentos de artéria, por

exemplo, medidas com tensão isométrica. Além disso, drogas que abrem canais para  $K^+$  tem sido frequentemente estudadas usando medidas de força (NELSON; QUAYLE, 1995), semelhante ao que foi realizado neste estudo.

Uma propriedade típica das drogas que promovem vasodilatação por ativarem canais para  $K^+$  é que elas efetivamente inibem a contração da musculatura vascular produzida por um aumento moderado na concentração de  $K^+$  extracelular ( $< 40$  mM), porém não são efetivas quando a concentração de  $K^+$  é alterada para níveis mais altos. Isto porque em elevadas concentrações de  $K^+$ , o potencial de equilíbrio do  $K^+$  está mais próximo ao potencial de membrana da célula muscular lisa, deixando a resultante do fluxo deste íon praticamente nula e, portanto, a hiperpolarização ou repolarização são evitadas. Esta propriedade permite estabelecer distinção entre os ativadores de canais para  $K^+$  e os antagonistas de canais para  $Ca^{2+}$ , que demonstram comportamento diferenciado nesta circunstância (GURNEY, 1994; NELSON; QUAYLE, 1995).

Baseado na importância dos canais para  $K^+$  na regulação de funções vasculares resolvemos avaliar a participação destes canais na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona. Utilizando preparações incubadas com KCl 20 mM, condição em que promove bloqueio parcial do efluxo de  $K^+$  por deslocar o potencial de equilíbrio do  $K^+$  (em torno de  $-84$  mV para  $-52$  mV) para valores mais próximos do potencial de membrana no repouso dos miócitos (em torno  $-60$  a  $-40$  mV) e atenuando desta forma relaxamentos mediados por abertura de canais para  $K^+$  (GURNEY, 1994; CLARK; FUCHS, 1997). O aumento do  $K^+$  extracelular (de 4 para 20 mM) alterou significativamente o vasorelaxamento dependente de concentração induzido por rotundifolona, com atenuação da sua potência farmacológica, sugerindo que a resposta relaxante induzida por rotundifolona parece envolver canais para  $K^+$ . No entanto, este protocolo não nos forneceu informações a cerca do tipo de canal para potássio que poderia estar sendo ativado por rotundifolona, e dados relatados na literatura apontam a existência de vários tipos diferentes de canais para  $K^+$  no músculo liso vascular (NELSON, QUAYLE, 1995).

Os canais para  $K^+$  são classificados em quatro subgrupos segundo as normas de nomenclatura da "International Union of Pharmacology - IUPHAR": Canais sensíveis a voltagem ( $K_v$ ), canais ativados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{ca}$ ), canais retificadores de entrada ( $K_{ir}$ ) e canais dois poros ( $K_{2p}$ ). Estes canais estão distribuídos em vários tecidos incluindo o músculo liso

vascular (WEI, et al., 2005; GUTMAN et al, 2005; KUBO et al., 2005; GOLDSTEIN et al., 2005).

Os canais Kv, alguns membros desta família de canais são chamados também de canais para K<sup>+</sup> retificadores de saída, são ativados por despolarização de membrana plasmática e estão presentes em todas as células musculares lisas. Estes canais são muito importantes na fase de repolarização do potencial de ação e regulação do potencial de membrana em muitas células excitáveis (HILLE, 1992; NELSON; QUAYLE, 1995).

Os K<sub>ca</sub> são canais ativados por influxo de Ca<sup>2+</sup>, bem como pela liberação de Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático (ZHANG et al., 2005). São divididos em canais para K<sup>+</sup> de grande (BK<sub>ca</sub>), intermediária (IK<sub>ca</sub>) e pequena condutância (SK<sub>ca</sub>). Os canais BK<sub>ca</sub> são ricamente expressos no tecido vascular (ASANO, MASUZAWA-ITO E MATSUDA, 1993). São ativados por despolarização do potencial de membrana e por Ca<sup>2+</sup> intracelular (FARACI e SOBEY, 1998), sendo importantes para induzir interrupção de mecanismos de despolarização e contração muscular (CAI et al., 2007). IK<sub>ca</sub> e SK<sub>ca</sub> são canais de condutância unitária menor que são sensíveis ao complexo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina (LEE et al., 2003) e insensíveis ao potencial de membrana (LEDOUX et al., 2006).

Os canais K<sub>ir</sub> conduzem corrente de K<sup>+</sup> mais prontamente para o meio intracelular do que para o meio extracelular em valores de potenciais de membrana mais negativos que o potencial de equilíbrio do K<sup>+</sup> (E<sub>k</sub>), porém também conduzem pequenas correntes para fora, em potenciais de membrana mais positivos que E<sub>k</sub> (HADDY; VANHOUTTE e FELETOU, 2006). São canais ativados por potenciais de membrana e por concentrações de K<sup>+</sup> extracelular (QUAYLE, 1993).

Então, devido à existência destes vários tipos de canais para K<sup>+</sup> nas células musculares lisas e da necessidade de identificar qual subtipo de canal para potássio poderia estar participando da resposta vasorelaxante, independente do endotélio, induzida por rotundifolona, realizamos experimentos para obtenção de curvas concentração-resposta para rotundifolona na presença de vários bloqueadores seletivos de canais para K<sup>+</sup>. Nestes experimentos, a curva concentração-resposta do monoterpeno foi deslocada significativamente para direita apenas na presença de caribdotoxina (0,1 µM), um bloqueador seletivo dos BK<sub>ca</sub> e IK<sub>ca</sub> (GHISDAL; MOREL, 2001), com diminuição significativa do efeito máximo apenas na presença de TEA 1 mM, nesta concentração um bloqueador seletivo dos

BK<sub>ca</sub> (COX, 2002). Interessantemente os resultados obtidos na presença de caribdotoxina foram semelhantes aos observados nos experimentos com 20 mM de concentração extracelular de K<sup>+</sup>, sugerindo uma forte participação dos canais BK<sub>ca</sub> e IK<sub>ca</sub> na resposta relaxante induzida por rotundifolona.

No entanto, o efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona foi potencializado nas preparações pré-incubadas separadamente com BaCl<sub>2</sub> (30μM), um bloqueador dos canais retificadores de entrada (EDWARDS et al., 1998; KAWABATA et al., 2004), apamina, um bloqueador seletivo dos SKca (GHISDAL; MOREL, 2001) e glibenclamida, um bloqueador seletivos dos K<sub>ATP</sub> (WANG et al., 2007), como pode ser observado pelos valores de pD<sub>2</sub>, sem alterações significativas na eficácia de rotundifolona em causar vasorelaxamento, como pode ser observado pelos valores de E<sub>max</sub>. Porém, nenhuma alteração significativa foi observada nas curvas concentração-resposta obtidas na presença de 4-AP, um bloqueador seletivo dos canais Kv (GHISDAL; MOREL, 2001). Estes resultados sugerem que o mecanismo de ação de rotundifolona para induzir vasorelaxamento em artéria mesentérica, parece envolver uma via de sinalização celular que altera a atividade de canais para K<sup>+</sup>, tanto para inibição quanto para ativação dos mesmos, mas que a resultante destes efeitos levaria ao maior efluxo de K<sup>+</sup> por canais BK<sub>ca</sub>, e conseqüentemente repolarização das células musculares lisas, induzindo vasodilatação.

A fim de reforçarmos as evidências obtidas até o momento nos experimentos funcionais, realizamos experimentos eletrofisiológicos para avaliarmos as influências de rotundifolona sobre as correntes de K<sup>+</sup> em miócitos recém dispersos de artéria mesentérica isolada de rato. Inicialmente, foram identificadas as células musculares lisas no homogenato de células recém dispersas de artéria mesentérica utilizando experimentos com imunofluorescência. A fluorescência a α-actina, proteína contida nas células musculares, foi alcançada utilizando o anticorpo específico para mesma, o anti-α-actina de camundongo conjugado ao anticorpo secundário contendo o cromóforo ALEXA-568. Nestes experimentos podemos constatar a morfologia das células musculares lisas e a possibilidade da realização dos estudos com miócitos vasculares.

Os resultados obtidos nos experimentos funcionais fundamentaram o estudo do efeito do monoterpene nas correntes de K<sup>+</sup> em miócitos de artéria mesentérica e para avaliarmos esta hipótese, utilizamos ensaios de fixação de voltagem pela técnica de patch clamp,

analisando a influência de rotundifolona nas correntes macroscópicas de  $K^+$  (configuração "Whole cell").

Corroborando com os estudos funcionais, rotundifolona ( $10^{-5}$  e  $10^{-4}$ M) aumentou as correntes de  $K^+$  em miócitos da artéria mesentérica superior de rato normotenso. Para avaliarmos se as correntes de  $K^+$  estimuladas por rotundifolona eram correntes provenientes da ativação de  $BK_{ca}$ , foram realizados experimentos na presença de TEA 1mM. O aumento das correntes de  $K^+$  induzidas pelo monoterpene foi abolido na presença do bloqueador dos canais  $BK_{ca}$ , sugerindo que rotundifolona realmente aumenta o efluxo de  $K^+$  em miócitos vasculares por estimular os canais  $BK_{ca}$  e este efeito poderia estar promovendo o relaxamento em anéis de artéria mesentérica isolada de rato, observado nos estudos funcionais. Além disso, o perfil das correntes de  $K^+$  estimuladas por rotundifolona apresentou semelhança às correntes obtidas por ativação de  $BK_{ca}$  em estudos com miócitos de artéria mesentérica de rato, realizados por Cai e colaboradores, 2007 e Cox, Lozinskaya e Dietz em 2003, reforçando as evidências que rotundifolona promove ativação destes canais.

Um resultado a ser ressaltado é que a faixa de concentração de rotundifolona que parecia influenciar os canais  $BK_{ca}$  nos estudos com artéria mesentérica isolada de rato LN ( $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  M), foi responsável por aumentar significativamente as correntes de  $K^+$  em miócitos vasculares de ratos normotensos Sprague Dawley ( $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  M), um fator adicional interligando diretamente os estudos funcionais aos eletrofisiológicos.

No entanto, o efeito relaxante induzido por rotundifolona em artéria mesentérica isolada de rato, pré-incubados com bloqueadores dos canais para  $K^+$ , foi alterado significativamente, porém não abolido, sugerindo a existência de um mecanismo de ação adicional ao de ativação de canais  $BK_{ca}$ .

Com a finalidade de observar a resposta de rotundifolona frente às contrações geradas por diferentes estímulos, passamos a avaliar o efeito do monoterpene em preparações pré-contraídas com solução despolarizante de KCl 80 mM. Como descrito anteriormente, altas concentrações de  $K^+$  extracelular impedem a observação de relaxamentos mediados por abertura de canais para  $K^+$ , o que favorece o uso desta solução para investigação do mecanismo adicional, não mediado por ativação de  $BK_{ca}$ , utilizado por rotundifolona para causar relaxamento.

Já é bem descrito na literatura que contrações induzidas por altas concentrações de  $K^+$ , nas células de músculo liso, são mediadas por uma despolarização de membrana e um aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  através dos  $Ca_v$  (GODFRAIND; KABA, 1969; SOMLYO; SOMLYO, 1994). No entanto, a geração da contração por agonista de receptores acoplados a proteína Gq/11 (ex. FEN), em células de músculo liso, é resultado da mobilização de ambos  $Ca^{2+}$  intracelular e extracelular (KITAZAWA; MASUO; SOMLYO, 1991; KARAKI et al., 1997). Interessantemente, rotundifolona foi capaz de relaxar as contrações induzidas por altas concentrações de  $K^+$ , sem alterações nos valores de  $E_{max}$ , porém com potência farmacológica menor, quando comparada ao relaxamento obtido em preparações contraídas por FEN. Estes resultados sugerem uma provável ação inespecífica do monoterpene, visto que o mesmo promoveu relaxamento tanto sobre contrações induzidas por um acoplamento eletromecânico como por fármaco-mecânico, respectivamente.

Existem várias evidências que um grande número de substâncias derivadas de plantas medicinais, inclusive a substância objeto do nosso estudo em experimentos com aorta de rato, altere a mobilização  $Ca^{2+}$  nas células musculares lisas (GUEDES et al., 2002; 2004; OLIVEIRA et al., 2006; KO et al., 2000; CAO et al., 2006). Além disso, como o tônus induzido por solução despolarizante com alta concentração de  $K^+$  é mediado inteiramente pelos canais  $Ca_v$  (KARAKI et al., 1997) e rotundifolona se mostrou capaz de induzir relaxamento nestas condições, é sugestivo que o monoterpene pode causar inibição dos  $Ca_v$  em artéria mesentérica de rato. Baseados em tais relatos, outro aspecto investigado em nossos estudos foi se o efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona estava relacionado à inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  via canais  $Ca_v$ .

Para verificar esta hipótese foi investigado o efeito de rotundifolona frente às contrações induzidas por  $CaCl_2$ , em meio despolarizante nominalmente sem  $Ca^{2+}$ . Este protocolo experimental fundamenta-se no fato de que as contrações induzidas por  $CaCl_2$  são geradas, quase que exclusivamente, pelo influxo de  $Ca^{2+}$ , já que a despolarização promovida por concentração elevada de  $K^+$  extracelular induz a abertura dos  $Ca_v$ . Nestas condições rotundifolona atenuou significativamente as contrações induzidas por  $CaCl_2$ , de maneira dependente de concentração ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $3 \times 10^{-3} M$ ). Esses resultados sugerem que o efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona pode ser devido a uma possível influência do

monoterpeno nos canais  $Ca_v$ , resultando em uma diminuição no influxo de  $Ca^{2+}$  em músculo liso da artéria mesentérica superior de rato, levando ao vasorelaxamento.

As células musculares lisas vasculares expressam dois tipos principais de  $Ca_v$ , os  $Ca_v1$  (tipo-L) e os  $Ca_v3$  (tipo-T). Os  $Ca_v1$  (tipo-L), mais recentemente referidos como  $Ca_v1.2$  (CATERRAL et al., 2005), são os mais expressos, desta forma, exercendo um papel importante na determinação da pressão sanguínea, sendo seus bloqueadores uma importante classe de drogas anti-hipertensivas (CRIBBS, 2006).

Com o intuito de avaliar o subtipo de  $Ca_v$  envolvido na resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona, analisou-se seu efeito sobre as contrações tônicas induzidas pelo derivado diidropiridínico S(-)-Bay K 8644, um agonista seletivo dos  $Ca_v1$  tipo-L (SCHRAMM et al., 1983). Interessantemente, rotundifolona inibiu as contrações tônicas induzidas por S(-)-Bay K 8644 de maneira dependente de concentração, entretanto o relaxamento foi observado apenas na faixa de concentração compreendida entre  $10^{-4}$  a  $3 \times 10^{-3}$  M, as mesmas que produziram diminuição nas contrações induzidas por  $CaCl_2$  descrita acima, sugerindo que o monoterpeno, nestas concentrações, parece inibir os canais  $Ca_v$  tipo-L para induzir vasorelaxamento.

É descrito na literatura a existência de uma fibra nervosa sensorial perivascular, presente em artéria mesentérica de rato que induz efeito vasodilatador. Esta fibra pode estar envolvida no sistema de regulação do tônus vascular, controle do fluxo sanguíneo, incluindo auto-regulação cerebral (ZYGMUNT et al., 1999; HOLZER, 1992; HONG et al., 1994). A excitação deste nervo na parede dos vasos leva a liberação de um neurotransmissor peptídico com 37 aminoácidos e com propriedades vasodilatadoras, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (ZYGMUNT et al., 1999; KAWASAKI, et al., 1988). Para avaliarmos se rotundifolona poderia estar influenciando a liberação do CGRP pela terminação nervosa sensorial perivascular para induzir relaxamento, realizamos experimentos com artéria mesentérica superior de rato pré-tratados por capsaicina.

A capsaicina é um ativador dos receptores vanilóides, os TRPV, um canal catiônico não-seletivo, permeável ao  $Ca^{2+}$ , que é aberto, por exemplo, por prótons extracelulares (CATERINE et al., 1997). O pré-tratamento das artérias mesentéricas com capsaicina causa liberação de CGRP e depleção dos estoques contendo neurotransmissores. Esses eventos culminam na dessensibilização do nervo sensorial, tornando-o refratário ao estímulo

subseqüente (KAWASAKI et al., 1988; SZALLASI; BLUMBERG, 1999) e desta forma pôde-se descartar a influência nervosa sensorial sobre a resposta vasorelaxante induzida por rotundifolona. Nestas condições, o efeito vascular induzido pelo monoterpeno não foi alterado significativamente, sugerindo que ativação de receptores de vanilóide e conseqüente liberação do CGRP parece não fazer parte do mecanismo de ação utilizado por rotundifolona para induzir vasorelaxamento.

Os experimentos em preparações pré-tratadas com capsaicina foram importantes para descartar a participação de CGRP nos efeitos relaxantes induzidos por rotundifolona, visto que dados na literatura reportam a atividade vasodilatadora deste peptídeo em coronárias de rato, por induzir diminuição da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular, principalmente por inibir o influxo de  $Ca^{2+}$ . Estes eventos ocorreram devido a ativação, pelo menos em parte, dos canais  $K_{Ca}$  pelo CGRP (SHEYKHZADE; NYBORG, 2001). Como descrito anteriormente, este também parece ser o provável mecanismo de ação de rotundifolona para induzir relaxamento, sugerindo que a ação do monoterpeno em aumentar o efluxo de  $K^+$  e diminuir o influxo de  $Ca^{2+}$  não seria por modular a fibra nervosa perivascular e liberar CGRP, mas sim por uma provável ação diretamente no músculo liso vascular.

Os canais  $Ca_v$  desempenham papel central na regulação do tônus vascular. A hiperpolarização promove fechamento destes canais, levando a vasodilatação, já a despolarização induz a abertura dos mesmos, resultando em vasoconstrição (JACKSON, 2000). Os canais  $Ca_v$  tipo-L, sensíveis a diidropiridinas, parecem ser predominantes na maioria das células musculares lisas vasculares, entretanto os  $Ca_v$  tipo-T também tem sido relatado (HUGHES, 1995).

Baseados na importância dos canais  $Ca_v$  na regulação do tônus vascular, aliado aos efeitos relaxantes induzidos por rotundifolona em anéis de artéria mesentérica contraídas com solução de alto  $K^+$  ou Bay K 8644, bem como os efeitos do monoterpeno sobre as contrações induzidas por  $CaCl_2$  em meio depolarizante nominalmente sem  $Ca^{2+}$ , resolvemos avaliar a ação direta de rotundifolona sobre as correntes de  $Ca^{2+}$ , por canais sensíveis a voltagem, em miócitos recém dispersos de artéria mesentérica de rato normotenso, utilizando para este fim, fixação de voltagem pela técnica de patch clamp, na configuração whole cell. Para isolar as correntes de  $K^+$  nestes experimentos, nas soluções externa e interna, o  $K^+$  foi trocado por  $Cs^+$  (PUCOVSKY, MOSS; BOLTON, 2003), além de conter TEA

10 mM, responsável por bloquear as correntes de  $K^+$ . Já as correntes de  $Na^+$  não foram observadas nestes experimentos, contrastando aos estudos realizados por ROMANIBERRA, BLAUSTEIN e MATTESON (2005).

Corroborando com os estudos funcionais, rotundifolona diminuiu o pico das correntes de  $Ba^{2+}$  por canais sensíveis a voltagem em miócitos vasculares, de maneira concentração dependente. Estes dados sugerem que o monoterpene induz inibição dos canais  $Ca_v$ , levando a diminuição do influxo de  $Ca^{2+}$ , o que seria responsável pelo efeito vasodilatador observado em artéria mesentérica. O mecanismo envolvido na diminuição das correntes de  $Ba^{2+}$  induzido por rotundifolona não parece envolver uma possível ação bloqueante de canal aberto ou bloqueio dependente de estado, visto que, não foram observadas alterações significativas entre os efeitos atenuantes de corrente de  $Ba^{2+}$ , induzidos por rotundifolona, nas análises feitas no pico das correntes e no final do pulso. Adicionalmente, as correntes de  $Ba^{2+}$  atenuadas por rotundifolona, nestes experimentos, foram totalmente bloqueadas por nicardipine, um antagonista dos  $Ca_v$  tipo-L (PUCOVSKY; MOSS; BOLTON, 2003). Estes dados sugerem que rotundifolona inibe canais  $Ca_v$  tipo-L em miócitos de artéria mesentérica. Para investigarmos o mecanismo pelo qual rotundifolona atenua as correntes de  $Ba^{2+}$  em miócitos vasculares, resolvemos analisar se o monoterpene alteraria a cinética de ativação e inativação, dependente de voltagem, dos canais  $Ca_v$  tipo-L.

A cinética de ativação dos canais  $Ca_v$  tipo-L foi avaliada pela curva de ativação estacionária, obtida a partir dos valores de condutância em função dos potenciais testes e ajustada segundo a equação de Boltzmann, como descrito em métodos. Nestes experimentos observamos que a de ativação estacionária foi significativamente deslocada para valores de potenciais de membrana mais negativos, sugerindo que rotundifolona induz ativação dos canais  $Ca_v$  tipo-L em potenciais mais negativos e provavelmente este mecanismo não seria o responsável pela diminuição das correntes de  $Ba^{2+}$  em miócitos perfundidos com rotundifolona.

A cinética de inativação dos canais  $Ca_v$  tipo-L foi avaliada a partir do protocolo de duplo-pulso, descrito inicialmente por Hodgkin e Huxley para medir a dependência de voltagem da inativação, no estado estacionário, dos canais sensíveis a voltagem. Este protocolo caracteriza-se por estimular os canais com pré-pulsos condicionantes, com voltagens variáveis, por um período de tempo suficientemente longo para permitir o processo

de inativação ao alcançar seu nível de estado estacionário. O segundo pulso de voltagem, chamado pulso teste, é dado para um valor fixo de voltagem, na qual se observa transientes de correntes de  $Ba^{2+}$ . Os valores de amplitude de corrente relativa obtidas nos pulsos testes foram usados para determinar a fração de canais que não foram inativados pelo pré-pulso condicionante (HILLE, 1992).

Nesta situação, observamos que a amplitude das correntes de  $Ba^{2+}$  provocadas pelo pulso teste diminuía quando a amplitude do pré-pulso aumentava. Em seguida, a perfusão de 0,3 mM de rotundifolona, concentração esta que produz cerca de 60% de inibição do pico das correntes de  $Ba^{2+}$ , na presença de S(-)-Bay K 8644, deslocou a curva de inativação estacionária para esquerda, com alteração do  $V_{1/2}$  em cerca de 10 mV para potenciais mais negativos, ou seja, rotundifolona diminuiu a fração de canais disponíveis para abrir em valores de potenciais testes, quando comparado aos experimentos na ausência do monoterpeno. Estes dados sugerem que rotundifolona diminui a disponibilidade de canais Cav tipo-L para abrir em função das mudanças no potencial de membrana, provavelmente por acelerar a entrada destes canais no estado inativado, culminando na atenuação das correntes de  $Ba^{2+}$  observada nos protocolos anteriormente descritos.

É importante evidenciar que modulações no influxo de cálcio são necessárias para funcionamento ideal das células. Enquanto o sinal para ativação dos Cav envolve apenas mudanças no potencial de membrana, ambos, voltagem e entrada de íons cálcio, servem como sinais de feedback negativo, causando transição dos canais para o estado inativado não condutível (LACINOVA; HOFMANN, 2005). A inativação dependente de  $Ca^{2+}$  dos Cav foi inicialmente reconhecida como uma propriedade dos Cav tipo-L (BREHM; ECKERT; 1978 Apud LACINOVA; HOFMANN, 2005). Posteriormente foi descrita também para os canais Cav tipo-N e tipo P/Q (COX; DUNLAP, 1994; LEE; SCHEUER; CATTERALL, 2000). Em nossos experimentos apenas evidenciamos as influências de rotundifolona sobre a inativação dependente de voltagem dos canais Cav tipo-L, não podendo descartar as influências que o monoterpeno pode induzir na inativação dependente de  $Ca^{2+}$  dos referidos canais.

Os resultados obtidos até este ponto nos mostram que o vasorelaxamento induzido por rotundifolona, em anéis de artéria mesentérica de rato LN, deve-se à estimulação dos canais  $BK_{Ca}$ , bem como inibição dos canais  $Ca_v$  tipo-L, culminando na diminuição de  $Ca^{2+}$

intracelular em anéis mesentéricos pré-contraídos, o que levaria a vasodilatação, embora o mecanismo responsável por estas alterações moleculares ainda não tenha sido elucidado.

Para melhor evidenciar o mecanismo molecular estimulado por rotundifolona em miócitos vasculares, realizamos experimentos com microscopia confocal, analisando em tempo real as alterações nos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares na presença de rotundifolona. Nestes experimentos os miócitos foram carregados com a sonda sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$ , fluo-4 na forma acetoximetil éster, que apresenta capacidade de atravessar a membrana plasmática. É importante salientar que a microscopia confocal deu suporte à comunidade científica para localizar moléculas, bem como analisar eventos nas células com alta resolução espacial e temporal (WIER et al., 2000).

Interessantemente, rotundifolona induziu aumento nos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos em miócitos recém dispersos, de artéria mesentérica isolada de rato normotenso, de maneira concentração dependente, com alterações mecânicas em algumas células, observadas nos cliques das imagens (dados não mostrados). Estes resultados contrastam com os dados obtidos nos estudos funcionais, visto que a administração do monoterpeno no tônus basal não induziu alterações significativas nas tensões isométricas. No entanto, as condições experimentais nos estudos com artéria mesentérica e nos estudos com miócitos isolados apresentam algumas diferenças. Na primeira situação o tecido encontra-se sob tensão, em tônus muscular basal, enquanto na segunda situação os miócitos estão dispersos, não estão submetidos a nenhum valor de tensão. Isto poderia responder a ausência de alterações no tônus basal em tecido pré-tensionado (estudos funcionais), em relação aos aumentos nos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos e alterações mecânicas observadas em algumas células, sob nenhum valor de tensão basal, após estímulos com concentrações diferentes do monoterpeno.

A literatura descreve três diferentes formas de alterações nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em músculo liso: Primeiro, o aumento nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  por todo o citoplasma, chamado de aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  global; segundo, o mecanismo de aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  em forma de ondas propagáveis, chamado de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ , resultantes da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques sensíveis a  $\text{IP}_3$  e/ou rianodina (LEDOUX, et al., 2006; BOITTIN et al., 1999); terceiro, aumento transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  altamente localizado espacialmente e temporalmente, chamado de sparks de  $\text{Ca}^{2+}$  (JAGGAR et al., 2000). As alterações nos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$

induzidos por rotundifolona em miócitos vasculares foi caracterizado por um aumento global na  $[Ca^{2+}]_i$ , não apresentando características de ondas ou sparks de  $Ca^{2+}$ .

Nos experimentos funcionais, os anéis se encontravam pré-contraídos com agentes contraturantes diferentes e nos experimentos realizados com miócitos vasculares recém dispersos, os mesmos não se encontravam previamente estimulados, então, resolvemos analisar os efeitos de rotundifolona nos transientes de  $Ca^{2+}$  citosólicos em miócitos pré-estimulados com Bay K 8644, um agonista dos canais  $Ca_v$  tipo-L. Nestas condições, Bay K 8644 induziu aumento  $[Ca^{2+}]_i$  em miócitos de artéria mesentérica de rato e rotundifolona potencializou estes efeitos.

É importante salientar que as diidropiridinas, tais como o Bay K 8644, apresentam ação dependente de estado do canal, ligando-se mais prontamente aos canais  $Ca_v$  tipo-L quando os mesmos se encontram no estado inativado (HILLE, 1992). Então, o aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular induzida por rotundifolona elevou o número de cargas positivas no meio intracelular, deslocando o potencial de membrana para valores provavelmente mais positivos, o que induziria um maior número de canais  $Ca_v$  entrarem no estado inativado e desta forma favorecendo a ação do agonista dos canais de  $Ca^{2+}$ . Isto poderia explicar a potencialização dos efeitos induzidos por Bay K 8644, em miócito vasculares, na presença de rotundifolona.

As principais fontes que levam ao aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular em miócitos incluem os canais de  $Ca^{2+}$  sensíveis a voltagem e canais catiônicos não-seletivos na membrana plasmalémal ou liberação de cálcio dos estoques intracelulares, como por exemplo, abertura de canais sensíveis a rianodina ou sensíveis a IP3, encontrados na membrana do retículo sarcoplasmático (LEDOUX et al., 2006). No intuito de evidenciarmos a fonte de cálcio utilizada por rotundifolona para aumentar a fluorescência ao  $Ca^{2+}$ , no meio intracelular, em miócitos de artéria mesentérica de ratos normotensos, realizamos experimentos na presença do quelante lento de  $Ca^{2+}$  extracelular, EGTA (MUKHAMEDYAROV et al., 2006; KERAMIDAS et al., 1999), ou na presença do quelante rápido de  $Ca^{2+}$  intracelular, BAPTA-AM (MUKHAMEDYAROV et al., 2006).

Nestas condições, na presença de EGTA ou BAPTA, os efeitos induzidos por rotundifolona nos transientes de  $Ca^{2+}$  citosólicos, em miócitos recém dispersos de artéria mesentérica, foram significativamente atenuados ou abolidos, respectivamente, sugerindo

que o aumento  $[Ca^{2+}]_i$  induzida pelo monoterpeno envolve tanto fonte de  $Ca^{2+}$  extracelular, como intracelular.

Tem sido bem documentado que a mobilização de  $Ca^{2+}$  é um importante mediador na resposta vascular de muitas substâncias vasoativas. O inositol 1,4,5-tris-fosfato ( $IP_3$ ) foi reconhecido como um mensageiro secundário a mediar respostas vasculares de vários agonistas tais como noradrenalina, angiotensina II, vasopressina, endotelina, tromboxano A2 e outros (ZHANG; LI, 2006). Neste processo, agonistas atuando através dos seus respectivos receptores ativam a fosfolipase C, o qual converte fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato ( $PIP_2$ ) em  $IP_3$  e diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  induz a liberação de  $Ca^{2+}$  através dos receptores de  $IP_3$  ( $IP_3R$ ) no retículo sarcoplasmático levando a um aumento do  $[Ca^{2+}]_i$  (THORNELOE; NELSON, 2005; WEBB, 2003). Os eventos de liberação de  $Ca^{2+}$  mediados por  $IP_3R$  são chamados “puffs” de  $Ca^{2+}$  e podem levar a liberação de  $Ca^{2+}$  por canais sensíveis a rianodina por um mecanismo de liberação de cálcio conhecido por cálcio induz a liberação do próprio cálcio (THORNELOE; NELSON, 2005).

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

Baseados nestes dados, passamos a investigar se a fonte de  $Ca^{2+}$  intracelular, mobilizada por rotundifolona, para induzir as alterações nos transientes de  $Ca^{2+}$  citosólicos, seria proveniente do retículo sarcoplasmático. Para atingir este objetivo, foi utilizado um inibidor da ATPase de  $Ca^{2+}$  do retículo endo-sarcoplasmático (SERCA), o ácido ciclopiazônico (CPA), responsável por depletar os estoques intracelulares de  $Ca^{2+}$  (ZHANG et al., 2005). Nestas condições, as alterações na fluorescência ao  $Ca^{2+}$ , captados por microscopia confocal, induzidas pelo monoterpeno foram significativamente atenuadas, mas não completamente abolidas, sugerindo que o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  observada após perfusão com rotundifolona em miócitos de artéria mesentérica envolve pelo menos duas vias: influxo de  $Ca^{2+}$ , bem como mobilização de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático.

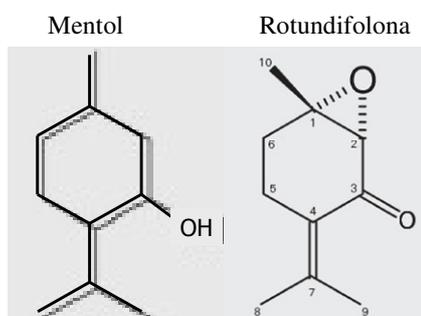
Estes resultados contrastam aos obtidos por Guedes e colaboradores (2004) que constataram, que OEMV e rotundifolona inibiram as contrações transientes em meio livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , induzidas por FEN ( $1\mu\text{M}$ ), mas não aquelas induzidas pela cafeína (20 mM) em aorta de rato, sugerindo que OEMV e rotundifolona têm alguma ação sobre a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares sensíveis ao  $\text{IP}_3$ , mas não sobre aqueles do tipo rianodina.

Como descrito anteriormente, uma via importante em elevar a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é a abertura de canais catiônicos na membrana plasmática. Um novo tipo de canal catiônico permeável ao  $\text{Ca}^{2+}$ , recentemente descrito, são os canais potenciais receptores transientes (TRP), descobertos inicialmente no sistema visual de *Drosophila* (COSENS; MANNING, 1969 Apud MINKE, 2006; CLAPHAM, et al., 2005). Estes canais estão intimamente ligados a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, estando implicados no controle da progressão do ciclo celular, migração celular, morte programada, reabsorção de íons divalentes, controle do potencial de membrana das células endoteliais, entre outros (LEDOUX et al., 2006; CLAPHAM, et al., 2005).

Dentre os vários participantes da superfamília dos canais TRP, os mais ricamente expressos em células musculares lisas, em estudos com aorta e artéria pulmonar de rato, são os canais TRPM e TRPV (YANG et al., 2006). A ordem de expressão relativa destes canais nestes tecidos vasculares, através de ensaios de reação em cadeia de polimerase (PCR) quantitativo, foi observada a seguinte escala: para os canais TRPV temos  $\text{TRPV4} > \text{TRPV2} > \text{TRPV1} > \text{TRPV3}$ ; Em se tratando dos canais TRPM temos  $\text{TRPM8} > \text{TRPM4} > \text{TRPM7} > \text{TRPM3} > \text{TRPM2} \gg \text{TRPM5}$  (YANG et al., 2006). Inoue e colaboradores (2006) demonstraram a expressão em artéria mesentérica, através de RT-PCR, dos canais TRPM1, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM7, TRPV2, TRPV3 e TRPV4.

Os monoterpenos são relatados por apresentarem ação agonista ou antagonista de diferentes membros da família dos TRPs (PIER et al., 2002; EISELE et al., 2007; PATEL et al., 2007). A cânfora, carvacrol, timol e mentol foram relatados por ativarem os canais TRPV3 (MACPHERSON, et al., 2006). Já o mentol, monoterpeno de origem natural, é o ativador clássico dos TRPM8, canal catiônico termossensível permeável ao  $\text{Ca}^{2+}$  (PATEL et al., 2007; PIER et al., 2002; BAUTISTA et al., 2007). Como podemos observar na figura 59, existe uma grande semelhança estrutural entre mentol e rotundifolona. Então, baseados nestas considerações, resolvemos avaliar se o aumento nos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares

induzidas pelo monoterpeno poderia envolver a ativação de canais TRP nos miócitos vasculares.



**Figura 60:** Estrutura química do mentol e de rotundifolona, dois monoterpenos originários de produtos naturais.

Interessantemente, após pré-tratamento dos miócitos vasculares com capsazepina, um antagonista dos canais TRPV1 e TRPM8 (BEVAN et al., 1992; BEHRENDT et al., 2004; CLAPHAM, et al., 2005), os aumentos na  $[Ca^{2+}]_i$  induzidas por rotundifolona foram significativamente atenuados, porém não abolidos, sugerindo que os efeitos induzidos por rotundifolona em miócitos recém dispersos de artéria mesentérica, observados nos experimentos com microscopia confocal, apontam para ativação destes canais TRP, influxo de  $Ca^{2+}$  e alterações funcionais nos miócitos.

Yang e colaboradores, em 2006, reportaram a expressão de canais TRPM8 em aorta de rato, artéria pulmonar e bexiga. A IUPHAR retrata ainda a expressão destes canais em neurônios sensoriais, gânglios das raízes dorsais e epitélio prostático (CLAPHAM et al., 2005). Inoue e colaboradores (2006) demonstraram a expressão de TRPM8 em artéria cerebral, gânglio das raízes dorsais (DRG), aorta e uma expressão marginal em artéria mesentérica.

A família dos canais iônicos TRP contem membros termosensíveis, chamados termoTRPs. Os termoTRPs são conhecidos por servir como sensores de temperatura em nível molecular. Enquanto que alguns membros dos TRPV são ativados com calor (TRPV1 e TRPV2, à 42°C e 52°C, respectivamente; TRPV3 à 39°C e TRPV4 a 27-42°C), os canais TRPM8 são detectores de temperaturas mais frias (8 a 28°C) (BRAUCHI et al., 2004; VOETS et al., 2004; PIER et al., 2002; XU et al., 2002). Além disto, os canais TRPM8 não

são ativados apenas por temperatura, mas também por mentol e os efeitos da temperatura e do mentol sobre o TRPM8 são conhecidos por cada um potencializarem o efeito do outro (MAHIEU et al., 2007).

No intuito de avaliarmos as influências mútuas de rotundifolona e da temperatura sobre os receptores TRPM, em anéis de artéria mesentérica isolada de rato, realizamos experimentos alterando a temperatura de banho, no qual se encontravam os anéis mesentéricos, para 25°C e 18°C. Nestas condições, foram observadas alterações significativas nos valores de tensão basal. A variação da temperatura de 37°C para 25°C e 18°C causou uma diminuição do tônus basal dos anéis mesentéricos de ratos LN e rotundifolona potencializou estes efeitos. Estes resultados em conjunto sugerem uma possível ativação de TRPM8 por rotundifolona.

Os dados em conjunto explicam muitos dos resultados obtidos anteriormente. As respostas induzidas por rotundifolona nas  $[Ca^{2+}]_i$  não foram abolidas quando os miócitos foram pré-tratados com capsazepine, sugerindo a existência de um mecanismo adicional ao influxo de  $Ca^{2+}$  por canais TRP, para os efeitos nos transientes de  $Ca^{2+}$  citosólicos induzidos por rotundifolona. Resultado semelhante foi observado com o pré-tratamento dos miócitos com o quelante de  $Ca^{2+}$  extracelular, EGTA (2 mM). Estas considerações reforçam os indícios da ação de rotundifolona no influxo de  $Ca^{2+}$  por canais TRP.

Já os resultados obtidos em miócitos vasculares tratados com CPA, evidenciando que rotundifolona induz liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares, corroboram com os estudos realizados por Mahieu e colaboradores (2007), relatando que o mentol, bem como outros monoterpenoides como linalol e geraniol, produziram aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular por liberar  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares, por uma via independente de ativação dos canais TRPM8.

Interessantemente, nossos resultados sugerem que o aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular induzido por rotundifolona envolve liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares, bem como influxo de  $Ca^{2+}$  por canais TRP. Inoue e colaboradores (2006) relataram que vários TRPs podem ser candidatos a canais operados por estoque (SOC), tais como TRPC1, TRPC3, TRPC4 e TRPC6. Os SOCs são canais ativados quando ocorre depleção dos estoques intracelulares de  $Ca^{2+}$  (JACKSON, 2000) e o mecanismo envolvido na ativação destes canais ocorre pela liberação de um fator de influxo de  $Ca^{2+}$  (CIF), difusível, liberado pelo

retículo sarcoplasmático em estados de depleção de  $\text{Ca}^{2+}$  do mesmo, e conseqüente ativação de SOC na membrana (TREPAKOVA et al., 2000; THORNELOE; NELSON, 2005). Então, em nossos resultados, não podemos descartar a hipótese que rotundifolona possa liberar  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático e dessa forma promover entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitivo por SOCs/TRPs.

Adicionalmente, a ativação de TRPs na célula muscular lisa, seguida pela elevação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular induzida por rotundifolona, poderia explicar a ativação dos canais BKca, observado nos estudos funcionais e eletrofisiológicos. Além disto, como mencionado anteriormente, os canais Cav tipo -L apresentam dois tipos de inativação, um processo lento dependente de voltagem e um processo rápido dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (LACINOVÁ; HOFMANN, 2005). O aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzida por rotundifolona pode induzir a inativação dos canais Cav tipo-L, levando os mesmo para um estado não condutor e desta forma diminuindo a amplitude das correntes de  $\text{Ba}^{2+}$  pelos canais Cav, diminuindo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e levando ao vasorelaxamento.

Em conjunto, os nossos resultados indicam o possível mecanismo de ação utilizado por rotundifolona para induzir vasodilatação em ratos normotensos, mecanismo este envolvendo alterações nas concentrações intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como descrito anteriormente, os animais hipertensos de Lyon fazem parte de um modelo de hipertensão essencial que apresenta maior sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  (FREITAS, 2003). A presença desta característica dos ratos LH juntamente com o possível mecanismo de ação envolvido nas respostas vasorelaxantes induzidas por rotundifolona, em ratos normotensos, envolvendo aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, nos impulsionaram a estudar os efeitos deste monoterpeno em animais geneticamente hipertensos de Lyon. Além disso, nenhum estudo investigando as ações de rotundifolona em animais geneticamente hipertensos havia sido realizado.

Em animais LN e LH, não anestesiados, a administração aguda de rotundifolona induziu uma resposta transiente de maneira dependente de dose, caracterizada por uma hipotensão associada a uma bradicardia. Esses resultados iniciais estão de acordo com estudos mostrando que a administração sistêmica de rotundifolona induziu uma hipotensão transiente em ratos wistar normotensos (GUEDES et al., 2002).

Vale salientar que a avaliação do efeito da administração aguda de rotundifolona sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos foi realizada em animais não

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

Para evidenciarmos o efeito vascular induzido por rotundifolona em animais hipertensos, realizamos experimentos com anéis de artéria mesentérica isolada de rato LH. No presente estudo foi observado que rotundifolona induziu um vasorelaxamento, dependente de concentração em anéis de mesentérica superior isolada de rato LH, com endotélio intacto, pré-contraídos com FEN, com potência e eficácia farmacológica semelhantes aos resultados obtidos com animais LN. Após remoção do endotélio vascular, a curva concentração-resposta induzida por concentrações crescentes de rotundifolona foi deslocada significativamente para direita, sem alterações em seus valores de efeito máximo, semelhantemente ao observado nos animais normotensos. Estes dados sugerem que o efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona em animais hipertensos também envolve dois mecanismos básicos, um dependente do endotélio vascular e outro independente do mesmo.

Como os efeitos de rotundifolona em animais hipertensos se mostraram semelhantes aos encontrados em animais normotensos, resolvemos também investigar em animais LH o mecanismo de ação independente do endotélio utilizado pelo monoterpene para induzir vasodilatação.

Em experimentos realizados na presença de solução de Tyrode com KCl 20 mM, condição em que promove bloqueio parcial do efluxo de  $K^+$ , como descrito anteriormente, alterou levemente, porém de maneira significativa, o vasorelaxamento dependente de concentração induzido por rotundifolona, com diferenças extremamente significantes entre os valores de  $pD_2$  quando comparados aos animais normotensos. Esses indícios sugerem que a resposta relaxante induzida por rotundifolona em animais hipertensos parece envolver em menor grau, a participação dos canais para  $K^+$ .

A hipertensão é relatada por estar associada à despolarização de membrana, resultando em maior probabilidade de abertura dos canais Cav. Isto levaria a um maior tônus basal das arteríolas, contribuindo para resistência vascular aumentada observada em hipertensos. Desde que as correntes de  $K^+$  desempenham papel principal na regulação do potencial de membrana no repouso, suprimindo a excitabilidade da membrana, é sugestivo que em animais hipertensos, uma menor corrente de  $K^+$  total seja observada, quando comparada a normotensos. Essas premissas foram confirmadas por Zhang e colaboradores, 2005, em estudos com miócitos de artéria mesentérica de ratos SHR e WKY, evidenciando uma menor densidade de corrente total para  $K^+$  e alterações nas contribuições dos BKca nestas correntes. Estes dados podem ser justificativos para a menor influência dos canais para  $K^+$  em animais hipertensos em nossos estudos, quando comparados aos resultados obtidos com animais normotensos.

Baseados na menor influência dos canais para  $K^+$  no vasorelaxamento induzido por rotundifolona em anéis mesentéricos de ratos hipertensos geneticamente, passamos a investigar a importância dos canais para  $Ca^{2+}$  nestes efeitos. Neste intuito avaliamos a influência do monoterpreno nas curvas cumulativas induzidas por  $CaCl_2$  em meio despolarizante e nominalmente sem  $Ca^{2+}$ , bem como nas contrações induzidas pelo agonista dos canais  $Ca_v$  tipo-L, o Bay K 8644, semelhante aos experimentos realizados com animais normotensos.

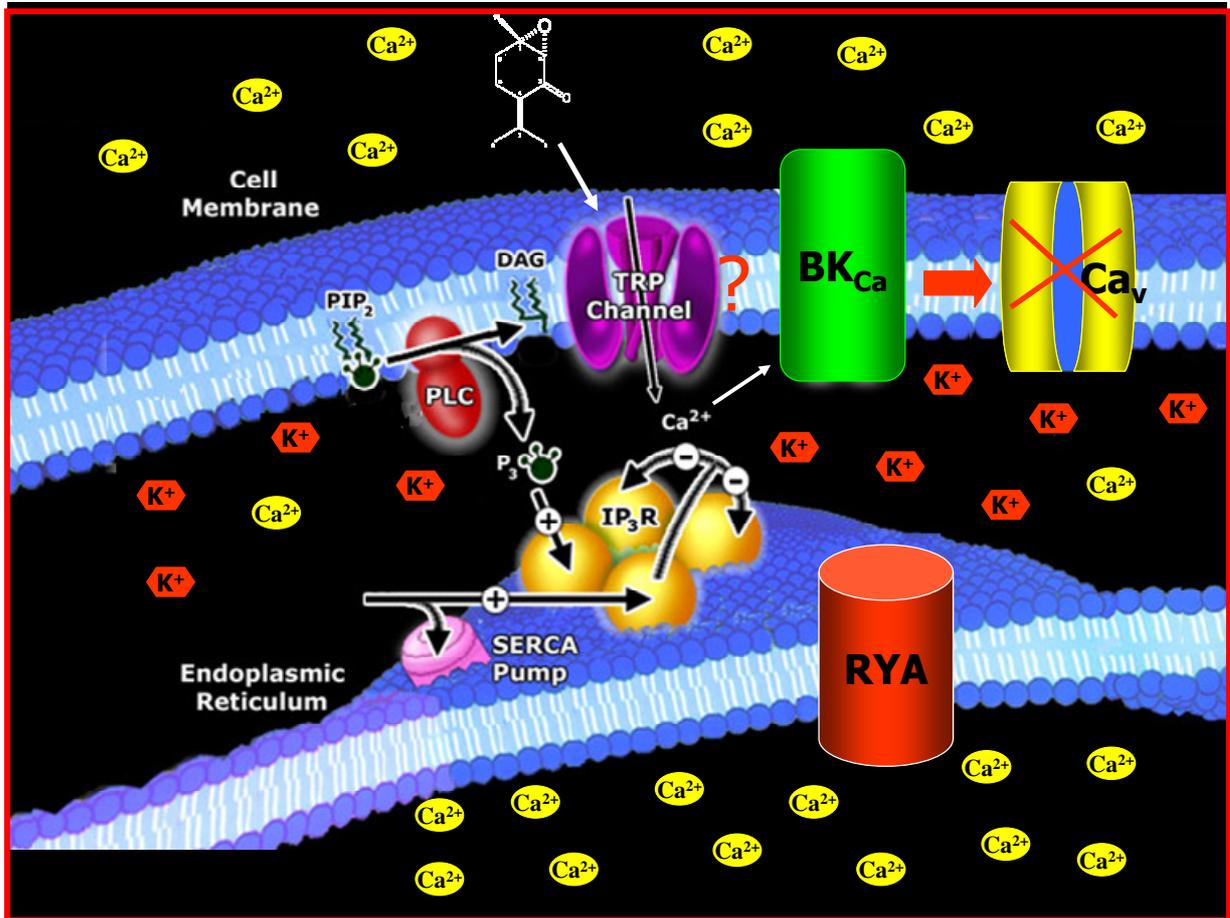
Nestas condições, rotundifolona foi mais eficaz, como evidenciado pelos valores de  $E_{max}$ , em atenuar as contrações induzidas por  $CaCl_2$  em meio despolarizante nominalmente sem  $Ca^{2+}$ , em anéis mesentéricos de ratos LH, quando comparado aos resultados obtidos com ratos LN. Além disto, rotundifolona induziu efeito vasodilatador em anéis mesentéricos pré-contraídos com Bay K 8644, apresentando diferença significativa na potência farmacológica, quando comparados aos resultados obtidos em animais normotensos. Estes resultados em conjunto sugerem que rotundifolona parece interferir mais pronunciadamente no influxo de  $Ca^{2+}$  em animais hipertensos que em animais normotensos.

Os ratos hipertensos de Lyon apresentam uma maior reatividade a agonistas vasoconstritores, bem como uma sensibilização aumentada ao  $Ca^{2+}$ , provavelmente envolvendo uma expressão aumentada de Rho-kinase (FREITAS, 2003). Então, os efeitos vasodilatadores envolvendo a inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  induzidos por rotundifolona serem

mais pronunciados em anéis de artéria mesentéricos de ratos LH, pode ser uma consequência da sensibilidade aumentada da maquinaria contrátil destes animais em relação aos seus controles normotensos (LN).

Estes resultados em conjunto, obtidos com animais hipertensos, sugerem que o efeito hipotensor induzido por rotundifolona parece ser decorrente de alterações na resistência vascular periférica, envolvendo provavelmente, diminuição do influxo de  $Ca^{2+}$  e consequente vasodilatação. O efeito bradicárdico pode ser decorrente de uma ação cardíaca direta por parte de rotundifolona, visto que nos nossos resultados evidenciamos uma ação antagonista dos canais  $Ca_v$  em miócitos vasculares de animais normotensos induzidas pelo monoterpeno. Além disso, Guedes e colaboradores (2002) relataram um efeito inotrópico e cronotrópico negativo, induzido por rotundifolona, em estudos realizados com átrio isolado de rato wistar normotenso, reforçando a hipótese que rotundifolona pode apresentar uma ação direta sobre a musculatura cardíaca. No entanto, estudos para avaliar esta hipótese em animais hipertensos espontaneamente não foram realizados em nosso trabalho.

Por fim, esses resultados em conjunto sugerem que rotundifolona induz efeito vasorelaxante em anéis da artéria mesentérica superior de rato normotenso por ativar provavelmente os canais TRPM8, levando ao aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ . Este evento induziria ativação de  $BK_{ca}$  e inativação dos canais  $Ca_v$ , culminando na hiperpolarização ou repolarização das células musculares lisas, diminuição do influxo de  $Ca^{2+}$  e relaxamento (figura 60). O efeito vasorelaxante observado pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo efeito hipotensor observado nos experimentos in vivo. Além disto, rotundifolona apresenta atividade hipotensora e bradicárdica em animais com hipertensão essencial, provavelmente trilhando um mecanismo semelhante ao observado em animais normotensos.



**Figura 61:** Mecanismo de ação proposto envolvido nas respostas cardiovasculares induzidas por rotundifolona em artéria mesentérica.

Conclusões

## 7. CONCLUSÕES

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

- 1) Rotundifolona promove vasorelaxamento, em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato, de maneira dependente e independente do endotélio vascular;
- 2) A vasodilatação induzida por rotundifolona envolve ativação dos canais  $BK_{ca}$  e inibição dos canais  $Ca_v$  nos miócitos da artéria mesentérica superior de rato;
- 3) O mecanismo molecular envolvido nas respostas biológicas induzidas por rotundifolona parece envolver ativação de canais TRP, provavelmente TRPM8, no músculo liso vascular, culminando em alterações nos transientes de  $Ca^{2+}$  intracelulares;
- 4) O aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular induzido por rotundifolona envolve entrada de  $Ca^{2+}$  por canais TRP e liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático;
- 5) Rotundifolona induz hipotensão e bradicárdia em ratos espontaneamente hipertensos, não anestesiados, de maneira dependente da dose. Os resultados encontrados sugerem que a hipotensão induzida em animais hipertensos parece envolver diminuição da resistência vascular periférica total.
- 6) O efeito vasorelaxante induzido por rotundifolona em animais hipertensos parece envolver mecanismo de ação semelhante ao observado em animais normotensos, no entanto, estudos adicionais serão necessários para melhor elucidar o mecanismo de ação de rotundifolona em animais hipertensos.

*Perspectivas*

---

## **8. PERSPECTIVAS**

- 1) Investigar a expressão dos canais TRPM8 em células musculares de artéria mesentérica utilizando RT-PCR;
- 2) Caracterizar, através de técnicas eletrofisiológicas, a ação de rotundifolona sobre as correntes de canais TRPM8;
- 3) Caracterizar a influência dos aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares induzidos por rotundifolona diretamente nas correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  em miócitos de artéria mesentérica;
- 4) Investigar o efeito bradicárdico induzido por rotundifolona estudando as influências do monoterpene nas correntes de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^{2+}$  em cardiomiócitos;
- 5) Investigar o mecanismo molecular envolvido nos efeitos cardiovasculares induzidos por rotundifolona em animais hipertensos.

## *Referências*

---

**REFERÊNCIAS**

AALKJAER, C.; HEAGERTY, A. M.; PETERSEN K. K., et al. Evidence for increased media thickness, increased neuronal amine uptake, and depressed excitation-contraction coupling in isolated resistance vessels from essential hypertensives. **Circ Res**, v.61, p.181-186, 1987.

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

ADEGUNLOYE, B.; SOFOLA, O. Aorta and mesenteric artery respond differently to serotonin. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v.8, p.255 - 267, 1997.

ALBUQUERQUE, A . A . C.; SORENSON, A . L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of essential oil of *Croton zehntneri* and of anethole and estragole on skeletal muscles. **J Pharmacol**, v.49, p.41-49, 1995.

ALENCASTRO, F. M. M. R.; SCATONE, Z.; PRISCO, J. T. et al. Contribuição para uma bibliografia do gênero *Mentha* L. Campinas, Assoc. Bras. Pesq. Plantas Arom. Óleos Essenciais, 354, 1965.

ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; DE JONGH, D. C. et al. Química Orgânica. 2 ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Dois, p.673-677, 1978.

ALMEIDA, R. N.; HIRUMA, C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M. . Analgesic effect of rotundifolone in rodents. **Fitoterapia**, v.67, p, 334-338, 1996.

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

AMBERG, G. C.; SANTANA, L. F. Downregulation of the BK channel h1 subunit in genetic hypertension. **Circ Res**, v.93, p.965-971, 2003.

ASANO, M.; MASUZAWA-ITO, K.; MATSUDA, T. Charybdotoxin-sensitive  $K^+$  channels regulate the myogenic tone in the resting state of arteries from spontaneously hypertensive rats. **Br J Pharmacol**, v.108, p.214–222, 1993.

AZIZI, M.; MENARD, J.; BISSERY, A. et al. Pharmacologic demonstration of the synergistic effects of a combination of the renin inhibitor aliskiren and the AT1 receptor antagonist valsartan on the angiotensin II-renin feedback interruption. **J Am Soc Nephrol**, v.15, n.12, p.3126 -3133, 2004.

BAO, L.; KALDANY, C.; HOLMSTRAND, E. C.; et al. Mapping the BKCa channel's "Ca<sup>2+</sup> bowl": side-chains essential for Ca<sup>2+</sup> sensing. **J Gen Physiol**, v.123, p.475 - 489, 2004.

BARBOSA FILHO, J. M.; BORBA, M. O. P.; ROUSSEL, J. L. et al. Constituintes Químicos do extrato butanólico da *Mentha x villosa* Hudson (Labiatae). Curitiba, **Resumos do XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 109, 1992.

BARDAI, S. E.; WIBO, M.; HAMAIDE, M. C.; et al. Characterisation of marrubenal, a diterpene extracted from *Marrubium vulgare*, as an L-type calcium channel blocker. **Br J Pharmacol**, v.140, p.1211 - 1216, 2003.

BAUTISTA, D. M., SIEMENS, J.; GLAZER, J. M. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. **Nature**, v.448, p.204 – 209, 2007.

BEHRENDT, H. J.; GERMANN, T. GILLEN, C. H.; et al. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. **Br J Pharmacol**, v.141, p.737 - 745, 2004.

BEVAN, S.; HOTHI, S.; HUGHE, G.; et al. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin, **Br J Pharmacol**, v.107, p. 544 - 552, 1992.

BEZANILLA, F.; ARMSTRONG, C. M. A low-cost signal averager and dataacquisition device. **Am J Physiol**, v.232, p.C211 - C215, 1977.

BEZERRA, M. A. C. *Alpinia speciosa* Schum: Estudo das frações fixas e do óleo essencial. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1994.

BÖDDING, M.; WISSENBACH, U.; FLOCKERZI, V. Characterisation of TRPM8 as a pharmacophore receptor. **Cell Calcium**, v.42, p.618 - 628, 2007.

BOITTIN, F. X.; MACREZ, N.; HALET, G.; et al. J. Norepinephrine-induced  $Ca^{2+}$  waves depend on InsP3 and ryanodine receptor activation in vascular myocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.277, C139 - C151, 1999.

BORBA, M. O. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PADOVANI, I. O. Ultra structural of the active fractions of *Mentha crisper* against the *Schistosoma mansoni* "in vivo". In: International Symposium on Schistosomiasis – National Meeting on Schistosomiasis, Rio de Janeiro, 1991.

BORBA, M. O. P.; KOBAYASHI, S.; ACA, I. S.; et al. Frações ativas da *Mentha crisper* sobre a cultura da *Entamoeba histolytica* cepa SAW 1627. Parte II. Resumos do XI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, João Pessoa, 69, 1988.

BORBA, M. O. P.; KOBAYASHI, S.; ACA, I. S.; et al. Frações ativas da *Mentha crisper* sobre cultura de *Entamoeba histolytica* cepa SAW 1627. Parte II. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, João Pessoa, 11, 1990a.

BORBA, M. O. P.; MELO, J. F. A. Uso da *Mentha crisper* no tratamento de helmintos e protozoários intestinais. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Manaus, 24, 1988.

BORBA, M. O. P.; PADOVAN, P. A.; PADOVAN, I. P.; et al. Effects of *Mentha crisper* crude extract on *Shistosoma mansoni* cercaria. An ultra-estrutural study. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.84, p.235, 1989b.

BORBA, M. O. P.; SANTANA, J.V. & BERINO, E. . Effects of *Mentha crisper* crude extract administration on murine experimental schistosomiasis. I – Clinical and parasitological aspects. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.84, p.236, 1989a.

BORBA, M. O. P.; SILVA, J. S.; MONTENEGRO, L.; et al. Frações ativas da *Mentha crisper* sobre camundongos albinos infectados com *Schistosoma mansoni* cepa São Lourenço da Mata. Parte I. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, João Pessoa, 11, 1990b.

BRAUCHI, S.; ORIO, P.; LATORRE, R. Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.101, 15494 – 15499, 2004.

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

BUCKINGHAM, J. Dictionary of natural products. London: Chapman and Hall, v.2, p.2169, 1994.

BYLUND, D. B. Nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacol Rev**, v.46, p.121 -136, 1994.

CAI, B. ; GONG, D. ; PAN, Z. et. al. Large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  currents blocked and impaired by homocysteine in human and rat mesenteric artery smooth muscle cells. **Life Sci**, v.80, p.2060 - 2066, 2007.

CALLAMARAS, N.; PARKER, I. Construction of a confocal microscope for real-time x-y and x-z imaging. **Cell Calcium**. 26, p. 271–279, 1999.

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

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

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v.389, p.816 - 824, 1997.

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

CHAUHAN, S.; RAHMAN, A.; NILSSON, H. et al. NO contributes to EDHF-like responses in rat small arteries: a role for NO stores. **Cardiovasc Res**, v.57, p. 207-216, 2003.

CHÁVEZ, J. P. Terpenóides de *Ocotea corymbosa* [Meissn] Mez. Dissertação de Mestrado Universidade de SP, São Paulo, 1991.

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

CLAPHAM, D. E.; JULIUS, D.; MONTELL, C.; et al. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels. **Pharmacol Rev**, v.57, p.427 - 450, 2005.

CLARK, S. G.; FUCHS, L. C. Role of nitric oxide and Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **J Pharmacol Exper Ther**, v.282, n.3, p.1473 - 1479, 1997.

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; BARATA, E. L.; MAGALHÃES, P. J. C.; et al. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri*, and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. **Phytother Res**, v.11, p.299 - 304, 1997.

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Selective modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea-pig. **Phytother Res**, v. 12, p.189 -194, 1998.

COHEN, R. A.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-Dependent Hyperpolarization: Beyond Nitric Oxide and Cyclic GMP. **Circulation**, v.92, p.3337 – 3349, 1995.

COSTA, A. F. Farmacognósia. 3 ed., Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1: 362, 1975.

COX, D. H.; ALDRICH, R. W. Role of the beta1 subunit in large-conductance Ca<sup>2+</sup> - activated K<sup>+</sup> channel gating energetics. Mechanisms of enhanced Ca<sup>2+</sup> sensitivity. **J Gen Physiol**, v.116, p.411-432, 2000.

COX, D.H.; DUNLAP, K. Inactivation of N-type calcium current in chick sensory neurons: calcium and voltage dependence. **J Physiol**, v.104, p. 311 – 336, 1994.

COX, R. H. Changes in the expression and function of arterial potassium channels during hypertension. **Vascul Pharmacol**, v.38, p.13 - 23, 2002.

COX, R. H.; LOZINSKAYA, I.; DIETZ, N. J. Calcium exerts a larger regulatory effect on potassium channels in small mesenteric artery myocytes from spontaneously hypertensive rats compared to Wistar-Kyoto rats. **Am J Hypertens**, v.16, p.21-27, 2003.

CRAVEIRO, A. A.; DE QUEIROZ, D. C. Óleos Essenciais e Química Fina. **Quim Nova**, v.16, p.224-228, 1993.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; et al. Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste. Ed. U.F.C., Fortaleza, p.7-19, 1981.

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

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

DANNERT, M. T.; ALSASUA, A.; HERRADON, E. ; et. al. Vasorelaxant effect of Win 55,212-2 in rat aorta: New mechanisms involved. **Vascul Pharmacol**, v.46, p.16 – 23, 2007.

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

DE OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F.; DA SILVA, M. S. et al. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). **Vascul Pharmacol**, v.44, p.338 - 344, 2006.

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

DONG, H.; EARLE, M. L.; JIANG, Y. et al. Cardiovascular effect of CPU-23, a novel L-type calcium channels blocker with a unique molecular structure. **Br J Pharmacol**, v.122, p.1271 - 1278, 1997.

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

DUPONT, J.; DUPONT, J.C.; FROMENT, A.; et al. Selection of three strains of rats with spontaneously different levels of blood pressure. **Biomedicine**. 19, p. 36-41, 1973.

EDWARDS, G.; DORA, K. A.; GARDENER, M. J.; et al.  $K^+$  is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature**, v.396, p.269 - 72, 1998.

ELIZABETSKY, E. New directions in ethnopharmacology. **J Etnobiol**, v.6, p.121, 1986.

ELLIOTT, W. J. Systemic Hypertension. **Curr Probl Cardiol**, v.32, p.201-259, 2007.

FANGER, C. M.; GHANSHANI, S.; LOGSDON, N. J.; et al. Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance  $KCa$  channel,  $IKCa1$ . **J Biol Chem**, v.274, p.5746 - 5754, 1999.

FARACI, F. M.; SOBEY, C. G. Role of potassium channels in regulation of cerebral vascular tone. **J Cereb Blood Flow Metab**, v.18, p.1047-63, 1998.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br J Pharmacol**, v.93, p.515 - 524, 1988.

FLAKE, R. H.; TURNER, B. L. Volatile Constituents, especially terpenes, and their utility and Potential as Taxonomic characters in Populational Studies. In: Chemistry in Botanical Classification (BENDZ, G. & SANTISSON, J. eds.). New York, Academic Press, 123-128, 1973.

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

FOGAÇA, R. T. H.; CAVALCANTE, A. D. A.; SERPA, A. K. L.; et al. The effects of essential oil of *Mentha x villosa* on skeletal muscle of the toad. **Phytother Res**, v.11, p.552-557, 1997.

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

FREITAS, Maria Regina de. Mecanismos de la vasomotricite dans les arteres de rats hypertendus de souche lyonnaise: role de l'endothelium, du calcium et des phosphorylations. 2003. 183 f. Tese (Pharmacologie Moleculaire et Cellulaire) – Universite Louis Pasteur de Strasbourg, França.

FREITAS, M.R.; SCHOTTA, C.; CORRIUA, C., et al. Heterogeneity of endothelium-dependent vasorelaxation in conductance and resistance arteries from Lyon normotensive and hypertensive rats. **Journal of Hypertension**. 21, p. 1505–1512, 2003.

FREISE, F. W. Essential oils from Brazilian Euphorbiaceae. **Perfum Essent Oil Rec**, v.26, p.219-220, 1935.

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

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

GARNERO, J. Le Problèmes rencontrés au Cours de L' obtention des Huiles essentielles – Le cos des Huiles essentielles de Labiées (2<sup>o</sup> partie). **Phytoterapy**, v.14, p.17-20, 1985.

GHISDAL, P.; MOREL N. Cellular target of voltage and calcium-dependent K<sup>+</sup> channel blockers involved in EDHF-mediated responses in rat superior mesenteric artery. **Br J Pharmacol**, v.134, 1021 - 1028, 2001.

GHISDAL, P.; MOREL, N. Cellular target of voltage and calcium-dependent K<sup>+</sup> channel blockers involved in EDHF-mediated responses in rat superior mesenteric artery. **Br J Pharmacol**, v.134, p.1021 - 1028, 2001.

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

GOLDSTEIN, S.A.N.; BAYLISS, D.A.; KIM, D.; et al. Nomenclature and Molecular Relationships of Two-P Potassium Channels **Pharmacol Rev**. 57, p. 527-540, 2005

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; et al. Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolone. **Braz J Med Biol Res**, v.37, p.1881 - 1887, 2004.

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; et al. Endothelium-dependent hypotensive and vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Mentha x villosa* in rats. **Phytomedicine**, v.11, p.490 - 497, 2004.

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; et al. Muscarinic agonist properties involved in the hypotensive and vasorelaxant responses of rotundifolone in rats. **Planta Med**, v.68, p.700 - 704, 2002.

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

GUTMAN, G.A.; CHANDY, K.G.; STEPHAN GRISSMER, S.; et al. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels **Pharmacol Rev**. 57, p. 473-508, 2005.

HADDY, F. J.; VANHOUTTE, P. M.; FELETOU, M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.290, p.546-552, 2006.

HAMILL, O. P.; MARTY, A.; NEHER, E. et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflugers Arch**, v.391, p.85 - 100, 1981.

HANDA, K. L.; SMITH, D. M.; NIGAM, I. C.; LEVI, L. Essential oils and their constituents XXIII. Chemotaxonomy of the genus *Mentha*. **J Pharmac Scie**, v.53, p.1407-1409, 1964.

HARLEY, R. M. Mints. In: *Plants wild and cultivated* (GREEN, P. S. ed.) Kew, Royal Botanic Gardens, p.126-128, 1973.

HARLEY, R. M.; REYNOLDS, T. *Advances in labiate science*. Royal Botanic Garden Kew, Richmond, Surrey, UK, 420, 1992.

HARRAP, S. B. Hypertension: genes versus environment. **Lancet**, v.344, p.169 – 171, 1994.

HILLS, J. M.; ARONSON, P. I. The mechanism of action of peppermint oil on gastrointestinal smooth muscle. **Gastroenterology**, v.101, p.55-56, 1991.

HIRUMA, C. A.; ALMEIDA, R. N.; BARBOSA FILHO, J. M. Óleo essencial da *Mentha x villosa* Hudson com atividade sobre o Sistema Nervoso Central. **Resumos do XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Curitiba, 73, 1992.

HOLZER, P. Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v.121, p.49 - 146, 1992.

HONG, K. W.; PYO, K. M.; LEE, W. S.; et al. Pharmacological evidence that calcitonin gene-related peptide is implicated in cerebral autoregulation. **Am J Physiol**, v.266, p.H11 - 16, 1994.

INOUE, R.; JENSEN, L. J.; SHI, J.; et al. Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. **Circ Res**, v.99, p.119 - 131, 2006.

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

ITOKAWA, H.; AIYAMA, R.; IKUTA, A. A. Pungent diarylheptanoid from the *Alpinia oxyphylla*. **Phytoch**, v.20, p.769-771, 1981.

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

JAGGAR, J. H.; PORTER, V. A.; LEDERER, W. J.; et al. Calcium sparks in smooth muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.278, C235 - C256, 2000.

JULIUS, S. Blood Pressure Lowering Only or More? Has the Jury Reached Its Verdict? **Am J Cardiol**, v.100, p.32J-32J, 2007.

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

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

KARLBERG, B. E. Cough and inhibition of the renin-angiotensin system. **J Hypertens.** v.11, p.49-52, 1993.

KAWABATA, A.; KUBOA, S.; NAKAYAA, Y. et. al. Distinct roles for protease-activated receptors 1 and 2 in vasomotor modulation in rat superior mesenteric artery. **Cardiovasc Res**, v.61, 683 - 692, 2004.

KAWASAKI, H.; TAKASAKI, K.; SAITO, A.; et al. Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. **Nature**, v.335, p.164 - 167, 1988.

KERAMIDAS, A.; KUHLMANN, L.; MOORHOUSE, A. J.; BARRY, P. H. Measurement of the limiting equivalent conductivities and mobilities of the most prevalent ionic species of EGTA (EGTA<sup>2-</sup> and EGTA<sup>3-</sup>) for use in electrophysiological experiments. **J Neurosci Methods**, v.89, p.41 - 47, 1999.

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

KILPATRICK, E. V.; COCKS, T. M. Evidence for differential roles of nitric oxide (NO) and hyperpolarization in endothelium – dependent relaxation of pig isolated coronary artery. **Br J Pharmacol**, v.112, p.557 - 565, 1994.

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

KIUCHI, F.; IWAKAMI, S.; SHBUYA, M.; et al. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. **Chem Pharm Bull**, v.40, p.387-391, 1992.

KO, W. H.; YAO, X. Q.; LAU, C. W.; et al. Vasorelaxant and antiproliferative effects of berberine. **Eur J Pharmacol**, v.399, p.187 - 196, 2000.

KOHLMANN-JUNIOR, O.; RIBEIRO, A. B. Tratamento Medicamentoso da Hipertensão Arterial. In: Tratado de cardiologia SOCESP, Manole, p.465 -474. cap.7, 2005.

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

KUBO, Y.; ADELMAN, J.P.; CLAPHAM, D.E.; et al. Nomenclature and Molecular Relationships of Inwardly Rectifying Potassium Channels. **Pharmacol Rev.** 57, p. 509-526, 2005.

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

LACINOVÁ, L.; HOFMANN, F. Ca<sup>2+</sup>-and voltage – dependent inactivation of the expressed L-type Ca<sub>v</sub>1.2 calcium channels. **Arch Biochem Biophys**, v.437, p. 42 – 50, 2005.

LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, L. F. R.; LEAL-CARDOSO, H. J.; et al. Cardiovascular Effects of the Essential Oil of *Mentha x villosa* and Main Constituent, Piperitenone Oxide, in Normotensive Anaesthetized Rats: Role of the Autonomic Nervous System. **Planta Med**, v.67, p.638-643, 2001.

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

LAVABRE, M. Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais. 2. ed. Rio de Janeiro, Record, 1993.

LAWRENCE, B. M. Chemical components of Labiatae oils and their exploitation. In: HARLEY, R. M. ; REYNOLDS, T. . *Advances in Labiatae Science*, p.399-436, Royal Botanic Gardens, Kew, p.399 - 436, 1992.

LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A . N.; FIGUEIREDO, I. B.; et al. Benzyl-eugenol antagonizes the contracture induced by eugenol on skeletal muscle. **Rev Med Univ Fed Ceará**, v.28/29, p.35 - 39, 1988.

LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; FIGUEIREDO, I. B. et al. Effects of eugenol on excitation-contraction coupling in skeletal muscle. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v.327, p.113 -124, 1994.

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

LEE, A.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. A.  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent facilitation and inactivation of P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels. **J Neurosci**, v.20, p.6830 - 6838, 2000.

LEE, W. S.; NGO-ANH, T. J.; BRUENING-WRIGHT, A.; et al. Small conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels and calmodulin: cell surface expression and gating. **J Biol Chem**, v.278, p.25940–25946, 2003.

LEITE, M. F.; THROWER, E. C.; ECHEVARRIA, W. et. al. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. **Physiology**, v.100, p.2975 – 2980, 2003.

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

LIU, C. ; NGAI, C. Y. ; HUANG Y.; et al. Depletion of intracellular  $Ca^{2+}$  stores enhances flow-induced vascular dilatation in rat small mesenteric artery. **Br J Pharmacol**, v.147, p.506 - 515, 2006.

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

LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S.; et al. Essential oils of the some Amazonian zingiberaceae, Genera *Alpinia* and *Rengalinine*. **J Nat Prod**, v.47, p.907 - 908, 1984.

MACMAHON, S.; PETO, R.; CUTLER J., et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Prolonged differences in blood pressure. **Lancet**, v.335, p.765 - 74, 1990.

MACPHERSON, L. J.; HWANG, S. W.; MIYAMOTO, T.; et al. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. **Mol Cell Neurosci**, v.32, p.335 - 343, 2006.

MAGALHÃES, P. J. C.; CRIDDLE, D. N.; TAVARES, R. A. ; et al. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its

constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytother Res**, v.12, p.172-177, 1998.

MAHIEU, F.; OWSIANIK, G.; VERBERT, L. et al. TRPM8-independent Menthol-induced  $\text{Ca}^{2+}$  Release from Endoplasmic Reticulum and Golgi. **J Biol Chem**, v.282, p.3325 – 3336, 2007.

MATOS, F. J. A . Farmácias Vivas. Fortaleza, Ed. UFC, p.48-49, 1991.

MATOS, F. J. A. Farmácias vivas. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1994.

MCKEMY, D. D.; NEUHAUSSER, W. M.; JULIUS, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**, v.416, p.52 - 58, 2002.

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

MENDONÇA, V. L. M.; OLIVEIRA, C. L. A.; CRAVEIRO, A. A.; RAO, V. S.; FONTELES, M. C. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 93-97, 1991.

MINKE, B. TRP channels and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. **Cell Calcium**, v.40, p.261 - 275, 2006.

MISRA, L.N.; TYAGI, B.R.; THAKUR, R.S. Chemotypic variation in Indian spearmint. **Plant Med**, v.55, p.575-576, 1989.

MONCADA, S.; VANE, J. R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandins endoperoxydes, thromboxane A2 and prostacyclin. **Pharmacol Rev**, v.30, p.293-331, 1979.

MONTE, J. Q.; DE FREITAS, M. R.; LEMOS, T. L. G. Contribuição ao Estudo Químico de Plantas Medicinais *Mentha crispata* L. **Resumos do XI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, João Pessoa, 204, 1988.

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

MUKHAMEDYAROV, M. A.; GRISHIN, S. N.; ZEFIROV, A. L.; et al. Evidences for calcium-dependent inactivation of calcium current at the frog motor nerve terminal. **Brain Res Bull**, v.69, p.652 - 655, 2006.

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

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

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

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

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J**. 27, p. 282 – 293, 1963.

PATEL, T.; ISHIUJI, Y; YOSIPOVITCH, G. Menthol: a refreshing look at this ancient compound. **J Am Acad Dermatol**, v.57, p. 873 – 881, 2007.

PEIER, A. M.; MOQRICH, A.; HERGARDEN, A. C.; et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**, v.108, p.705 - 715, 2002a.

PEREZ-REYES, E. Molecular Physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. **Physiol Rev**, v.83, n.1, p.117 - 161, 2003.

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

PUCOVSKÝ, V.; MOSS, R. F.; BOLTON, T. B. Non-contractile cells with thin processes resembling interstitial cells of Cajal found in the wall of guinea-pig mesenteric arteries. **J Physiol**, v.552, p.19 - 33, 2003.

RODRIGUES, M. A.; GOMES, D. A.; LEITE, M. F. et al. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. **J Biol Chem**, v.282, p.17061 - 17068, 2007.

ROMANI-BERRA, R.; BLAUSTEIN, P.; MATTESON, D.R. TTX-sensitive voltage-gated Na<sup>+</sup> channels are expressed in mesenteric artery smooth muscle cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.289, p.H137 - H145, 2005.

SANTANA, C. F.; ALMEIDA, E. R.; DOS SANTOS, E. R. et al. Action ofr Mentha crispa hydroethanolic extract in patients bearing intestinal protozoan. **Fitoterapia**, v.63, p.409-410, 1992.

SASSARD, J.; MING, L.; KIAO-LING, L. Lyon genetically hypertensive rats: an animal model of "low rennin hypertension". **Acta Pharmacol Sin**, v.24, p.1 - 6, 2003.

SASSOLAS, A.; VINCENT, M.; BENZONI, D.; SASSARD, J. Plasma lipids in genetically hypertensive rats of the Lyon strain. **J Cardiovasc Pharmacol**. 3, p. 1008-14,1981.

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

SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R. et. al. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca<sup>2+</sup> channels. **Nature**, v.303, p.535 - 537, 1983b.

SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R. et. al. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca<sup>2+</sup> channels. **Nature**, v.303, p.535 - 537, 1983b.

SHEYKHZADE, M.; NYBORG, N. C. B. Mechanism of CGRP-induced relaxation in rat intramural coronary arteries. **Br J Pharmacol**, v.132, p.1235 - 1246, 2001.

SHIMIZU, S. Essential oil of *Mentha rotundifolia*. Isolation of rotundifolone: a new terpenic ketone. Bull. **Agric Chem Soc Japan**, v.20, p.84-88, 1956.

SHUBINA, L. P.; SIURIN, S. A.; SAVCHENKO, V. M. Inhalations of essential oils in the combined treatment of patients with chronic bronchitis. **Vrach Delo**, v.5, p.66-67, 1990.

SMITH, G. D.; GUNTHORPE, M.J.; KELSELL, R.E.; et al. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. **Nature**, v.418, p.186 - 190, 2002.

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

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v.372, n.6503, p. 231 - 236, 1994.

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

SOUSA, P. J. C.; MAGALHÃES, P. J. C.; OLIVEIRA, V. S.; et al. Effects of piperitenone oxide on the intestinal smooth muscle of guinea pig. **Braz J Med Biol Res**, v.30, p.787-791, 1997.

SOUSA, P.J.C. Estudos Farmacológicos do óleo essencial de *Mentha x villosa* e seu principal constituinte, óxido de piperitenona, em músculos lisos gastrointestinais de cobaia e pressão arterial de rato. Tese de Doutorado em Farmacologia – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

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

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol Rev**, v.51, p.159 - 212, p.1999.

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

TAO, J.; ZHANG, Y.; SOONG T. W. et al. Urocortin II Inhibits the Apoptosis of Mesenteric Arterial Smooth Muscle Cells Via L-type Calcium Channels in Spontaneously Hypertensive Rats. **Cell Physiol Biochem**, v.17, p.111 - 120, 2006.

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

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

TREPAKOVA, E.S.; CSUTORA, P.; HUNTON, D.L.; et al. Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.** 275, p. 26158 – 26163, 2000.

UCHIDA, R.; YAMAZAKI, J.; OZEKI, S.; KITAMURA, K., State-dependndent Inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in A7r5 cells by cilnidipine and its derivatives. **Jpn J Pharmacol**, v.85, p.260 - 270, 2001.

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

VANHEEL, B.; VAN DE VOORDE, J. EDHF and residual NO: different factors. **Cardiovasc Res**, v.46, p.370 - 375, 2000.

VANNIER, B.; ZHU, X.; BROWN, D.; et al. The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. **J Biol Chem**, v.273, p.8675 - 8679, 1998.

VOETS, T.; DROOGMANS, G.; WISSENBACH, U.; et al. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels, **Nature**, v.430, p.748 - 754, 2004.

VOGT-EISELE, A. K.; WEBER, K.; SHERKHELI, M. A. et al. Monoterpenoid agonists of TRPV3. **Br J Pharmacol**, v.151, p.530 - 540, 2007.

WANG, S. P.; ZANG, W. J.; KONG, S. S. et al. Vasorelaxant effect of isopropyl 3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoate, a novel metabolite from *Salvia miltiorrhiza*, on isolated rat mesenteric artery. **Eur J Pharmacol**, v.579, p. 283 -288,2007.

WEI, A. D.; GUTMAN, G. A.; ALDRICH, R.; et al. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. **Pharmacol Rev**, v.57, p.463 - 472, 2005.

WIER, W.G; BALKE, C.W.; MICHAEL, J.A., et al. A custom confocal and two-photon digital laser scanning microscope. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 278: p. H2150–H2156, 2000.

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

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

XIA, X. M.; FAKLER, B.; RIVARD, A.; et al. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. **Nature**, v.395, p.503 - 507, 1998.

XU, C.; LU, Y.; TANG, G., WANG, R. Expression of Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Channel Genes in Mesenteric Artery Smooth Muscle Cells. **Am J Physiol**. V.277 p.G1055 - G1063, 1999.

XU, H.; RAMSEY, I. S.; KOTECHEA, S. A.; et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature sensitive cation channel. **Nature**, v.418, p.181 - 186, 2002.

YANG, X. R.; LIN, M. J.; MCINTOSH, L. S.; et al. Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.290, p.L1267 - L1276, 2006.

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

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

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

ZYGMUNT, P. M.; PETERSSON, J.; ANDERSSON, D. A. et. al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**, v.400, p.452 – 457, 1999.

<<http://molecularprobes.com>>. Acesso em: 10 nov. 2007.

# 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](#)