

JULIANELI TOLENTINO DE LIMA

**MECANISMO DE AÇÃO ESPASMOLÍTICA DE DIPLLOTROPINA
EM ÍLEO DE COBAIA E ÚTERO DE RATA E ESTUDO
COMPARATIVO DO SEU ANÁLOGO SINTÉTICO**

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

JOÃO PESSOA

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Julianeli Tolentino de Lima

**MECANISMO DE AÇÃO ESPASMOLÍTICA DE DIPLLOTROPINA
EM ÍLEO DE COBAIA E ÚTERO DE RATA E ESTUDO
COMPARATIVO DO SEU ANÁLOGO SINTÉTICO**

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

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

JOÃO PESSOA

2008

L732 c Lima, Julianeli Tolentino de.

Mecanismo de ação espasmolítica de diplotropina em íleo de cobaia e útero de rata e estudo comparativo do seu análogo sintético. / Julianeli Tolentino de Lima. – João Pessoa, 2008.

146 f.: il.

Orientadora: Bagnólia Araújo da Silva

Tese (doutorado) - UFPB / CCS / LTF

1. Produtos naturais. 2. *Diploptropis ferruginea* Benth.
3. Farmacologia.

UFPB / BC

CDU: 547.9 (043)

Julianeli Tolentino de Lima

**MECANISMO DE AÇÃO ESPASMOLÍTICA DE DILOTROPINA
EM ÍLEO DE COBAIA E ÚTERO DE RATA E ESTUDO
COMPARATIVO DO SEU ANÁLOGO SINTÉTICO**

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Josemar Sena Batista
(Universidade Federal de Sergipe)
Examinador Externo

Profa. Dra. Fernanda Burle de Aguiar
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Externa

Prof. Dr. Antônio Pedro de Araújo Filho
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Externo

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

“Não creio ser um homem que saiba, tenho sido sempre um homem que busca ”

Hermann Hesse, no livro “Demian”

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus pais, Antonino José de Lima (*in memoriam*) e Maria do Socorro Tolentino de Lima, a minha esposa, Xirley Pereira Nunes e minha filha, Brenda Pereira Tolentino Nunes e Lima.

Agradecimientos

Agradeço às várias pessoas que me ajudaram, de diversas formas, a realizar este trabalho:

Aos meus pais, Antonino José de Lima (*in memoriam*) e Maria do Socorro Tolentino de Lima, pelo amor, pela educação e estímulo que me deram. Também a minha esposa Xirley Pereira Nunes e minha filha, Brenda Pereira Tolentino Nunes e Lima, pela paciência, pelo apoio constante, pelo amor e, simplesmente, por existirem.

As minhas irmãs, Jullianny Aluska Tolentino de Lima e Juliene Tolentino de Lima, pelo amor e carinho;

A minha orientadora, Dra. Bagnólia Araújo da Silva, por todos os ensinamentos, que em muito contribuíram para o meu crescimento profissional/intelectual e pessoal, e ainda por acreditar em mim apesar das dificuldades enfrentadas durante os sete anos de convívio;

Ao Dr. José Maria Barbosa Filho, ao então doutorando Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida e a aluna de iniciação científica Ana Sílvia Suassuna Carneiro da Silva pelo fornecimento de diplotropina, substância estudada neste trabalho;

Ao Dr. Celso de Amorim Camara (Departamento de Química/Universidade Federal Rural de Pernambuco), pela paciência, diversas idéias, dicas e discussão a respeito dos resultados desse trabalho e, especialmente do derivado sintético obtido a partir de diplotropina, além das revisões científicas constantes;

A Dra. Temilce Simões de Assis, por sua valiosíssima ajuda nas correções dos artigos e revisões do inglês, durante todas as etapas deste trabalho;

A Dra. Viviane Louise André Nouailhetas e a Dra. Jeannine Aboulafia, pela recepção no Laboratório de Biofísica (Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina) e pelas valiosas dicas e discussões sobre os resultados que apresento nesse trabalho, a Dra. Alice Teixeira Ferreira e Dra. Maria Etsuko Miyamoto Oshiro do Departamento de Biofísica (Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina) pela recepção e suas valiosas contribuições práticas nos experimentos em espectrofluorimetria;

A Dra. Maria de Fátima Agra e sua aluna de doutorado, Kiriaki Nurit, pela coleta e identificação da espécie estudada, bem como por todas as informações botânicas a respeito de tal espécie;

A Dra. Leônia Maria Batista e ao Prof. Climério Avelino de Figueredo (Núcleo de Estudos e Pesquisas Homeopáticas e Fitoterápicas/Departamento de Fisiologia e Patologia/UFPB), que me iniciaram na Ciência e que muito me incentivaram e ajudaram desde o início da minha vida acadêmica.

Ao Dr. Eduardo Conde Garcia (Laboratório de Biofísica do Coração/Universidade Federal de Sergipe), pela calorosa recepção e pela oportunidade de acompanhar, pela primeira vez, experimentos de eletrofisiologia e ainda pela participação no meu enriquecimento científico;

Ao Dr. Jader dos Santos Cruz, ao doutorando Hugo Leonardo Duarte e todos os membros do Laboratório de Membranas Excitáveis (Laboratório de Membranas Excitáveis/Universidade Federal de Minas Gerais), pela calorosa recepção e pela oportunidade de realização de experimentos avançados de eletrofisiologia;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do LTF/UFPB e, principalmente, aos que me ajudaram, discutindo a teoria e a prática relacionada ao meu trabalho: Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, Dr. Isac Almeida de Medeiros, Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida, Dr. Eduardo Jesus de Oliveira, Dra. Márcia Regina Piuvezam, Dra. Maria de Fátima Agra, Dr. Demétrius Antônio Araújo Machado e Dr. Luiz(ito) Dias;

A toda equipe do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas e, em especial, à Sílvia de Siqueira, Fábio Monteiro, Kayla Alarcón, Msc. Luciana Macêdo, Dra. Hilzeth Pessôa, Dra. Fabiana Cavalcante, Msc. Joelmir Silva e Msc. Rosimeire Santos, pelo apoio, atenção e convívio em todos os momentos, o que foi de imprescindível importância para o meu crescimento pessoal e profissional;

Aos amigos farmacêuticos, Dr. Luciano Augusto de Araújo Ribeiro, Dr. Fladmir de Souza Claudino, Msc. Marcos Antonio Alves de Medeiros e Marcelo Cavalcante Duarte, ex-colegas de laboratório, sem cuja ajuda teria sido impossível vencer as muitas dificuldades ao se realizar um trabalho científico. A amiga Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira, bióloga, que muito contribuiu para

o meu aprendizado através das rotineiras discussões. A Kelly Samara de Lira Mota que, com suas dúvidas, me fez buscar, estudar e compreender melhor os modelos experimentais de músculos lisos por nós estudados;

Ao amigo José Crispim Duarte, pelo valiosíssimo apoio técnico, e a alta qualidade no manejo dos animais no Biotério Prof. Thomas George, que foi fundamental para o perfeito andamento deste trabalho, e pela amizade que se tornou cada vez maior durante os sete anos de convivência;

Ao amigo Vicente Carlos de Oliveira Costa, pelo apoio, amizade e compreensão durante todas as fases desse trabalho;

Ao Sr. Luís Cordeiro da Silva e Adriano Cordeiro da Silva pela manutenção do Biotério Prof. Thomas George, disponibilização de animais de qualidade e apoio diário;

Aos membros da Banca de Qualificação e da Banca Examinadora, pelas dicas, correções, críticas e sugestões que ajudaram a enriquecer este trabalho;

Ao Governo Federal, e todos que pagam seus impostos em dia, por terem patrocinado meus estudos. É claro que ainda há muito espaço para melhoria no fomento à pesquisa do Brasil, mas não posso deixar de reconhecer que devo muito da minha formação aos órgãos públicos;

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e à Universidade Federal da Paraíba, pela infra-estrutura;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de estudos e ainda da “taxa de bancada”, que muito facilitou as idas e vindas aos centros mais desenvolvidos para o desenvolvimento desse trabalho, bem como para apresentação dos resultados, aqui descritos, em eventos científicos regionais, nacionais e internacionais em todo o Brasil;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela disponibilização de artigos científicos com livre acesso no Portal Periódicos;

E a todos os funcionários do LTF, nos seus mais diversos setores, em especial à Tânia Araújo, Francisca Barreto, Piodéssimo Almeida e Gilmar Araújo, meu agradecimento pelo apoio permanente durante todo o período em que fiz parte dessa equipe.

Resumo

RESUMO

Estudos anteriores revelaram que diplotropina, flavonóide isolado de *D. ferruginea* Benth. apresentou efeito espasmolítico em íleo de cobaia por modulação dos canais para K^+ . Diante dessa premissa, objetivou-se aprofundar a investigação do mecanismo de ação espasmolítica de diplotropina, através de uma abordagem funcional e celular em íleo de cobaia, investigar o mecanismo de ação tocolítica e ainda testar e comparar o efeito do derivado sintético obtido a partir de modificações estruturais em diplotropina. Diplotropina relaxou o íleo pré-contraído com acetilcolina ($CE_{50} = 2,4 \pm 0,6 \times 10^{-5} M$) de maneira dependente de concentração e este efeito não foi sensível à 4-AP, um bloqueador seletivo dos K_v porém, foi significativamente atenuado ($CE_{50} = 9,0 \pm 3,1 \times 10^{-5} M$) por IbTx, um bloqueador seletivo dos BK_{Ca} . O espasmo, contração muito comum no músculo liso, é dependente de um aumento da $[Ca^{2+}]_i$. Diante disso, investigou-se uma possível diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ induzida por diplotropina em miócitos isolados de íleo de cobaia. Diplotropina reduziu em 25 % a razão de fluorescência basal do fluoróforo de Ca^{2+} , Fura-2, indicando que este flavonóide promove redução da $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos isolados. Semelhantemente ao observado em íleo, diplotropina relaxou ($CE_{50} = 1,7 \pm 0,5 \times 10^{-5} M$) o útero de rata de maneira dependente de concentração e o mecanismo de ação neste órgão parece ser semelhante ao observado em íleo. Diplotropina relaxou ($CE_{50} = 2,1 \pm 0,3 \times 10^{-5} M$, $R^2 = 0,98$), o útero de rata pré-contraído com 60 mM de KCl, de maneira dependente de concentração, mas não foi capaz de antagonizar as contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante, descartando-se a possibilidade de que diplotropina estivesse bloqueando diretamente os Ca_v , levando a sugerir que o bloqueio do influxo de Ca^{2+} se dá indiretamente através da ativação de canais para K^+ . Dentre os bloqueadores de canais para potássio testados (CsCl, TEA⁺, 4-AP e IbTx), somente a 4-AP não foi capaz de deslocar para a direita a curva de relaxamento induzida por diplotropina porém, foi a IbTx quem promoveu a maior inibição do efeito tocolítico de diplotropina, uma redução de, aproximadamente, 5 vezes. Sabendo-se que tais canais podem ser fosforilados pela PKA e, como diplotropina, devido ao seu caráter lipossolúvel, pode atravessar a membrana plasmática e chegar ao meio intracelular, testou-se a possibilidade de que esteja interagindo com a enzima ciclase de adenilil, ativando-a e, conseqüentemente, a via de sinalização do monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c)-PKA, para promover atividade tocolítica. A aminofilina não interferiu no efeito de diplotropina em útero de rata, indicando que as fosfodiesterases não participam do mecanismo de ação tocolítico desse flavonóide. Após uma desmetilação oxidativa e, conseqüentemente, modificação estrutural de diplotropina e obtenção do derivado sintético, este perdeu a atividade relaxante anteriormente observada em íleo de cobaia e útero de rata e continuou sem efeito vasorelaxante mas passou a apresentar efeito relaxante, de maneira dependente de concentração e equipotente, em traquéia de cobaia pré-contraída com carbacol, tanto na presença ($CE_{50} = 4,2 \pm 0,8 \times 10^{-5} M$) como na ausência ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,5 \times 10^{-5} M$) de epitélio funcional. Conclui-se que o mecanismo de ação espasmolítica de diplotropina tanto em íleo como em útero provavelmente se dá por abertura dos BK_{Ca} e, indiretamente, bloqueio dos Ca_v . Em íleo de cobaia, a abertura dos BK_{Ca} parece levar a uma redução da $[Ca^{2+}]_i$ livre. E ainda que, após modificação estrutural, o derivado sintético de diplotropina perde tais efeitos, continua sem apresentar efeito vasorelaxante e adquire efeito relaxante em traquéia de cobaia.

Palavras-chave: ação espasmolítica; diplotropina; canais para potássio.

Abstract

ABSTRACT

Previous studies have shown that diplopin, a furanoflavan-type flavonoid from *D. ferruginea* Benth. presented a spasmolytic effect in guinea-pig ileum by modulation of K^+ channels. The aim of this work was to investigate the spasmolytic action mechanism of diplopin through a functional and cellular approach in guinea-pig ileum, to investigate the tocolytic action mechanism and to test and compare the effect of the new synthetic derivative furanoflavoquinone derivative obtained from structural modifications of diplopin. Diplopin relaxed ileum pre-contracted with acetylcholine ($EC_{50} = 2.4 \pm 0.6 \times 10^{-5}$ M) in a concentration-dependent manner and this effect was not sensitive to 4-AP, a K_V selective blocker, however, it was significantly attenuated by IbTx ($EC_{50} = 9.0 \pm 3.1 \times 10^{-5}$ M), a selective BK_{Ca} blocker. Spasm, a very common contraction of smooth muscle, is dependent of an increase of $[Ca^{2+}]_i$. Before that, a possible decrease of the $[Ca^{2+}]_i$ induced by diplopin in isolated myocytes of guinea-pig ileum was investigated. Interestingly, diplopin decreased fura-2 fluorescence ratio by 25 %, indicating that this furanoflavan promotes a reduction of the $[Ca^{2+}]_i$ in isolated myocytes. Likewise observed in ileum, diplopin relaxed rat uterus ($EC_{50} = 1.7 \pm 0.5 \times 10^{-5}$ M) in a concentration-dependent manner and the mechanism of action in this organ seem to be similar to the observed in guinea-pig ileum. Diplopin relaxed ($EC_{50} = 2.1 \pm 0.3 \times 10^{-5}$ M) pre-contracted rat uterus with KCl, in a concentration-dependent manner ($R^2 = 0.98$), but it was not capable to antagonize $CaCl_2$ -induced contractions in Ca^{2+} -free depolarizing medium, discarding the hypothesis that diplopin was directly blocking Ca_V channels, suggesting that the blockade of the Ca^{2+} influx occurs indirectly through the activation of K^+ channels. Among the tested K^+ channels blockers (CsCl, TEA⁺, 4-AP or IbTx), only 4-AP was not capable to shift to the right the relaxing curve induced by diplopin, even so the IbTx promoted the largest inhibition of the tocolytic effect of diplopin, reducing approximately five times. Being known that such channels can be phosphorylated by PKA and, as diplopin, due to a great lipophilic character, can cross the cell membrane towards the intracellular medium, we tested the possibility of an interaction with adenylyl cyclase, activating and consequently the (cAMP)-PKA way to promote a tocolytic activity. Aminophylline did not change the effect of diplopin in rat uterus, indicating that phosphodiesterases do not participate of the tocolytic mechanism of action of the furanoflavan. After structural modifications of diplopin, a synthetic derivative was obtained. However, the relaxing activity of the compound previously observed in guinea-pig ileum and rat uterus was lost. Nonetheless, the synthetic compound presented a relaxing effect in guinea-pig trachea pre-contracts with carbachol, in a concentration-dependent manner and equipotent, in the presence ($EC_{50} = 4.2 \pm 0.8 \times 10^{-5}$ M) or absence ($EC_{50} = 2.7 \pm 0.5 \times 10^{-5}$ M) of functional epithelium. All evidences presented in this work suggest that the relaxant mechanism of action of diplopin either in ileum or in rat uterus occurs directly through a BK_{Ca} channels opening and indirectly by a Ca_V channel blockage. Although the synthetic derivative of diplopin after structural modification loses such effect, it still does not present a vasorelaxant effect acquiring though, a relaxant effect in guinea-pig trachea.

Keywords: spasmolytic action; diplopin; potassium channel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotos de <i>Diploptropis ferruginea</i> Benth. (planta inteira, detalhe da casca do caule e frutos, detalhe das folhas e flores)	6
Figura 2. Estrutura química do flavonóide diploptropina (3,4,5,8-tetrametoxi-6,7,2",3"-furanoflavana)	6
Figura 3. Foto do útero de rata e esquema do útero humano	18
Figura 4. Estrutura química do derivado sintético, DPTN-Sint. 1, obtido a partir de modificações estruturais no composto natural diploptropina	21
Figura 5. Foto da exsicata de <i>Diploptropis ferruginea</i> Benth., com detalhes das folhas e frutos e do código de registro no Herbário LTF	26
Figura 6. Fotos de <i>Cavia porcellus</i> e <i>Rattus norvegicus</i>	27
Figura 7. Fotos das bombas termostáticas. Polystat 12002 e Fisatom 597	29
Figura 8. Fotos do sistema de aquisição de dados digital, com amplificador e cubas para órgãos isolados em detalhe.....	30
Figura 9. Foto do quimógrafo com cilindro esfumaçado e sistema de cubas.....	30
Figura 10. Fotos do pHmetro digital, da balança analítica e da balança semi-analítica.....	31
Figura 11. Fotos do espectrofluorímetro modelo LS-5B e do fluorímetro SPEX ...	31
Figura 12. Registro original representativo do curso temporal do efeito de diploptropina sobre a fluorescência basal dependente de Ca^{2+} em miócitos isolados de íleo de cobaia	57
Figura 13. Registro original representativo do curso temporal do efeito de diploptropina sobre a fluorescência máxima dependente de Ca^{2+} em miócitos isolados de íleo de cobaia, após a adição de acetilcolina.....	58
Figura 14. Registro original representativo do efeito tocolítico de diploptropina sobre a fase tônica da contração induzida por ocitocina em útero isolado de rata	61

Figura 15. Registro original representativo da contração induzida por ocitocina na presença de CsCl (A). Efeito relaxante de diplotropina sobre a fase tônica da contração induzida por ocitocina na presença de CsCl em útero isolado de rata (B)	66
Figura 16. Registro original representativo da contração induzida por ocitocina na presença de TEA ⁺ (A). Efeito relaxante de diplotropina sobre a fase tônica da contração induzida por ocitocina na presença de TEA ⁺ em útero isolado de rata (B).	69
Figura 17. Registro original representativo da contração induzida por ocitocina na presença de 4-AP (A). Efeito relaxante de diplotropina sobre a fase tônica da contração induzida por ocitocina na presença de 4-AP em útero isolado de rata (B)... ..	71
Figura 18. Registro original representativo da contração induzida por ocitocina na presença de IbTx (A). Efeito relaxante de diplotropina sobre a fase tônica da contração induzida por ocitocina na presença de IbTx em útero isolado de rata (B)	74
Figura 19. Registro original representativo da contração induzida por KCl na presença de aminofilina (AMF) (A). Efeito relaxante de diplotropina sobre a fase tônica da contração induzida por KCl na presença de AMF em útero isolado de rata (B)	76
Figura 20. Registro original representativo do efeito relaxante de DPTN-Sint. 1 sobre a fase tônica da contração induzida por carbacol em traquéia isolada de cobaia, na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.....	79
Figura 21. Registro original representativo do efeito de DPTN-Sint. 1 sobre a fase tônica da contração induzida por 3×10^{-7} M de fenilefrina em aorta isolada de rato, na presença (A) e na ausência (B) de endotélio	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da solução de Krebs normal.....	32
Tabela 2. Composição da solução de Krebs modificado por Sun e Benishin (1994).....	32
Tabela 3. Composição da solução de Locke Ringer de acordo com Revuelta, Cantabrana e Hidalgo (1997; 2000).....	33
Tabela 4. Composição da solução de Locke Ringer sem Ca^{2+}	33
Tabela 5. Composição da solução de Tyrode	34
Tabela 6. Composição da solução de Hank	34

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Efeito de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por acetilcolina, na ausência e na presença de 4-AP, em íleo isolado de cobaia. 53
- Gráfico 2.** Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por acetilcolina, na ausência e na presença de IbTx, em íleo isolado de cobaia 54
- Gráfico 3.** Valores da CE_{50} de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por acetilcolina, na ausência e na presença de IbTx, em íleo isolado de cobaia..... 55
- Gráfico 4.** Efeito de diplotropina sobre a fluorescência basal dependente de Ca^{2+} em miócitos isolados de íleo isolado de cobaia..... 57
- Gráfico 5.** Efeito de diplotropina sobre a fluorescência máxima dependente de Ca^{2+} em miócitos isolados de íleo de cobaia, após a adição de acetilcolina..... 59
- Gráfico 6.** Efeito de diplotropina frente às curvas concentração-resposta cumulativas à ocitocina em útero isolado de rata..... 60
- Gráfico 7.** Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina em útero isolado de rata..... 62
- Gráfico 8.** Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por KCl em útero isolado de rata..... 63
- Gráfico 9.** Efeito de diplotropina frente às curvas cumulativas ao $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} , em útero isolado de rata. 64
- Gráfico 10.** Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl em útero isolado de rata..... 67
- Gráfico 11.** Valores da CE_{50} de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de CsCl em útero isolado de rata..... 67
- Gráfico 12.** Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de TEA^+ em útero isolado de rata. 70

Gráfico 13. Valores da CE_{50} de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de TEA^+ em útero isolado de rata.....	70
Gráfico 14. Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de 4-AP em útero isolado de rata.....	72
Gráfico 15. Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de IbTx em útero isolado de rata.....	75
Gráfico 16. Valores da CE_{50} de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de IbTx em útero isolado de rata.....	75
Gráfico 17. Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, na ausência e na presença de AMF, em útero isolado de rata	77
Gráfico 18. Efeito de DPTN-Sint. 1 sobre a fase tônica das contrações induzidas por carbacol em traquéia isolada de cobaia, tanto na presença como na ausência de epitélio funcional.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

μM	micromolar (10^{-6} mol/L)
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	concentração de Ca^{2+} intracelular livre
4-AP	4-aminopiridina
AA	ácido araquidônico
AC	ciclase de adenilil
ACh	acetilcolina
AMP_C	monofosfato cíclico de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
BK_{Ca}	canal para potássio de grande condutância ativado pelo Ca^{2+}
CaM	calmodulina
Ca^{2+}	íon cálcio
Ca_V	canal para cálcio aberto por voltagem
$\text{Ca}_V\text{-L}$	canal para cálcio aberto por voltagem do tipo L
$\text{Ca}_V\text{-T}$	canal para cálcio aberto por voltagem do tipo T
ChTx	caribdotoxina
CCh	carbacol
CE_{50}	concentração de uma substância capaz de produzir 50 % do seu efeito máximo
DMSO	dimetil sulfóxido
DPTN-Sint. 1	derivado sintético de diplotropina
e.p.m.	erro padrão da média
EDTA	ácido etileno-diamino-tetraacético
EGTA	ácido etilenoglicol-bis-(β -aminoetiléter) N,N,N',N'-tetraacético
E_{max}	efeito máximo
FEN	L(-)-fenilefrina
GMP_C	monofosfato cíclico de guanosina
GTP	trifosfato de guanosina
IbTx	iberiotoxina
IK_{Ca}	canal para potássio de condutância intermediária ativado pelo Ca^{2+}
InsP_3	1,4,5-trifosfato de inositol
IP_3R	receptor sensível ao InsP_3

K⁺	íon potássio
K_{ATP}	canal para potássio sensível ao ATP
K_{ir}	canal para potássio retificador de entrada
K_v	canal para potássio aberto por voltagem
L-NMMA	N ^G -monometil-L-arginina
LTD₄	leucotrieno
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”
M	concentração molar (mol/L)
MLC	cadeia leve da miosina
MLCP	fosfatase da cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
mM	milimolar (10 ⁻³ mol/L)
n	número de experimentos realizados
Na_v	canal para sódio aberto por voltagem
nM	nanomolar (10 ⁻⁹ mol/L)
NO	óxido nítrico
p	probabilidade
PDEs	fosfodiesterases
PGE₂	prostaglandina E ₂
PKA	proteína cinase dependente de AMP _C
PKC	proteína cinase dependente de cálcio
PKG	proteína cinase dependente de GMP _C
PLC	fosfolipase C
PLD	fosfolipase D
ROK	proteína cinase dependente do complexo RhoA-GTP
RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptor sensível à rianodina
SK_{Ca}	canal para potássio de pequena condutância ativado pelo Ca ²⁺
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
V_m	potencial de membrana

OBS: As abreviaturas utilizadas neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Geral	23
2.2 Específicos	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 MATERIAL	26
3.1.1 Material vegetal	26
3.1.2 Animais.....	27
3.1.3 Substâncias e sais	28
3.1.4 Aparelhos	29
3.1.5 Soluções nutritivas	32
3.2 MÉTODOS	35
3.2.1 Preparo das amostras estudadas.....	35
3.2.2 Caracterização Funcional do Mecanismo de Ação Espasmolítica de Diplotropina em Íleo Isolado de Cobaia.....	36
3.2.2.1 Avaliação da participação dos canais para K^+ no relaxamento produzido por diplotropina em íleo isolado de cobaia	36
3.2.2.1.1 Efeito de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por acetilcolina na ausência e na presença da 4-aminopiridina (4-AP) e da iberiotoxina (IbTx) em íleo isolado de cobaia	36
3.2.3 Caracterização do mecanismo de ação de diplotropina em nível celular	38
3.2.3.1 Obtenção dos miócitos de íleo isolado de cobaia em cultura.....	38
3.2.3.2 Determinação fluorimétrica da $[Ca^{2+}]_i$	39
3.2.3.2.1 Determinação da autofluorescência das células	39
3.2.3.2.2 Incorporação do fura-2 aos miócitos	40
3.2.3.2.3 Determinação da $[Ca^{2+}]_i$ através da razão das leituras de fluorescência	40
3.2.4 Avaliação do Mecanismo de Ação Tocolítica de Diplotropina	42

3.2.4.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por ocitocina em útero isolado de rata.....	42
3.2.4.1.1 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina em útero isolado de rata.....	42
3.2.4.2 Avaliação da participação dos canais para cálcio operados por voltagem (Ca_v)	44
3.2.4.2.1 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por KCl em útero isolado de rata.....	44
3.2.4.2.2 Efeito de diplotropina sobre a contração induzida por Ca^{2+} em meio despolarizante nominalmente sem cálcio.....	44
3.2.4.3 Avaliação do envolvimento dos canais para potássio no mecanismo de ação tocolítica de diplotropina.....	45
3.2.4.3.1 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de cloreto de cézio (CsCl) em útero isolado de rata	45
3.2.4.3.2 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de tetraetilamônio (TEA^+) ou 4-aminopiridina (4-AP) em útero isolado de rata	45
3.2.4.3.3 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de iberiotoxina (IbTx) em útero isolado de rata.....	46
3.2.4.4 Avaliação do envolvimento da via de sinalização dos nucleotídeos cíclicos ($\text{AMP}_c/\text{GMP}_c$) no mecanismo de ação tocolítica de diplotropina.....	47
3.2.4.4.1 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, na ausência e na presença de aminofilina em útero isolado de rata.....	47
3.2.5 Estudo Comparativo do Efeito Espasmolítico de Diplotropina e seu Derivado, DPTN-Sint. 1, em Músculos Lisos.....	48
3.2.5.1 Efeito de DPTN-Sint. 1 frente às contrações fásicas induzidas por acetilcolina ou por histamina em íleo isolado de cobaia.....	48
3.2.5.2 Efeito de DPTN-Sint. 1 frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero isolado de rata.....	48
3.2.5.3 Efeito de DPTN-Sint. 1 sobre o tônus espontâneo, bem como sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol em traquéia isolada de cobaia.....	49

3.2.5.4 Efeito de DPTN-Sint. 1 sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta isolada de rato	50
3.2.6 Cálculo do logP	51
3.2.7 Análise Estatística	51
4 RESULTADOS.....	53
4.1 Caracterização Funcional do Mecanismo de Ação Espasmolítica de Diplotropina em Íleo Isolado de Cobaia.....	53
4.1.1 Avaliação da participação dos canais para K^+ no relaxamento produzido por diplotropina em íleo isolado de cobaia	53
4.1.1.1 Efeito de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por acetilcolina na ausência e na presença da 4-aminopiridina em íleo isolado de cobaia.....	53
4.1.1.2 Efeito de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por acetilcolina na ausência e na presença da iberiotoxina (IbTx) em íleo isolado de cobaia.....	54
4.2 Caracterização do mecanismo de ação de diplotropina em nível celular	56
4.2.1 Investigação do efeito de diplotropina sobre a $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos de íleo de cobaia (determinação fluorimétrica da $[Ca^{2+}]_i$)	56
4.3 Avaliação do Mecanismo de Ação Tocolítica de Diplotropina	60
4.3.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por ocitocina em útero isolado de rata.....	60
4.3.2 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina em útero isolado de rata.....	61
4.3.3 Avaliação da participação dos canais para cálcio operados por voltagem (Ca_v)	63
4.3.3.1 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por KCl em útero isolado de rata.....	63
4.3.3.2 Efeito de diplotropina sobre a contração induzida por Ca^{2+} em meio despolarizante nominalmente sem cálcio	64
4.3.4 Avaliação do envolvimento dos canais para potássio no mecanismo de ação tocolítica de diplotropina.....	65
4.3.4.1 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl) em útero isolado de rata..	65

4.3.4.2 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de tetraetilamônio (TEA ⁺) ou 4-aminopiridina (4-AP) em útero isolado de rata.....	68
4.3.4.3 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de iberiotoxina (IbTx) em útero isolado de rata	73
4.3.5 Avaliação do envolvimento da via de sinalização dos nucleotídeos cíclicos (AMP _c /GMP _c) no mecanismo de ação tocolítica de diplotropina	76
4.3.5.1 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, na ausência e na presença de aminofilina em útero isolado de rata.....	76
4.4 Estudo da Relação Entre a Modificação Estrutural e o Efeito Espasmolítico de DPTN-Sint. 1	78
4.4.1 Efeito de DPTN-Sint. 1 frente às contrações fásicas induzidas por acetilcolina ou histamina em íleo isolado de cobaia.....	78
4.4.2 Efeito de DPTN-Sint. 1 sobre o tônus espontâneo, bem como sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traquéia isolada de cobaia	78
4.4.3 Efeito de DPTN-Sint. 1 sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta isolada de rato.....	81
4.4.4 Efeito de DPTN-Sint. 1 frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou carbacol em útero isolado de rata	82
5 DISCUSSÃO	84
6 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS.....	105
APÊNDICE.....	133
ANEXOS	143

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O ser humano utiliza as espécies vegetais para aliviar ou tratar suas enfermidades em todas as culturas desde a antiguidade. Cada povo, cada grupamento humano no planeta traz consigo conhecimentos ancestrais sobre plantas medicinais. Registros egípcios encontrados revelaram que esse povo já conhecia o efeito dos sedativos e, por volta de 1600 a.C., já apresentavam estudos com cerca de oitocentas plantas medicinais (ELDIN; DUNFORD, 2001).

Os vegetais são importantes fontes de produtos biologicamente ativos, melhores conceituados por Gottlieb et al. (1996) como metabólitos especiais.

A fantástica variedade e complexidade dos metabólitos secundários biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído como mecanismo de defesa destes vegetais às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação (REINBOTHE et al., 1990).

No contexto da evolução das plantas terrestres, estima-se que aproximadamente 500.000 espécies ocupam todo o planeta, sendo que, 50 % delas são angiospermas (BRITO, 1986). Desta forma, as plantas constituem um enorme laboratório de síntese orgânica, conhecem-se cerca de 50.000 metabólitos secundários isolados de angiospermas, muitos destes ainda sem qualquer avaliação com relação ao seu potencial farmacológico. Segundo o *Phytochemical Dictionary* (HARBORNE, 1993), o número de compostos com atividade biológica bem caracterizada totaliza 2.793.

O emprego de plantas com o objetivo de recuperar ou manter a saúde é uma prática que se confunde com a própria história da humanidade. A medicina popular, desde os primórdios da civilização, fundamenta-se no uso de plantas como um dos únicos elementos de cura que o homem conhecia, porém, apesar do surgimento dos medicamentos sintéticos, jamais desapareceu por completo (LIMA et al., 2001).

A pesquisa farmacológica de plantas medicinais tem propiciado não só avanços importantes para a terapêutica de várias doenças como também tem fornecido ferramentas extremamente úteis para o estudo teórico da fisiologia e da farmacologia (DOHADWALLA, 1985).

Estima-se que 50 % da população da América Latina tem pouco ou nenhum acesso aos medicamentos e que grande parte destes usam uma ou outra forma de plantas medicinais nos cuidados com a saúde (JORQUERA, 1993; MIGUEL; MIGUEL, 2004).

O Brasil possui uma grande diversidade genética de espécies de plantas, mas somente 10 % têm sido avaliadas com respeito às suas características biológicas e apenas 5 % com objetivos fitoquímicos (LUNA, 2005).

Infelizmente o nosso País, nos últimos anos, passou por grandes mudanças no plano econômico, o que gerou severos danos aos programas sociais de saúde, e a descontinuidade destes programas tem gerado impacto negativo sobre o consumo e mercado de medicamentos. Contudo, a população, vítima deste descaso tenta minorar estes problemas através da “automedicação tradicional” (MIGUEL; MIGUEL, 2004).

As plantas, como medicamento, têm sido utilizadas por grande parte de nossa população, em diversos países industrializados, estas possuem significativa representação, pois, de acordo com Jorquera (1993), dos 173 bilhões de dólares em fármacos consumidos em 1990, cerca de 25 % contém pelo menos um componente de origem vegetal ou são sintetizados a partir destes. As plantas são utilizadas em quase todo o mundo como matéria-prima, na forma de extratos, óleos essenciais e substâncias químicas puras ou semi-sintéticas.

O Brasil exporta cerca de 7 milhões de dólares anuais em extratos, dentre eles o alcaçuz, alóes, bardana, arnica, catuaba, ipecacuanha e quina. Porém o país importa a quase totalidade de produtos naturais de alto valor unitário, dentre eles alcalóides, hormônios esteroidais, glicosídeos, drogas vegetais e seus extratos, óleos essenciais e corantes naturais, para o uso da indústria farmacêutica e de cosméticos. Dentre os produtos importados figuram aqueles que compõem a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), como glicosídeos cardiotônicos, digoxina, deslanosídeo e tiocolchicosídeo (MIGUEL; MIGUEL, 2004).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais é uma prática bastante difundida, sendo resultante de um acúmulo secular de conhecimentos

empíricos ou experimentais, por diversos grupos étnicos, sobre as ações das plantas medicinais.

A escolha da planta para estudo químico e farmacológico baseada em seu uso na medicina popular é um dos meios que podem conduzir à descoberta de novos medicamentos ou substâncias que possam servir como ferramentas farmacológicas ou modelos para a síntese de novos fármacos.

Diversos trabalhos e revisões foram escritos e descrevem a importância de substâncias de fontes naturais para tratar doenças, bem como o papel altamente significativo que os produtos naturais possuem no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN et al., 2003), apesar de que, nos dias atuais, as grandes companhias farmacêuticas tenham reduzido significativamente, ou até mesmo eliminado, a busca por novos agentes terapêuticos a partir de fontes naturais (GULLO; HUGHES, 2005),

Mesmo com a significativa redução da prospecção de novos agentes terapêuticos a partir de fontes naturais, estima-se que 25 % de todo o faturamento da indústria farmacêutica brasileira (aproximadamente 8 bilhões de dólares) advem de medicamentos derivados de plantas (GUERRA; NODARI, 2003). Considera-se também que as vendas nesse setor crescem 10 % ao ano, com estimativa de terem alcançado a cifra de 550 milhões de dólares no ano de 2001 (KNAPP, 2001).

Juntos, a descoberta de novos produtos naturais, a química combinatória e computacional oferecem maiores oportunidades para se encontrar pequenas e novas moléculas que possam levar à descoberta de fármacos úteis no tratamento de diversas doenças (HARVEY, 2000; GULLO; HUGHES, 2005).

A Fabaceae é uma grande família de ervas, arbustos e árvores com grande variedade de habitats, incluindo aquáticas, xerófitas e trepadeiras. Tem distribuição cosmopolita nas zonas tropicais, subtropicais e temperadas (HEYWOOD, 1996) e é constituída por 476 gêneros e 13.855 espécies (STEVENS, 2005).

Dentre as várias espécies da família Fabaceae, destaca-se *Bowdichia virgilioides* Kunt., espécie conhecida como “sucupira” cujas sementes são usadas na medicina popular brasileira para o tratamento do reumatismo, artrite e doenças da pele, enquanto que, as cascas do seu caule são muito

empregadas no tratamento da diarreia crônica e para purificação do sangue (CORRÊA, 1984). Marinho (1991) também observou que tanto o extrato como alcalóides quinolizidínicos isolados de *B. virgilioides* apresentam atividade espasmolítica em íleo isolado de cobaia e útero isolado de rata.

Produtos naturais de várias classes já foram isolados de espécies da família Fabaceae, incluindo flavonóides, benzofuranóides, óleos essenciais, triterpenóides e alcalóides de *Bowdichia virgilioides* Kunt. (MARINHO, 1991; MARINHO et al., 1994; MELO et al., 2001; BARBOSA-FILHO et al., 2003).

O gênero *Diploptropis* é muito pouco estudado, havendo, até hoje, apenas nove trabalhos descritos na literatura, sendo cinco destes no âmbito da fitoquímica (BRAZ-FILHO et al., 1973; KINGHORN et al., 1982; ALMEIDA et al., 2003; 2004; ALMEIDA, 2004), e quatro no âmbito da farmacologia (LIMA et al., 2003a, b; MEDEIROS et al., 2003; LIMA, 2004) todos eles desenvolvidos pela equipe do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba.

Diploptropis ferruginea Benth. (Figura 1) é uma árvore, medindo de 10 a 12 m de altura e, aproximadamente, 40 cm de diâmetro (LEWIS, 1994; The New York Botanical Garden - NYBG, 02/08/2005), é popularmente conhecida no Nordeste do Brasil como “sucupira-preta”. Suas cascas, nas formas de tintura e decocto, são bastante utilizadas na medicina tradicional para o tratamento do reumatismo, artrite e diabetes (CORRÊA, 1984).

A partir do fracionamento da fase hexânica obtida do extrato etanólico bruto das cascas do caule dessa espécie, foi isolado um furanoflavonóide (Fluxograma 1) pertencente à classe dos flavanodióis, o 3,4,5,8-tetrametoxi-6,7,2”,3”-furanoflavana (Figura 2), vulgarmente conhecido como diploptropina, sólido branco na forma de cristais com fórmula molecular $C_{21}H_{22}O_6$ e peso molecular de 370,396 u.m.a. (ALMEIDA et al., 2003; 2004; ALMEIDA, 2004; LIMA, 2004).

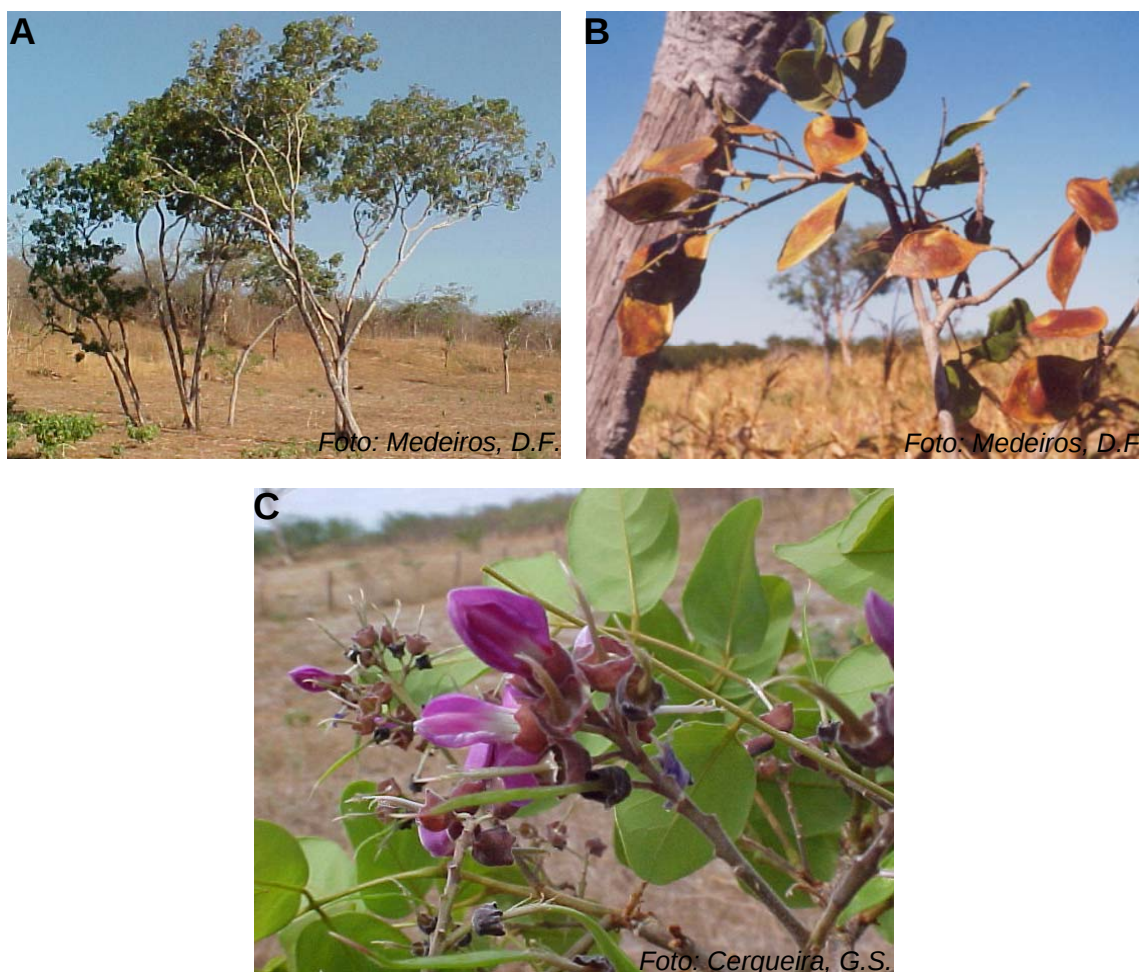


Figura 1. Fotos de *Diplotropis ferruginea* Benth. (A, planta inteira; B, detalhe da casca do caule e frutos; C, detalhe das folhas e flores).

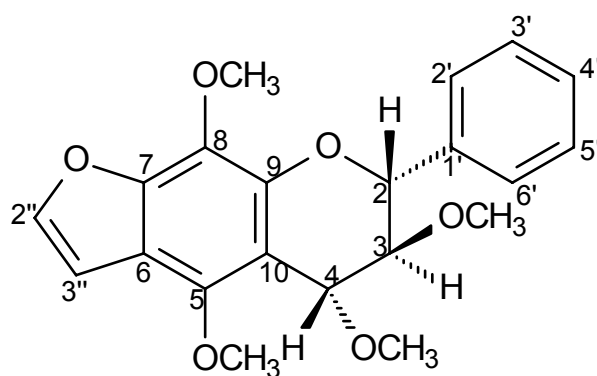


Figura 2. Estrutura química do flavonóide diplotropina (3,4,5,8-tetrametoxi-6,7,2'',3''-furanoflavana).

Os flavonóides são os pigmentos responsáveis pela coloração das pétalas e pela diferenciação das diversas tonalidades das cores amarela, laranja e vermelha das flores (TIMBERLAKE; HENRY, 1986). Estes compostos pertencem a uma classe de produtos naturais amplamente distribuída no reino vegetal e, atualmente, consumidos em grande quantidade na alimentação diária (DI CARLO et al., 1999). Estruturalmente são compostos fenólicos presentes em grande número de plantas vasculares, podendo ocorrer no estado livre ou associados a açúcares, ou alquilados como éteres metílicos, esterificados, dentre outros (WOLLENWEBER, 1994). Estes compostos também são conhecidos como bioflavonóides e formam um grupo com aproximadamente 4000 compostos (HAVSTEEN, 1983). A enorme variedade estrutural destes metabólitos e os diversos estudos químicos, genéticos e enzimológicos refletem o crescente e continuado interesse de químicos, farmacólogos e biólogos nesta classe de compostos (WOLLENWEBER, 1994). Estes compostos são bastante importantes não somente para as plantas, mas também para os animais, incluindo os seres humanos.

Acredita-se que, provavelmente, os flavonóides existem no reino vegetal há um bilhão de anos (RUSAK et al., 2002). Esta extensa interação entre os flavonóides das plantas e os seres humanos tem estimulado muito interesse pelas atividades bioquímicas e fisiológicas dessa classe de substância (DI CARLO et al., 1999).

Esta classe de metabólitos secundários também é encontrada em diversas plantas medicinais, e muitos remédios derivados de ervas medicinais contendo flavonóides são bastante utilizados em todo o mundo.

Os flavonóides são capazes de modular a atividade de enzimas e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares, sugerindo que estes compostos têm significantes atividades anti-hepatotóxica (SOIKE; LENG-PESCHLOW, 1987), proteção vascular (BERETZ; CAZENAVE, 1988), anti-hipertensiva (CONSENTINO; VOLPE, 2002; VILAR et al., 2002), antioxidante (BLASA et al., 2006; MEYER; HEINONEN; FRANKEL, 1997), antiinflamatória (KIM et al., 2004; LI et al., 2005; AHMED et al., 2005), antialérgica (SAMUELSON, 1993; BERG; DANIEL, 1988), hipoglicemiante (PEREZ et al., 2000), antiosteoporótica (EATON-EVANS, 1994), anticâncer (WANG et al., 2005; LI et al., 2005; VAN ERK et al., 2005; AKBAS; TIMUR;

OZBEN, 2004), espasmolítica (MIDDLETON, 1984; ABDALLA; ABU-ZARGA, 1987; CAPASSO et al., 1988, 1991a, 1991b; DI CARLO et al., 1999; LIMA, 2004; LIMA et al., 2005) e tocolítica (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997, 2000).

Os flavonóides são conhecidos por atuar nos vasos sanguíneos da mesma forma que a vitamina P, e estes compostos são necessários para a manutenção da permeabilidade vascular normal (DI CARLO et al., 1999). Os primeiros estudos que descrevem as propriedades dos flavonóides sobre a resistência vascular constam de 1936, onde foi observado que a citrina, uma mistura da hesperidina com o glicosídeo eriodictiol, normalizou a resistência capilar em pacientes com certas patologias que envolviam uma diminuição da resistência vascular (GABOR, 1988). Mais recentemente, os efeitos do O-(β -hidroxietil)-rutosídeo (HR) foram observados em pacientes com insuficiência venosa crônica e observou-se que houve um restabelecimento dos parâmetros hemorreológicos (TIMEUS, 1985). Também existem dados que sugerem um efeito promissor dos flavonóides na angina pectoris (GOTTSEGEN, 1981).

Recentemente, o óxido nítrico (NO) foi proposto como um mediador da secreção intestinal associada com a administração de laxantes (MASCOLO et al., 1994a; MASCOLO et al., 1994b), e Di Carlo et al. (1996) postularam que o NO poderia estar envolvido na atividade da quercetina no intestino. As ações de muitos flavonóides podem estar correlacionadas com sua capacidade de interagir com o NO, um mediador de vários sistemas biológicos (MONCADA et al., 1991). Por exemplo, flavonóides que são conhecidos por “sequestrar” radicais livres oxigenados e recentemente, estudos sugerem que talvez eles também sejam “sequestradores” muito potentes do NO, aumentando a especulação de que eles desempenham um papel nos supostos efeitos terapêuticos dos flavonóides (VAN ACKER et al., 1995).

O NO é formado por uma enzima conhecida como sintase do óxido nítrico (NOS), que é um tipo de enzima diaforase. Estudos recentes sugerem que os flavonóides podem inibir *in vitro* a atividade da enzima NADPH diaforase no cérebro. Estes experimentos mostram que a quercetina e a apigenina inibiram marcadamente a atividade desta enzima de maneira dependente de concentração, sugerindo que estes flavonóides talvez também

sejam capazes de inibir a produção de NO no cérebro (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1989; VAN ACKER et al., 1995, DI CARLO et al., 1996).

A atividade gastrointestinal da quercetina foi avaliada por Di Carlo et al. (1996) em animais pré-tratados com dois inibidores da NOS, N^G-nitro-L-arginina metil éster e N^G-monometil-L-arginina (L-NAME e L-NMMA). Este pré-tratamento potencializou o retardo do trânsito, secreção intestinal e diarreia causados pela quercetina, e dessa forma sugerindo que o NO está envolvido na atividade gastrointestinal da quercetina.

Há relatos de que os flavonóides têm efeitos na motilidade intestinal tanto *in vitro* como *in vivo* (DI CARLO et al., 1999), também como agente antiulcerogênico (IZZO et al., 1994), antiespasmódico (CAPASSO et al., 1991a; CAPASSO et al., 1991b), anti-secretório ou antidiarréico (DI CARLO et al., 1993). Foi relatado que a quercetina e outros flavonóides inibiram as contrações induzidas em íleo de cobaia (FANNING et al., 1983; MACANDER, 1986).

Capasso et al. (1991a), testaram 13 flavonóides de várias classes (apigenina, catequina, crisina, flavona, hesperetina, campferol, morina, miricetina, naringenina, naringina, floridzina, quercetina e taxifolina) sobre as contrações induzidas por PGE₂, LTD₄, acetilcolina (ACh) e BaCl₂ em íleo isolado de cobaia, e observaram que todos eles inibiram estas contrações. Capasso et al. (1991b) também observaram que os flavonóides inibiram as contrações induzidas eletricamente e por uma variedade de agonistas, dentre eles a ACh, 5-hidroxitriptamina, histamina e algumas prostaglandinas, em íleo isolado de cobaia.

Em útero isolado de rata, Revuelta et al. (1997) observaram que os flavonóides genisteína, campferol e quercetina apresentaram efeito relaxante sendo que para o campferol e a quercetina este efeito parece estar relacionado ao aumento do AMP_C no meio intracelular, já para a genisteína este efeito está inversamente relacionado ao grau de despolarização induzido neste órgão.

Em estudos realizados no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFPB, Lima (2004) investigou uma possível atividade espasmolítica de diplotropina em vários músculos lisos isolados, como aorta de rato, traquéia e íleo de cobaia e útero de rata, e os resultados obtidos mostraram que este flavonóide só

apresentou atividade espasmolítica em útero de rata e íleo de cobaia, sendo mais potente e eficaz neste último órgão.

Inicialmente, foi observado que diplotropina parecia estar promovendo tal efeito espasmolítico em íleo isolado de cobaia, por inibir o influxo de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_V) (LIMA et al., 2005). Porém, outros estudos evidenciaram que o mecanismo pelo qual diplotropina exerce efeito relaxante em íleo de cobaia não se dá por inibição direta do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V , parecendo envolver indiretamente a ativação ou modulação dos canais para K^+ (LIMA, 2004). Isto porque, em nível funcional, o efeito relaxante de diplotropina sobre o íleo pré-contraído com 10^{-6} M de ACh foi atenuado significativamente quando na presença de 5 mM de cloreto de cério (CsCl), um bloqueador não seletivo dos canais para potássio (LATORRE et al., 1989) e também na presença de 10^{-7} M de caribdotoxina (ChTx), um bloqueador não seletivo dos BK_{Ca} e K_V (GIANGIACOMO et al., 1999; MULLMANN et al., 2001; SCHROEDER et al., 2002).

Fisiologicamente, o espasmo, contração muito comum neste tipo músculo, é dependente do aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (SOMLYO; SOMLYO, 1994), seja por liberação dos estoques intracelulares ou por sua entrada através de canais de Ca^{2+} na membrana plasmática (THORNELOE; NELSON, 2005), e este aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é um fator chave para muitas respostas celulares dependentes da ligação a íons Ca^{2+} e para um vasto número de moléculas efetoras, tais como algumas enzimas, proteínas contráteis e canais iônicos presentes na membrana.

Os canais iônicos desempenham papel crucial para a rápida transmissão de informações entre as células traduzindo os sinais na forma de mudanças no potencial de membrana (V_m), compreendendo dois processos: a despolarização e a hiperpolarização da membrana (YU; CATTERALL, 2004). Estes sinais elétricos resultam, na sua maioria, em oscilações na concentração de Ca^{2+} intracelular livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Dessa forma, promovendo o controle de inúmeros processos fisiológicos, tais como: secreção hormonal, transmissão e processamento de informações pelo sistema nervoso central, sensações somáticas e a própria contração muscular. Todos esses processos são mediados, pelo menos em parte, por membros da superfamília de canais sensíveis à voltagem, dentre eles, os K_V , os BK_{Ca} , os Ca_V , os canais para Na^+

sensíveis à voltagem (Na_v), os canais abertos por nucleotídeos cíclicos (CNG), os canais ativados por hiperpolarização e nucleotídeos cíclicos (HCN), os canais receptores de potencial transiente (TRP), os canais de potencial transiente (TPC), os canais para K^+ retificadores de entrada (K_{ir}) e os canais para K^+ de dois poros (K_{2P}) (YU; CATTERALL, 2004).

Sabe-se que nas células do músculo liso estão mais comumente expressos os BK_{Ca} , canais para Cl^- e canais catiônicos ativados pelo receptor muscarínico, que além de sensíveis ao Ca^{2+} intracelular, são regulados por proteínas-G (INOUE; ISENBERG, 1990b). A atividade de todos esses canais reflete em variações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ da vizinhança imediata do lado intracelular da membrana plasmática (BENHAM; BOLTON, 1986).

O espasmo pode ser inibido quando se impede alguma etapa da via de sinalização bioquímica ativada durante o processo contrátil. A contração é, basicamente, resultante de um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que pode ser de origem extracelular, a partir de uma inversão no potencial de membrana ou, indiretamente, após ligação de agonistas aos seus receptores levando à abertura de canais para Ca^{2+} operados por voltagem do tipo L ($\text{Ca}_v\text{-L}$) (CASTEELS; SUZUKI, 1980; NEILD; KOTE-CHA, 1987; NELSON et al., 1988). A origem do Ca^{2+} intracelular pode ser resultado da ativação de receptores específicos na membrana do retículo sarcoplasmático (RS), organela que representa a principal fonte de Ca^{2+} intracelular, devido ao aumento dos níveis de 1,4,5-trisfosfato de inositol (InsP_3), promovido após a interação agonista/receptor e ativação da fosfolipase C (PLC); da liberação do Ca^{2+} por interação do próprio Ca^{2+} com o receptor de rianodina (RyR, sensível à cafeína), também presente na membrana do RS (DELLIS et al., 2006) e, por fim, do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediado por um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ reverso na membrana plasmática (BLAUSTEIN, 1989).

Recentemente foi descoberto um mecanismo de entrada de Ca^{2+} no meio intracelular mediado diretamente por ativação de receptores de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3R) situados na membrana plasmática (DELLIS et al., 2006), mas seu papel na contração do músculo liso ainda não está bem esclarecido. Porém, a principal porta de entrada para o Ca^{2+} que vem do meio extracelular são os Ca_v (CATTERALL, 2000), e como a abertura de tais canais é controlada por variações no V_m das células da musculatura lisa, a contração

no músculo liso está intimamente relacionada com o Vm dessas células, onde eventos de despolarização levam à contração, enquanto que eventos de repolarização ou hiperpolarização levam ao relaxamento deste músculo (NELSON et al., 1990; KNOT et al., 1996; THORNELOE; NELSON, 2005).

O íon Ca^{2+} , advindo de qualquer meio, quando em quantidades elevadas no meio intracelular pode ligar-se à calmodulina (CaM) e contribuir para a formação do complexo $[(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}]$ que, por sua vez, pode ativar a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). O novo complexo formado $[(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM-MLCK}]$ constitui a forma ativa da MLCK, que tem como função fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC20), e esta fosforilação permite o desencadeamento do mecanismo de ciclicização das pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina favorecendo um deslizamento entre estes filamentos e, conseqüentemente, o desenvolvimento da contração (ALLEN; WALSH, 1994; SOMLYO; SOMLYO, 1994; 2003).

O equilíbrio entre a MLCK e a fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) funciona como um mecanismo regulador reversível de fosforilação/desfosforilação que integra a contração no músculo liso (WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005).

Novos estudos sobre mecanismos de contração de músculos lisos revelam uma via acessória que contribui para este fenômeno: a modulação da MLC pela inibição da MLCP (SOMLYO; SOMLYO, 2000). A MLCP é formada por 3 subunidades: uma catalítica (PP1c), uma regulatória (MYPT1) e outra, com 20 kDa, de função até então desconhecida (SOMLYO; SOMLYO, 2003). O mecanismo de inibição da MLCP inicia-se a partir da ativação da pequena proteína ligante de GTP (RhoA), dependente da proteína $G_{12/13}$. O complexo RhoA-GTP estimula a sua cinase associada (ROK) e uma fosfolipase D (PLD), que é específica para fosfatidilcolina, liberando ácido fosfatídico, o qual sofre desfosforilação, formando diacilglicerol (DAG) e ativação sustentada da proteína cinase C (PKC) (EXTON, 1997). A ativação da PKC pode resultar da ativação, dependente da proteína G_q , da PLC que forma DAG a partir da hidrólise do 4,5-bifosfato de inositol (PIP_2). As proteínas ROK e PKC podem agir de forma isolada ou em cooperação para inibir a atividade da MLCP (SOMLYO; SOMLYO, 2000) e, desta forma, manter a contração. Apesar de a proteína ROK fosforilar diretamente a MLC (TOTSUKAWA et al., 2000), seu

mecanismo de ação para sensibilização do Ca^{2+} parece se dar por inibição da MLCP, e este mecanismo se dá por fosforilação direta dos resíduos Thr696 e Thr853 da MYPT1 humana (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A ROK também pode fosforilar o resíduo Thr38 da CPI-17 (uma proteína inibitória endógena), contribuindo para o aumento da sua potência inibitória sobre a MLCP, chegando a mais de 1000 vezes (SOMLYO; SOMLYO, 2003).

Se o mecanismo contrátil se dá pelo aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, o relaxamento do músculo liso se dá pelo retorno dos níveis de Ca^{2+} livre no citosol aos níveis basais (SOMLYO et al., 2004). Tal redução na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pode ocorrer, basicamente, por dois mecanismos, o eletromecânico, que é a repolarização (ou hiperpolarização) de membrana, ou o fármaco-mecânico, que ocorre a partir da ativação de receptores de membrana e, conseqüentemente, inibição das vias bioquímicas que levam a contração (WOODRUM; BROPHY, 2001).

De grande importância para tal fenômeno é o movimento dos íons K^+ , através de canais presentes na membrana plasmática, contribuindo para a regulação do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v (HUANG, 1998). Assim, os canais para potássio desempenham um papel chave na regulação do V_m e na excitabilidade celular. O V_m do músculo liso depende do balanço entre o aumento da condutância ao K^+ levando a uma hiperpolarização e a diminuição da condutância ao K^+ levando a uma despolarização. A abertura do canal para K^+ hiperpolariza a membrana das células musculares lisas levando a uma redução na probabilidade de abertura dos Ca_v e, portanto, a um relaxamento (KNOT et al., 1996).

A relação entre o aumento da atividade dos canais para K^+ e o relaxamento observado no músculo liso vem sendo estudada em diferentes tecidos e relacionada com diferentes tipos de canais para K^+ , alguns autores apresentando somente evidências farmacológicas envolvendo a resposta contrátil, como por exemplo, os canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) em traquéia de cobaia (SHIKADA; TANAKA, 1995), em músculo longitudinal de íleo de rato (DAVIES; McCURRIE; WOOD, 1996) e de cobaia (SUN; BENISHIN, 1994), os canais BK_{Ca} em músculo liso longitudinal de íleo de cobaia (UYAMA et al., 1993), em traquéia de porco (KANNAN; JOHNSON, 1995), canais para K^+ de pequena condutância ativados por Ca^{2+} (SK_{Ca}) em útero de rata (SILVA et al., 1996), outros associando experimentos de

contração e eletrofisiológicos, como por exemplo, os canais para K^+ de pequena condutância ativados por Ca^{2+} em aorta de rato (SILVA et al., 1994), os canais BK_{Ca} em traquéia de cão (WADE; SIMS, 1993), de porco (KUME et al., 1994; YAMAGAGE et al., 1996), de cobaia (HIRAMATSU et al., 1994), em aorta de coelho (DEMIREL et al., 1994), em miométrio humano (ANWER et al., 1993, MEERA et al., 1995), em artérias submucosas e mesentéricas de cobaia (HILL et al., 1997) e em íleo de cobaia (HONG et al., 1997; SILVA et al., 1999; ABOULAFIA; SILVA; NOUAILHETAS, 2002), os canais K_{ATP} em uretra de cobaia (TERAMOTO et al., 1999) e em traquéia de gato (TERAMOTO et al., 2000).

Atualmente é reconhecido que, em células da musculatura lisa, há pelo menos quatro diferentes famílias de canais para K^+ identificadas, a dos BK_{Ca} , dos K_V , dos K_{ATP} e dos K_{ir} (NELSON; QUAYLE, 1995). Sendo que, a repolarização ou hiperpolarização de membrana ocorre devido, principalmente, a ativação dos BK_{Ca} , que são ativados quando a $[Ca^{2+}]_i$ se eleva na ordem de μM , e a ativação dos K_V , em decorrência à despolarização de membrana (LEDOUX et al., 2006). Tal ativação leva a uma redução no influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V por sua inibição e, conseqüentemente, a uma redução da $[Ca^{2+}]_i$ (LEDOUX et al., 2006; LIN et al., 2006).

Diante do exposto, compostos como os ativadores de canais para K^+ podem hiperpolarizar a membrana e, indiretamente, bloquear os Ca_V-L , inibir o influxo de Ca^{2+} , e conseqüentemente, diminuir a $[Ca^{2+}]_i$, inibindo a contração (WESTON; EDWARDS, 1992; KURIYAMA et al., 1995; LEDOUX et al., 2006; LIN et al., 2006).

Os mecanismos que podem resultar em relaxamento e que estão diretamente relacionados com um acoplamento fármaco-mecânico incluem a fosforilação via PKG (proteína cinase dependente de GMP_C) ou PKA de vários substratos, podendo promover: (1) o aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA), promovendo aumento do seqüestro e extrusão de Ca^{2+} , respectivamente, reduzindo a $[Ca^{2+}]_i$; (2) a inativação dos IP_3R e redução da sua capacidade de liberar Ca^{2+} do RS; (3) a diminuição da formação do $InsP_3$ e, conseqüentemente, redução da liberação de Ca^{2+} do RS; (4) a inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo $[(Ca^{2+})_4-CaM]$, e a fosforilação de telocquina, que promove a ativação da

MLCP, ambos os processos causando uma redução nos níveis de MLC fosforilada e da própria contração; (5) a inibição dos Ca_V , promovendo uma redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por diminuição do influxo de Ca^{2+} ; (6) a ativação de canais para K^+ , que indiretamente, por repolarização ou hiperpolarização, causam a desativação dos Ca_V (WOODRUM; BROPHY, 2001; DUTTA et al., 2002; DANILA; HAMILTON, 2004).

Em células do músculo liso intestinal, agonistas muscarínicos M_3 (ex. carbacol) induzem oscilações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ com variações concomitantes na probabilidade de abertura dos BK_{Ca} e canais catiônicos (ZHOLOS et al., 1994; KOHDA et al., 1996, 1998). Isto promove oscilações sincronizadas no V_m e na entrada de Ca^{2+} induzida por despolarização. Porém, muitos aspectos importantes deste complexo de interações entre o V_m , $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e a atividade de dois tipos de canais para Ca^{2+} sensíveis ao Ca^{2+} , os intracelulares e os da membrana, ainda necessitam de esclarecimentos (GORDIENKO et al., 1999).

Semelhantemente ao que ocorre em outros tipos de células do músculo liso, tal como em miócitos de íleo isolados de cobaia, um aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é primordial para o controle da atividade contrátil no miométrio (WORD, 1995). No miométrio, o Ca^{2+} é considerado o principal íon, exceto no final da gravidez, quando o íon Na^+ desempenha o principal papel no controle da atividade elétrica do miométrio (KAO, 1989; MARSHALL, 1990; PARKINGTON; COLEMAN, 1990; HILLE, 1992; SANBORN, 1995). Assim, a entrada de Ca^{2+} nas células miométriais medeia as variações no potencial de membrana e funcionam como um sinal interno para a contração. Consequentemente, o entendimento das bases para a regulação da atividade elétrica do miométrio é um fator chave para o entendimento da regulação do Ca^{2+} miométrial e da atividade contrátil. De tal forma, o controle da movimentação iônica pode prever um alvo responsável pelo controle das contrações uterinas (SANBORN, 2000).

Um número de canais para Ca^{2+} miométriais tem sido bem descritos, incluindo os $\text{Ca}_V\text{-L}$, os $\text{Ca}_V\text{-T}$ (INOUE et al., 1990a; INOUE; SPERELAKIS, 1991; SPERELAKIS et al., 1992; MIRONNEAU, 1993; SANBORN, 1995) e uma nova classe de canais iônicos envolvidos na entrada de Ca^{2+} tem sido descrita recentemente, e várias destas proteínas estão presentes nas células miométriais. Membros da família dos receptores de potencial transiente (TRP) são proteínas da membrana plasmática implicadas na entrada de Ca^{2+} nessas

células em resposta a sinais resultantes a partir do InsP_3 gerado e/ou da depleção dos estoques desse íon no meio intracelular (BIRNBAUMER et al., 1996).

O mecanismo de contração uterino é similar aos outros tipos de músculos lisos (WRAY, 1993; WRAY et al., 2001). Para que haja ativação dessa contração é necessário que haja um aumento global da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sendo que a principal fonte de Ca^{2+} ativador no miométrio é o fluido extracelular (SHMIGOL et al., 1998; WRAY et al., 2001) o qual pode entrar no compartimento citoplasmático durante uma despolarização de membrana ou após estímulo de um agonista. Neste último caso, a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, p ex.: RS, pode ser o mecanismo predominante responsável pela elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que precede a ativação da entrada de Ca^{2+} através de canais iônicos na membrana. Após o término do estímulo, o relaxamento se dá por recaptção do Ca^{2+} para os estocadores intracelulares de Ca^{2+} e extrusão para o meio extracelular (KARAKI et al., 1997).

Devido ser necessária uma elevação global da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para iniciar-se uma contração, elevações localizadas da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, tais como os “ Ca^{2+} sparks” e “ Ca^{2+} puffs” iniciados espontaneamente ou em resposta a agonistas, por exemplo o InsP_3 (YAO et al., 1995), não contribuem para a ativação da contração porém, podem ser importantes para a regulação da excitabilidade da membrana uterina (NELSON et al., 1995) e ativação localizada de vias de transdução específicas (RASMUSSEN et al., 1987). O RS ocupa aproximadamente 7,5 % do volume celular uterino total (excluindo mitocôndria e núcleo). A abundância do RS em células do músculo liso uterino e suas variações de acordo com o ciclo estral ou estado de gravidez sugere que esta organela pode estar envolvida na regulação da sinalização dos miócitos uterinos durante os estados de gravidez e parto (SHMYGOL; WRAY, 2004).

Em miócitos uterinos os mecanismos de sinalização para liberação de cálcio intracelular envolvem principalmente a ação de agonistas como a ocitocina, as prostaglandinas, os α -adrenérgicos e os muscarínicos. A ligação de tais agonistas aos seus receptores na superfície da membrana proporciona a ativação da fosfolipase C (PLC) via proteínas-G, resultando na produção de InsP_3 e, conseqüentemente, liberação de Ca^{2+} do RS (MARC et al., 1986; ANWER; SANBORN, 1989; ARNAUDEAU et al., 1994). Também já foi

observada a participação dos RyR no mecanismo de liberação de Ca^{2+} intracelular em células miométriais, um mecanismo denominado, liberação de Ca^{2+} induzida pelo próprio Ca^{2+} (CICR). Como subtipos desse receptor sofrem supra-regulação (“up-regulation”) em úteros grávidos (AWAD et al., 1997), sugere-se que um possível envolvimento do mecanismo de CICR na regulação da contratilidade uterina durante o parto.

No miométrio, sabe-se que variações rítmicas na permeabilidade ao Ca^{2+} contribuem para a despolarização e variações na permeabilidade ao íon K^+ contribuem para a repolarização ou hiperpolarização (REINER; MARSHALL, 1975; KAWARABAYASHI et al., 1986; KAO, 1989; MARSHALL, 1990; PARKINGTON, 1990; SANBORN, 1995).

Os canais para K^+ , no miométrio, incluem os BK_{Ca} , retificadores retardados e retificadores de entrada. Um dos canais para K^+ melhor caracterizado é o BK_{Ca} , detectado em células miométriais de um grande número de espécies, incluindo humanos (MOLLARD et al., 1986; TORO et al., 1990; TRITTHART et al., 1991; ANWER et al., 1993; ADELWOEHRER; MAHNERT, 1993; ERULKAR et al., 1993; PEREZ et al., 1993; MEERA et al., 1995; SANBORN, 1995; KHAN et al., 1998). Assim, devido serem regulados pelo Ca^{2+} , a atividade de tais canais pode ser regulada por agentes relaxantes ou contracturantes uterinos.

A IbTx, um bloqueador seletivo dos BK_{Ca} (GALVEZ et al., 1990; FOX et al., 1997; KOSCHAK et al., 1997; SCHROEDER et al., 2002), promove o surgimento de potenciais de membrana mais positivos (ANWER et al., 1993). Uma rápida despolarização, atribuída primariamente à entrada de Ca^{2+} (ou Na^+ durante o início da gravidez) é responsável pela geração do potencial de ação (KAO, 1989; MARSHALL, 1990; PARKINGTON, 1990; INOUE et al., 1990a; SANBORN, 1995). A diminuição do potencial de ação é consequência do envolvimento da abertura de canais para K^+ (LATORRE et al., 1989; PARKINGTON; COLEMAN, 1990; SANBORN, 1995).

Notavelmente, esses canais são ativados por agentes capazes de aumentar os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c) e, conseqüentemente, a atividade da PKA, incluindo agonistas β -adrenérgicos e a relaxina (TRITTHART et al., 1991; ANWER et al., 1992; MEERA et al., 1995;

SANBORN et al., 1995) porém, são raros os agentes relaxantes de músculos lisos que agem por ativação direta desses canais.

Em útero isolado de rata, Revuelta, Cantabrana e Hidalgo (1997) observaram que os flavonóides genisteína, campferol e quercetina apresentaram efeito relaxante sendo que para o campferol e a quercetina este efeito parece estar relacionado ao aumento do AMP_C no meio intracelular, já para a genisteína este efeito está inversamente relacionado ao grau de despolarização induzido neste órgão.

O útero de rata é bicornio, com os dois cornos uterinos claramente definidos e aderidos sobre a cérvix uterina, tendo o órgão a forma de Y (Figura 3 A).

Na espécie humana, o útero exibe uma estrutura simples, com a massa do órgão sendo comprimida ao corpo uterino (Figura 3 B). O útero de todos os mamíferos placentários é composto de, no mínimo, três camadas: o endométrio que reveste a superfície luminal, a camada de músculo liso ou miométrio e a serosa (CRANKSHAW, 2001).

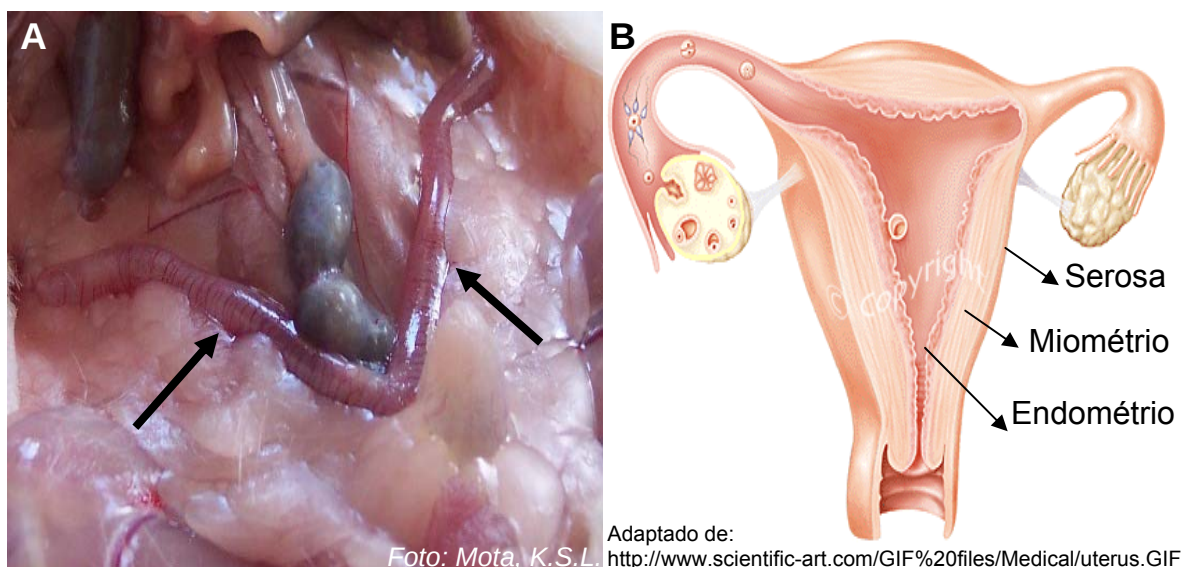


Figura 3. Foto do útero de rata (A) e esquema do útero humano (B).

A regulação das contrações uterinas é um parâmetro de importância para a saúde da mulher. As cólicas uterinas e abortos prematuros são problemas que acometem mulheres em todo o mundo. Por exemplo, as contrações uterinas fortes e regulares são essenciais para a iniciação do trabalho de parto bem como, manutenção e eventual expulsão do feto e da placenta durante o nascimento.

A hiperatividade uterina antes do tempo predispõe as grávidas ao trabalho de parto prematuro. Contrações uterinas inadequadas podem impedir o trabalho de parto e aumentar a incidência de emergências das cesarianas e hemorragias pós-parto com perigo potencial para a mãe e para a criança (ADELSTEIN; HATHAWAY, 1979; WRAY, 1993).

Tentar descobrir alguma substância que possa prevenir ou até curar tais problemas é de extrema importância, uma vez que a diplotropina apresentou efeito relaxante tanto em íleo isolado de cobaia como em útero isolado de rata, também surge a importância de se tentar elucidar o mecanismo de ação tocolítico apresentado por este flavonóide.

O músculo liso é o principal tipo de músculo que controla o funcionamento da maioria dos órgãos ocos do organismo. A regulação da contração do músculo liso desempenha um papel integral em muitos processos fisiopatológicos, dessa forma o músculo liso possui um importante papel na maioria dos sistemas biológicos, e ainda representa uma ferramenta útil para a investigação de atividades biológicas de substâncias de origem natural ou sintética (WATTERSON et al., 2005).

A contração anormal do músculo liso é importante no mecanismo da hipertensão, do vasoespasma cerebral e coronariano, da disfunção erétil, da asma brônquica, do trabalho de parto e das cólicas uterinas e intestinais (WEBB, 2003). Além disso, como os íons Ca^{2+} medeiam grande parte das ações das drogas no nosso organismo e desempenham um papel central no processo de contração e relaxamento, os modelos de músculos lisos (intestinal e uterino) se apresentam como meios, relativamente simples, para a investigação de mecanismos de ação de drogas que envolvem o metabolismo do cálcio como é o caso da diplotropina.

Diante de todas essas premissas e observando-se os resultados anteriormente obtidos com o flavonóide diplotropina, isolado da fase hexânica

obtida do extrato etanólico bruto das cascas do caule de *Diploptropis ferruginea* Benth. (Fluxograma 1), resolveu-se dar continuidade aos estudos sobre o efeito relaxante de diplotropina em íleo isolado de cobaia e útero isolado de rata, visando caracterizar molecularmente o mecanismo de ação pelo qual diplotropina promove relaxamento desses músculos, bem como expandir os estudos que combinem a modificação estrutural no composto natural diplotropina e sua atividade biológica, constituindo um trabalho de correlação entre a estrutura química e a atividade biológica. Para tanto os colaboradores da química propuseram modificações estruturais no composto natural diplotropina, utilizando-se técnicas de síntese orgânica e de transformações químicas orgânicas, focalizando as modificações nos anéis aromáticos com o objetivo de aumentar a potência da atividade farmacológica mais evidente no flavonóide diplotropina, que é a de induzir relaxamento em íleo isolado de cobaia e útero isolado de rata e assim, obtiveram, através de uma desmetilação oxidativa com nitrato cérico de amônia, uma quinona, a (2,3-*trans*-3,4-*trans*)-3,4-dimetoxi-(6,7,2",3")-furanoflavana-5,8-diona, que foi codificada como DPTN-Sint. 1 (Figura 4).

Fluxograma 1. Esquema geral para obtenção do extrato etanólico bruto, bem como da fase hexânica e isolamento e purificação do flavonóide diplotropina.

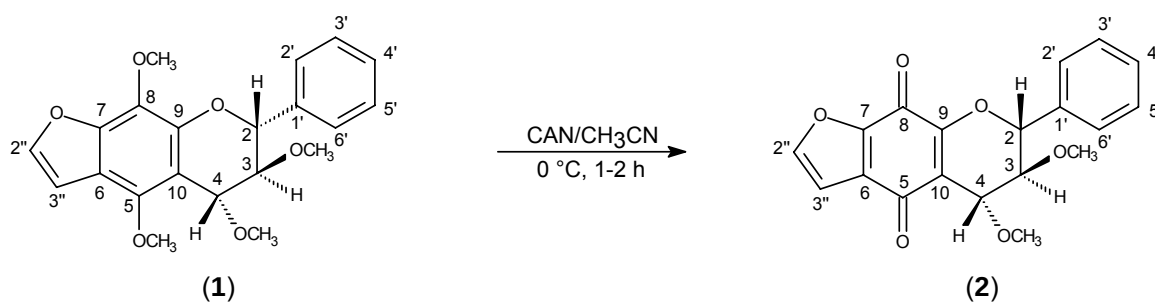
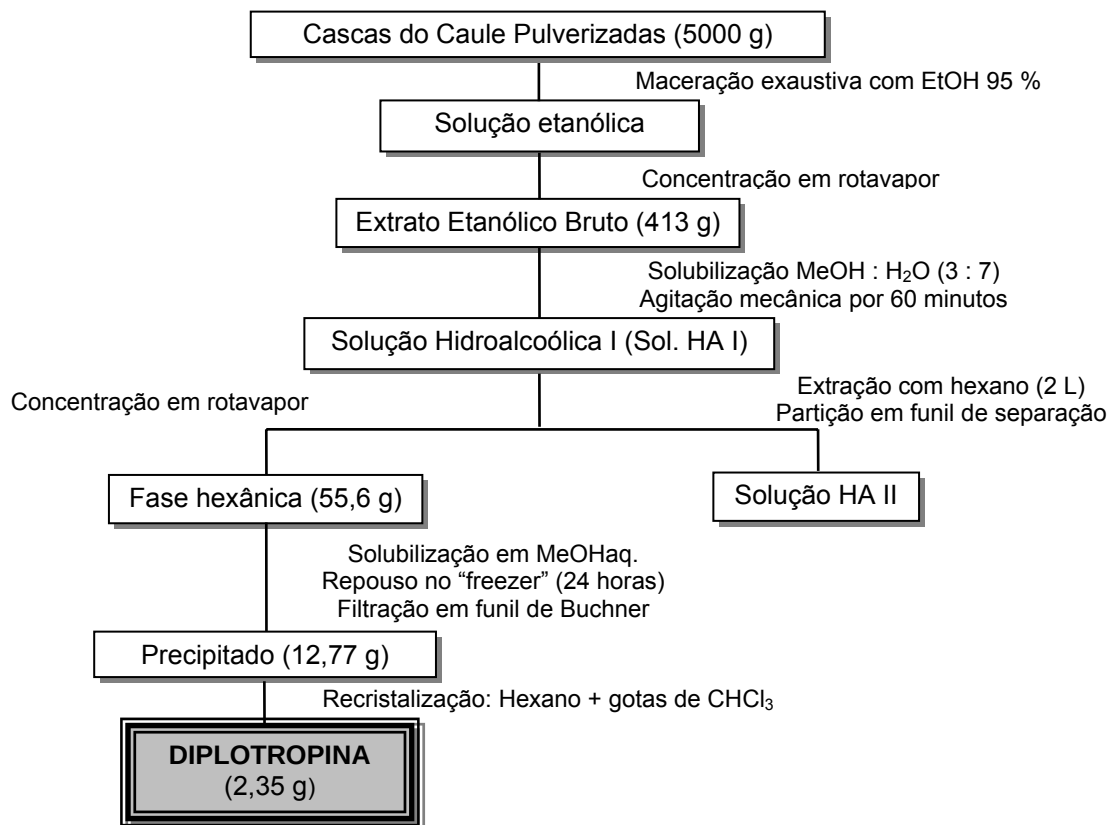


Figura 4. Estrutura química do derivado sintético, DPTN-Sint. 1 (2), obtido a partir de modificações estruturais no composto natural diplotropina (1).

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Aprofundar o estudo sobre o mecanismo de ação espasmolítica da diplotropina, furanoflavona isolada da fase hexânica obtida das cascas do caule de *Diplotropis ferruginea* Benth. (Fabaceae) em íleo isolado de cobaia e útero isolado de rata.

2.2 Específicos

2.2.1 Em íleo isolado de cobaia:

2.2.1.1 avaliar o efeito da diplotropina frente a vários bloqueadores de canais para potássio, inclusive específico para BK_{Ca};

2.2.1.2 investigar o efeito da diplotropina sobre a [Ca²⁺]_i em miócitos de íleo de cobaia com e sem estimulação prévia.

2.2.2 Em útero isolado de rata:

2.2.2.1 investigar o efeito tocolítico promovido por diplotropina;

2.2.2.2 caracterizar tal efeito, na tentativa de elucidar o (s) mecanismo (s) de ação envolvido (s), investigando:

a. a característica do antagonismo das contrações uterinas induzidas por ocitocina;

b. o envolvimento dos canais para potássio;

c. uma possível participação da via de sinalização dos nucleotídeos cíclicos.

2.2.3 Investigar o efeito do derivado sintético da diplotropina (2,3-*trans*-3,4-*trans*)-3,4-dimetoxi-(6,7,2",3")-furanoflavana-5,8-diona, DPTN-Sint. 1, em músculos lisos isolados (aorta de rato, traquéia e íleo de cobaia e útero de rata);

2.2.4 Comparar os parâmetros de potência e eficácia relativas de DPTN-Sint. 1 com o seu precursor, diplotropina, com base na determinação da CE_{50} , CI_{50} e E_{max} .

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material vegetal

As cascas do caule de *Diplotropis ferruginea* Benth. foram coletadas no município de Caraúbas, estado do Rio Grande do Norte, em maio de 2002. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do Setor de Botânica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros (LTF). Uma exsicata da espécie está depositada no Herbário LTF, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) sob o código M. F. AGRA & D. ALMEIDA 5559 (Figura 5).

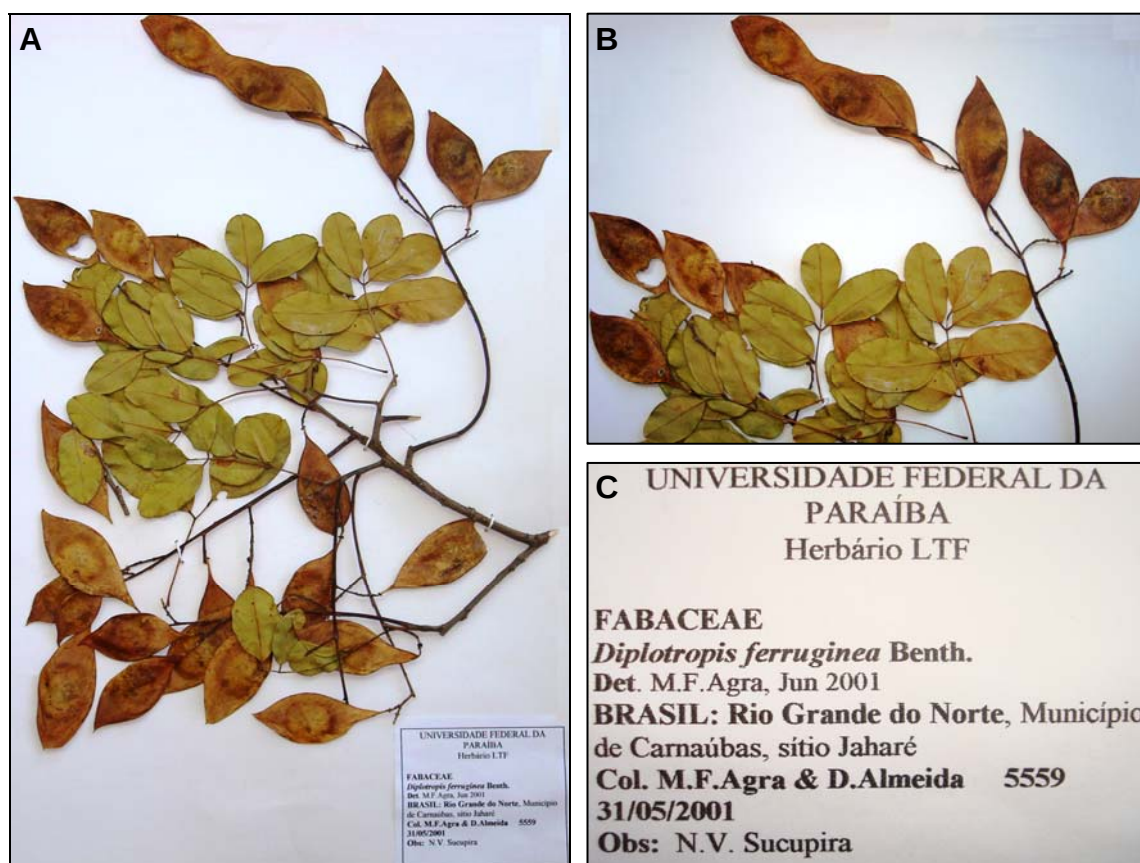


Figura 5. Foto da exsicata de *Diplotropis ferruginea* Benth. (A), detalhes das folhas e frutos (B) e do código de registro no Herbário LTF (C).

3.1.2 Animais

Eram utilizadas cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos pesando entre 300 e 500 g, ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) virgens pesando entre 180 e 250 g e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 250 e 350 g (Figura 6), todos procedentes do Biotério Prof. Thomas George do LTF/UFPB ou do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM).

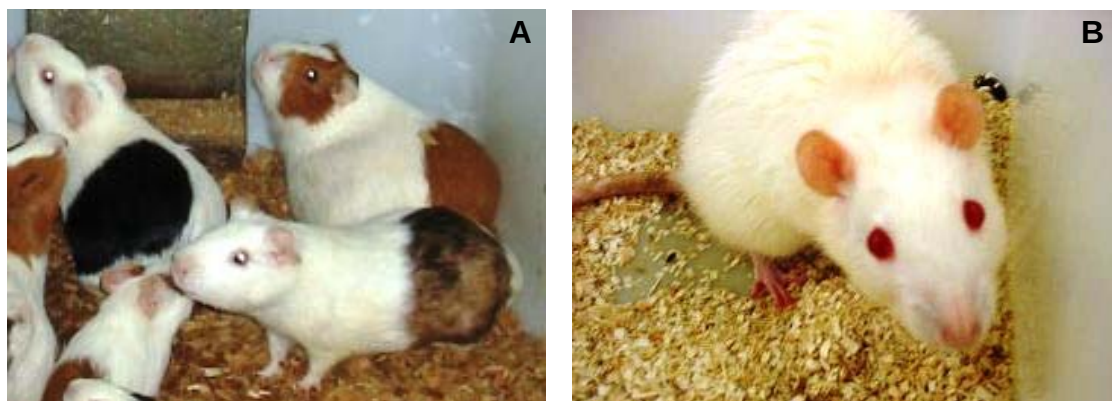


Figura 6. Fotos de *Cavia porcellus* (A) e *Rattus norvegicus* (B).

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Purina) com livre acesso a água, com ventilação e temperatura (22 ± 1 °C) controladas e constantes. Todos os experimentos eram realizados no período de 07:00 às 18:00 horas.

Todos os animais utilizados nos experimentos eram eutanasiados seguindo os princípios de cuidados com animais aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB (Certidão CEPA/LTF # 0508/05) (Anexo 1) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM.

3.1.3 Substâncias e sais

A acetilcolina (ACh), o cloridrato de carbamilcolina (carbacol), a histamina, o cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o cloreto de sódio (NaCl), o cloreto de potássio (KCl), o cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), o fosfato monossódico 1-hidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e o sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

O ácido araquidônico (AA), o cloreto de cério (CsCl), o cloreto de tetraetilamônio (TEA^+), o cremofor, a caribdotoxina (ChTx), o dietilestilbestrol, a apamina, a iberiotoxina (IbTx), o 1-[2(-carboxioxazol-2-i)-6-aminobenzofurano-5-oxil]-2-(2'-amino-5'-metilfenoxi) etano-N, N, N, N-tetraacético ácido pentacetoximetil éster (fura 2-AM), a albumina sérica bovina, o cloreto de bário (BaCl_2), o cloreto de manganês (MnCl_2), a digitonina, o inibidor de tripsina, a penicilina e o sulfato de estreptomicina foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

A ocitocina foi obtida da Eurofarma (Brasil), o ácido plurônico F-127 foi obtido da Molecular Probes Inc. (Carlsbad, CA, USA), a collagenase foi obtida da Worthington Biochemical Corporation.

O flavonóide diplotropina, bem como o seu derivado obtido por síntese, DPTN-Sint. 1, foram gentilmente cedidos pelos colaboradores do Setor de Química do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica.

A estrutura química da diplotropina, bem como do seu derivado sintético, foi determinada por comparação de seus dados de ponto de fusão (114-115 - 90-92 °C, respectivamente), espectroscopia de ressonância nuclear magnética de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) e espectrometria de massas com dados previamente publicados (ALMEIDA et al., 2003; ALMEIDA, 2004). Informações quanto à marcha para isolamento do flavonóide diplotropina e sobre sua determinação estrutural e características químicas são de responsabilidade de nossos colaboradores do Setor de Química do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (ALMEIDA, 2004) e não fazem parte deste trabalho.

3.1.4 Aparelhos

Para registro das contrações isométricas e isotônicas os segmentos de órgãos isolados eram suspensos em cubas de vidro (6 mL) aquecidas à temperatura adequada, de acordo com cada protocolo experimental, por bombas termostáticas modelo Polystat 12002 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) ou Fisatom 597 (FISATOM, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 7).



Figura 7. Fotos das bombas termostáticas. Polystat 12002 (A) e Fisatom 597 (B).

As contrações isométricas eram registradas através de transdutores de força modelo FORT-10 conectados a um amplificador modelo TBM4M (ambos da World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) que, por sua vez, estava conectado a uma placa conversora analógico/digital (BioData, João Pessoa, PB, Brasil) instalada em um computador com o programa BioMed[®] versão Rv2 (BioData, João Pessoa, PB, Brasil) (Figura 8).

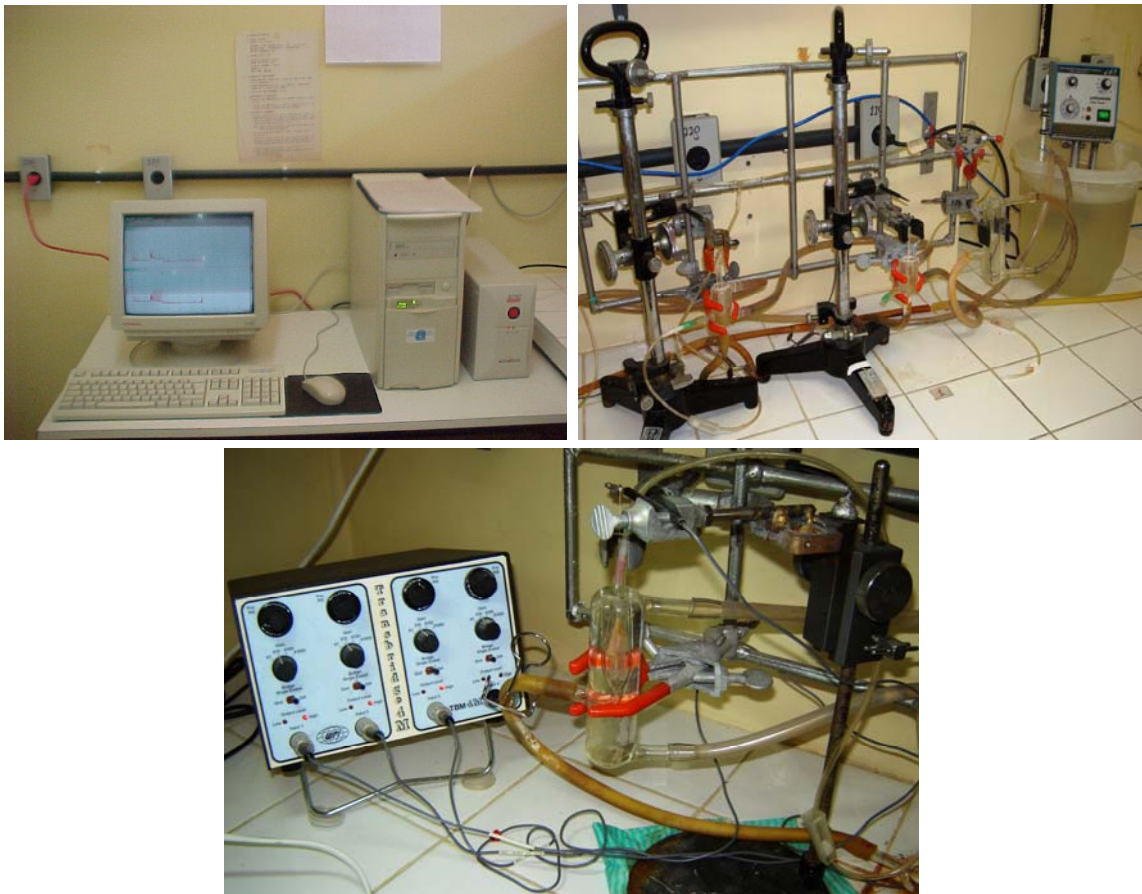


Figura 8. Fotos do sistema de aquisição de dados digital, com amplificador e cuba para órgãos isolados em detalhe.

As contrações isotônicas eram registradas por meio de uma alavanca isotônica de inscrição frontal em cilindros esfumaçados de um quimógrafo (DTF, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 9).



Figura 9. Foto do quimógrafo com cilindro esfumaçado e sistema de cubas.

Para aferição do pH das soluções nutritivas era utilizado um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 10 A).

Todas as substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG200 (Figura 10 B), e os animais em balança semi-analítica (ambas da GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 10 C).



Figura 10. Fotos do pHmetro digital (A), da balança analítica (B) e da balança semi-analítica (C).

Para determinação indireta da $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos recém dispersos isolados de íleo de cobaia eram utilizadas cubetas de quartzo acopladas à câmara escura de um espectrofluorímetro modelo LS-5B (Perkin-Elmer, Buckinghamshire, Inglaterra) (Figura 11 A) e de um fluorímetro SPEX (ARCM System, USA) (Figura 11 B), para monitorar a incorporação do fura-2 e para a medida da fluorescência dependente de Ca^{2+} , respectivamente.



Figura 11. Fotos do espectrofluorímetro modelo LS-5B (A) e do fluorímetro SPEX (B).

3.1.5 Soluções nutritivas

Foram utilizadas diferentes soluções nutritivas, todas aeradas com mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂), cujas composições variavam de acordo com as características de cada protocolo experimental, e estão descritas a seguir:

Tabela 1. Composição da solução de Krebs normal.

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	118,0
KCl	4,6
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,7
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5
Glicose	11,0
NaHCO ₃	25,0

Tabela 2. Composição da solução de Krebs modificado por Sun e Benishin (1994).

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	117,0
KCl	4,7
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,3
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5
Glicose	11,0
NaHCO ₃	25,0

Tabela 3. Composição da solução de Locke Ringer de acordo com Revuelta, Cantabrana e Hidalgo (1997; 2000).

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	154,0
KCl	5,63
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,16
MgCl ₂	2,10
Glicose	5,55
NaHCO ₃	5,95

Tabela 4. Composição da solução de Locke Ringer sem Ca²⁺.

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	154,0
KCl	5,63
MgCl ₂	2,10
Glicose	5,55
NaHCO ₃	5,95

Tabela 5. Composição da solução de Tyrode.

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	137
KCl	2,7
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,49
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,36
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,36
Glicose	5,04
NaHCO ₃	11,9

Tabela 6. Composição da solução de Hank.

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	137,0
KCl	5,4
KH ₂ PO ₄	0,44
MgSO ₄	1,0
Na ₂ HPO ₄	0,25
CaCl ₂	1,3
Glicose	5,6
Vermelho de fenol	28,8
NaHCO ₃	4,2

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparo das amostras estudadas

O cremofor, agente solubilizante, foi utilizado para facilitar a dissolução da diplotropina e do seu derivado sintético, DPTN-Sint. 1, em água destilada, na concentração de 3 % (P/V). Inicialmente as amostras eram dissolvidas em cremofor puro e, em seguida, era adicionada água destilada (pH = 7,0) até um volume que gerasse uma concentração de 10^{-2} M (solução-estoque). Esta solução-estoque era armazenada em “freezer” a -20°C , sendo novamente diluída em água destilada no momento da realização dos experimentos de acordo com a necessidade de cada protocolo. A concentração final de cremofor nas cubas nunca excedeu 0,01 % (V/V). Nesta concentração o cremofor é desprovido de efeito contrátil ou relaxante.

O fura-2-AM e o ácido plurônico F-127 eram dissolvidos em DMSO. O ácido araquidônico era dissolvido em etanol absoluto. As demais substâncias e sais eram dissolvidos em água destilada e as soluções-estoque eram conservadas sob refrigeração ou congelamento, conforme o caso. No momento da realização dos experimentos estas soluções eram diluídas de acordo com a exigência do protocolo experimental.

3.2.2 Caracterização Funcional do Mecanismo de Ação Espasmolítica de Diplotropina em Íleo Isolado de Cobaia

3.2.2.1 Avaliação da participação dos canais para K^+ no relaxamento produzido por diplotropina em íleo isolado de cobaia

Baseados em resultados anteriormente obtidos, os quais levaram à sugerir que, provavelmente, diplotropina poderia estar modulando os canais para K^+ , decidiu-se investigar o efeito desta furanoflavana sobre o íleo pré-contráido com acetilcolina tanto na ausência como na presença de bloqueadores seletivos de canais para potássio.

3.2.2.1.1 Efeito de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por acetilcolina na ausência e na presença da 4-aminopiridina (4-AP) e da iberitoxina (IbTx) em íleo isolado de cobaia

As cobaias eram mantidas em jejum por um período de 18 a 24 horas, tendo acesso à água *ad libitum* antes do início dos experimentos. Após este período eram eutanasiadas por deslocamento cervical. O abdômen era aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento era retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs modificado a 37 °C sob aeração com carbogênio.

Após cuidadosa dissecação, o segmento do íleo era seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, suspensos individualmente em cubas de vidro e deixados em repouso por um período de 30 minutos, tempo necessário para perfeita estabilização da preparação, durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 15 minutos. Após o período de estabilização, duas contrações sub-máximas similares eram obtidas com 10^{-6} M de acetilcolina e registradas através de transdutores isométricos conectados a um amplificador que, por sua vez, estava conectado a uma placa conversora analógico/digital instalada em um computador onde os resultados eram registrados para posterior análise. Para obtenção do registro controle, durante a fase tônica sustentada da segunda resposta, diplotropina era adicionada de maneira cumulativa à cuba. Para se testar o efeito de

diplotropina na presença dos bloqueadores, após o período de estabilização (30 min.), em algumas das preparações, bloqueadores de canais para K^+ eram incubados por um período de 15 min. antes da indução de uma segunda contração em resposta a adição de 10^{-6} M de acetilcolina. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da força de contração inicial produzida pela acetilcolina. Os valores de CE_{50} da diplotropina foram obtidos por regressão não-linear.

3.2.3 Caracterização do mecanismo de ação de diplotropina em nível celular

Diploptropina foi submetida a estudos em nível celular para melhor caracterização do mecanismo de ação anteriormente observado em nível funcional.

3.2.3.1 Obtenção dos miócitos de íleo isolado de cobaia em cultura

Os animais eram eutanasiados por deslocamento cervical, o órgão em estudo era removido e dissecado para que ficasse livre de gordura e tecido conectivo. Após dissecação, era lavado com solução nutritiva de Hank (tabela 5) à 37 °C contendo o indicador de pH vermelho de fenol e com o pH ajustado para um valor de 7,4. Após esse procedimento era transferido para uma solução de Hank sem Ca^{2+} e contendo EGTA (0,2 mM) por um período de 10 min. Após isso, os fragmentos de íleo eram transferidos para uma segunda solução de Hank sem Ca^{2+} , contendo EGTA (0,2 mM) e enzimas proteolíticas adequadas para a dispersão das células (colagenase tipo XI [3 mg/mL], papaína [1 mg/mL], elastase tipo I [1 mg/mL] e ditioneitol [1 mM]) (solução digestiva 1) por um período de 30 min. à 37 °C em estufa para cultura (95 % de O_2 e 5 % de CO_2). Passados 30 min., o íleo era segmentado em pequenos fragmentos e estes eram transferidos para uma segunda solução digestiva em meio de cultura DMEM contendo colagenase tipo XI (1 mg/mL), tripsina (0,6 mg/mL) (solução digestiva 2) por um período de 2 h em estufa para cultura, ao término do qual o homogenato era levemente triturado usando uma pipeta de Pasteur e os miócitos eram dispersos. O processo digestivo era suspenso quando a solução digestiva 2 era trocada por uma de Tyrode com albumina sérica bovina (10 %) e inibidor de tripsina (0,5 mg/mL), a suspensão de células era filtrada e centrifugada a 2.000 rpm por 4 min. Após a centrifugação, as células recém dispersas eram ressuspensas em solução de Tyrode e, após isto, essas células eram semeadas em frascos de cultura de 25 cm².

As células eram mantidas em estufas com temperatura constante de 37 °C em ar saturado com água contendo 5 % de CO_2 . Entre 24 e 48 horas

antes do experimento, as células isoladas eram removidas de seus respectivos frascos de cultura e semeadas em lamínulas de vidro. No momento do experimento as lamínulas eram lavadas com solução salina apropriada e transferidas para um fluorímetro visando realizar medidas de $[Ca^{2+}]_i$.

3.2.3.2 Determinação fluorimétrica da $[Ca^{2+}]_i$

A $[Ca^{2+}]_i$ era estimada fluorimetricamente utilizando o fura 2 como fluoróforo de Ca^{2+} . Esta metodologia consistia basicamente em três etapas:

- Determinação da autofluorescência das células;
- Incorporação do fura 2 nos miócitos, que se complexa com o Ca^{2+} citoplasmático livre;
- Determinação da $[Ca^{2+}]_i$ através da razão das leituras da fluorescência em 505 nm, após a excitação das células a 340 e 380 nm (método ratiométrico, de acordo com GRYENKIEWICZ et al., 1985).

3.2.3.2.1 Determinação da autofluorescência das células

A suspensão de células cultivadas em 2,5 mL de solução fisiológica apropriada, era transferida para uma cubeta de quartzo do espectrofluorímetro e mantida sob agitação constante por barra magnética a 37 °C.

As leituras de autofluorescência eram realizadas a 505 nm após a excitação dos miócitos em 340 e 380 nm. Um programa de computador acoplado ao sistema permitia a alternância do monocromador em frações de milissegundos de 340 para 380 nm, possibilitando assim a leitura contínua da fluorescência. Este procedimento era feito antes do início do experimento propriamente dito e o valor de autofluorescência sempre era abaixo de 1 % da fluorescência emitida pelas células na etapa de incorporação com o indicador fura 2-AM e, portanto, considerado desprezível para o cálculo da razão de fluorescência obtida após estímulos com os agonistas em estudo.

3.2.3.2.2 Incorporação do fura 2 aos miócitos

As suspensões de células contendo 10^6 células/mL eram incubadas com 2 μ M de fura 2 acetoximetil éster (fura 2-AM) na presença de ácido plurônico F-127 (0,01 %) à temperatura ambiente em cubetas de quartzo (2,5 mL), continuamente agitadas por barras magnéticas. O fura 2-AM, por ser uma molécula eletricamente neutra, difundia-se através da membrana celular. Sob ação de esterases citoplasmáticas, as ligações ésteres do fura 2-AM eram hidrolisadas, liberando assim o fura 2 na sua forma ácida. Devido a suas cargas elétricas negativas, conferidas por quatro radicais carboxílicos, a molécula de fura 2 permanecia presa no interior da célula e assim interagindo com o Ca^{2+} livre citoplasmático. O complexo fura 2- Ca^{2+} apresentava fluorescência máxima em 505 nm quando excitado entre 340 e 350 nm, enquanto que para o fura 2-AM, a excitação máxima ocorria em 390 nm.

Deste modo a incorporação do fluoróforo no meio intracelular era monitorada em diferentes tempos após a adição do fura 2-AM, através da varredura de excitação entre 300 e 400 nm. Usualmente, a saturação do fluoróforo no meio intracelular era observada após um período de 3 a 4 horas de incubação das células com o fura 2-AM. Uma vez atingida esta saturação, completava-se para 15 mL, com solução fisiológica apropriada, o volume da suspensão de células carregadas com fura 2. Em seguida, esta suspensão era centrifugada a 715 g por 2 minutos para eliminar algum excesso de fura 2-AM extracelular.

3.2.3.2.3 Determinação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ através da razão das leituras de fluorescência

O sedimento de células era ressuspenso em 2,5 mL da solução fisiológica, homogeneizado e transferido para uma cubeta de quartzo do fluorímetro SPEX (ARCM System, NJ, USA) e esta suspensão era mantida sob agitação magnética contínua a 37 °C. Nesta fase, utilizando-se o método ratiométrico (GRYENKIEWICZ et al., 1985), a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ era registrada. Após a estabilização da leitura, as substâncias eram aplicadas nas cubetas conforme a exigência do protocolo experimental.

Diploptropina foi testada em diferentes situações: Inicialmente era avaliado o seu efeito sobre a fluorescência basal dos miócitos de íleo de cobaia, sem que nenhum estímulo promovesse um aumento nos níveis basais de Ca^{2+} . Em um segundo momento era avaliado o efeito do flavonóide após um aumento na razão de fluorescência em resposta à adição de acetilcolina à cubeta, que é indicativo de um aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelulares.

Após a estabilização da fluorescência basal diploptropina foi adicionado à cuba tanto em concentração simples de 10^{-4} M como cumulativamente, nas concentrações de 10^{-4} e 3×10^{-4} M, e o curso-temporal do seu efeito era registrado para observação e análise.

Em outros experimentos, após a estabilização da fluorescência basal era adicionada acetilcolina (10^{-4} M) para promover um aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e quando este aumento atingiu seu valor máximo diploptropina foi adicionada, cumulativamente, nas concentrações de 10^{-4} e 3×10^{-4} M, e o curso-temporal do seu efeito, bem como a percentagem de redução da fluorescência eram registrados para análise posterior.

Os resultados obtidos foram expressos como razão de fluorescência antes e após a adição de diploptropina à solução contendo miócitos de íleo de cobaia.

3.2.4 Avaliação do Mecanismo de Ação Tocolítica de Diplotropina

3.2.4.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por ocitocina em útero isolado de rata

As ratas eram tratadas 24 horas antes do início dos experimentos com dietilestilbestrol (1 mg/kg s.c.) para indução do estro. Decorrido este tempo, eram eutanasiadas por deslocamento cervical. Após abertura da cavidade abdominal, era feita a dissecação do útero, colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Locke Ringer a 32 °C. Em seguida, os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de vidro (6 mL). Para estabilização da preparação, esta era mantida em repouso por 45 minutos antes do contato com qualquer agente, sob tensão de 1 g, efetuando, neste período, a renovação da solução nutritiva da cuba a cada 15 minutos. Após o período de estabilização, duas curvas concentração-resposta cumulativas similares à ocitocina eram obtidas. Em seguida, na ausência da ocitocina, diplotropina era incubada por 15 minutos em diferentes concentrações e em experimentos independentes. Após este período, na presença de diplotropina, uma nova curva concentração-resposta cumulativa à ocitocina era obtida. Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença de diplotropina com aquela obtida pela amplitude média das curvas controle na ausência de diplotropina.

3.2.4.1.1 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina em útero isolado de rata

O útero era montado como descrito no item 3.2.4.1. Após o período de estabilização de 45 minutos, eram obtidas duas curvas de amplitudes similares, concentração-resposta simples com 10^{-2} UI/mL de ocitocina, em preparações diferentes, registradas através de transdutores isométricos acoplados a um amplificador ligado a uma placa conversora analógico-digital, conectada a um computador. Durante a fase tônica sustentada da segunda resposta, diplotropina era adicionada cumulativamente à cuba, em preparações

diferentes. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo agonista contrátil. Os valores de CE_{50} foram obtidos por regressão não-linear das curvas concentração-resposta de diplotropina, em cada experimento.

3.2.4.2 Avaliação da participação dos canais para cálcio operados por voltagem (Ca_v)

3.2.4.2.1 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl em útero isolado de rata

O útero era montado como descrito no item 3.2.4.1. Após o período de estabilização de 45 minutos, eram obtidas duas curvas concentração-resposta simples com 60 mM KCl de amplitudes semelhantes, registradas através de transdutores isométricos acoplados a um amplificador ligado a uma placa conversora analógico-digital conectada a um computador. Durante a fase tônica sustentada da segunda resposta, diplotropina era adicionada à cuba, de maneira cumulativa, em preparações diferentes. O relaxamento era expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelos agentes contráteis. Os valores de CE_{50} obtidos das curvas concentração-resposta de diplotropina em cada experimento foram calculados.

3.2.4.2.2 Efeito de diplotropina sobre a contração induzida por Ca^{2+} em meio despolarizante nominalmente sem cálcio

O útero era montado como descrito no item 3.2.4.1 O tecido permanecia em repouso por 30 minutos com a solução Locke Ringer a 32 °C que era substituída pela solução Locke Ringer sem Ca^{2+} , permanecendo também por 30 minutos, e logo em seguida, era adicionado 60 mM de KCl por 10 minutos. Assim, eram induzidas duas curvas similares de maneira concentração-resposta cumulativas ao $CaCl_2$ que eram registradas através de transdutores isométricos, com intervalo de 30 minutos. Após estas respostas, as preparações eram lavadas e diplotropina era incubada por 15 minutos em preparações diferentes e após este período uma terceira curva cumulativa ao $CaCl_2$ era obtida ainda na presença de diplotropina.

3.2.4.3 Avaliação do envolvimento dos canais para potássio no mecanismo de ação tocolítica de diplotropina

3.2.4.3.1 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl) em útero isolado de rata

O útero era montado como descrito no item 3.2.4.1. Após o período de estabilização de 45 minutos, eram obtidas duas curvas de amplitudes similares, concentração-resposta simples com 10^{-2} UI/mL de ocitocina, em preparações diferentes. Antes da última curva concentração-resposta era incubado, por 10 minutos, o CsCl na concentração de 5 mM, bloqueador não seletivo dos canais para potássio (LATORRE et al., 1989). Durante a fase tônica sustentada da segunda resposta, diplotropina era adicionada cumulativamente à cuba, em preparações diferentes. Os resultados foram avaliados comparando-se as potências relaxantes e o E_{max} de diplotropina tanto na presença de CsCl como na ausência de CsCl.

3.2.4.3.2 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de tetraetilamônio (TEA^+) ou 4-aminopiridina (4-AP) em útero isolado de rata

O útero era montado como descrito no item 3.2.4.1. Após o período de estabilização de 45 minutos, eram obtidas duas curvas de amplitudes similares, concentração-resposta simples com 10^{-2} UI/mL de ocitocina em preparações diferentes, antes da última curva concentração-resposta eram incubados por 10 minutos na concentração de 1 mM o tetraetilamônio (TEA^+), bloqueador dos canais para potássio de grande condutância ativados pelo Ca^{2+} (BK_{Ca}) (MURRAY et al., 1991; HUANG, 1998; SEITZ et al., 1999) ou 0,3 mM de 4-AP, um bloqueador dos canais para potássio operados por voltagem (K_V) (AKKER et al., 1985; LI et al., 1999). Durante a fase tônica sustentada da segunda resposta, diplotropina era adicionada cumulativamente à cuba, em preparações diferentes. Os resultados foram avaliados comparando-se as potências

relaxantes de diplotropina na presença de TEA⁺ ou 4-AP com àquela obtida na ausência dos referidos bloqueadores.

3.2.4.3.3 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de iberiotoxina (IbTx) em útero isolado de rata

O útero era montado como descrito no item 3.2.4.1. Após o período de estabilização de 45 minutos, eram obtidas duas curvas de amplitudes similares, concentração-resposta simples com 10⁻² UI/mL de ocitocina em preparações diferentes, antes da última curva concentração-resposta era incubada, por um período de 10 minutos, a iberiotoxina, na concentração de 93 nM, um bloqueador seletivo dos canais para potássio de grande condutância ativados pelo Ca²⁺ (BK_{Ca}) (GALVEZ et al., 1990; VAN DER STAAY et al., 1999). Durante a fase tônica sustentada da segunda resposta, diplotropina era adicionada cumulativamente à cuba, em preparações diferentes. Os resultados foram avaliados comparando-se as potências relaxantes de diplotropina na presença da IbTx com àquela obtida na sua ausência (controle).

3.2.4.4 Avaliação do envolvimento da via de sinalização dos nucleotídeos cíclicos (AMP_c/GMP_c) no mecanismo de ação tocolítica da diplotropina

3.2.4.4.1 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, na ausência e na presença de aminofilina em útero isolado de rata

O útero era montado como descrito no item 3.2.4.1. Após o período de estabilização, duas curvas similares concentração-resposta simples com 60 mM de KCl eram obtidas. Em seguida, a preparação era incubada por 20 minutos com 10^{-4} M de aminofilina, inibidor inespecífico da enzima fosfodiesterase (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 2000) e, ainda na sua presença, uma nova contração induzida por KCl era obtida. Em seguida, diplotropina era adicionada cumulativamente sobre a fase tônica da contração. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo agente contrátil na ausência e na presença da aminofilina. Os valores de CE₅₀ foram calculados como descrito anteriormente.

3.2.5 Estudo Comparativo do Efeito Espasmolítico de Diplotropina e seu Derivado, DPTN-Sint. 1, em Músculos Lisos

3.2.5.1 Efeito de DPTN-Sint. 1 frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de acetilcolina ou de histamina em íleo isolado de cobaia

O íleo era montado como descrito no item 3.2.2.1.1. Após o período de estabilização, duas contrações fásicas de magnitudes similares, com intervalo de 15 minutos, eram obtidas com 10^{-6} M de acetilcolina ou de histamina, concentração sub-máxima que produz cerca de 70 % da resposta máxima e registradas através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal em um cilindro esfumaçado de um quimógrafo (Figura 9). DPTN-Sint. 1 era incubado por 15 minutos em preparações diferentes, e na presença deste, era induzida uma terceira contração utilizando um dos agonistas.

A inibição da resposta contrátil submáxima de acetilcolina e de histamina era avaliada por comparação das respostas antes (100 %) e após a adição de DPTN-Sint. 1 à cuba. O valor da concentração de DPTN-Sint. 1 que inibe 50 % da resposta máxima de um agonista (CI_{50}) era obtido por regressão não linear a partir dos valores individuais de inibição de cada concentração de DPTN-Sint. 1 e comparados com o valor de CI_{50} de diplotropina (LIMA, 2004).

3.2.5.2 Efeito de DPTN-Sint. 1 frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina ou por 10^{-6} M de carbacol em útero isolado de rata

O útero era montado como descrito no item 3.2.4.1. As curvas concentração-resposta simples para ocitocina e para carbacol eram obtidas, com repetição (2 vezes), da concentração máxima (60 – 70 % das respostas máximas) e registradas com o auxílio de alavanca isotônica de inscrição frontal em um cilindro esfumaçado de um quimógrafo (Figura 9). O derivado sintético era incubado por 15 minutos e a inibição da resposta submáxima à ocitocina e ao carbacol era avaliada como já descrito anteriormente.

3.2.5.3 Efeito de DPTN-Sint. 1 sobre o tônus espontâneo, bem como sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol em traquéia isolada de cobaia

As cobaias eram eutanasiadas por deslocamento cervical e tinham o abdômen aberto e dissecado, a traquéia era retirada e limpa, de modo a separá-la de todo o tecido conectivo e adiposo, sendo cortada longitudinalmente em linha oposta à camada muscular. O órgão era dividido em 4 segmentos, contendo de 4 a 5 anéis de cartilagem. Os segmentos eram suspensos individualmente através de hastes de aço inoxidável em cubas de vidro (6 mL), contendo solução nutritiva de Krebs e mantidos sob tensão de 1 grama. Estes segmentos eram mantidos a uma temperatura de 37 °C e permaneciam em repouso durante 60 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos. Após esse período de estabilização, eram realizados protocolos para avaliar o efeito de DPTN-Sint. 1 sobre o tônus espontâneo ou sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traquéia tanto na presença como na ausência de epitélio funcional.

A integridade do epitélio traqueal era verificada pela adição de ácido araquidônico (AA) à cuba na concentração de 10^{-4} M (TSCHIRHART et al., 1987) durante a fase tônica da primeira resposta induzida por carbacol, onde anéis que apresentavam relaxamentos superiores a 50 % (em relação a força de contração inicial) eram considerados com epitélio. Anéis de traquéia sem epitélio eram obtidos através da retirada do mesmo por atrito do lúmen do órgão com uma haste envolta com algodão e embebida com solução de Krebs.

A retirada do epitélio era confirmada pela adição de AA à cuba, caso não houvesse relaxamento ou se esse fosse inferior a 10 %, o anel era considerado sem epitélio. Os valores de CE_{50} e E_{max} na ausência (controle) e na presença do epitélio funcional eram obtidos por regressão não linear e comparados com os dados obtidos com diplotropina em estudos anteriores (LIMA, 2004).

3.2.5.4 Efeito de DPTN-Sint. 1 sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de fenilefrina em aorta isolada de rato

Os ratos eram eutanasiados por deslocamento cervical. O tórax do animal era aberto e dissecado, a aorta torácica era retirada cuidadosamente e anéis aórticos medindo de 2-3 mm eram obtidos livres de tecido conectivo e adiposo. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis eram suspensos individualmente por hastes de aço inoxidável conectadas a transdutores de força, em cubas de vidro (6 mL) contendo solução de Krebs, a 37 °C e aerados com carbogênio. As preparações eram estabilizadas por um período de 1 hora, durante o qual eram mantidas sob uma tensão de repouso de 1 grama. Durante esse período, a solução nutritiva era renovada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização, eram induzidas duas contrações de magnitudes similares com fenilefrina na concentração sub-máxima de 3×10^{-7} M, e consideradas como controle. A integridade do endotélio vascular era verificada após adição de acetilcolina (10^{-6} M) à cuba durante a fase tônica da primeira resposta induzida com fenilefrina (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Os anéis sem endotélio eram obtidos por retirada mecânica do mesmo, através do atrito sutil de uma haste metálica envolta com algodão e embebida com solução de Krebs na parede interna do vaso. Este tratamento não reduzia a reatividade do músculo liso. O endotélio vascular era considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentavam relaxamento induzido com acetilcolina igual ou superior a 50 % (em relação à contração inicial) e a retirada do endotélio era confirmada quando não havia relaxamento, ou se o mesmo fosse inferior a 10 % (AJAY; GILANI; MUSTAFA; 2003).

Após a obtenção de uma segunda contração induzida com fenilefrina e durante a fase tônica dessa segunda resposta, DPTN-Sint. 1 era adicionado de maneira cumulativa à cuba. O relaxamento era expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por fenilefrina e os valores de CE_{50} e E_{max} na ausência (controle) e na presença do endotélio eram obtidos por regressão não linear e comparados com os dados obtidos com diplotropina em estudos anteriores (LIMA, 2004).

3.2.6 Cálculo do logP

O valor do logP, o qual é um parâmetro satisfatório para prever o grau de lipossolubilidade de um molécula, foi calculado para a molécula do flavonóide diplotropina, utilizando-se o programa “Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris” V4.67 (© 1994-2005 ACD/Labs).

3.2.7 Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($\bar{x} \pm \text{e.p.m.}$) e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” de Student (não pareado) ou ANOVA “one way” seguido do teste de Bonferroni e os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Os valores de CE_{50} (concentração molar da substância que produz 50 % do seu efeito máximo) (JENKINSON et al., 1995) foram calculados por regressão não-linear para todos os experimentos realizados.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Graph-Pad Prism[®] versão 4.03 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

Foram utilizados os programas SpectraMax[®] (SPEX ARCM System Inc., Edison, NJ, USA) para aquisição dos dados em espectrofluorimetria de Ca^{2+} e BioMed[®] (BioData, João Pessoa, PB, Brasil) para aquisição de dados de tensão isométrica em órgãos isolados.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização Funcional do Mecanismo de Ação Espasmolítica de Diplotropina em Íleo Isolado de Cobaia

4.1.1 Avaliação da participação dos canais para K^+ no relaxamento produzido por diplotropina em íleo isolado de cobaia

4.1.1.1 Efeito de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por acetilcolina na ausência e na presença da 4-aminopiridina em íleo isolado de cobaia

Diplotropina relaxou o íleo pré-contraído com 10^{-6} M de acetilcolina tanto na ausência quanto na presença de 3×10^{-4} M de 4-AP ($CE_{50} = 6,5 \pm 3,4 \times 10^{-6}$ M), não havendo diferença estatística significativa entre os valores de CE_{50} , quando comparado ao valor obtido para diplotropina na ausência do bloqueador ($CE_{50} = 2,05 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M) (Gráfico 1). O E_{max} atingido por diplotropina é de $85 \pm 8,0$ %, com tempo médio de relaxamento igual a 180 ± 10 minutos. Tal efeito é reversível após 30 minutos da retirada de diplotropina da cuba.

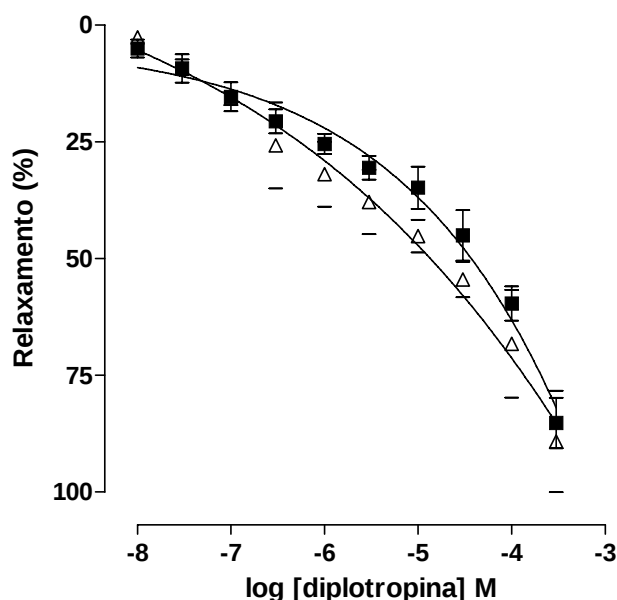


Gráfico 1. Efeito de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por 10^{-6} M de acetilcolina, na ausência (■, $n = 7$) e na presença (Δ , $n = 3$) de 3×10^{-4} M de 4-AP, em íleo isolado de cobaia. Os símbolos e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente.

4.1.1.2 Efeito de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por acetilcolina na ausência e na presença da iberiotoxina (IbTx) em íleo isolado de cobaia

Diplotropina relaxou o íleo de cobaia pré-contraído com 10^{-6} M de acetilcolina na presença de 93 nM de IbTx ($CE_{50} = 2,1 \pm 0,04 \times 10^{-4}$ M) (Gráfico 3), porém com uma potência cerca de 9 vezes menor quando comparada ao relaxamento induzido por diplotropina na ausência do bloqueador ($CE_{50} = 2,4 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M) (Gráficos 2 e 3). Diplotropina, mesmo na concentração 10^{-3} M, não atinge o E_{max} quando na presença do bloqueador seletivo dos BK_{Ca} , IbTx, em relação ao observado quando na ausência desse bloqueador (controle). O tempo médio de relaxamento induzido por diplotropina na presença de IbTx é de 220 ± 10 minutos. O efeito observado é reversível após 45 minutos da retirada de diplotropina da cuba.

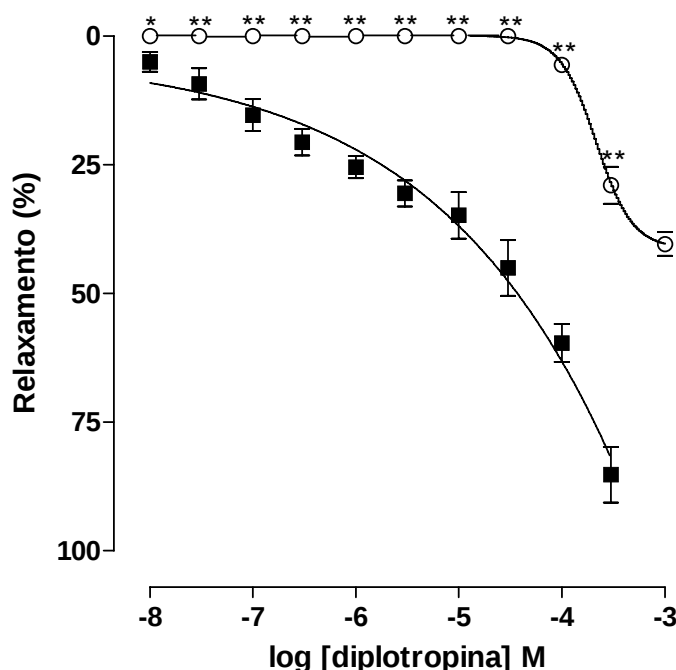


Gráfico 2. Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de acetilcolina, na ausência (■, $n = 7$) e na presença (○, $n = 3$) de 93 nM de IbTx, em íleo isolado de cobaia. Os símbolos e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente. ANOVA "one-way", seguido do teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ (ACh x ACh + IbTx).

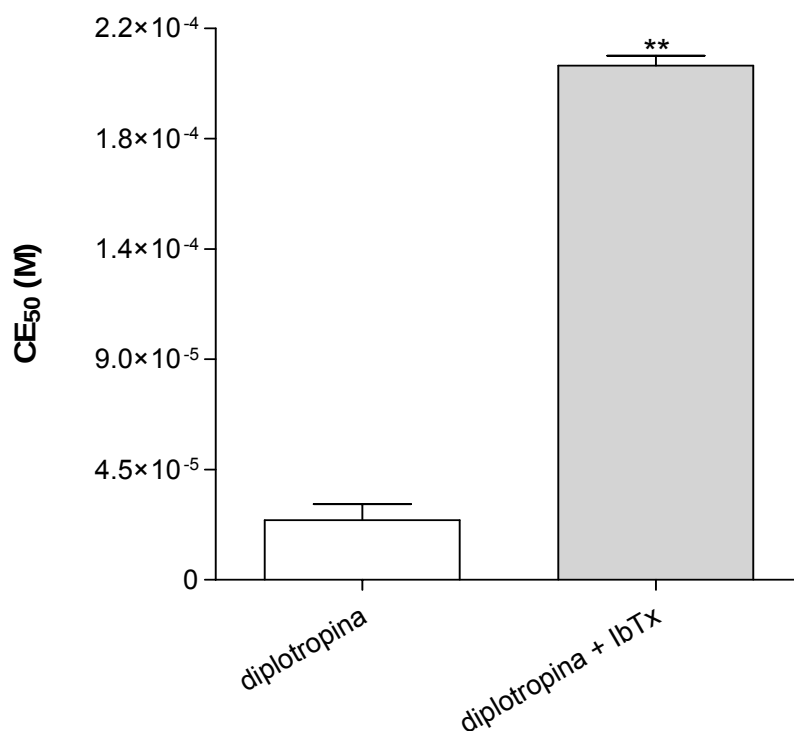


Gráfico 3. Valores da CE_{50} de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por acetilcolina, na ausência ($n = 7$) e na presença de 93 nM de IbTx ($n = 3$). As colunas e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente. $**p < 0,001$ (ACh x IbTx + ACh; teste “t” de Student).

4.2 Caracterização do mecanismo de ação de diplotropina em nível celular

4.2.1 Investigação do efeito de diplotropina sobre a $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos de íleo de cobaia (determinação fluorimétrica da $[Ca^{2+}]_i$)

O flavonóide diplotropina, na concentração de 3×10^{-4} M, reduziu significativamente (aproximadamente 25 %) a razão de fluorescência basal (F340/F380 nm) do fluoróforo de Ca^{2+} (fura 2), dessa forma, indicando que diplotropina promove redução da $[Ca^{2+}]_i$, em miócitos isolados de íleo de cobaia, mesmo quando nos seus níveis basais (Figura 12 e Gráfico 4). Tal redução da razão de fluorescência requer um tempo médio de 20 segundos para que se atinja o efeito máximo.

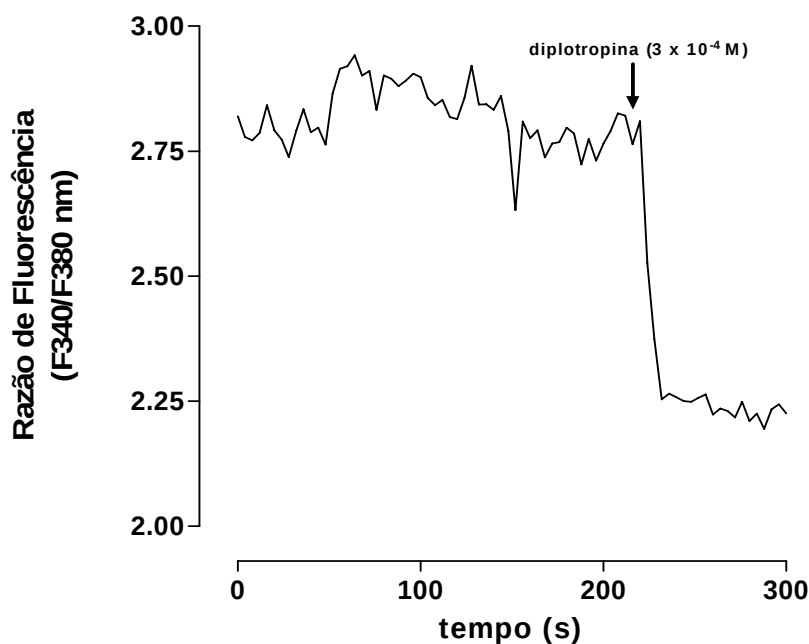


Figura 12. Registro original do curso temporal do efeito de diplotropina ($3 \times 10^{-4} \text{ M}$) sobre a fluorescência basal dependente de Ca^{2+} em miócitos isolados de íleo de cobaia ($n = 2$).

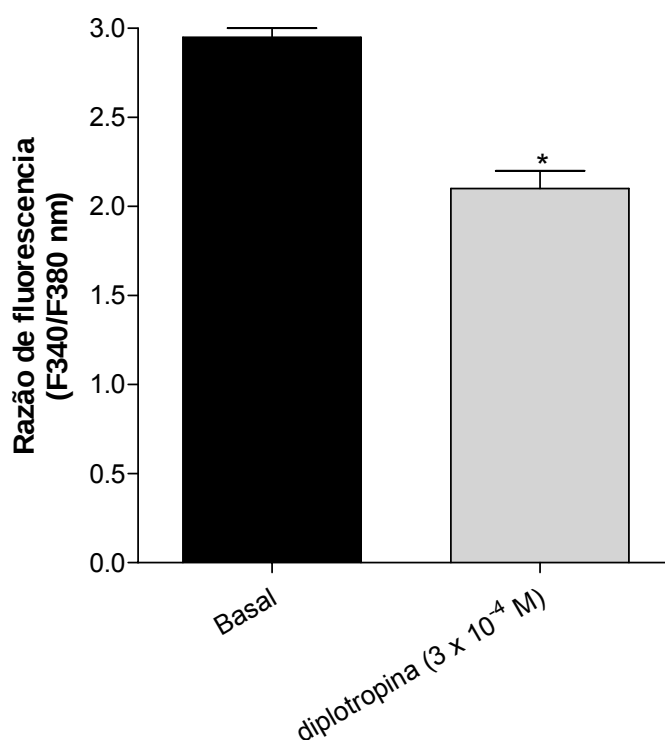


Gráfico 4. Efeito de diplotropina sobre a fluorescência basal dependente de Ca^{2+} em miócitos isolados de íleo de cobaia. Colunas e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente ($n = 2$). * $p < 0,05$ (teste "t" de Student não-pareado: basal x diplotropina [$3 \times 10^{-4} \text{ M}$]).

Também foi possível observar que diplotropina, nas concentrações 10^{-4} e 3×10^{-4} M, foi capaz de reduzir a razão de fluorescência do fura 2 (F340/F380 nm) em miócitos de íleo de cobaia, estimulados com 10^{-6} M de acetilcolina (Figura 13).

A adição de 10^{-4} M de diplotropina reduziu significativamente a razão de fluorescência para níveis muito abaixo do basal, porém quando essa concentração foi elevada para 3×10^{-4} M a razão de fluorescência foi reduzida a níveis ainda menores, levando um tempo médio de 2,5 minutos para alcançar este efeito (Figura 13).

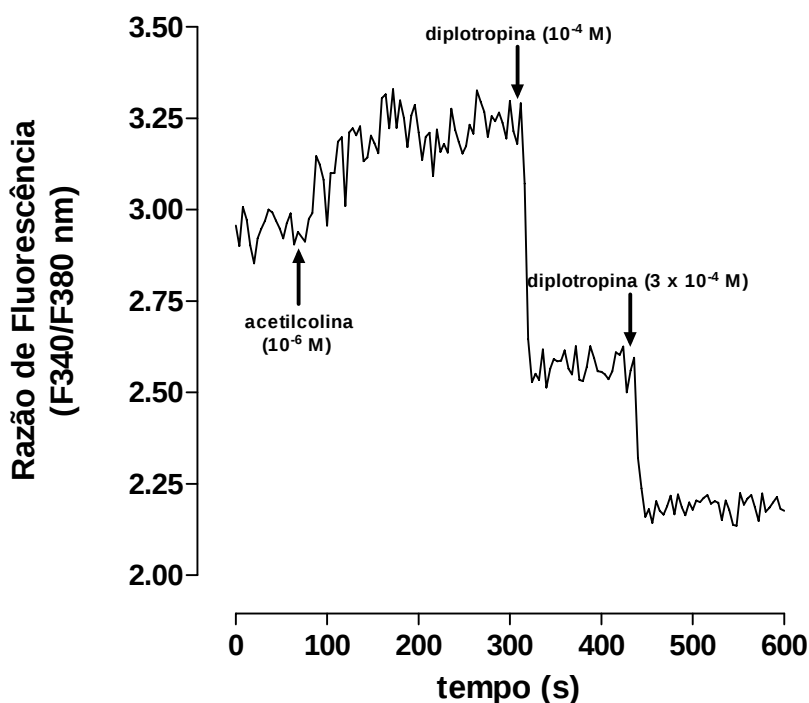


Figura 13. Registro original representativo do curso temporal do efeito de diplotropina (10^{-4} e 3×10^{-4} M) sobre a fluorescência máxima dependente de Ca^{2+} em miócitos isolados de íleo de cobaia, após a adição de acetilcolina (10^{-6} M, $n = 3$).

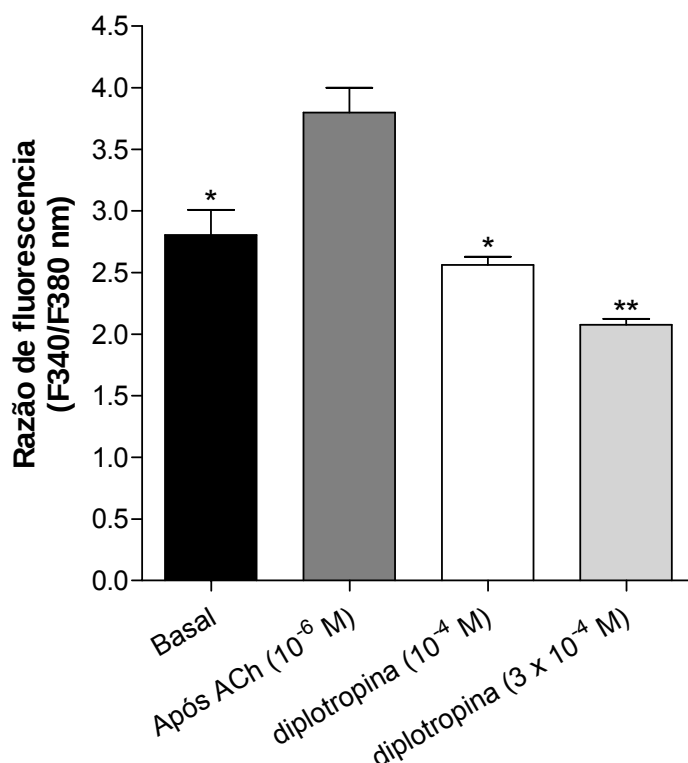


Gráfico 5. Efeito de diplotropina sobre a fluorescência máxima dependente de Ca^{2+} em miócitos isolados de íleo de cobaia, após a adição de 10^{-6} M de acetilcolina. Colunas e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente ($n = 3$). * $p < 0,05$ (teste “t” de Student não-pareado: basal x ACh e ACh x diplotropina [10^{-4} M]) e ** $p < 0,001$ (teste “t” de Student não-pareado: ACh x diplotropina [3×10^{-4} M]).

Baseado nos resultados apresentados acima, foi possível observar que diplotropina tanto na concentração 10^{-4} M, separadamente, como nas concentrações 10^{-4} e 3×10^{-4} M reduziu o aumento da fluorescência induzida por 10^{-6} M de acetilcolina (Gráfico 4) a níveis inferiores ao basal (antes da aplicação da acetilcolina) em miócitos isolados de íleo de cobaia (Figuras 12 e 13, Gráfico 4).

4.3 Avaliação do Mecanismo de Ação Tocolítica de Diplotropina

4.3.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por ocitocina em útero isolado de rata

Diplotropina, nas concentrações de 10^{-4} e 3×10^{-4} M, não antagonizou as contrações induzidas cumulativamente à ocitocina, o que foi evidenciado pela ausência de desvio significativo para a direita das curvas cumulativas à ocitocina, como se pode observar claramente no gráfico 6.

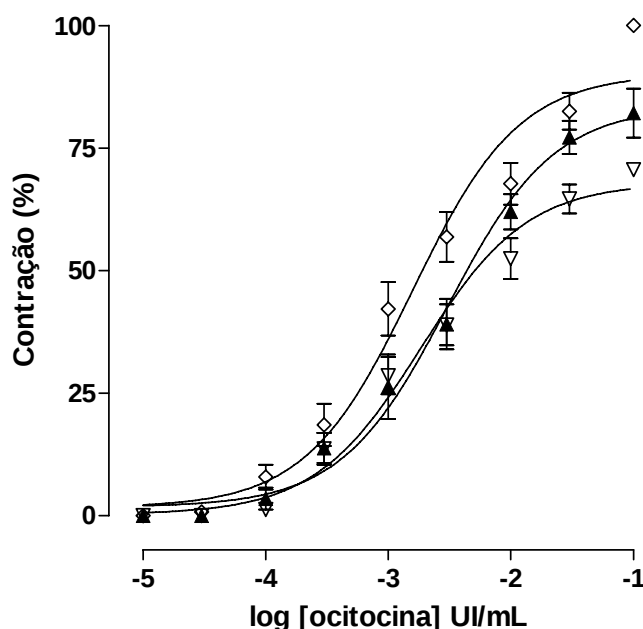


Gráfico 6. Efeito de diplotropina frente às curvas concentração-resposta cumulativas à ocitocina em útero isolado de rata ($n = 4$). Os símbolos e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente. Controle (◇); diplotropina: 10^{-4} M (▲), 3×10^{-4} M (▽).

4.3.2 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina em útero isolado de rata

Quando adicionado de maneira cumulativa (10^{-8} e 10^{-3} M), o flavonóide diplotropina relaxou, de maneira dependente de concentração, o útero pré-contráido com ocitocina (Figura 14 e Gráfico 7), apresentando uma CE_{50} de $1,7 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M. Sendo que o valor de $E_{max} = 80 \pm 7,5 \%$ foi atingido apenas após a concentração de 10^{-3} M de diplotropina. O tempo médio de relaxamento foi de 195 ± 5 minutos, sendo reversível após 30 minutos da remoção de diplotropina do banho.

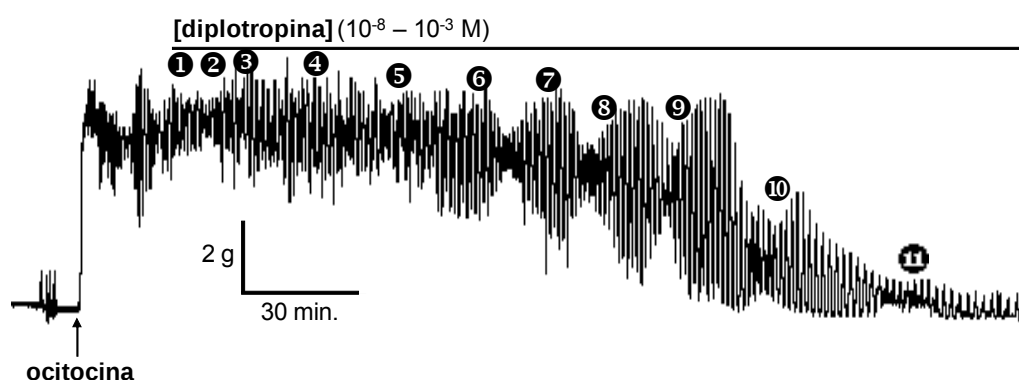


Figura 14. Registro original representativo do efeito tocolítico de diplotropina sobre a fase tônica da contração induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina em útero isolado de rata. Os números representam os pontos, durante o curso temporal do efeito tocolítico, onde o flavonóide diplotropina foi adicionado nas seguintes concentrações (M): (1) 10^{-8} , (2) 3×10^{-8} , (3) 10^{-7} , (4) 3×10^{-7} , (5) 10^{-6} , (6) 3×10^{-6} , (7) 10^{-5} , (8) 3×10^{-5} , (9) 10^{-4} , (10) 3×10^{-4} e (11) 10^{-3} .

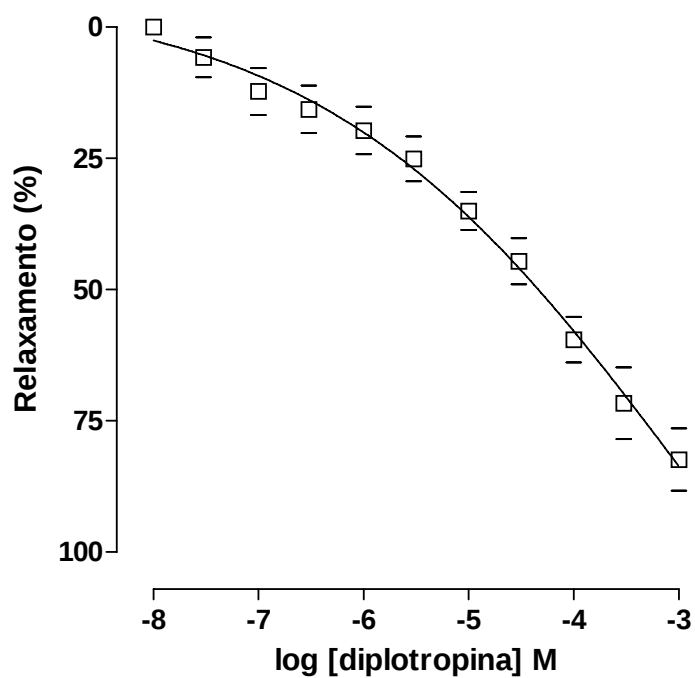


Gráfico 7. Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina em útero isolado de rata ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente.

4.3.3 Avaliação da participação dos canais para cálcio operados por voltagem (Ca_v)

4.3.3.1 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl em útero isolado de rata

A adição cumulativa do flavonóide diplotropina (10^{-7} - 3×10^{-4} M) promoveu relaxamento do útero pré-contraído com 60 mM de KCl de maneira dependente de concentração, o que pode ser evidenciado pelo valor de R^2 ($0,98 \pm 0,001$), apresentando valor de $\text{CE}_{50} = 2,1 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M. O tempo médio para que diplotropina promovesse relaxamento máximo ($E_{\text{max}} = 85 \pm 2,5$ %) foi de aproximadamente 220 ± 5 minutos (Gráfico 8).

Este efeito foi reversível após 30 minutos da retirada de diplotropina da cuba.

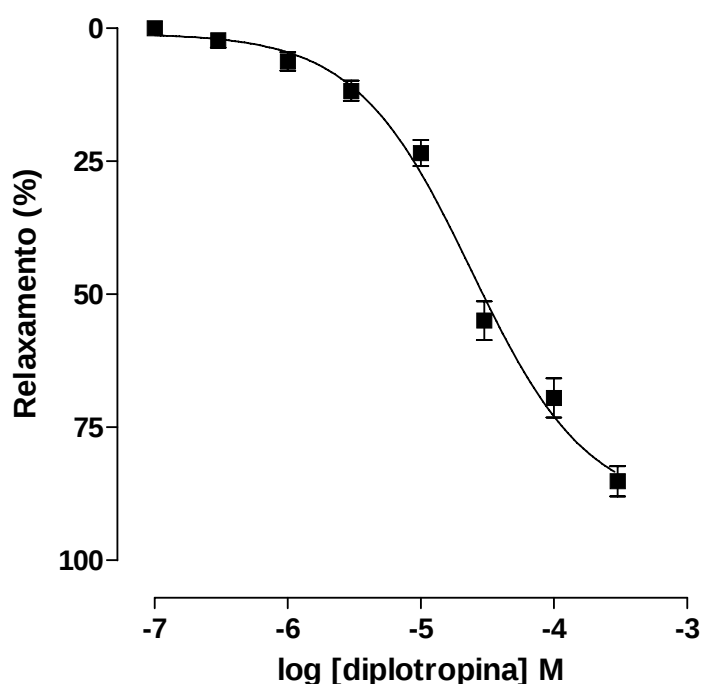


Gráfico 8. Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por KCl (60 mM) em útero isolado de rata ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente.

4.3.3.2 Efeito de diplotropina sobre a contração induzida por Ca^{2+} em meio despolarizante nominalmente sem cálcio

Diploptropina, nas concentrações 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} não antagonizou as contrações induzidas cumulativamente ao CaCl_2 em meio despolarizado com 60 mM de KCl e nominalmente sem Ca^{2+} em útero isolado de rata. O que foi evidenciado pela ausência de desvio significativo da curva controle ($\text{CE}_{50} = 5,1 \pm 1,4 \times 10^{-4}$ M) para a direita, como pode ser observado pelos valores de CE_{50} após 3×10^{-5} M ($0,9 \pm 0,2 \times 10^{-3}$ M), 10^{-4} M ($1,1 \pm 0,2 \times 10^{-3}$ M) e 3×10^{-4} M ($1,6 \pm 0,4 \times 10^{-3}$ M) e ainda por não ter havido redução do E_{max} (Gráfico 9).

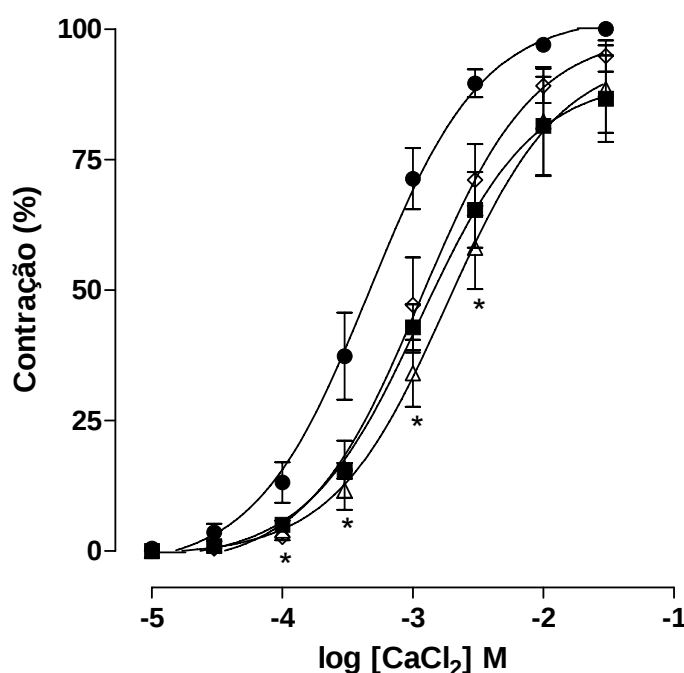


Gráfico 9. Efeito de diplotropina frente às curvas cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} , em útero isolado de rata. Os símbolos e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m. de 3 experimentos. ANOVA “one way” seguido do teste de Bonferroni (Controle [●] x diplotropina [M]: 3×10^{-4} [△]). * $p < 0,05$ (Teste “t” de Student, controle x presença de diplotropina).

4.3.4 Avaliação do envolvimento dos canais para potássio no mecanismo de ação tocolítica de diplotropina

4.3.4.1 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl) em útero isolado de rata

Diplotropina relaxou, de maneira dependente de concentração (Figura 15 B e Gráfico 10), o útero pré-contraído com 10^{-2} UI/mL de ocitocina, tanto na ausência ($CE_{50} = 1,7 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M) como na presença de 5 mM de CsCl ($CE_{50} = 3,8 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M). A potência relaxante do flavonóide diplotropina na presença de CsCl, bloqueador inespecífico dos canais para K^+ , diminuiu cerca de duas vezes (Gráfico 11). A figura 15 A, mostra a curva controle na ausência de diplotropina, demonstrando que a contração não se dissipa com o tempo, permanecendo sustentada durante todo o período do experimento. O tempo médio de relaxamento foi de 195 ± 5 minutos, sendo reversível após 30 minutos da remoção de diplotropina do banho.

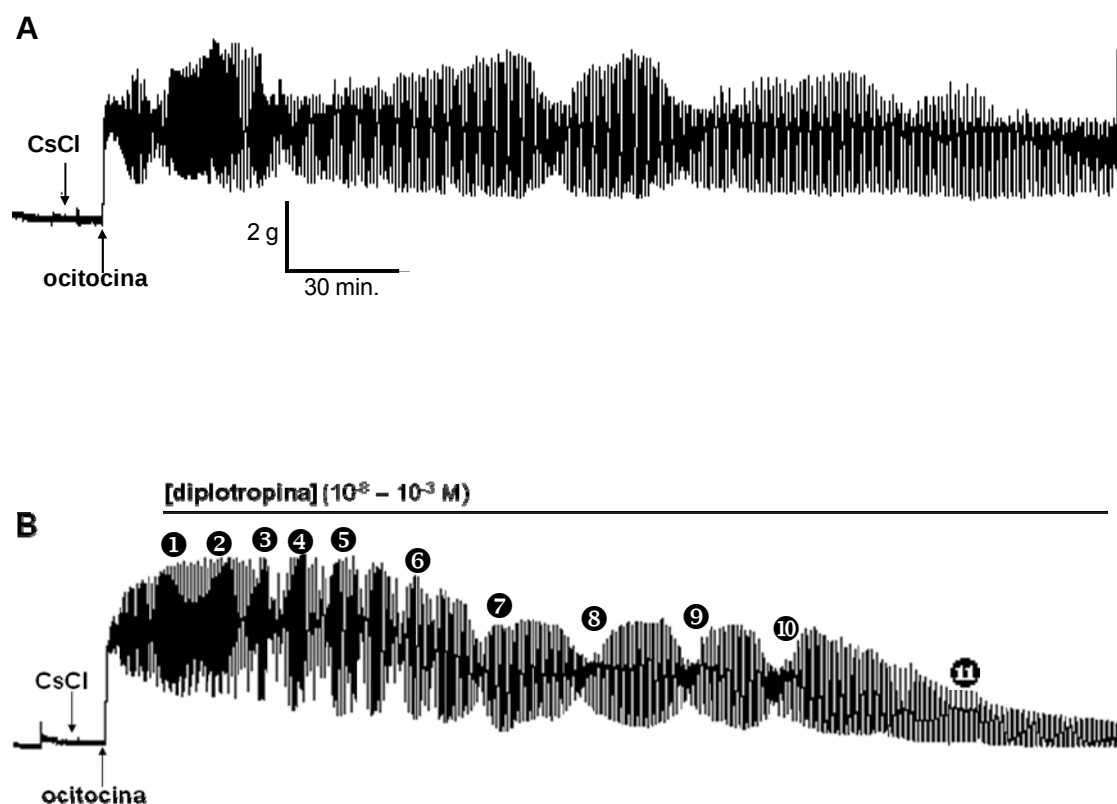


Figura 15. (A) Registro original representativo da contração induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na presença de 5 mM de CsCl (controle). (B) Efeito relaxante de diplotropina sobre a fase tônica da contração induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na presença de 5 mM de CsCl em útero isolado de rata. Os números representam os pontos, durante o curso temporal do efeito tocolítico, onde o flavonóide diplotropina foi adicionado nas seguintes concentrações (M): (1) 10^{-8} , (2) 3×10^{-8} , (3) 10^{-7} , (4) 3×10^{-7} , (5) 10^{-6} , (6) 3×10^{-6} , (7) 10^{-5} , (8) 3×10^{-5} , (9) 10^{-4} , (10) 3×10^{-4} e (11) 10^{-3} .

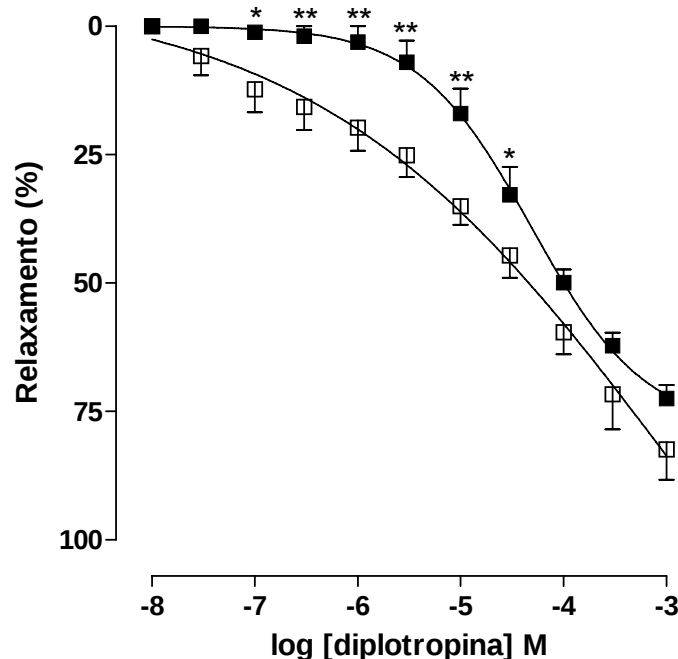


Gráfico 10. Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (□, $n = 5$) e na presença de 5 mM de CsCl (■, $n = 6$) em útero isolado de rata. Os símbolos e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, $*p < 0,05$ e $**p < 0,001$ (Ocitocina x Ocitocina + CsCl).

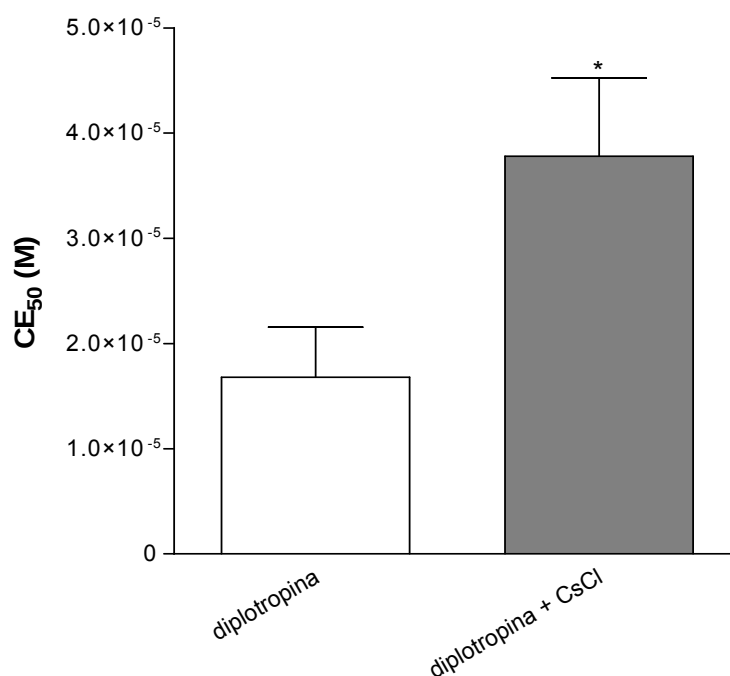


Gráfico 11. Valores da CE₅₀ de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por ocitocina, na ausência ($n = 5$) e na presença de 5 mM de CsCl ($n = 6$). As colunas e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente. $*p < 0,05$ (ocitocina x CsCl + ocitocina; teste “t” de Student).

4.3.4.2 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de tetraetilamônio (TEA⁺) ou 4-aminopiridina (4-AP) em útero isolado de rata

Diplotropina relaxou, de maneira dependente de concentração (Figura 16 B e Gráfico 12), o útero pré-contráido com 10^{-2} UI/mL de ocitocina tanto na ausência ($CE_{50} = 1,7 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M) como na presença de 1 mM de TEA⁺ ($CE_{50} = 5,9 \pm 1,5 \times 10^{-5}$ M), sem atingir 100 % de relaxamento. A potência relaxante do flavonóide diplotropina na presença do bloqueador dos BK_{Ca} diminuiu cerca de 3,5 vezes (Gráfico 13). A figura 16 A, mostra a curva controle na ausência de diplotropina, demonstrando que a contração não se dissipa com o tempo, durante todo o decorrer do experimento. O tempo médio de relaxamento foi de 175 ± 5 minutos, sendo reversível após 30 minutos da remoção de diplotropina do banho.

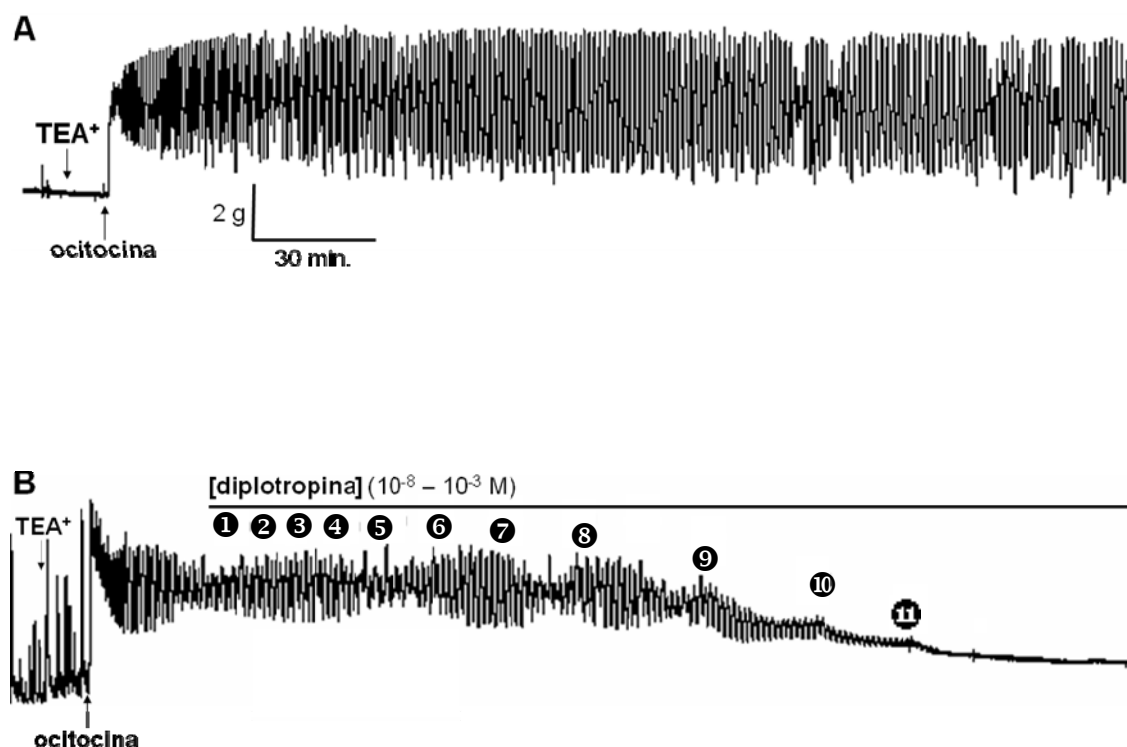


Figura 16. (A) Registro original representativo da contração induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na presença de 1 mM de TEA⁺ (controle). (B) Efeito relaxante de diplotropina sobre a fase tônica da contração induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na presença de 1 mM de TEA⁺ em útero isolado de rata. Os números representam os pontos, durante o curso temporal do efeito tocolítico, onde o flavonóide diplotropina foi adicionado nas seguintes concentrações (M): (1) 10^{-8} , (2) 3×10^{-8} , (3) 10^{-7} , (4) 3×10^{-7} , (5) 10^{-6} , (6) 3×10^{-6} , (7) 10^{-5} , (8) 3×10^{-5} , (9) 10^{-4} , (10) 3×10^{-4} e (11) 10^{-3} .

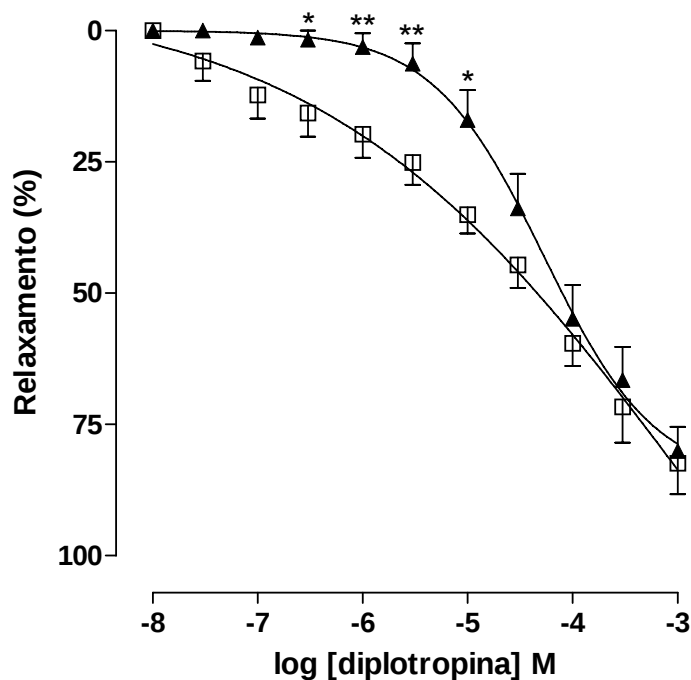


Gráfico 12. Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência ($\square$, $n = 5$) e na presença de 1 mM de TEA^+ ($\blacktriangle$, $n = 5$) em útero isolado de rata. Os símbolos e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, $*p < 0,05$ e $**p < 0,001$ (Ocitocina x Ocitocina + TEA^+).

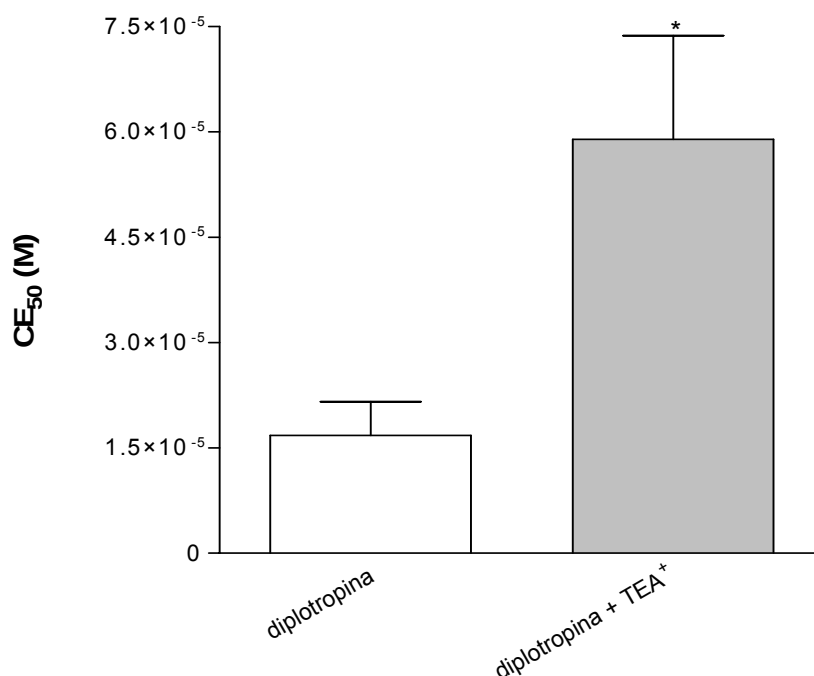


Gráfico 13. Valores da CE_{50} de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por ocitocina, na ausência ($n = 5$) e na presença de 1 mM de TEA^+ ($n = 5$). As colunas e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente. $*p < 0,05$ (ocitocina x TEA^+ + ocitocina; teste “t” de Student).

De forma semelhante, diplotropina também relaxou, de maneira dependente de concentração e eqüipotente (Figura 17 e Gráfico 14), o útero pré-contráido com 10^{-2} UI/mL de ocitocina tanto na ausência ($CE_{50} = 1,7 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M) como na presença de 0,3 mM de 4-AP ($CE_{50} = 2,3 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M). Porém, neste caso, o bloqueador dos K_v não foi capaz de deslocar para a direita a curva de relaxamento induzida pelo flavonóide diplotropina. O tempo médio de relaxamento foi de 200 ± 10 minutos, sendo reversível após 30 minutos da remoção de diplotropina do banho.

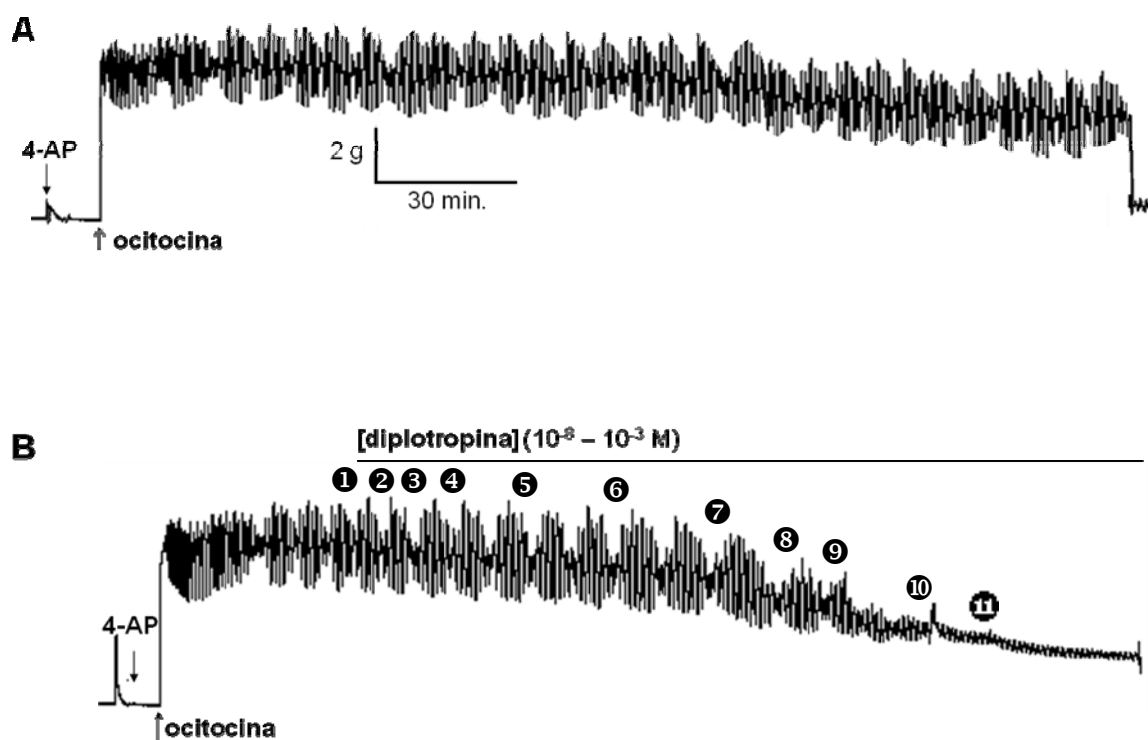


Figura 17. (A) Registro original representativo da contração induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na presença de 0,3 mM de 4-AP (controle). (B) Efeito relaxante de diplotropina sobre a fase tônica da contração induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na presença de 0,3 mM de 4-AP em útero isolado de rata. Os números representam os pontos, durante o curso temporal do efeito tocolítico, onde o flavonóide diplotropina foi adicionado nas seguintes concentrações (M): (1) 10^{-8} , (2) 3×10^{-8} , (3) 10^{-7} , (4) 3×10^{-7} , (5) 10^{-6} , (6) 3×10^{-6} , (7) 10^{-5} , (8) 3×10^{-5} , (9) 10^{-4} , (10) 3×10^{-4} e (11) 10^{-3} .

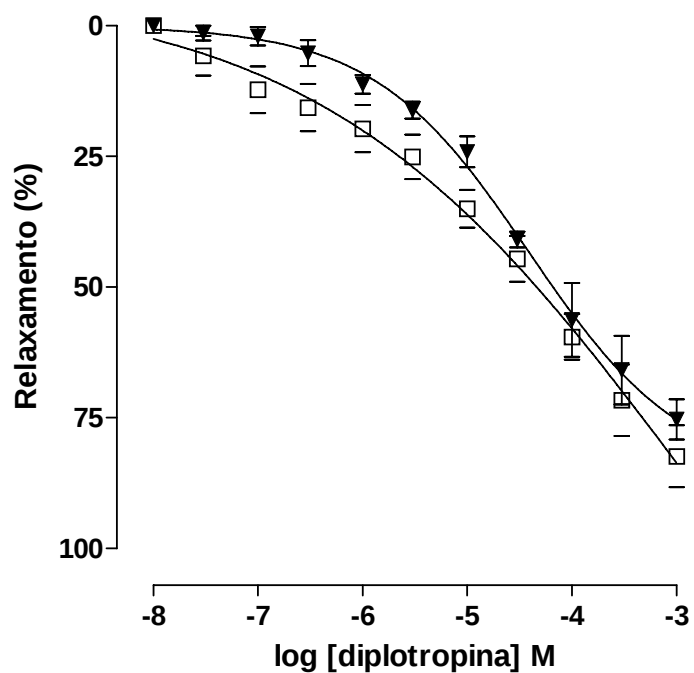


Gráfico 14. Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (□, $n = 5$) e na presença de 0,3 mM de 4-AP (▼, $n = 4$) em útero isolado de rata. Os símbolos e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente.

4.3.4.3 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de iberiotoxina (IbTx) em útero isolado de rata

Diploptropina, quando aplicada cumulativamente (10^{-8} – 10^{-3} M) relaxou, (Figura 18 e Gráfico 15), o útero pré-contraído com 10^{-2} UI/mL de ocitocina tanto na ausência, $E_{\max} = 80 \pm 4,0 \%$, ($CE_{50} = 1,9 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M) quanto na presença de 93 nM de IbTx ($CE_{50} = 9,0 \pm 3,1 \times 10^{-5}$ M), não atingindo o efeito máximo ($E_{\max} = 50 \pm 12,0 \%$). O bloqueador seletivo dos BK_{Ca} foi capaz de deslocar para a direita a curva de relaxamento induzido por diplotropina, aumentando o valor de CE_{50} em, aproximadamente, 5 vezes (Gráfico 16). O tempo médio de relaxamento foi de 200 ± 10 minutos, sendo reversível após 30 minutos da remoção de diplotropina do banho.

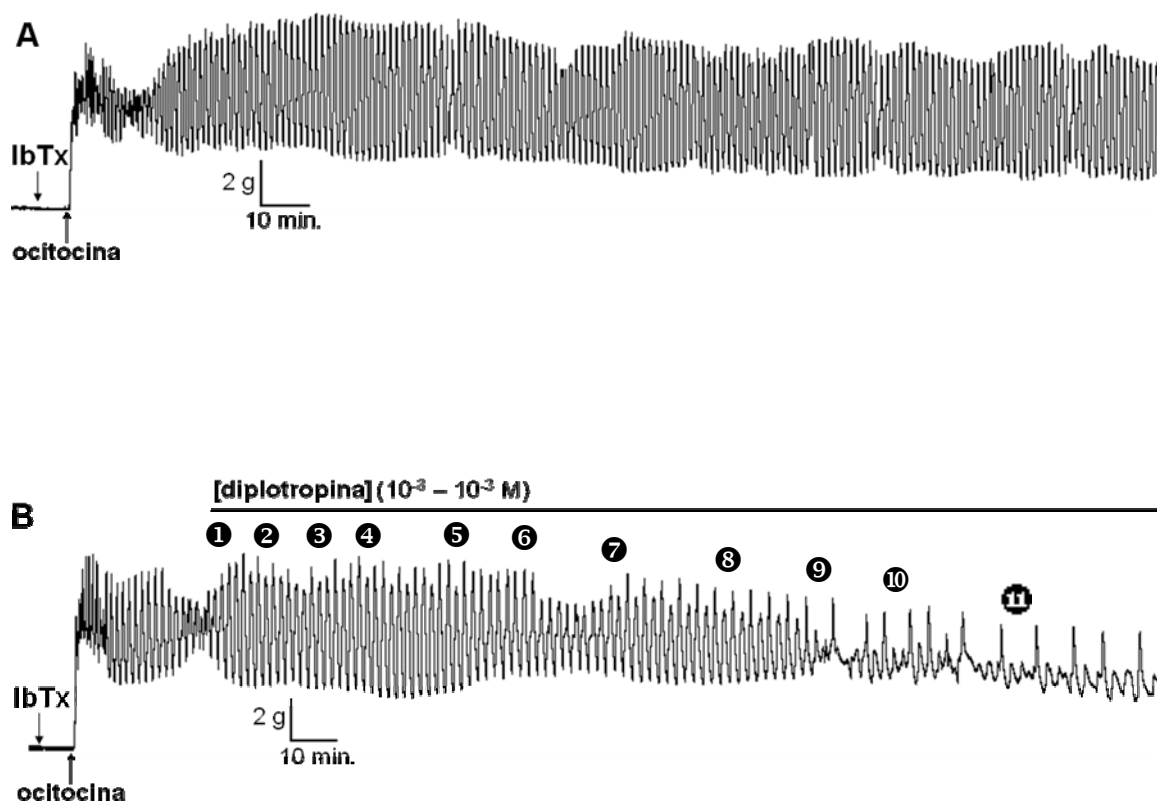


Figura 18. (A) Registro original representativo da contração induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na presença de 93 nM de IbTx (controle). (B) Efeito relaxante de diplotropina sobre a fase tônica da contração induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na presença de 93 nM de IbTx em útero isolado de rata. Os números representam os pontos, durante o curso temporal do efeito tocolítico, onde o flavonóide diplotropina foi adicionado nas seguintes concentrações (M): (1) 10^{-8} , (2) 3×10^{-8} , (3) 10^{-7} , (4) 3×10^{-7} , (5) 10^{-6} , (6) 3×10^{-6} , (7) 10^{-5} , (8) 3×10^{-5} , (9) 10^{-4} , (10) 3×10^{-4} e (11) 10^{-3} .

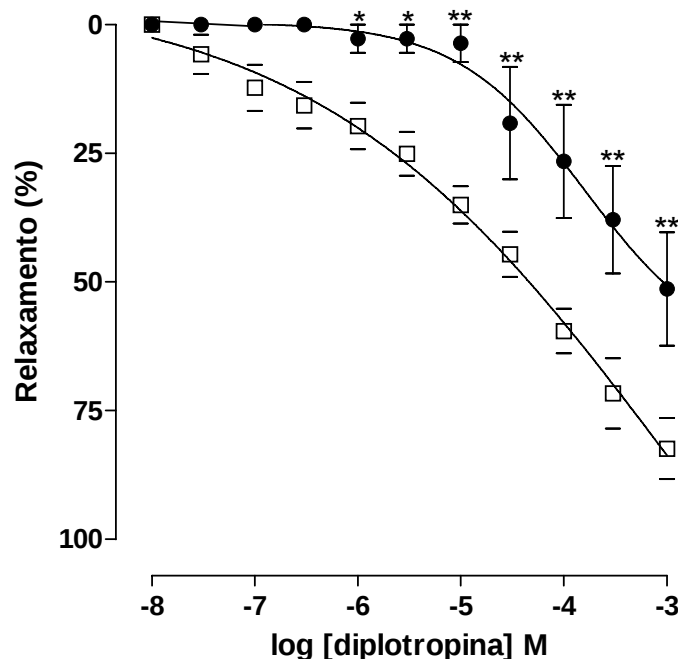


Gráfico 15. Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (□, $n = 5$) e na presença de 93 nM de IbTx (●, $n = 3$) em útero isolado de rata. Os símbolos e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, $*p < 0,05$ e $**p < 0,001$ (Ocitocina x Ocitocina + IbTx).

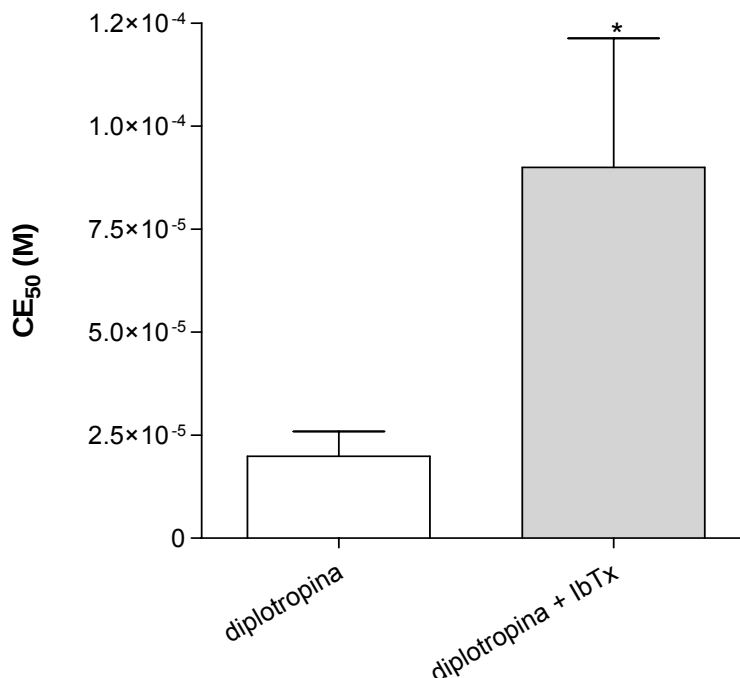


Gráfico 16. Valores da CE_{50} de diplotropina sobre a fase tônica das contrações induzidas por ocitocina, na ausência ($n = 5$) e na presença de 93 nM de IbTx ($n = 3$). As colunas e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente. $*p < 0,05$ (ocitocina x IbTx + ocitocina; teste “t” de Student).

4.3.5 Avaliação do envolvimento da via de sinalização dos nucleotídeos cíclicos (AMP_c/GMP_c) no mecanismo de ação tocolítica de diplotropina

4.3.5.1 Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, na ausência e na presença de aminofilina em útero isolado de rata

Diplotropina relaxou, de maneira dependente de concentração (10^{-8} – 10^{-3} M), o útero pré-contraído com 60 mM de KCl (Figura 19 B), tanto na ausência ($CE_{50} = 2,1 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) como na presença de 10^{-4} M de aminofilina ($CE_{50} = 1,3 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M), não havendo diferença significativa entre os valores de CE_{50} (Gráfico 17). O tempo médio de relaxamento foi de 300 ± 10 minutos, sendo reversível após 45 minutos da remoção de diplotropina do banho.

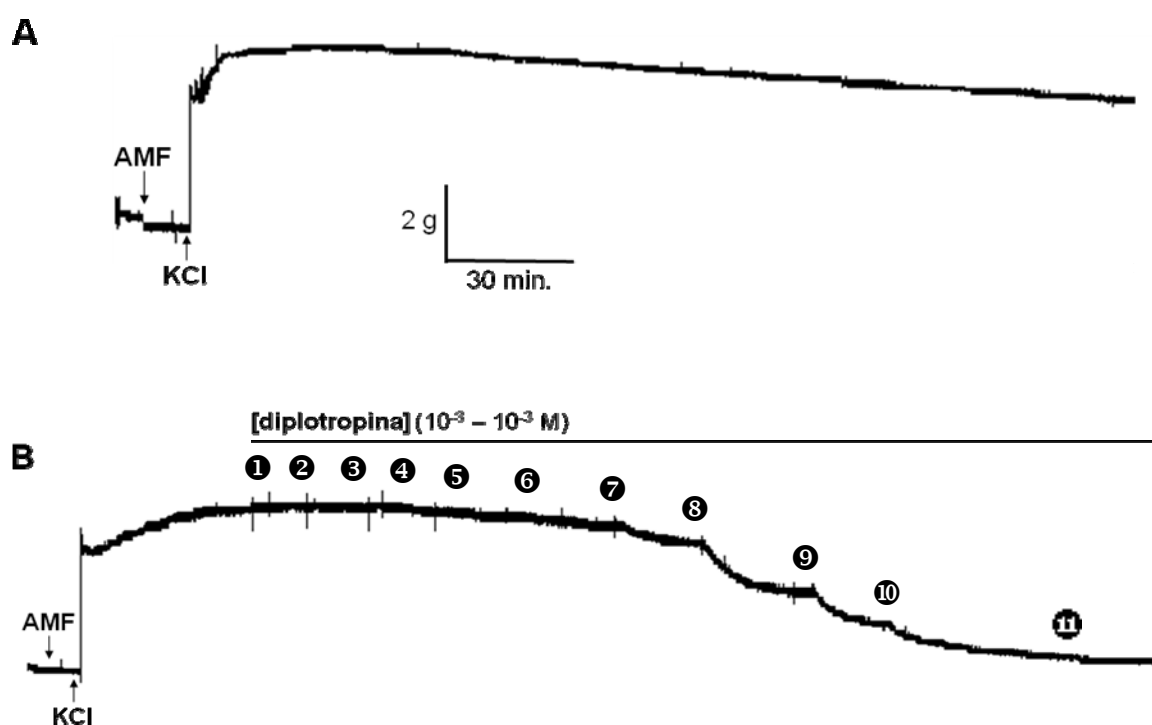


Figura 19. (A) Registro original representativo da contração induzida por 60 mM de KCl na presença de 10^{-4} M de aminofilina (AMF) (controle). (B) Efeito relaxante de diplotropina sobre a fase tônica da contração induzida por KCl na presença de 10^{-4} M de AMF em útero isolado de rata. Os números representam os pontos, durante o curso temporal do efeito tocolítico, onde o flavonóide diplotropina foi adicionado nas seguintes concentrações (M): (1) 10^{-8} , (2) 3×10^{-8} , (3) 10^{-7} , (4) 3×10^{-7} , (5) 10^{-6} , (6) 3×10^{-6} , (7) 10^{-5} , (8) 3×10^{-5} , (9) 10^{-4} , (10) 3×10^{-4} e (11) 10^{-3} .

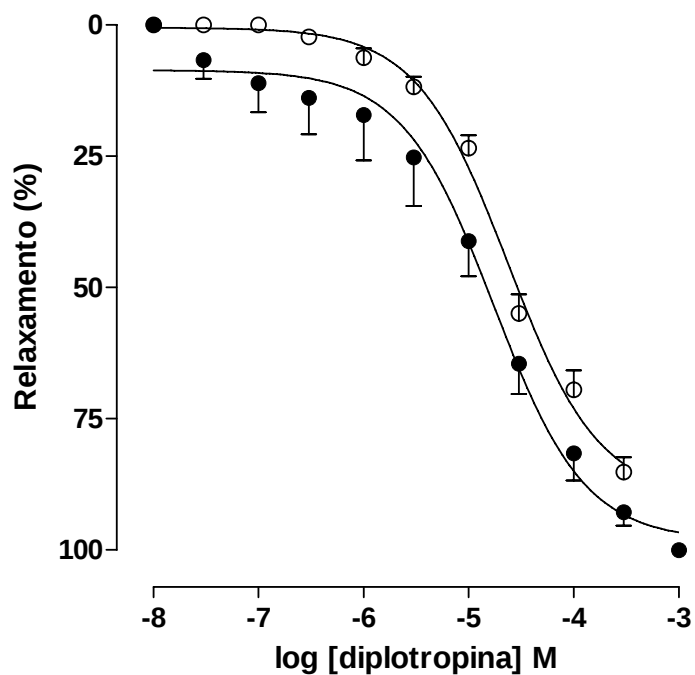


Gráfico 17. Efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl, na ausência (○) e na presença (●) de 10^{-4} M de AMF, em útero isolado de rata. Os símbolos e as barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m., respectivamente de 3 experimentos.

4.4 Estudo da Relação Entre a Modificação Estrutural e o Efeito Espasmolítico de DPTN-Sint. 1

Após testar o efeito de diplotropina em modelos de músculos lisos isolados (aorta de rato, íleo e traquéia de cobaia e útero de rata) e de posse de resultados significantes em íleo de cobaia e útero de rata, propôs-se aos nossos colaboradores do Setor de Química um estudo de relação entre modificação estrutural na molécula de diplotropina e atividade farmacológica do derivado sintético. Diante disso, foi obtido o derivado sintético, DPTN-Sint. 1, (Figura 4), a partir de modificações estruturais no composto natural, diplotropina, utilizando-se técnicas de síntese orgânica e de transformações químicas orgânicas com o objetivo de aumentar a potência da atividade farmacológica mais evidente no flavonóide diplotropina, que é a de induzir relaxamento em íleo isolado de cobaia.

4.4.1 Efeito de DPTN-Sint. 1 frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de acetilcolina ou de histamina em íleo isolado de cobaia

Inicialmente, devido aos resultados anteriormente observados com diplotropina em íleo isolado de cobaia, testamos o possível efeito espasmolítico do derivado sintético, a quinona codificada como DPTN-Sint. 1. Neste modelo de músculo liso foi possível observar que, ao contrário do que anteriormente havia sido obtido com o flavonóide diplotropina, a incubação de DPTN-Sint. 1 até a concentração 3×10^{-4} M não promoveu inibição das contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de acetilcolina ou histamina (Quadro 1).

4.4.2 Efeito de DPTN-Sint. 1 sobre o tônus espontâneo, bem como sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol em traquéia isolada de cobaia

DPTN-Sint. 1, até a concentração de 3×10^{-4} M, não apresentou efeito relaxante significativo sobre o tônus espontâneo da traquéia de cobaia porém, relaxou, de maneira dependente de concentração (10^{-8} - 3×10^{-4} M), a traquéia de cobaia pré-contraída com 10^{-6} M de carbacol, tanto na presença

($CE_{50} = 4,2 \pm 0,8 \times 10^{-5} \text{ M}$) como na ausência ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,5 \times 10^{-5} \text{ M}$) de epitélio funcional (Gráfico 18), com tempo médio de relaxamento de 150 ± 5 minutos. Este efeito foi reversível após 30 minutos da retirada de DPTN-Sint. 1 da cuba.

Tomando como referência os valores de CE_{50} apresentados por DPTN-Sint. 1, tanto na presença como na ausência de epitélio funcional, verificou-se que não houve diferença significativa entre estes porém, o valor de $E_{\max}$ foi significativamente reduzido ($E_{\max} = 78 \pm 6,0 \%$) quando os anéis de traquéia apresentavam epitélio íntegro.

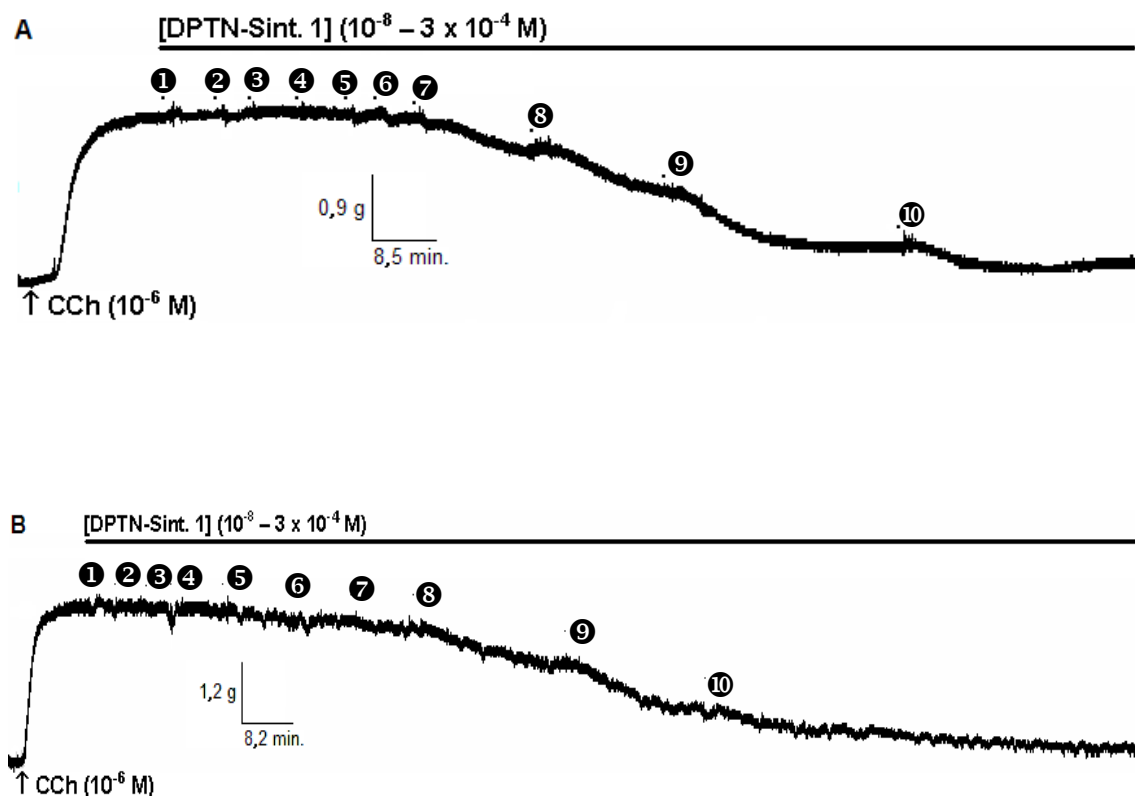


Figura 20. Registro original representativo do efeito relaxante de DPTN-Sint. 1 sobre a fase tônica da contração induzida por 10^{-6} M de carbacol em traquéia isolada de cobaia, na presença (**A**) e na ausência (**B**) de epitélio funcional. Os números representam os pontos, durante o curso temporal do efeito relaxante, onde o derivado quinona foi adicionado nas seguintes concentrações (M): (1) 10^{-8} , (2) 3×10^{-8} , (3) 10^{-7} , (4) 3×10^{-7} , (5) 10^{-6} , (6) 3×10^{-6} , (7) 10^{-5} , (8) 3×10^{-5} , (9) 10^{-4} e (10) 3×10^{-4} .

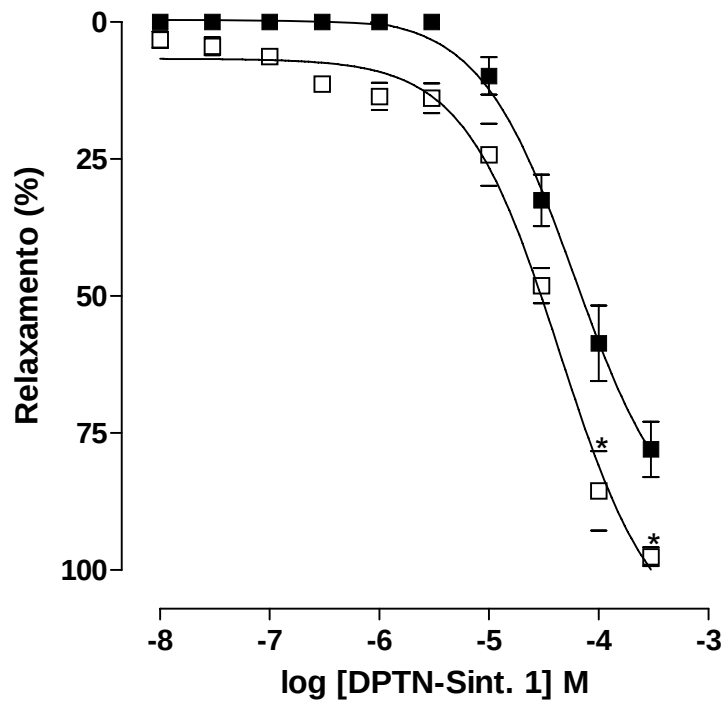


Gráfico 18. Efeito de DPTN-Sint. 1 sobre a fase tônica das contrações induzidas por 10^{-6} M de carbacol em traquéia isolada de cobaia ($n = 4$), tanto na presença (■) como na ausência (□) de epitélio funcional. Símbolos e barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m. ANOVA “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, $*p < 0,05$ (presença x ausência de epitélio funcional).

4.4.3 Efeito de DPTN-Sint. 1 sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de fenilefrina em aorta isolada de rato

Corroborando com o que anteriormente havia sido observado com a molécula protótipo de DPTN-Sint. 1, o flavonóide diplotropina, a adição do derivado quinona (3×10^{-5} – 3×10^{-4} M) sobre os anéis de aorta isolada de rato pré-contráidos com FEN (3×10^{-7} M), tanto na ausência quanto na presença de endotélio, não promoveu relaxamento (Figura 21 A e B).

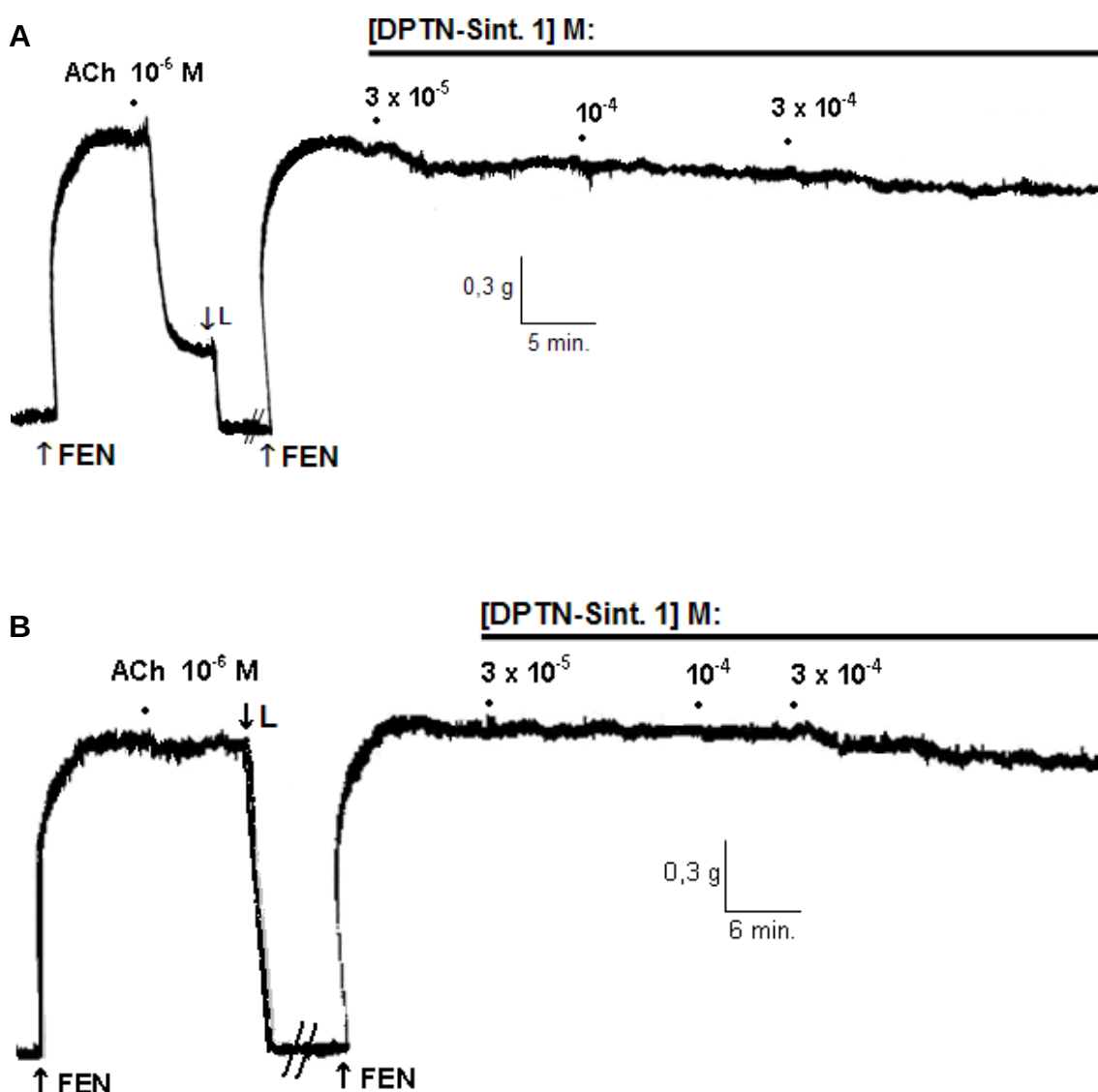


Figura 21. Registro original representativo do efeito de DPTN-Sint. 1 sobre a fase tônica da contração induzida por 3×10^{-7} M de fenilefrina em aorta isolada de rato, na presença (A) e na ausência (B) de endotélio.

4.4.4 Efeito de DPTN-Sint. 1 frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina ou por 10^{-6} M de carbacol em útero isolado de rata

Ao contrário do que anteriormente havia sido observado com o flavonóide diplotropina, a incubação de DPTN-Sint. 1 (10^{-8} – 3×10^{-4} M) não inibiu as contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina ou 10^{-6} M de carbacol em útero isolado de rata (Quadro 1).

Quadro 1. Comparação do efeito espasmolítico de diplotropina e seu análogo sintético, DPTN-Sint. 1, em músculos lisos isolados.

Órgãos Isolados	Efeito Espasmolítico (diplotropina)	Efeito Espasmolítico (DPTN-Sint. 1)
Íleo de cobaia	+	--
Útero de rata	+	--
Aorta de rato	--	--
Traquéia de cobaia	--	+

Nota: + (apresentou efeito), -- (não apresentou efeito)

Discussão

5 DISCUSSÃO

Em estudos anteriormente realizados pela nossa equipe no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, ficou evidenciado que o mecanismo de ação pelo qual o flavonóide do tipo furanoflavana, diplotropina, exerce seu efeito relaxante em íleo isolado de cobaia envolve o bloqueio do influxo de Ca^{2+} neste órgão (LIMA et al., 2005).

Paralelamente aos estudos sobre o mecanismo de ação espasmolítica de diplotropina em íleo isolado de cobaia, também eram realizados testes sobre a atividade deste flavonóide em outros modelos de músculos lisos, tais como: útero isolado de rata, traquéia isolada de cobaia e aorta isolada de rato. Após tais testes, ficou demonstrado que, além do efeito espasmolítico em íleo de cobaia, diplotropina apresenta efeito tocolítico porém não é capaz de relaxar a traquéia de cobaia nem a aorta de rato, fato que pode estar diretamente relacionado com o mecanismo de ação espasmolítica proposto para diplotropina em íleo de cobaia e útero de rata, pois há diferenças, de acordo com o tipo de tecido estudado, na distribuição dos canais iônicos e ainda na maior ou menor dependência do funcionamento de tais canais para o funcionamento de cada um deles.

Em continuidade aos estudos sobre o mecanismo de ação espasmolítica da diplotropina em íleo de cobaia, ficou evidente a participação dos canais para K^+ contribuindo para tal mecanismo, visto que a presença de bloqueadores destes canais, como o cloreto de cério (CsCl), um bloqueador não seletivo dos canais para K^+ , interferiu no efeito relaxante induzido por diplotropina, também foi possível observar que a caribdotoxina (ChTx), um bloqueador não seletivo dos IK_{Ca} , BK_{Ca} e K_V , semelhantemente ao CsCl , interfere no efeito relaxante observado com esse flavonóide (LIMA, 2004).

Diante do exposto acima, decidiu-se também aprofundar os estudos sobre o mecanismo de ação relaxante de diplotropina em útero isolado de rata. Além disso, como nossos colaboradores do Setor de Química Orgânica propuseram a realização de modificações na estrutura química do protótipo natural, o flavonóide diplotropina, e obtenção de derivados sintéticos para que estes fossem testados e seus possíveis efeitos em músculos lisos fossem

comparados aos anteriormente observados com o protótipo natural, decidiu-se associar à investigação do mecanismo de ação, um estudo comparativo entre o primeiro derivado sintético obtido e o composto natural.

Neste trabalho estão reunidas evidências farmacológicas que dão suporte a hipótese de que o flavonóide diplotropina (3, 4, 5, 8-tetrametoxi-6, 7², 3²-furanoflavana), isolado da fase hexânica do extrato etanólico bruto obtido das cascas do caule da espécie *Diplotropis ferruginea* Benth. (Fluxograma 1), exerce seu efeito relaxante em íleo de cobaia e útero de rata a partir de uma interação e conseqüente ativação dos BK_{Ca} que, neste sentido, são considerados os possíveis alvos finais para tal efeito relaxante, até por que fisiologicamente tais canais para K⁺ são determinantes, mas não os únicos alvos, para proporcionar o relaxamento de tais órgãos.

Seguindo os estudos para elucidação do mecanismo de ação relaxante de diplotropina em íleo de cobaia e útero de rata, bem como para incluir ou descartar hipóteses que surgiram com o avanço de tal investigação, tais como a influência de nucleotídeos cíclicos para abertura dos canais para K⁺, a possível entrada de diplotropina na célula, devido seu caráter lipofílico, o que ficou bastante evidente após cálculo do logP ($3,053 \pm 0,437$) (Anexo 2), a interação com enzimas que promovem o aumento de tais nucleotídeos, a ativação de canais para Ca²⁺ na membrana do RS, seu aumento no citosol e a facilitação da ativação dos BK_{Ca}, vários experimentos foram realizados e, conseqüentemente, diversos resultados foram obtidos e permitiram, após sua análise, a proposta de uma possível via que explique o efeito relaxante observado com diplotropina nestes órgãos.

Constam na literatura científica, diversos relatos sobre o efeito relaxante de flavonóides em músculos lisos, devido principalmente a propriedades como a capacidade de modular a atividade de enzimas e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares, sugerindo que estes compostos têm significantes atividades anti-hipertensiva (CONSENTINO; VOLPE, 2002; VILLAR et al., 2002), espasmolítica (MIDDLETON, 1984; ABDALLA; ABU-ZARGA, 1987; CAPASSO et al., 1988, 1991a, 1991b; DI CARLO et al., 1999; LIMA, 2004; LIMA et al., 2005) e tocolítica (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997, 2000).

Após a observação de que diplotropina parecia estar ativando diretamente canais para K^+ e, indiretamente, contribuindo para a inibição do influxo de Ca^{2+} na célula muscular, ao invés de se ligar diretamente aos canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem (Ca_v), bloqueando-os (LIMA et al., 2005), decidiu-se continuar investigando tal mecanismo utilizando como agente contracturante a ACh.

Neste trabalho, demonstrou-se que a presença de IbTx promove uma redução considerável da potência relaxante de diplotropina em íleo isolado de cobaia (Gráficos 2 e 3) e, além disso, o efeito relaxante máximo anteriormente observado não é obtido (Gráfico 2), evidenciando que a ativação desses canais é um passo essencial no mecanismo de ação relaxante induzido por diplotropina em íleo de cobaia. Já os resultados obtidos após a aplicação de 4-AP, corroboram a idéia de que estes não estão envolvidos no efeito relaxante promovido pelo flavonóide, visto que não há diferença significativa entre os valores de CE_{50} antes e após a incubação da 4-AP (Gráfico 1).

Corroborando com os resultados relatados acima, a aplicação de 10^{-4} M de diplotropina sobre o tônus basal do íleo de cobaia não promove nenhuma alteração desse tônus, o que permite concluir, pelo menos em nível funcional, que não há bloqueio direto do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v , e que este provavelmente está se dando devido a uma modulação positiva dos BK_{Ca} pela diplotropina.

É bastante relatado na literatura científica que, além da inibição do influxo de Ca^{2+} , produtos naturais e sintéticos análogos do AMP_C são capazes de reduzir a $[Ca^{2+}]_i$ livre (ABE; KARAKI, 1989; 1992), podendo acontecer: (1) por fosforilação, via PKA, dos IP_3R no RS e redução da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis ao $InsP_3$ (KOMALAVILAS; LINCOLN, 1996); (2) por recaptção de Ca^{2+} por transportadores no RS (HWANG; VAN BREEMEN, 1987), devido ao aumento no funcionamento do trocador Na^+/Ca^{2+} (WOO; MORAD, 2001) ou da Ca^{2+} -ATPase do RS (SERCA) (YAEKURA; YADA, 1998) e, conseqüentemente, redução da capacidade contrátil do músculo liso (VAN RIPER et al., 1995).

Diante de tais fatores, o resultado dessa redução no conteúdo de $[Ca^{2+}]_i$ livre é o relaxamento do músculo liso (THORNELOE; NELSON, 2005), pois o espasmo pode ser inibido quando se impede alguma etapa da via de

sinalização bioquímica ativada durante o processo contrátil (CASTEELS; SUZUKI, 1980; NEILD; KOTE-CHA, 1987; NELSON et al., 1988) e, de acordo com Somlyo e colaboradores (2004), se o mecanismo contrátil se dá pelo aumento da $[Ca^{2+}]_i$, o relaxamento do músculo liso se dá pelo retorno dos níveis de Ca^{2+} livre no citosol aos níveis basais.

Caso diplotropina realmente estivesse bloqueando a entrada de Ca^{2+} no músculo liso, advindo do meio extracelular, seria esperado que, após sua adição no meio, houvesse diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ e, conseqüentemente, o favorecimento do relaxamento.

Visando testar tal hipótese, avaliou-se o efeito de diplotropina sobre a razão de fluorescência do fura 2, que é dependente de sua ligação aos íons Ca^{2+} em miócitos de íleo de cobaia, tanto na ausência como na presença de um estímulo que aumentasse os níveis basais de Ca^{2+} , neste último caso, foi utilizada a ACh, na concentração 10^{-6} M.

De acordo com o que se pode observar nas figuras 12 e 13, diplotropina promoveu redução significativa da razão de fluorescência nas duas situações. Este dado em conjunto com outro fato importante, o de que o curso temporal do efeito de diplotropina requer poucos segundos para atingir seu E_{max} em reduzir a fluorescência dependente de Ca^{2+} (Gráfico 4 e Figura 12) e ainda ao fato de que diplotropina não promove nenhuma alteração, em nível funcional, no tônus basal do íleo de cobaia, é um forte indicativo de que tal efeito não está associado à produção de mensageiros secundários, o que leva a sugerir que, provavelmente, diplotropina esteja ativando diretamente os BK_{Ca} e, conseqüentemente, de maneira indireta, impedindo o influxo de Ca^{2+} nos miócitos isolados de íleo de cobaia devido ao fechamento dos Ca_v em conseqüência da repolarização/hiperpolarização de membrana induzida pela abertura dos BK_{Ca} .

A regulação das contrações uterinas é um parâmetro de grande importância para a saúde da mulher. As cólicas uterinas e abortos prematuros são problemas que acometem mulheres em todo o mundo. Por exemplo, as contrações uterinas fortes e regulares são essenciais para a iniciação do trabalho de parto bem como, manutenção e eventual expulsão do feto e da placenta durante o nascimento.

A hiperatividade uterina antes do tempo pré-dispõe as grávidas ao trabalho de parto prematuro. Contrações uterinas inadequadas podem impedir o trabalho de parto e aumentar a incidência de emergências das cesarianas e hemorragias pós-parto com perigo potencial para a mãe e para a criança (ADELSTEIN; HATHAWAY, 1979; WRAY, 1993).

Tentar descobrir alguma substância que possa prevenir ou até curar tais problemas é de extrema importância e, uma vez que o flavonóide diplotropina também apresentou efeito relaxante em útero isolado de rata, surge a importância de se tentar elucidar o mecanismo de ação tocolítica apresentado por este flavonóide.

Tal ação tocolítica apresentada por diplotropina se dá por um mecanismo não-seletivo, visto que este flavonóide é capaz de inibir as contrações induzidas tanto por ocitocina quanto por carbacol, não apresentando diferença significativa entre os seus valores de CI_{50} frente às contrações fásicas induzidas por tais agonistas, o que, naquele momento, nos levou a sugerir que diplotropina poderia estar agindo em um passo comum da via de sinalização que leva a contração para ambos os agonistas testados e não em nível de receptor, uma vez que a via de sinalização da ocitocina assim como do carbacol para indução da contração é a mesma, porém cada um dos agonistas tem o seu próprio sistema de receptor.

Desta forma, visando confirmar ou eliminar a hipótese de que diplotropina estaria agindo em nível de receptor, avaliou-se seu efeito frente às curvas cumulativas à ocitocina. Corroborando com o que havíamos inicialmente sugerido, foi observado que diplotropina provavelmente não está agindo em nível de receptor de ocitocina, visto que não antagonizou as contrações induzidas cumulativamente à ocitocina, o que pode ser observado pela ausência de desvio significativo para direita das curvas concentração-resposta cumulativas à ocitocina, sem que o efeito máximo fosse atingido (Gráfico 6).

O mecanismo de contração uterino é similar aos outros tipos de músculos lisos (WRAY, 1993; WRAY et al., 2001). Para que haja ativação dessa contração é necessário que haja um aumento global da $[Ca^{2+}]_i$, sendo que a principal fonte de Ca^{2+} ativador no miométrio é o fluido extracelular (SHMIGOL et al., 1998; WRAY et al., 2001) o qual pode entrar no

compartimento citoplasmático durante uma despolarização de membrana ou após estímulo de um agonista.

A regulação funcional da $[Ca^{2+}]_i$, para dar início a uma resposta contrátil no músculo liso depende de dois tipos diferentes de estímulos que levam a dois tipos de acoplamentos: o acoplamento eletromecânico, que está envolvido com a mudança do potencial de membrana (V_m) e o acoplamento fármaco-mecânico, que acontece quando a contração promovida por um agonista é sempre maior que a observada só com a mudança do V_m (REMBOLD, 1996; WOODRUM; BROPHY, 2001).

Os mecanismos que levam a uma resposta contrátil através do acoplamento eletromecânico são devido a uma despolarização de membrana diretamente, que pode ser causada, possivelmente, pelo aumento da concentração externa de K^+ ($[K^+]_e$) ou indiretamente pela ligação dos agonistas aos seus receptores levando à abertura dos Ca_v , causando influxo de Ca^{2+} para o citoplasma e, conseqüentemente, a contração (REMBOLD, 1996; BOOTMAN; LIPP; BERRIDGE, 2001; ALIOUA et al., 2002).

Em miócitos uterinos os mecanismos de sinalização para liberação de cálcio intracelular envolvem principalmente a ação de agonistas como a ocitocina, as prostaglandinas, os α -adrenérgicos e os muscarínicos. A ligação de tais agonistas aos seus receptores na superfície da membrana proporciona a ativação via da fosfolipase C (PLC) via proteínas ligantes de GTP, resultando na produção de $InsP_3$ e, conseqüentemente, liberação de Ca^{2+} do RS (MARC et al., 1986; ANWER; SANBORN, 1989; ARNAUDEAU et al., 1994). Também já foi observada a participação dos receptores de rianodina (RyR) no mecanismo de liberação de Ca^{2+} intracelular em células miométriais, um mecanismo denominado, liberação de Ca^{2+} induzida pelo próprio Ca^{2+} (CICR).

Sabe-se que a contração no músculo liso em resposta a vários agentes, é frequentemente, composta por duas fases: um componente fásico rápido seguido por um lento, porém sustentado, o componente tônico (VAN BREEMEN; AARONSON; LOUTZENHISER, 1979; BOLTON, 1979) e esta resposta bifásica é devido à fonte dual de Ca^{2+} no músculo liso, isto é, os estoques intracelulares e o líquido extracelular. Em útero de rata, a ocitocina e o carbacol, produzem esta resposta bifásica, e é sugerido que a contração fásica é causada por liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares mediados

por InsP_3 (ABDEL-LATIF, 1989; WRAY, 1993; ASOKAN et al., 2002). Por outro lado, a contração tônica é atribuída ao influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v (WRAY, 1993). A probabilidade de abertura dos Ca_v é favorecida por uma despolarização de membrana por estímulo mediado por acoplamento fármaco e eletromecânico (REMBOLD, 1996).

Um passo comum às vias de sinalização dos agonistas testados (ocitocina e carbacol) é a despolarização da membrana plasmática, com conseqüente abertura dos Ca_v o que leva a um influxo de Ca^{2+} , resultando na manutenção da fase tônica da contração no útero de rata (WRAY, 1993).

Diante dessas premissas e visando confirmar a hipótese de que diplotropina está promovendo efeito relaxante em útero de rata por inibir um passo comum da via de sinalização, investigou-se seu efeito sobre o componente tônico da contração induzida por ocitocina (acoplamento fármaco e eletromecânico). Pode-se observar que diplotropina relaxou o útero pré-contraído com ocitocina de maneira dependente de concentração (Figura 14 e Gráfico 7) porém sem atingir 100 % de relaxamento.

Sabendo que o Ca^{2+} é um mensageiro intracelular capaz de controlar processos celulares como a contração e ainda devido, em trabalhos anteriores, ter sido observado que diplotropina relaxa o músculo liso de útero isolado de rata (LIMA, 2004) e agora que tal mecanismo não se dá por ativação dos receptores da OT da ocitocina (Gráfico 6), surgiu a seguinte pergunta: será que o flavonóide diplotropina estaria promovendo relaxamento do útero de rata por bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v ? Para testarmos esta hipótese, avaliou-se o efeito de diplotropina sobre o componente tônico da contração induzida por 60 mM de KCl (acoplamento eletromecânico) em útero isolado de rata (Gráfico 8). O fato de diplotropina promover o relaxamento do útero pré-contraído com 60 mM de KCl de maneira dependente de concentração ($\text{CE}_{50} = 2,1 \pm 0,3 \times 10^{-5} \text{ M}$) (Gráfico 8), permite sugerir que o mecanismo envolvido nesse efeito relaxante parece se dar por bloqueio direto do influxo de cálcio através dos Ca_v .

Visando confirmar a hipótese anterior de que diplotropina estaria bloqueando o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v presentes na membrana plasmática, avaliou-se seus efeitos frente às contrações induzidas cumulativamente ao CaCl_2 em meio despolarizado por 60 mM de KCl e

nominalmente sem Ca^{2+} , e observou-se que o flavonóide diplotropina não desviou significativamente para a direita as curvas cumulativas ao CaCl_2 (Gráfico 9), o que não corrobora a hipótese anterior. Diante de tal resultado, o mecanismo pelo qual diplotropina está promovendo efeito espasmolítico em útero isolado de rata parece não envolver um bloqueio direto do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v .

De acordo com Khan e colaboradores (2001), para melhor compreensão e caracterização do controle do miométrio, os canais iônicos são novos alvos para drogas que podem, eventualmente, ser usadas terapeuticamente no combate ao trabalho de parto pré-maturo e para reduzir o espectro de mortalidade infantil e morbidez na gravidez, entre esses, os canais para K^+ estão emergindo gradualmente como alvos para investigação no controle da contração do músculo liso uterino, especialmente com respeito à caracterização dos BK_{Ca} . Porém, foram realizados poucos estudos com enfoque no papel e modulação de canais iônicos, sejam eles para Ca^{2+} , Na^+ , K^+ ou Cl^- .

Os canais para K^+ têm uma ampla distribuição, estando difundidos, virtualmente, em todos os tipos de células estudadas e envolvidos em vários processos celulares. A função principal de tais canais é reduzir a excitabilidade celular, e isso é devido à manutenção do potencial de membrana da célula próximo do potencial de reversão do íon K^+ , que é negativo sobre um gradiente fisiológico. Isto significa que o estímulo despolarizante é contrabalanceado pela geração de uma corrente de K^+ para o exterior da célula. Essas correntes causam hiperpolarização ou repolarização de membrana, que se contrapõem à geração do potencial de ação e, assim, reduzem a contração miométrial (KHAN et al., 2001). Todos estes canais podem ser ativados na fase de repolarização do potencial de ação e as contribuições relativas deles podem sofrer controle hormonal e são diretamente dependentes das fases da gravidez (SANBORN, 2000).

No miométrio, sabe-se que variações rítmicas na permeabilidade ao Ca^{2+} contribuem para a despolarização e variações na permeabilidade ao íon K^+ contribuem para a repolarização ou hiperpolarização (REINER; MARSHALL, 1975; KAWARABAYASHI et al., 1986; KAO, 1989; MARSHALL, 1990; PARKINGTON, 1990; SANBORN, 1995).

Atualmente é reconhecido que, em células da musculatura lisa, há pelo menos quatro diferentes famílias de canais para K^+ identificadas, a dos BK_{Ca} , dos K_V , dos K_{ATP} e dos K_{ir} (NELSON; QUAYLE, 1995). Sendo que, a repolarização ou hiperpolarização de membrana ocorre devido, principalmente, a ativação dos BK_{Ca} , que são ativados quando a $[Ca^{2+}]_i$ se eleva na ordem de μM , e a ativação dos K_V , em decorrência à despolarização de membrana (LEDOUX et al., 2006). Tal ativação leva a uma redução no influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V por sua inibição e, conseqüentemente, a uma redução da $[Ca^{2+}]_i$ (LEDOUX et al., 2006; LIN et al., 2006).

Inicialmente levantou-se a hipótese de que diplotropina poderia estar inibindo as contrações uterinas por ativar os canais para K^+ e, indiretamente, bloquear os canais para Ca^{2+} . Para testar esta hipótese, avaliou-se o efeito desse flavonóide sobre o componente tônico das contrações induzidas por ocitocina na presença e na ausência de CsCl, um bloqueador inespecífico de canais para K^+ (LATORRE et al., 1989). A observação de que a curva de relaxamento induzida por diplotropina no útero pré-contráído com ocitocina na presença do CsCl foi desviada para a direita, em relação à curva controle na ausência de CsCl (Figura 15 B e Gráfico 10), e que a potência relaxante do flavonóide na presença do bloqueador ($CE_{50} = 3,8 \pm 0,7 \times 10^{-5} M$) foi cerca de duas vezes menor do que na sua ausência (Gráfico 11), nos leva a sugerir que, provavelmente, haja a ativação de canais para K^+ no mecanismo de ação relaxante de diplotropina em útero isolado de rata.

Sabe-se que os K_V desempenham importante papel na manutenção do potencial de repouso em diferentes músculos lisos. Até hoje, pelo menos doze diferentes subfamílias de subunidades- α de K_V têm sido relatadas e os genes que codificam essas subunidades funcionais desses canais já foram identificados tanto no genoma humano como de outros animais (YU; CATTERALL, 2004). Isso demonstra a grande diversidade e complexidade de ações que podem ser esperadas a partir da ativação destes canais para K^+ na membrana.

Os K_V podem ser classificados de acordo com características biofísicas e farmacológicas em: K_A (Canal-A), K_{dr} (retificadores tardios), $K_{V(r)}$ (retificador tardio rápido), $K_{V(s)}$ (retificador tardio lento) e K_{SR} (canal do retículo

sarcoplasmático) (ALEXANDER; PETERS, 1999; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007).

Há um número considerável de experimentos eletrofisiológicos que demonstram as características das correntes iônicas dependentes de voltagem em células de animais diversos. Estas correntes macroscópicas têm uma implicação importante para fisiologia uterina. Existem, claramente, muitos processos celulares onde essas correntes são necessárias para a função celular. Porém, em miométrio humano existem muito poucos dados sobre correntes dependentes de voltagem (KHAN et al., 2001).

Apesar da grande diversidade dos K_V , uma ferramenta farmacológica muito importante no estudo desses canais é a 4-AP, que é conhecida por bloquear a maioria dos K_V , sendo assim usada para o estudo do mecanismo de ação de várias substâncias com atividade relaxante da musculatura lisa (SATAKE; SHIBATA; SHIBATA, 1997; HUANG et al., 1999; LI et al., 1999; PELAIA et al., 2002).

Diante disso, foi investigada a participação dos K_V sensíveis à 4-AP no efeito relaxante promovido pelo flavonóide diplotropina em útero isolado de rata pré-contráido com ocitocina. Na presença de 4-AP, o efeito relaxante promovido por diplotropina não foi alterado, uma vez que não houve diferença significativa das potências relaxantes do flavonóide, tanto na presença ($CE_{50} = 2,3 \pm 0,4 \times 10^{-5} M$), como na ausência ($CE_{50} = 1,7 \pm 0,5 \times 10^{-5} M$) do bloqueador (Gráfico 14). Com isso, pode-se sugerir que o mecanismo de ação relaxante promovido por diplotropina em útero isolado de rata provavelmente não envolve a ativação dos K_V .

A IbTx, um bloqueador seletivo dos BK_{Ca} (GALVEZ et al., 1990; FOX et al., 1997; KOSCHAK et al., 1997; SCHROEDER et al., 2002), promove o surgimento de potenciais de membrana mais positivos (ANWER et al., 1993). Uma rápida despolarização, atribuída primariamente à entrada de Ca^{2+} (ou Na^+ durante o início da gravidez) é responsável pela geração do potencial de ação (KAO, 1989; MARSHALL, 1990; PARKINGTON, 1990; INOUE et al., 1990a; SANBORN, 1995). A diminuição do potencial de ação é consequência do envolvimento da abertura de canais para K^+ (LATORRE et al., 1989; PARKINGTON; COLEMAN, 1990; SANBORN, 1995).

Notavelmente, esses canais são ativados por agentes capazes de aumentar os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMP_C) e, conseqüentemente, a atividade da PKA, incluindo agonistas β -adrenérgicos e a relaxina (TRITTHART et al., 1991; ANSWER et al., 1992; MEERA et al., 1995; SANBORN et al., 1995) porém, são raros os agentes relaxantes de músculos lisos que agem por ativação direta desses canais.

Sabendo-se da importância dos canais para K^+ na musculatura miometrial, de sua capacidade de modular os Ca_v na resposta contrátil, aliada a dificuldade em se descobrir uma substância capaz de ativar diretamente esses canais, mais especificamente os BK_{Ca} , e diante dos resultados obtidos com esse flavonóide em músculo liso de íleo de cobaia, cujo controle fisiológico se dá de maneira semelhante ao observado em útero de rata, decidimos continuar investigando o possível mecanismo de ação farmacológica desse flavonóide neste órgão.

Os BK_{Ca} pertencem a uma subclasse de canais para K^+ que são ativados quando os níveis de Ca^{2+} intracelular aumentam (BLATZ; MAGLEBY, 1987; VERGARA et al., 1998). Os BK_{Ca} são os canais para K^+ predominantemente encontrados em miométrio humano não-grávidos (TRITTHART et al., 1991; ERULKAR et al., 1993; PEREZ et al., 1993) e grávidos (ANSWER et al., 1993; KHAN et al., 1993). Dessa forma estes canais possuem um papel no relaxamento do útero, mantendo este em um estado de pouca motilidade ao longo da gravidez, impedindo assim as contrações uterinas e, conseqüentemente, o aborto. Apesar de estudos mostrarem uma regulação no fenótipo deste canal no começo do trabalho de parto, seu papel ainda é desconhecido (BRAINARD et al., 2005).

Além disso, sabe-se que compostos como os ativadores de canais para K^+ podem hiperpolarizar a membrana e, indiretamente, bloquear os Ca_v-L , inibir o influxo de Ca^{2+} , e conseqüentemente, diminuir a $[Ca^{2+}]_i$, inibindo a contração (WESTON; EDWARDS, 1992; KURIYAMA et al., 1995; LEDOUX et al., 2006; LIN et al., 2006).

Para investigar se diplotropina estaria agindo sobre os BK_{Ca} , ativando-os e, conseqüentemente, levando a uma hiperpolarização ou a uma repolarização de membrana, o que levaria a um bloqueio dos Ca_v , realizou-se experimentos na presença de 1 mM de TEA^+ , que apesar de ser um bloqueador não-seletivo

dos canais para K^+ , nesta concentração específica, atua como um bloqueador apenas dos BK_{Ca} (LATORRE et al., 1989; KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). Nestes experimentos, a curva de relaxamento resultante após a adição de diplotropina sobre o útero pré-contráído com ocitocina na presença de TEA^+ foi desviada para direita, em relação à curva controle, na ausência do TEA^+ (Gráfico 12) e com uma potência relaxante ($CE_{50} = 5,9 \pm 1,5 \times 10^{-5} M$) cerca de 3,5 vezes atenuada em relação ao controle (Gráfico 13), semelhantemente ao que ocorreu nos experimentos anteriores, envolvendo o $CsCl$, porém com maior diminuição da potência relaxante de diplotropina. O que corrobora a hipótese de que diplotropina promove efeito relaxante em útero de rata, pelo menos em parte, por ativação dos BK_{Ca} .

Visando caracterizar ainda melhor a possível participação dos BK_{Ca} no mecanismo de ação tocolítico de diplotropina e sabendo-se da notável especificidade de ação da iberiotoxina, uma toxina isolada do veneno do escorpião *Buthus tamulus*, para os BK_{Ca} , decidimos testar o efeito de diplotropina sobre as contrações induzidas por ocitocina tanto na presença quanto na ausência da $IbTx$ e, interessantemente, após incubarmos 93 nM de $IbTx$ na preparação, podemos observar que houve um desvio significativo para direita da curva de relaxamento induzido pela diplotropina (Gráfico 15), com uma redução de, aproximadamente, 5 vezes a potência do flavonóide diplotropina, $CE_{50} = 9,0 \pm 3,1 \times 10^{-5} M$ (Gráfico 16). Diante da grande importância da descoberta de substâncias que modulem os canais para K^+ e, mais especificamente, os BK_{Ca} , dos resultados até então obtidos em útero isolado de rata, atrelados ao fato de que os canais para K^+ são importantes na regulação do tônus do músculo liso e na regulação da atividade uterina, aliada as informações de que os BK_{Ca} são os canais para K^+ predominantemente encontrados em miométrio humano não-grávidos e grávidos e à eliminação da hipótese de participação dos K_v no efeito tocolítico de diplotropina, é plausível afirmar que os BK_{Ca} estão envolvidos no efeito relaxante promovido por diplotropina em útero isolado de rata.

Existem muitas evidências de substâncias capazes de, indiretamente, modular a abertura de canais para K^+ (LIU et al., 2003; DENSON et al., 2005; YANG et al., 2005), sendo que algumas são capazes de modular positivamente a abertura de canais para K^+ por fosforilação via PKA, dentre elas derivados de

produtos naturais como a forskolina, isolada da espécie *Coleus forskohlii* Briq. (LAMIACEAE) (WELLMAN et al., 1998; WALDRON; COLE, 1999; MASON et al., 2002; WINKLHOFER et al., 2003). Neste contexto, e sabendo da importância da via de sinalização dos nucleotídeos cíclicos para a modulação de vários canais para K^+ (COLE et al., 1996; SON et al., 2005; PEARMAN et al., 2006) e, conseqüentemente, promover o relaxamento do músculo liso devido ao aumento dos níveis de AMP_C e/ou GMP_C torna-se importante uma investigação da participação desses nucleotídeos no efeito tocolítico do flavonóide diplotropina, até por que, de acordo com o seu perfil químico aliado ao valor do logP (Anexo 2), é uma molécula com caráter lipossolúvel, conseqüentemente, com certa probabilidade de atravessar a membrana plasmática e adentrar na célula.

O aumento na $[GMP_C]$ ativa a proteína cinase G (PKG), enquanto que o aumento na $[AMP_C]$ ativa tanto uma proteína cinase dependente de AMP_C (PKA) como a PKG, tais proteínas ativadas irão fosforilar canais iônicos como, por exemplo, os canais para K^+ , levando a abertura dos mesmos, fosforilação e bloqueio de canais para Ca^{2+} , bem como a ativação de bombas que proporcionam uma diminuição da $[Ca^{2+}]_i$, desta forma levando ao relaxamento do músculo liso (REMBOLD, 1996).

Os níveis de AMP_C são controlados por enzimas que hidrolisam a ligação entre os carbonos 3' e 5' do AMP_C denominadas fosfodiesterases (PDEs) transformando-o em 5'-AMP, que perde a capacidade de ativar a PKA (LEHNART et al., 2005). Sabe-se que a ativação das PDEs, que são capazes de transformar o AMP_C em AMP, leva ao aumento dos mecanismos contráteis no músculo liso por diminuir os níveis de nucleotídeos cíclicos (CHOI et al., 1988; LUGNIER, 2006). Diante disso, uma maneira de se investigar a participação de nucleotídeos cíclicos no efeito relaxante de uma droga teste é a utilização de inibidores de PDEs, onde se espera que a potência relaxante seja aumentada.

Revuelta, Cantabrana e Hidalgo (1997 e 2000) mostraram que outras classes de flavonóides, como genisteína, campferol e quercetina, promovem relaxamento da musculatura uterina pré-contráida com 60 mM de KCl, sendo que, para os dois últimos flavonóides citados, este efeito parece estar relacionado ao aumento do AMP_C no meio intracelular. Então surgiu a questão:

será que o nosso flavonóide, diplotropina, estaria agindo por aumentar os níveis de nucleotídeos cíclicos (AMP_C/GMP_C), como o fazem campferol e quercetina? Pois, como acima relatado, o flavonóide diplotropina tem um grande caráter lipofílico, devido à presença das quatro metoxilas e do anel furano (Figura 2), é provável que ele acesse a membrana plasmática, podendo, desta forma, inibir a fosfodiesterase, e também ativar a PKA ou PKG, ou ainda interferir em algum outro passo dessa cascata de sinalização.

Com o objetivo de confirmar ou descartar tal hipótese, lançou-se mão de um conhecido inibidor não seletivo das PDEs, a aminofilina (REVUELTA, CANTABRANA; HIDALGO, 2000; HIRSH et al., 2004). Assim, avaliou-se o efeito de diplotropina sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl tanto na ausência como na presença da aminofilina. Após esse procedimento pode-se observar que o relaxamento do útero induzido por diplotropina não foi alterado pela presença da aminofilina (Gráfico 17), o que nos permite sugerir que um possível aumento no conteúdo de AMP_C/GMP_C intracelular e a conseqüente ativação da via de sinalização PKA/PKG não está envolvida na ação relaxante promovida pelo flavonóide diplotropina em útero isolado de rata, pois, se assim fosse o seu efeito deveria ter sido potencializado quando na presença da aminofilina.

Devido, durante a execução de todos os protocolos experimentais que proporcionaram a obtenção de todos os resultados até então apresentados, nossos colaboradores do Setor de Química Orgânica juntamente com a equipe de farmacologia terem planejado a obtenção de derivados sintéticos a partir de modificações químicas na estrutura do flavonóide natural, diplotropina, decidiu-se iniciar um estudo comparativo dos derivados que estavam sendo obtidos e analisar os resultados obtidos confrontando com os que anteriormente foram observados com o protótipo natural em modelos de músculos lisos, como: íleo e traquéia isolados de cobaia, aorta isolada de rato e útero isolado de rata.

Para nossa surpresa, o primeiro derivado obtido e testado pela nossa equipe, uma quinona, era, na realidade, uma molécula inédita, nunca antes descrita na literatura química nem, até então, conhecida como metabólito secundário. Diante desse fato, no presente estudo foi demonstrado, pela primeira vez, que o sistema 1,4-dimetoxilado da diplotropina parece ser o grupo responsável pelo efeito espasmolítico em útero isolado de rata e íleo isolado de

cobaia, pois a oxidação deste sistema dimetoxilado resultou na obtenção de um derivado sintético, que diferentemente do seu protótipo natural, apresentou propriedade relaxante em traquéia isolada de cobaia, ao passo que perdeu tal atividade em íleo de cobaia e útero de rata e, semelhantemente à diplotropina, continuou sem apresentar atividade vasorelaxante em aorta isolada de rato.

Em estudos anteriores foi demonstrado que flavonóide diplotropina apresentou atividade espasmolítica não seletiva em útero de rata e em íleo de cobaia (LIMA, 2004; LIMA et al., 2005) e tais resultados, juntamente com todos os que foram acima apresentados, serviram para comparação com os que foram obtidos após os testes com o derivado sintético.

Inicialmente levantou-se a hipótese de que o sistema 1,4-dimetoxilado da diplotropina poderia ser um provável grupo farmacofórico responsável pela atividade espasmolítica deste flavonóide. Para testarmos esta hipótese foi proposta a realização de uma reação de oxidação dirigida para as metoxilas 1,4, o que levou a obtenção de uma nova quinona, a (2,3-*trans*-3,4-*trans*)-3,4-dimetoxi-(6,7,2",3")-furanoflavana-5,8-diona, codificada como DPTN-Sint.1 (Figura 4).

Assim como observado com diplotropina (LIMA, 2004), o seu derivado quinona DPTN-Sint. 1 não apresentou quaisquer efeitos sobre a aorta de rato pré-contraída com fenilefrina. Por outro lado, diferentemente da diplotropina, que em estudos anteriores havia exibido atividade espasmolítica não-seletiva em útero de rata e em íleo de cobaia (LIMA et al., 2005), DPTN-Sint. 1 mostrou-se ineficaz em induzir tal atividade nestes órgãos. O fato da oxidação das metoxilas nas posições 1 e 4 terem abolido o efeito espasmolítico em útero de rata e íleo de cobaia nos leva a sugerir que o sistema dimetoxilado 1,4 é um dos responsáveis pelos efeitos espasmolíticos da diplotropina nestes músculos.

Interessantemente, a oxidação do sistema 1,4-dimetoxilado proporcionou o surgimento de um efeito espasmolítico seletivo para a traquéia isolada de cobaia que foi evidenciado pelo relaxamento da traquéia pré-contraída com carbacol induzido por DPTN-Sint. 1, de maneira dependente de concentração e independente de epitélio funcional (Figura 20 e Gráfico 18).

Do ponto de vista fisiológico, o íleo de cobaia e o útero de rata são músculos fásicos, enquanto que a traquéia de cobaia é um músculo tônico. Estas diferenças fisiológicas são resultantes de mecanismos contráteis

diferentes, o que levaria a mecanismos espasmolíticos também diferentes. No caso do íleo de cobaia já foi demonstrado, em nível funcional, que o mecanismo de ação espasmolítico de diplotropina envolve bloqueio do influxo de cálcio (LIMA et al., 2005) e redução da $[Ca^{2+}]_i$. Como DPTN-Sint. 1 apresentou atividade espasmolítica seletiva em traquéia de cobaia é provável que esta esteja ocorrendo por outro mecanismo que não o bloqueio direto do influxo de cálcio.

Em resumo, demonstrou-se que o sistema 1,4-dimetoxilado de diplotropina é um dos responsáveis pela atividade espasmolítica deste flavonóide em íleo de cobaia e útero de rata, e que a oxidação destas metoxilas proporcionou a obtenção de uma nova quinona dotada de efeito espasmolítico seletivo para a traquéia de cobaia, dentre os músculos lisos aqui testados.

Diante de todos os resultados acima apresentados, neste trabalho estão reunidas evidências que nos levam a propor que, em nível funcional, o mecanismo de ação para explicar o efeito do flavonóide diplotropina em íleo isolado de cobaia e útero isolado de rata reside, principalmente, em sua capacidade de modular positivamente os BK_{Ca} e, conseqüentemente, promover repolarização de membrana. Tal repolarização resultaria na inativação dos Ca_v e impedimento do influxo de Ca^{2+} .

Devido a possibilidade de entrada de diplotropina no meio intracelular, fato diretamente relacionado com a sua lipofilicidade (Anexo 2), não se descarta a possibilidade de que tal flavonóide esteja interferindo em mecanismos intracelulares e, assim, contribuindo para o relaxamento do íleo de cobaia e do útero de rata. Diante de tal fato, outras vias de sinalização intracelular, ainda não investigadas, podem ter um grande papel no efeito relaxante do flavonóide diplotropina sobre os músculos lisos, ainda sendo necessárias futuras investigações para a obtenção de uma visão total do mecanismo de ação pelo qual diplotropina exerce seus efeitos.

Atualmente existem muito poucas substâncias capazes de ativar canais para K^+ e o nível de raridade torna-se ainda maior quando se refere aos BK_{Ca} que, por sua vez estão bastante presentes no músculo liso e ainda são de grande importância para o seu funcionamento, principalmente na regulação fisiológica do tônus dos órgãos formados por músculo liso tanto na homeostasia como em estados patológicos.

Diante disso, podemos estar lidando com um novo ativador desses canais, que pode, futuramente, ser utilizado na terapêutica ou ainda funcionar como ferramenta farmacológica, tendo em vista que os resultados obtidos e apresentados neste trabalho demonstram claramente sua potência em ativar tais canais.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho estão reunidas evidências farmacológicas obtidas em nível funcional que, associadas a resultados obtidos em nível celular, dão suporte a hipótese de que o flavonóide diplotropina (3, 4, 5, 8-tetrametoxi-6, 7 2", 3"-furanoflavana), isolado da fase hexânica do extrato etanólico bruto obtido das cascas do caule da espécie *Diplotropis ferruginea* Benth. exerce seu efeito relaxante em íleo de cobaia e útero de rata devido a participação dos BK_{Ca}.

⇒ Em íleo isolado de cobaia:

- Modula positivamente os BK_{Ca}, promovendo sua abertura;
- Inibe o influxo de Ca²⁺ através dos Ca_V;
- Promove redução da [Ca²⁺]_i em miócitos intestinais.

⇒ Em útero isolado de rata:

- O efeito tocolítico apresentado pela diplotropina não envolve bloqueio direto dos receptores OT;
- Também não envolve bloqueio direto do influxo de Ca²⁺ através dos Ca_V;
- Os BK_{Ca} participam do mecanismo de ação tocolítica da diplotropina;
- Os K_V não estão envolvidos neste mecanismo;
- A via dos nucleotídeos cíclicos (AMP_C/GMP_C) parece não estar envolvida no mecanismo de ação tocolítica apresentado pela diplotropina.

⇒ Após modificação estrutural da diplotropina (flavonóide) através de uma desmetilação oxidativa e obtenção de DPTN-Sint. 1 (quinona), pode-se concluir que:

- O derivado obtido trata-se de uma molécula inédita na literatura química;

- Houve perda da atividade espasmolítica em íleo isolado de cobaia e útero isolado de rata;

- O derivado mantém a ausência de efeito vasorelaxante em aorta isolada de rato;

- Interessantemente, DPTN-Sint. 1 apresentou efeito espasmolítico em traquéia de cobaia, o que anteriormente não era observado com o composto natural, diplotropina;

- Diante dos resultados obtidos, o sistema 1,4-dimetoxilado da diplotropina parece ser o grupo responsável pelo efeito espasmolítico em útero isolado de rata e íleo isolado de cobaia.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABE, A.; KARAKI, H. Effect of forskolin on cytosolic Ca^{2+} level and contraction in vascular smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 249, n. 3, p. 895-900, 1989.
- ABE, A.; KARAKI, H. Mechanisms underlying the inhibitory effect of dibutyryl cyclic AMP in vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 211, n. 3, p. 305-311, 1992.
- ABDEL-LATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphospholinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Sci.**, v. 45, p. 757-786, 1989.
- ABDALLA, S. S.; ABU ZARGA, M. H. Effects of cirsimaritin. a flavones isolated from *Artemisia judaica*, on isolated guinea pig ileum. **Planta Med.**, v. 53, p. 322-324, 1987.
- ABOULAFIA, J.; SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A. Protein kinase C modulators enhance angiotensin II desensitization of guinea pig ileum via maxi- K^+ channels. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 442, n. 1-2, p. 29-36, 2002.
- ADELSTEIN, R. S.; HATHAWAY, D. R. Role of calcium and cyclic adenosine 3':5' monophosphate in regulating smooth muscle contraction. Mechanisms of excitation-contraction coupling in smooth muscle. **Am. J. Cardiol.**, v. 44, p. 783-787, 1979.
- ADELWOEHRER, M. E.; MAHNERT, W. Hexoprenaline activates potassium channels of human miometrial myocytes. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 252, p. 179-184, 1993.

- AHMED, M. S.; TANBOULY, N. D. E.; ISLAM, W. T.; SLEEM, A. A.; SENOUSY, A. S. E. Antiinflammatory Flavonoids from *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw. Flowers growing in Egypt. **Phytother. Res.**, v. 19, p. 807-809, 2005.
- AJAY, M.; GILANI, A. H.; MUSTAFA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sci.**, v. 74, n. 5, p. 603-603, 2003.
- AKBAS, S. H.; TIMUR, M.; OZBEN, T. The Effect of Quercetin on Topotecan Cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB 231 Human Breast Cancer Cells. **J. Surg. Res.**, v. 125, p. 49-55, 2004.
- AKKER, J. V. D.; HERTOOG, A. D.; PIELKENROOD, J. Responses evoked by electrical stimulation, adenosine trisphosphate, adenosine and 4-aminopyridine in *taenia caeci* of the guinea-pig. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 109, p. 373-380, 1985.
- ALIOUA, A.; MAHAJAN, A.; NISHIMARU, K.; ZAREI, M. M.; STEFANI, E.; TORO, L. Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca^{2+} -activated K^+ channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, p. 14560-14565, 2002.
- ALLEN, B. G.; WALSH, M. P. The biochemical basis of the regulation of smooth muscle contraction. **Trends Biochem. Sci.**, v. 19, n. 9, p. 362-368, 1994.
- ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 2nd edition (2007 Revision). **Br. J. Pharmacol.**, v. 150 (Suppl. 1), p. S1-S168, 2007.
- ALEXANDER, S. P. H.; PETERS, J. A. 1999 Receptor & ion channel nomenclature supplement. **Trends Pharmacol. Sci.**, 10th Ed., p. 95-96, 1999.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BRAZ-FILHO, R.; MARQUES, A. S.; ZHENG, C.; BARBOSA-FILHO, J. M. The assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra and X-ray crystallographic analysis of furanoflavan from *Diplotropis ferruginea* Benth. **Ann. Magn. Reson.**, v. 2, p. 32-37, 2003.

ALMEIDA, J. R. G. S.; NASCIMENTO, S. C.; AGRA, M. F.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BARBOSA FILHO, J. M.; BRAZ FILHO, R. **Diploflavone, a new flavone from the stem bark of *Diplotropis ferruginea***. In: Second International Joint Symposium, 2004, São Pedro-SP. Second International Joint Symposium, 2004.

ALMEIDA, J. R. G. S. Flavonóides de *Diplotropis ferruginea* Benth. (Fabaceae): uma contribuição à fitoquímica do gênero *Diplotropis*. 2004. **Dissertação (Mestrado)**. Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2004.

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, 1970.

ANWER, K.; SANBORN, B. M. Changes in intracellular free calcium isolated miometrial cells: role of extracellular and intracellular calcium and possible involvement of guanine nucleotide-sensitive proteins. **Endocrinology**., v. 124, p. C976-C985, 1989.

ANWER, K.; TORO, L.; OBERTI. C.; STEFANI, E.; SANBORN, B. M. Ca^{2+} -activated K^+ channels in pregnant rat myometrium: Modulation by β -adrenergic agent. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. C1049-C1056, 1992.

ANWER, K.; OBERTI. C.; PEREZ, G. J.; PEREZ-REYES, N.; McDOUGALL, J. K.; MONGA, M.; SANBORN, B. M.; STEFANI, E.; TORO, L. Calcium-activated K^+ channels as modulators of human myometrial contractile activity. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. C976-C985, 1993.

ARNAUDEAU, S.; LEPRETRE, N.; MIRONNEAU, J. Oxytocin mobilizes calcium from a unique heparin-sensitive and thapsigargin-sensitive store in single myometrial cells from pregnant rats. **Pflugers Arch.-Eur. J. Physiol.**, v. 428, p. 51-59, 1994.

- ASOKAN, K. T.; SARKAR, S. N.; MISHRA, S. K.; RAVIPRAKASH, V. Effects of mibefradil on uterine contractility. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 455, p. 65 -71, 2002.
- AWAD, S. S.; LAMB, H. K.; MORGAN, J. M.; DUNLOP, W.; GILLESPIE, J. I. Differential expression of ryanodine receptor RyR2 mRNA in the non-pregnant and pregnant human myometrium. **Biochem. J.**, v. 322, p. 777-783, 1997.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; COSTA, V. C. O.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BRAZ-FILHO, R. Bowdichine, a new diaza-adamantane alkaloid from *Bowdichia virgilioides*. **J. Asian Nat. Prod. Res.**, v. 6, p. 11-17, 2003.
- BENHAM, C. D.; BOLTON, T. B. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. **J. Physiol.**, v. 381, p. 385-406, 1986.
- BERETZ, A.; CAZENAVE, J. P. The effect of flavonoids on blood-vessel wall interactions. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 280, p. 187-200, 1988.
- BERG, P. A.; DANIEL, P. T. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine II**. In: Progress in Clinical and Biological Research. Cody, V., Middleton, E. e Harborne, J. B. (Eds), 280 157-171. Alan R. Liss Inc., New York, 1988.
- BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. The versatility and universality of calcium Signalling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 1, p. 11-21, 2000.
- BIRNBAUMER, L.; ZHU, X.; JIANG, M. On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: Roles for trp proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 93, p. 15195-15202, 1996.
- BLASA, M.; CANDIRACCI, M.; ACCORSI, A.; PIACENTINI, M. P.; ALBERTINI, M. C.; PIATTI, E. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. **Food Chemistry.**, v. 97, p. 217-222, 2006.

BLATZ, A. L.; MAGLEBY, K. Calcium-activated potassium channels. **Trends in Neurosci.**, v. 10, p. 463-467, 1987.

BLAUSTEIN, M. P. Sodium/Calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Curr. Top. Membr. Trans.**, v. 289-330, 1989.

BOLTON, T. B. Mechanisms of action of neurotransmitters and other substances on smooth muscle. **Physiol. Rev.**, v. 59, p. 606-718, 1979.

BOOTMAN, H.; LIPP, P.; BERRIDGE, M. J. The organization and functions of local Ca^{2+} signals. **J. Cell Sci.**, v. 114, p. 2213-2222, 2001.

BRAINARD, A. M.; MILLER, A. J.; MARTENS, J. R.; ENGLAND, S. K. Maxi-K channels localize to caveolae in human myometrium: a role for an actin-channel-caveolin complex in the regulation of myometrial smooth muscle K^+ current. **Am. J. Physiol. - Cell Physiol.**, v. 289, p. 49-57, 2005.

BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; PINHO, S. L. V.; MONTE, F. J. Q.; ROCHA, A. I. Flavonoids from Amazonian Leguminosae. **Phytochemistry**, v. 12, p. 1184, 1973.

BRITO, N. R. S. Perfil químico de famílias de Angiospermas. 1986. **Tese (Doutorado)** - Instituto de Química; Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.

CAPASSO, F.; PINTO, A.; MASCOLO, N.; AUTORE, G; FRANCO, F. P. Effect of flavonoids on PGE_2 - and LTD_4 - induced contractions of the guinea pig isolated ileum. **Pharmacol. Res. Comm.**, v. 20 (Suppl. 1), p. 201-202, 1988.

CAPASSO, A.; PINTO, A.; SORRENTINO, R.; CAPASSO, F. Inhibitory effects of quercetin and other flavonoids on electrically-induced contraction of guinea pig isolated ileum. **J. Ethnopharmacol.**, v. 34, p. 279-281, 1991a.

CAPASSO, A.; PINTO, A.; MASCOLO, N.; AUTORE, G; CAPASSO, F. Reduction of agonist-induced contractions of guinea pig isolated ileum by flavonoids. **Phytother. Res.**, v. 5, p. 85-87, 1991b.

CASTEELS, R.; SUZUKI, H. The effect of histamine on the smooth muscle cells of the ear of the rabbit. **Pflugers Archiv-Eur. J. Physiol.**, v. 387, n. 1, p. 17-25, 1980.

CATTERALL, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. **Ann. Rev. Cell Develop. Biol.**, v. 16, p. 521-555, 2000.

CHOI, O. H.; SHAMIM, M. T.; PADGETT, W. L.; DALY, J. W. Caffeine and theophylline analogues: correlation of behavioral effects with activity as adenosine receptor antagonists and as phosphodiesterases inhibitors. **Life Sci.**, v. 43, p. 387-398, 1988.

COLE, W. C.; CLEMENT-CHOMIENNE, O.; AIELLO, E. A. Regulation of 4-aminopyridine-sensitive, delayed rectifier K^{+} channels in vascular smooth muscle by phosphorylation. **Biochem. Cell Biol.**, v. 74, n. 4, p. 439-447, 1996.

CONSENTINO, F.; VOLPE, M. Antihypertensive effect and end-organ protection of flavonoids: some insights, more questions. **J. Hypertension.**, v. 20, n. 9, p. 1721-1724, 2002.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. IBDF-Ministério da Agricultura. v. 6, p. 149. Rio de Janeiro, 1984.

CRANKSHAW, D. J. Pharmacological techniques for the *in vitro* study of the uterus. **J. Pharmacol. Toxicol. Method.**, v. 42, p. 123-140, 2001.

DANILA, C. I.; HAMILTON, S. L. Phosphorylation of ryanodine receptors. **Biological Res.**, v. 37, n. 4, p. 521-525, 2004.

- DAVIES, M. P.; McCURRIE, J. R.; WOOD, D. Comparative effects of K⁺ channel modulating agents on contractions of rat intestinal smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 297, p. 249 - 256, 1996.
- DELLIS, O.; DEDOS, S. G.; TOVEY, S. C.; TAUFIQ UR, R.; DUBEL, S. J.; TAYLOR, C. W. Ca²⁺ entry through plasma membrane IP₃ receptors. **Science.**, v. 313, n. 5784, p. 229-233, 2006.
- DEMIREL, E.; RUSKO, J.; LASKEY, R. E.; ADAMS, D. J.; VAN BREEMEN, C. TEA inhibits ACh-induced EDRF release: endothelial Ca²⁺-dependent K⁺ channels contribute to vascular tone. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. H1135-H1141, 1994.
- DENSON, D. D.; LI, J.; WANG, X.; EATON, D. C. Activation of BK channels in GH3 cells by a c-PLA₂-dependent G-protein signaling pathway. **J. Neurophysiol.**, v. 93, n. 6, p. 3146-3156, 2005.
- DI CARLO, G.; AUTORE, G.; IZZO, A. A.; MAIOLINO, P.; MASCOLO, N.; VIOLA, P.; DIURNO, M. V.; CAPASSO, F. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 45, n. 12, p. 1054-1059, 1993.
- DI CARLO, G.; IZZO, A. A.; BORRELLI, F.; PINTO, L.; PERILLI, S.; CAPASSO, F. Natural products and cardiovascular disturbances. **Phytother. Res.**, v. 10, p. S114 – S115, 1996.
- DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: Old and New Aspects of a Class of Natural Therapeutic Drugs. **Life Sci.**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.
- DOHADWALLA, A. N. Natural product pharmacology: strategies in search of leads for new drug designs. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 6, p. 49-53, 1985.

DUTTA, K.; CARMODY, M. W.; CALA, S. E.; DAVIDOFF, A. J. Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 34, n. 8, p. 985-996, 2002.

EATON-EVANS, J. Osteoporosis and the role of diet. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 51, n. 4, p. 358-370, 1994.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na atenção primária à saúde**. Ed. Manole, São Paulo, 2001.

ERULKAR, S. D.; LUDMIR, J.; GER, B.; NORI, R. D. Expression of different potassium channels in cells isolated from human myometrium and leiomyomas. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 168, p. 1628-1639, 1993.

EXTON, J. H. New Developments in phospholipase D. **J. Biol. Chemistry.**, v. 272, n. 25, p. 15579-15582, 1997.

FANNING, M. J.; MACANDER, P.; DRZEWIECKI, G.; MIDDLETON, E. Quercetin inhibits anaphylactic contraction of guinea-pig ileum smooth muscle. **Int. Arch. Allergy Applied Immunol.**, v. 71, n. 4, p. 371-373, 1983.

FOX, A. J.; BARNES, P. J.; VENKATESAN, P.; BELVISI, M. G. Activation of large conductance potassium channels inhibits the afferent and efferent function of airway sensory nerves in the guinea pig. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n. 3, p. 513-519, 1997.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

GABOR, M. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine II**. Cody, V., Middleton, E. and Harborne, J. B. (Ed.). In: Progress in Clinical and Biological Research. New York: Alan R. Liss Inc., v. 280, p. 1-15, 1988.

GALVEZ, A.; GIMENEZ-GALLEGO, G.; REUBEN, J. P.; ROY-CONTANCIN, L.; FEIGENBAUM, P.; KACZOROWSKI, G. J.; GARCIA, M. L. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 11083-11090, 1990.

GIANGIACOMO, K. M.; GABRIEL, J.; FREMONT, V.; MULLMANN, T. J. **Perspect. Drug Discov. Des.**, v. 15, n.16, p. 167-186, 1999.

GORDIENKO, D. V.; ZHOLOS, A. V.; BOLTON, T. B. Membrane ion channels as physiological targets for local Ca^{2+} signaling. **J. Microscopy**, v. 196, p. 305-316, 1999.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A.; BORIN, M. R. **Biodiversidade: um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro. Ed. UERJ, 1996.

GOTTSEGEN, A. **Proceedings of the 2nd International Meeting on Medicinal and Aromatic Plants**. p. 117-130, Delta Grafica, Citta di Castello, 1981.

GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R. Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. **J. Biol. Chem.**, v. 260, n. 6, p. 3440-3450, 1985.

GUERRA, O. M.; NODARI, O. R. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.) et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. cap. 1, p. 14-28, 2003.

GULLO, V. P.; HUGHES, D. E. Exploiting new approaches for natural product drug discovery in the biotechnology industry. **DDT: Technol.**, v. 2, n. 3, p. 281-286, 2005.

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

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Dictionary**. [S. l.]: Taylor & Francis, 1993.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **DDT.**, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol.**, v. 32, p. 141-148, 1983.

HEYWOOD, V. H. **Flowering Plants of the World**. B. T. Batsford Ltd -London, p. 149-152, 1996.

HILL, C. E.; KIRTON, A.; WU, D. D.; VANNER, S. J. Role of maxi-K⁺ channels in endothelin-induced vasoconstriction of mesenteric and submucosal arterioles. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. G1087-G1093, 1997.

HILLE, B. **Ionic channels of excitable membranes**. 2nd ed. Sunderland, M. A.: Sinauer Associates. p. 1-139, 1992.

HIRAMATSU, T.; KUME, H.; KOTLIKOFF, M. I.; TAKAGI, K. Role of calcium-activated potassium channels in the relaxation of tracheal smooth muscles by forskolin. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 21, n. 5, p. 367-375, 1994.

HIRSH, L.; DANTES, A.; SUH, B. S.; YOSHIDA, Y.; HOSOKAWA, K.; TAJIMA, K.; KOTSUJI, F.; MERIMSKY, O.; AMSTERDAM, A. Phosphodiesterase inhibitors as anti-cancer drugs. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, n. 6, p. 981-988, 2004.

HONG, S. J.; ROAN, Y; CHANG, C. C. Spontaneous activity of guinea pig ileum longitudinal muscle regulated by Ca²⁺-activated K⁺ channel. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. G962-G971, 1997.

HUANG, Y. Hydroxylamine-induced relaxation inhibited by K⁺ channel blockers in rat aorta rings. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 349, n. 1, p. 53-60, 1998.

HUANG, Y.; LAU, C. W.; CHAN, F. L.; YAO, X. Q. Contribution of nitric oxide and K⁺ channel activation to vasorelaxation of isolated rat aorta induced by procaine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 367, n. 2-3, p. 231-237, 1999.

HWANG, K. S.; VAN BREEMEN, C. Effect of dB-c-AMP and forskolin on the ⁴⁵Ca influx, net Ca²⁺ uptake and tension in rabbit aortic smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 134, n. 2, p. 155-162, 1987.

INOUE, Y.; NAKAO, K.; OKABE, K. Some electrical properties of human pregnant myometrium. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 162, p. 1090-1098, 1990a.

INOUE, R.; ISENBERG, G. Intracellular calcium ions modulate acetylcholine-induced inward current in guinea-pig ileum. **J. Physiol.**, v. 424, p. 73-92, 1990b.

INOUE, Y.; SPERELAKIS, N. Gestational change in Na⁺ and Ca²⁺ channel current densities in rat myometrial smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 260, p. C658-663, 1991.

IZZO, A. A.; DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; AUTORE, G.; CAPASSO, F. **Phytother. Res.**, v. 8, p. 179-181, 1994.

JENKINSON, D. H.; BARNARD, E. A.; HOYER, D.; HUMPHREY, P. P. A.; LEFF, P.; SHANKLEY, N. P. International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. IX. Recommendations on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharm. Rev.**, v. 47, n. 2, p. 255-266, 1995.

JORQUERA, C. S. **Utilization industrial de plantas medicinales**. Workshop presented in UNIDO in Latin America, Panajachel, Guatemala 11-17 july, 1993.

KANNAN, M. S.; JOHNSON, D. E. Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels. **Life Sci.**, v. 56, p. 2229-2238, 1995.

KAO, C. Y. **Electrophysiological properties of uterine muscle**. In: Wynn, R. M.; JOLLIE, W. P., eds. *Biology of the uterus*. New York: Plenum Press, p. 403-453, 1989.

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

KAWARABAYASHI, T.; IKEDA, M.; SUGIMORI, H.; NAKANO, H. Spontaneous electrical activity and effects of noradrenaline on pregnant human myometrium recorded by the single sucrose gap method. **Acta Physiol Hung.**, v. 67, p. 71-82, 1986.

KHAN, R. N.; SMITH, S. K.; MORRISON, J. J.; ASHFORD, M. L. J. Properties of large conductance potassium channels in human myometrium during pregnancy and labour. **Proc. Royal Soc. B.**, v. 251, p. 9-13, 1993.

KHAN, R. N.; SMITH, S. K.; ASHFORD, M. L. Contribution of calcium-sensitive potassium channels to NS1619-induced relaxation in human pregnant myometrium. **Hum Reprod.**, v. 13, p. 208-213, 1998.

KHAN, R. N.; MATHAROO-BALL, B.; ARULKUMARAN, S.; ASHFORD, M. L. J. Potassium channels in the human myometrium. **Exp. Physiol.**, v. 86, n. 2, p. 255-264, 2001.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 96, p. 229-245, 2004.

KINGHORN, A. D.; BALANDRIN, M. F.; LIN, L. J. Alkaloids of the Papilionoideae. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2269, 1982.

KNAP, L. **Fitoterapia abre novos campos de pesquisa**. Gazeta Mercantil, São Paulo, Caderno 1, p. 6, 18 set. 2001.

KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. **Calcium channels and potassium channels**. In: BÁRÁNY, M. Biochemistry of smooth muscle contraction. San Diego, Academic Press, 203-219, 1996.

KOHDA, M.; KOMORI, S. UNNO, T.; OHASHI, H. Carbachol induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in single smooth muscle cells of guinea pig ileum. **J. Physiol.**, v. 492, p. 315-328, 1996.

KOHDA, M.; KOMORI, S. UNNO, T.; OHASHI, H. Carbachol induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in membrane potential and $[Ca^{2+}]_i$ guinea-pig ileal smooth muscle cells. **J. Physiol.**, v. 511, p. 559-571, 1998.

KOMALAVILAS, P.; LINCOLN, T. M. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 36, p. 21933-21938, 1996.

KOSCHAK, A.; KOCH, R. O.; LIU, J.; KACZOROWSKI, G. J.; REINHART, P. H.; GARCIA, M. L.; KNAUS, H. G. $[^{125}I]$ -Iberiotoxin-D19Y/Y36F, the first selective, high specific activity radioligand for high-conductance calcium activated potassium channels. **Biochemistry**, v. 36, p. 1943-1952, 1997.

KUME, H.; HALL, I. P.; WASHABAU, R. J.; TAKAGI, K.; KOTLIKOFF, M. I. Beta-adrenergic agonists regulate K-Ca channels in airway smooth-muscle by cAMP-dependent and cAMP-independent mechanisms. **J. Clin. Invest.**, v. 93, n. 1, p. 371-379, 1994.

KURIYAMA, H.; KITAMURA, K.; NABATA, H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. **Pharmacol. Rev.**, v. 47, p. 387-573, 1995.

LATORRE, R.; OBERHAUSER, A.; LABARCA, P.; ALVAREZ, O. Varieties of calcium-activated potassium channels. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 51, p. 385-399, 1989.

LEDOUX, J.; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology** (Bethesda), v. 21, n. 1, p. 69-78, 2006.

LEHNART, S. E.; WEHRENS, X. H. T.; REIKEN, S.; WARRIER, S.; BELEVYCH, A. E.; ROBERT D. HARVEY, D.; RICHTER, W.; CATHERINE JIN, S. L.; CONTI, M.; MARKS, A. R. Phosphodiesterase 4D Deficiency in the Ryanodine-Receptor Complex Promotes Heart Failure and Arrhythmias. **Cell**, v. 123, p. 25-35, 2005.

LEWIS, G. P. *Diploptropis ferruginea* Benth (FABACEAE). Disponível em: http://scisun.nybg.org:8890/searchdb/owa/wwwcatalogrenz.detail_list?this_id=4067534. Acesso em: 30 nov. 2003.

LI, L.; VAALI, K.; VAPAATALO, H.; KANKAANRANTA, H. Effects of K⁺ channel inhibitors on relaxation induced by flufenamic and tolfenamic acids in guinea-pig trachea. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 383, n. 2, p.169-176, 1999.

LI, W. X.; CUI, C. B.; CAI, B.; WANG, H. Y.; YAO, X. S. Flavonoids from *Vitex trifolia* L. inhibit cell cycle progression at G2/M phase and induce apoptosis in mammalian cancer cells. **J. Asian Nat. Prod. Res.**, v. 7, p. 615-626, 2005.

LIMA, J. T.; SOUSA, M. F. P.; SOUSA, A. O.; FIGUEREDO, C. A. The Root Seller's Profile of João Pessoa – PB and Their Relationship With the Medicinal Plant Prescription. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 13 (Suppl. 1), p. S-128, 2001.

LIMA, J. T.; CLAUDINO, F. S.; CAVALCANTE, F. A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, B. A. Investigation of the Spasmolytic Activity of *Diploptropis ferruginea* Benth. (FABACEAE). **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 39, (Suppl. 2), p. 158, 2003a.

LIMA, J. T. Ação espasmolítica do 3, 4, 5, 8-tetrametoxi-(6, 7, 2", 3")-furanoflavana, obtido de *Diploptropis ferruginea* Benth. (FABACEAE), envolve ativação de canais de potássio. 2004. **Dissertação (Mestrado)** Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2004.

LIMA, J. T.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ASSIS, T. S.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, B. A. Spasmolytic Action of Diploptropin, a Furanoflavan from *Diploptropis ferruginea* Benth., Involves Calcium Blockade in Guinea-Pig Ileum. **Z. Naturforsch. B.**, v. 60b, p. 1093-1100, 2005.

LIN, M. T.; HESSINGER, D. A.; PEARCE, W. J.; LONGO, L. D. Modulation of BK channel calcium affinity by differential phosphorylation in developing ovine basilar artery myocytes. **Am. J. Physiol.-Heart and Circulatory Physiology.**, v. 291, n. 2, p. H732-740, 2006.

LIU, Y. C.; LO, Y. K.; WU, S. N. Stimulatory effects of chlorzoxazone, a centrally acting muscle relaxant, on large conductance calcium-activated potassium channels in pituitary GH3 cells. **Brain Res.**, v. 959, n. 1, p. 86-97, 2003.

LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. **Pharmacol. Ther.**, v. 109, n. 3, p. 366-398, 2006.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 199-206, 2005.

MACANDER, P. J. Flavonoids affect acetylcholine, prostaglandin E2 and antigen-mediated smooth muscle contraction. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 213, p. 489-492, 1986.

MARC, S.; LEIBER, D.; HARBON, S. Carbachol and oxytocin stimulate the generation of inositol phosphates in guinea pig myometrium. **FEBS Letters.**, v. 201, p. 17-23, 1986.

MARINHO, L. C. Estudo químico-farmacológico do extrato e alcalóides quinolizidínicos isolado de *Bowdichia virgilioides* KUNTH. 1991. **Dissertação (Mestrado)** Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1991.

MARINHO, L. C.; CUNHA, M. T. M. C.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J. M. **Fitoterapia**, v. 65, n. 475, 1994.

MARSHALL, J. M. **Relation between membrane potential and spontaneous contraction of the uterus.** In: Gargield, R. E. Ed. Uterine contractility. Mechanisms of control. Norwell, M. A.: Serono Symposia, USA, p. 3-7, 1990.

MASCOLO, N.; GAGINELLA, T.; IZZO, A. A. DI CARLO, G.; CAPASSO, F. Nitric oxide involvement in sodium choleate-induced fluid secretion and diarrhoea in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 264, n. 1, p. 21-26, 1994a.

MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; AUTORE, G.; BARBATO, F.; CAPASSO, F. Nitric oxide and castor oil-induced diarrhea. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 268, n. 1, p. 291-295, 1994b.

MASON, H. S.; LATTEN, M. J.; GODOY, L. D.; HOROWITZ, B.; KENYON, J. L. Modulation of Kv1.5 currents by protein kinase A, tyrosine kinase, and protein tyrosine phosphatase requires an intact cytoskeleton. **Molecular Pharmacol.**, v. 61, n. 2, p. 285-293, 2002.

MEDEIROS, M. A. A.; LIMA, J. T.; CLAUDINO, F. S.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, B. A. **Investigação da Atividade Espasmolítica de *Diplotropis ferruginea* Benth. (Fabaceae) em Aorta Isolada de Rato e Útero Isolado de Rata.** In: 56ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. v. único. Recife-PE. 2003.

MEERA, P.; ANWER, K.; MONGA, M.; OBERTI, C.; STEFANI, E.; TORO, L.; SAMBOR, B.M. Relaxin stimulates myometrial calcium-activated potassium channel activity via protein kinase A. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. C312-C317, 1995.

MELO, F. N.; NAVARRO, V. R.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R. **Nat. Prod. Letters**, v. 15, p. 261, 2001.

MEYER, A. S.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. **Food Chem.**, v. 61, p. 71-75, 1997.

MIDDLETON, E. The flavonoids. **Trends Biol. Sci.**, v. 5, p. 335-338, 1984.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos.** Tecmedd Editora, Ribeirão Preto, São Paulo, 2004.

MIRONNEAU, J. **Ion channels and the control of uterine contractility.** In: Garfield, R. E.; Tabb, T. N.; eds. Control of uterine contractility. Boca Raton, F. L.: CRC Press. p. 1-22, 1993.

MOLLARD, P.; MIRONNEAU, J.; AMEDEE, T.; MIRONNEAU, C. Electrophysiological characterization of single pregnant rat miometrial cells in short-term primary culture. **Am. J. Physiol.**, v. 250, p. C47-C54, 1986.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem. pharmacol.** v. 38, p. 1709-1715, 1989.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MULLMANN, T. J.; SPENCE, K. T.; SCHROEDER, N. E.; FREMONT, V. F.; CHRISTIAN, E. P.; GIANGIACOMO, K. M. **Biochemistry.** v. 40, p. 10987-10997, 2001.

MURRAY M. A.; BERRY J. L.; COOK S. J.; FOSTER R. W.; GREEN K. A.; SMALL R. C. Guinea-pig isolated trachealis: the effects of charybdotoxin on mechanical activity, membrane potential changes and the activity of plasmalemmal K(+)-channels. **Br. J. Pharmacol.**, v. 103, p. 1814-1818, 1991.

NEILD, T. O.; KOTE-CHA, N. Relation between membrane potential and contractile force in smooth muscle of the rat tail artery during stimulation by norepinephrine, 5-hydroxytryptamine, and potassium. **Circ. Res.**, v. 60, n. 5, p. 791-795, 1987.

NELSON, M. T.; STANDEN, N. B.; WORLEY, J. F. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. **Nature**, v. 336, p. 3382-3385, 1988.

NELSON, M. T.; PATLAK, J. B.; WORLEY, J. F.; STANDEN, N. B. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. **Am. J. Physiol.**, v. 259, n. 1, p. C3-18, 1990.

NELSON, M. T.; CHENG, H.; RUBART, M.; SANTANA, L. F. BONEV, A. D.; KNOT, H. J.; LEDERER, W. J. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. **Science.** v. 270, p. 633-637, 1995.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 268, n. 1, p. C799-C822, 1995.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

PARKINGTON, H. C.; COLEMAN, H. A. **The role of membrane potential in the control of uterine motility.** In: Carsten, M. E.; Miller, J. D., eds. Uterine function: Molecular and cellular aspects. New York: Plenum Press, p. 195-248, 1990.

PEARMAN, C.; KENT, W.; BRACKEN, N.; HUSSAIN, M. H-89 inhibits transient outward and inward rectifier potassium currents in isolated rat ventricular myocytes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 148, n. 8, p. 1091-1098, 2006.

PELAIA, G.; GALLELLI, L.; VATRALLA, A.; GREMBIALE, R. D.; MASELLI, R.; DE SARRO, G. B.; MARSICO, S. A. Potential role of potassium channel openers in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Life Sciences.**, v. 70, n. 9, p. 977-990, 2002.

PEREZ, G. J.; TORO, L.; ERULKAR, S. D.; STEFANI, E. Characterization of large conductance calcium-activated potassium channels from human myometrium. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 168, p. 652-660, 1993.

PEREZ, R. M.; CERVANTES, H.; ZAVALA, M. A.; SANCHEZ, S. J.; PEREZ, S.; PEREZ, C. Isolation and hypoglycemic activity of 5,7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone from *Brickellia veronicaefolia*. **Phytomedicine**, v. 7, n. 1, p. 25-29, 2000.

RASMUSSEN, H.; TAKUWA, Y.; PARK, S. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. **FASEB J.**, v. 1, p. 177-185, 1987.

REINBOTHE, C.; DIETRICH, B.; LUCKNER, M.: Regeneration of plants from somatic embryos of *Digitalis lanata*. **J. Plant Physiol.**, v. 137, p. 224-228, 1990.

REINER, O.; MARSHALL, J. M.; Action of D600 on spontaneous electrical stimulatory activity of the parturient rat uterus. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 290, p. 21-28, 1975.

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

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Despolarization-Dependent Effect of Flavonoids in Rat Uterine Smooth Muscle Contraction by Elicited by CaCl_2 . **Gen. Pharmacol.**, v. 29, p. 847-857, 1997.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Mechanisms involved in kaempferol-induced relaxation in rat uterine smooth muscle. **Life Sci.**, v. 67, p. 251-259, 2000.

RUSAK, G.; GUTZEIT, H. O.; LUDWIG-MÜLLER, J. Effects of Structurally Related Flavonoids on hsp Gene Expression in Human Promyeloid Leukaemia Cells. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 40, n.4, p. 267-273, 2002.

SAMUELSSON, G. **Drugs of Natural Origin**. Textbook of Pharmacognosy. Swedish Pharmaceutical, Press Editor, 1993.

SANBORN, B. M. Ion channels and the control of myometrial electrical activity. **Semin. Perinatol.**, v. 19, p. 31-40, 1995.

SANBORN, B. M. Relationship of Ion Channel Activity to Control of Myometrial Calcium. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v. 7, p. 4-11, 2000.

SATAKE, N.; SHIBATA, M.; SHIBATA, S. The involvement of K_{Ca} , K_{ATP} and K_V channels in vasorelaxing responses to acetylcholine in rat aortic rings. **Gen. Pharmacol.**, v. 28, n. 3, p. 453-457, 1997.

SCHROEDER, N.; MULLMANN, T. J.; SCHMALHOFER, W. A.; GAO, Y.; GARCIA, M. L.; GIANGIACOMO, K. M. Glycine 30 in iberiotoxina is a critical determinant of its specificity for maxi-K versus K_V channels. **FEBS Letters.**, v. 527, p. 298-302, 2002.

SEITZ, S.; WEGENER, J. W.; RUPP, J.; WATANABE, M.; JOST, A.; GERHARD, R.; SHAINBERG, A.; OCHI, R.; NAWRATH, H. Involvement of K^+ channels in the relaxant effects of YC-1 in vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 382, n. 1, p. 11-18, 1999.

SHIKADA, K.; TANAKA, S. K^+ channel openers produce epithelium-dependent relaxation of the guinea-pig trachea. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 282, p. 193-197, 1995.

SILVA, E. G.; FREDIANI-NETO, E.; FERREIRA, A. T.; PAIVA, A. C. M.; PAIVA, T. B. Role of Ca^{2+} -dependent K-channel in the membrane potential and contractility of aorta from spontaneously hypertension rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 113, p. 1022-1028, 1994.

SILVA, E. G.; OKUYAMA, P.; PAIVA, T. B. Role of Ca^{2+} -dependent K^+ channels in the membrane potential and contractility of uterus from spontaneously hypertensive rats. **Pathophysiology**. v. 3, p. 259-265, 1996.

SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A.; ABOULAFIA, J. Desensitization to ANG II in guinea-pig ileum depends on membrane repolarization: role of maxi- K^+ channel. **Am. J. Physiol.**, v. 277, n. 4, p. C739-C745, 1999.

SHMIGOL, A.; EISNER, D. A.; WRAY, S. Properties of voltage-activated $[Ca^{2+}]_i$ transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. **J. Physiol.**, v. 511, p. 803-811, 1998.

SHMYGOL, A.; WRAY, S. Functional architecture of the SR calcium store in uterine smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 35, p. 501-508, 2004.

SOIKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Plant. Med.**, v. 53, p. 37-39, 1987.

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

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

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 1325-1358, 2003.

SOMLYO, A. V.; KHROMOV, A. S.; WEBB, M. R.; FERENCZI, M. A.; TRENTAM, D. R.; HE, Z. H.; SHENG, S.; SHAO, Z.; SOMLYO, A. P. Smooth muscle myosin: regulation and properties. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. **Biol. Sci.**, v. 359, n. 1452, p. 1921-1930, 2004.

SON, Y. K.; PARK, W. S.; KO, J. H.; HAN, J.; KIM, N.; EARM, Y. E. Protein kinase A-dependent activation of inward rectifier potassium channels by adenosine in rabbit coronary smooth muscle cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 337 (4). p. 1145-1152, 2005.

SPERELAKIS, N.; INOUE, Y.; OHYA, Y.; Fast Na^+ and slow Ca^{2+} current in smooth muscle from pregnant rat uterus. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 114, p. 79-89, 1992.

STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website, 2001. Disponível em: <[http://www. Mobot.org](http://www.Mobot.org)>. Acesso em: 25 de novembro de 2005.

SUN, Y. D.; BENISHIN, C. G. K⁺ channel openers relax longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 271, p. 453-459, 1994.

TERAMOTO, N.; BRADING, A. F.; ITO, Y. Glibenclamide-sensitive K⁺ channels underlying levromakalim-induced relaxation in pig urethra. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 365, p. 291-300, 1999.

TERAMOTO, N.; NAKASHIMA, T.; ITO, Y. Properties and pharmacological modification of ATP-sensitive K⁺ channels in cat thacheal myocytes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 130, p. 625-635, 2000.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian J. Physiol. Pharmacol.**, v. 83, n. 3, p. 215-242, 2005.

TIMBERLAKE, C. F.; HENRY, B. S. Plant pigments as natural food colours. **Endeavour**, v. 10, p. 31-36, 1986.

TIMEUS, C. **Phlebology**. Negus, D. e Jantet, G. (Eds), v. 85, p. 828-830, London, 1985.

TORO, L.; STEFANI, E.; ERULKAR, S. Hormonal regulation of potassium currents in single miometrial cells. **Proc. Natl. Acad Sci USA.**, v. 87, p. 2892-2895, 1990.

TOTSUKAWA, G.; YAMAKITA, Y.; YAMASHIRO, S.; HARTSHORNE, D. J.; SASAKI, Y.; MATSUMURA, F. Distinct Roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in Spatial Regulation of MLC Phosphorylation for Assembly of Stress Fibers and Focal Adhesions in 3T3 Fibroblasts. **J. Cell Biol.**, v. 150, p. 797-806, 2000.

TRITTHART, H. A.; MANHERT, W.; FLEISCHACKER, A. Potassium channels and modulating factors of channel functions in the human myometrium. **Z. Kardiol.**, v. 80 (suppl. 7), p. 29-33, 1991.

TSCHIRHART, E.; FROSSARD, N.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 243, n. 1, p. 310-316, 1987.

UYAMA, Y.; IMAIZUMI, Y.; WATANABE, M. Cyclopiazonic acid, an inhibitor of Ca^{2+} -ATPase in sarcoplasmic reticulum, increases excitability in ileal smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 565-572, 1993.

VAN ACKER, S. A.; TROMP, M. N. HAENEN, G. R.; VAN DER VIJGH, W. J.; BAST, A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 214, p. 755-759, 1995.

VAN BREEMEN, C.; AARONSON, P.; LOUTZENHISER, R. Ca^{2+} interactions in mammalian smooth muscle. **Pharmacol. Rev.**, v. 30, p. 167-208, 1979.

VAN DER STAAY, F. J.; FANELLI, R. J.; BLOKLAND, A.; SCHMIDT, B. H. Behavioral effects of apamin, a selective inhibitor of the SKCa-channel, in mice and rats. **Neurosci. Behav. Rev.**, v. 23, n. 8, p. 1087-1110, 1999.

VAN ERK, M. J.; ROEPMAN, P.; VAN DER LENDE, T. R.; STIERUM, R. H.; AARTS, J. M. M. J. G.; VAN BLADEREN, P. J.; VAN OMMEN, B. Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells *in vitro*. **Eur. J. Nutr.**, v. 44, n. 3, p. 143-156, 2005.

VAN RIPER, D. A.; WEAVER, B. A.; STULL, J. T.; REMBOLD, C. M. Myosin light chain kinase phosphorylation in swine carotid artery contraction and relaxation. **Am. J. Physiol.**, v. 268, n. 6, p. H2466-2475, 1995.

- VERGARA, C.; LATORRE, R.; MARRION, N. V.; ADELMAN, J. P. Calcium-activated potassium channels. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 8, p. 321-329, 1998.
- VILLAR, I. C.; JIMENEZ, R.; GALISTEO, M.; GARCIA-SAURA, M. F.; ZARZUELO, A.; DUARTE, J. Effects of chronic chrysin treatment in spontaneously hypertensive rats. **Plant. Med.**, v. 68, n. 9, p. 847-850, 2002.
- WADE, G. R.; SIMS, S. M. Muscarinic stimulation of tracheal smooth muscle cell activates large-conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channel. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. C658-C665, 1993.
- WALDRON, G. J.; COLE, W. C. Activation of vascular smooth muscle K^+ channels by endothelium-derived relaxing factors. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 26, n. 2, p. 180-184, 1999.
- WANG, C. L.; LI, H. Q.; MENG, W. D.; QING, F. L. Trifluoromethylation of flavonoids and anti-tumor activity of the trifluoromethylated flavonoid derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 15, p. 4456-4458, 2005.
- WATTERSON, K. R.; RATZ, P. H.; SPIEGEL, S. The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. **Cell. Signall.**, v. 17, p. 289-298, 2005.
- WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv. Physiol. Educ.**, v. 27, p. 201-206, 2003.
- WELLMAN, G. C.; QUAYLE, J. M.; STANDEN, N. B. ATP-sensitive K^+ channel activation by calcitonin gene-related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle. **J. Physiol.**, v. 507, n. Pt 1, p. 117-129, 1998.
- WESTON, A. H.; EDWARDS, G. Recent progress in potassium channel opener pharmacology. **Biochem. Pharmacol.**, v. 43, p. 47-54, 1992.

WINKLHOFER, M.; MATTHIAS, K.; SEIFERT, G.; STOCKER, M.; SEWING, S.; HERGET, T.; STEINHAUSER, C.; SAALER-REINHARDT, S. Analysis of phosphorylation-dependent modulation of K_v1.1 potassium channels. **Neuropharmacol.**, v. 44, n. 6, p. 829-842, 2003.

WOLLENWEBER, E. **Flavones and flavonols**. In: Harborne, J. B. The Flavonoids Advances in Research Since 1986, Chapman and Hall Ed., Londres, 1994.

WOO, S. H.; MORAD, M. Bimodal regulation of Na(+)-Ca(2+) exchanger by beta-adrenergic signaling pathway in shark ventricular myocytes. **Proc. Natl. Acad Sci USA.**, v. 98, n. 4, p. 2023-2028, 2001.

WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 177, n. 1-2, p. 135-143, 2001.

WORD, R. A. Myosin phosphorylation and the control of miometrial contraction/relaxation. **Semin. Perinatol.**, 19, p. 3-14, 1995.

WRAY, S. Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. C1-C18, 1993.

WRAY, S.; KUPITTAYANANT, S.; SHMYGOL, A.; SMITH, R. D.; BURDYGA, T. The physiological basis of uterine contractility: a short review. **Exper. Physiol.**, v. 86, n. 2, p. 239-246, 2001.

YAEKURA, K.; YADA, T. [Ca²⁺]_i-reducing action of cAMP in rat pancreatic beta-cells: involvement of thapsigargin-sensitive stores. **Am. J. Physiol.**, v. 274, n. 2, p. C513-521, 1998.

YAMAGAGE, M.; HIRSHMAN, C. A.; CROXTON, T. L. Sodium nitroprusside stimulates Ca²⁺-activated K⁺ channels in porcine tracheal smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p. L338-L345, 1996.

YANG, S. K.; PARKINGTON, H. C.; BLAKE, A. D.; KEATING, D. J.; CHEN, C. Somatostatin increases voltage-gated K^+ currents in GH3 cells through activation of multiple somatostatin receptors. **Endocrinology**, v. 146, n. 11, p. 4975-4984, 2005.

YAO, Y.; CHOI, J.; PARKER, I. Quantal puffs of intracellular Ca^{2+} evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus oocytes*. *J. Physiol.*, v. 482, p. 533-553, 1995.

YU, F. H.; CATTERALL, W. A. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. **Science's Signal Transduction Knowledge Environment.**, v. 2004, n. 253, p. re15, 2004.

ZHOLOS, A. V.; KOMORI, S.; OHASHI, H.; BOLTON, T. B. Ca^{2+} inhibition of inositol trisphosphate-induced Ca^{2+} release in single smooth muscle cells of guinea-pig small intestine. **J. Physiol.**, v. 481, p. 97-109, 1994.

Apêndice

Spasmolytic Action of Diploptropin, a Furanoflavan from *Diploptropis ferruginea* Benth., Involves Calcium Blockade in Guinea-Pig Ileum

Julianeli T. Lima^a, Jackson R. G. S. Almeida^a, José Maria Barbosa-Filho^a,
Temilce S. Assis^{a,b}, Marcelo S. Silva^a, Emídio V. L. da-Cunha^{a,c}, Raimundo Braz-Filho^d,
and Bagnólia A. Silva^a

^a Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, P.O. Box 5009,
58051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil

^b Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba, 58051-970, João Pessoa,
Paraíba, Brazil

^c Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, 58100-000, Campina Grande,
Paraíba, Brazil

^d Setor de Química de Produtos Naturais, LCQUI-CCT, Universidade Estadual do Norte Fluminense,
28015-620, Campos, Rio de Janeiro, Brazil

Reprint requests to Dr. J. M. Barbosa-Filho or Dr. B. A. Silva. Tel/Fax: +55-83-216-7364.
E-mail: jbarbosa@ltf.ufpb.br or bagnolia@ltf.ufpb.br

Z. Naturforsch. **60b**, 1–8 (2005); received June 6, 2004

Diploptropis ferruginea Benth. (Fabaceae) is a tree popularly known in Northeastern Brazil as “sucupira-preta”. In the present work, the isolation, identification and pharmacological activity of a furanoflavan-type flavonoid (2,3-*trans*-3,4-*trans*)-3,4,5,8-tetramethoxy-(6,7,2”,3”)–furanoflavan, which received the trivial name diploptropin is reported. The structure was determined by means of spectroscopic techniques, especially EIMS and 1D and 2D NMR. Diploptropin (10^{-8} – $3 \cdot 10^{-4}$ M) inhibited the phasic contractions induced by both acetylcholine ($IC_{50} = 4.6 \pm 0.8 \cdot 10^{-5}$ M) and histamine ($IC_{50} = 2.3 \pm 1.1 \cdot 10^{-5}$ M) in guinea-pig ileum. Diploptropin relaxed the ileum pre-contracted with KCl ($EC_{50} = 3.9 \pm 1.1 \cdot 10^{-6}$ M), acetylcholine ($EC_{50} = 3.7 \pm 1.6 \cdot 10^{-6}$ M) and histamine ($EC_{50} = 4.4 \pm 1.4 \cdot 10^{-5}$ M) in a concentration-dependent manner. As the maintenance of tonic contraction induced by these contractile agents involves Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels, it is suggestive that this relaxation may be due to the blockade of Ca^{2+} influx through those channels. This hypothesis was confirmed by the observation that diploptropin antagonized ($pD'_2 = 4.83 \pm 0.37$) $CaCl_2$ induced contractions in Ca^{2+} -free depolarizing medium ($IC_{50} = 1.5 \pm 0.8 \cdot 10^{-5}$ M).

Key words: *Diploptropis ferruginea*, Spasmolytic Action, Guinea-Pig Ileum

Introduction

The Leguminosae or Fabaceae is a large family of herbs, shrubs and trees. It is comprised by approximately 700 genera and 17,000 species showing a cosmopolitan distribution in tropical, subtropical and temperate zones [1]. This family is subdivided in three subfamilies: Mimosoideae, Caesalpinioideae and Papilionoideae, and the last is constituted of about 400 genera and 12,000 species [2]. Within these genera, the genus *Diploptropis* is included, totaling 22 species.

Few studies are found about the genus *Diploptropis*. There are only three papers describing the isolation of quinolizidine alkaloids from *Diploptropis martiusii* [3], flavonoids, steroids and triterpene from *Diploptropis pupurea* [4], benzenoid and triterpene from *Diploptropis*

ferruginea [5]. The species *Diploptropis ferruginea* Benth. (Fabaceae) is a tree, 10–12 m tall and is popularly known in Northeastern Brazil as “sucupira-preta”, where it is used in folk medicine to treat symptoms of rheumatism, arthritis and diabetes [6]. The tree is widely distributed in the states of Bahia and Rio Grande do Norte, Brazil.

A search on NAPRALERT database (NATURAL PRoducts ALERT) and Web of Science did not show any reference to the species *D. ferruginea* Benth. However, previous studies from this research group have shown that the crude ethanol extract (CEE) obtained from the stem-barks of this plant exhibited non-selective spasmolytic effects in all tissues tested (rat aorta and uterus, guinea-pig ileum and trachea) [7].

There have been papers demonstrating that flavonoids have effects on intestinal motility both *in vitro* and *in vivo*. For example, it was reported that quercetin and other flavonoids inhibited guinea-pig ileum induced contractions [8,9]. Capasso *et al.* [10] screened 13 flavonoids (apigenin, catechin, chrysin, flavone, hesperetin, kaempferol, morin, myricetin, naringenin, naringin, phloridzin, quercetin and taxifolin) on contractions in guinea-pig ileum induced by PGE₂, LTD₄, acetylcholine and BaCl₂. These spasmolytic effects of flavonoids may have been due to a nonspecific action since they were also found to inhibit acetylcholine and BaCl₂ induced contractions. These authors concluded that the spasmolytic effects displayed by the flavonoids were related to an inhibition of the calcium influx and/or calcium release from intracellular stores.

Thus, given the importance of the pharmacological actions of other flavonoids in isolated guinea-pig ileum and knowing that no pharmacological study has been done using this species and that other species belonging to Fabaceae family have ethnomedicinal use to the treatment of intestinal cramps and chronic diarrhea [6]. The aim of the present study was to report the isolation and identification of a new furanoflavan-type flavonoid (diploptropin) as well as to investigate the effect of diploptropin in isolated guinea-pig ileum and to verify the mechanism of action of this flavonoid.

Material and Methods

Plant material

The stem-bark of *D. ferruginea* Benth. was collected in September 2002 near the city of Caraubas in the state of Rio Grande do Norte – Brazil and identified by the botanist, Dr. Maria de Fátima Agra, from the Setor de Botânica of the Laboratório de Tecnologia Farmacêutica of the Universidade Federal da Paraíba. A voucher specimen (Agra 5559) was authenticated and deposited in the Herbarium Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), Departamento de Sistemática e Ecologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

General procedures

Melting points were determined on a REICHERT, model R3279 “Kofler” apparatus, with a temperature range of 0–350 °C and are uncorrected. ¹H NMR (400 MHz) and ¹³C NMR (100 MHz) were recorded at room temperature with a Jeol Eclipse 400 spectrom-

eter with an 5 mm multinuclear probe. The spectra were recorded in CDCl₃, and the solvent signals (7.26 and 77.00 ppm, respectively) were used as reference. The chemical shifts (δ) are given in ppm, and the coupling constant *J* (in Hz). The two dimensional (2D) experiments were acquired and processed with the Delta software provided by Jeol. Mass spectra were measured on a Shimadzu spectrometer.

Extraction and isolation

The crude ethanol extract (CEE) was obtained according to Almeida *et al.* (2003) [5]. The dried and powdered stem-barks (10 kg) of *D. ferruginea* were extracted with EtOH (95%), yielding, 413 g of crude ethanol extract (CEE). The CEE was suspended in H₂O and partitioned with hexane and CHCl₃. The hexane extract (55.6 g) was dissolved in hot MeOH and left in a freezer for 24 h, yielding a yellow precipitate, which after recrystallization from hexane yielded (**1**) (2.35 g).

(2,3-trans-3,4-trans)-3,4,5,8-Tetramethoxy-(6,7,2'',3'')-furanoflavan

Yellow crystals, $[\alpha]_D^{23} + 47^\circ$ (CHCl₃, c 0.425); melting point 114–115 °C; IR $\nu_{\max}$ (KBr): 1300, 1285, 1271 and 1250 cm⁻¹. EIMS, *m/z* 370 ([M]⁺); ¹H and ¹³C data (Table 1).

Animals

Adult guinea-pigs (*Cavia porcellus*, 300–500 g) obtained from the Thomas George Biotery, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica of the Universidade Federal da Paraíba, were used. The animals were submitted the following conditions: 12 h light : 12 h dark cycle, ventilation and temperature controlled (27 ± 2 °C) and received water and food pellets *ad libitum*. All sets of experiments were carried out in the period of 07:00–14:00 h.

Study of spasmolytic activity of diploptropin

Tissue preparation

To perform *in vitro* studies, the guinea-pig ileum was prepared according to Daniel *et al.* [11]. The guinea-pigs were killed by cervical dislocation, the abdomen opened and the ileum was immediately removed. Only the distal portions, with 3 cm length, were used. The tissues were placed in 6 ml isolated

Table 1. ^1H (400 MHz) and ^{13}C (100 MHz) NMR for **1** in CDCl_3 as solvents and residual CDCl_3 used as internal references (δ_{H} 7.24 and δ_{C} 70.00), compared with data described in the literature for linear (**1**) and its angular isomer.^{a,b} Chemical shifts (δ , ppm) and coupling constants (J , Hz, in parenthesis).*

	1 (This paper)			Literature data		Angular isomer	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C							
5	147.29	—		H-4; MeO-5	—	147.6	—
6	113.74	—	H-3''	H-2''	—	114.1	—
7	148.53	—		H-2''; H-3''	—	148.9	—
8	129.62	—		MeO-8	—	130.0	—
9	144.99	—		H-2; H-4	—	145.4	—
10	111.02	—	H-4	H-3	—	111.4	—
1'	138.79	—	H-2	H-3; H-3'/H-5'	—	139.1	—
CH							
2	80.45	5.02 (d, 6.6)		H-2'/H-6'; H-4	5.02 (d)	80.5	5.15 (d, 6.5)
3	82.84	3.90 (dd, 6.6, 4.4)	H-2; H-4	MeO-3	4.10–3.90 (dd)	82.9	3.91 (dd, 6.5, 4.7)
4	74.47	4.79 (d, 4.4)	H-3	H-2; MeO-4	4.80–4.78 (d)	74.5	4.66 (d, 4.7)
2', 6'	126.56	7.46 (dd, 8.0, 1.4)		H-2; H-4'	7.50–7.28 (m)	126.6	7.39 (m)
3', 5'	128.19	7.36 (t, 8.0)			7.50–7.28 (m)	128.2	7.39 (m)
4'	127.72	7.30 (dd, 8.0, 1.4)		H-2'/H-6'	7.50–7.28 (m)	127.7	7.39 (m)
2''	143.51	7.50 (d, 2.6)	H-3''		7.52 (d, 2.0)	143.5	7.51 (d, 2.2)
3''	104.80	6.86 (d, 2.6)	H-2''		6.84 (d, 2.0)	104.8	6.82 (d, 2.2)
CH₃							
MeO-3	58.32	3.29 (s)		H-3	3.38 (s)	58.3	3.28 (s)
MeO-4	56.71	3.35 (s)		H-4	3.44 (s)	56.7	3.38 (s)
MeO-5	60.55	4.06 (s)			4.08 (s)	60.6	4.07 (s)
MeO-6	—	—	—	—	—	—	3.98 (s)
MeO-8	61.33	4.04 (s)			4.04 (s)	61.3	—

^a Number of hydrogens bound to carbon atoms deduced by comparative analysis of HBBB- and APT ^{13}C NMR spectra. Homonuclear 2D ^1H - ^1H -COSY spectrum was also used in these assignments. Chemical shifts and coupling constants (J) obtained from 1D ^1H NMR spectrum.

^b Chemical shift in disaccord with the prevision based in the comparative analysis of these furanoflavan.

organ baths containing modified Krebs solution with the following composition (mM): NaCl 117, KCl 4.7, CaCl_2 2.5, MgSO_4 1.3, NaH_2PO_4 1.2, NaHCO_3 25, glucose 11 dissolved up in distilled water and bubbled continuously with a 95% O_2 and 5% CO_2 gas mixture and maintained at 37 °C. The pH was adjusted to 7.4 with HCl 1 N. Tension changes were recorded through an isometric force transducer (7003) counterbalanced by 1 g loading, connected with a polygraph (Gemini 7070), both from Ugo Basile (Italy). The phasic contractions were recorded using isotonic levers coupled to kymographs and smoked drums.

At the beginning of each experiment, the reactivity of the tissue preparations was tested with KCl (40 mM). After washout and 30 min recovery in modified Krebs solution, contractions were evoked by adding KCl (40 mM), acetylcholine or histamine (10^{-6} M).

Effect of diploptropin on histamine- or acetylcholine-induced contractions in guinea-pig ileum

Two simple concentration-response curves were obtained for both histamine and acetylcholine.

Diploptropin was then added and after an incubation period of 15 min (time required to produce maximum effects), a third concentration-response curve was constructed in the presence of diploptropin. The tissue was washed when the agonist responses had returned to resting level. The procedure was repeated in the presence and absence of various concentrations of diploptropin. Inhibition was measured by comparing the response before and after addition of the furanoflavan in the organ bath, and IC_{50} values were obtained graphically from simple concentration-response curves.

Mechanism of action of diploptropin on guinea-pig ileum: Effect of diploptropin on tonic contractions induced by histamine, acetylcholine or KCl

After stabilization of the preparations, an isometric contraction was elicited to a concentration of histamine (10^{-6} M), acetylcholine (10^{-6} M) or KCl (40 mM), which gave a response at 60–75% of the maximum (determined from preliminary experiments). Histamine, acetylcholine or KCl remained in contact with the preparation until a plateau of contraction was reached (approximately 8 min), after that time

the tissue was washed. After a further 30 min, the process was repeated and at the plateau of contraction, diploptropin was added cumulatively. Subsequent concentrations were added only after the response to the previous concentration became stable. The relaxant effect induced by diploptropin was expressed as the percentage of relaxation (100% when baseline was reached) of the maximal contractile tension induced by histamine, acetylcholine or KCl.

Effect of diploptropin on Ca^{2+} -induced contractions in Ca^{2+} -free depolarizing solution

The strips were prepared as described before. To access the effect of diploptropin on the influx of Ca^{2+} through the voltage-dependent Ca^{2+} channels [12, 13], the strips were bathed for 30 min. in modified Krebs solution and then exposed for 45 min to high- K^+ Ca^{2+} -free depolarizing solution at the following composition (mM): NaCl 51.7, KCl 70, MgSO_4 1.3, NaH_2PO_4 1.2, NaHCO_3 25, glucose 11. In general, two cumulative concentration-response curves to CaCl_2 were obtained at 60 min intervals in each preparation [14]. After obtaining the first curve, washing and complete relaxation, different concentrations of diploptropin were added to the bath and left in contact with the tissue for 15 min. Then, a second cumulative concentration-response curve to CaCl_2 was obtained in the presence of the furanoflavan. The maximal contraction obtained with the first concentration-response curve to CaCl_2 was taken as 100%, and all contractions were calculated as a function of this value. Each preparation was exposed to only one concentration of diploptropin. Inhibition of CaCl_2 responses was calculated by comparing the response in the absence or presence of the diploptropin. The IC_{50} values were calculated as described before.

Statistical analysis

Values were expressed as means $\pm$ S. E. M. and “n” refers to the number of animals used in each set of experiments. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism® 3.03 software (GraphPad Software Inc., San Diego CA). The EC_{50} , IC_{50} and pD'_2 values were determined by non-linear regression from concentration-response curves [15, 16]. Differences between the means were statistically compared using Student's test and/or one-way ANOVA followed by Bonferroni's test, as appropriate, and were considered to differ significantly when $p < 0.05$.

Results

Structural determination of compound 1

The EIMS spectrum of diploptropin (**1**) revealed a molecular ion peak at m/z 370 ($[\text{M}]^+$) which together with the ^1H (1D and 2D ^1H - ^1H -COSY), ^{13}C (HBBD and APT) and ^1H - ^{13}C -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 1$, HMQC; $n = 2$ and 3, HMBC) NMR spectral data (Table 1) led to deduction of the molecular formula $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_6$ (11 degrees of unsaturation) compatible with a flavan skeleton. The 1D ^1H and ^{13}C (HBBD and APT) together with the 2D ^1H - ^{13}C -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 1$, HMQC; $n = 2$ and 3, HMBC) NMR spectra led to the elucidation of a highly methoxylated flavan with a furan ring bonded to ring A and having an unsubstituted ring B. The ^1H NMR spectrum revealed the presence of a phenyl group by signals at $\delta_{\text{H}} = 7.46$ (dd, $J = 8.0$ and 1.4 Hz, H-2'/H-6'), 7.36 (t, $J = 8.0$ Hz, H-3'/H-5') and 7.30 (dd, $J = 8.0$ and 1.4 Hz, H-4'), which showed correlations in the HMQC with ^{13}C signals at $\delta_{\text{C}} = 126.56$ (CH-2'/CH-6'), 128.19 (CH-3'/CH-5') and 127.72 (CH-4'). The location of this phenyl group at the carbinolic carbon atom CH-2 [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$: 5.02 (d, 6.6 Hz)/ 80.45] was deduced by heteronuclear long-range spin-spin interactions between C-1' ($\delta_{\text{C}} = 138.79$) with H-3'/H5' ($\delta_{\text{H}} = 7.36$, $^3J_{\text{CH}}$), H-2 ($\delta_{\text{H}} = 5.02$, $^2J_{\text{CH}}$) and H-3 ($\delta_{\text{H}} = 3.90$, $^3J_{\text{CH}}$) as well as by correlations of the ^{13}C signal of the CH-2 ($\delta_{\text{C}} = 80.45$) with both the ^1H signals at $\delta_{\text{H}} = 7.46$ (H-2'/H-6', $^3J_{\text{CH}}$) and 4.79 (H-4', $^3J_{\text{CH}}$) observed in the HMBC spectrum. The homonuclear spin-spin couplings of H-3 ($\delta_{\text{H}} = 3.90$) with both H-2 ($\delta_{\text{H}} = 5.02$) and H-4 ($\delta_{\text{H}} = 4.79$) were revealed by the 2D ^1H - ^1H -COSY spectrum, which also showed the interaction of H-2'' ($\delta_{\text{H}} = 7.50$, d, $J = 2.6$ Hz) and H-3'' ($\delta_{\text{H}} = 6.86$, d, $J = 2.6$ Hz) of the furan ring. The direct heteronuclear correlations of these ^1H signals of the heterocyclic (ring C) and furan ring with the corresponding ^{13}C signals was deduced through cross-peaks observed in the HMQC spectrum: $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$: $5.02/80.45$ (CH-2), $3.90/82.84$ (CH-3), $4.79/74.47$ (CH-4), $7.50/143.51$ (CH-2'') and $6.86/104.80$ (CH-3''). The identification of the ^1H signals of the MeO-3 and MeO-4 was based in the HMBC spectrum, which showed spin-spin interaction ($^3J_{\text{CH}}$) of the CH-3 ($\delta_{\text{C}} = 82.84$) with MeO-3 ($\delta_{\text{H}} = 3.29$) and CH-4 ($\delta_{\text{C}} = 74.47$) and MeO-4 ($\delta_{\text{H}} = 3.35$), as shown in Table 1. The presence of a methoxy group at carbon C-5 ($\delta_{\text{C}} = 147.29$) was established by long-range interaction of the signal at $\delta_{\text{C}} = 147.29$ (C-5) with both H-4 ($\delta_{\text{H}} = 4.79$, $^3J_{\text{CH}}$)

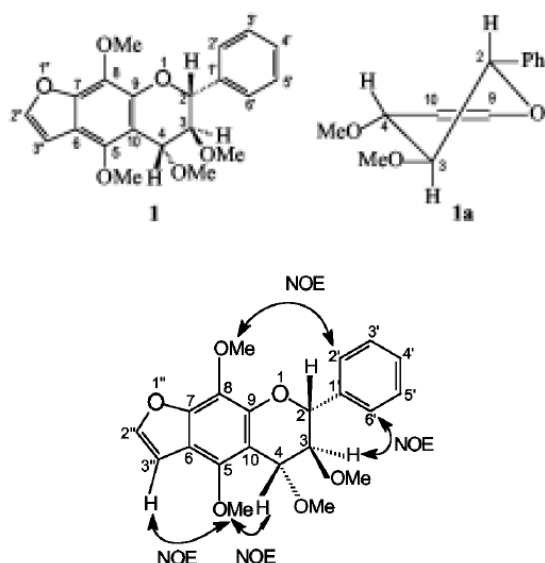


Fig. 1. Important ^1H - ^1H NOESY correlations for diploptropin (1).

and MeO-5 ($\delta_{\text{H}} = 4.06$, $^3J_{\text{CH}}$). The dipolar-dipolar interaction revealed by NOE effect (Fig. 1) between the hydrogen atoms of the MeO-5 ($\delta_{\text{H}} = 4.06$) and H-3'' ($\delta_{\text{H}} = 6.86$) was used to locate the carbon atoms C-6 and C-7 of the flavan skeleton in the furan ring (1). Consequently, the remaining methoxy group ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$: 4.04/61.33) was located at C-8, which was confirmed by the long-range coupling of C-8 ($\delta_{\text{C}} = 129.62$) with the hydrogens of the MeO-8 ($\delta_{\text{H}} = 4.04$, $^3J_{\text{CH}}$). The ^{13}C chemical shifts of the methoxyl groups MeO-5 ($\delta_{\text{C}} = 60.55$) and MeO-8 ($\delta_{\text{C}} = 61.33$) are in accor-

dance with their localizations in hindrance positions. A methoxy group linked to sp^2 carbon atom and located at a position without steric hindrance reveals ^{13}C signals about $\delta_{\text{C}} = 56$ ppm.

The relative stereochemistry of (1) was determined from the coupling constants revealed by ^1H signals corresponding to H-2, H-3 and H-4 (Table 1) and by NOE effects observed ^1H - ^1H -NOESY spectrum (Fig. 1). The values corresponding to the vicinal interaction ($^3J_{\text{H,H}}$) between the hydrogens H-2 and H-3 ($J = 6.6$ Hz) and H-3 (dd, $J = 6.6$ and 4.4 Hz) with both H-2 and H-4 ($J = 4.4$ Hz) are consistent with the relative configuration showed in (1) and (1a).

Consistent with these deductions, the NOESY spectrum showed cross peaks attributed to dipolar interaction (space proximity, Fig. 1), which was also used to confirm the location of the methoxyl groups: MeO-8 ($\delta_{\text{H}} = 4.04$) with H-2'/H-6' ($\delta_{\text{H}} = 7.46$); MeO-5 ($\delta_{\text{H}} = 4.06$) with both H-3'' ($\delta_{\text{H}} = 6.86$) and H-4 ($\delta_{\text{H}} = 4.79$); H-3 ($\delta_{\text{H}} = 3.90$) with H-2'/H-6' ($\delta_{\text{H}} = 7.46$) and H-2 ($\delta_{\text{H}} = 5.02$) with H-4 ($\delta_{\text{H}} = 4.79$).

All the data discussed above led to deduce the relative configuration (2,3-*trans*-3,4-*trans*)-3,4,5,8-tetramethoxy-(6,7,2'',3'')-f uranoflavan (1). Despite the great distribution of flavonoids in nature, this type of structure was only found in *Derris araripensis* and *Lonchocarpus subglaucescens* [17]. The NOE effect between MeO-8 and H-2'/H-6' (Fig. 1) points to the possibility of an induced deshielding in the H-2 of the isomer (2,3-*trans*-3,4-*trans*)-3,4,5,6-tetramethoxy-(7,8:2'',3'')-f uranoflavan (angular isomer) [17] by an anisotropic effect, in accordance with the difference observed in the chemical shifts of the H-2 and H-4 of

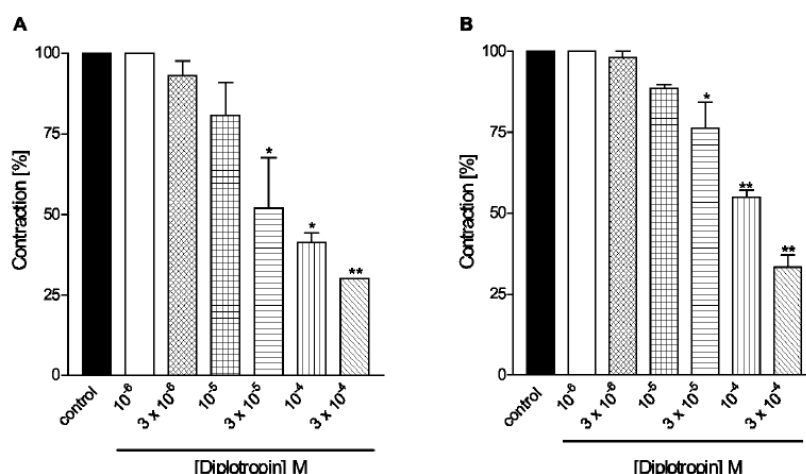


Fig. 2. Effect of diploptropin on phasic contractions induced by 10^{-6} M histamine (A) and acetylcholine (B) in guinea-pig ileum. The columns and bars represent the means and S.E.M., respectively ($n = 4$). Significant differences are indicated by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ (control $\times$ diploptropin; Student's test).

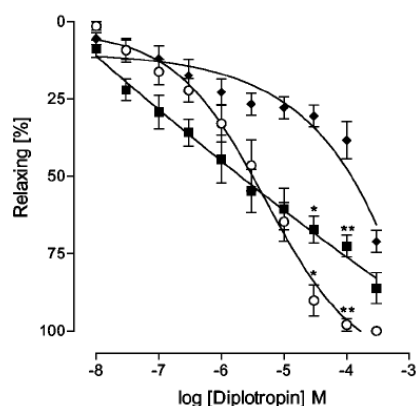


Fig. 3. Effect of different concentrations of diploptropin on the 10^{-6} M histamine (◆)-, 10^{-6} M acetylcholine (■)- and 40 mM KCl (○)-induced tonic contractions in guinea-pig ileum. The symbols and vertical bars shown on the figure represent the means and S.E.M., respectively ($n = 6$). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ (KCl $\times$ acetylcholine, Student's test).

the linear (1) and angular isomers, without neglecting the possibility of a small conformational change. Thus, this angular isomer revealing signals of H-2, H-3 and H-4 with approximately same values of coupling constants observed in the linear isomer (*e.g.* 1) may also represent relative configuration (2,3-*trans*-3,4-*trans*).

Effect of diploptropin on histamine- or acetylcholine-induced contractions in guinea-pig ileum

Diploptropin (10^{-8} – $3 \cdot 10^{-4}$ M) inhibited the phasic contractions induced by both histamine or acetylcholine (Fig. 2A and B, respectively). The corresponding values of IC_{50} obtained graphically were 2.3 ± 1.1 and $4.6 \pm 0.8 \cdot 10^{-5}$ M for histamine and acetylcholine, respectively.

Mechanism of action of diploptropin on guinea-pig ileum: Effect of diploptropin on tonic contractions induced by histamine, acetylcholine or KCl

Cumulative addition of diploptropin during the development of the tonic component of the contractions resulted in a concentration-dependent relaxation in the guinea-pig ileum that had been precontracted with histamine (10^{-6} M), acetylcholine (10^{-6} M) or KCl (40 mM) (Fig. 3). The threshold concentration of diploptropin was 10^{-8} M for histamine, acetylcholine or KCl induced contractions, but maximal relaxation occurred at $3 \cdot 10^{-4}$ M for all tested contractile agents (Fig. 3). The EC_{50} values (Fig. 4) were $4.4 \pm 1.4 \cdot$

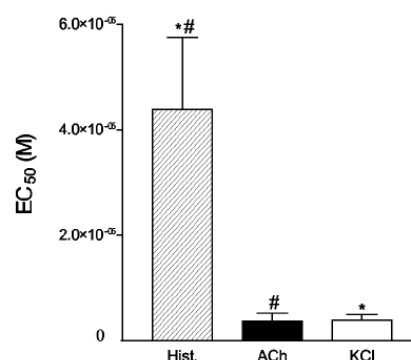


Fig. 4. EC_{50} values of diploptropin on the histamine-, acetylcholine- or KCl-induced tonic contractions in guinea-pig ileum. The columns and bars represent the means and S.E.M., respectively ($n = 6$). One-way ANOVA followed by Bonferroni's test. Significant differences are indicated by * $p < 0.05$. (histamine $\times$ acetylcholine or histamine $\times$ KCl).

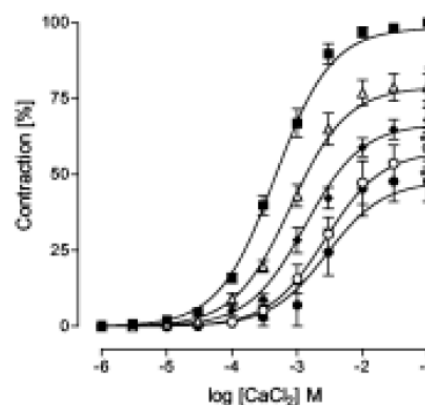


Fig. 5. Concentration-response curves to $CaCl_2$ in Ca^{2+} -free and high- K^+ depolarizing solution in guinea-pig ileum in the absence, control (■) and presence of diploptropin [M]: 10^{-5} (△); $3 \cdot 10^{-5}$ (◆); 10^{-4} (○) and $3 \cdot 10^{-4}$ (●). Contractions expressed as percentage of the maximum control responses. Values are mean $\pm$ S.E.M. for 5 experiments. One-way ANOVA followed by Bonferroni's test. Significant differences are indicated by * $p < 0.05$ (control $\times$ diploptropin [M]: 10^{-5} ; $3 \cdot 10^{-5}$) and ** $p < 0.001$ (control $\times$ diploptropin [M]: 10^{-4} ; $3 \cdot 10^{-4}$).

10^{-5} M, $3.7 \pm 1.6 \cdot 10^{-6}$ M and $3.9 \pm 1.1 \cdot 10^{-6}$ M for histamine, acetylcholine and KCl, respectively.

Effect of diploptropin on Ca^{2+} -induced contractions in Ca^{2+} -free depolarizing solution

Fig. 5 shows the mean cumulative concentration-response curves for $CaCl_2$ alone and in the presence of

different concentrations of diploptropin (10^{-5} , $3 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} and $3 \cdot 10^{-4}$ M). Diploptropin produced a non parallel and concentration-dependent rightward shift of the concentration-response curve to CaCl_2 , significantly reducing the maximal response ($\text{IC}_{50} = 1.5 \pm 0.8 \cdot 10^{-5}$ M). Analysis of the data showed a linear regression and the value of linear correlation coefficient (r^2) was 0.7. The pD'_2 and Schild slope values were 4.83 ± 0.37 and -0.62 ± 0.23 , respectively, indicating a non-competitive blockade.

Discussion

In the present study, we have investigated the effects of diploptropin on intestinal smooth muscle, and the most important finding in this work is the demonstration that diploptropin exerts a nonselective spasmolytic action, and that this effect is due in part to the inhibition of Ca^{2+} influx through the voltage-dependent Ca^{2+} channels.

Since diploptropin inhibited the contractions induced by different contractile agents in smooth muscle of guinea-pig ileum (Figs 2 and 3), it would be reasonable to affirm that diploptropin has no selectivity to the contractile agents tested. Moreover, as the IC_{50} and EC_{50} values were not significantly different, it can be suggested that diploptropin may be acting by a similar pathway in the tissue studied.

In the guinea-pig ileum, the phasic component is reached at 15 sec after the contact of the stimulus with the tissue, while the tonic component is reached after 8 min under the same conditions [18].

In order to verify whether diploptropin acts on Ca^{2+} influx across the membrane, we evaluated its effect on the tonic component of the contractile response induced by acetylcholine, histamine or KCl in isolated guinea-pig ileum. As shown in Fig. 3, diploptropin relaxed in a concentration-dependent manner the pre-contracted ileum with the previously mentioned contracting agents. Independently of the contraction be-

ing evoked by either pharmacomechanical or electromechanical coupling, the maintenance of the tonic component involves activation of voltage-dependent Ca^{2+} channels [19]. Therefore we can postulate that diploptropin may be acting by the blockade of Ca^{2+} influx through these channels to produce nonselective spasmolytic effects.

The confirmation of this hypothesis resulted from the observation that diploptropin inhibited in a concentration-dependent manner the CaCl_2 -induced contractions in guinea-pig ileum in Ca^{2+} -free depolarizing solution (Fig. 5). Whether the flavonoid inhibits the Ca^{2+} influx across the membrane acting indirectly on voltage-dependent Ca^{2+} channels, blocking protein kinase C or opening potassium channels, these are questions that need to be answered.

Flavonoids are capable of modulating the activity of many enzymes and have a remarkable spectrum of biochemical and pharmacological activities [20]. Furthermore, the behavior of many cell systems, suggest that these substances may possess significant gastrointestinal, antihepatotoxic, antiallergic, antiinflammatory, antiosteoporotic and even antitumor activities [21]. Many of the biological actions of flavonoids have been attributed to their antioxidant properties; however the precise mechanisms by which flavonoids exert their beneficial or toxic actions remain unclear.

In conclusion, we have shown that diploptropin produces spasmolytic effect in guinea-pig ileum and that this effect is due in part to the inhibition of Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels. However, we do not discard other possible mechanisms that have not been studied yet.

Acknowledgements

The authors thank Vicente Carlos O. Costa, Raimundo Nonato S. Filho, and José Crispim Duarte for providing technical assistance.

This work was supported by CNPq, CAPES and IMSEAR (Brazil) for grants and fellowships.

- [1] V. H. Heywood, in V. H. Heywood (ed.): *Flowering plants of the world*, p. 149–152, B. T. Batsford Ltd., London (1996).
- [2] W. S. Judd, C. S. Campbell, E. A. Kellog, P. F. Stevens, *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*, p. 282–288, Sinauer Associates, Inc. USA (1999).
- [3] A. D. Kinghorn, M. F. Balandrin, L. J. Lin, *Phytochemistry* **21**, 2269 (1982).
- [4] R. Braz-Filho, O. R. Gottlieb, S. L. V. Pinho, F. J. Q. Monte, A. I. Rocha, *Phytochemistry* **12**, 1184 (1973).
- [5] J. R. G. S. Almeida, E. V. L. Da-Cunha, M. S. Silva, P. F. Athayde-Filho, R. Braz-Filho, J. M. Barbosa-Filho, *Rev. Bras. Farmacogn.* **13**, 44 (2003).
- [6] M. P. Corrêa, *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, p. 149, IBDF, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro (1984).

- [7] J. T. Lima, F. S. Claudino, F. A. Cavalcante, J. R. G. S. Almeida, J. M. Barbosa-Filho, B. A. Silva, *Braz. J. Pharm. Sci.* **39**, 158 (2003).
- [8] M. J. Fanning, P. Macander, G. Drzewiecki, E. Middleton, *Int. Arch. Aller. A. Imm.* **71**, 371 (1983).
- [9] P. J. Macander, *Prog. Clin. Biol. Res.* **213**, 489 (1986).
- [10] A. Capasso, A. Pinto, N. Mascolo, G. Autore, F. Capasso, *Phytother. Res.* **5**, 85 (1991).
- [11] E. E. Daniel, C. Y. Kwan, L. Janssen, *J. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 159 (2001).
- [12] G. B. Weiss, in G. B. Weiss (ed.): *New perspective on Calcium Antagonists*, p. 47 – 57, American Physiological Society, Bethesda, Maryland (1981).
- [13] T. Godfraind, R. Miller, M. Wibo, *Pharmacol. Rev.* **38**, 321 (1986).
- [14] J. M. Van-Rossum, *Arch. Int. Pharmacod. T.* **143**, 299 (1993).
- [15] H. O. Schild, *Br. J. Pharmacol.* **2**, 189 (1947).
- [16] D. H. Jenkinson, E. A. Barnard, D. Hoyer, P. P. A. Humphrey, P. Leff, N. P. Shankley, *Pharmacol. Rev.* **47**, 255 (1995).
- [17] A. F. Magalhães, A. M. G. A. Tozzi, B. H. L. N. Sales, E. G. Magalhães, *Phytochemistry* **42**, 1459 (1996).
- [18] B. A. Silva, V. L. A. Nouailhetas, J. Aboulafia, *Am. J. Physiol.* **277**, C739 (1999).
- [19] C. M. Rembold, in: M. Bárány (ed.): *Biochemistry of smooth muscle contraction*, p. 227 – 239, Academic Press, San Diego (1996).
- [20] G. Rusak, H. O. Gutzeit, J. Ludwig-Müller, *Food Technol. Biotech.* **40**, 267 (2002).
- [21] G. Di Carlo, N. Mascolo, A. A. Izzo, F. Capasso, *Life Sci.* **65**, 337 (1999).

Anexos

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

João Pessoa, 8 de junho de 2005.
CEPA Nº. 0508/05

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Prof^ª. Dr^ª. BAGNÓLIA ARAÚJO DA SILVA

Departamento/Setor: CCS/Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - LTF

Ref.: Projeto de Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ESPASMOLÍTICA DO 3,4,5,5-TETRAMETOXI(2",3",6,7) FURANOFLAVANA, FLAVONÓIDE ISOLADO DE *Diplotropis ferruginea* BENTH. (FABACEAE), E DOS SEUS DERIVADOS SINTÉTICOS

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

Atenciosamente,



Prof. Dr. REINALDO NOBREGA DE ALMEIDA
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB

LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA • UFPB • CAIXA POSTAL 5009 • CEP 58051-970
JOÃO PESSOA • PARAÍBA • BRASIL • FAX: (083) 216-7502 - 216-7511
FONE: (083) 216-7173 - 216-7125 • Home Page: <http://www.ltf.ufpb.br>

Anexo 2. Dados sobre o cálculo do logP para diplotropina.

Chemical Structure task started on Fri Sep 16, 2005 at 11:50 AM

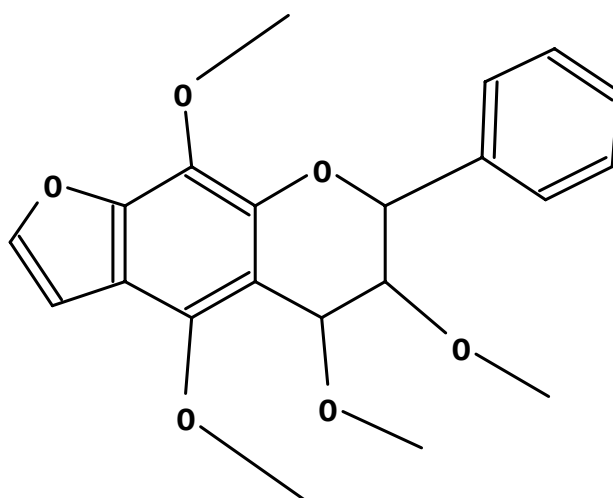
SEARCH for exact matches or related structures.

INCLUDE answers with additional components.

Search in substance classes.

Explored by Chemical Structure in REGISTRY.

Input structure:



Get References started for 179003-81-7

1 references were found for 179003-81-7 in CAPLUS and MEDLINE

Copyrights:

CAPLUS: Copyright © 2005 American Chemical Society. All Rights Reserved. (The UK patent material in this product/service is UK Crown copyright and is made available with permission. © Crown Copyright. The French (FR) patent material in this product/service is made available from Institut National de la Propriete Industrielle (INPI).)

MEDLINE: Produced by the U.S. National Library of Medicine

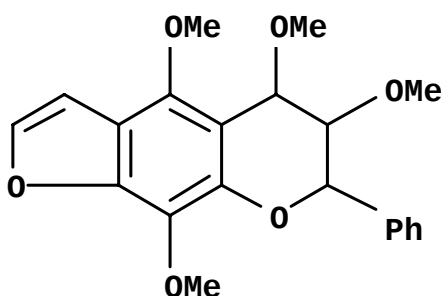
REGISTRY: Copyright © 2005 American Chemical Society. All Rights Reserved. (Some records contain information from GenBank(R). See also: Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Rapp B.A., Wheeler D.L. Genbank. Nucl. Acids Res. 28(1):15-18 (2000). Property values tagged with IC are from the ZIC/VINITI data file provided by InfoChem.)

CASREACT: Copyright © 2005 American Chemical Society. All Rights Reserved. (In addition to reactions indexed by CAS, CASREACT contains reactions derived from the following sources: ZIC/VINITI database (1974-1991) provided by InfoChem, INPI data prior to 1986, and Biotransformations database compiled under the direction of Professor Dr. Klaus Kieslich.)

CHEMLIST, CHEMCATS: Copyright © 2005 American Chemical Society. All Rights Reserved.

~1 Reference

Registry Number: 179003-81-7



Formula: C₂₁ H₂₂ O₆

CA Index Name: 5H-Furo[3,2-g][1]benzopyran, 6,7-dihydro-4,5,6,9-tetramethoxy-7-phenyl-(9CI)

-- Properties --

<u>Property</u>	<u>Calculated Value</u>	<u>Condition</u>	<u>Note</u>
Bioconc. Factor	123	pH 1	(1) ACD
Bioconc. Factor	123	pH 4	(1) ACD
Bioconc. Factor	123	pH 7	(1) ACD
Bioconc. Factor	123	pH 8	(1) ACD
Bioconc. Factor	123	pH 10	(1) ACD
Boiling Point	479.3±45.0 °C	Press: 760.0 Torr	(1) ACD
Enthalpy of Vap.	71.53±3.0 kJ/mol		(1) ACD
Flash Point	255.7±31.8 °C		(1) ACD
H acceptors	6		(1) ACD
H donors	0		(1) ACD
Koc	1090	pH 1	(1) ACD
Koc	1090	pH 4	(1) ACD
Koc	1090	pH 7	(1) ACD
Koc	1090	pH 8	(1) ACD
Koc	1090	pH 10	(1) ACD
logD	3.05	pH 1	(1) ACD
logD	3.05	pH 4	(1) ACD
logD	3.05	pH 7	(1) ACD
logD	3.05	pH 8	(1) ACD
logD	3.05	pH 10	(1) ACD
logP	3.053±0.437		(1) ACD
Molar Solubility	Sparingly Soluble	pH 1	(1) ACD
Molar Solubility	Sparingly Soluble	pH 4	(1) ACD
Molar Solubility	Sparingly Soluble	pH 7	(1) ACD
Molar Solubility	Sparingly Soluble	pH 8	(1) ACD
Molar Solubility	Sparingly Soluble	pH 10	(1) ACD
Molecular Weight	370.40		(1) ACD
Vapor Pressure	6.92E-9 Torr	Temp: 25.0 °C	(1) ACD

Notes:

(1) Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris V4.67 (© 1994-2005 ACD/Labs)

-- Resources --

References: ~1

STN Files: CAPLUS, CA

Database: REGISTRY (Copyright 2005 ACS)

Anexo 3. Valores de CE_{50} e E_{max} referentes à diplotropina em íleo isolado de cobaia pré-contráido com ACh (10^{-6} M), na situação controle ou na presença de bloqueadores de canais para K^+ (experimental).

CE_{50} (M)		Na presença de:	Teste “t” de Student (Controle x Experimental)	E_{max} (%)	
Controle	Experimental			Controle	Experimental
$2,05 \pm 0,6 \times 10^{-5}$	$6,5 \pm 3,4 \times 10^{-6}$	4-AP (3×10^{-4} M)	NS	$85 \pm 8,0$	$89 \pm 10,0$
$2,4 \pm 0,6 \times 10^{-5}$	$2,1 \pm 0,04 \times 10^{-4}$	IbTx (93 nM)	$p < 0,001$	$85 \pm 8,0$	$45 \pm 2,0$

Nota: Concentração molar (M); não-significante (NS).

Anexo 4. Valores de CE_{50} e E_{max} referentes à diplotropina em útero isolado de rata pré-contráido com Oci (10^{-2} UI/mL), na situação controle ou na presença de bloqueadores/inibidores diversos (experimental).

CE_{50} (M)			Na presença de:	Teste “t” de Student (Controle x Experimental)	E_{max} (%)	
Controle (KCl)	Controle (Oci)	Experimental			Controle	Experimental
NT	$1,7 \pm 0,5 \times 10^{-5}$	$3,8 \pm 0,7 \times 10^{-5}$	CsCl (5 mM)	$p < 0,05$	$80 \pm 7,5$	$70 \pm 1,0$
NT	$1,7 \pm 0,5 \times 10^{-5}$	$5,9 \pm 1,5 \times 10^{-5}$	TEA ⁺ (1 mM)	$p < 0,05$	$80 \pm 7,5$	$76 \pm 5,0$
NT	$1,7 \pm 0,5 \times 10^{-5}$	$2,3 \pm 0,4 \times 10^{-5}$	4-AP (0,3 mM)	NS	$80 \pm 7,5$	$75 \pm 3,5$
NT	$1,9 \pm 0,6 \times 10^{-5}$	$9,0 \pm 3,1 \times 10^{-5}$	IbTx (93 nM)	$p < 0,05$	$80 \pm 4,0$	$50 \pm 12,0$
$2,1 \pm 0,3 \times 10^{-5}$	NT	$1,3 \pm 0,6 \times 10^{-5}$	AMF (10^{-4} M)	NS	$85 \pm 2,5$	$97 \pm 2,0$

Nota: Concentração molar (M); não testado (NT); não-significante (NS).

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](#)