

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

RENATA DE SOUZA SAMPAIO

**Efeito vasorrelaxante do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. e seus
constituintes majoritários em artéria pulmonar de rato: mecanismo de ação do
timol**

João Pessoa - PB

2017

RENATA DE SOUZA SAMPAIO

Efeito vasorrelaxante do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. e seus constituintes majoritários em artéria pulmonar de rato: mecanismo de ação do timol

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: FARMACOLOGIA

Orientadora: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

João Pessoa - PB

2017

S192e Sampaio, Renata de Souza.

Efeito vasorrelaxante do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. e seus constituintes majoritários em artéria pulmonar de rato: mecanismo de ação do timol / Renata de Souza Sampaio. - João Pessoa, 2017.
142 f. : il.

Orientação: Bagnólia Araújo da Silva.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. efeito vasodilatador - LM-OE.
3. *Lippia microphylla* Cham. 4. Óleo essencial. I.
Silva, Bagnólia Araújo da. II. Título.

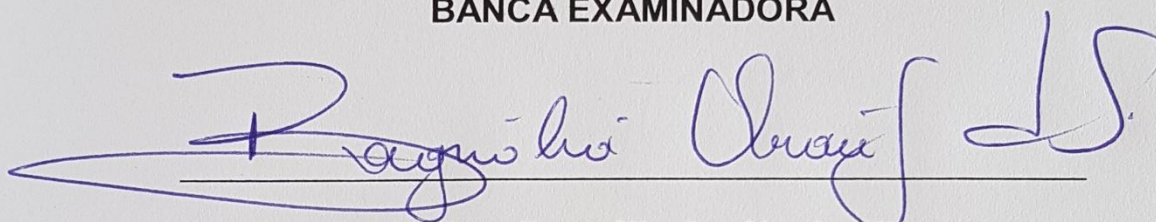
UFPB/BC

RENATA DE SOUZA SAMPAIO

Efeito vasorrelaxante do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. e seus constituintes majoritários em artéria pulmonar de rato: mecanismo de ação do timol

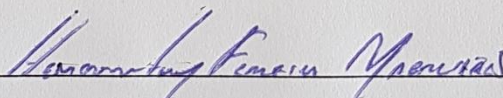
Aprovada em 31 / 08 / 2017

BANCA EXAMINADORA



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

Profa. Dra. Maria do Socorro de França Falcão
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Interna



Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Interno

Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Externa

Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Externo

Dedicatória



Aos meus pais, Maria das Graças de Souza e Raimundo Nonato Sampaio, por todo empenho e amor incondicional que tiveram por mim em todos os momentos de minha vida, por acreditarem no caminho que escolhi para minha vida e sempre o apoiarem. Sem eles nada seria possível.

Aos meus irmãos, Tamara de Souza Sampaio e David de Souza Sampaio, pelo suporte, momentos de desabafo e, de todas as maneiras possíveis, quererem o meu bem e minha felicidade. Por todo o amor, momentos de descontração e pelas boas risadas.

À minha tia Judite, que durante todo esse tempo me apoiou de maneira incondicional com tanto amor, fazendo o que podia para nos agradar e fazendo com que sentíssemos menos falta possível de casa e do colo de mãe. Sem ela a caminhada teria sido muito mais difícil.

À Audun Turoey, namorado, amigo e parceiro que me apoiou de maneira incondicional e irrestrita nessa etapa final. Um companheiro que sei que posso contar em todas as situações e que me completa a cada dia mais. E sei que a recíproca é verdadeira.

Agradecimentos



À Deus não só pelas conquistas, mas, principalmente pelos desafios colocados em minha vida, por ter me concedido a coragem, paciência e disposição para assim encontrar a melhor saída possível, que sempre nos deixa um aprendizado para a vida. Por mostrar que com tempo e perseverança toda e qualquer barreira pode ser transposta, por fazer tudo no tempo certo e por me mostrar, com cada desafio superado, que sou capaz.

À minha orientadora, Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva por aceitar me orientar mesmo sem nenhuma referência minha, pelo exemplo de moral e conduta que possui, por sempre me estimular a superar meus limites e me conhecer cada vez mais, me instigando a desenvolver capacidades que até então achava não possuir. Um molde de profissional e mestre que todos deveriam seguir, orientando não somente para a vida acadêmica, mas também para o mundo fora da universidade.

À Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante por todo empenho e por ser tão solícita comigo. Por sempre estar disposta a ajudar e contribuir no desenvolvimento não só deste trabalho, mas também para a resolução de qualquer problemática que houvesse no laboratório.

Ao Professor Dr. Josean Fachine Tavares pela gentileza em ceder o óleo utilizado neste trabalho.

Aos Professores Dra. Barbara Viviana de Oliveira Santos, Dra. Maria do Socorro de França Falcão, Dr. Rafael de Almeida Travassos e Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhaes por aceitarem participar da banca examinadora da defesa e ao Professores Dra. Leônia Maria Batista e Dr. Robson Cavalcante Veras por aceitarem participar dessa banca como suplente. Agradeço por todas as suas contribuições nessa etapa tão importante na minha formação acadêmica.

À todos que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, entre eles, Alana Cristina Costa, Aline de Freitas Brito, Ana Carolina de Carvalho Correia, Ana Caroline de Lima Silva, Antônio Raphael Cavalcanti, Barbara Cavalcanti, Elba Ferreira, Filipe Rodolfo de Oliveira, Giulyane Targino Moreno, Iara Leão de Souza, Indyra Figueiredo, José Lucas Galvão, Layanne Cabral da Cunha Araújo, Luan Diniz, Rafael Lima, Rayane Fernandes, Sarah Rebeca Ferreira, Thaynan Carvalho, Thiago Melo pela ajuda, amizade e boa convivência.

Ao Prof. Dr. Italo Rossi e a Profa. Dra. Carol Correia pela ajuda incondicional em todo o processo de seleção do doutorado bem como na realização do doutorado. Obrigada, em especial ao Italo, por estar presente me dando força e apoio em cada momento, pelas boas conversas e risadas, pela positividade, e por cada contribuição. Sua ajuda foi indispensável para que eu chegasse até aqui.

À Giuliana Amanda e Kimã Barbosa, em especial, por terem contribuído mais que diretamente para a realização deste trabalho, pelos inúmeros momentos e horas que me auxiliaram de maneira direta e imprescindível na realização inicial dos experimentos aqui constantes. Agradeço também pela amizade e troca de experiências enriquecedoras para mim. Vocês foram essenciais para que este trabalho tenha se concretizado.

À Maria da Conceição Correia Silva e Luiz Henrique César Vasconcelos por terem me auxiliado na obtenção de fração significativa dos dados presentes aqui, pelas discussões acerca de metodologias e pontos de vistas úteis no desenvolvimento e maturação desta tese, nas ajudas com cálculos e protocolos. Obrigada por serem sempre tão prestativos comigo e nunca me negarem ajuda.

À Joedna Pereira e Paula Benvindo por serem amigas tão especiais, presentes e tão positivas. Obrigada pelos conselhos, pela ajuda, conversas, troca de experiências, momentos de diversão, pelo colo nos momentos difíceis, e risadas essenciais para o alívio das tensões inerentes ao desenvolvimento da pesquisa científica. Sem vocês a caminhada teria sido bem mais árdua.

Ao Luiz Henrique Agra pela boa vontade e disponibilidade, por ter vindo em pleno final de semana e me auxiliado na parte experimental de dosagem de cAMP, que infelizmente não entraram neste trabalho.

Aos professores deste Programa de Pós-graduação que contribuíram tanto com a minha formação acadêmica.

À Coordenação do PPgPNSB em nome do Professor Dr. Josean Fachine Tavares pela competência com que coordenam este Programa.

Às funcionárias da coordenação da pós-graduação Caroline Manguiera e Dayana Brandão, por toda dedicação e eficiência.

Ao José Crispim Duarte pela competência e auxílio técnico nos mais variados problemas no Laboratório e no Biotério.

À Mônica Rodrigues por sua alegria, bom humor e por manter nosso ambiente de trabalho/estudo sempre em condições salutaras para nossas tarefas diárias.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida e pelo suporte técnico-científico através do Portal Periódicos, respectivamente.

À Universidade Federal da Paraíba, instituição responsável pela minha formação profissional.

À todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a produção desta tese de doutorado.

Muitíssimo obrigado!

Renata de Souza Sampaio

Resumo



A espécie *Lippia microphylla* Cham. foi descrita na Guiana e no Brasil, é popularmente conhecida como “alecrim-do-mato”, “alecrim-de-tabuleiro” e “alecrim-pimenta”, utilizada pela população como antisséptico ou no tratamento de doenças respiratórias, como resfriados, gripes, bronquite, tosse e asma. O óleo essencial dessa espécie (LM-OE) possui como compostos majoritários os monoterpenos isômeros de posição timol e carvacrol, que já foram descritas diversas atividades farmacológicas para esses compostos. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito vasodilatador do LM-OE e seus componentes majoritários em artéria pulmonar (AP) de rato. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo CEUA/UFPB (certidão: 0501/13). Foi observado que o LM-OE, timol e carvacrol relaxaram a artéria pulmonar do rato quando contraída com fenilefrina (FEN) tanto na ausência ($CE_{50} = 21,83 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$, $CE_{50} = 23,02 \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$, $CE_{50} = 15,8 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) como na presença ($CE_{50} = 29,1 \pm 5 \mu\text{g/mL}$, $CE_{50} = 6,6 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$, $CE_{50} = 20,4 \pm 4,2 \mu\text{g/mL}$) do endotélio funcional, porém, o timol na presença do endotélio foi mais potente em relaxar a AP, por isso decidiu-se investigar o mecanismo de ação desse composto nessa condição. A ativação dos receptores muscarínicos endoteliais é uma das principais vias de relaxamento do músculo liso, uma vez que a mesma irá induzir a ativação da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) e produção de óxido nítrico (NO). Para tanto, utilizou-se a atropina, um antagonista desses receptores. Os resultados evidenciaram que a potência relaxante foi reduzida em aproximadamente 4 vezes na presença do antagonista ($CE_{50} = 27,1 \pm 3,7 \mu\text{g/mL}$). Em seguida foi avaliado se o timol estaria modulando positivamente a eNOS para exercer seu efeito vasorrelaxante, para isso foi utilizado o L-NAME um inibidor seletivo dessa enzima. Observou-se que na presença desse bloqueador a potência relaxante do timol foi reduzida em aproximadamente 2 vezes ($CE_{50} = 14,7 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$). Visto isso, foi investigado a participação de outro importante fator relaxante derivado do endotélio, as prostaglandinas, no efeito relaxante do timol, para tanto foi utilizada a indometacina que é um bloqueador da ciclo-oxigenase (COX), enzima responsável pela produção de PGI_2 . Foi evidenciado que a potência relaxante do timol foi reduzida em cerca de 4 vezes ($CE_{50} = 27,7 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$). Como a indometacina foi mais eficaz em inibir o efeito vasorrelaxante do timol quando comparado com o L-NAME, decidimos seguir investigando a via das prostaciclinas (PGI_2). O receptor de PGI_2 no músculo liso de AP encontra-se acoplado a G_s que por sua vez irá ativar a ciclase de adenilil (AC), diante disso utilizou-se o IPA, bloqueador da AC. Foi observado que na presença do bloqueador a potência relaxante do timol foi cerca de 3 vezes menor ($CE_{50} = 18,0 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$). Seguindo a via, o próximo passo era investigar se o timol estaria modulando positivamente a PKA para exercer seu efeito vasorrelaxante, para isso foi utilizado o H-89, um inibidor dessa proteína. Nos resultados observou-se que timol foi cerca de 2 vezes menor na presença de H-89 ($CE_{50} = 13,7 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$). Como o mecanismo de contração do músculo liso envolve a participação dos íons K^+ e Ca^{2+} , foi avaliado se o timol estaria atuando nos canais desses íons para exercer seu efeito relaxante. Para isso eram induzidas contrações com 30 mM ou 80 mM de KCl, onde não foram observadas diferenças estatísticas entre as duas condições ($CE_{50} = 18,6 \pm 3,4$ e $15,1 \pm 2,2 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). Indicando que o composto estaria atuando em um passo comum à via, canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem (Ca_v). Para confirmar essa hipótese foram feitas curvas concentrações-resposta cumulativas ao $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência e na presença do timol, o qual antagonizou essas contrações, além de relaxar o órgão pré-contraído com S(-)-Bay K 8644 ($CE_{50} = 10,6 \pm 2 \mu\text{g/mL}$). Além disso, a potência relaxante do timol não foi alterada ($10,1 \pm 2,1 \mu\text{g/mL}$) na presença de Y-27632, um inibidor da Rho cinase (ROCK). Em conclusão, o timol atua modulando positivamente os receptores muscarínicos endoteliais, a eNOS e a via PGI_2 -AC-PKA, além de inibir os Ca_v1 para exercer seu efeito relaxante em artéria pulmonar de rato.

Palavras-chave: *Lippia microphylla*, timol, artéria pulmonar, endotélio, vasodilatador, cálcio

Abstract



The species *Lippia microphylla* Cham. has been described in Guyana and in Brazil, popularly known as “alecrim-do-mato”, “alecrim-de-tabuleiro” and “alecrim-pimenta”, used by the population as an antiseptic or in the treatment of respiratory diseases such as colds, flu, bronchitis, cough and asthma. The essential oil of this species (LM-OE) has as major compounds the monoterpenes isomers of position thymol and carvacrol, where several pharmacological activities have already been described for these compounds. Therefore, the objective of this study was to evaluate the vasodilatory effect of LM-OE and its major components in the pulmonary artery (AP) of the rat. All experimental protocols were approved by CEUA / UFPB (certificate: 0501/13). It was observed that LM-OE, thymol and carvacrol relaxed the pulmonary artery of the rat when contracted with FEN in the absence ($EC_{50} = 21,83 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$, $EC_{50} = 23,02 \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$, $EC_{50} = 15,8 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$, respectively) as in the presence ($EC_{50} = 29,1 \pm 5 \mu\text{g/mL}$, $EC_{50} = 6,6 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$, $EC_{50} = 20,4 \pm 4,2 \mu\text{g/mL}$) of the functional endothelium; Presence of the endothelium was more potent in relaxing the PA, so we decided to investigate the mechanism of action of this compound in this condition. Activation of endothelial muscarinic receptors is one of the main smooth muscle relaxation pathways, since this activation will induce eNOS activation and nitric oxide (NO) production. For this, atropine, an antagonist of these receptors, was used. The results showed that the relaxing potency was reduced by approximately 4 times in the presence of the blocker ($EC_{50} = 27,1 \pm 3,7 \mu\text{g/mL}$). We then evaluated whether the thymol was positively modulating eNOS to exert its vasorelaxant effect, for which the L-NAME was used as a selective inhibitor of this enzyme. It was observed that in the presence of this blocker the thymol relaxing potency was reduced by approximately 2-fold ($EC_{50} = 14,7 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$). Considering this, we investigated the participation of another important endothelial-derived relaxing factor, prostacyclins (PGI₂), in the thymol relaxing effect, for that it was used Indomethacin, which is a COX blocker, is the enzyme responsible for the production of PGI₂. It was evidenced that the thymol relaxing potency was reduced by about 4 times ($EC_{50} = 27,7 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$). As indomethacin was more effective in inhibiting the vasorelaxing effect of thymol when compared to L-NAME, we decided to further investigate the PGI₂ pathway. The PGI₂ receptor in AP smooth muscle is coupled to G_s which in turn will activate the adenylyl (AC) cyclase, on which we use the IPA, AC blocker. It was possible to observe that in the presence of the blocker the thymol relaxing potency was about 3 times lower ($EC_{50} = 18,0 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$). Following the pathway, the next step was to investigate whether thymol would be positively modulating PKA to exert its vasorelaxant effect, for which H-89, an inhibitor of this protein, was used. In the results we can observe that thymol was about 2-fold lower in the presence of H-89 ($EC_{50} = 13,7 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$). As the mechanism of smooth muscle contraction involves the participation of the K⁺ and Ca²⁺ ions, we were able to evaluate if the thymol is acting in the channels of these ions to exert their relaxing effect. For this, contractions were induced with 30 mM or 80 mM KCl, where no statistical differences were observed between the two conditions ($EC_{50} = 18,6 \pm 3,4$ e $15,1 \pm 2,2 \mu\text{g/mL}$, respectively). Indicating that the compound would be acting in a common post to the pathway, voltage-activated Ca²⁺ channels (Ca_v). To confirm this hypothesis, cumulative concentration-response curves were made to CaCl₂ in nominally non-Ca²⁺ depolarizing medium in the absence and presence of thymol, which antagonized these contractions, in addition to relaxing the pre-contracted organ with S-(-)- Bay K 8644 ($EC_{50} = 10,6 \pm 2 \mu\text{g/mL}$). In addition, the thymol relaxing potency was not altered ($10,1 \pm 2,1 \mu\text{g/mL}$) in the presence of Y-27632, a Rho kinase inhibitor (ROCK). In conclusion, thymol acts by modulating positively the endothelial muscarinic receptors, eNOS and the PGI₂-AC-PKA pathway, in addition to inhibiting Ca_v1 to exert their relaxing effect on the pulmonary artery of the rat.

Key-words: *Lippia microphylla*, thymol, pulmonary artery, endothelium, vasodilator, calcium

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Lippia microphylla</i> Cham. (Verbenaceae).....	32
Figura 2 – Estrutura dos monoterpenos timol (a) e carvacrol (b)	34
Figura 3 – Mecanismo fármaco-mecânico da contração muscular lisa pela ativação do sistema efetor $G_{q/11}$ - PLC- $\beta 1$	40
Figura 4 – Mecanismo de sensibilização ao Ca^{2+} desencadeado pela via $G_{12/13}$ -RhoA-ROCK	43
Figura 5 – Mecanismo do relaxamento no músculo liso induzido pelas vias efetoras do cAMP e pelo cGMP	46
Figura 6 – Esquema ilustrando a circulação pulmonar e a circulação sistêmica	49
Figura 7 – Foto do sistema de banho para órgãos isolados composto por cubas de vidro (A), transdutores isométricos (B), bomba termostática (C), amplificador (D) e microcomputador (E).....	60
Figura 8 – Registros representativos do efeito relaxante do LM-OE em anéis de artéria pulmonar de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional..	68
Figura 9 – Registros representativos do efeito relaxante do carvacrol em anéis de artéria pulmonar de rato pré-contraída com FEN 3×10^{-6} M na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional...	70

Figura 10 – Registros representativos do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráídos com 3×10^{-6} M de FEN na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional 72

Figura 11 - Registro representativo do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráída com FEN 3×10^{-6} M na presença de 1 nM de atropina. 74

Figura 12 - Registro representativo do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráída com FEN 3×10^{-6} M na presença de 10^{-4} M de L-NAME.....76

Figura 13 - Registro representativo do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráída com FEN 3×10^{-6} M na presença de 10^{-5} M de indometacina. 78

Figura 14 – Registro representativo do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráída com FEN 3×10^{-6} M na presença de 10^{-5} M de IPA.....81

Figura 15 - Registro representativo do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráída com FEN 3×10^{-6} M na presença de 5×10^{-7} M de H-89.....83

Figura 16 - Registros representativos do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráídos com KCl 30 (A) e 80 mM (B).....85

Figura 17 - Registros representativos das curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 na presença do timol nas concentrações de 3 (A), 9 (B) 27 (C) e 81 $\mu\text{g/mL}$ (D) em anéis de artéria pulmonar isolada de rato.....88

Figura 18 - Registro representativo do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráída com 3×10^{-7} M de S(-)-Bay K8644.....90

Figura 19 - Registro representativo do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráída com FEN 3×10^{-6} M na presença 10^{-6} M de Y-27632.....92

Figura 20 - Proposta de mecanismo de ação vasorrelaxante do timol em artéria pulmonar de ratos.....	111
--	------------

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito relaxante do LM-OE em anéis de artéria pulmonar de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na presença (▲) e na ausência (△) de endotélio funcional.....**69**

Gráfico 2 – Efeito relaxante do carvacrol em anéis de artéria pulmonar de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na presença (■) e na ausência (□) de endotélio funcional**71**

Gráfico 3 – Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na presença (●) e na ausência (○) de endotélio funcional.....**73**

Gráfico 4 – Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na ausência (■) e na presença (□) de 1 nM de atropina.....**75**

Gráfico 5 – Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na ausência (●) e na presença (○) de 10^{-4} M de L-NAME.....**77**

Gráfico 6 – (A) Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na ausência (●) e na presença (○) de 10^{-5} M de indometacina. (B) Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na ausência (●) e na presença (○) da combinação de 10^{-4} M de L-NAME e 10^{-5} M de indometacina.....**79**

Gráfico 7 – Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na ausência (●) e na presença (○) de IPA (A) ou de forskolina (B)**82**

Gráfico 8 – Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na ausência (●) e na presença (○) de 5×10^{-7} M de H-89.....**84**

Gráfico 9 – Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraídos com KCl 30 (▼) e 80 mM (▽) 86

Gráfico 10 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (●) e na presença de timol nas concentrações de 3 (○), 9 (■), 27 (□) e 81 $\mu\text{g/mL}$ (▲), em artéria pulmonar de rato.89

Gráfico 11 – Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraídos com 3×10^{-6} M de FEN (●) ou 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (○). 91

Gráfico 12 – Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na ausência (●) e na presença (○) de 10^{-6} M de Y-27632.....93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Krebs-Henseleit por Pauvert et al., 2003	58
Tabela 2 - Solução despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} por Karasu-Minareci et al., 2012	58
Tabela 3 - Valores de CE_{50} dos produtos-teste em artéria pulmonar de rato pré contraída com FEN, na presença e na ausência de endotélio.....	73
Tabela 4 - Valores de CE_{50} do timol em artéria pulmonar de rato pré contraída com FEN, na presença (E+) e na ausência (E-) do endotélio funcional e na presença de inibidores.....	80
Tabela 5 - Valores de CE_{50} do timol em artéria pulmonar de rato pré contraída com FEN, na presença de indometacina, IPA e H-89.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

4(Ca²⁺)-CaM complexo cálcio - calmodulina

[Ca²⁺] concentração de Ca²⁺

[Ca²⁺]_c concentração de Ca²⁺ citosólico

ACh acetilcolina

cAMP monosfato cíclico de adenosina

ANOVA análise de variância

ATP trifosfato de adenosina

CaM calmodulina

Cav canais de cálcio dependentes de voltagem

Cav1 canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 1

Cav-L canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L

CCS Centro de Ciências da Saúde

CE₅₀ concentração molar de uma droga necessária para produzir 50% de seu efeito máximo

CPI-17 proteína inibitória ativada por PKC de 17KDa

DAG diacilglicerol

e.p.m. erro padrão da média

E_{max} efeito máximo

G_{q/11} proteína G_q ou proteína G₁₁

G_{αq} subunidade α da proteína G_q

G_{12/13} proteína G₁₂ ou proteína G₁₃

cGMP monofosfato cíclico de guanosina

GPCR receptor acoplado à proteína G

GTP trifosfato de guanosina

IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP₃ R	receptor de IP ₃
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
MLCP	fosfatase da cadeia leve da miosina
MYPT1	subunidade 1 condutora da fosfatase da miosina
NO	óxido nítrico
pD₂	logaritmo negativo, na base 10, da CE ₅₀
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	proteína cinase dependente de cAMP
PKG	proteína cinase dependente de cGMP
PLC	fosfolipase C
PLD	fosfolipase D
PMCA	Ca ²⁺ ATPase da membrana plasmática
PP1c	região catalítica da proteína fosfatase 1
RhoA	pequena proteína G ligante de GTP
ROCK	cinase dependente de RhoA
RYR	receptor de rianodina
RS	retículo sarcoplasmático
SERCA	Ca ²⁺ ATPase do retículo endo-sarcoplasmático
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
ZIPK	proteína cinase de interação zíper

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1 Produtos naturais	27
2.2 Família Verbenaceae, gênero <i>Lippia</i> e espécie <i>Lippia microphylla</i> Cham	29
2.3 Óleos essenciais	32
2.4 Controle da reatividade do músculo liso vascular	36
2.5 Artéria Pulmonar e Circulação Pulmonar: Princípios Básicos	48
3 OBJETIVOS.....	54
3.1 Geral.....	54
3.2 Específicos	54
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 Material.....	56
4.1.1 Produtos teste	56
4.1.2 Animais.....	56
4.1.3 Drogas e reagentes	57
4.1.4 Preparo da solução-estoque do LM-OE	57
4.1.5 Solução nutritiva.....	58
4.1.6 Equipamentos	59
4.2 Métodos.....	61
4.2.1 Preparação dos anéis de artéria pulmonar de rato	61
4.2.2 Triagem farmacológica.....	61
4.2.2.1 Efeito do LM-OE, do carvacrol e do timol sobre a artéria pulmonar isolada de rato pré-contraída com FEN	61
4.2.3 Caracterização do mecanismo de ação do timol em artéria pulmonar de rato	62
4.2.3.1 Participação dos receptores muscarínicos endoteliais no efeito relaxante do timol em artéria pulmonar de rato.....	62
4.2.3.2 Participação do óxido nítrico (NO) no efeito relaxante do timol em artéria pulmonar de rato	62
4.2.3.3 Participação das prostaciclinas endoteliais no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato.....	62

4.2.3.4 Efeito do inibidor e do ativador da ciclase de adenilil no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato	63
4.2.3.5 Efeito do inibidor da PKA no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato	64
4.2.3.6 Efeito relaxante do timol sobre a artéria pulmonar pré-contraída com 30 ou 80 mM de KCl.....	64
4.2.3.7 Efeito do timol frente às contrações induzidas por CaCl ₂ em meio despolarizante nominalmente sem Ca ²⁺	64
4.2.3.8 Efeito relaxante do timol em artéria pulmonar de rato sobre as contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644	65
4.2.3.9 Efeito do inibidor da Rho cinase no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato	65
4.3 Análise estatística	65
5 RESULTADOS.....	67
5.1 Triagem farmacológica.....	67
5.1.1 Efeito do LM-OE, carvacrol e timol sobre a contração tônica induzida por FEN em artéria pulmonar de rato	67
5.2 Caracterização do mecanismo de ação do timol em artéria pulmonar isolada de rato.....	74
5.2.1 Participação dos receptores muscarínicos endoteliais no efeito relaxante do timol em artéria pulmonar de rato.....	74
5.2.2 Participação do óxido nítrico (NO) no efeito relaxante do timol em artéria pulmonar de rato	76
5.2.3 Participação das prostaciclinas endoteliais no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato.....	78
5.2.4 Efeito do inibidor e do ativador da ciclase de adenilil no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato	81
5.2.5 Efeito do inibidor da PKA no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato	83
5.2.6 Efeito relaxante do timol sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou 80 mM de KCl em artéria pulmonar.....	85
5.2.7 Efeito do timol frente às contrações induzidas por CaCl ₂ em meio despolarizante nominalmente sem Ca ²⁺	87

5.2.8 Efeito relaxante do timol em artéria pulmonar de rato sobre as contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644	90
5.2.9 Efeito do inibidor da Rho cinase no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato	92
6 DISCUSSÃO	95
7 CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS	115
ANEXO	139

1 Introdução



INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm servido como fonte e inspiração para uma grande fração da atual farmacopeia (KINGSTON, 2011), fornecendo um vasto arsenal terapêutico contra inúmeras enfermidades, desde as mais simples até as mais complexas, compreendendo assim uma fonte de inestimável valor às necessidades medicinais da humanidade.

As plantas medicinais têm sido uma fonte inesgotável para a obtenção de moléculas com potencial terapêutico, mas a utilização destas pela indústria farmacêutica é relativamente recente. Até meados do século XX, as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa, quando a síntese química, que teve início no final do século XIX, iniciou uma fase de desenvolvimento vertiginoso. Esse processo de descoberta de novos compostos tem estado em permanente evolução, devido ao aperfeiçoamento das técnicas que permitem o isolamento e a determinação estrutural dos compostos químicos (CALIXTO, 2000; COSTA; TEIXEIRA, 2009).

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), sendo assim um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas, vislumbrando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos (FOGLIO et al., 2006).

Dentre os produtos oriundos de plantas, os óleos essenciais merecem destaque devido a suas inúmeras atividades farmacológicas, despertando o interesse da indústria farmacêutica para a pesquisa de novas fontes de fármacos. O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleo essencial, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os 4 grandes produtores mundiais (BIZZO et al., 2009) e parece ser evidente o potencial que os óleos essenciais vêm adquirindo no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Além das várias atividades biológicas descritas (HENRIQUE et al., 2009).

O Nordeste Brasileiro apresenta uma rica biodiversidade com flora diversificada, possuindo várias plantas que são utilizadas pela população no tratamento de doenças, entre elas a espécie *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae),

a qual é encontrada na Guiana e no Brasil (PASCUAL et al., 2001), sendo popularmente conhecida como “alecrim-do-mato”, “alecrim-de-tabuleiro” e “alecrim-pimenta”, é utilizada pela população na forma de decocto ou maceração em álcool como um antisséptico ou no tratamento de doenças respiratórias, como resfriados, gripes, bronquite, tosse e asma (AGRA et al., 2008). Dentre as diversas atividades já descritas, o óleo essencial dessa planta (LM-OE) apresentou atividade relaxante em diferentes tipos de músculo liso, como íleo de cobaia (OLIVEIRA, 2013), útero de rata (SILVA, 2015) e em artérias aorta e mesentérica de rato (ARAÚJO, 2011).

O músculo liso é amplamente distribuído por todo o corpo, incluindo os vasos sanguíneos, vias respiratórias, trato gastrointestinal, urinário e reprodutivo, apresentando uma variedade de funções essenciais à vida. As células do músculo liso dos vasos sanguíneos exibem considerável plasticidade no seu fenótipo. O tônus do músculo liso vascular é regulado por um mecanismo molecular, resultando no equilíbrio entre as vias de sinalização vasoconstritoras e vasodilatadoras existente, sendo, portanto, essencial para o estabelecimento de novas estratégias de prevenção e tratamento de doenças vasculares (MORGADO et al., 2011; BROZOVICH et al., 2016).

Tendo-se em vista que o aumento do tônus vascular pode ter repercussões graves no organismo, buscam-se novas drogas potentes, eficazes e seguras que, atuando no músculo liso vascular, sirvam como terapia ou ferramenta farmacológica para o entendimento do processo fisiopatológico das doenças cardiovasculares.

Dentre essas doenças destaca-se a Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP), uma doença crônica e progressiva caracterizada por elevação da pressão arterial pulmonar e resistência vascular pulmonar, o que, em última análise, resulta em insuficiência ventricular direita e morte. Substâncias que venham a ocasionar o relaxamento da artéria pulmonar são potenciais candidatas a serem utilizadas no combate aos sintomas da HAP. Com base nessas premissas, decidiu-se investigar o efeito relaxante do LM-OE, timol e carvacrol em artéria pulmonar de ratos e investigar o mecanismo de ação do composto mais potente em relaxar essas artérias.

2 Fundamentação teórica



FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Produtos naturais

A utilização de plantas com fins terapêuticos, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Sabe-se do uso empírico de drogas de origem vegetal, animal e mineral para o tratamento de doenças desde as civilizações antigas (MARQUES et al., 2009).

Ao longo do processo evolutivo, o homem foi aprendendo a selecionar plantas para a sua alimentação e para o alívio de seus males e doenças. O resultado desse processo é que muitos povos passaram a dominar o conhecimento do uso de plantas e ervas medicinais (FERREIRA; PINTO, 2010).

Durante um longo período têm sido registrados diversos procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina tradicional a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos ainda não superados na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Além disso, a fácil obtenção de produtos naturais e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (JUNIOR; PINTO; MARCIEL, 2005; MARQUES et al., 2009).

A obtenção de efeitos benéficos com o uso de drogas de origem natural contribuiu para que a medicina popular e tradicional introduzisse fármacos à terapêutica moderna. O arsenal terapêutico atualmente disponível inclui medicamentos resultantes da purificação de extratos de origem vegetal e animal e do isolamento de seus princípios ativos (MARQUES et al., 2009).

O uso de medicamentos fabricados em laboratórios é muito recente em relação a utilização de plantas para o tratamento e cura de doenças, e sua comprovação por testes clínicos é ainda mais recente. Os extratos vegetais e de fungos, por exemplo, são constituídos por misturas multicomponentes de substâncias, parcialmente ativas e inativas, que, muitas das vezes, atuam em alvos farmacológicos diferentes (FERREIRA; PINTO, 2010).

As plantas têm que competir por espaço e se defender do ataque de herbívoros e patógenos em geral, por isso passaram por diversos processos evolutivos para

garantir sua sobrevivência. Durante milhões de anos, as plantas foram desenvolvendo suas próprias defesas químicas. Esta é uma das razões pelas quais a constituição química das plantas é tão complexa, e porque muitas plantas biossintetizam substâncias para atuar em alvos específicos moleculares de seus predadores. Metabólitos secundários de plantas e micro-organismos são produzidos para modular seus próprios metabolismos e, conseqüentemente, também podem alcançar alvos terapêuticos de doenças humanas (FERREIRA; PINTO, 2010; OLIVEIRA, PUPO; VIEIRA, 2013).

A falta de informação do público sobre os fitoterápicos tem levado a sociedade a ter uma percepção de que todo produto natural é seguro e desprovido de efeitos colaterais, o que não é totalmente verdade. Existem plantas que são venenos por conterem toxinas poderosas que podem levar à morte. Algumas plantas medicinais são, inclusive, incompatíveis com o uso de certos medicamentos. Em alguns casos, os efeitos dos produtos naturais são apenas placebo e, em outros, causam danos irreversíveis à saúde (COSTA et al., 2010; FERREIRA; PINTO, 2010).

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial, porém, a toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidade, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente (JUNIOR; PINTO; MARCIEL, 2005; FILHO, 2010).

O estudo de compostos bioativos originados de plantas e vegetais é sem dúvida uma das abordagens mais ricas dentre as disponíveis para a busca de novos candidatos a fármacos. Além dos produtos naturais que são empregados como medicamentos, também há outros produtos naturais que nos fornecem informações estruturais úteis na busca de novos compostos bioativos que possam vir a alcançar os requisitos necessários relacionados a atividade, seletividade, toxicidade, tempo de meia vida, entre outros, para o desenvolvimento de um novo fármaco (NASCIMENTO - JÚNIOR; 2015).

A importância da Química de Produtos Naturais (QPN) na descoberta de novos fármacos é incontestável, estima-se que 40% dos novos fármacos aprovados nos

últimos vinte anos sejam provenientes ou inspirados através de modificações moleculares de produtos naturais. A QPN de vegetais – fitoquímica, como é concebida atualmente, se dedica principalmente à caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biossintéticas de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos (FILHO; 2010; RODRIGUES 2010).

Neste aspecto a QPN desempenha um papel de grande importância. Porém, esta subárea da química requer uma aproximação de outras áreas do conhecimento devido ao seu caráter interdisciplinar. Entre as áreas de destaque nesta interdisciplinaridade está a Biologia, Imunologia, Farmacologia, Bioquímica, Biologia Molecular entre outras. No Brasil, a QPN sempre foi uma das áreas que lideraram o desenvolvimento da Química. Todavia, esta área enfrenta atualmente diversos desafios a nível global e econômico. A biodiversidade está diminuindo com a redução das florestas e dos recifes de coral, em razão do aumento populacional, da poluição atmosférica e da expansão do agronegócio. Como consequência, muitos protótipos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos estão sendo perdidos (FERREIRA; PINTO, 2010; OLIVEIRA, PUPO; VIEIRA, 2013).

O Ministério da Saúde ao recomendar e indicar 66 plantas medicinais aprovadas pela ANVISA, cujo uso está consagrado na cultura da medicina popular brasileira, teve uma atitude correta e coerente. A etapa seguinte é fiscalizar a comercialização destes fitoterápicos para preservar a saúde do consumidor (FERREIRA; PINTO, 2010).

2.2 Família Verbenaceae, gênero *Lippia* e espécie *Lippia microphylla* Cham.

A família Verbenaceae inclui cerca de 35 gêneros e 1000 espécies, que se distribuem principalmente nos países tropicais, existindo também espécies extratropicais (JUDD et al., 2008; SOUZA; LORENZI, 2008; CANTELI; 2012). No Brasil ocorrem dezessete gêneros nativos: *Aloysia*, *Baillonia*, *Bouchea*, *Casselia*, *Cithrexyllum*, *Duranta*, *Glandularia*, *Lantana*, *Lippia*, *Monochilus*, *Petrea*, *Phyla*, *Priva*, *Stachytarpheta*, *Tamonea*, *Verbena*, *Verbenoxylum*; e um cultivado: *Congea*, sendo ao todo cerca de 250 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008).

Essa família é composta por ervas, arbustos, lianas e árvores muitas vezes aromáticas. Podem conter ou não espinhos; possuem pêlos simples, geralmente

unicelulares e as vezes calcificados ou silicificados; glândulas oleíferas. Seus caules são geralmente quadrados. Suas folhas podem ser distribuídas opostamente, ou helicoidalmente, sendo simples ou lobadas; inteiras ou serradas; com nervura peniforme. Inflorescência racemosa. Flores bissexuais e pentâmeras, vistosas sendo normalmente polinizadas por coleta de néctar através de abelhas, vespas e moscas. Fruto drupa ou esquizocarpo (JOLY, 1991; JUDD et al., 2008; SOUZA; LORENZI, 2008; CANTELI; 2012).

Atividades biológicas de interesse têm sido relatadas na literatura etnofarmacológica para óleos voláteis de Verbenaceae. Além dos indicativos etnofarmacológicos, pesquisas recentes confirmam experimentalmente várias atividades biológicas de metabólitos secundários dessa família (PASCUAL et al., 2001; MONTANARI; 2010).

De todos os gêneros de Verbenaceae, *Lippia* é certamente o mais estudado quimicamente e farmacologicamente, devido a sua importância econômica decorrente das diferentes aplicações dos óleos essenciais, sendo muitas espécies consideradas medicinais (SALIMENA; 2000; MONTANARI; 2010). Esse gênero possui aproximadamente 200 espécies encontradas na forma de ervas, arbustos e pequenas árvores. As várias espécies desse gênero encontram-se distribuídas em países das Américas Central e do Sul e em territórios da África tropical (SANDERS; 2001; AGRA et al., 2007; GOMIDE, 2012).

O Brasil é uma das regiões de maior biodiversidade do mundo e uma das principais zonas de crescimento e diversificação de plantas do gênero *Lippia*, contendo aproximadamente 75% de suas espécies (SALIMENA-PIRES, 1991; VICCINI et al., 2004; GOMIDE, 2012). Popularmente, o uso mais comum de *Lippia* é para o tratamento de distúrbios respiratórios, porém já foram relatados diversos outros usos populares do gênero, dentre eles relaxante em diferentes músculos lisos (SALIMENA; 2000; PASCUAL et al., 2001).

O gênero se destaca por sua riqueza química e farmacológica, dessa forma, a maioria dos estudos envolvendo *Lippia* possuem esse foco, destacando-se aqueles relacionados aos seus óleos essenciais. Inúmeras espécies de *Lippia* já tiveram a constituição do seu óleo essencial investigada, onde, em geral, geraniol, carvona, carvacrol e timol são os constituintes majoritários (ESCOBAR et al., 2010; JANNUZZI et al., 2011; HATANO et al., 2012; CAMPOS, 2014).

Diversas ações são conhecidas para espécies do gênero, tais como: atividade antimicrobiana (OWOLABI et al., 2009; SHIKANGA et al., 2010); atividade antiinflamatória e antifúngica (FUNARI et al., 2012); atividades anti-helmíntica (VASCONCELOS, 2006), efeitos antisséptico e cicatrizante (COSTA et al., 1998), atividade antimalárica (VALENTIN et al., 1995), propriedades antioxidantes (AVILA-SOSA et al., 2010; QUIROGA et al., 2013), larvicida (GOMES et al., 2012), atividade antinociceptiva (MARÇAL et al., 2006) bem como ação contra protozoários (ESCOBAR et al., 2010).

Várias espécies do gênero *Lippia* fazem parte de uma lista de plantas medicinais e aromáticas que encontram-se ameaçadas de extinção, o que não somente as coloca como prioritárias para conservação como também reforça a necessidade de estudos mais detalhados de seu potencial medicinal (VIEIRA, 1999; GOMIDE, 2012).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Lippia* encontra-se *Lippia microphylla* Cham. (Figura 1), a qual é encontrada apenas na Guiana e no Brasil (PASCUAL et al., 2001), sendo popularmente conhecida como “alecrim-do-mato”, “alecrim-de-tabuleiro” e “alecrim-pimenta”, é utilizada pela população na forma de decocto ou maceração em álcool como um antisséptico ou no tratamento de doenças respiratórias, como resfriados, gripes, bronquite, tosse e asma (AGRA et al., 2008; PASCUAL et al., 2001).

Dados da literatura mostram diversas atividades farmacológicas para esta espécie, dentre elas, podemos destacar: atividade antioxidante para o extrato metanólico das partes aéreas e do caule (DAVID et al., 2007), atividade relaxante em aorta e traqueia de rato e potencial atividade gastroprotetora para o extrato etanólico das partes aéreas (ANTUNES et al., 2011; JACINTO et al., 2011), o óleo essencial apresentou atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (RODRIGUES et al., 2011), atividade antitumoral (XAVIER, 2011) e efeito espasmolítico em artérias mesentérica e aorta de rato (ARAÚJO, 2011), traqueia (OLIVEIRA et al., 2012) e íleo de cobaia (OLIVEIRA, 2013) e útero de rata (SILVA, 2013).

Figura 1. *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae)



Fonte: Josean Fachine Tavares, 2007

2.3 Óleos essenciais

Dentre os produtos naturais empregados em abordagens terapêuticas, os óleos essenciais (OE), utilizados frequentemente na aromaterapia, são descritos como produtos com grande potencial terapêutico e farmacológico (EDRIS, 2007). As plantas aromáticas, bem como os respectivos óleos essenciais, são utilizadas desde o início da história da humanidade para saborizar comidas e bebidas; empiricamente usadas para disfarçar odores desagradáveis; atrair outros indivíduos e controlar problemas sanitários, contribuindo também para a comunicação entre os indivíduos e influenciando o bem-estar dos seres humanos e animais, demonstrando assim uma antiga tradição sociocultural e socioeconômica da utilização desses produtos (FRANZ, 2010; MACHADO; JUNIOR, 2011). As bases da indústria de OE foram concebidas e desenvolvidas no Oriente, especialmente no Egito, Pérsia, Índia e no Ocidente alcançou seu desenvolvimento pleno (MONTANARI, 2010)

Os óleos essenciais pertencem ao metabolismo secundário das plantas e constituem um dos mais importantes grupos de matéria prima para a indústria alimentícia, farmacêutica, perfumaria e afins. São misturas complexas de substâncias

voláteis e lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídas, em sua maioria, por moléculas de natureza terpênica (MORAIS, 2009; SOARES; DIAS, 2013) e de outras propriedades químicas (GOMES et al., 2011). Consequentemente, podem ser obtidos diferentes constituintes químicos de óleos essenciais extraídos de diferentes *Lippia spp.*

As propriedades farmacológicas atribuídas aos OE são diversas e algumas são preconizadas por apresentarem vantagens importantes, quando comparadas a outros medicamentos, como por exemplo, a sua volatilidade, que os torna ideal para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente em inalações. A volatilidade e o baixo peso molecular de seus componentes, possibilitam que eles sejam rapidamente eliminados do organismo através das vias metabólicas. (BANDONI; CZEPAK, 2008; MACHADO; JUNIOR, 2011), porém sua frequência posológica seria maior. Com o descobrimento e a elucidação das centenas de componentes dos óleos essenciais nas últimas décadas, pode se entender a complexidade e a enorme diversidade que existe neste grupo de produtos naturais, o qual consiste normalmente de mono (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}), fenilpropenos e outros componentes voláteis (FRANZ, 2010; MACHADO; JUNIOR, 2011).

Muitos óleos possuem um ou dois compostos majoritários que lhes conferem seus sabores e odores característicos, porém podem estar presentes muitos outros componentes minoritários (MONTANARI, 2010). É possível ressaltar que as substâncias majoritárias encontradas nos óleos essenciais nem sempre são os componentes responsáveis pelas propriedades que estes demonstram, assim, o efeito pode ser atribuído a um constituinte em menor proporção ou de um sinergismo entre os compostos existentes naquele óleo (BANDONI; CZEPAK, 2008; MACHADO; JUNIOR, 2011).

Outro aspecto importante, quanto ao uso dos óleos essenciais, refere-se a forma de obtenção. Estes podem ser extraídos através de inúmeras técnicas e suas propriedades dependem do tipo de extração. Os métodos mais utilizados são: extração por arraste a vapor, hidro destilação, prensagem a frio, extração por solventes orgânicos, extração por alta pressão e extração por CO_2 supercrítico (OKOH et al., 2010).

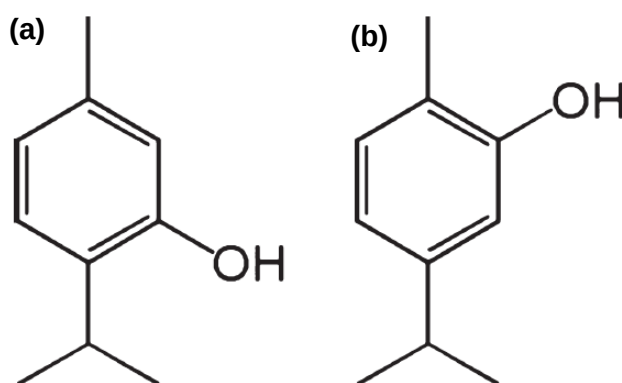
Muitos óleos voláteis possuem uma grande variedade de atividades farmacológicas e esses efeitos são provavelmente devido à diversidade estrutural dos

constituintes presentes nos óleos essenciais de plantas medicinais aromáticas (SOUZA et al., 2006; SOUZA et al., 2010). Inúmeras atividades biológicas destes óleos voláteis, como atividade vasorrelaxante em aorta e mesentérica de ratos (ARAÚJO, 2011) e atividade antiinflamatória tópica em camundongos (VERAS et al., 2013), são atribuídas aos monoterpenos, que são os principais componentes químicos dos óleos essenciais (AMARAL et al., 2007; SANTOS; FREITAS, 2013).

Os óleos essenciais e seus constituintes têm sido amplamente utilizados nos mais diversos ramos, diversos fatores como estrutura, grupo funcional e composição do óleo essencial determinam sua atividade biológica e suas propriedades físico-químicas, determinando assim, sua aplicação comercial (MONTANARI, 2010). Estudos relataram que óleos essenciais que possuem elevado teor de compostos fenólicos apresentam maiores atividades farmacológicas, como antiinflamatória, ansiolítica, anticonvulsivante, antibacteriana, entre outras (DORMAN; DEANS, 2000).

Da espécie *Lippia microphylla* Cham foi extraído o óleo essencial (LM-OE) e de acordo com a revisão realizada por Pascualet et al., (2001), os principais componentes do óleo essencial de *Lippia microphylla* são os monoterpenos 1,8-cineol, α -terpineol, terpinen-4-ol, metiltimol, sabineno, γ -terpineno, carvacrol e timol; e os sesquiterpenos β -cariofileno e α -humuleno, sendo os majoritários o timol e o carvacrol, apresentando uma abundância de cerca de 46% para o timol e 32% para o carvacrol, tomados em conjunto somam quase 80% do total do LM-OE, sendo estes dois componentes monoterpenos fenólicos e isômeros de posição (Figura 2).

Figura 2. Estrutura dos monoterpenos timol (a) e carvacrol (b).



Fonte: adaptado de PEIXOTO-NEVES et al., 2010

O timol e o carvacrol fazem parte do grupo mais numeroso de metabólitos secundários conhecidos como terpenos, possuindo mais de quarenta mil moléculas diferentes. A rota bioquímica desses compostos dão lugar tanto a metabólitos primários como secundários de grande importância para o crescimento e sobrevivência da planta. São insolúveis em água e derivam da união de unidades de isopreno (5 átomos de C). Desta forma, os terpenos se classificam pelo número de unidades de isopreno que contêm, os monoterpenos possuem 10 átomos de carbono (10 C) (duas unidades de isopreno), os sesquiterpenos possuem 15 C (três unidades de isopreno), os diterpenos possuem 20 C (quatro unidades de isopreno), os triterpenos possuem 30 C, os tetraterpenos 40 C e politerpenos quando possuem mais de oito unidades de isopreno (ACAMOVIC; BROOKER, 2005; GARCÍA; CARRIL, 2009).

Os monoterpenos são os principais componentes das resinas (cola ou goma das árvores), e dos óleos essenciais. Essas substâncias são produzidas pelas folhas de árvores e possuem propriedades de grande interesse farmacológico, dentre elas antimicóticas, anti-tumorais, antioxidantes, antihelmínticas, antibióticas e anti-inflamatórias (SANTOS et al., 2011; COÊLHO et al., 2013).

Além das atividades descritas acima, os monoterpenos também produzem efeitos significativos no sistema cardiovascular, promovendo, entre outras ações, vasorrelaxamento em artérias aorta e mesentérica de ratos, diminuição da frequência cardíaca e hipotensão (AYDIN et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2008; BASTOS et al., 2009; PEIXOTO-NEVES et al., 2010). Deste modo, os monoterpenos podem ser úteis como agentes para a prevenção e/ou tratamento de doenças cardiovasculares (SANTOS et al., 2011).

Dentre os monoterpenos com efeitos no sistema cardiovascular, podemos destacar o citrionelol com efeito vasorrelaxante em artéria mesentérica de ratos (BASTOS et al., 2009); o eucaliptol que apresenta efeito inotrópico negativo em músculo papilar do ventrículo esquerdo de rato (SOARES et al., 2005); o 1,8-cineol que induz vasorrelaxamento em aorta isolada de ratos (LAHLOU et al., 2002; PINTO et al., 2009); o limoneno reduz e previne as lesões cardiovasculares causadas por hipertensão pulmonar em ratos (TOUVAY et al., 1995); rotundifolona tem efeito vasorrelaxante em aorta isolada de ratos (GUEDES et al., 2004); o terpineol induz o

relaxamento em mesentéricas isoladas de ratos (RIBEIRO et al., 2010), entre várias outras atividades observadas em diversos outros monoterpenos.

Várias atividades biológicas já foram descritas para o timol merecendo destaque a atividade vasorrelaxante em artérias aorta e mesentérica de ratos por bloqueio do influxo de cálcio através da membrana (PEIXOTO-NEVES et. al., 2010; ARAÚJO, 2011), e para o carvacrol como atividade vasorrelaxante em aorta torácica de rato (PEIXOTO-NEVES et. al., 2010), efeito vasorrelaxante em artérias cerebral de ratos (EARLEY et al., 2010), espasmolítica em íleo de cobaia (OLIVEIRA, 2013) e tocolítico em útero de rata (SILVA, 2013) para ambos os compostos.

2.4 Controle da reatividade do músculo liso vascular

O músculo liso é amplamente distribuído por todo o corpo, incluindo os vasos sanguíneos, vias respiratórias, trato gastrointestinal, urinário e reprodutivo, apresentando uma variedade de funções essenciais à vida, tais como controle da respiração, do peristaltismo gastrointestinal, da pressão arterial dentre outros. Anormalidades no processo de contratilidade do músculo liso acarretam em várias desordens e doenças como cólicas uterinas, disfunção erétil, dispepsia, asma e hipertensão (KIM et. al., 2008). Dessa forma, o modelo experimental de músculo liso tem uma grande importância na busca por moléculas de interesse terapêutico, que venham a restabelecer as funções fisiológicas deste músculo e, conseqüentemente, o bem-estar do indivíduo.

Muitas estratégias terapêuticas potenciais são projetadas para ativar ou inibir vias de sinalização específicas na célula do músculo liso vascular. É evidente que múltiplas vias de sinalização vascular coexistem como compartimentos de sinalização espacialmente separados em células de músculo liso vascular diferenciado e coordenadas por uma diversidade de proteínas, no entanto, estas vias são frequentemente sobrepostas. A natureza específica dessas vias nos tecidos, mesmo entre diferentes vasos ou tamanhos de vasos, levou a muita controvérsia sobre a importância relativa de uma via *versus* outra. No entanto, em última análise, a possibilidade de múltiplas vias que poderiam ser ativadas ou inibidas em vários estados patológicos ou como compensação funcional ao stress fisiológico, dá ao

sistema uma considerável plasticidade funcional (PFITZER, 2001; POBURKO et al., 2004; BROZOVICH et al., 2016).

É bem estabelecido que o tônus vascular pode ser aumentado amplificando a ativação da miosina ou, de uma maneira análoga à do músculo estriado, pela remoção da inibição de actina. Recentemente, vários estudos relataram mecanismos mais controversos pelos quais agonistas ou forças biomecânicas podem regular tanto a contratilidade vascular como das vias aéreas através da remodelação de anexos citoesqueléticos (WALSH; COLE, 2013; ZHANG et al., 2015; BROZOVICH et al., 2016).

Uma série de sinais extracelulares, incluindo sinais neurais, humorais, iônicos e mecânicos induzem contração ou relaxamento do músculo liso vascular (MLV). O equilíbrio entre os sinais de contração e relaxamento determina o tônus intrínseco do MLV, que por sua vez regula a dinâmica dos vasos sanguíneos (WOODRUM; BROPHY, 2001; MORGADO et al., 2012).

Sob condições fisiológicas, os aumentos de $[Ca^{2+}]_c$ que conduzem à contração do músculo liso, são causados por dois mecanismos, tanto pela despolarização da membrana (isto é, pelo acoplamento eletromecânico, conseguido, por exemplo, por diminuição do gradiente eletroquímico de correntes de potássio para fora, ou ativação de canais dependentes de voltagem na membrana plasmática) quanto através da ligação de agonistas contráteis a receptores de superfície celular específicos (isto é, acoplamento farmacomecânico) (SOMLYO; SOMLYO, 1998). No entanto, é importante notar que alterações no potencial de membrana podem ocorrer secundários no acoplamento farmacomecânico. Estes dois mecanismos parecem ocorrer simultaneamente numa dada célula do MLV, e a excitação causada por um único agente pode ser o resultado de qualquer acoplamento eletromecânico ou farmacomecânico sozinho, ou uma combinação dos dois mecanismos (ORALLO, 1996; MORGADO et al., 2012).

Um dos mecanismos mais importantes do acoplamento farmacomecânico (Figura 3) envolve a ativação da via da fosfolipase C $\beta 1$ (PLC- $\beta 1$) como resultado da interação entre um agonista vasoconstritor (por exemplo, fenilefrina, angiotensina II, serotonina e endotelina) e um receptor de membrana acoplado à uma proteína G (GPCR) heterotrimérica ($G_{q/11}$). A PLC- $\beta 1$ hidrolisa o 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol

(PIP₂) produzindo dois segundos mensageiros, 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP₃) e 1,2-diacylglicerol (DAG) (MARIN et al., 1999).

O IP₃ se difunde da membrana celular para o citosol, enquanto o DAG permanece na membrana celular, sendo o ativador fisiológico da PKC (proteína cinase dependente de cálcio). No citosol, o IP₃ estimula os receptores de IP₃ (IP₃R), que são canais de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático para liberar Ca²⁺, esse por sua vez, ativa proteínas contráteis e inicia a contração. Por outro lado, o DAG, juntamente com Ca²⁺, ativa a PKC, que atua sobre várias proteínas citoplasmáticas e de membrana, modulando assim um certo número de processos celulares, tais como a regulação do transporte transmembranar de Ca²⁺ através dos Cav (ORALLO, 1996; HIRANO et al., 2003; MORGADO et al., 2012).

Alguns agonistas podem ativar canais de Ca²⁺ da membrana plasmática sem despolarização prévia da membrana, embora a resposta contrátil dos receptores aos agonistas esteja normalmente associada à despolarização da membrana e a um aumento da condutância da membrana (AKATA, 2007).

O mecanismo fármaco-mecânico da contração inclui, além do aumento de IP₃ e ativação dos IP₃R permitindo a liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares, e também a liberação do Ca²⁺ induzida por Ca²⁺ através de receptores de rianodina (RyR) presentes na membrana do retículo sarcoplasmático (RS), os quais são ativados pelo Ca²⁺ previamente liberado via IP₃R, além de também levar ao influxo de Ca²⁺ através da abertura dos Cav por um mecanismo que não envolve mudança no potencial de membrana, mas sim via ativação deste canal pela PKC (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

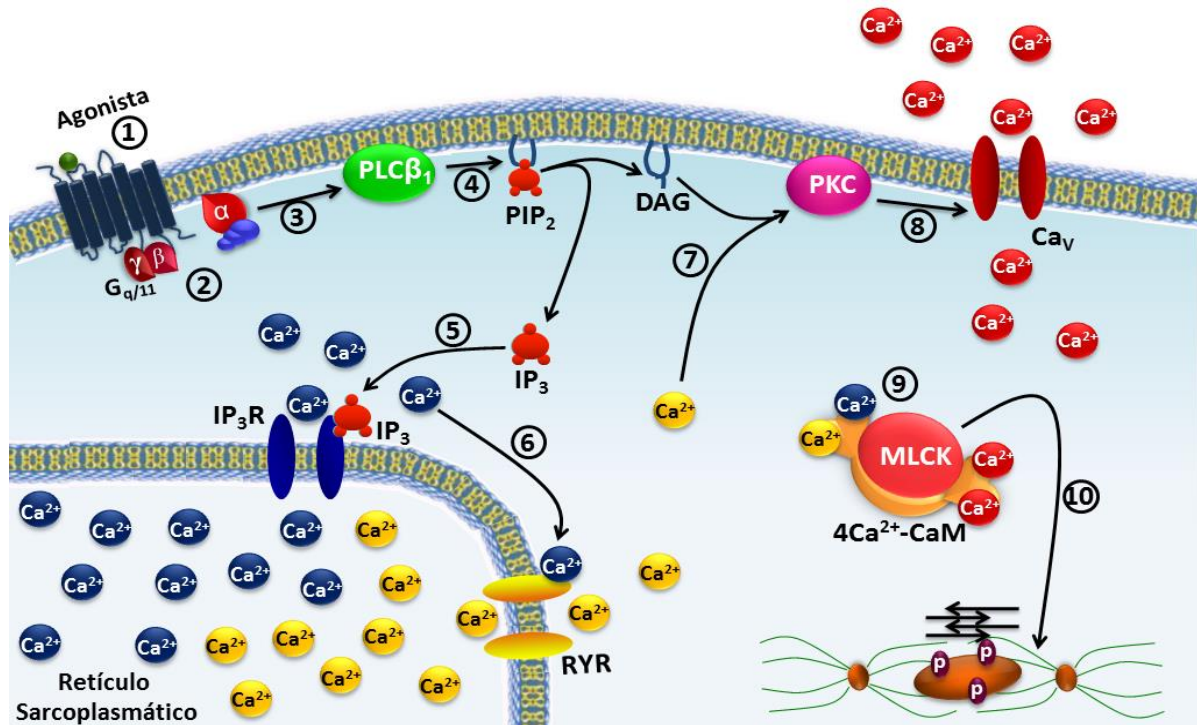
A rápida e transiente elevação da [Ca²⁺]_c é responsável pela ocupação sequencial dos quatro sítios de ligação para o Ca²⁺ presentes na calmodulina (CaM). O complexo 4Ca²⁺-CaM ativa e expõe o domínio enzimático da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que fosforila um resíduo específico de aminoácido (serina 19) presente na porção regulatória da cadeia leve da miosina de 20 kDa (MLC₂₀) (PELAIA et al., 2008). Uma vez fosforilada pela MLCK, a MLC₂₀ fica apta a interagir com a actina, iniciando-se o ciclo das pontes cruzadas, ou seja, o movimento da cabeça da miosina sobre os filamentos da actina, que resulta no fenômeno biológico da contração muscular lisa.

Além disso, o endotélio regula o tônus vascular via liberação de fatores derivados do endotélio e desempenha um papel fundamental na regulação basal e dinâmica da circulação. Sabe-se que as células endoteliais e do MLV se comunicam através de junções gap, que podem espalhar alguns sinais entre essas células e causar reversão ou condução da dilatação. As junções gap mioendoteliais permitem a transferência de carga e moléculas pequenas, tais como IP_3 e Ca^{2+} (DORA, 2010; WIT; GRIFFITH, 2010; MORGADO et al., 2012).

O mecanismo principal de manutenção da contração é através da abertura dos canais de cálcio da membrana plasmática, porém o músculo liso dispõe de um outro sistema de manutenção da contração mesmo em baixas $[Ca^{2+}]$. No músculo liso, incluindo o vascular, esse comportamento funcional implica no aumento de sensibilidade ao Ca^{2+} uma vez que não depende de níveis elevados da $[Ca^{2+}]_c$ mas sim da fosforilação da MLCP e ativação da MLCK por outros mecanismos que não o complexo $4Ca^{2+}$ -CaM (SOMLYO; SOMLYO, 1994). Esse evento é descrito como via de sensibilização ao Ca^{2+} e se dá a partir da pequena proteína G, RhoA e o seu alvo Rho cinase (ROCK) que desempenham um papel importante na regulação da atividade de vários alvos celulares envolvidos no mecanismo da contração (CHITALEY et al., 2001; WRIGHT et al., 2013).

Os avanços na biologia molecular têm elucidado o vasto envolvimento de vias de sinalização intracelular mediado por pequenas proteínas G, tais como as famílias Rho, Ras, Rab, Sarl/Arf e Ran (SHIMOKAWA; TAKESHITA, 2005). RhoA é um dos membros mais conhecidos da família de proteínas Rho, pois regulam uma ampla variedade de funções celulares fundamentais, tais como contração, motilidade, proliferação e apoptose. A RhoA atua em ciclos moleculares entre um estado inativo, ligada a GDP e complexada no citosol com o inibidor de dissociação do GDP (GDI), e uma conformação ativa, ligada a GTP (ETIENNE-MANNEVILLE; HALL, 2002; LOIRAND; GUÉRIN; PACAUD, 2006).

Figura 3. Mecanismo fármaco-mecânico da contração muscular lisa pela ativação do sistema efetor $G_{q/11}$ - PLC- β 1



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) As proteínas $G_{q/11}$ troca GDP por GTP na sua subunidade α (não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) A subunidade $\alpha_{q/11}$ -GTP ativa a enzima PLC β_1 ; (4) A PLC β_1 cliva o lipídio de membrana PIP $_2$ em IP $_3$ e DAG; (5) O IP $_3$ migra pelo citoplasma e ativa o IP $_3$ R presente na membrana do RS, liberando o Ca $^{2+}$ dos estoques; (6) O Ca $^{2+}$ liberado ativa o RyR, fazendo com que mais Ca $^{2+}$ seja liberado para o citoplasma; (7) O Ca $^{2+}$ que foi liberado, juntamente com o DAG ativam a PKC; (8) A PKC ativada fosforila os Ca v 1 promovendo o influxo de Ca $^{2+}$ através dos mesmos; (9) O aumento da [Ca $^{2+}$] $_c$ aumenta a afinidade pela CaM formando o complexo 4Ca $^{2+}$ - CaM e ativando a MLCK; (10) A MLCK ativada fosforila a MLC e esta se torna ativa e interage com os filamentos de actina, desencadeando a contração do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Correia, 2013.

A interação entre o agonista com seu respectivo GPCR (G_{12} e G_{13}) ativa o fator de troca de nucleotídeo de guanina (GEF), que promove a substituição do GDP pelo GTP na RhoA e dissociação do GDI, ocorrendo a formação do complexo RhoA-GTP que pode, assim, atingir a face interna da membrana plasmática, onde interage e ativa alvos *downstream* (efetores), incluindo a ROCK, para induzir respostas celulares. A

ROCK é o primeiro e o melhor caracterizado efetor da RhoA (SYLVESTER, 2004; LOIRAND; GUÉRIN; PACAUD, 2006).

A ROCK é uma cinase de serina/treonina com uma massa molecular de ≈ 160 kDa. Desde a sua descoberta, a ROCK tem sido amplamente estudada, onde muitos dos estudos se concentram em funções da ROCK no sistema cardiovascular (LOIRAND; GUÉRIN; PACAUD, 2006; SHI; WEI, 2013). A via de sinalização mediada por ROCK foi identificada pela primeira vez em células de músculo liso, e ligada a doenças cardiovasculares em que foi encontrada contração anormal de músculo liso em leito vascular (KUREISHI et al., 1997; SHI; WEI, 2013).

A ligação da RhoA-GTP a ROCK produz uma mudança conformacional no domínio cinase, ativando-o e causando uma autofosforilação (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A ROCK por sua vez, irá induzir sensibilidade aumentada ao Ca^{2+} do aparato contrátil que permite que o músculo permaneça contraído, mesmo quando os níveis intracelulares de Ca^{2+} são apenas ligeiramente aumentados acima das concentrações iniciais (SOMLYO; SOMLYO, 1994).

Isso ocorrerá através da fosforilação, pela ROCK, da subunidade ligada a miosina (MYPT-1), com aproximadamente 130 kDa, da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), resultando na inibição dessa enzima. A fosforilação de MYPT-1 inibe a MLCP, evitando a desfosforilação de MLC_{20} e, conseqüentemente, aumenta a sensibilidade do aparato contrátil ao Ca^{2+} . Diminuições e aumentos na atividade de MLCP são capazes de evocar a contração e relaxamento vascular independentemente de quaisquer alterações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (WOODSOME et al., 2001; CONNOLLY; AARONSON, 2011). Inibidores farmacológicos da ROCK, como fasudil e Y-27632, bloqueiam a sua atividade por competir com o sítio de ligação do ATP na enzima (CHITALEY et al., 2001).

A MLCP é uma enzima heterotrimérica com uma subunidade catalítica denominada subunidade catalítica da fosfatase do tipo 1 de 38 kDa (PP1c), uma subunidade regulatória de ligação à de miosina de 110-130 kDa (MYPT-1) e uma subunidade de 20-21 kDa de função desconhecida (SOMLYO; SOMLYO, 2003).

Além da fosforilação de MYPT-1, a MLCP irá sofrer uma fosforilação no seu resíduo PP1c por uma segunda proteína inibidora de MLCP, denominada CPI-17, isolada pela primeira vez a partir do músculo liso da aorta do porco (ETO et al., 1995). Apesar da CPI-17 possuir uma atividade intrínseca, a sua fosforilação no resíduo

Thr-38 por PKC, converte essa proteína em um potente inibidor da atividade catalítica de MLCP (ETO et al., 1997; WOODSOME et al., 2001). A via de sinalização PKC/CPI-17, ativada pelo DAG, representa outro passo relevante no mecanismo de sensibilização ao Ca^{2+} .

No músculo liso, a fosforilação de CPI-17 em resposta à estimulação a um agonista ocorre, principalmente, através da ativação de PKC (KITAZAWA et al., 2000). Após a fosforilação de CPI-17 pela PKC ocorrerá uma mudança conformacional em CPI-17 que permite sua associação com a subunidade PP1c da MLCP. Essa subunidade da fosfatase liga-se especificamente ao resíduo Thr-38 fosforilado da CPI-17, com a formação de um complexo inativo entre PP1c e CPI-17 fosforilada, contribuindo, dessa forma, para a manutenção da contração (WRIGHT et al., 2013) (Figura 4).

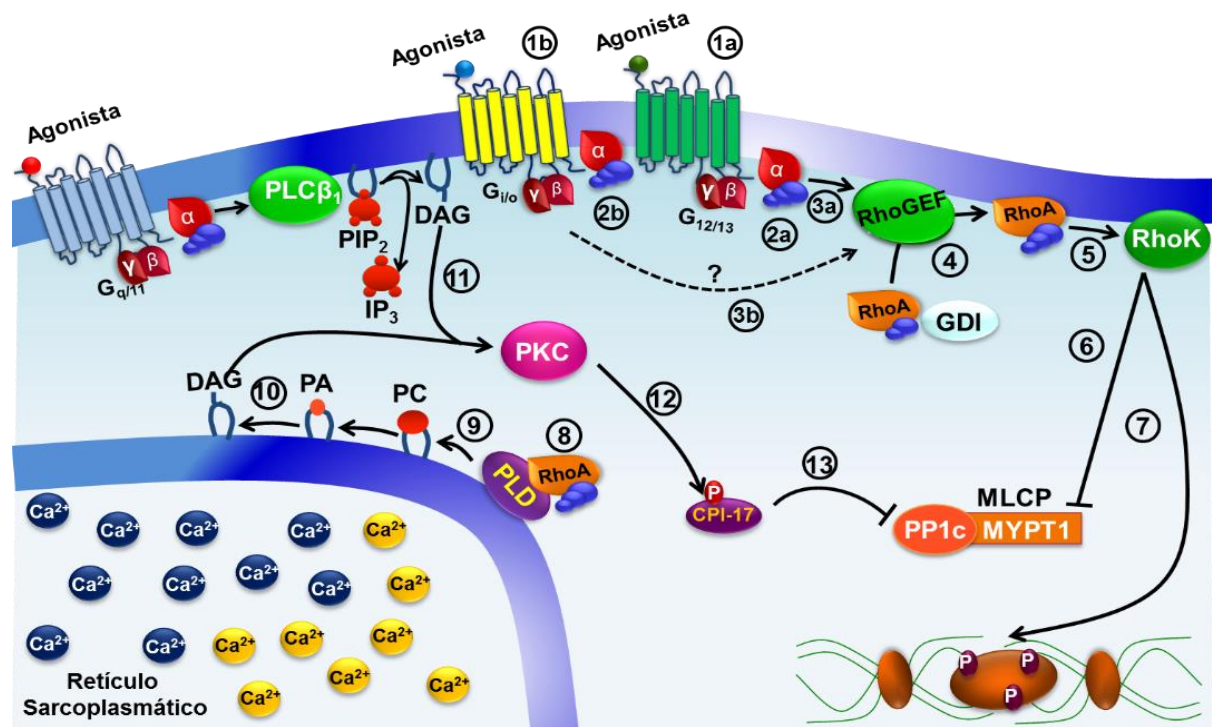
O fluxo dos íons K^+ através de canais localizados na membrana regulam o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v (THORNELOE; NELSON, 2005). Os canais de potássio desempenham um papel chave na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular, sendo a contração no músculo liso dependente do balanço entre o aumento e a diminuição da condutância ao íon K^+ , onde o primeiro evento leva a uma hiperpolarização da membrana da célula com consequente fechamento dos Ca_v , enquanto que o segundo causa uma despolarização celular levando a abertura dos Ca_v e dessa forma controlam a oferta de íons Ca^{2+} para o aparato contrátil do músculo liso (KNOT et al., 1996).

As células do músculo liso vascular (CMLV), assim como todas as outras células musculares, dependem do influxo de Ca^{2+} para iniciar a contração. Contudo, a concentração de Ca^{2+} intracelular em CMLV não apenas determina o estado contrátil, mas também afeta a atividade de vários fatores de transcrição dependentes de Ca^{2+} , e assim determina o fenótipo CMLV (BROZOVICH et al., 2016).

Estudos indicaram que, apesar das semelhanças nas propriedades básicas da liberação e aumento basal de Ca^{2+} em células do músculo liso da artéria pulmonar (CMLAPs) e células de músculo liso vascular sistêmico, as funções fisiológicas são notavelmente diferentes, uma vez que a circulação pulmonar é frequentemente regulada de forma diferente da circulação sistêmica, onde a primeira é um sistema de alto fluxo e baixa pressão necessários para a ejeção do sangue, pobre em oxigênio,

do coração para os pulmões ocorrendo o processo de hematose (REMILLARD et al., 2002; GREYSON, 2010).

Figura 4 - Mecanismo de sensibilização ao Ca^{2+} desencadeado pela via $\text{G}_{12/13}$ -RhoA-ROCK.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática, que pode estar acoplado às proteínas $\text{G}_{12/13}$ (1a) ou $\text{G}_{i/o}$ (1b); (2) as subunidades α das proteínas G trocam GDP por GTP na sua subunidade (processo não mostrado na figura), tornando-se ativas (2a e 2b); (3) a subunidade $\alpha_{12/13}$ -GTP (3a) ou via ativação de GPCR acoplado a $\text{G}_{i/o}$ (3b), a RhoGEF é ativada; (4) A RhoA se dissocia da GDI e troca o GDP pelo GTP, sendo translocada à membrana plasmática; (5) a RhoA ativa sua cinase associada, a RhoK; (6) A RhoK fosforila a MLCP na subunidade MYPT1, tornando-a inativa; ou (7) fosforila diretamente a cadeia leve da miosina; (8) a RhoA-GTP ativa diretamente a PLD que (9) cliva a PC a PA, que é então (10) convertido a DAG para, juntamente com o DAG proveniente da via da $\text{PLC}\beta_1$, (11) ativar a PKC que, por sua vez, (12) fosforila e ativa a CPI-17, que (13) interage com a subunidade PP1c da MLCP, inativando-a, contribuindo, então, para a manutenção do estado fosforilado da rMLC e das pontes cruzadas de actina e miosina.

Fonte: Vasconcelos, 2017, adaptado de Correia, 2013.

Estudos mostraram que o aumento espontâneo de Ca^{2+} nas CMLAPs de ratos originam-se exclusivamente dos RyR no RS. Nesse mesmo estudo os autores observaram que a ocorrência de liberação de Ca^{2+} não foi afetada significativamente pelo nifedipino, sugerindo que a liberação e aumento espontâneo de Ca^{2+} nas CMLAPs em repouso não são desencadeados por uma corrente nos canais de Ca^{2+} do tipo-L, mas são iniciadas pela atividade de estocagem espontânea de RyR (REMILLARD et al., 2002).

Os canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem (VOCCs) são organizados em seis subtipos por suas características funcionais e ainda divididos em grupos com base em sua sensibilidade à despolarização da membrana (WAN et al., 2013). Esses canais são divididos em: 1) $\text{Cav}1$, codificando como canais de tipo L de alta voltagem; 2) $\text{Cav}2$, codificando como canais de tipo P / Q, tipo N, e tipo R ou "média voltagem"; e 3) $\text{Cav}3$, codificando como canais do tipo T de baixa voltagem (RODMAN et al., 2005). Os canais do tipo L, T e P / Q foram identificados em células de músculo liso vascular (RODMAN et al., 2005; HANSEN et al., 2011), contudo, a expressão dos canais do tipo P e Q não foi investigada na vasculatura pulmonar (WAN et al., 2013).

Os VOCCs do tipo-L são ativados em potenciais mais despolarizados exibindo uma inativação mais lenta e tempos de desativação mais rápidos comparados com os do tipo-T. Os antagonistas do VOCCs do tipo-L, como nifedipino ou verapamil, podem prevenir a vasoconstrição pulmonar induzida por hipóxia, inibem a proliferação de CMLAPs e diminuem a hipertensão pulmonar (DAVIDSON et al., 1989; FIKE; KAPLOWITZ, 1999; BONNE et al., 2001; HIRENALLUR et al., 2008; WAN et al., 2013).

O Ca^{2+} libertado a partir dos estoques periféricos estimula canais sensíveis ao Ca^{2+} , tais como os canais de Cl^- ativados por Ca^{2+} (CCAC) e canais de K^+ sensíveis a Ca^{2+} (BK_{Ca}) na membrana plasmática (JANSSEN, 1997; WRIGHT et al., 2013). Sabe-se que, a ativação de BK_{Ca} leva ao efluxo de K^+ , induzindo uma hiperpolarização da membrana celular, promovendo assim o relaxamento (SHEPHERD et al., 2007; WRIGHT et al., 2013). Nas CMLAPs, a ativação de PKA mostrou-se fosforilar os BK_{Ca} , aumentando sua probabilidade de estado aberto e, portanto, efluxo de K^+ e hiperpolarização (KUME et al., 1994; WANG; KOTLIKOFF, 1996).

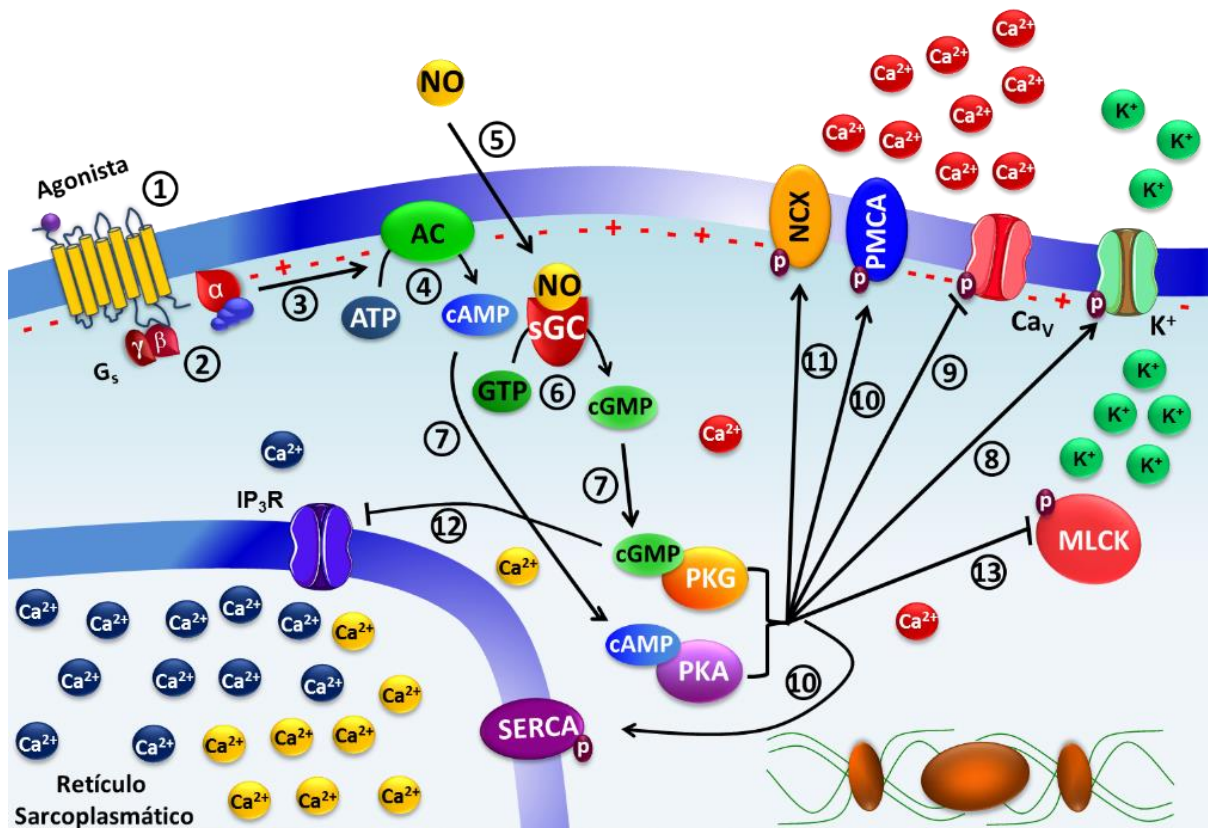
Entre os mecanismos que desempenham papéis fundamentais na regulação do tônus vascular, um aumento do nível citosólico de cAMP ou cGMP em células do

músculo liso vascular (MLV) é uma das principais vias de sinalização que medeiam a vasodilatação em condições fisiológicas (WIT; GRIFFITH, 2010; MORGADO et al., 2012). O relaxamento no músculo liso ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de uma substância que estimula a inibição do mecanismo contrátil. Independente, o processo requer uma diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ e o aumento da atividade da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) (SOMLYO; SOMLYO, 2003).

Os mecanismos de relaxamento envolvidos no acoplamento fármaco-mecânico incluem: (1) aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase tanto do retículo sarcoplasmático (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA) através da proteína cinase G (PKG) ou proteína cinase A (PKA), levando a um aumento do sequestro e da saída de Ca^{2+} , respectivamente, diminuindo assim a $[Ca^{2+}]_c$; (2) diminuição da formação do IP_3 , levando a uma diminuição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares; (3) redução da $[Ca^{2+}]_c$ pela proteína cinase A (PKA) por diminuir o influxo de Ca^{2+} indiretamente por hiperpolarização ou por ação direta nos Ca_v1 , e, finalmente, (4) diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ por estimulação do trocador Na^+/Ca^{2+} (NXC) (WEBB, 2003) (Figura 5).

Tanto em músculo liso da artéria pulmonar como em músculo liso vascular, Ca^{2+} citosólico é sequestrado pela SERCA no RS, e também em mitocôndrias por uniportes de Ca^{2+} localizados na membrana mitocondrial, embora este último têm uma baixa afinidade para Ca^{2+} (WRIGHT et al., 2013). A PMCA tem uma alta afinidade pelo Ca^{2+} que é reforçada pela ligação calmodulina, contudo, apenas transporta um Ca^{2+} por hidrólise de ATP e é, por conseguinte, lento e mais eficaz quando a concentração de Ca^{2+} intracelular é relativamente baixo. O NCX é um transportador eletrogênico que utiliza o gradiente eletroquímico do Na^+ através da membrana, para excluir um Ca^{2+} para três íons Na^+ . Como a operação do NCX depende do gradiente de Na^+ , quando a concentração citosólica de Na^+ é elevado, ele também pode operar em modo inverso, onde transporta íons Ca^{2+} para a célula e exclui Na^+ . Estas propriedades cinéticas associadas a uma distribuição uniforme através da membrana plasmática, determinam o papel destes transportadores para o controle do Ca^{2+} citosólico (CARAFOLI et al., 1996; FLOYD; WRAY, 2007; WRIGHT et al., 2013).

Figura 5 - Mecanismo do relaxamento no músculo liso vascular induzido pelas vias efectoras do cAMP e cGMP.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) a proteína G_s troca GDP por GTP na sua subunidade α (processo não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) a subunidade $G_{\alpha s}$ -GTP ativa a AC; (4) a AC converte o ATP em cAMP; (5) o NO gerado tanto dos nervos como das células epiteliais estimula a atividade da sGC; (6) a sGC converte o GTP em cGMP; (7) os nucleotídeos cíclicos, cAMP e cGMP, ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG. Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: (8) ativam os canais de K^+ ; (9) inibem os Ca_v ; (10) aumentam a atividade da SERCA e da PMCA; (11) ativam o NCX; (12) A PKG inibe os IP_3R . Todos esses mecanismos diminuem a $[Ca^{2+}]_c$; (13) inibem a MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo $4Ca^{2+}$ -CaM. Todos esses mecanismos impedem a fosforilação da MLC e, conseqüentemente, a interação dos filamentos de miosina com os de actina, promovendo o relaxamento do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Vasconcelos, 2017, adaptado de Correia, 2013.

Os nucleotídeos cíclicos (cAMP e cGMP) são os segundos mensageiros mais importantes ligados à vasodilatação, a elevação dos seus níveis intracelulares representa uma estratégia indispensável para induzir uma variedade de efeitos farmacológicos benéficos sobre várias condições patológicas cardiovasculares. Os níveis intracelulares destes dois segundos mensageiros são o resultado do equilíbrio entre a taxa de sua síntese e a taxa de sua degradação, esse segundo é feito por fosfodiesterases (PDEs) que são enzimas que atuam hidrolisando e inativando o cAMP e o cGMP em 5' AMP e 5' GMP, respectivamente (MORGADO et al., 2012; MAURICE et al., 2014).

O AMP cíclico é sintetizado a partir do ATP intracelular pela ciclase de adenilil, que são normalmente ativadas por uma primeira mensagem extracelular (neurotransmissor, hormônio, fármaco) que se liga a um GPCR (HANOUNE; DEFER, 2001; MORGADO et al., 2012). O GMP cíclico pode ser sintetizado em células do músculo liso vascular por dois tipos principais de ciclase de guanilil, diferindo na sua localização celular e na sua ativação por compostos específicos: (1) a ciclase de guanilil particulada (pGC), presente na membrana plasmática, que é ativada por peptídeos natriuréticos, tais como peptídeo natriurético atrial (ANP), do cérebro (BNP) e peptídeo natriurético do tipo C (CNP) (POTTER et al., 2006) e (2) a ciclase de guanilil solúvel (sGC) que pode ser ativada pelo óxido nítrico (NO), produzido pelas células endoteliais, e pelos doadores de NO (CARY et al., 2006; MORGADO et al., 2012).

O endotélio intacto pode liberar local e de forma controlada, compostos que induzem vasodilatação, como os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF), óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e prostaglandina E₂ (PGE₂), bem como compostos que induzem vasoconstrição, como a endotelina-1 (ET1), prostaglandina H₂ (PGH₂), tromboxano A₂ (TXA₂) e ânions superóxido (O₂⁻). Em condições fisiológicas, é observado o equilíbrio desses fatores, porém, ocorre uma predominância dos fatores relaxantes. Em contrapartida, em condições patológicas, como na hipertensão arterial pulmonar, o equilíbrio entre esses fatores é alterado, havendo uma atenuação dos efeitos vasodilatadores e predomínio dos vasoconstritores (BATLOUNI, 2001).

Dentre diversas funções exercidas pelo endotélio, ele está estrategicamente situado na parede vascular para: (1) atuar como sensor de alterações hemodinâmicas,

(2) transmitir sinais que recebe de células e da matriz extracelular, (3) produzir mediadores que interferem com crescimento, atividade, migração e morte de células; (4) manter as alterações adaptativas de forma que elas se adequem às exigências circulatórias (CARVALHO et al., 2001).

2.5 Artéria Pulmonar e Circulação Pulmonar: Princípios Básicos

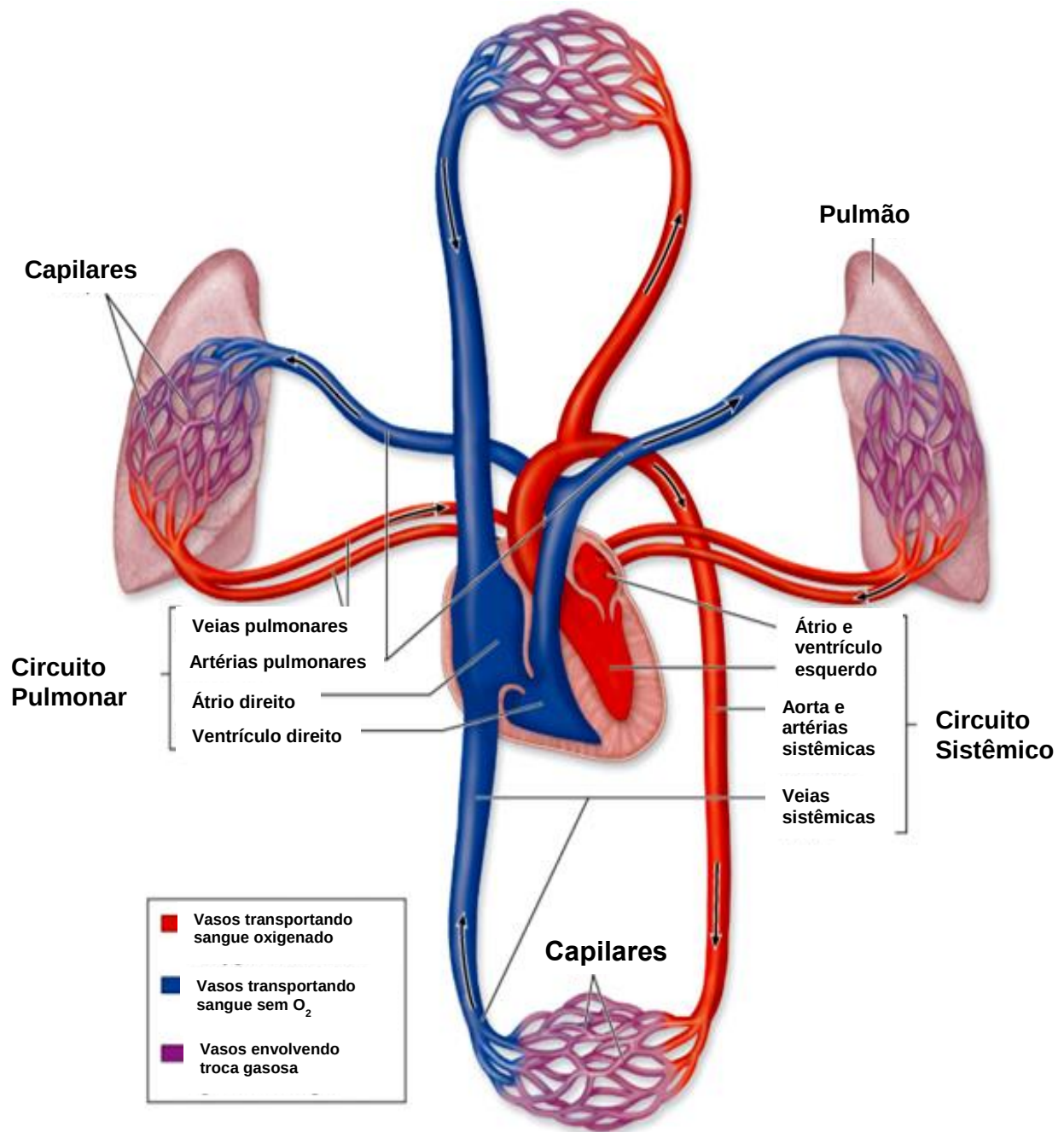
Por mais de mil anos, a visão do mundo sobre circulação pulmonar seguiu os ensinamentos de Galeno, que acreditava que o sangue era produzido no fígado, e então entregue pelo ventrículo direito (VD) aos tecidos e órgãos onde era consumido. Embora possa parecer evidente que isso é impossível, Galeno viu o movimento do sangue como baixo volume e baixo fluxo (SCHULTZ, 2002).

Apesar de não ser o primeiro a descrever a circulação pulmonar, William Harvey é considerado o pai da fisiologia moderna porque foi o primeiro a realizar, no final do século XVI, medições e cálculos detalhados (SCHULTZ, 2002) que lhe permitiram deduzir a existência de recirculação do sangue e demonstrou o fluxo sanguíneo pulmonar experimentalmente (COMTOR, 1982; GREYSON, 2010).

A circulação pulmonar, como um sistema separado de alto fluxo e de baixa pressão (Figura 6), é o resultado final de um processo evolutivo visando a otimização da troca gasosa de aves e mamíferos endotérmicos. Esta evolução foi acompanhada por uma progressiva descarga e remodelamento do ventrículo direito como um gerador de fluxo (NAEIJJE, 2013; WEST, 2013).

A principal função do ventrículo direito e da circulação pulmonar é a troca de gases, ou seja, otimizar a exposição do sangue ao ar alveolar (TAWHAI; CLARK; BURROWES, 2011). Uma vez que a troca gasosa ocorre nas membranas finas alveolares e altamente permeáveis, a pressão pulmonar deve ser mantida baixa para evitar o edema pulmonar, pois o ventrículo direito e os pulmões correspondem ao ventrículo esquerdo e a circulação sistêmica, e todo o débito cardíaco deve passar através dos pulmões (GREYSON, 2010).

Figura 6 – Esquema ilustrando a circulação pulmonar e a circulação sistêmica.



Fonte: <http://saladeobservacao.blogspot.com.br/2012/02/como-funciona-nosso-corpo-circulacao.html>

Esse sistema de baixa pressão e alto volume no ventrículo direito são exigências completamente distintas das que a circulação sistêmica implica para o ventrículo esquerdo. Além disso, o ventrículo direito e a circulação pulmonar devem equilibrar as mudanças dinâmicas no volume sanguíneo e do fluxo resultante da respiração, alterações posicionais e alterações no débito cardíaco ventricular esquerdo. As adaptações necessárias para atender a essas demandas conflitantes têm como consequência uma capacidade de compensação reduzida frente a um aumento da pós-carga ou pressão (SCHULTZ; WILLIAM, 2002; NAEIJE, 2005; GREYSON, 2010).

A artéria pulmonar (Figura 6) é caracterizada por ser um vaso delgado e elástico que se ramifica para suprir as várias artérias pulmonares lobares, arteríolas pulmonares e capilares alveolares. Essa artéria é responsável por transportar o sangue pobre em oxigênio do coração para os pulmões, onde será oxigenado e então distribuído para o resto do corpo. O sangue sai dos capilares alveolares através de vênulas pulmonares e retorna ao coração, para o átrio esquerdo, através de um sistema de vênulas e ramos pulmonares semelhantes em estrutura ao ramo arterial pulmonar (SINGHAL et al., 1973; GREYSON, 2010).

A vasculatura pulmonar em um pulmão humano típico inclui na ordem de centenas de milhares de vasos arteriais e venosos. A troca gasosa ocorre através das paredes finas dos capilares alveolares, dos quais existem bilhões (HUANG et al., 1996; TAWHAI; CLARK; BURROWES, 2011).

A regulação da circulação pulmonar está sob o controle de um mecanismo de detecção de oxigênio, ainda não totalmente compreendido, que pode depender de canais de potássio sensíveis a voltagem ou ao cálcio, espécies reativas de oxigênio ou outros mecanismos (SOMME et al., 2008), bem como do óxido nítrico, prostaglandinas, endotelina e catecolaminas (MORRELL et al., 2009; GREYSON, 2010).

Nas artérias pulmonares são encontrados diferentes tipos de receptores importantes para a regulação do tônus vascular pulmonar, entre eles destacam-se dois receptores distintos para a família de peptídeos de endotelina (ET-1, ET-2 e ET-3), o receptor de endotelina A (ET_A) e o receptor de endotelina B (ET_B), sendo ambos receptores do tipo GPCRs, acoplados a proteína G_{q/11} (RUBIN, 2012). A estimulação dos receptores ET_B endoteliais levam a liberação de fatores

vasodilatadores como NO e prostaciclina (HIRATA et al., 1993; DUPUIS, HOEPER, 2008).

Estudos bioquímicos revelaram a presença das isoformas 1, 3, 4 e 5 da enzima fosfodiesterase (PDE) em artérias pulmonares humanas (RABE et al., 1994).

Embora a circulação pulmonar de muitas espécies seja innervada com nervos colinérgicos, esses não parecem ser importantes na manutenção do baixo tônus vascular pulmonar. Em humanos, ACh induz uma clara resposta vasodilatadora dependente de endotélio, tanto em condições de repouso quanto durante a vasoconstrição pulmonar induzida por hipóxia aguda. Existem cinco subtipos de receptores muscarínicos e os que medeiam os relaxamentos nas artérias pulmonares são classificados como receptores M3 (BARNES; LIU, 1995; WOLFGANG, 2011).

Diferente da innervação parassimpática, os nervos simpáticos desempenham um papel importante na manutenção do tônus vascular pulmonar basal. Tanto o aumento da resistência vascular pulmonar como a diminuição da complacência vascular pulmonar que ocorrem durante a estimulação da innervação simpática são mediados por α -adrenoceptores. Estudos mostraram que os receptores α 1-adrenoceptores estão localizados tanto na artéria como na veia pulmonar, mas os receptores α 2-adrenoceptores só podem ser encontrados na veia pulmonar (BARNES; LIU, 1995; WOLFGANG, 2011).

Como dito anteriormente, a circulação pulmonar normal é um sistema de baixa pressão e resistência, capaz de acomodar todo o débito cardíaco por estar completamente dilatada. Essa particularidade fisiológica observada no leito vascular pulmonar é consistente com a observação de que quase nenhuma alteração é observada nas pressões pulmonares em condições de alto fluxo sanguíneo pulmonar. Além disso, não ocorrem alterações significativas da pressão arterial pulmonar, mesmo após a administração de drogas vasodilatadoras em doses suficientes para causar significativa redução das pressões sistêmicas (BARNES; LIU, 1995; DIAS-JUNIOR et al., 2008).

Infelizmente, um grande número de processos patológicos podem ter como consequência aumentos agudos ou crônicos na pós-carga. A medida que aumenta o excesso de pós-carga, pode aparecer insuficiência cardíaca direita podendo ocorrer instabilidade hemodinâmica repentina e morte. Foram identificadas várias vias

bioquímicas que podem participar da adaptação apropriada ou inadequada de sobrecarga e pressão (HUANG et al., 1996; GREYSON, 2010).

Dentre as doenças que acometem o ventrículo direito e as artérias pulmonares destaca-se a hipertensão arterial pulmonar (HAP), uma doença crônica e progressiva caracterizada por elevação da pressão arterial pulmonar e resistência vascular pulmonar, o que, em última análise, resulta em insuficiência ventricular direita e morte (MUBARAK, 2010). A HAP é uma doença progressiva de várias origens que está associada a um mau prognóstico e resulta em disfunção cardíaca direita, estima-se que esta doença afeta até 100 milhões de pessoas em todo o mundo (SCHERMULY et al., 2011).

A HAP é caracterizada por vasoconstrição pulmonar excessiva e processos de remodelamento vascular anormais que geralmente afetam todas as camadas dos vasos resultando em perda severa da área da seção transversal e, portanto, aumento da pós-carga ventricular direita. Alterações mais íntimas incluem lesão endotelial, proliferação de células endoteliais, invasão da íntima por células fibroblásticas e, as vezes, obstrução do lúmen vascular por lesões plexiformes únicas (RABINOVITCH, 2007; SCHERMULY et al., 2011).

O tratamento da HAP inclui modificações de estilo de vida e tratamentos convencionais medicamentosos. Atualmente, são utilizados para o tratamento dessa doença, nos casos iniciais, os bloqueadores de canais Ca^{2+} , como o nifedipino e diltiazem, porém esses medicamentos não são os mais indicados nos casos mais avançados da doença devido a sua reduzida eficácia, ou em pacientes que não respondem a esse tratamento (SITBON et al., 2005).

Como tratamentos mais eficazes são utilizados os análogos da prostaciclina, como o iloprote e epoprostenol, os antagonistas dos receptores de endotelina, como a bosentana, e os inibidores de PDE-5, como a sildenafil. Estudos mostraram que os inibidores da ROCK são alternativas promissoras para o tratamento da HAP (MCLAUGHLIN; MCGOON, 2006).

Diante disso, substâncias que induzam o relaxamento das artérias pulmonares diminuindo a pós-carga do ventrículo direito são potenciais candidatas a se tornarem alternativas para o tratamento da HAP.

3 Objetivos



3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Contribuir para o estudo farmacológico da família Verbenaceae, em particular da espécie *Lippia microphylla* Cham., com a finalidade de colaborar na descoberta de drogas com potencial terapêutico na hipertensão pulmonar ou que possam ser utilizadas como ferramentas farmacológicas para o entendimento dos mecanismos de contração – relaxamento da artéria pulmonar de rato.

3.2 Específicos

- ♦ Determinar e comparar os parâmetros de eficácia e potência relativas do efeito relaxante do LM-OE, timol e carvacrol em artéria pulmonar de ratos, na ausência e na presença de endotélio funcional;
- ♦ Avaliar a participação dos fatores relaxantes derivados do endotélio, óxido nítrico (NO) e prostaciclina no efeito relaxante do timol;
- ♦ Investigar a participação dos receptores muscarínicos endoteliais no efeito relaxante promovido timol;
- ♦ Analisar se o efeito relaxante do timol envolve a ativação da via de sinalização AC-cAMP-PKA;
- ♦ Determinar se o efeito relaxante do timol é mediado pelo bloqueio do influxo de Ca^{2+} pelos Ca_v ;
- ♦ Avaliar se o timol estaria inibindo a via da Rho cinase para exercer seu efeito vasodilatador.

4 Material e Métodos



MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Produtos-teste

A espécie *Lippia microphylla* Cham. foi coletada, em junho de 2010, no município de Serra Branca, estado da Paraíba, sendo o material botânico identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do setor de Botânica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Uma exsicata da planta está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da UFPB sob código de identificação AGRA 6118.

O óleo essencial obtido das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (LM-OE) foi caracterizado pelos Profs. Drs. José Guilherme Soares Maia e Eloisa Helena de Aguiar Andrade, da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal do Pará (UFPA) e cedido pelo Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, do setor de Fitoquímica do PPgPNSB. O timol e o carvacrol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil), com pureza igual ou superior a 99,5%.

4.1.2 Animais

Utilizou-se ratos da espécie *Rattus norvegicus*, pesando entre 270-310 g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM)/UFPB. Os procedimentos experimentais eram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia (CEUA/Cbiotec), sob certidão nº 0501/13.

Os animais eram mantidos sob controle alimentar com uma dieta balanceada à base de ração (Presence®) com livre acesso à água e em ambiente com ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) reguladas e constantes.

Todos os experimentos eram realizados no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas do PPgPNSB/CCS/UFPB no período entre 8 e 20 h.

4.1.3 Drogas e reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), o cloreto de sódio (NaCl) e o sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram obtidos da Vetec (Brasil). O fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4) foi obtido da Nuclear (Brasil). O bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e o cloreto de potássio (KCl) foram obtidos da Fmaia (Brasil). Estas substâncias, exceto a glicose, o NaCl e o NaHCO_3 , eram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução estoque que era mantida sob refrigeração.

O cloridrato de acetilcolina (ACh) foi obtido da Merck (Brasil). A fenilefrina (FEN) foi obtida da Pfizer (EUA). A FEN e a ACh eram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução estoque (10^{-1} M).

O óleo de castor (Cremophor®), Nw-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), 2',3'-O-isopropilideno adenosina (IPA), S-(-)-Bay K8644, Y-27632, atropina e indometacina foram obtidos da Sigma-Aldrich (Brasil). O N- [2 - ((p-Bromocinamil) amino) etil] -5-isoquinolinossulfonamida (H-89) foi obtido da Cayman Chemical Company (EUA). Estas substâncias eram mantidas em um "freezer" à temperatura de -20°C , dissolvidas e diluídas em água destilada, exceto o IPA, o Y-27632 e o H-89 que eram dissolvidos em etanol absoluto.

A mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) foi obtida da White Martins (Brasil).

4.1.4 Preparo da solução-estoque do LM-OE

O LM-OE era solubilizado em Cremophor® (3% v/v) e diluído em água destilada para obtenção da solução de partida (10 mg/mL). Esta solução era preparada diariamente antes de cada experimento, uma vez que os óleos essenciais se caracterizam pela presença de compostos voláteis (BAKKALI et al., 2008). A concentração final de Cremophor® nas cubas nunca excedeu 0,01% (v/v).

No momento da realização dos experimentos, essa solução era diluída em água destilada de acordo com a exigência do protocolo. As concentrações do LM-OE eram utilizadas em múltiplos de 3 (SILVA, 2015). O mesmo era feito com o timol e

carvacrol. As concentrações utilizadas para as três substâncias eram de 0,01 a 729 µg/mL, podendo variar de acordo com cada experimento.

4.1.5. Solução nutritiva

A solução nutritiva de Krebs-Henseleit utilizada era gaseificada com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂) e o pH era ajustado para 7,4 com solução de HCl ou NaOH 1 N (Tabela 1).

A solução despolarizante nominalmente sem Ca²⁺, era utilizada no protocolo de CaCl₂ (Tabela 2).

Tabela 1 – Krebs-Henseleit por Pauvert et al., 2003.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	119,0
KCl	4,6
MgSO ₄	1,2
KHPO ₄	1,2
CaCl ₂	1,5
Glicose	11,4
NaHCO ₃	20,0

Tabela 2 – Solução despolarizante nominalmente sem Ca²⁺ por Karasu-Minareci et al., 2012.

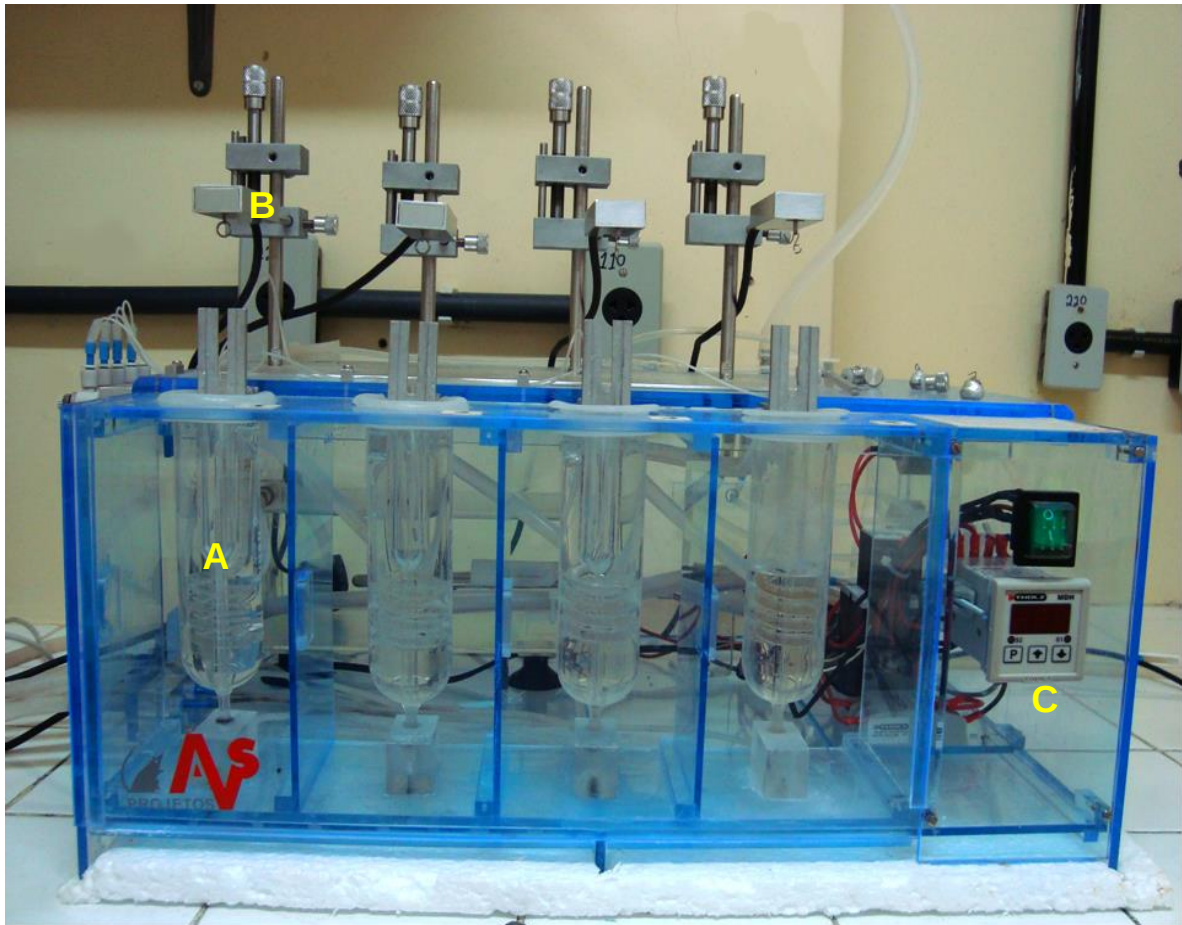
Substância	Concentração (mM)
NaCl	43,6
KCl	80
MgSO ₄	1,2
KHPO ₄	1,2
Glicose	11,4
NaHCO ₃	20,0

4.1.6 Equipamentos

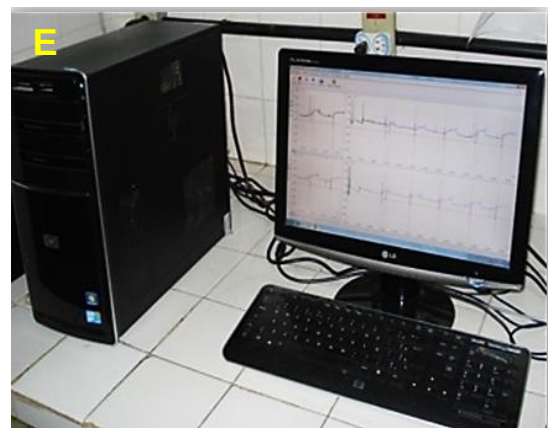
Para o registro das contrações isométricas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados de 6 mL (Figura 7 A), modelo BOI-04 AVS (São Carlos, SP, Brasil), o qual contém uma bomba termostática (Figura 7 C) modelo BT-60 AVS (São Carlos, SP, Brasil) que mantinha a temperatura das cubas em 37° C, e conectados a transdutores de força isométricos (Figura 7 B) modelo TIM-05 AVS (São Carlos, SP, Brasil), acoplados a um amplificador (Figura 7 D) modelo AECAD04F. O amplificador era conectado a um sistema de aquisição digital (Figura 7 E) com o software AQCAD versão 2.1.6 para aquisição dos dados e, para análise dos registros, foi utilizado o software ANCAD.

O pH era aferido por um pHmetro digital PG2000 GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil). As substâncias eram pesadas em balança analítica modelo MARTE AY220 (São Paulo, SP, Brasil). Os animais eram pesados em balança semianalítica GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil).

Figura 7 – Foto do sistema de banho para órgãos isolados composto por cubas de vidro (A), transdutores isométricos (B) e bomba termostática (C), amplificador (D), microcomputador (E).



Fonte: Monteiro, 2013.



Fonte: Martins, 2016.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação dos anéis de artéria pulmonar de rato

Os ratos eram eutanasiados por decapitação em guilhotina. Em seguida, o coração e os pulmões eram retirados da cavidade torácica, as artérias pulmonares eram isoladas e livres de tecido conjuntivo e adiposo e os segmentos eram suspensos individualmente em cubas de banho para órgão isolado por hastes de aço inoxidável, conectadas a transdutores de força isométricos, mantidas sob tensão de repouso de 1 g, contendo solução de Krebs Henseleit a 37 °C. As preparações eram mantidas em repouso por um período de 60 minutos para estabilização, com renovação da solução nutritiva a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA, 1970). Após o período de estabilização, era induzida uma contração com FEN 3×10^{-6} M (concentração que induz a resposta contrátil submáxima do órgão) (PAUVERT et al., 2003) e durante o componente tônico da contração, de amplitude iguais ou superiores a 0,5 g, era adicionado 10^{-6} M de acetilcolina para verificar a integridade do endotélio (FURCHGOTT; ZAWDZKI, 1980). O endotélio vascular era considerado íntegro quando o órgão apresentava relaxamento igual ou superior a 60%. Em relaxamento igual ou inferior a 10%, os segmentos eram considerados sem endotélio funcional (ALENCAR et al, 2013).

4.2.2 Triagem farmacológica

4.2.2.1 Efeito do LM-OE, do carvacrol e do timol sobre a artéria pulmonar isolada de rato pré-contraída com FEN

Após a verificação do endotélio, lavagem e retorno à tensão basal do órgão, era induzida uma nova contração com 3×10^{-6} M de FEN e, sobre o componente tônico desta contração, os produtos testes eram adicionados de maneira cumulativa à cuba, em preparações diferentes. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração induzida por FEN. Os valores de CE_{50} (concentração de um composto que produz 50% do seu efeito máximo) foram obtidos por regressão

não-linear a partir das curvas concentrações-resposta obtidas para o LM-OE, timol e carvacrol nos segmentos dos órgãos na ausência ou presença de endotélio.

4.2.3 Caracterização do mecanismo de ação do timol em artéria pulmonar de rato

4.2.3.1 Participação dos receptores muscarínicos endoteliais no efeito relaxante do timol em artéria pulmonar de rato

O órgão era isolado e montado como descrito anteriormente. Após o período de estabilização, os anéis de artéria pulmonar com endotélio funcional eram pré-incubados com 1 nM de atropina, um bloqueador não específico dos receptores muscarínicos, por 30 minutos (CHOY et al., 2002). Em seguida, era induzida uma contração com 3×10^{-6} M de FEN e, sobre o componente tônico dessa contração o timol adicionado à cuba em concentrações cumulativas. A potência relaxante do timol foi comparada na ausência e na presença da atropina.

4.2.3.2 Participação do óxido nítrico (NO) no efeito relaxante do timol em artéria pulmonar de rato

O órgão era isolado e montado como descrito anteriormente. Após o período de estabilização, os anéis de artéria pulmonar com endotélio funcional eram pré-incubados com 10^{-4} M de L-NAME, um inibidor competitivo da sintase do óxido nítrico (NOS), por 30 minutos (REES et al., 1990). Em seguida, era induzida uma contração com 3×10^{-6} M de FEN e, sobre o componente tônico dessa contração o timol era adicionado à cuba em concentrações cumulativas. As potências relaxantes do timol foram comparadas na ausência e na presença do L-NAME.

4.2.3.3 Participação das prostaciclina endoteliais no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato

O órgão era isolado e montado como descrito anteriormente. Após o período de estabilização, os anéis de artéria pulmonar com endotélio funcional eram

pré-incubados com 10^{-5} M de indometacina, um inibidor da COX, por 30 minutos (SUBRAMANI et al., 2010). Em seguida, era induzida uma contração com 3×10^{-6} M de FEN e, sobre o componente tônico dessa contração o timol era adicionado à cuba em concentrações cumulativas. A potência relaxante do timol foi comparada na ausência e na presença da indometacina.

Em seguida, em diferentes experimentos, os anéis de artéria pulmonar com endotélio funcional eram pré-incubados uma combinação com 10^{-4} M de L-NAME e 10^{-5} M de indometacina por 30 minutos (SUBRAMANI et al., 2010). Em seguida, era induzida uma contração com 3×10^{-6} M de FEN e, sobre o componente tônico dessa contração o timol era adicionado à cuba em concentrações cumulativas. Dessa forma foi avaliado uma possível potencialização no bloqueio induzido por esses inibidores quando comparados em preparações separadas ou uma combinação dos dois.

4.2.3.4 Efeito do inibidor e do ativador da ciclase de adenilil no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato

O órgão era isolado e montado como descrito anteriormente. Após o período de estabilização, os anéis de artéria pulmonar com endotélio funcional eram pré-incubados com 10^{-5} M de IPA, um inibidor da ciclase de adenilil (RODRÍGUEZ-RAMOS; GONZÁLEZ-ANDRADE; NAVARRETE, 2011), por 30 minutos. Em seguida, era induzida uma contração com 3×10^{-6} M de FEN e, sobre o componente tônico dessa contração o timol era adicionado à cuba em concentrações cumulativas. A potência relaxante do timol foi comparada na ausência e na presença do inibidor.

Em seguida, após o período de estabilização, os anéis de artéria pulmonar com endotélio funcional eram pré-incubados com $5,6 \times 10^{-14}$ M de forskolina, um ativador da ciclase de adenilil, por 30 minutos. Em seguida, era induzida uma contração com 3×10^{-6} M de FEN e, sobre o componente tônico dessa contração o timol era adicionado à cuba em concentrações cumulativas. A potência relaxante do timol foi comparada na ausência e na presença do ativador.

4.2.3.5 Efeito do inibidor da PKA no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato

O órgão era isolado e montado como descrito anteriormente. Após o período de estabilização, os anéis de artéria pulmonar com endotélio funcional eram pré-incubados com 5×10^{-7} M de H-89, um inibidor da proteína cinase dependente de cAMP (PKA) (ZHANG et al., 2010), por 30 minutos. Em seguida, era induzida uma contração com 3×10^{-6} M de FEN e, sobre o componente tônico dessa contração o timol era adicionado à cuba em concentrações cumulativas. A potência relaxante do timol foi comparada na ausência e na presença do inibidor.

4.2.3.6 Efeito relaxante do timol sobre a artéria pulmonar pré-contraída com 30 ou 80 mM de KCl

O órgão era isolado e montado como descrito anteriormente e, após o período de estabilização, era induzida uma contração com 30 ou 80 mM de KCl em diferentes preparações (GURNEY, 1994). Durante a fase tônica sustentada dessa contração, o timol era adicionado à cuba em concentrações cumulativas e em diferentes preparações. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por KCl, e os valores de efeito máximo (E_{max}) do timol foram obtidos para contrações induzidas por 30 e 80 mM de KCl. Os valores de CE_{50} foram calculados como descrito anteriormente.

4.2.3.7 Efeito do timol frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+}

A artéria pulmonar era montada como descrito anteriormente. Após o período de estabilização de uma hora a solução de Krebs Henseleit era substituída pela solução despolarizante (KCl 80 mM) nominalmente sem Ca^{2+} , por um período de 45 minutos (KARASU-MINARECI et al., 2012). Eram induzidas duas curvas semelhantes concentrações-resposta cumulativa ao $CaCl_2$, em seguida o timol (3, 9, 27 ou 81 μ g/mL) era incubado na ausência de $CaCl_2$ por 30 minutos e após esse período uma terceira curva cumulativa ao $CaCl_2$ era obtida na presença de timol.

4.2.3.8 Efeito relaxante do timol em artéria pulmonar de rato sobre as contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644

O órgão era montado com descrito anteriormente, e após estabilização, a artéria pulmonar era parcialmente despolarizada pela adição de 10 mM de KCl por 10 minutos e em sua presença era induzida uma contração com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644, um agonista seletivo dos Ca_v do tipo L ou Ca_v1 (JEFFERY; WANSTALL, 2001). Após a estabilização dessa contração, o timol era adicionado de maneira cumulativa à cuba. Os valores de CE_{50} foram obtidos por regressão não-linear a partir da curva concentração-resposta obtidas para o timol.

4.2.3.9 Efeito do inibidor da Rho cinase no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato

O órgão era isolado e montado como descrito anteriormente. Após o período de estabilização, os anéis de artéria pulmonar com endotélio funcional eram pré-incubados com 10^{-6} M de Y-27632, um inibidor da proteína Rho cinase (GAO et al., 2007; DHAESE; LEFEBVRE, 2009), por 30 minutos. Em seguida, era induzida uma contração com 3×10^{-6} M de FEN e, sobre o componente tônico dessa contração o timol era adicionado à cuba em concentrações cumulativas. A potência relaxante do timol foi comparada na ausência e na presença do inibidor.

4.3 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como a média e o erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente empregando-se o teste *t* não pareado ou análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. A hipótese nula foi rejeitada quando o valor de $p < 0,05$. Os valores de CE_{50} foram calculados por regressão não-linear para todos os experimentos realizados, como parâmetro de potência (NEUBIG et al., 2003). Foram utilizados os valores do efeito máximo (E_{max}) como parâmetro de eficácia. A análise dos dados foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

5 Resultados



RESULTADOS

5.1 Triagem farmacológica

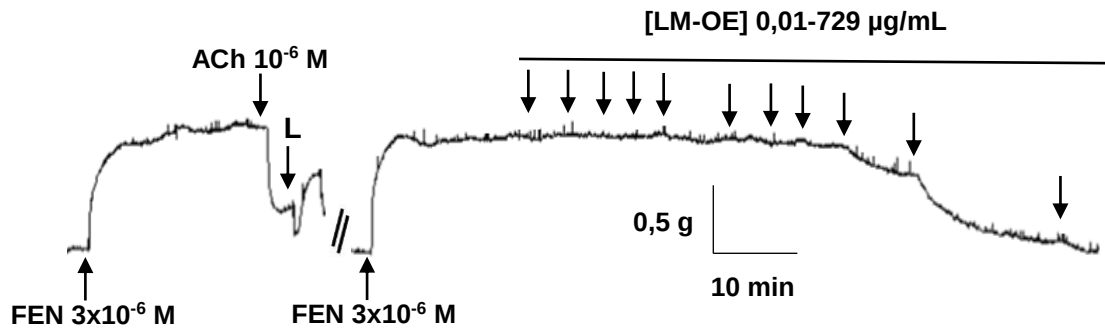
5.1.1 Efeito do LM-OE, carvacrol e timol sobre a contração tônica induzida por FEN em artéria pulmonar de rato

O LM-OE relaxou completamente, de maneira equipotente, os anéis de artéria pulmonar na presença ($E_{\max} = 92,8 \pm 4,6\%$, $CE_{50} = 29,1 \pm 5 \mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,98 \pm 0,006$ $n = 5$) e na ausência ($E_{\max} = 97,8 \pm 0,9\%$, $CE_{50} = 21,83 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,98 \pm 0,01$ $n = 5$) de endotélio (Figura 8 A e B, Gráfico 1) com tempo de relaxamento de aproximadamente 50 minutos. De maneira semelhante, o carvacrol promoveu o relaxamento dos anéis de artéria pulmonar de maneira equipotente tanto na presença ($E_{\max} = 100\%$, $CE_{50} = 20,4 \pm 4,2 \mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,98 \pm 0,01$, $n = 5$) como na ausência ($E_{\max} = 97,3 \pm 2,0\%$, $CE_{50} = 15,8 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,99 \pm 0,002$, $n = 5$) de endotélio (Figura 9 A e B, Gráfico 2), com tempo de relaxamento de aproximadamente 45 minutos. O timol relaxou os anéis de artéria pulmonar, porém com maior potência na presença ($E_{\max} = 99,6 \pm 0,4\%$, $CE_{50} = 6,6 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,95 \pm 0,01$ $n = 5$) que na ausência ($E_{\max} = 100\%$, $CE_{50} = 23,02 \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,98 \pm 0,01$ $n = 5$) de endotélio (Figura 10 A e B, Gráfico 3) com tempo de relaxamento de aproximadamente 55 minutos.

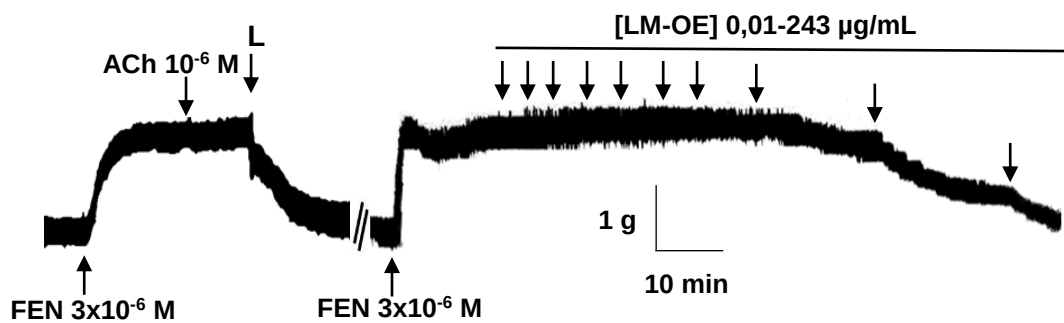
Na tabela 3 é possível observar as CE_{50} dos três produtos-teste na presença e ausência do endotélio funcional. O efeito dos compostos foi reversível, sendo os tempos de reversão para os três produtos testados de aproximadamente uma hora.

Figura 8 - Registros representativos do efeito relaxante do LM-OE em anéis de artéria pulmonar de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.

A



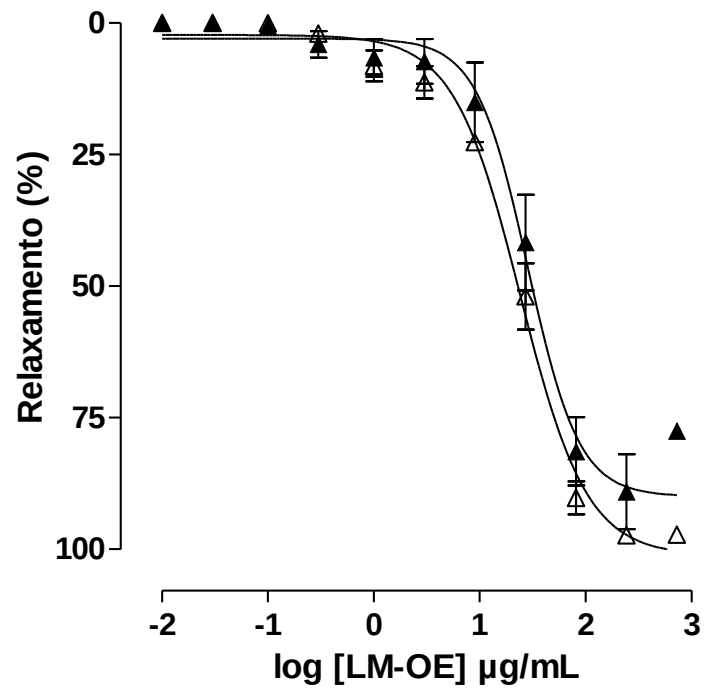
B



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do LM-OE (A e B).

Fonte: Sampaio, 2017.

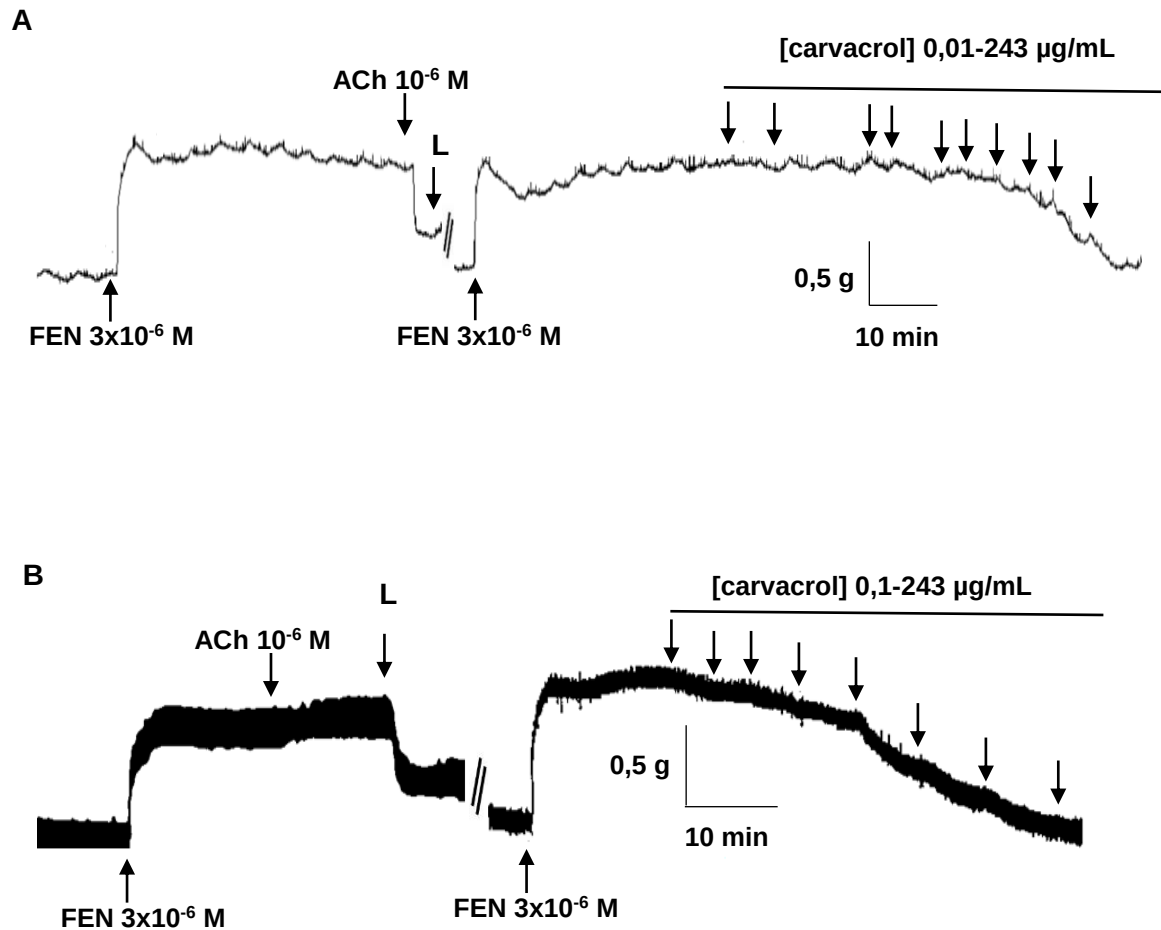
Gráfico 1 - Efeito relaxante do LM-OE em anéis de artéria pulmonar de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na presença (▲) e na ausência (△) de endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Sampaio, 2017.

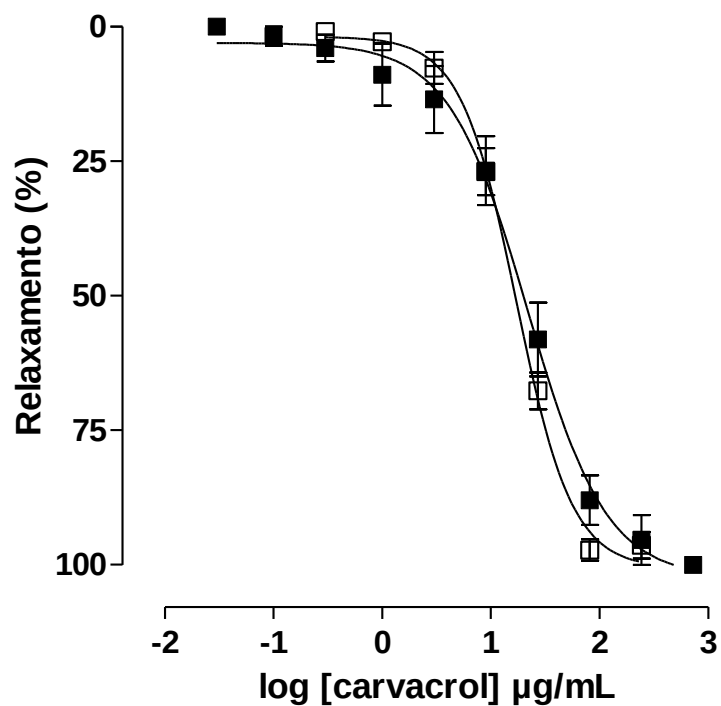
Figura 9 - Registros representativos do efeito relaxante do carvacrol em anéis de artéria pulmonar de rato pré-contraída com FEN 3×10^{-6} M na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do carvacrol (A e B).

Fonte: Sampaio, 2017.

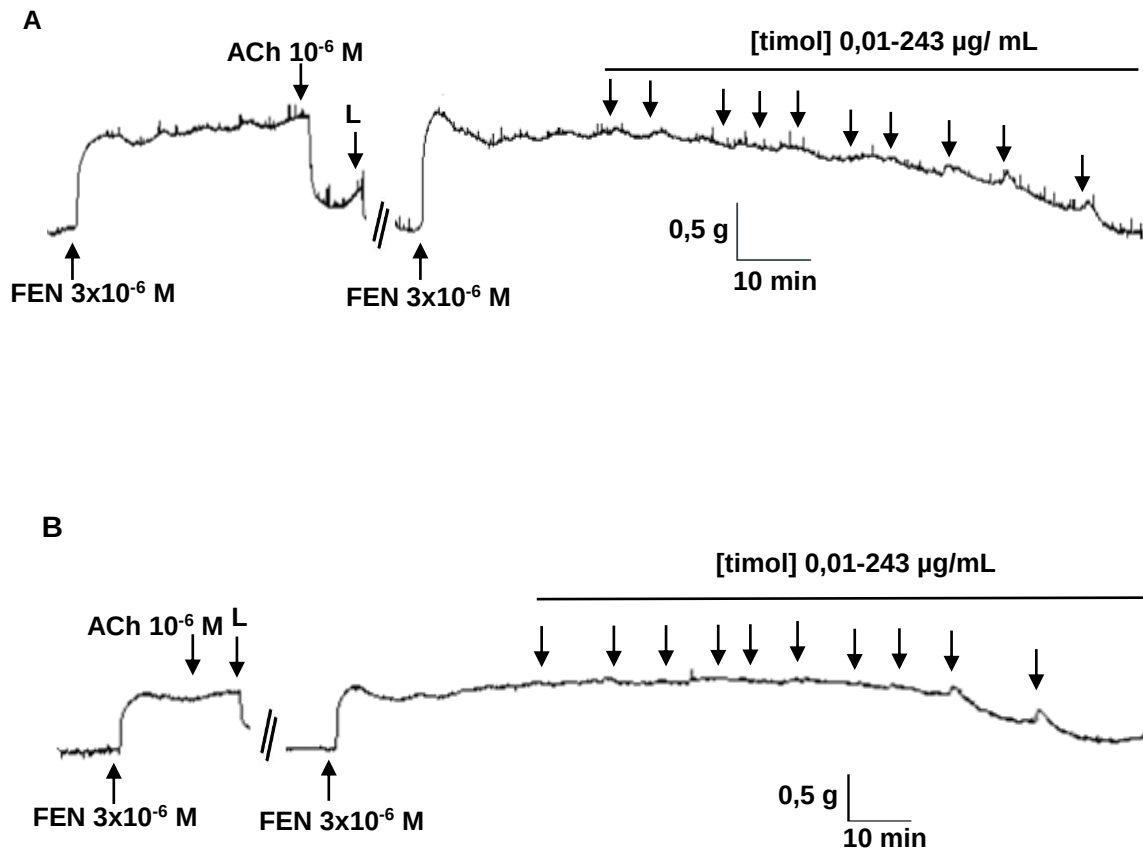
Gráfico 2 - Efeito relaxante do carvacrol em anéis de artéria pulmonar de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na presença (■) e na ausência (□) de endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Sampaio, 2017.

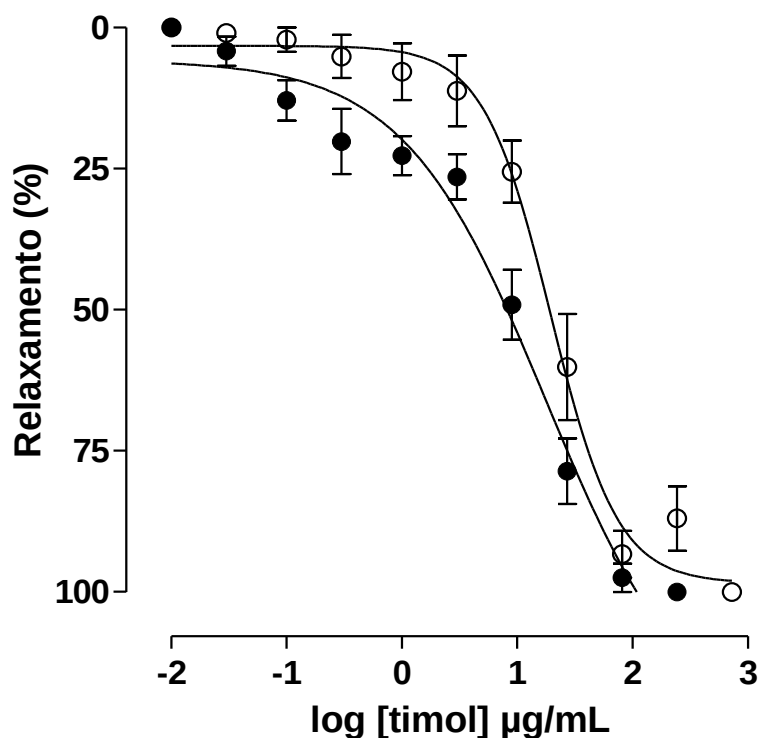
Figura 10 - Registros representativos do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraídos com 3×10^{-6} M de FEN na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do timol (A e B).

Fonte: Sampaio, 2017.

Gráfico 3 – Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráídos com FEN 3×10^{-6} M na presença (●) e na ausência (○) de endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Sampaio, 2017.

Tabela 3 – Valores de CE_{50} dos produtos-teste em artéria pulmonar de rato pré contraída com FEN, na presença e na ausência de endotélio.

Produto-teste	CE_{50} (µg/mL)	
	E+	E-
LM-OE	29,1 ± 5,6	21,83 ± 1,9
Carvacrol	20,4 ± 4,2	15,8 ± 1,0
Timol	6,6 ± 0,9*#	23,02 ± 3,8

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (timol (E+) vs. LM-OE (E+) + LM-OE (E-) + carvacrol (E+) + carvacrol (E-)); # $p < 0,05$ (timol (E+) vs. Timol (E-)), (n = 5). E+ = artéria com endotélio funcional, E- = artéria sem endotélio funcional.

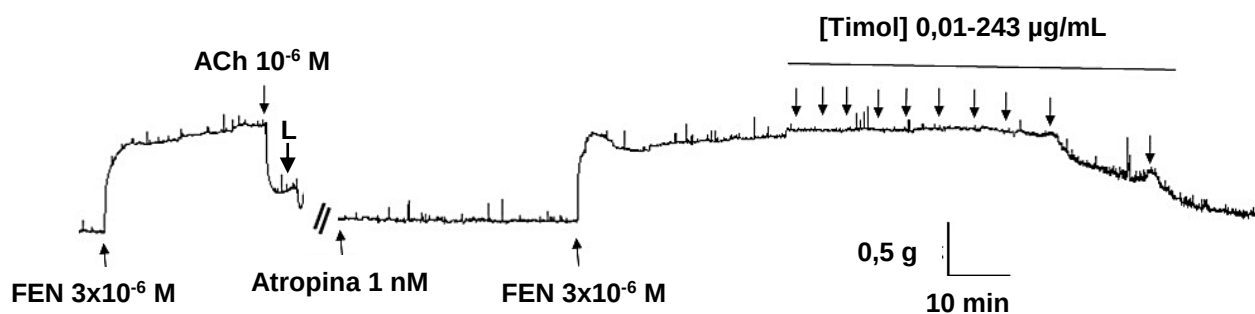
Fonte: Sampaio, 2017.

5.2 Caracterização do mecanismo de ação do timol em artéria pulmonar isolada de rato

5.2.1 Participação dos receptores muscarínicos endoteliais no efeito relaxante do timol em artéria pulmonar de rato

A curva de relaxamento do timol foi desviada para a direita na presença de 1 nM de atropina ($p < 0,05$), com potência relaxante reduzida em cerca de 4 vezes na presença desse inibidor, como pode-se observar através do valor da sua CE_{50} , que passou de $6,6 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ ($n = 5$), na ausência, para $27,1 \pm 3,7 \mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,99 \pm 0,002$, $n = 5$) na presença da atropina (Figura 11, Gráfico 4). O E_{max} do timol foi atingido com $243 \mu\text{g/mL}$ tanto na ausência como presença de atropina.

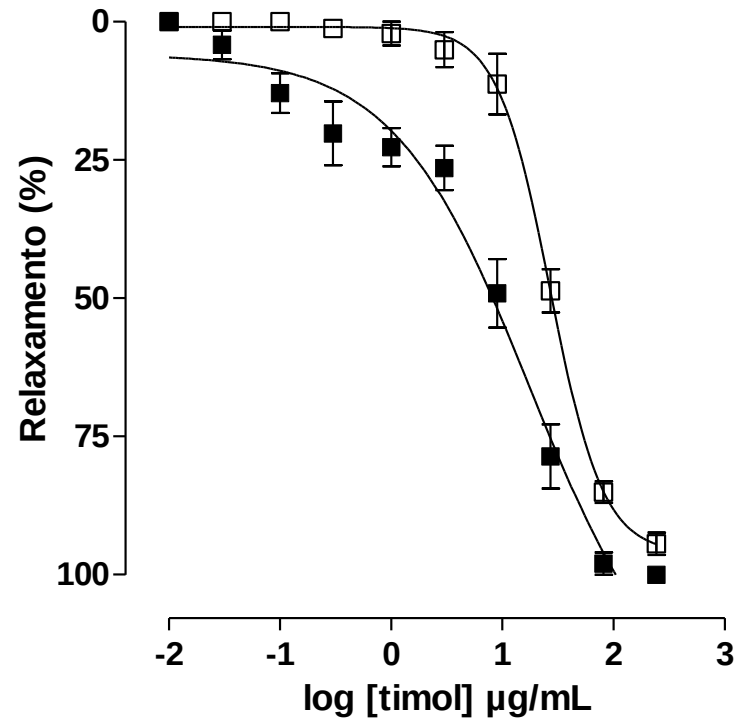
Figura 11 - Registro representativo do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraída com FEN 3×10^{-6} M na presença de 1 nM de atropina.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do timol.

Fonte: Sampaio, 2017.

Gráfico 4 – Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráídos com FEN 3×10^{-6} M na ausência (■) e na presença (□) de 1 nM de atropina.



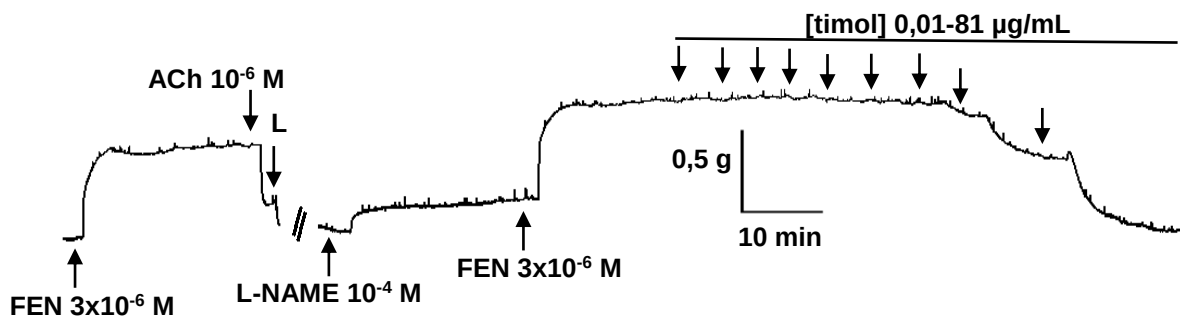
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Sampaio, 2017.

5.2.2 Participação do óxido nítrico (NO) no efeito relaxante do timol em artéria pulmonar de rato

A curva de relaxamento do timol foi desviada para a direita na presença de 10^{-4} M de L-NAME ($p < 0,05$), com potência relaxante reduzida em cerca de 2 vezes na presença desse inibidor, como observa-se através do valor da sua CE_{50} , que passou de $6,6 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ ($n = 5$), na ausência, para $14,7 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,99 \pm 0,002$, $n = 5$) na presença do L-NAME (Figura 12, Gráfico 5). O E_{max} do timol foi atingido com $243 \mu\text{g/mL}$ na ausência de L-NAME, enquanto na presença do inibidor foi atingido na concentração de $81 \mu\text{g/mL}$.

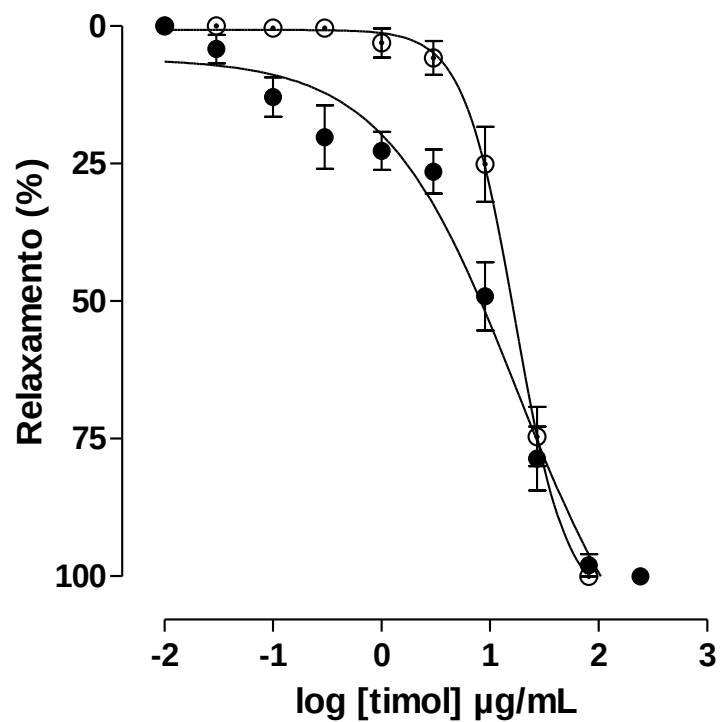
Figura 12 - Registro representativo do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraída com FEN 3×10^{-6} M na presença de 10^{-4} M de L-NAME.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do timol.

Fonte: Sampaio, 2017.

Gráfico 5 – Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na ausência (●) e na presença (○) de 10^{-4} M de L-NAME.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Sampaio, 2017.

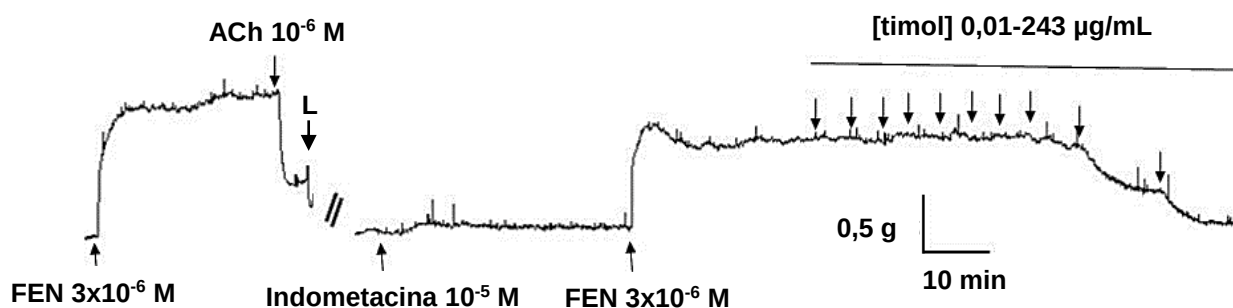
5.2.3 Participação das prostaciclinas endoteliais no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato

A curva de relaxamento do timol foi desviada para a direita na presença de 10^{-5} M de indometacina ($p < 0,05$), com potência relaxante reduzida em cerca de 4 vezes na presença desse inibidor, como observa-se através, como pode-se observar através do valor da sua CE_{50} , que passou de $6,6 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ ($n = 5$), na ausência, para $27,7 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,99 \pm 0,001$, $n = 5$) na presença da indometacina (Figura 13, Gráfico 6 A). O E_{max} do timol foi atingido com $243 \mu\text{g/mL}$ na ausência e na presença de indometacina.

No gráfico 6 B é possível observar que a curva de relaxamento do timol ($0,01 - 81 \mu\text{g/mL}$) foi desviada para a direita na presença da combinação de 10^{-4} M de L-NAME e 10^{-5} M de indometacina ($p < 0,05$), com potência relaxante reduzida em cerca de 4 vezes na presença dos inibidores ($CE_{50} = 29,6 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,99 \pm 0,003$), havendo uma diferença estatística significativa da combinação quando comparada apenas com o L-NAME sozinho, mas não houve diferença quando comparado com a indometacina sozinha.

Na tabela 4 é possível observar os valores das CE_{50} do timol na presença de L-NAME, atropina e indometacina, com suas respectivas comparações estatísticas.

Figura 13 - Registro representativo do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraída com FEN 3×10^{-6} M na presença de 10^{-5} M de indometacina.

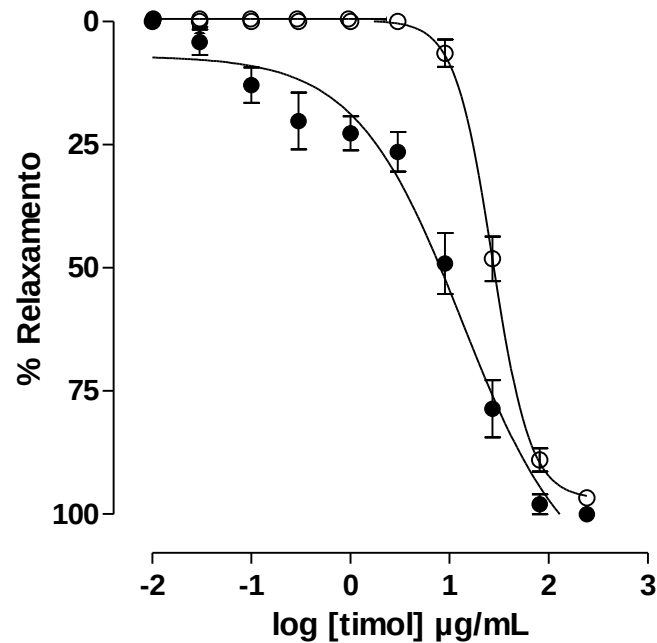


As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do timol.

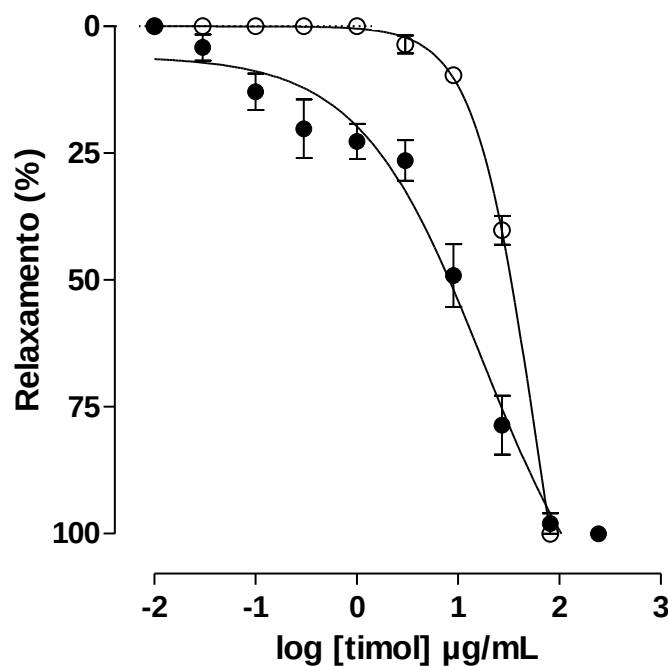
Fonte: Sampaio, 2017.

Gráfico 6 – (A) Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráídos com FEN 3×10^{-6} M na ausência (●) e na presença (○) de 10^{-5} M de indometacina. (B) Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráídos com FEN 3×10^{-6} M na ausência (●) e na presença (○) da combinação de 10^{-4} M de L-NAME e 10^{-5} M de indometacina

A



B



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Sampaio, 2017.

Tabela 4 – Valores de CE_{50} do timol em artéria pulmonar de rato pré contraída com FEN, na presença (E+) do endotélio funcional e na presença de inibidores.

Produto-teste + inibidores	CE_{50}
Timol	$6,6 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$
Timo / Atropina	$25,2 \pm 2,5 \mu\text{g/mL}^{* \#}$
Timol / L-NAME	$14,7 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}^*$
Timol / Indometacina	$27,7 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}^{* \#}$
Timol / L-NAME + Indometacina	$29,6 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}^{* \#}$

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. $*p < 0,05$ (Timol vs. Timo / Atropina + Timol / L-NAME + Timol / Indometacina + Timol / L-NAME + Indometacina); $\#p < 0,05$ (Timol / L-NAME vs. Timol / Atropina + Timol / Indometacina + Timol / L-NAME / Indometacina), (n = 5).

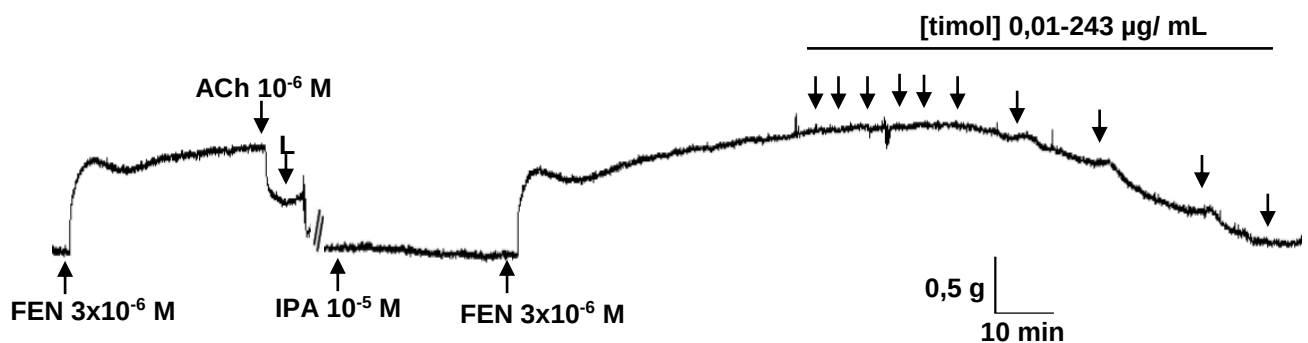
Fonte: Sampaio, 2017.

5.2.4 Efeito do inibidor e do ativador da ciclase de adenilil no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato

A curva de relaxamento do timol foi desviada para a direita na presença de 10^{-5} M de IPA ($p < 0,05$), onde a potência relaxante do timol foi cerca de 3 vezes menor na presença do inibidor, como pode-se observar através do valor da sua CE_{50} , que passou de $6,6 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ ($n = 5$), na ausência, para $18,0 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,98 \pm 0,01$, $n = 5$) na presença do inibidor (Figura 14, Gráfico 7 A). Além disso, a eficácia do timol também foi reduzida de $99,98 \pm 0,02\%$ para $85,66 \pm 5,2\%$ na presença do IPA, o E_{max} do timol foi atingido com $243 \mu\text{g/mL}$ na ausência e na presença do inibidor.

Não houve diferença da potência relaxante na curva de relaxamento do timol na presença de $5,6 \times 10^{-14}$ M de forskolina, como é possível observar através do valor de CE_{50} que foi $8,4 \pm 0,6$ ($R^2 = 0,97 \pm 0,006$, $n = 5$), porém houve redução do efeito máximo, que foi de $99,8 \pm 0,2\%$ na ausência para $87,04 \pm 2,1\%$ na presença do ativador (Gráfico 7 B), que foi atingido com $243 \mu\text{g/mL}$.

Figura 14 - Registro representativo do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraída com FEN 3×10^{-6} M na presença de 10^{-5} M de IPA.

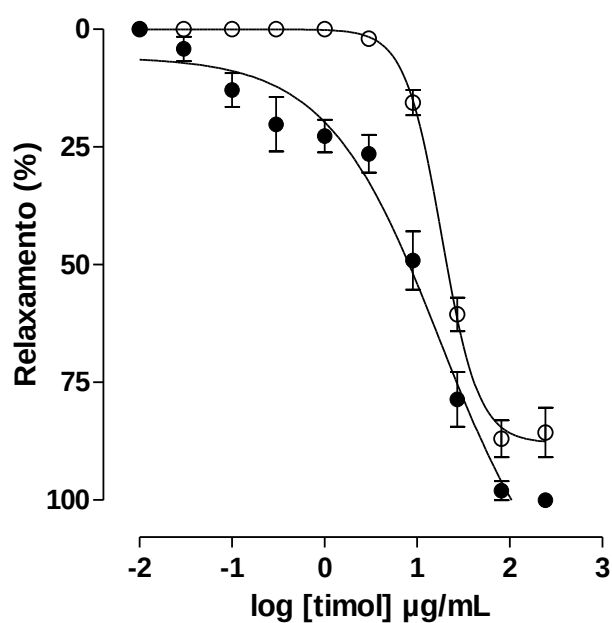


As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do timol.

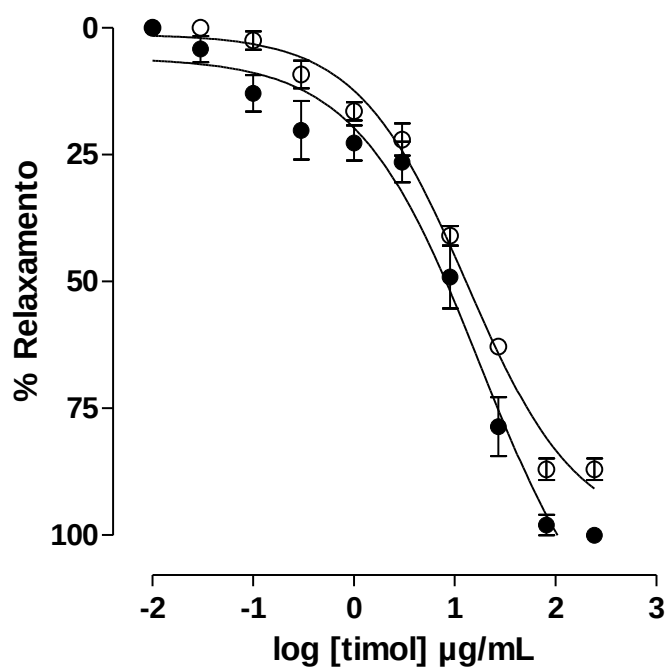
Fonte: Sampaio, 2017.

Gráfico 7 – Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na ausência (●) e na presença (○) de IPA (A) ou de forskolina (B).

A



B



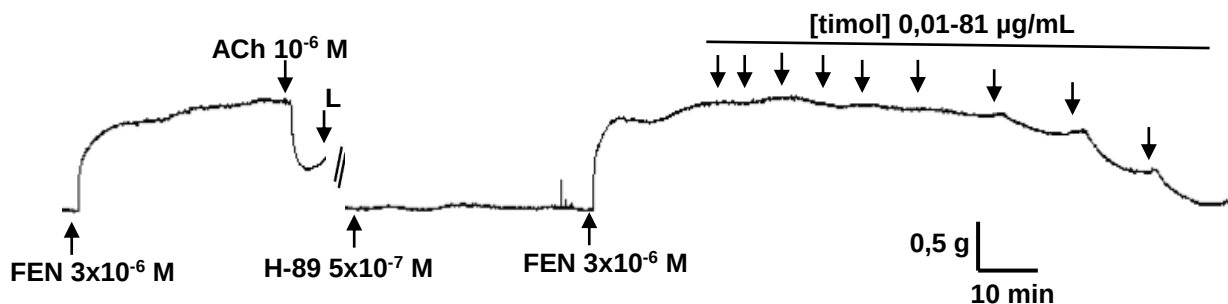
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Sampaio, 2017.

5.2.5 Efeito do inibidor da PKA no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato

A curva de relaxamento do timol foi atenuada na presença de 5×10^{-7} M de H-89 ($p < 0,05$), onde a potência relaxante do timol foi cerca de 2 vezes menor na presença de H-89, como pode-se observar através do valor da sua CE_{50} , que passou de $6,6 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ ($n = 5$), na ausência, para $13,7 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,98 \pm 0,003$, $n = 5$) na presença do inibidor (Figura 15, Gráfico 8). O E_{max} do timol foi atingido com $243 \mu\text{g/mL}$ na ausência e $81 \mu\text{g/mL}$ na presença de H-89. A tabela 5 mostra a comparação estatística entre as CE_{50} do timol na presença de indometacina, IPA e H-89.

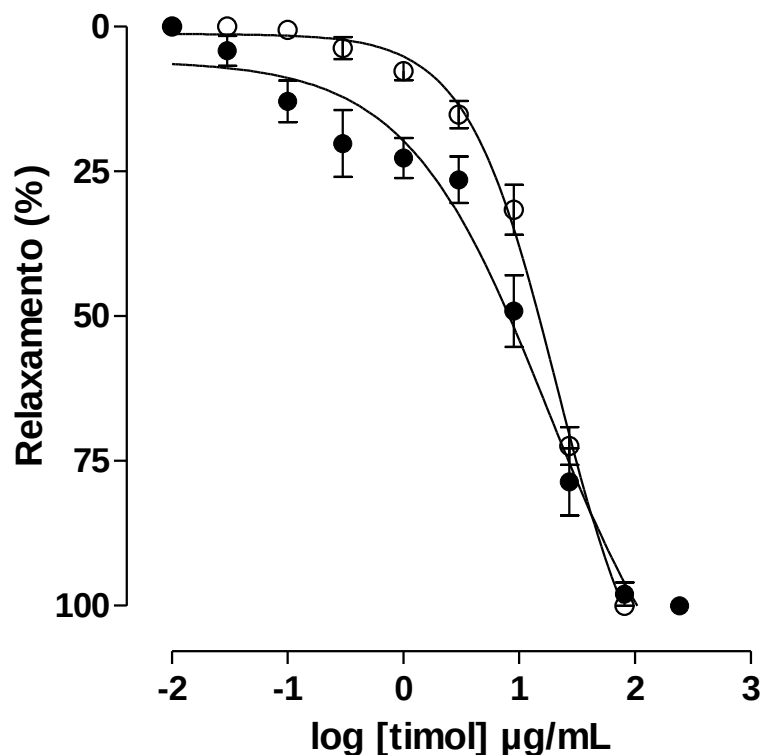
Figura 15 - Registro representativo do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraída com FEN 3×10^{-6} M na presença de 5×10^{-7} M de H-89.



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do timol.

Fonte: Sampaio, 2017.

Gráfico 8 – Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraídos com FEN 3×10^{-6} M na ausência (●) e na presença (○) de 5×10^{-7} M de H-89.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Sampaio, 2017.

Tabela 5 – Valores de CE_{50} do timol em artéria pulmonar de rato pré contraída com FEN, na presença de indometacina, IPA e H-89.

Produto-teste + inibidores	CE_{50}
Timol	$6,6 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$
Timol / Indometacina	$27.7 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}^*$
Timol / IPA	$18 \pm 1 \mu\text{g/mL}^{* \#}$
Timol / H-89	$13.7 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}^{* \#}$

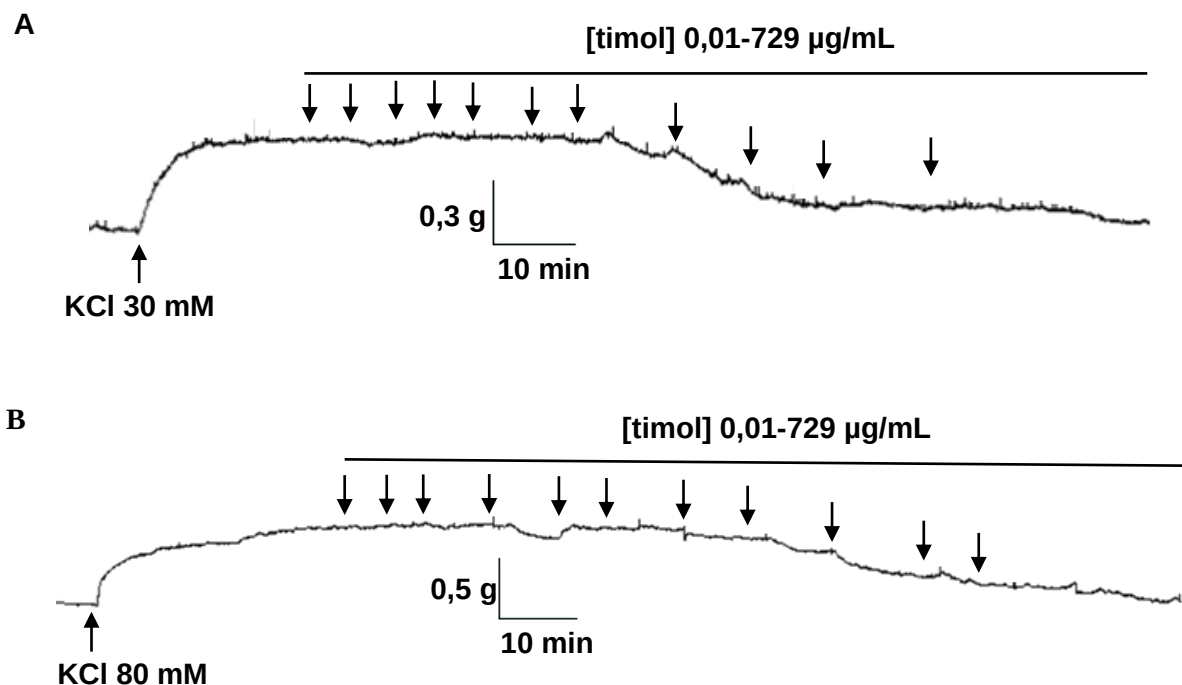
ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. $*p < 0,05$ (timol vs. timol /Indometacina + Timol / IPA + Timo / H-89) $^{\#}p < 0,05$ (timol / Indometacina vs. Timol / IPA + Timo / H-89), (n = 5).

Fonte: Sampaio, 2017.

5.2.6 Efeito relaxante do timol sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou 80 mM de KCl em artéria pulmonar

O timol relaxou de maneira equipotente, os anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráidos com KCl 30 ($CE_{50} = 18,6 \pm 3,4 \mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,99 \pm 0,002$, $n = 5$) ou 80 mM de KCl ($CE_{50} = 15,1 \pm 2,2 \mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,99 \pm 0,001$, $n = 5$; Figura 16 A e B; Gráfico 9). Quando o órgão era pré-contráido com 30 mM de KCl o E_{max} foi de 100%, enquanto que quando a contração era induzida por 80 mM o efeito máximo foi de $95,96 \pm 4,0\%$. Com base nos valores de CE_{50} , observa-se que as potências relaxantes do timol não diferiram estatisticamente entre si quando o órgão era pré-contráido com concentrações moderadas (30 mM) ou elevadas (80 mM) de KCl.

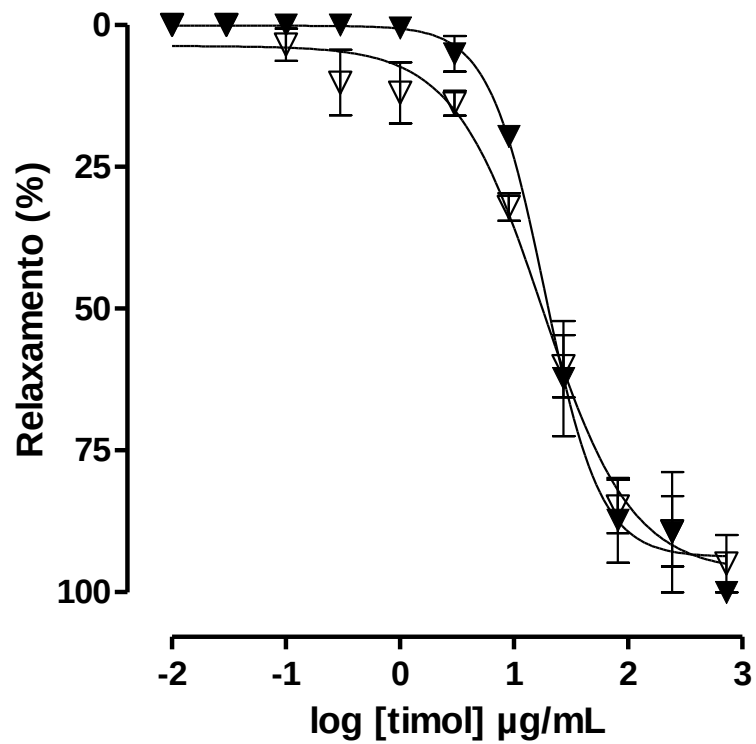
Figura 16 - Registros representativos do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráidos com KCl 30 (A) e 80 mM (B).



As setas para baixo sob a reta representam a adição cumulativa do timol (A e B).

Fonte: Sampaio, 2017.

Gráfico 9 – Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráídos com KCl 30 (▼) e 80 mM (▽).



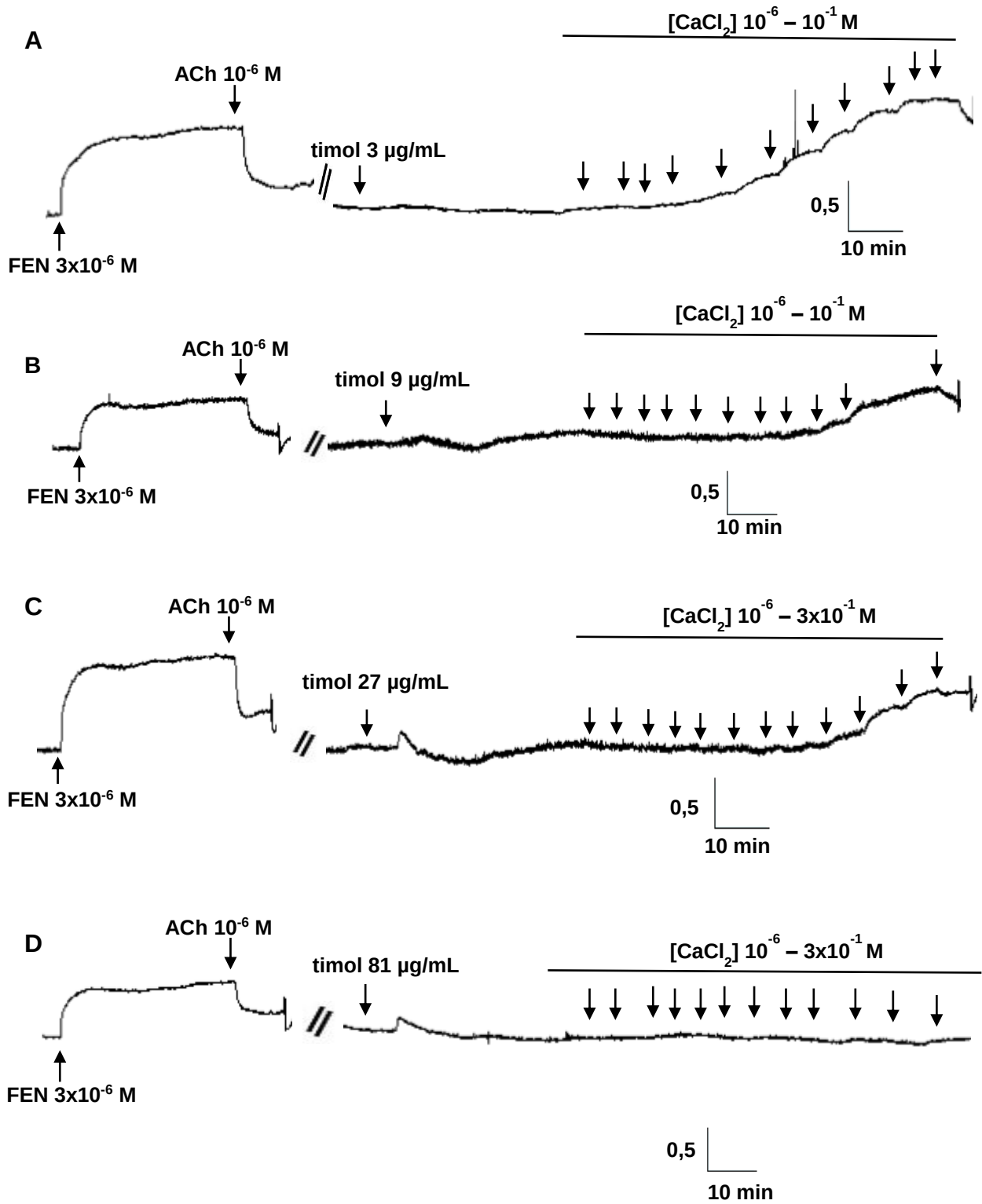
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Sampaio, 2017.

5.2.7 Efeito do timol frente às contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+}

O timol (3 - 81 $\mu\text{g/mL}$) inibiu de maneira significativa ($p < 0,05$) e dependente de concentração as contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 80 mM) nominalmente sem Ca^{2+} . As curvas cumulativas ao CaCl_2 foram desviadas para a direita de maneira não paralela e com redução do E_{max} de 100% (controle) para $99,1 \pm 4,8$; $75 \pm 2,7$; $33,4 \pm 4,7$ e 0%, respectivamente ($n = 5$). Os valores de CE_{50} do CaCl_2 passaram de $8,1 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ M no controle, para $1,6 \pm 0,3 \times 10^{-3}$; $3,7 \pm 0,5 \times 10^{-3}$ e $1,4 \pm 0,3 \times 10^{-2}$ M, respectivamente (Figura 17 A, B, C e D, Gráfico 10).

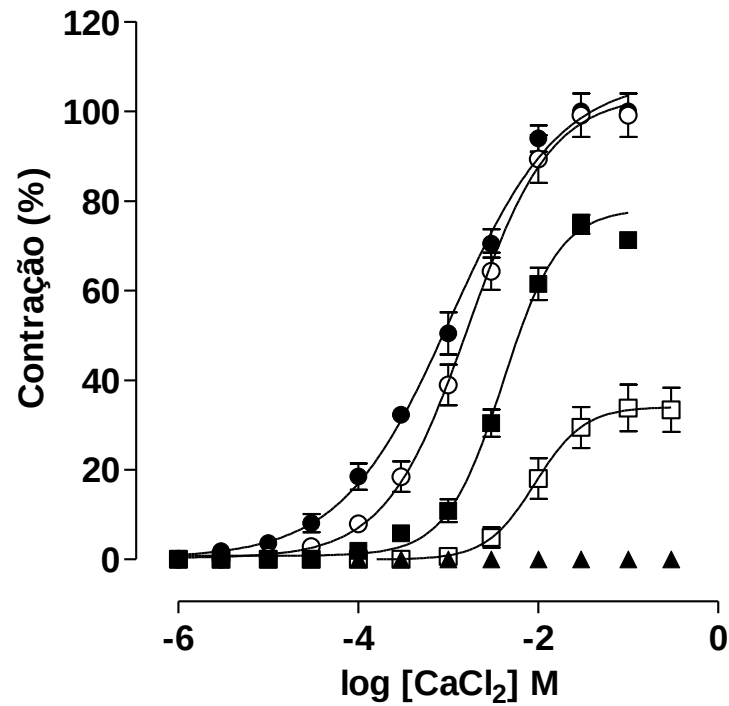
Figura 17 - Registros representativos das curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 na presença do timol nas concentrações de 3 (A), 9 (B) 27 (C) e 81 $\mu\text{g/mL}$ (D) em anéis de artéria pulmonar isolada de rato.



As setas para baixo sob a reta representam a adição cumulativa do CaCl_2 (A, B, C e D).

Fonte: Sampaio, 2017.

Gráfico 10 - Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (●) e na presença de timol nas concentrações de 3 (○), 9 (■), 27 (□) e 81 $\mu\text{g/mL}$ (▲), em artéria pulmonar de rato.



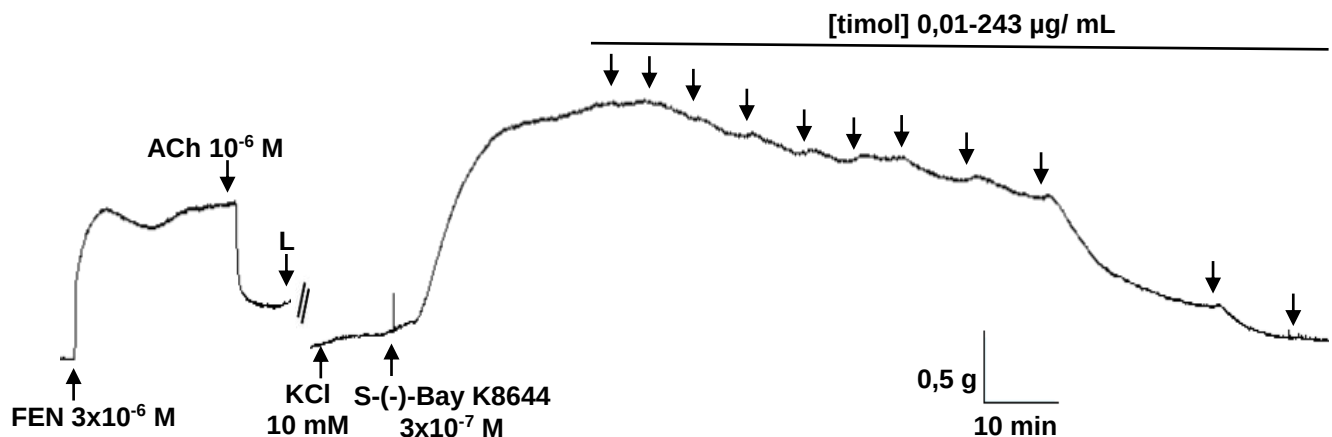
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Sampaio, 2017.

5.2.8 Efeito relaxante do timol em artéria pulmonar de rato sobre as contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644

A adição cumulativa do timol (0,01-243 $\mu\text{g/mL}$) durante o componente tônico da contração induzida por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644, um agonista dos canais de cálcio do tipo di-hidropiridina, resultou em relaxamento, atingindo um $E_{\text{max}} = 98,78 \pm 1,2\%$ na concentração de 243 $\mu\text{g/mL}$. Este relaxamento foi significativo ($p < 0,05$) e dependente de concentração ($CE_{50} = 10,6 \pm 2$ $\mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,94 \pm 0,01$, Figura 18, Gráfico 11, $n = 5$).

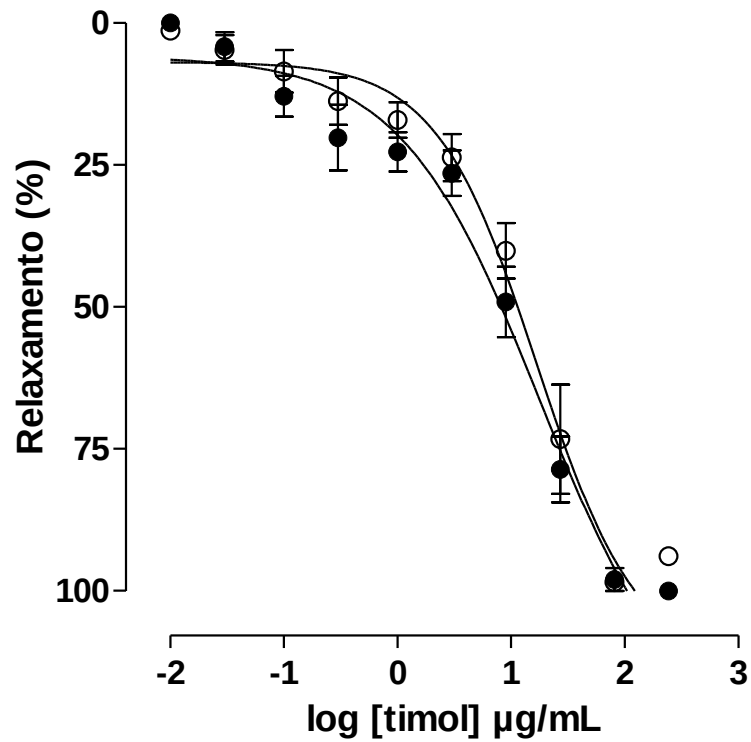
Figura 18 - Registro representativo do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do timol.

Fonte: Sampaio, 2017.

Gráfico 11 - Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráídos com 3×10^{-6} M de FEN (●) ou 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (○).



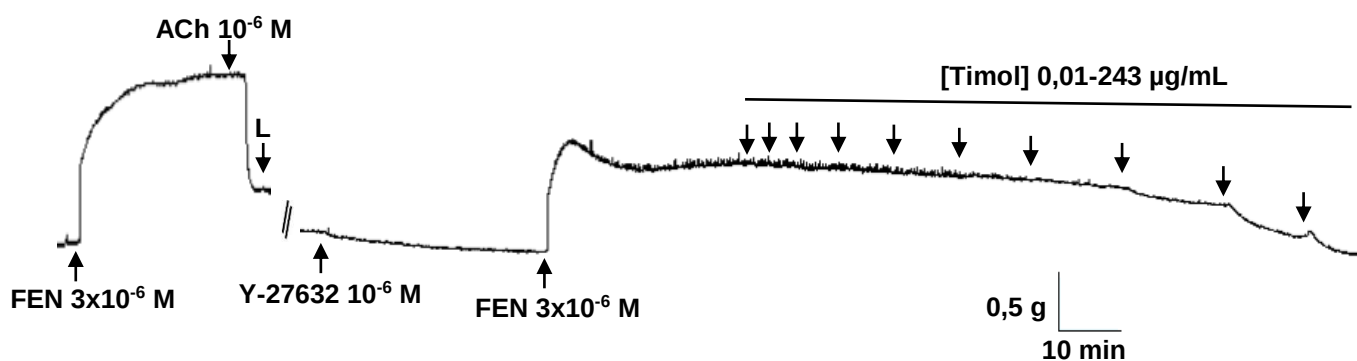
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Sampaio, 2017.

5.2.9 Efeito do inibidor da Rho cinase no relaxamento promovido pelo timol em artéria pulmonar de rato

A curva de relaxamento do timol na presença de 10^{-6} M de Y-27632 ($p < 0,05$) foi sobreposta a curva sem o bloqueador, como pode-se observar através do valor da sua CE_{50} , que foi de $6,6 \pm 0,9$ $\mu\text{g/mL}$ ($n = 5$), na ausência, e $10,1 \pm 2,1$ $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,98 \pm 0,01$, $n = 5$) na presença do inibidor (Figura 19, Gráfico 12). O E_{max} do timol foi atingido com 243 $\mu\text{g/mL}$ na ausência e na presença de Y-27632.

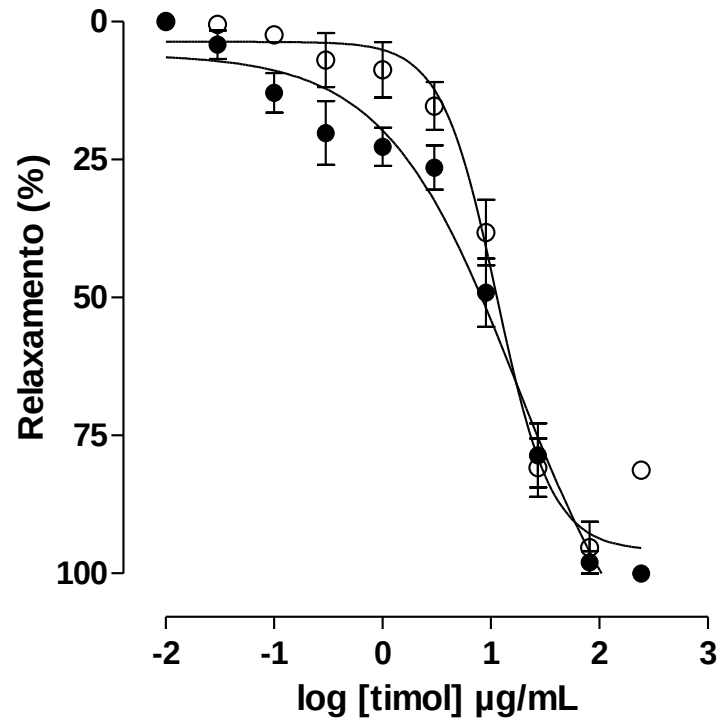
Figura 19 - Registro representativo do efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contraída com FEN 3×10^{-6} M na presença 10^{-6} M de Y-27632



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa do timol.

Fonte: Sampaio, 2017.

Gráfico 12 - Efeito relaxante do timol em anéis de artéria pulmonar isolada de rato pré-contráídos com FEN 3×10^{-6} M na ausência (●) e na presença (○) de 10^{-6} M de Y-27632.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Sampaio, 2017.

6 Discussão



DISCUSSÃO

Neste trabalho, inicialmente, foi feita uma triagem farmacológica utilizando o óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. bem como seus dois compostos majoritários, timol e carvacrol, para análise do seu efeito vasorrelaxante, sendo demonstrado, pela primeira vez, o efeito destes compostos em artéria pulmonar de rato. Dentre esses, o que apresentou melhor atividade, em termos de potência, foi o timol na presença do endotélio funcional, sendo selecionado para caracterização do mecanismo de ação, observando-se a modulação positiva dos receptores muscarínicos endoteliais e das prostaciclinas, possível ativação da AC, ativando a PKA, além disso foi observado o possível bloqueio do influxo de Ca^{2+} , todos esses mecanismos induziram o relaxamento da artéria pulmonar.

O músculo liso reveste os órgãos ocos e é amplamente distribuído por todo o corpo, incluindo as vias respiratórias, trato gastrointestinal, urinário e reprodutivo e os vasos sanguíneos, apresentando uma variedade de funções essenciais à vida, tais como respiração, peristaltismo gastrointestinal, ereção peniana, controle da pressão arterial, dentre outros. Anormalidades no processo de contratilidade ou relaxamento do músculo liso acarretam várias desordens e doenças como hipertensão, cólicas uterinas, disfunção erétil, dispepsia e asma (KIM et al., 2008). Dessa forma, o modelo experimental de músculo liso tem uma grande importância na busca por moléculas de interesse terapêutico, que venham a restabelecer as funções fisiológicas deste músculo e, conseqüentemente, o bem-estar do indivíduo.

É importante atentar para o fato de que a grande maioria dos trabalhos relatando os efeitos cardiovasculares dos monoterpenos são em vasos que fazem parte da circulação sistêmica, porém, como ressaltado anteriormente, existem diferenças importantes entre a circulação sistêmica e a circulação pulmonar, onde a segunda funciona como um sistema separado de alto fluxo e de baixa pressão, na qual a principal função é a troca gasosa que ocorre nas membranas finas alveolares e altamente permeáveis, por isso a pressão pulmonar deve ser mantida baixa para evitar o edema pulmonar (SCHULTZ; WILLIAM, 2002; NAEIJE, 2005; GREYSON, 2010). Devido a essas diferenças, dá-se a importância de estudar substâncias que

possam atuar sobre esse tipo de circulação, podendo contribuir para o tratamento de doenças como a hipertensão arterial pulmonar.

Devido à importância do músculo liso para o funcionamento do corpo e sabendo-se do grande potencial existente nos produtos naturais, existem vários trabalhos investigando a ação desses produtos nos diferentes tipos de músculos lisos com o objetivo de descobrir novas moléculas que possam ser utilizadas para o tratamento de diversas doenças, ou como ferramentas farmacológicas.

Na literatura existem vários trabalhos científicos analisando as atividades farmacológicas e biológicas do LM-OE, timol e carvacrol, destacando-se o efeito relaxante do LM-OE e timol em artérias mesentérica e aorta de rato (ARAÚJO, 2011), atividade vasorrelaxante do carvacrol e timol em aorta torácica de rato (PEIXOTO-NEVES et. al., 2010), e atividade espasmolítica em íleo de cobaia (OLIVEIRA, 2013) e útero de rata (SILVA, 2013; SILVA, 2015) para os três compostos.

Estudos realizados com o timol para avaliação do seu efeito vasorrelaxante em artérias mesentéricas e aorta de ratos (PEIXOTO-NEVES et. al., 2010; ARAÚJO, 2011) demonstraram que o composto relaxa de maneira equipotente as contrações induzidas por FEN, na presença e na ausência do endotélio funcional, o que levou os autores a sugerir que o relaxamento induzido pelo timol em artérias mesentérica e aorta de ratos parece não envolver a liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE).

Porém, foi possível observar nesse estudo que o timol foi mais potente em relaxar a artéria pulmonar de rato na presença do endotélio funcional (Gráfico 3), sugerindo uma possível participação desses FRDE no efeito relaxante do timol em artéria pulmonar. O endotélio vascular é uma camada monocelular que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos, ele desempenha um importante efeito regulador do tônus vascular, funcionando como sensor das alterações hemodinâmicas e sinais humorais ou estímulos químicos da corrente sanguínea e transmitindo-os às células musculares lisas vasculares (DZAU, 1989; BATLOUNI, 2001). Dessa forma, com estes resultados podemos observar que timol possui diferentes mecanismos de ação nos diferentes tipos de leitos vasculares.

Visto que o timol foi mais potente em relaxar as artérias pulmonares quando comparados ao LM-OE e ao carvacrol, e que o composto poderia estar modulando

fatores endoteliais para exercer seu efeito vasorrelaxante em artéria pulmonar de ratos, fomos investigar quais mecanismos poderiam estar envolvidos nesse efeito.

O fluxo sanguíneo na circulação pulmonar, assim como em todo resto do corpo, está sob o controle do sistema nervoso autônomo (sistema simpático e parassimpático). O sistema nervoso simpático atua principalmente mediando a vasoconstrição através da ativação de α -adrenoceptores pela noradrenalina, enquanto que a acetilcolina liberada pelos nervos parassimpáticos contribui para a resposta relaxante na circulação pulmonar (CHOY et al., 2002; WOLFGANG, 2011).

É bem conhecido que a resposta de relaxamento induzida pela acetilcolina nos vasos sanguíneos é mediada através da ativação dos receptores muscarínicos endoteliais, como evidenciado pelo antagonismo competitivo observado quando diferentes antagonistas muscarínicos são usados (NOREL et al., 1996; CHOY et al., 2002).

São conhecidos cinco subtipos de receptores muscarínicos (M_1 - M_5), identificados através de técnicas de clonagem molecular (CAULFIELD; BIRDSALL, 1998). Verificou-se que na maioria das preparações vasculares, incluindo artérias pulmonares isoladas de rato e coelho, o relaxamento dependente de endotélio é mediado pelo receptor muscarínicos M_3 (ALTIERE et al., 1994; EGLIN et al., 1996).

Sabe-se que os receptores muscarínicos M_3 endoteliais é um receptor do tipo GPCR e estão acoplados a proteína $G_{q/11}$, quando ativado esse receptor irá ativar a via da $PLC\beta_1$, induzindo o aumento de IP_3 e de Ca^{2+} intracelular, o Ca^{2+} por sua vez se ligará à calmodulina e esse complexo irá ativar a sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) que irá converter a L-arginina em L-citrulina e NO, que irá promover os efeitos relaxantes no músculo liso vascular (WYLIE et al., 1999).

Diante disso, sabendo que a ativação dos receptores muscarínicos endoteliais é uma das principais formas de produção e liberação de NO nos vasos sanguíneos e que o timol parece envolver componentes endoteliais para exercer seu efeito vasorrelaxante em artéria pulmonar de ratos, fomos investigar a participação desses receptores no efeito do composto em estudo.

Neste trabalho, a atropina (um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos) desviou para a direita a curva concentração-resposta do timol, com atenuação da potência relaxante desse composto em cerca de quatro vezes (Gráfico 4). Esses resultados sugerem que a via muscarínica parece estar envolvido no

relaxamento induzido pelo timol na artéria pulmonar de rato pré-contraída com fenilefrina.

Observou-se que parte dos efeitos cardiovasculares do citral em ratos normotensos se deve pela ativação de receptores muscarínicos cardíacos (MOREIRA, 2013), e foi demonstrado também que o citrônolol apresentou efeito hipotensor em ratos pela modulação positiva desses receptores (BASTOS et al., 2009). Dessa forma, o efeito modulador dos receptores muscarínicos foi visto também em outros monoterpenos.

Os receptores muscarínicos responsáveis pelo relaxamento dos vasos ficam no endotélio que, como dito anteriormente, caracteriza-se por ser uma camada única de células que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos (TRIGGLE et al., 2012). Constitui uma interface ativa, estrategicamente situada entre a circulação e o restante da parede vascular (BATLOUNI, 2001).

O endotélio intacto controla a permeabilidade vascular, regulando o tráfego de moléculas pequenas e grandes e mesmo de células, além disso, é um local ativo de síntese, podendo ser considerado um verdadeiro sistema autócrino, parácrino e endócrino do organismo humano, que responde a vários estímulos, produzindo e secretando um grande número de compostos metabolicamente ativos como NO, PGI₂ e outros metabólitos da COX, além de modular ou inibir os efeitos de substâncias circulantes (VANE et al., 1990; BATLOUNI, 2001).

A identificação química do fator relaxante derivado do endotélio, o óxido nítrico (NO), possibilitou um melhor entendimento de importantes processos fisiológicos, especialmente do aparelho cardiovascular, tais como a regulação do tônus vascular e da função plaquetária (DIAS-JUNIOR et al., 2008).

A síntese do NO envolve duas etapas, e é realizado por uma família de enzimas denominadas sintase do NO (NOS). Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas farmacologicamente por análogos da L-arginina, como a N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-Lornitina (L-NIO), N^G-amino-L-arginina (L-NAA), N^G-nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS (REES et al., 1990; MONCADA et al., 1991; DUSSE et al., 2003).

Sabe-se que a NOS constitutiva do endotélio (eNOS) é responsável pela geração de níveis baixos e intermitentes de NO, suficientes para manter o tônus vascular basal. A eNOS é ativada por diversos agonistas, entre eles serotonina, histamina, bradicinina e substância P, os quais, via IP₃, causam liberação de Ca²⁺ intracelular, que se une à calmodulina, ativando-a (BATLOUNI, 2001).

Detalhes sobre os mecanismos envolvidos na regulação fisiológica do tônus vascular pulmonar ainda não foram totalmente elucidados. Porém, quando o NO foi descoberto como vasodilatador endógeno, acreditou-se na ideia de que esta molécula pudesse contribuir para a manutenção do baixo tônus vascular pulmonar. Entretanto, estudos concluíram que em condições normais, a produção de NO na circulação pulmonar parece não contribuir muito para a manutenção das baixas pressões observadas neste leito vascular, contudo, em condições fisiopatológicas, especialmente quando há hipertensão arterial pulmonar, ocorre uma diminuição na biodisponibilidade de NO, levando a uma vasoconstrição sustentada dos vasos dessa circulação, em particular da artéria pulmonar (DIAS-JUNIOR et al., 2008).

Diante disso, seguindo a via *downstream* da estimulação muscarínica para produção de fatores endoteliais que poderiam estar atuando no mecanismo de ação do timol, fomos investigar se o mesmo estaria modulando a NOS e, conseqüentemente, a via do NO, para exercer seu efeito relaxante em artéria pulmonar de rato. Para isso foi utilizado o L-NAME, inibidor da enzima NOS, e em seguida feita uma curva cumulativa do composto em estudo na presença deste inibidor. De acordo com os resultados foi possível observar que a inibição da produção de NO endotelial induzida pela adição de L-NAME, desviou para a direita a curva concentração-resposta do timol, onde a potência relaxante do composto foi cerca de duas vezes menor na presença do inibidor (Gráfico 5), sugerindo que o efeito relaxante desse composto em artéria pulmonar de rato pode envolver a modulação positiva da via do NO.

Foram descritos diversos terpenos que possuem atividades em diferentes leitos vasculares por estarem modulando positivamente a via do NO, entre eles o α -terpineol em artéria mesentérica superior de rato (RIBEIRO, 2012), o citral em anéis de artéria mesentérica em ratos (MOREIRA, 2013), e o metileugenol e o α -terpineol em aorta de ratos (MAGALHÃES et al., 2008).

Além do NO, os prostanoides (em particular, prostaciclina e tromboxano A₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio também são sugeridos como importantes no controle do tônus vascular pulmonar (CHOY et al., 2002).

Os prostanoides (PGs, PGI₂, TXA₂) pertencem à superfamília dos eicosanoides, sendo estes derivados do ácido araquidônico (AA), que é um ácido graxo poliinsaturado contendo 20 carbonos (ácido 5, 8, 11,14-eicosatetraenóico), que é obtido da dieta ou pela conversão do ácido graxo essencial, ácido linoleico. Normalmente ele é esterificado na membrana fosfolipídica, e pela ação da fosfolipase A₂ é liberado (CHLOPICKI; GRYGLEWSKI, 2004; GRYGLEWSKI, 2008; MORRISON et al., 2012).

A prostaciclina, ou PGI₂, um membro da família dos prostanoides endógenos, é produzida a partir do ácido araquidônico em um processo com diferentes etapas envolvendo as enzimas ciclo-oxigenase (COX) e sintase de prostaciclina. Na circulação pulmonar, a prostaciclina é liberada pelas células endoteliais da artéria pulmonar sendo um potente vasodilatador endógeno e inibidor da agregação plaquetária. Estudos demonstraram que PGI₂ e PGE₂ são os principais produtos da COX em células do músculo liso de artérias pulmonares humanas (BATLOUNI, 2001; BRADBURY et al., 2002; WU; SO; RUAN, 2003; HAROUN et al., 2004; RUAN et al., 2010).

As funções biológicas da PGI₂ na circulação pulmonar são mediadas por um receptor específico da superfície celular. Encontrado em diversas localizações do corpo, incluindo o músculo liso da artéria pulmonar, o receptor de PGI₂ (IP) pertence à classe dos GPCRs. Em estudos com o objetivo de entender melhor a participação desses receptores na fisiologia, principalmente a cardiovascular, as relações estruturais e funcionais do receptor IP foram bem caracterizadas, sendo identificados os principais resíduos envolvidos na mediação da ligação e da sinalização da PGI₂ (RUAN et al, 2003; ZHANG; WU; RUAN, 2006; NI et al, 2008).

A estimulação dos receptores IP, acoplados a Gs, nas células musculares lisas provoca ativação da ciclase de adenilil (AC), induzindo aumento do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e estimulação da proteína cinase dependente do cAMP (PKA) na musculatura lisa vascular. A PKA exerce efeito similar à PKG, causando a saída de Ca²⁺ do citosol e inibindo a maquinaria contrátil. Estudos demonstraram que além de regular o tônus do músculo liso da artéria pulmonar, a PGI₂ também inibe a

proliferação celular desse músculo, esse efeito se dar, em parte, através do acúmulo de cAMP e da ativação da PKA (WHARTON et al., 2000; BATLOUNI, 2001; CLAPP et al., 2002; HAROUN et al., 2004; RUAN et al., 2010).

Sabendo que a PGI₂ é um dos mais importantes FRDE e da sua importância para a manutenção do tônus vascular normal na artéria pulmonar, decidimos avaliar a participação desse importante agente relaxante endógeno no efeito do timol nessa artéria. Para isso utilizamos a indometacina que é um inibidor da enzima COX, sendo essa enzima, como dito anteriormente, a responsável pela conversão do AA em PGG₂/PGH₂ que são precursores de todos os prostanoídes, incluindo a PGI₂ e a PGE₂.

De acordo com os resultados foi possível observar que a inibição da síntese do precursor da PGI₂ endotelial induzida pela adição de indometacina, também desviou para a direita a curva concentração-resposta do timol, onde a potência relaxante do composto foi cerca de 4 vezes menor na presença do inibidor (Gráfico 6 A), sugerindo que o efeito relaxante desse composto em artéria pulmonar de rato envolve a modulação positiva desse prostanóide.

Foi visto que outros monoterpenos também estariam modulando positivamente a via dos prostanoídes para exercer seus efeitos no sistema cardiovascular, como o citral que induziu hipotensão em ratos normotensos, em parte, pela liberação de PGI₂ endotelial (MOREIRA, 2013).

O NO e a PGI₂ são os principais FRDE. A PGI₂ não é apenas um vasodilatador potente, mas também um agente antiagregante plaquetário (BARNES; LIU, 1995), e é bem aceito que o NO é o vasodilatador pulmonar primário que é produzido e liberado pelo endotélio (CROSSWHITE; SUN, 2010). Visto a importância desses dois fatores para o relaxamento e a regulação do tônus vascular pulmonar, fomos avaliar se o bloqueio simultâneo dessas duas vias iria potencializar a redução do efeito relaxante do timol.

De acordo com os resultados obtidos podemos observar que na presença da combinação dos bloqueadores (Indometacina + L-NAME) a potência relaxante do timol foi diminuída cerca de quatro vezes, com CE₅₀ semelhante à quando o bloqueador atropina foi pré-incubado (Gráfico 6 B). Essa combinação potencializou o efeito inibitório quando comparado ao L-NAME sozinho, que reduziu a potência relaxante do timol cerca de duas vezes, porém não teve diferença significativa quando comparado à adição apenas da indometacina. Diante desse resultado, podemos

sugerir que o timol envolve principalmente a via dos prostanoídes relaxantes para exercer seu efeito em artéria pulmonar de rato.

Como dito anteriormente, a prostaciclina liberada pelo endotélio vai ativar seus receptores IP na célula muscular lisa, que estará acoplado a proteína Gs, onde a ativação dessa proteína, por sua vez, irá ativar a ciclase de adenilil (AC) aumentando os níveis citosólicos de cAMP, através da conversão do ATP, que tem sido amplamente implicado no controle do tônus vascular pulmonar. A ativação de PKA pelo cAMP diminui o influxo global de Ca^{2+} resultando na inibição da contração. Portanto, a AC desempenha um papel central na regulação do tônus vascular após ativação do GPCR na superfície celular (HALL, 2000; SOBOLEWSKI et al., 2004).

A principal atividade da AC é, portanto, regular os níveis de cAMP intracelulares. Possuindo pelo menos 10 isoformas, a regulação diferencial e a distinta distribuição tecidual das diferentes isoformas de ciclase de adenilil permitem que estas enzimas se integrem e interpretem os sinais celulares frequentemente opostos, tornando-as enzimas chave de suas vias de sinalização (DEFER; BEST-BELPOMME; HANOUNE, 2000; PIERRE et al., 2004; SOBOLEWSKI et al., 2004).

A família de AC compreende nove isoenzimas ligadas à membrana (ACs 1-9) e uma solúvel (sAC), cada uma com expressões distintas e perfis reguladores. Em comum com a maioria dos outros tipos de células, as células do músculo liso vascular expressam múltiplas isoenzimas de AC, com maior evidência para AC do tipo 3, 5 e 6 (MATSUMOTO et al., 2004; WILLOUGHBY; COOPER, 2007; NELSON et al., 2011). Estudos indicaram que a AC do tipo 6 é a principal isoenzima endógena de AC envolvida na sinalização de cAMP/PKA mediada por receptores β -adrenérgicos. Foi demonstrado também que as isoformas de ACs expressas no músculo liso da artéria pulmonar de humanos, sob condições de repouso, são as isoformas 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 9 (HAROON et al., 2004; NELSON et al., 2011).

Uma vez que foi demonstrado que o timol estaria modulando positivamente a PGI_2 para exercer seu efeito vasorrelaxante em artéria pulmonar de rato, e sabendo que após a ativação dos receptores IP (acoplados a Gs) o próximo passo da via seria a ativação da AC, além da sua importância na manutenção do tônus vascular pulmonar, fomos avaliar se essa enzima estaria envolvida no efeito vasorrelaxante de timol.

Para tanto, foi utilizado o análogo da adenosina 2',3'-O-isopropilideno adenosina (IPA), um potente inibidor não seletivo da AC em mamíferos. Estudos realizados em mamíferos verificaram que os análogos de adenosina com modificações na porção de purina são geralmente menos eficazes do que a adenosina. Porém, os análogos de adenosina modificados com ribose são mais eficazes e isso é particularmente o caso do IPA. Foi demonstrado que o inibidor ocupava o sítio de ligação do ATP na enzima (SOEDE et al., 1996; IBRAHIMI et al., 1999; DORMANN et al., 2001; ALVAREZ-CURTO; WEENING; SCHAAP, 2007).

Nos experimentos executados foi possível observar que o inibidor deslocou a curva concentração-resposta do timol para a direita, com a redução da potência relaxante do composto em aproximadamente três vezes (Gráfico 7 A), além disso houve diminuição da eficácia do timol na presença do bloqueador. Corroborando, dessa forma, com os resultados anteriores, sugerindo que o efeito relaxante desse composto em artéria pulmonar de rato, provavelmente, envolve a modulação positiva da via PGI_2 – IP – AC.

Todas as isoformas da AC podem ser ativadas pela forskolina, um ativador direto (MANOLOPOULOS; SAMET; LELKES, 1995), que é um diterpeno do tipo lábdano, isolado de *Coleus forskohlii* (Laminaceae) (HANKS; HUNTER, 1995). Para confirmar a participação dessa enzima no efeito relaxante do timol foi utilizada a forskolina e em seguida foi induzida uma contração e feita a curva de relaxamento para o timol. Com os resultados foi observado que não houve alteração na potência relaxante do composto na presença do ativador, com alteração na eficácia relaxante (Gráfico 7 B), isso pode ser explicado porque a forskolina e o timol poderiam estar se ligando no mesmo sítio de ativação na AC. Confirmando a participação dessa via no efeito relaxante do produto-teste.

Após a ativação da AC, essa enzima irá realizar a conversão do ATP em cAMP, esse, por sua vez, é um segundo mensageiro que produz as mais diversas respostas biológicas, onde a ativação da PKA é um dos seus mais importantes alvos (BILLINGTON; HALL, 2012).

A proteína cinase ativada por cAMP (PKA) é um sensor altamente conservado do estado de energia celular que fosforila os resíduos de serina e treonina em resposta ao cAMP, os genes que codificam as três subunidades da cinase são encontrados essencialmente em todos os genomas eucarióticos. Como o estado de energia da

célula é um fator crucial em todos os aspectos da função celular, é comum que a PKA tenha muitos alvos downstream cuja fosforilação medeia mudanças fundamentais no metabolismo celular, no crescimento celular, na regulação da contratilidade em músculo liso e em diversas outras funções. Sabe-se que a PKA pode ser útil para o tratamento de diversos distúrbios, por isso a indústria farmacêutica tem se dedicado ao desenvolvimento de novos ativadores para essa proteína (HARDIE, 2011; EFENDIEV; DESSAUER, 2011; HARDIE; ROSS; HAWLEY, 2012).

A PKA parece existir em todos os eucariotos como complexos heterotriméricos compostos por uma subunidade catalítica α e subunidades reguladoras β e γ . Em mamíferos, todas as três subunidades têm múltiplas isoformas (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 e γ_3) codificadas por genes distintos, e todas as doze possíveis combinações heterotriméricas são capazes de se formar quando essas são expressas em células (HARDIE; ROSS; HAWLEY, 2012). Essa proteína está envolvida em diversas funções celulares, dentre elas foi demonstrado que a PKA, inibe o crescimento celular antagonizando de maneira eficiente as vias de sinalização miogênicas em células de músculo liso (COOK; MCCORMICK, 1993; TANTINI et al., 2005).

Estudos também apresentaram evidências de que a inibição de PKG e PKA e a ativação de PKC aumentam as correntes de canais operados por estoques (SOC) em músculo liso de artéria pulmonar de rato, contribuindo para a regulação da contração muscular lisa na resistência vascular (CHEN et al., 2011).

Diante da importância da PKA para a manutenção do tônus no músculo liso vascular, uma vez que ela fosforila diversos alvos celulares culminando na diminuição na concentração citosólica de Ca^{2+} com consequente relaxamento desse músculo, e que essa cinase é o próximo alvo downstream da via PGI_2 – IP – AC, nos questionamos se o timol estaria modulando essa cinase em artéria pulmonar de rato para desenvolver seu efeito vasorrelaxante. Para isso foi utilizado o H-89 (N- [2 - ((p-Bromocinamil) amino) etil] -5-isoquinolinossulfonamida), um inibidor potente e seletivo da PKA, que exerce seus efeitos a partir da ligação específica ao sítio de ligação do ATP na subunidade catalítica da PKA, sendo essa ligação reversível (HELMESTE; TANG, 1994; LOCHNER; MOOLMAN 2006).

De acordo com os resultados obtidos podemos observar que na presença do inibidor de PKA a curva concentração-resposta do timol foi atenuada, com a redução da potência relaxante do composto em aproximadamente 2 vezes, mas sem alteração

da eficácia (Gráfico 8). Esse resultado corrobora com os resultados anteriores, confirmando, dessa forma, a modulação positiva da via IP – AC – PKA no efeito relaxante do timol em artéria pulmonar de rato.

Sabendo que a contratilidade do músculo liso depende de alterações reguladas da concentração de Ca^{2+} intracelular, e que alterações da condutância dos íons potássio pela membrana influenciam a entrada de Ca^{2+} na célula, fomos avaliar se o efeito vasorrelaxante do timol em artéria pulmonar de rato estaria regulando canais de K^+ ou Ca^{2+} .

A homeostase dos íons intracelulares, o volume celular e a excitabilidade da membrana são mecanismos importantes regulados pela permeabilidade da membrana aos cátions e ânions. Este fluxo de íons transmembranares é o fator predominante no controle dos mecanismos de acoplamento excitação-contração nas células do músculo liso da artéria pulmonar (CMLAP). Os processos de acoplamento eletromecânicos e farmacomecânicos são os dois principais mecanismos de excitação-contração. Destes, é a excitabilidade elétrica que desempenha um papel importante no acoplamento da excitação-contração na vasculatura pulmonar, predominantemente controlada pelo fluxo de íons transmembranares nas CMLAP (CASTEELS et al., 1977; FIRTH et al., 2011).

Como mencionado acima, o acoplamento excitação-contração requer uma alteração no potencial de membrana para alterar o tônus vascular. Os canais iônicos são poros encontrados na membrana, e são seletivamente permeáveis a cátions (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) ou ânions (Cl^-). Os íons estão distribuídos em ambos os lados da membrana celular e seu movimento transmembranar é baseado em seu gradiente eletroquímico (FIRTH et al., 2011).

Nas células humanas, o Na^+ (~ 140 mM) e Ca^{2+} (~ 2 mM) são os cátions dominantes no fluido extracelular (concentrações semelhantes às encontradas no plasma sanguíneo), enquanto que K^+ (~ 140 mM) é o cátion dominante no citoplasma da célula (TORO et al., 1986; FIRTH et al., 2011).

A contração pelo acoplamento eletromecânico ocorre através de mudanças no potencial da superfície da membrana e seus efeitos na concentração citoplasmática de Ca^{2+} . O potencial de repouso da membrana no músculo liso é, como em outras células, negativo em relação ao espaço extracelular. Potenciais mais positivos (despolarização) podem abrir canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v),

causando influxo de Ca^{2+} e aumento da concentração citoplasmática desse íon, desencadeando a contração. Por outro lado, mudanças para potenciais de membrana mais negativos (hiperpolarização), como abertura dos canais de K^+ , podem causar relaxamento através da inibição de potenciais de ação e fechamento dos canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem (SOMLYO; SOMLYO, 1994).

Uma vez que a abertura dos canais de Ca^{2+} requer a despolarização da membrana, então agentes que produzem hiperpolarização farão com que os canais de Ca^{2+} fechem, o que por sua vez irá reduzir o influxo de Ca^{2+} e promover o relaxamento muscular. A hiperpolarização da membrana celular do músculo liso pode ser produzida por agentes que abrem canais de K^+ , aumentando assim o efluxo desse íon da célula (GURNEY, 1994).

A ativação dos canais de K^+ diretamente nas células do músculo liso vascular é uma via de sinalização celular que pode ser ativada para induzir o relaxamento independente do endotélio vascular.

Uma propriedade característica dos fármacos que abrem canais de K^+ para produzir hiperpolarização é que eles inibem de maneira eficaz a contração do músculo liso vascular provocada por um aumento moderado na concentração extracelular de K^+ (até $<40 \text{ mM}$), porém são ineficazes quando a concentração de K^+ é elevada para níveis mais altos. Isso ocorre porque em altas concentrações de K^+ , o potencial de membrana da célula do músculo liso está próximo ao potencial de equilíbrio de K^+ , reduzindo o efluxo desse íon e, portanto, a hiperpolarização é impedida. Esta propriedade é importante pois distingue os ativadores de canais de K^+ dos antagonistas dos canais de Ca^{2+} , que mostram o comportamento oposto (GURNEY, 1994).

Compreendendo a importância desses íons para o controle do tônus vascular pulmonar, fomos avaliar se o efeito relaxante do timol em artéria pulmonar de rato estaria ativando canais de K^+ ou bloqueando canais de Ca^{2+} .

Para isso o órgão foi contraído com 30 mM ou 80 mM de KCl, onde na primeira condição irá ocorrer o bloqueio parcial do efluxo de íons K^+ e, desta forma, aumento dos relaxamentos mediados por ativação dos canais de K^+ (CLARK; FUCHS, 1997), já na segunda condição irá ocorrer uma contração induzida por alta concentração de K^+ , onde sabe-se que, nas células de músculo liso, essa contração é mediada por uma despolarização de membrana e um aumento do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v ,

portanto substâncias que promovam o relaxamento nessa condição são potenciais antagonistas desses canais (SOMLYO; SOMLYO, 1994; GURNEY, 1994).

Observou-se, nesse experimento, que não houve diferença estatística significativa no E_{max} nem na CE_{50} na curva concentração-resposta do timol quando a artéria pulmonar era contraída com 30 mM ou 80 mM de KCl (Gráfico 9), indicando dessa forma, que o timol não estaria ativando canais de K^+ para exercer seu efeito relaxante, pois se modulasse positivamente esse canal, o timol seria mais potente em relaxar a artéria contraída com 30 mM de K^+ (GURNEY, 1994). Sabendo que nas duas situações o KCl irá induzir a contração através de uma despolarização na membrana e aumento do influxo de Ca^{2+} devido a abertura dos Cav , fomos avaliar se o efeito relaxante induzido pelo timol estaria relacionado a inibição no influxo desse íon pelos Cav .

Para testar essa hipótese foram realizadas curvas cumulativas concentrações-resposta ao $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem cálcio na ausência e na presença de diferentes concentrações do timol. Este protocolo fundamenta-se no fato de que a contração induzida por $CaCl_2$ irá ocorrer, quase que exclusivamente, pelo influxo de Ca^{2+} proveniente do meio extracelular, uma vez que a despolarização promovida pela alta concentração de K^+ extracelular induz abertura dos Cav (REMBOLD, 1996; RATZ; BERG, 2006).

Nesse experimento foi observado que a curva controle do $CaCl_2$ foi deslocada para a direita de maneira não paralela (Gráfico 10), havendo redução da potência contrátil e do E_{max} . Dessa forma, esses resultados confirmam a hipótese sugerida anteriormente de que o timol também esteja exercendo seu efeito vasodilatador em artéria pulmonar de rato por bloquear o influxo de cálcio através dos Cav .

Diante dessa evidência, nos questionamos qual seria o tipo de canal Cav que o timol estaria atuando para exercer seu efeito vasorrelaxante.

Os Cav , inicialmente, têm sido classificados como sendo do tipo L, N, P/Q, R e T dependendo de algumas propriedades eletrofisiológicas e farmacológicas (CATTERALL, 2005).

A entrada de cálcio no músculo liso é controlada através do potencial de membrana, uma vez que isto determina a abertura de canais Cav . Os canais de Ca^{2+} do tipo L (ou $Cav1$, ativados por alta tensão) são sensíveis à di-hidropiridina, sendo o principal, e frequentemente único, tipo de canal Cav expresso em muitos músculos

lisos (FLOYD; WRAY, 2007). Os do tipo N (Cav2.2), os do tipo P/Q (Cav2.1) e o do tipo R (Cav2.3) são sensíveis a di-hidropiridina e ativados por alta voltagem; e os canais do tipo T (Cav3) que são canais ativados por baixa voltagem e são expressos em alguns tipos de músculos lisos como útero, uretra e tecido vascular (ERTEL et al., 2000; ALEXANDER et al., 2007; FLOYD; WRAY, 2007).

Em CMLAP, os Cav do tipo L e T são as principais vias para o influxo de Ca^{2+} envolvido no acoplamento excitação-contração e proliferação celular. Estudos mostraram que antagonistas dos Cav do tipo L, como o nifedipino ou verapamil, podem prevenir a vasoconstrição pulmonar e inibir a proliferação de CMLAP, atenuando a hipertensão pulmonar, sugerindo que o influxo de Ca^{2+} através desses canais é uma das importantes vias de regulação da concentração de Ca^{2+} citosólico em artérias pulmonares (DAVIDSON et al., 1989; BONNET et al., 2001; WAN et al., 2013).

No músculo liso em geral, os Cav1 (tipo L) são os melhores caracterizados e são os principais responsáveis pelo influxo de Ca^{2+} , onde o sítio de ligação para seus bloqueadores está na subunidade α_1 , embora nele existam quatro outras subunidades complexas (2 α , 1 β e 1 γ) (KUIYAMA; KITAMURA; NABATA, 1995; KNOT et al., 1996).

Já foram feitos diversos estudos que mostram a ação inibitória de monoterpenos nesse tipo de canal iônico, entre eles Aydin e colaboradores (2007) mostraram que o carvacrol, um monoterpeno constituinte de muitos óleos essenciais incluindo o LM-OE, apresenta ação hipotensora e vasorrelaxante possivelmente devido ao bloqueio de canais de cálcio do tipo L vasculares. Além disso, Lahlou e colaboradores (2002) e Guedes e colaboradores (2004) demonstraram que a rotundifolona, um monoterpeno isolado a partir de óleo essencial de *Mentha x villosa*, apresentou ação hipotensora pela diminuição da resistência vascular periférica causada por vasodilatação. Este efeito foi causado pela inibição de Cav. Também foi demonstrado que o citrônolol reduz a pressão arterial por um efeito direto no músculo liso vascular, que envolveria a inibição dos Cav do tipo L, levando a vasodilatação (BASTOS et al., 2009).

Foi observado, nesse experimento, que o timol relaxou de maneira significativa e dependente de concentração o órgão quando era contraído com S(-)- Bay K 8644 (Gráfico 11), sugerindo que de fato o composto em estudo bloqueia os canais de Ca^{2+}

para exercer seu efeito vasorrelaxante em artéria pulmonar de rato, e que o subtipo de canal envolvido é o Cav1.

Esses resultados corroboram com estudos anteriores que demonstraram que o timol estaria induzindo a vasodilatação em artérias mesentérica e aorta de ratos por bloquear os Cav do tipo 1, com consequente inibição do influxo de Ca^{2+} (PEIXOTO-NEVES et al., 2010; ARAÚJO, 2011).

Foi observado que não houve diferença estatística significativa dos valores de CE_{50} do timol quando a artéria era contraída com 80 mM de KCl ou com o Bay-k 8644, e que não houve diferença estatística significativa no efeito do timol quando a artéria era contraída com fenilefrina ou o Bay-k 8644. O que esses três agentes contráteis apresentam em comum para induzir contração na artéria pulmonar é a abertura dos Cav da membrana plasmática permitindo o influxo de Ca^{2+} , o aumento desse íon vai induzir a contração pela maneira clássica, descrita anteriormente nesse trabalho, e também vai levar a ativação da principal via de sensibilização ao Ca^{2+} que é mediada pela pequena proteína G monomérica RhoA e seu alvo Rho cinase (ROK) (RATZ et al., 2005).

Essa via constitui o principal componente do aumento sustentado da tensão induzida por vasoconstritores, contribuindo para a regulação da pressão arterial (UEHATA et al., 1997; SAUZEAU et al., 2003). Estudos recentes mostraram que a inibição da Rho cinase praticamente normaliza a elevada pressão e resistência da artéria pulmonar (AP) em ratos com hipóxia crônica (NAGAOKA et al., 2004).

Diversos estudos demonstraram que a RhoA desempenha um papel importante na regulação de processos em células vasculares como a organização do citoesqueleto de actina, contração, expressão gênica e diferenciação (SOMLYO; SOMLYO, 2000; MACK et al., 2001).

O alvo mais importante da ROCK, em termos de contração do músculo liso vascular, é a fosforilação da subunidade de ligação à miosina da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), MYPT-1. A fosforilação de MYPT-1 inibe a MLCP, que previne a desfosforilação da cadeia leve da miosina (MLC) e, conseqüentemente, aumenta a sensibilidade do aparelho contrátil ao Ca^{2+} (CONNOLLY; AARONSON, 2011).

A sinalização ROCK altera a expressão de vários genes conhecidos como importantes na regulação do tônus e da estrutura vascular pulmonar, incluindo a

sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS). Nas células endoteliais, a ativação da ROCK diminui a eNOS reduzindo a estabilidade do mRNA para a síntese eNOS (FAGAN et al., 2004).

Evidências sugerem que a RhoA/ROCK é um alvo importante para o desenvolvimento de terapêuticas para tratamento da hipertensão arterial pulmonar, uma vez que muitos estudos têm mostrado que a via de sinalização da ROCK está envolvida na vasoconstrição sustentada, remodelamento vascular e inflamação que ocorre nesta doença (BARMAN et al., 2009).

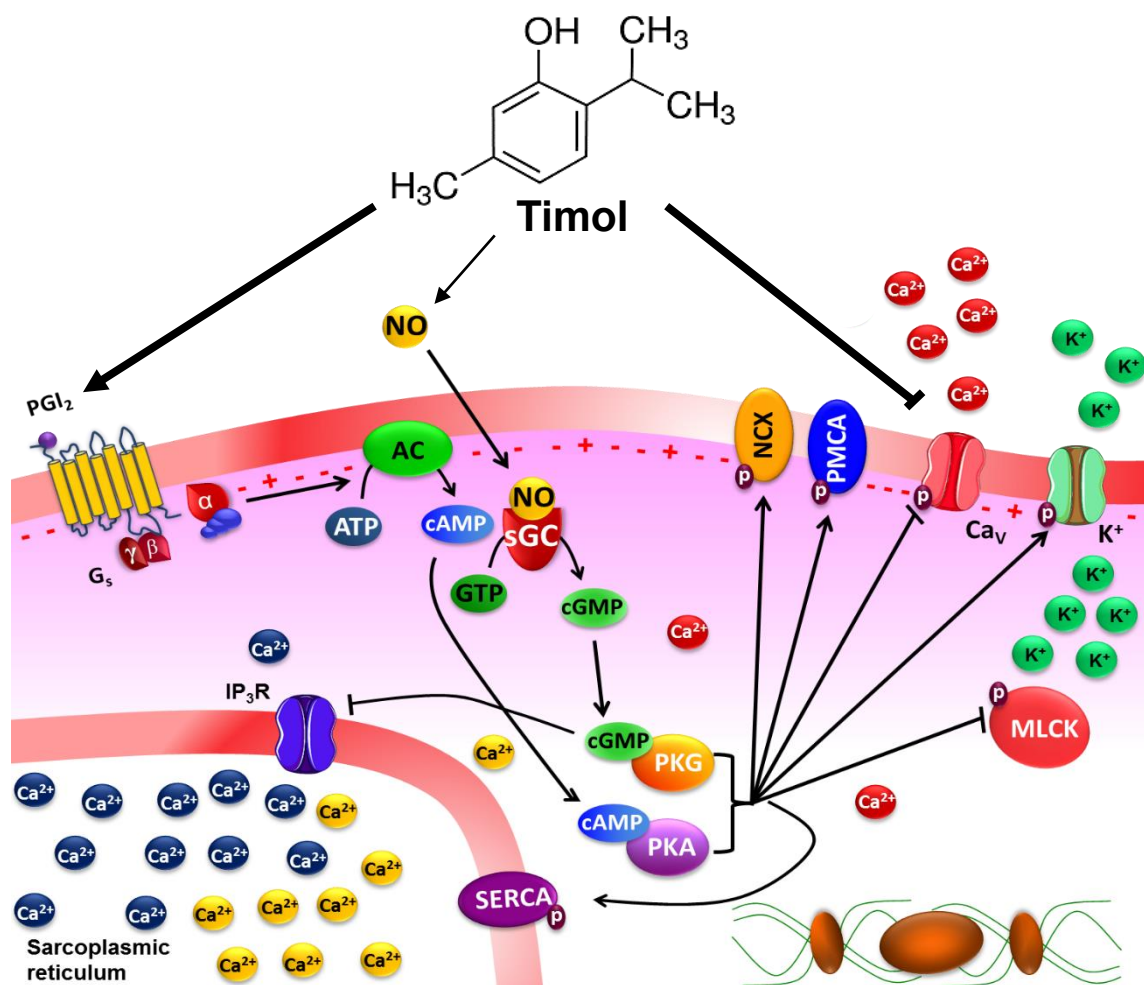
Sabendo que essa é a mais importante via de sensibilização ao Ca^{2+} , mantendo a contração do músculo liso mesmo em baixas concentrações desse íon, nos questionamos se o timol poderia estar inibindo essa via de sinalização para exercer seu efeito vasodilatador em artéria pulmonar de rato.

Para isso foi utilizado o Y-27632, um inibidor da ROCK que tem como alvo o domínio cinase dependente de ATP dessa proteína (SHI; WEI, 2013), e feita uma curva cumulativa concentrações-reposta do timol. Nesse experimento foi possível observar que na presença do bloqueador não houve alteração da potência relaxante do timol (Gráfico 12), sugerindo, assim, que esse composto não envolveria o bloqueio dessa via de sinalização para exercer seu efeito relaxante no referido órgão, porém são necessários experimentos mais específicos e a nível celular para que essa nossa hipótese seja confirmada.

Nossos resultados são semelhantes aos descritos para o efeito relaxante de NaHS no músculo liso gástrico de camundongos, que foi investigada a participação da via RhoA/ROCK nesse efeito pela da inibição da mesma por Y-27632. Porém, nessa condição, o efeito relaxante do NaHS foi mantido, sendo essa possibilidade excluída pelos autores (DHAESE; LEFEBVRE, 2009).

Dessa forma, o conjunto de resultados obtidos direciona o mecanismo vasorrelaxante do timol em artéria pulmonar de rato para a ativação da via PGI_2 -AC-PKA, bem como inibição do influxo de Ca^{2+} através do bloqueio de Ca_v1 (Figura 20).

Figura 20 - Proposta de mecanismo de ação vasorrelaxante do timol em artéria pulmonar de ratos.



Fonte: Sampaio; Vasconcelos, 2017.

O mecanismo vasorrelaxante do timol em artéria pulmonar de rato promove a ativação da via PGI_2 -AC-PKA, com moderada modulação positiva da via do NO, bem como inibição do influxo de Ca^{2+} através do bloqueio de Ca_v1 .

7 Conclusões



CONCLUSÕES

Na avaliação da atividade espasmolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham (Verbenaceae) e de seus constituintes majoritários, timol e carvacrol, em artéria pulmonar de rato, pode-se concluir:

- O LM-OE e seus compostos majoritários, timol e carvacrol, isolados apresentam atividade vasodilatadora em artéria pulmonar de rato;
- O efeito vasodilatador do timol parece envolver a ativação da via muscarínica no endotélio vascular;
- O timol parece estar modulando a eNOS com liberação de NO e relaxamento das células do músculo liso da artéria pulmonar;
- O timol modula positivamente a via PGI₂-AC com possível aumento de cAMP citosólico e ativação de PKA;
- O timol inibe os canais de cálcio dependentes de voltagem, particularmente os do tipo Cav1;

8 Referências



REFERÊNCIAS

ACAMOVIC, T.; BROOKER, J. D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, p. 403–412, 2005.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 114-140, 2007.

AKATA T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca^{2+} concentration and the Ca^{2+} -dependent regulation of vascular tone. **The Journal of Anesthesia**, v. 21, n. 2, p. 220–231, 2007.

ALENCAR, A. K. N.; PEREIRA, L. S.; SILVA, F. E.; CUNHA, V. M. N.; LIMA, M. L.; TESCH, R.; ANNA, C. M. R. S.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J.; SUDIO, R. T.; SUDIO, G. Z. A novel adenosine A_{2a} receptor agonist attenuates the progression of monocrotalina-induced pulmonary hypertension in rats. **Pulmonary and Respiratory Medicine**, v. S4, p. 1-6, 2013.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 2nd edition (2007 Revision). **British Journal of Pharmacology**, v. 150 (Suppl.1), p. S1-S168, 2007.

ALEXANDER, S.P. H., MATHIE, A., PETERS, J.A., 2008. Guide to Receptors and channels (GRAC). **British Journal of Pharmacology**, v.150, n. 1, p. S1 – S168, 2008.

ALTIERE, R.J., TRAVIS, D.C., ROBERTS, J., THOMPSON, D.C. Pharmacological characterisation of muscarinic receptors mediating acetylcholineinduced contraction and relaxation in rabbit intrapulmonary arteries. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 270, p. 269– 276, 1994.

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

ALVAREZ-CURTO, E.; WEENING, K. E.; SCHAAP, P. Pharmacological profiling of the Dictyostelium adenylate cyclases ACA, ACB and ACG. **Biochemical Journal**, v. 401, p. 309–316, 2007.

AMARAL, J. F. et al. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 7, p.1217-1220, 2007.

ANTUNES, R. G. O.; SILVA, A. C. S.; OLIVEIRA, P. R.; SILVA, L. P. S.; MAGALHÃES, P. S.; SILVA, A. P. S.; TAVARES, J. F.; ABOULAFIA, J.; NOUAILHETAS, V. L. A.; SILVA, J. L., 2011. V. *Relaxant effects of Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) on rat trachea and aorta. XX **Congresso Italo Latinoamericano de Etnomedicina**. Fortaleza, Ceará, 2011.

ARAÚJO, I. G. A. **Efeitos hipotensor e vasorrelaxante do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seu constituinte principal timol: envolvimento do bloqueio de canais para cálcio**. 2011. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

AVILA-SOSA, R.; GASTÉLUM-FRANCO, M.G.; CAMACHO-DÁVILA, A.; TORRES-MUÑOS, J.V.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G.V. Extracts of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with Atioxidant and Atimicrobial Activity. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 434-440, 2010.

AYDIN Y, KUTLAY O, ARI S, DUMAN S, UZUNER K, AYDIN S. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. **Planta Medica**, v. 73, p. 1365-1371, 2007.

AZEDDINE IBRAHIMI, NADA ABUMRAD, HENGAMEH MAGHAREIE, MICHAEL GOLIA, ILANA SHOSHANI, LAURENT DE SAUBRY, AND ROGER A. JOHNSON. Adenylyl cyclase P-site ligands accelerate differentiation in Ob1771 preadipocytes. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 276, n. 2, p. C487-C496, 1999.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitória: **Edufes**, p. 624, 2008.

BARMAN, S. A.; ZHU, S.; WHITE, R. E. RhoA/Rho-kinase signaling: A therapeutic target in pulmonary hypertension. **PCOM Scholarly Papers**, v. 1091, p. 663-671, 2009.

BARNES PJ, LIU SF. Regulation of pulmonary vascular tone. **Pharmacological Reviews**, v. 47, n. 1, p. 87-131, 1995.

BASTOS JF, MOREIRA IJ, RIBEIRO TP, MEDEIROS IA, ANTONIOLLI AR, DE SOUSA DP, SANTOS MR. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, p. 331-337, 2009.

BATLOUNI M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 328-38, 2001.

BILLINGTON, C. K.; HALL, I. P. Novel cAMP signalling paradigms: therapeutic implications for airway disease. **British journal of pharmacology**, v. 166, n. 2, p. 401-410, 2012.

BONNET S, HYVELIN JM, BONNET P, MARTHAN R, SAVINEAU JP. Chronic hypoxia-induced spontaneous and rhythmic contractions in the rat main pulmonary artery. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 281, p. L183–L192, 2001.

BRADBURY, D. A.; NEWTON, R.; ZHU, Y. M.; STOCKS, J.; CORBETT, L.; HOLLAND, E. D.; et al. Effect of bradykinin, TGF- α 1, IL-1 α , and hypoxia on COX-2 expression in pulmonary artery smooth muscle cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 283, p. L717–L725, 2002.

BRAINARD, A. M.; KOROVKINA, V. P.; ENGLAND, S. K. Potassium channels and uterine function. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 18, n. 3, p. 332-339, 2007.

BRAZ – FILHO R. contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, 229-239, 2010.

BROZOVICH, F.V.; NICHOLSON, C.J.; DEGEN, C.V.; GAO, Y. Z.; AGGARWAL, M.; MORGAN, K.G. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. **Pharmacological Reviews**, v. 68, p.476–532, 2016.

BROZOVICH, F.V.; NICHOLSON, C.J.; DEGEN, C.V.; GAO, Y. Z.; AGGARWAL, M.; MORGAN, K.G. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. **Pharmacological Review**, v. 68, p. 476–532, 2016.

CAMPOS F.P. **Prospecção da composição e citogenotoxicidade de óleos essenciais de Lippia L.** 2012. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de fora, Minas Gerais.

- CANTELI V.C.D. **Composição fitoquímica e atividades biológicas de *Duranta vestita* Cham., Verbenaceae**. 2012. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas), Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- CARAFOLI E, GARCIA-MARTIN E, GUERINI D. The plasma membrane calcium pump: recent developments and future perspectives. **Experientia**, v. 52, p. 1091-100, 1996.
- CARREIRO, J. N.; CORREIA, A. C. C.; PEREIRA, J. C.; FERREIRA, T. F.; SILVA, M. C. C.; TAVARES, J. F.; SILVA, B. A. Essential oil of *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) shows spasmolytic effect on guinea-pig trachea and ileum. In: 44th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2012, Foz do Iguaçu. **Anais...** Paraná: 2012.
- CARVALHO, M. H. C.; NIGRO, D.; LEMOS, V. S.; TOSTES, R. C. A.; FORTES, Z. B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 76-88, 2001.
- CARY, S. P.; WINGER, J. A.; DERBYSHIRE, E. R.; MARLETTA, M. A. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 4, p. 231–239, 2006.
- CASTEELS R, KITAMURA K, KURIYAMA H, SUZUKI H. Excitation-contraction coupling in the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery. **Journal of Physiology**, v. 271, p. 63-79, 1977.
- CATTERALL, W.A., 2005. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Annual Review of Cell & Developmental Biology**, v. 16, p.521-555, 2005.
- CAULFIELD, M.P.; BIRDSALL, N.J. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 50, p. 279– 290, 1998.
- CHAVES D.S.A.; COSTA S.S.; ALMEIDA A.P.; FRATTANI F.; ASSAFIM M.; ZINGALI R.B. Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 172-180, 2010.
- CHEN, I. S.; DAI, Z.K.; WELSH, D.G.; CHEN, I.J.; WU, B. N. Protein kinases modulate store-operated channels in pulmonary artery smooth muscle cells. **Journal of Biomedical Science**, v. 18, p. 1-12, 2011.

CHENG, H.; LEDERER, W. J.; CANNELL, M. B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. **Science**, v. 262, p. 740–744, 1993.

CHLOPICKI, S.; GRYGLEWSKI, R. J. Endothelial secretory function and atherothrombosis. In: *The Eicosanoids*. Ed. Peter Curtis-Prior, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex, England, 267–276, 2004.

CHOY, W. Y., WONG, Y. F., KWAN, Y. W., et al. Role of mitogen-activated protein kinase pathway in acetylcholine-mediated in vitro relaxation of rat pulmonary artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 434, p. 55-64, 2002.

CLAPP, L. H.; FINNEY, P.; TURCATO, S.; TRAN, S.; RUBIN, L. J.; TINKER, A. Differential effects of stable prostacyclin analogs on smooth muscle proliferation and cyclic AMP generation in human pulmonary artery. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 26, p. 194–201, 2002.

CLARK, S. G.; FUCHS, L. C. Role of Nitric Oxide and Ca⁺⁺-Dependent K⁺ Channels in Mediating Heterogeneous Microvascular Responses to Acetylcholine in Different Vascular Beds. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, p. 1473–1479, 1997.

COÊLHO, M. L.; ALMEIDA, A. A. C.; CARVALHO, R. B. F.; FREITAS, R. M. Formulações farmacêuticas contendo monoterpenos: uma prospecção tecnológica. **Revista GEINTEC**, v. 3, n. 3, p. 058-065, 2013.

COMTOR, J. H. Harvey's 1651 perfusion of the pulmonary circulation of man. **Circulation**, v. 65, p. 1-3, 1982.

CONNOLLY, M. J.; AARONSON, P. I. Key role of the RhoA/Rho kinase system in pulmonary hypertension. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 24, p. 1-14, 2011.

COOK, S. J.; McCORMICK, F. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. **Science**, v. 262, p. 1069–1072, 1993.

COSTAS.M.O.; LEMOS, T.L.; MONTE,F.J.Q.; MATOS F.J.A. Quinona dimérica (tectol) de *Lippia sidoides* (Verbenaceae). **XV Simpósio de plantas medicinais**, Resumos, Águas de Lindóia, 1998.

CROSSWHITE, P.; SUN, Z. Nitric Oxide, Oxidative Stress and Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. **J Hypertens**, v. 28, n. 2, p. 201–212, 2010.

DAVID, J.P., MEIRA, M., DAVID, J.M., BRANDÃO, H.N., BRANCO, A., AGRA, M.F., BARBOSA, M.R.V., QUEIROZ, L.P., Giulietti, A.M., 2007. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 215–218.

DAVIDSON A, BOSSUYT A, DAB I. Acute effects of oxygen, nifedipine, and diltiazem in patients with cystic fibrosis and mild pulmonary hypertension. **Pediatric Pulmonology**, v. 6, p. 53–59, 1989.

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

DHAESE, I.; LEFEBVRE, R. A. Myosin light chain phosphatase activation is involved in the hydrogen sulfide-induced relaxation in mouse gastric fundus. **European Journal of Pharmacology**, v. 606, p. 180–186, 2009.

DIAS-JUNIOR, C. A.; CAU, S. B. A.; TANUS-SANTOS, J. E. Papel do óxido nítrico na regulação da circulação pulmonar: implicações fisiológicas, fisiopatológicas e terapêuticas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 6, p. 412-419, 2008.

DORA, K. A. Coordination of vasomotor responses by the endothelium. **Circulation Journal**, v. 74, n.2, p. 226–232, 2010.

DORMANN, D.; ABE, T.; WEIJER, C. J.; WILLIAMS, J. Inducible nuclear translocation of a STAT protein in Dictyostelium prespore cells: implications for morphogenesis and cell-type regulation. **Development**, v. 128, p. 1081–1088, 2001.

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

DZAU VJ. Significance of endothelial derived vasoactive substances. **Journal of Vascular Medicine and Biology**, v. 1, p. 43-55, 1989.

EARLEY, S.; GONZALES, A. L.; GARCIA, Z. I. A dietary agonist of transient receptor potential cation channel V3 elicits endothelium-dependent vasodilation. **Molecular Pharmacology**, v. 77, p. 612-620, 2010.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308-23, 2007.

EFENDIEV, R.; DESSAUER, C. W. AKAPs and Adenylyl Cyclase in Cardiovascular Physiology and Pathology. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 58, n. 4, p. 339–344, 2011.

EGLIN, R.M., HEGDE, S.S., WATSON, N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. **Pharmacological Reviews**, v. 48, p. 531– 565, 1996.

EL-HAROON, H.; BRADBURY, D.; CLAYTON, A.; KNOX, A.J. Interleukin-1, Transforming Growth Factor- β 1, and Bradykinin Attenuate Cyclic AMP Production by Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells in Response to Prostacyclin Analogues and Prostaglandin E2 by Cyclooxygenase-2 Induction and Downregulation of Adenylyl Cyclase Isoforms 1, 2, and 4. **Circulation Research**, vol. 94, p. 353-361, 2004.

ERTEL, E. A.; CAMPBELL, K. P.; HARPOLD, M. M.; HOFMANN, F.; MORI, Y.; PEREZ-REYES, E.; SCHWARTZ, A.; et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, v. 25, p. 533-535, 2000.

ESCOBAR, P.; LEAL, S. M.; et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 184-190, 2010.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, v. 420, p. 629–635, 2002.

ETO, M., OHMORI, T., SUZUKI, M., FURUYA, K.; MORITA, F. A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. **Journal of Biochemistry**, v. 118, p. 1104–110, 1995.

ETO, M., SENBA, S., MORITA, F.; YAZAWA, M. Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: specific location in smooth muscle. **FEBS Letters**, v. 410, p. 356–360, 1997.

FAGAN, K. A.; OKA, M.; BAUER, N. R.; GEBB, R. A.; IVY, D. D.; MORRIS, K.G.; MCMURTRY, I. F. Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, p. L656–L664, 2004.

FERREIRA V.F.; PINTO A.C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 18 - 29, 2010.

FIKE, C. D.; KAPLOWITZ, M. R. Nifedipine inhibits pulmonary hypertension but does not prevent decreased lung eNOS in hypoxic newborn pigs. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 277, p. L449–L456, 1999.

FIRTH, A. L.; REMILLARD C. V.; PLATOSHYN, O.; FANTOZZI, I.; KO, E. A.; YUAN, J. X. J. Functional ion channels in human pulmonary artery smooth muscle cells: Voltage-dependent cation channels. **Pulmonary Circulation**, v. 1, n. 1, 2011.

FLOYD, R.; WRAY, S. Calcium transporters and signalling in smooth muscles. **Cell Calcium**, v. 42, p. 467–476, 2007.

FRANZ, C. M. Essential oil research: past, present and future. **Flavour Fragrance Journal**, v. 25, p. 112-113, 2010.

FUNARI, C.S.; GULLO, P.F.; NAPOLITANO, A.; et al. Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 2086-94, 2012.

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

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal**, v. 2, n. 3, 119-145, 2009.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GOMES, G.A.; MONTEIRO, C.M.O.; SENRA, T.O.S.; et al. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 111, p. 2423-2430, 2012.

Gomide M.S. **Avaliação da atividade anticancerígena de óleos essenciais de cinco espécies de *Lippia* (Verbenaceae)**. 2012. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de fora, Minas Gerais.

GRANT, B. J.; PARADOWSKI, L. J. Characterization of pulmonary arterial input impedance with lumped parameter models. **American Journal of Physiology**, v. 252, p. H585-93, 1987.

GREYSON, C. R. The Right Ventricle and Pulmonary Circulation: Basic Concepts. **Revista Española de Cardiología**, v. 63, n. 1, p. 81-95, 2010.

GUEDES DN, SILVA DF, BARBOSA-FILHO JM, MEDEIROS IA. Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolone. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1881-1887, 2004.

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

HALL I.P. Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. **European Respiratory Journal**, v.15, p. 1120–1127, 2000.

HANOUNE J, DEFER N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 41, p. 145–174, 2001.

HANSEN, P. B.; POULSEN, C. B.; WALTER, S.; MARCUSSEN, N.; CRIBBS, L. L.; SKOTT, O.; JENSEN, B. L. Functional importance of L- and P/Q-type voltage-gated calcium channels in human renal vasculature. **Hypertension**, v. 58, p. 464–470, 2011.

HANKS, S. K.; HUNTER, T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **FASEB Journal**, v. 9, p. 576-596, 1995.

HARDIE, D. G.; ROSS, F.A.; HAWLEY, S.A. AMP-Activated Protein Kinase: A Target for Drugs both Ancient and Modern. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 1222–1236, 2012.

HARDIE, D.G. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. **Genes Dev**, v. 25, p. 1895–1908, 2011.

HATANO, V.Y.; TORRICELLI, A.S.; GIASI, A.C.C.; COSLOPE, L.A.; VIANA, M.B. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.45, n. 3, p. 179-290, 2012.

HELMESTE, D. M.; TANG, S. W. Kinase inhibitors compete with imipramine for binding and inhibition of serotonin transport. **European Journal of Pharmacology**, v. 267, p. 239–242, 1994.

HESS, W. Effects of amrinone on the right side of the heart. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 3, p. 8–44, 1989.

HIRANO, K.; DERKACH, D. N.; HIRANO, M.; NISHIMURA, J.; KANAIDE, H. Protein kinase network in the regulation of phosphorylation and dephosphorylation of smooth

muscle myosin light chain. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 248, n. 2, p. 105–114, 2003.

HIRENALLUR, S. D. K.; HAWORTH, S.T.; LEMING, J. T.; CHANG, J.; HERNANDEZ, G.; GORDON, J. B.; RUSCH, N. J. Upregulation of vascular calcium channels in neonatal piglets with hypoxia-induced pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 295, p. L915–L924, 2008.

HUANG, W.; YEN, R. T.; MCLAURINE, M.; BLEDSOE, G. Morphometry of the human pulmonary vasculature. **Journal of Applied Physiology**, v. 81, p. 2123-33, 1996.

JACINTO, K.R., SILVA, I.A., CARVALHO, V. S., CAVALCANTI, V.B., TAVARES, J. F., NOUAILHETAS, V. L. A., BERALDO J., SILVA, J. L. V., 2011. *Etnofarmacologia de LippiamicrophyllaCham.* (Verbenaceae): Potencial propriedade gastrointestinal em ratos. **XX Congresso Italo Latinoamericano de Etnomedicina**. Fortaleza, Ceará.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J.K.A; et al. Avaliação agronômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E Brown]- quimiotipo citral, cultivados no Distrito federal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 13, n. 3, p. 258-264, 2011.

JANSSEN, L. J. T-type and L-type Ca^{2+} currents in canine bronchial smooth muscle: characterization and physiological roles. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. C1757-C1765, 1997.

JEFFERY, T. K.; WANSTALL, J. C. Pulmonary vascular remodeling in hypoxic rats: effects of amlodipine, alone and with perindopril. **European Journal of Pharmacology**, v. 416, p. 123–131, 2001.

JOHNSON, R. A.; SHOSHANI, I. Kinetics of “P”-site-mediated inhibition of adenylyl cyclase and the requirements for substrate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 11595–11600, 1990.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**.10. ed. São Paulo: Companhia Editira Nacional, 1991.

JUDD, W. S. et al.**Plant Systematics: A Phylogenetic apporoach**.3 ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2008.

JUNIOR V.F.V.; PINTO A. C.; MACIEL M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

KARASU-MINARECI E.; OZBUDAK I.H.; OZBILIM G.; SADAN G. Acute Effects of Vardenafil on Pulmonary Artery Responsiveness in Pulmonary Hypertension. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-6, 2011.

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**, p. 203-219, 1996.

KUIYAMA, H; KITAMURA, K.; NABATA, H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. **Pharmacology Reviews**, v. 47, n. 3, p. 387-573, 1995.

KUME H, HALL IP, WASHABAU RJ, TAKAGI K, KOTLIKOFF MI. Beta-adrenergic agonists regulate K_{Ca} channels in airway smooth muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, p. 371-9, 1994.

KUREISHI, Y.; KOBAYASHI, S.; AMANO, M.; KIMURA, K.; KANAIDE, H.; NAKANO, T.; KAIBUCHI, K.; ITO, M. Rho associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p.12257–12260, 1997.

KURIYAMA H.; KITAMURA K.; NABATA H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissue. **Pharmacological Reviews**, v. 47, p. 387–573, 1997.

KUSSMAUL, W. G.; NOORDERGRAAF, A.; LASKEY, W. K. Right ventricular-pulmonary arterial interactions. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 20, p. 63– 80, 1992.

LAHLOU, S.; FIGUEIREDO, A. F.; MAGALHÃES, P. J.; LEAL-CARDOSO, J. H. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 80, p. 1125-1131, 2002.

LAHLOU, S.; GALINDO, C. A.; LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES, M. C.; DUARTE, G. P. Cardiovascular effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* leaves and its main constituent, Terpinen-4-ol, in rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Medica**, v. 68, p.1097–102, 2002.

LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C.; CECCATTO, V. M; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers,

carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, p. 341-350, 2010.

LOCHNER, A; MOOLMAN, J. A. The Many Faces of H89: A Review. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 24, n. 3–4, p. 261–274, 2006.

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

MACK, C.P., SOMLYO, A.V., HAUTMANN, M., SOMLYO, A.P.; OWENS, G.K. Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 341–347, 2001.

MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S.; JUCÁ, D. M.; COELHO-DE-SOUZA, L. N.; FROTA, P.T.; COSTA, A. M, LEAL-CARDOSO, J. H. Vasorelaxation induced by the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 22, p. 169-177, 2008.

MANOLOPOULOS, V. G.; SAMET, M. M.; LELKES, P. I. Regulation of the adenylyl cyclase signaling system in various types of cultured endothelial cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 57 p.590-598, 1995.

MARÇAL,M.R.; PTAK, D.M.; KREMPSER, R.R.; et al. Antinociceptive effect of the essential oil *Lippia sidoides* on mice. **Plantas Medicas**, v. 72, p. 291, 2006.

MARIN, J.; ENCABO, A.; BRIONES, A.; GARCIA-COHEN, E. C.; ALONSO, M.J. Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. **Life Sciences**, v. 64, n. 5, p. 279–303, 1999.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, p. 927-30, 1994.

MARQUES, A. J.; FILGUEIRAS, C.A.L. "O químico e o naturalista luso-brasileiro Alexandre Antonio Vandelli". **Química Nova**, Vol.32, no.9,p.2492-2500. 2009.

MATSUMOTO, T.; WAKABAYASHI, K.; KOBAYASHI, T.; KAMATA, K. Diabetes-related changes in cAMP-dependent protein kinase activity and decrease in relaxation response in rat mesenteric artery. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, p. H1064–H1071, 2004.

MAURICE DH, KE H, AHMAD F, WANG Y, CHUNG J, MANGANIELLO VC:. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 4, p. 290-314, 2014.

MONCADA, S. *et al.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-42, 1991.

MONTANARI, R.M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae**. 2010. Tese (Programa de Pós- Graduação em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.

MOREIRA, F. V. **Efeitos cardiovasculares do citral, monoterpenos majoritário do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, em ratos**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2013.

MORGADO, M.; CAIRRÃO, E.; SANTOS-SILVA, A. J; VERDE, I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p.247–266, 2012.

MORRELL, N. W.; ADNOT, S.; ARCHER, S. L.; DUPUIS, J.; JONES, P. L.; MACLEAN, M. R, *et al.* Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v.54, p. S20-31, 2009.

MORRIS, S.M.; BILLIAR, T.R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. E829-39, 1994.

MORRISON, K.; STUDER, R.; ERNST, R.; HAAG, F.; KAUSER, K.; CLOZEL, M. Differential Effects of Selexipag and Prostacyclin Analogs muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 497–503, 2012.

NAEIJJE, R. Physiology of the Pulmonary Circulation and the Right Heart. **Current Hypertension Reports**, v. 15, p. 623–631, 2013.

NAEIJJE, R. Pulmonary hypertension and right heart failure in chronic obstructive pulmonary disease. **Proceedings of the American Thoracic Society**, n. 2, p. 20-2, 2005.

NAGAOKA, T.; MORIO, Y.; CASANOVA, N.; BAUER, N.; *et al.* Rho/Rho kinase signaling mediates increased basal pulmonary vascular tone in chronically hypoxic rats. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, p. L665–L672, 2004.

NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. A Relação entre Fragmentos Estruturais Oriundos de Produtos Naturais e Compostos Bioativos. **Revista Virtual Química**, v. 7, n. 2, 697-712, 2015.

NEEDLEMAN P.; TURK J.; JAKSCHIK B.A.; MORRISON A.R.; LEFKOWITH J.B. Arachidonic acid metabolism. **Ann Rev Biochem**, v. 55, p. 69-102, 1986.

NELSON, C. P.; RAINBOW, R. D.; BRIGNELL, J. L.; PERRY, M. D.; WILLETS, J.M.; et al. Principal role of adenylyl cyclase 6 in K1 channel regulation and vasodilator signalling in vascular smooth muscle cells. **Cardiovascular Research**, v.91, p. 694–702, 2011.

NI, F.; SO, S. P.; CERVANTES, V.; RUAN, K. H. A profile of the residues in the second extracellular loop that are critical for ligand recognition of human prostacyclin receptor. **FEBS Journal**, v. 275, n. 1, p. 128-37, 2008.

NOREL, X.; WALCH, L.; COSTANTINO, M.; LABAT, C.; GORENNE, I.; DULMET, E., ROSSI, F., BRINK, C. M1 and M3 muscarinic receptors in human pulmonary arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, p. 149– 157, 1996.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, p. 308-312, 2010.

OLIVEIRA G.L.; PUPO M.T; VIEIRA P.C. explorando produtos naturais microbianos nas fronteiras da química e da biologia. **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 10, 1577-1586, 2013.

OLIVEIRA, G. A. **A ação espasmolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seus constituintes majoritários envolve o bloqueio do influxo de cálcio em íleo de cobaia.** 2013. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

OLIVEIRA, G. A.; TRAVASSOS, R. A.; SOUZA, I. L. L.; MARTINS, I. R. R.; OWOLABI, N.M.S.; OGUNDAJO, A.; LAJIDE, L.; OLADIMEJI, M.O.; SETZER, W.N.; PALAZZO, M.C. Chemical composition and Antibacterial Activity of the Essential oil of *Lippia multiflora* Moldenke. **Records of Natural Products**, v. 3 n. 4, p. 170-177, 2009.

ORALLO, F. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. **Pharmacol Ther**, v. 69, p. 153–171, 1996.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ, D. M.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology** 76, p. 201–214, 2001.

PAUVERT, O.; LUGNIER, C.; KERAVALIS, T.; MARTHAN, R.; ROUSSEAU, E.; SAVINEAU, J. P. Effect of sildenafil on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, vascular tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, p. 513–522, 2003.

PEIXOTO-NEVES, D.; SILVA-ALVES, K.S.; GOMES, M.D.M.; LIMA, F.C.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P.J.C.; CECCATTO, V.M.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; LEAL-CARDOSO, J.H. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, p. 341–350, 2010.

PEIXOTO-NEVES, D.; SILVA-ALVES, K. S.; GOMES, M. D. M.; LIMA, F. C.; QUIROGA, P.R.; GROSSO, N.R.; LANTE, A.; LOMOLINO, G.; ZYGADLO, J.A.; NEPOTE, V. Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. **International Journal of Food Science & Technology**, v.48, n. 3, p. 642-649, 2013.

PELAIA, G., TERESA RENDA, LUCA GALLELLI, ALESSANDRO VATRELLA, MARIA TERESA BUSCETI, SERGIO AGATI, MARIO CAPUTI, MARIO CAZZOLA, ROSARIO MASELLI, SERAFINO A. MARSICO. Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: implications for asthma. **Respiratory medicine**, v. 102, n. 8, p. 1173-1181, 2008.

PIERRE, S.; ESCHENHAGEN, T.; GEISSLINGER, G.; SCHOLICH, K. Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. **Nature**, v. 8, p. 321-335, 2009.

PIERRE, S.C.; HAUSLER, J.; BIROD, K.; GEISSLINGER, G.; SCHOLICH, K. PAM mediates sustained inhibition of cAMP signaling by sphingosine-1-phosphate. **EMBO Journal**, v. 23, p. 3031–3040, 2004.

PINTO, N. V.; ASSREUY, A. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CECCATTO, V. M.; MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1,8-cineole in rats. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1151-1155, 2009.

POBURKO, D.; KUO, K. H.; DAI, J.; LEE, C. H.; VAN BREEMEN, C. Organellar junctions promote targeted Ca²⁺ signaling in smooth muscle: why two membranes are better than one. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, p. 8–15, 2004.

POTTER, L. R.; ABBEY-HOSCH, S.; DICKEY, D. M. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate dependent signaling functions. **Endocrine Reviews**, v. 27, n. 1, p. 47–72, 2006.

RATZ, P. H.; BERG, K. M.; URBAN, N. H.; MINER, A. S. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium sensitizing stimulus. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 288, p. C769–C783, 2005.

RATZ P. H.; BERG K. M. 2-Aminoethoxydiphenyl borate inhibits KCl-induced vascular smooth muscle contraction. **European Journal of Pharmacology**, v. 541, p. 177 – 183, 2006

REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; SCHULZ, R.; HODSON, H. F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **British Journal of Pharmacology**, v. 101, p. 746-752, 1990.

REEVES, J. T.; RUBIN, L. J. The pulmonary circulation: snapshots of progress. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 157, p. S101-8, 1998.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; M. Biochemistry of Smooth Muscle Contraction. San Diego, **Academic Press**, p. 227 –239, 1996.

REMILLARD, C. V.; ZHANG, W. M.; SHIMODA, L. A.; SHAM, J. S.K. Physiological properties and functions of Ca²⁺ sparks in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells. **American Journal Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 283, p. L433–L444, 2002.

RIBEIRO, T. P.; PORTO, D. L.; MENEZES, C. P.; ANTUNES, A. A.; SILVA, D. F.; et al. Unravelling the cardiovascular effects induced by α -terpineol: A role for the nitric oxide-cGMP pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, p. 811-816, 2010.

ROBEIRO, T. P. **Mecanismos de sinalização endoteliais envolvidos na atividade cardiovascular do α -terpineol em ratos normotensos**. Tese (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

RODMAN, D.; REESE, K.; HARRAL, J.; FOUTY, B.; WU, S.; WEST, J.; et al. Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. **Circulation Research**, v. 96, p. 864–872, 2005.

RODRIGUES E.D. **Estratégias de aumento de eficiência da análise de produtos naturais por espectroscopia de ressonância magnética nuclear**. 2010. Tese. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RODRIGUES, F.F.G.; COUTINHO, H.D.M.; CAMPOS, A.R.; LIMA, S.G.; COSTA, J.G.M. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil *Lippia microphylla* Cham. **Biological Sciences**, v. 33, n. 2, p. 141-144, 2011.

RODRÍGUEZ-RAMOS F.; GONZÁLEZ-ANDRADE M.; NAVARRETE A. Gnaphaliin A and B relax smooth muscle of guinea-pig trachea and rat aorta via phosphodiesterase inhibition. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, p. 926–935, 2011.

RUAN, C.H.; DIXON, R. A. F.; WILLERSON, J. T.; RUAN, M. D. Prostacyclin Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. **Texas Heart Institute Journal**, v. 37, n. 4, p. 391-399, 2010.

RUAN, K. H.; WU, J.; SO, S. P.; JENKINS, L. A. Evidence of the residues involved in ligand recognition in the second extracellular loop of the prostacyclin receptor characterized by high resolution 2D NMR techniques. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 418, n. 1, p. 25-33, 2003.

RYSZARD, J.; GRYGLEWSKI. Prostacyclin among prostanoides. **Pharmacological Reports**, v. 60, p. 3-11, 2008.

SAKUMA, M.; ISHIGAKI, H.; KOMAKI, K.; OIKAWA, Y.; KATOH, A.; NAKAGAWA, M.; et al. Right ventricular ejection function assessed by cineangiography--Importance of bellows action. **Circulation Journal**, v. 66, p. 605-9, 2002.

SALIMENA, F.R.G. **Revisão taxonômica de Lippia L. sect. Rhodolippia Schauer (Verbenaceae)**. 2000. Tese. Doutorado em Botânica. Universidade de São Paulo, São Paulo.

SALIMENA-PIRES, F.R. **Verbenaceae da serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. 1991. Dissertação Mestrado em Botânica. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. SANDERS, R.W. The genera of Verbenaceae in the southeastern United States. **Harvard papers in Botany**, v.5, n. 2, p. 303-358, 2001.

SANTOS, M. R. V.; MOREIRA, F. V.; FRAGA, B. P.; SOUSA, D. P.; BONJARDIM, L. R.; QUITANS-JUNIOR, L.J. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia - Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 4, p. 764-771, 2011.

SANTOS, P.S; FREITAS, R.M. Atividades ansiolítica e anticonvulsivante de constituintes de óleos essenciais. **Revista Internacional Interdisciplinar**, v.6, n.1, p.105-111, 2013.

SATOH, H.; BLATTER, L. A.; BERS, D. M. Effects of $[Ca^{2+}]_i$, SR Ca^{2+} load, and rest on Ca^{2+} spark frequency in ventricular myocytes. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 272, p. H657–H668, 1997.

SAUZEAU, V.; ROLLI-DERKINDEREN, M.; LEHOUX, S.; LOIRAND, G.; PACAUD, P. Sildenafil Prevents Change in RhoA Expression Induced by Chronic Hypoxia in Rat Pulmonary Artery. **Circulation Research**, v. 93, p. 630-637, 2003.

SCHULTZ, S. G. William Harvey and the circulation of the blood: the birth of a scientific revolution and modern physiology. **News in Physiological Sciences**, v. 17, p. 175-80, 2002.

SEIGLER, D. S. Plant secondary metabolism. **New Phytologist**, v. 147, p. 483-485, 2000.

SHEPHERD, M. C.; DUFFY, S. M.; HARRIS, T.; CRUSE, G.; SCHULIGA, M.; et al. KCa3.1 Ca^{2+} activated K^{+} channels regulate human airway smooth muscle proliferation. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 37, p. 525-31, 2007.

SHI, J.; WEI, L. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology: the effect of fasudil. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 62, n. 4, p. 1-32, 2013.

SHIKANGA, E.A.; COMBRINCK, S.; REGNIER, T. South African *Lippia* herbal infusions: Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. **South African Journal of Botany**, 76, 567-571, 2010.

SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A. Rho-Kinase Is an Important Therapeutic Target in Cardiovascular Medicine. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 25, p. 1767-1775, 2005.

SILVA, M. C. C. **Investigação da atividade tocolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e dos seus constituintes majoritários, carvacrol e timol, em útero de rata.** 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SINGHAL, S.; HENDERSON, R.; HORSFIELD, K.; HARDING, K.; CUMMING, G. Morphometry of the human pulmonary arterial tree. **Circulation Research**, v. 33, p. 190-7, 1973.

SOARES C.C; MARQUES T. M.; RIGOLIN G. G.; NEISE.; FRIAÇA A M. V.; SILVA A. S.; BARRETO G. S.; LOPES L. Atividade analgésica do extrato da *Pectis jangadensis* (S. Moore). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n.1A, p. 77-81, 2009.

SOARES, B.V.; DIAS,M.T. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SOARES, M.C.; DAMIANI, C. E.; MOREIRA, C. M.; STEFANON, I.; VASSALLO, D. V. Eucalyptol, na essential oil, reduces contractile activity in rat cardiac muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 453-461, 2005.

SOBOLEWSKI, A.; JOURDAN, K. B.; UPTON, P. D.; LONG, L.; MORRELL, N. W.. Mechanism of cicaprost-induced desensitization in rat pulmonary artery smooth muscle cells involves a PKA-mediated inhibition of adenylyl cyclase. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, p. L352–L359, 2004.

SOEDE, R. D. M.; HOPPER, N. A.; WILLIAMS, J. G.; SCHAAP, P. Extracellular cAMP depletion triggers stalk gene expression in *Dictyostelium*: disparities in developmental timing and dose dependency indicate that prespore induction and stalk repression by cAMP are mediated by separate signaling pathways. **Developmental Biology**, v. 177, p. 152–159, 1996.

SOMLYO A.P.; SOMLYO A. V. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 164, n. 4, p. 437–448, 1998.

SOMLYO, A.P., SOMLYO, A.V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiology Reviews**, v. 83, p. 1325-1358, 2003.

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

SOMMER, N.; DIETRICH, A.; SCHERMULY, R. T.; GHOFrani, H. A.; GUDERMANN, T.; et al. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. **European Respiratory Journal**, v. 32, p. 1639-51, 2008.

SOUSA, D. P. et al. Anticonvulsant activity of the linalool enantiomers and racemate: investigation of chiral influence. **Natural Product Communications**, v. 5, n, 12, p. 1847-1851, 2010.

SOUSA, D. P. et al. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, n. 1, p. 231-235, jun. 2006.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**:guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II.2 ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

SUBRAMANI, J., LEO, M. D. M., KATHIRVEL, K., et al. Essential role of nitric oxide in sepsis-induced impairment of endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation in rat pulmonary artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 630, p. 84-91, 2010.

SUBRAMANI, J.; LEO, M. D. M.; KATHIRVEL, K.; ARUNADEVI, R.; SINGH, T. U.; PRAKASH, V. R.; MISHRA, S. K. Essential role of nitric oxide in sepsis-induced impairment of endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation in rat pulmonary artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 630, p. 84–91, 2010.

SYLVESTER, J. T. The tone of pulmonary smooth muscle: ROK and Rho music?. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, n. 4, p. L624-L630, 2004.

TANTINI, B.; MANES, A.; FIUMANA, E.; PIGNATTI, C.; ZANNOLI, C. G. R.; et al. Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells. **Basic Research in Cardiology**, v. 100, p. 131 – 138, 2005.

TAWHAI, M. H; CLARK, A. R; BURROWES, K. S. Computational models of the pulmonary circulation: Insights and the move towards clinically directed studies. **Pulmonary Circulation**, v. 1, p. 224-38, 2011.

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

TORO, L.; GONZALEZ-ROBLES, A.; STEFANI, E. Electrical properties and morphology of single vascular smooth muscle cells in culture. **American Journal of Physiology**, v. 251, p. C763-73, 1986.

TOUVAY, C.; VILAIN, B.; CARRÉ, C.; MENCIA-HUERTA, J. M.; BRAQUET, P. Effect of limonene and sobrerol on monocrotalineinduced lung alterations and pulmonary hypertension. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 107, p. 272-274, 1995.

TRIGGLE, C. R.; SAMUEL, S. M.; RAVISHANKAR, S.; MAREI, I.; ARUNACHALAM, G.; DING, H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 90, p. 713–738, 2012.

UEHATA, M.; ISHIZAKI, T.; SATOH, H.; ONO, T.; KAWAHARA, T.; MORISHITA, T.; TAMAKAWA, H.; YAMAGAMI, K.; INUI, J.; MAEKAWA, M.; NARUMIYA, S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature**, v. 389, p. 990–994, 1997.

VALENTIN, A.; PELISSIER, Y.; BENOIT, F.; et al. Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1439-1442, 1995.

VAN BREEMEN, C.; SAIDA, K. Cellular mechanisms regulating $[Ca^{2+}]_c$ smooth muscle. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 315 – 329, 1989.

VANE, J. R.; ANGARD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **New England Journal of Medicine**, v. 323, p. 27-36, 1990.

VASCONCELOS, A.L.C.F. **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre 54raçãs54 gastrintestinais de ovinos**. 2006. Tese. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará.

VERAS, H. N. H.; ARARUNA, M. K. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A. Topical Antiinflammatory Activity of Essential Oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible Mechanism of Action. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 179–185, 2013.

VICCINI, L.F.; COSTA, D.C.S.; MACHADO, M.A; CAMPOS, A.L. Genetic diversity among nine species of *Lippia* (Verbenaceae) based on RAPD markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 246, p. 1-8, 2004.

VIEIRA, R.F. Conservation of Medicinal and Aromatic Plants in Brazil. In: J. Janick (ed), **Perspectives on new crops and new uses**. J. Janick (ed), ASHS Press, Alexandria, VA.

WALSH, M. P.; COLE, W. C. The role of actin filament dynamics in the myogenic response of cerebral resistance arteries. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 33, p. 1–12, 2013.

WAN, J.; YAMAMURA, A.; ZIMNICKA, A. M.; VOIRIOT, G.; SMITH, K. A.; TANG, H.; et al. Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca^{2+} channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2. **American**

Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, v. 305, p. L154–L164, 2013.

WANG, Z. W.; KOTLIKOFF, M. I. Activation of K_{Ca} channels in airway smooth muscle cells by endogenous protein kinase A. **American Journal of Physiology**, v. 271, p. L100-5, 1996.

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

WEST, J. B. The role of the fragility of the pulmonary blood-gas barrier in the evolution of the pulmonary circulation. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 304, p. R171–6, 2013.

WHARTON, J.; DAVIE, N.; UPTON, P.D.; YACOUN, M.H.; POLAK, J. M.; MORRELL, N. W. Prostacyclin analogues differentially inhibit growth of distal and proximal human pulmonary artery smooth muscle cells. **Circulation**, v. 102, p. 3130–3136, 2000.

WILLOUGHBY, D.; COOPER, D. M. Organization and Ca^{2+} regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 965–1010, 2007.

WIT, C.; GRIFFITH, T. M. Connexins and gap junctions in the EDHF phenomenon and conducted vasomotor responses. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 897–914, 2010.

WOLFGANG, K. Pulmonary Vascular Innervation and Its Role in Responses to Hypoxia. **American Thoracic Society**, v. 8, p. 471–476, 2011.

WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, n. 2, p.135–143, 2001.

WOODSOME, T. P.; ETO, M.; EVERETT, A.; BRAUTIGAN, D. L.; KITAZAWA, T. Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca^{2+} sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. **Journal of Physiology**, v. 535, n. 2, p. 553–564, 2001.

WRIGHT, D.B.; S. TRIPATHI; A. SIKARWAR; K.T. SANTOSH; J. PEREZ-ZOGHBI; O.O. OJO; N. IRECHUKWU; J.P.T. WARD; D. SCHAAFSMA. Regulation of GPCR-mediated smooth muscle contraction: Implications for asthma and pulmonary hypertension. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, p. 121-131, 2013.

WU, J.; SO, S. P.; RUAN, K. H. Determination of the membrane contact residues and solution structure of the helix F/G loop of prostaglandin I₂ synthase. **Arch Biochem Biophys**, v.411, n. 1, p. 27-35, 2003.

WYLIE, P.G., CHALLISS, R.A.J., BLANK, J.L. Regulation of extracellular signal regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase by G-protein-linked muscarinic acetylcholine receptors. **Biochemical journal**, v. 338, p. 619– 628, 1999.

XAVIER, A. L. **Estudo do potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e sua toxicidade**. 2011. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

XUEFEI, M. A.; CHENG, Z.; KONG, H.; WANG, Y.; UNRUH, H.; STEPHENS, N. L.; LAVIOLETTE, M. Changes in biophysical and biochemical properties of single bronchial smooth muscle cells from asthmatic subjects. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 6, p. L1181-L1189, 2002.

YANG, Y.; SHI, Y.; GUO, S.; ZHANG, S.; CUI, N.; SHI, W.; ZHU, D.; JIANG, C. PKA-dependent activation of the vascular smooth muscle isoform of KATP channels by vasoactive intestinal polypeptide and its effect of relaxation of the mesenteric resistance artery. **Biochim Biophys Acta**, v. 1788, p. 88–96, 2008.

ZHANG, L.; WU, J.; RUAN, K. H. Solution structure of the first intracellular loop of prostacyclin receptor and implication of its interaction with the C-terminal segment of G alpha s protein. **Biochemistry**, v. 45, n. 6, p. 1734-44, 2006.

ZHANG, S.; LIU, Y.; GUO, S.; ZHANG, J.; CHU, X.; JIANG, C.; ZHU, D. Vasoactive intestinal polypeptide relaxes isolated rat pulmonary artery rings through two distinct mechanisms. **Journal of Physiological Sciences**, v. 60, p. 389–397, 2010.

ZHANG, W.; HUANG, Y.; WU, Y.; GUNST, S. J. A novel role for RhoA GTPase in the regulation of airway smooth muscle contraction. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 93, p. 129–136, 2015.

Anexo



Anexo 1 – Certidão de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB).



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 16 de julho de 2013.

CEUA Nº 0501/13

Ilmo(a). **Bagnólia Araújo da Silva**

Departamento Ciências Farmacêuticas - CCS - UFPB

Orientando(a): **Renata de Souza Sampaio, (Doutorado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **15/07/13** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Bioprospecção de Produtos Naturais obtidos de Solanum paludosum Moric. e Lippia microphylla Cham. com potencial atividade vasorrelaxante em corpo cavernoso e artéria pulmonar de rato.**

Com previsão de empregar **120 Ratos WISTAR;**
DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.

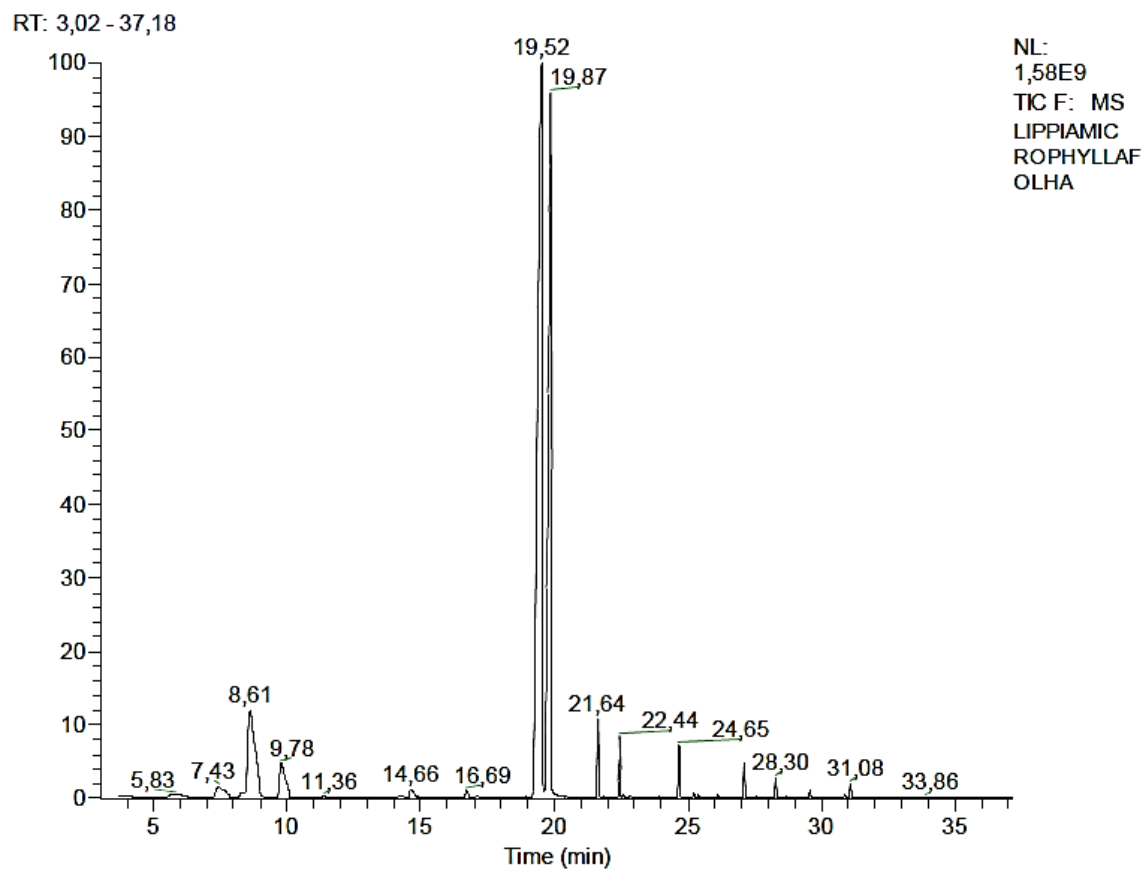
- ANIMAIS PROVÉM

Para serem utilizados no período de **01/08/2013 a 02/02/2017**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

Anexo 2 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae).



Anexo 3 – Tabela dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae).

IR	Constituintes	(%)
929	α -pineno	0,51
988	mirreno	1,40
1014	α -terpineno	0,20
1023	<i>p</i> -cimeno	9,00
1055	γ -terpineno	2,92
1088	<i>p</i> -cimeneno	0,10
1097	hidrato de trans-sabineno	0,10
1128	aloocimeno	0,10
1133	<i>cis</i> - <i>p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	0,10
1170	umbelona	0,12
1179	4-terpineol	0,57
1182	<i>p</i> -cimen-8-ol	0,10
1186	α -terpineol	0,10
1227	metiltimol	0,28
1236	metilcarvacrol	0,20
1293	timol	46,52
1301	carvacrol	31,74
1343	acetato de carvacrol	1,61
1362	acetato de timol	1,32
1415	β -cariofileno	1,15
1430	<i>trans</i> - α -bergamoteno	0,11
1451	α -humuleno	0,06
1476	hidroxianisol butilado	0,68
1505	β -bisaboleno	0,42
1537	espatulenol	0,16
1576	óxido de cariofileno	0,42
	Total	99,99

IR = índice de retenção

Fonte: XAVIER, 2015.