

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

JULIANA DA NÓBREGA CARREIRO

EFEITO DUAL DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE
CAMUNDONGOS SOB NORMÓXIA E HIPÓXIA

JOÃO PESSOA-PB

2016

JULIANA DA NÓBREGA CARREIRO

**EFEITO DUAL DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE
CAMUNDONGOS SOB NORMÓXIA E HIPÓXIA**

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 requisito para obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS, área de concentração: FARMACOLOGIA.

Orientador: Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

JOÃO PESSOA-PB

2016

C314e Carreiro, Juliana Da Nóbrega.

Efeito dual do resveratrol em útero isolado de camundongos sob normóxia e hipóxia / Juliana Da Nóbrega Carreiro. - João Pessoa, 2016.

112 f. : il.

Orientação: Valdir de Andrade Braga.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Efeito de resveratrol - Útero de camundongo. 3. Canais de potássio. I. Braga, Valdir de Andrade. II. Título.

UFPB/BC

JULIANA DA NÓBREGA CARREIRO

**EFEITO DUAL DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE
CAMUNDONGOS SOB NORMÓXIA E HIPÓXIA**

Aprovada em ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

**Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientador**

**Profa. Dra. Josiane Cruz
Membro Interno
(Universidade Federal da Paraíba)**

**Profa. Dra Maria de Fátima Agra
Membro Interno
(Universidade Federal da Paraíba)**

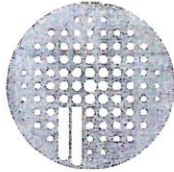
**Profa. Dra Marciane Magnani
Membro Externo
(Universidade Federal da Paraíba)**

**Prof. Dr João Henrique da Costa Silva
Membro Externo
(Universidade Federal do Pernambuco)**

**Profa. Dra. Leônia Maria Batista
Membro suplente interno
(Universidade Federal da Paraíba)**

**Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior
Membro suplente externo
(Universidade Federal de Ouro Preto)**

**JOÃO PESSOA-PB
2016**



PgPN SB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 244ª (ducentésima quadragésima quarta) Tese de Doutorado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Juliana da Nóbrega Carreiro**, candidata ao Título de "Doutora" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de Farmacologia.

Às quatorze horas (14h) do dia vinte e dois de agosto do ano dois mil e dezesseis (22.08.2016), nas dependências do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Juliana da Nóbrega Carreiro** candidata ao Título de "DOUTORA" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de Farmacologia. Foram componentes da Banca Examinadora os professores João Henrique da Costa Silva, Ph.D em Fisiologia, Marciane Magnani, Ph.D em Ciência de Alimentos, Josiane de Campos Cruz, Ph. D em Ciências, Maria de Fatima Agra, Ph.D em Botânica e Valdir de Andrade Braga, Ph.D em Fisiologia. Sendo o primeiro, integrante do corpo docente da Universidade Federal de Pernambuco e os demais, integrantes do corpo docente desta Universidade. Dando início aos trabalhos, o Presidente da Banca, professor Valdir de Andrade Braga, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Juliana da Nóbrega Carreiro**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Efeito dual do resveratrol em útero isolado de camundongos sob normóxia e hipóxia". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de cinquenta minutos, a candidata foi arguida pelos Examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADA**. Em face da aprovação, declarou o Presidente, achar-se a examinada **Juliana da Nóbrega Carreiro** legalmente habilitada a receber o Título de "DOUTORA" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na Área de Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o mesmo faz jus. Nada mais havendo a tratar, eu, Dayana Rosa Brandão Pires, na qualidade de Secretária, lavrei a presente Ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.

Dayana Rosa Brandão Pires
Dayana Rosa Brandão Pires (Secretária)

Valdir de A. Braga
Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga (Orientador)

Josiane de Campos Cruz
Prof.ª Dr.ª Josiane de Campos Cruz (Examinador)

Marciane Magnani
Prof.ª Dr.ª Marciane Magnani (Examinadora)

João Henrique da Costa Silva
Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva (Examinador)

Maria de Fatima Agra
Prof.ª Dr.ª Maria de Fatima Agra (Examinadora)



Resumo

RESUMO

O efeito de resveratrol em útero isolado de camundongo sob normóxia e hipóxia foi avaliado neste estudo. O resveratrol (1, 3, 10, 30, 100 uM) relaxou o útero de camundongos e diminuiu a amplitude e frequência das contrações uterinas. O polifenol (3, 10, 30 uM) inibiu as contrações induzidas pela ocitocina em concentrações cumulativas no útero isolado. As curvas cumulativas foram deslocadas para a direita de uma forma não-paralela e com efeito máximo (E_{max}) reduzido. Os valores de CE_{50} aumentaram de $9,2 \pm 0,1$ (controle) para $3,1 \pm 0,02$, $2,9 \pm 0,01$ e $0,03 \pm 1,5$ na presença de resveratrol, caracterizando antagonismo não competitivo. Resveratrol exibiu um efeito regenerativo após hipóxia. Com resveratrol (% contração = $51,18 \pm 4,5$), o útero foi cinco vezes mais funcional do que sem (contração% = $10,67 \pm 1,6$). Observou-se que na presença de resveratrol, após 10 minutos de hipóxia, o útero foi apresentou tônus contrátil de aproximadamente 75%. Comparou-se o efeito do resveratrol com tempol e observou-se que o resveratrol (% contração = $51,18 \pm 4,5$) foi três vezes melhor (% contração = $19,73 \pm 0,8$). O efeito do resveratrol (% contração = $51,18 \pm 4,5$) foi atenuado após incubação com o tetraetilamônio (% contração = $21,25 \pm 1,9$), indicando que os canais de potássio estão envolvidos no efeito de resveratrol na útero hipóxico. O efeito de resveratrol (% contração = $51,18 \pm 4,5$) foi praticamente abolid após incubação com nifedipino (% contração = $4,46 \pm 1,4$). Observou-se a participação do KATPs no efeito de resveratrol.

Palavras-chave: útero; Resveratrol; hipóxia; antioxidante; tocolítico; canais de potássio

Abstract

EFEITO DUAL DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGOS SOB NORMÓXIA E HIPÓXIA. CARREIRO, J. N. Tese apresentada ao Programa De Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. CCS/UFPB. 2016.

ABSTRACT

The effect of resveratrol in normoxic and hypoxic uterine was evaluated in this study. Resveratrol (1, 3, 10, 30, 100 μM) relaxed the uterus of mice and decreased the amplitude and frequency of uterine contractions. The polyphenol (3, 10, 30 μM) inhibited the oxytocin-induced cumulative contractions in the isolated uterus. The cumulative curves were shifted to the right in a non-parallel manner and with reduced E_{max} . The EC_{50} values increased from 9.2 ± 0.1 (control) to 3.1 ± 0.02 , 2.9 ± 0.01 and 1.5 ± 0.03 in the presence of resveratrol. Noncompetitive antagonism was the confirmed effect. Resveratrol exhibited a regenerative effect after hypoxia. With resveratrol (% contraction = 51.18 ± 4.5), the uterus was five times more functional than without (contraction % = 10.67 ± 1.6). We observed that in the presence of resveratrol, after 10 minutes of hypoxia, the uterus was capable of approximately 75% contraction. We compared the effect of resveratrol with tempol and observed that resveratrol (% contraction = 51.18 ± 4.5) was three times better (% contraction = 19.73 ± 0.8). The effect of resveratrol (% contraction = 51.18 ± 4.5) was attenuated after incubation with tetraethyl ammonium (% contraction = 21.25 ± 1.9), indicating that potassium channels are involved in the effect of resveratrol in the hypoxic uterus. The effect of resveratrol (% contraction = 51.18 ± 4.5) was almost abolished following incubation with nifedipine (% contraction = 4.46 ± 1.4). We observed the participation of KATPs in the effect of resveratrol.

Keywords: uterus; resveratrol; hypoxia; antioxidant; tocolytic; potassium channels

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estruturas químicas dos isômeros: trans-resveratrol e cis-resveratrol. 19
- Figura 2: Registro representativo do efeito do resveratrol nas contrações fásicas espontâneas. As setas para baixo representam a adição cumulativa das concentrações (1-100 μ M) do resveratrol..... 44
- Figura 3: Curva concentração-resposta ao resveratrol. Efeito sobre o tônus (A), amplitude (B) e frequência (C) das contrações uterinas espontâneas (n = 6). 47
- Figura 4: Registro representativo das contrações induzidas por concentrações cumulativas de ocitocina (10^{-11} – 10^{-5} M) na ausência e na presença do resveratrol. ... 49
- Figura 5: Curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina na ausência (●) e na presença do resveratrol nas concentrações de 3 μ M (□), 10 μ M (▲) e 30 μ M (O) em útero isolado de camundongos (n = 6). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way” seguido por Bonferroni, ****p < 0,0001 (controle vs. resveratrol)..... 50
- Figura 6: Registros representativos do efeito de resveratrol (1 – 130 μ M) sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina em útero isolado de camundongo. As setas para baixo representam a adição cumulativa das concentrações do resveratrol 51
- Figura 7: Efeito do resveratrol sobre o tônus (A), amplitude (B) e frequência (C) das contrações tônicas induzidas por ocitocina em útero isolado de camundongo (n = 6). 54
- Figura 8: Registros representativos do efeito regenerativo do resveratrol (100 μ M) em útero isolado de camundongo exposto à 30 minutos de hipóxia..... 56
- Figura 9: Efeito regenerativo do resveratrol (100 μ M) após 30 minutos de hipóxia em útero. Símbolos e barras verticais representam a média e E.P.M., respectivamente. One-way e teste t **** p < 0,0001 (Hypoxial vs. hipóxia + resveratrol); ### p < 0,0001 (Controle vs. Hipóxia); (n = 6). 57
- Figura 10: Registros representativos do efeito protetor do resveratrol (100 μ M) em útero isolado de camundongo exposto à 30 minutos de hipóxia..... 59
- Figura 11: Efeito protetor do resveratrol (100 μ M) após 30 minutos de hipóxia em útero. Símbolos e barras verticais representam a média e S.D.M., respectivamente. One-way e teste t ***p < 0,001; ****p < 0.0001 (Hipoxia controle vs. Hipoxia 10, 20, 30 min / EC50), ###p < 0,001, ####p < 0.0001 (Hipoxia vs. Hipoxia + Resveratrol) (n = 6). 60
- Figura 12: Comparação dos efeitos do resveratrol (100 μ M) e tempol (100 μ M) após 30 minutos de hipóxia em útero. Símbolos e barras verticais representam a média e S.D.M., respectivamente. One-way e teste t **** p < 0,0001 (Hypoxial vs. hipóxia + resveratrol vs hipóxia + tempol), ### p < 0,05 (Hipóxia vs. Hipóxia + Tempol) (n = 6). 61
- Figura 13: Avaliação do efeito de resveratrol na presença de TEA⁺ (10mM) em útero em modelos de hipóxia. Símbolos e barras verticais representam a média e S.D.M.,

respectivamente. One-way ANOVA seguido por teste de Bonferroni e test t, *** $p < 0.001$ (Hipoxia vs. Hipoxia + Resveratrol + TEA), ### $p < 0.001$ (Hipoxia + Resveratrol vs. Hipoxia + Resveratrol + TEA) (n = 6). 63

Figura 14: Avaliação do efeito de resveratrol na presença de nifedipino em útero isolado de camundongo em modelos de hipóxia. Símbolos e barras verticais representam a média e S.D.M., respectivamente. One-way ANOVA seguido por teste de Bonferroni *** $p < 0,0001$ (Hipóxia +R100 vs. Hipóxia +R100+ Nifedipino), #### $p < 0,0001$ (Hipóxia vs. Hipóxia+R100+ Nifedipino) (n = 6). 63

Figura 15: Avaliação do efeito de resveratrol na presença de glibenclamida em útero isolado de camundongo em modelos de hipóxia. Símbolos e barras verticais representam a média e S.D.M., respectivamente. One-way ANOVA seguido por teste de Bonferroni *** $p < 0,0001$ (Hipóxia +R100 vs. Hipóxia +R100+ glibenclamida), ## $p < 0,001$ (Hipóxia vs. Hipóxia+R100+ Glibenclamida) (n = 6). 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Composição da solução de Krebs.....	33
------------------	-------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BK _{Ca}	canais para potássio ativados por cálcio de grande condutância
[Ca ²⁺] _c	concentração citosólica do íon cálcio
Ca ²⁺ - ATPase	bomba de cálcio
CaM	Calmodulina
[Ca ²⁺ ₄ -CaM	complexo cálcio – calmodulina
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
Ca _v	canais para cálcio dependentes de voltagem (De acordo com The IUPHAR Ion Channel Compendium, 2002)
CGs	ciclase de guanilil solúvel
COX	Ciclooxygenase
DAG	Diacilglicerol
E _{max}	efeito máximo
Glib	Glibenclamida
G _{αq}	subunidade alfa da proteína G _q
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GPCRs	receptores acoplados a proteína G
GTP	trifosfato de guanosina
IP ₃	trifosfato de inositol

[K ⁺] _e	concentração de potássio externa
K _v	canais de potássio sensíveis à voltagem
K _{ATP}	canais de potássio ativados por ATP
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do óxido nítrico
OXI	Ocitocina
PGE ₂	prostaglandina E
PKA	proteína cinase dependente de AMP _c
PKG	proteína cinase dependente de GMP _c
PLC	fosfolipase C
R ²	coeficiente de determinação de correlação não linear
R100	resveratrol 100 μM
R.S.	retículo sarcoplasmático
SK _{Ca}	Canaismgf,.dsamdftr56 para potássio ativados por cálcio de pequena condutância

Sumário

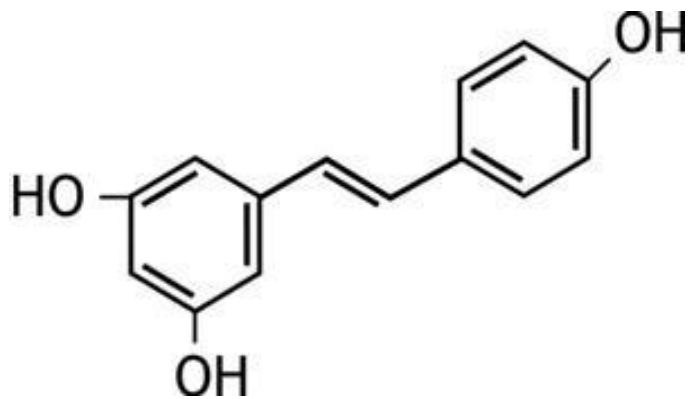
SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	17
1.1 PRODUTOS NATURAIS E O RESVERATROL	17
1.2 MÚSCULO LISO: CANAIS PARA CÁLCIO E CANAIS PARA POTÁSSIO	22
1.3 ÚTERO: FISILOGIA E HIPÓXIA	26
2 OBJETIVO GERAL	29
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3. METODOLOGIA.....	32
3.1 ANIMAIS.....	32
3.2 DROGAS E REAGENTES	32
3.3 SOLUÇÕES NUTRITIVAS	33
3.4 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DA SUBSTÂNCIA EM ESTUDO	34
3.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	34
3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	35
3.6.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO EM NORMÓXIA.....	35
3.6.1.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL NO TÔNUS, NA AMPLITUDE E NA FREQUÊNCIA DAS CONTRAÇÕES UTERINAS FÁSICAS E ESPONTÂNEAS.	35
3.6.2 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES PARA OCITOCINA NO MECANISMO DE AÇÃO Tocolítico DE RESVERATROL.....	36
3.6.2.1 ANTAGONISMO DA CONTRAÇÃO INDUZIDA POR OCITOCINA.	36
3.6.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL NO TÔNUS, AMPLITUDE E FREQUÊNCIA SOBRE AS CONTRAÇÕES UTERINAS INDUZIDAS POR OCITOCINA.	37
3.6.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB HIPÓXIA.....	37
3.6.4.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO REGENERATIVO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB HIPÓXIA.....	37
3.6.4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB HIPÓXIA.....	38

3.6.6.	AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO NO MECANISMO DE AÇÃO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO SOB HIPÓXIA.....	39
3.6.7	AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA CÁLCIO NO MECANISMO DE AÇÃO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO SOB HIPÓXIA.	40
3.6.8	AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS K_{ATP_s} , SUBTIPOS DE CANAIS PARA POTÁSSIO NO MECANISMO DE AÇÃO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO SOB HIPÓXIA	40
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4.	RESULTADOS.....	43
4.1.2	ANTAGONISMO DA CONTRAÇÃO INDUZIDA POR OCITOCINA	48
4.1.3	EFEITO DO RESVERATROL SOBRE AS CONTRAÇÕES TÔNICAS INDUZIDAS POR OCITOCINA.	51
4.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB HIPÓXIA 55	
4.2.1	AVALIAÇÃO DO EFEITO REGENERATIVO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB HIPÓXIA.....	55
4.2.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB HIPÓXIA.....	58
4.2.3	COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DO TEMPOL E RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB HIPÓXIA.....	60
4.2.4	AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO NO MECANISMO DE AÇÃO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO SOB HIPÓXIA.....	62
4.2.5	AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA CÁLCIO NO MECANISMO DE AÇÃO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO SOB HIPÓXIA	63
4.2.6	AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP (K_{ATP_s}) NO MECANISMO DE AÇÃO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGOS SOB HIPÓXIA. ...	64
6.	CONCLUSÃO	81
7.	REFERÊNCIAS	83

“O fardo é proporcional às forças, como a recompensa será proporcional à resignação e à coragem”

(Allan Kardec)



Dedicatória

Aos meus pais,

Joaquim Carreiro Neto e Maria da Conceição da N. Carreiro, que sempre estiveram junto, que fizeram de suas vidas exemplos a serem seguidos. Que fizeram de tudo para me proporcionar uma formação digna. Pelo carinho, presença e paciência.

Aos meus irmãos e sobrinha,

Artur e Gabriela da N. Carreiro, Ceci Lemos Carreiro pelos sorrisos e momentos vividos juntos. Pela cumplicidade e por acreditarem na minha capacidade, sempre. Ceci em especial por dar um novo sentido a todos os meus valores.

Ao meu companheiro,

Franco Ribeiro, pela lealdade, companheirismo e amor. Por ter acreditado sempre. Por me levantar nos momentos de fraqueza. Obrigada pelo incentivo e paciência nessa reta final.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e serenidade, pela paciência e sabedoria no discernimento das minhas atitudes e caminhos escolhidos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga. Pelos ensinamentos e orientação. Pelo exemplo de conduta profissional, dedicação e por abraçar de forma tão intensa o propósito de ensinar.

Aos meus professores da Universidade de Newcastle, Austrália, por todo apoio ao meu trabalho.

Ao meu amigo Rafael de Almeida Travassos. Pelas doses diárias de estímulo, de alegria, de coragem e muitas vezes de resignação. Pelos sorrisos e lágrimas compartilhadas. Por ser não só amigo, mas parceiro em todos os momentos. Amizade essa que levarei por toda a vida.

A minha amiga Naiane Ferraz por todo apoio científico e amizade. Por sempre ser tão solícita nos momentos de dificuldade

A todos os colegas e amigos que estão ou passaram pelo Laboratório de controle neural da circulação e hipertensão pela amizade e bons momentos vividos.

A todos os colegas e amigos da turma do Mestrado e Doutorado, do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pelos momentos vividos juntos.

Aos meus professores do Programa de graduação e Pós-Graduação. Muito obrigada pelos ensinamentos e dedicação.

Ao Centro de Biotecnologia (CBiotec / UFPB) pelo apoio Institucional.

A José Crispim Duarte, pela sua amizade e por sempre está pronto a nos auxiliar nos mais variados problemas.

À Coordenação da Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos em nome do Professore Dr. Josean fechine por todo empenho e competência.

A Caroline Mangueira, secretaria da Pós-Graduação, por toda dedicação, eficiência e amizade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro na concessão da minha bolsa e pelo suporte técnico-científico através do Portal Periódicos.

À Universidade Federal da Paraíba, instituição maior, pelo desenvolvimento na minha carreira profissional.

À Universidade de Newcastle e ao seu corpo docente que me ajudou a desenvolver este trabalho final

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a produção deste trabalho.

Muito Obrigada!

Juliana da Nóbrega Carreiro

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 PRODUTOS NATURAIS E O RESVERATROL

O Brasil possui uma grande diversidade de espécies de plantas medicinais, fator esse estimulante para a pesquisa e estudo dos produtos naturais. Contudo, aproximadamente apenas 10% têm sido avaliadas com respeito às suas características biológicas e apenas 5% com objetivos fitoquímicos e/ou farmacológicos que visam tratar e/ou melhorar quadro patológicos que acometem a população. Buscar produtos naturais ativos para auxílio no tratamento de doenças negligenciadas ou não bem esclarecidas é o grande objetivo de muitos grupos nacionais e internacionais de pesquisas, em especial no Brasil devido à grande oferta e variedade de substratos encontrados na flora, bem como, na fauna brasileira.

A partir dos produtos naturais, moléculas são isoladas e testadas com o intuito de descobrir fins terapêuticos visando uma melhoria no tocante aos desconfortos, como por exemplo dores, causadas por inúmeras doenças que afetam a população de uma maneira geral. Assim, essas moléculas podem ser utilizadas com fins terapêuticos, seja como medicamento curativo, paliativo ou preventivo (LUNA, 2005).

A relação entre produtos naturais e saúde é responsável pelo início de uma nova geração de terapia, que inclui fármacos derivados de plantas. O uso da própria planta ou de suas partes em dietas suplementares ou como alimentos funcionais, tornou-se uma importante alternativa na busca de uma vida mais saudável. Visando contribuir na busca de uma terapia eficaz, de fácil acesso, menor custo e efeitos adversos reduzidos, muitos pesquisadores apresentam um levantamento de substâncias de origem vegetal com comprovada ação em alvos utilizados na descoberta de novos fármacos. Nos últimos 35 anos, dentre os novos fármacos aprovados, cerca de 30% são produtos naturais ou derivados destes e muitos tem sido utilizados no alívio e/ou cura de muitas doenças (NEWMAN & CRAGG 2007).

A pesquisa em produtos naturais no Brasil teve início em meados do século passado e tem sido foco de constantes revisões, indicando uma preocupação com a diversidade a ser pesquisada, a qualidade e objetividade

dos trabalhos bem como sua divulgação no meio científico (PUPO; GALLO, 2009). Através de investigações por meio de triagem de substâncias obtidas de diversas espécies de plantas ou utilizando substâncias isoladas e puras a partir de métodos de extração, isolamento e identificação pode-se obter fármacos usados na terapêutica moderna ou ferramentas farmacológicas como: quinina (antimalárico), pilocarpina (colinesterásico), sildenafil (vasodilatador), vincristina (anticancerígeno), penicilinas, cefalosporinas (antibióticos), ácido acetilsalicílico (AAS) e morfina (analgésicos), captopril (anti-hipertensivo), estatinas (anticoolesterolêmico) e azidovudina (antiviral) (BARREIRO, 2009). Dados como esses só reforçam a importância dos estudos com produtos naturais, estudos esses que podem tanto comprovar o uso de determinadas substâncias na medicina popular como descobrir novas drogas e/ou fármacos que possam ser utilizados na terapêutica.

Dentre os fármacos oriundos de produtos naturais, encontram-se os polifenóis, que formam um grupo heterogêneo de substâncias, constituído de várias classes de compostos, com propriedade antioxidante, presentes em vários alimentos e bebidas, em especial na uva e em seus derivados. Esses compostos possuem atividade antioxidante, possuem também propriedades antibacterianas, antiviral, antihepatotóxica e antialérgica dentre outras (SHAHIDI; NACZK, 2008; RIZZON & MIELE, 2006). Devido a essas inúmeras atividades biológicas podemos encontrar muitos desses compostos sendo utilizados como medicamentos no alívio e/ou combate de muitas doenças, na produção de cosméticos e introduzidos na dieta alimentar de muitas pessoas, sendo alvos importantes na indústria farmacêutica. A grande procura da humanidade por meios que favoreçam uma vida saudável tem impulsionado as pesquisas por novas substâncias capazes de satisfazer tais necessidades.

Dentre os polifenóis, o resveratrol é exemplo e se destaca em pesquisas que visam melhoria na qualidade de vida dos pacientes a partir de substâncias de origem natural.

O resveratrol é um fármaco classificado como polifenol, produzido por diversas plantas como Kojo-kon (*Polygonum cuspidatum*), Kashuwu (*Polygonum multiflorum*), encontrado também no eucalipto, amendoim, amora e em uvas (*Vitis vinifera*, *Vitis labrusca*) (ARCE, L., 1998; HILLIS, W. E., 1974; KIMURA, Y., 1983; KUBO, M., 1979). Na uva é sintetizado na casca como

resposta ao stress causado por ataque fúngico, dano mecânico ou por irradiação de luz ultravioleta. Os precursores do resveratrol são os ácidos cumárico e malônico, na proporção de 1:3 (SOLEAS, et., al, 1997), provenientes das rotas do ácido chiquímico e ácido mevalônico.

O resveratrol é sintetizado naturalmente na planta sob duas formas isômeras: trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e cis-resveratrol (cis-3,5,4' trihidroxiestilbeno), o isômero trans-resveratrol é convertido para cis-resveratrol em presença da luz visível, sendo esta forma a mais estável (Figura 1).

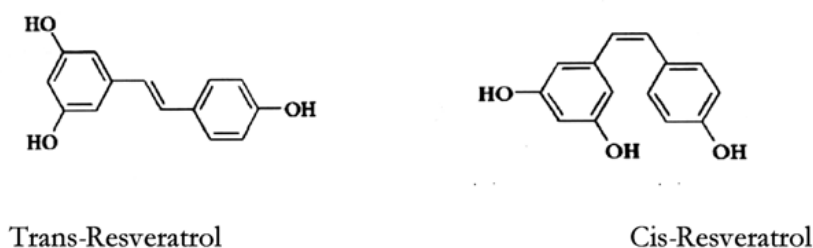


Figura 1: Estruturas químicas dos isômeros: trans-resveratrol e cis-resveratrol.

O resveratrol possui inúmeras atividades biológicas relatadas na literatura, tal como atividade antioxidante através da inibição da atividade dioxigenase e lipoxigenase (ARICHI, H., 1982; PINTO, M., 1999). Além disso, pode atuar de modo similar ao estrogênio e substituir parcialmente este estrógeno nos tratamentos pós-menopausa, sendo utilizado em estudos anteriores como suplemento dietético, fato que revela ainda mais a relação entre o resveratrol e o aparelho reprodutor feminino (RATNA, W. N.; SIMONELLI J. A., 2002). De acordo com SUBBARAMAIAH et al. (1998), a atividade antiinflamatória do resveratrol é explicada pela inibição da transcrição e atividade da ciclooxygenase (COX-1 e COX-2), inibindo também a síntese de tromboxinas, portanto atuando como anticoagulante. Nesse estudo citado anteriormente foi observado que um pré-tratamento de plaquetas com resveratrol (50 μ g / ml) inibiu a adesão das mesmas. Resveratrol também

teve um efeito inibidor sobre a geração de malonildialdeído (um marcador da síntese de tromboxano A₂) tiobarbitúrico medido como substância reativa nas plaquetas ativadas por trombina. (JANG, M., et., al., 1997; PACE-ASCIAK, et., al., 1998; ZBIKOWSKA, H. M., et., al., 1998). Há relatos de que o resveratrol atua sobre o câncer em diversas maneiras, uma destas é a inibição da cascata do ácido araquidônico, rota metabólica que pode induzir a gênese de tumores (SUBBARAMAIAH, K., et., al., 1999). Outra via é pela inibição da proteína quinase C (PKC), um mediador chave na promoção dos tumores, ação que poderia explicar o seu efeito quimiopreventivo, pois verificou-se que o resveratrol inibe a autofosforilação de algumas proteínas cinases específicas de um modo dependente da concentração, mas tem efeitos insignificantes contra reações de autofosforilação dos membros representativos das isoenzimas da subfamília da PKC (proteína cinase C) (STEWART, J. R., et. al., 2000). Alguns outros estudos indicam que o resveratrol pode induzir a apoptose, morte programada de células, atuando como um agente antiproliferativo de alguns tipos de tumores, em especial de útero e mama (SCHNEIDER, Y.; et., al., 2000).

A maior parte dos estudos até agora examinaram os efeitos de resveratrol na prevenção de aterosclerose e doença das artérias coronárias. Estudos mostraram que o resveratrol (100 uM) tem ações cardioprotetoras em corações isolados de ratos (RAY, P.S., et al., 1999). Grupos tratados com o resveratrol demonstraram uma diminuição no malonaldeído (MDA) e tamanho do infarto, possivelmente devido a uma diminuição de radicais livres. Estudos anteriores com corações isolados de ratos normotensos sugerem uma capacidade cardioprotetora do resveratrol contra lesão de isquemia-reperusão com tratamento tanto crônico como agudo. O resveratrol, reduziu o tamanho da área afetada com o enfarte, reduzindo a apoptose de cardiomiócitos, e aumentando a recuperação da contractilidade do ventrículo esquerdo (GOH, S. S., et al., 2007).

Outro fator de relevante importância é que estudos anteriores avaliaram a segurança farmacocinética e o metabolismo do resveratrol e relataram que suas doses podem ser bem toleradas em seres humanos, mesmo quando muito elevadas, pois nenhuma evidência de teratogênese foi associada com

este composto (WILLIAMS, L. D., et., al., 2009), o que torna as concentrações utilizadas no nosso estudo eficazes e seguras.

Com base em uma pesquisa usando SciFinder® acessada 18 de julho de 2014, utilizando a estrutura química (CAS 501-36-0), foi observado que existem muitas fontes comerciais e reações disponíveis, para se obter o resveratrol e essas já foram publicadas. Um grande número de patentes foi registrado e está relacionado com os efeitos do mesmo em aplicações terapêuticas, cosméticos e em produtos nutracêuticos (DJOKO B. et., al., 2007). O investimento da indústria nutracêutica tem sido intenso. Muitos suplementos dietéticos contendo resveratrol como um componente único ou em combinação com outros ingredientes estão no mercado (EUN -JUNG P., 2015).

Logo, o fato do resveratrol ser um potente antioxidante de origem natural, com muitas atividades biológicas que contribuem para o bem estar de muitas pessoas que o utilizam, aumenta a busca pelo composto e torna-se motivo para que muitos pesquisadores invistam em projetos que envolvam a avaliação de novas propriedades assim como a descobertas dos mecanismos de ação pelos quais o polifenol age em tais atividades já relatadas ou em outras a serem descobertas.

Outros estudos, ainda a respeito das atividades biológicas e terapêuticas sobre o resveratrol, destacaram a relação sua atividade antioxidante, vasorelaxante e anticancerígena em ovário. Nesses estudos foi observado que o resveratrol atua no fator de crescimento celular que é alvo quimioterápico no tratamento de câncer, retardando o crescimento celular de células cancerígenas PA-1 de ovário humano, além de ativar as caspases 9 e 7 induzindo apoptoses nessas células (LEE, M.H, et., al., 2009; PIROLA L, FROJDO S., 2008; PATEL, K. R., 2008).

Embora o resveratrol tenha muitas atividades citadas na literatura, seus mecanismos de ação e efeitos em útero ainda se apresentam pouco esclarecidos, mesmo diante do fato de relatos da existência de muitas mulheres que sofrem por problemas uterinos, desde a um câncer de colo até as fortes dores, conhecidas como cólicas que na maioria das vezes impedem-as de realizar suas atividades de rotina normalmente. Esse fato impulsiona o

crescimento do estudo e interesse dos pesquisadores em descobrir novas drogas e/ou fármacos que tratem ou aliviem tais desconfortos.

Devido a um grande número de atividades biológicas do resveratrol serem relacionadas ao aparelho reprodutor feminino, como foi citado: câncer de ovário, câncer de mama, reposição hormonal na menopausa, entre outros, torna-se importante investigar a atividade do resveratrol em útero, tanto em condições fisiológicas como em quadros que mimetizam alguma patologia. Assim, posteriormente podemos relacionar as atividades observadas com os possíveis mecanismos de ação descobertos.

Devido a isso, o resveratrol tornou-se uma ferramenta importante no estudo de possíveis efeitos para solucionar e/ou amenizar problemas uterinos.

1.2 MÚSCULO LISO: CANAIS PARA CÁLCIO E CANAIS PARA POTÁSSIO

No músculo liso um aumento na concentração de cálcio citosólico ($[Ca^{2+}]_c$), é a causa primária para contração e também está envolvida na proliferação celular (VAN BREEMEN; SAIDA, 1989). A contração pode ser alcançada quer através da despolarização da membrana (acoplamento eletromecânico), levando ao aumento da $[Ca^{2+}]_c$, proveniente do meio extracelular através dos Ca_v (canais para cálcio dependentes de voltagem), desencadeando o processo de contração muscular ou induzida por um agonista (acoplamento farmaco-mecânico) que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003). Agonistas como ocitocina, carbacol ou histamina se ligam a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata do fosfatidilinositol, através da proteína Gq ou G11 mediando a produção de 1,4,5 trisfosfato de inositol (IP3), que estimulam a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) e diacilglicerol (DAG), responsável pela ativação da proteína cinase C (PKC) que por sua vez pode fosforilar canais para potássio bloqueando-os e levando a uma ativação indireta dos Ca_v (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). O aumento na $[Ca^{2+}]_c$

favorece a ligação do Ca^{2+} com a proteína calmodulina, formando o complexo 4Ca^{2+} -CAM. Este complexo ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) a qual fosforila a cadeia leve da miosina (CLM), promovendo a interação da CLM com os filamentos de actina, desencadeando o processo de contração do músculo liso (WEBB, 2003).

Na busca por substâncias que interfiram na sinalização do Ca^{2+} , o músculo liso, tendo como exemplo a camada muscular lisa do útero, se tornou um grande foco para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem essa investigação (KARAKI et al., 1997).

O cálcio além de sua extrema importância na contração muscular é um importante segundo mensageiro que desempenha um papel necessário a uma grande variedade de processos biológicos, incluindo a regulação enzimática, expressão gênica, tráfego de proteína, proliferação celular, apoptose, e a coordenação do acoplamento excitação-contração do músculo (CARAFOLI, 2002). Em geral, existem duas fontes deste íon sinalizador na célula: uma extracelular que permite o influxo de Ca^{2+} para o citoplasma, através dos canais na membrana plasmática, e outra intracelular representada pelos estoques internos, principalmente o retículo sarcoplasmático (RS) que liberam Ca^{2+} para o citosol (PAN; MA, 2003).

Os mecanismos que levam a uma resposta contrátil através do acoplamento eletromecânico são devido a uma despolarização de membrana diretamente pelo aumento da concentração externa de K^+ ($[\text{K}^+]_e$) ou indiretamente pela ligação dos agonistas de acoplamento misto aos seus receptores levando à abertura de Ca_v , causando influxo de Ca^{2+} no citoplasma e, conseqüentemente, a contração (REMBOLD, 1996). Já os mecanismos fármaco-mecânicos da contração incluem (1) aumento de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG) por ligação do agonista com o receptor ativando a proteína Gq/11 fosfolipase C (PLC). O IP3 liga-se ao seu receptor permitindo a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares presentes no retículo sarcoplasmático (RS) que favorecerá a formação do complexo 4Ca^{2+} – CaM disparando o início do mecanismo contrátil (GARRET; GRISHAM, 1995); (2) aumento do influxo de Ca^{2+} através da abertura do canal de Ca^{2+} tipo 1 por um mecanismo que não envolve mudança no potencial de membrana; (3) liberação do Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} através de receptores de rianodina

(sensíveis à cafeína) presentes na membrana do R.S. (KOMORI et al., 1995) e (4) aumento do Ca^{2+} por ativação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ reverso (BLAUSTEIN, 1989).

Os mecanismos de relaxamento podem incluir: (1) hiperpolarização, (2) aumento na atividade da Ca^{2+} – ATPase (bomba de Ca^{2+}), tanto do R.S. como da membrana plasmática, através da fosforilação pela PKG, levando a um aumento do sequestro e da extrusão de Ca^{2+} , respectivamente, diminuindo assim a $[\text{Ca}^{2+}]_c$; (3) diminuição da formação do IP_3 e conseqüente diminuição da liberação de Ca^{2+} dos estoques como o RS; (3) redução da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ via AMPc/PKA (monofosfato de adenosina cíclico / proteína cinase A) por diminuir o influxo de Ca^{2+} indiretamente, por hiperpolarização, ou por agir diretamente nos Ca_v do tipo 1 inativando-os e finalmente (4) diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ por ativação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (BLAUSTEIN, 1989).

Os canais para cálcio e para potássio estão intimamente relacionados com a regulação do músculo liso (WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005). A principal porta de entrada para o Ca^{2+} que vem do meio extracelular são os Ca_v (CATTERALL, 2000), os quais estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). A entrada de cálcio em músculo liso visceral é controlada pelo potencial de membrana, uma vez que este determina a abertura de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (SHMIGOL; EISNER; WRAY, 1998; WRAY et al., 2001).

Pelo menos 10 tipos diferentes de Ca_v subdivididos em três grandes famílias já foram descritos: (1) sensíveis a di-hidropiridina e ativados por alta voltagem (Ca_v1); (2) insensíveis a di-hidropiridina e ativados por alta voltagem, (Ca_v2); e (3) ativados por baixa voltagem (Ca_v3), (ERTEL et al., 2000; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007).

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 para 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 da condutância ao íon K^+ , levando a uma hiperpolarização, e a diminuição da condutância ao K^+ , levando a uma despolarização (KNOT et al., 1996).

Os ativadores de canais para K^+ são substâncias que incluem um grupo de diversas moléculas com um largo potencial terapêutico (QUEST, 1992; EMPFIELD; RUSSELL; TRAINOR, 1995). Estes compostos abrem os canais para K^+ , causando hiperpolarização de membrana através do aumento do efluxo de K^+ , diminuição o influxo de Ca^{2+} e conseqüente diminuição do Ca^{2+} intracelular livre culminando assim no relaxamento muscular (QUEST; COOK, 1989; WESTON; EDWARDS, 1992).

No músculo liso, o tônus basal pode ser regulado por vários subtipos de canais para K^+ , entre eles: canais para K^+ dependentes de voltagem (K_v); canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de larga condutância (BK_{Ca}); canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de pequena condutância (SK_{Ca}); canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), entre outros (THORNELOE; NELSON, 2005).

A repolarização ou hiperpolarização de membrana na musculatura lisa uterina, ocorre devido, principalmente, a ativação dos BK_{Ca} , que são ativados quando a $[Ca^{2+}]_c$ se eleva e a ativação dos K_v , em decorrência à despolarização de membrana (LEDOUX et al., 2006). Tal ativação leva a uma redução no influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v por sua inibição e, conseqüentemente, a uma redução da $[Ca^{2+}]_c$ (LEDOUX et al., 2006; LIN et al., 2006).

1.3 ÚTERO: FISILOGIA E HIPÓXIA

O útero é um órgão oco, revestido de musculatura lisa bem diferenciada, possuindo três camadas: endométrio, miométrio (camada muscular lisa espessa) e serosa (camada externa), ainda em relação ao útero, tem havido um progresso notável para o entendimento da fisiologia e fisiopatologia do útero, o que resultou em muitas intervenções importantes que afetam a concepção e contracepção, bem como a função menstrual. Embora haja crescente conscientização da importância potencial da função anormal da camada muscular do útero (miométrio), há relativamente poucos esclarecimentos sobre o papel do miométrio em doenças mais frequentes da reprodução (AGUILLAR; MITCHELL, 2010). O miométrio é de vital importância em processos fisiológicos como implantação do embrião e na manifestação de distúrbios como dismenorreia, assim como em processos como aborto espontâneo e pré-eclâmpsia, processos que podem ocorrer por um descontrole das contrações uterinas (AGUILLAR; MITCHELL, 2010). Contrações exageradas culminam na dor, promovem a redução do fluxo vascular uterino, causando isquemia e hipóxia, aumentando ainda mais o quadro doloroso (BORTOLETO, 1995).

Existem relatos na literatura que o fluxo sanguíneo normal em útero de ovelha grávida é intimamente relevante durante uma contração e depende do seu bom funcionamento (GREISS, F. C., 1965), só depois de algum tempo este fato foi confirmado e estendido para útero humano através de técnicas como *laser doppler*. Fortes contrações uterinas assim como contrações fracas demais, tornam praticamente impossível a drenagem venosa e o fluxo arterial, ou seja, qualquer descontrole no tocante à maquinaria que coordena os processos de contração e relaxamento da musculatura lisa uterina, pode acarretar desconfortos e/ou processos patológicos. Com esse descontrole por parte das contrações, o próprio útero oclui o seu fornecimento de sangue, o qual é veículo importante para o transporte de oxigênio e nutrientes para o tecido. Um descontrole nas contrações uterinas pode acarretar muitos danos morfofisiológicos ao tecido em questão e esse descontrole ocorre nos casos de

abortos induzidos ou espontâneos, trabalho de parto, dismenorreia entre outros (DAWSON, M. J. & S. WRAY, 1985).

Dentre muitas causas, a hipóxia pode ser considerada um grande motivo para os descontroles contráteis uterinos culminando em dor e possível agravamento do quadro com problemas futuros. E para entendermos como isso ocorre, faz-se necessária uma revisão sobre os efeitos moleculares causados pela hipóxia no útero.

É descrito na literatura que a fosforilação oxidativa é a maior fonte na obtenção de adenosina tri fosfato (ATP), músculos lisos, os quais não possuem grande reserva de fosfato e desta forma o útero não seria uma exceção (Dawson, M. J., 1985). Isso torna o útero um dos órgãos mais vulneráveis à hipóxia.

A capacidade contrátil uterina é drasticamente diminuída em baixos níveis de oxigênio e esse efeito é observado tanto em útero de roedores quanto em útero humano, ambos possuem o mesmo mecanismo de depressão contrátil mediante à hipóxia, tornando assim os protocolos usados em modelos de laboratório viáveis para execução em estudos com seres humanos (Wray, S., 1993). É sabido também que o útero gravídico é mais resistente à hipóxia que o útero não gravídico, provavelmente pelo fato do primeiro ter uma maior concentração de ATP e estoques de glicogênio (WYNN, R., 1977) junto com um melhor funcionamento da lactato desidrogenase (LDH) em manter constantes os níveis de ATP, o que é mais predominante em úteros gravídicos.

Uma das funções dos canais para K^+ nas células uterinas em especial, é a manutenção do potencial de repouso negativo ($E_m -45$ mV), por meio do efluxo do íon K^+ . Esta característica é importante para as células excitáveis, pois, suas funções são dependentes e podem ser alteradas por mudanças no potencial de membrana, este fato torna o estudo sobre os K_{ATPs} no processo de hipóxia uterina extremamente importante (NELSON; QUAYLE, 1990).

Elevações no potencial de membrana podem levar a uma despolarização, onde a carga perimembranar passa para valores positivos. Este evento ocorrendo numa célula muscular lisa comum, culmina no aumento da concentração intracelular do íon cálcio ($[Ca^{2+}]_c$), devido à abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem. É esse aumento na $[Ca^{2+}]_c$ que promove uma sinalização intracelular que leva à vasoconstrição. Por sua vez, a

abertura dos canais para K^+ levam a uma hiperpolarização, fechamento dos canais para Ca^{2+} e vasorrelaxamento (NELSON; QUAYLE, 1990).

A hipóxia no útero afeta profundamente as contrações uterinas, deixando-as bastante reduzidas ou até mesmo abolidas. Isso pode ter implicações clínicas, isto é, com contrações demasiadamente fracas tornar-se ineficiente o trabalho de parto e funcionamento de condições normais no período menstrual, por exemplo. Este é um das definições de distócia uterina em trabalho de parto, onde, por causa do fracasso do útero a se contrair adequadamente, o trabalho torna-se prolongado ou até mesmo cessa e torna-se necessária uma cesariana de emergência. A variação brusca no pH, tornando o meio ácido também é característica da hipóxia uterina, fator este que culmina na perda da força contrátil e sensibilidade do miométrio (Wray. S., 1993).

Estudar e entender os mecanismos pelos quais a hipóxia produz esses efeitos no útero é um passo importante para a produção de medicamentos potentes e eficazes para o tratamento de muitas doenças e quadros dolorosos que acometem mulheres em todo o mundo. Estudos que avaliam o comportamento uterino e buscam drogas que possuam efeito regenerativo e/ou protetor contra a hipóxia são de grande valor, visto que o efeitos causados pela mesma no útero acontecem e podem ser observados em estudos *in vitro* relacionando diferentes tipos de problemas que são ocasionados por, por exemplo, desconroles hormonais que por sua vez possuem efeitos a longo prazo (DART, C. & STANDEN, N. B.1995)

Pesquisadores relataram que o desequilíbrio de íons como Ca^{2+} e H^+ e metabólitos como ATP e fosfato é frequentemente observado em quadro de hipóxia uterina, o que confirma que a brusca acidificação do meio devida a queda no pH, não é a única causa da perda de força contrátil, pois estudos nos quais o pH era mantido com tampões, na presença da hipóxia as contrações continuavam fracas (Wray, S., 1990). No tocante à relação entre hipóxia vs mecanismo de contração no músculo liso, sabe-se que a calmodulina não mostrou-se afetada em meios com hipóxia, no entanto é observada uma diminuição da desfosforilação pelas fosfatases na cadeia leve da miosina (KHAN, R. N, et al., 1993).

A hipóxia pode causar uma redução de ATP intracelular ou elevação no ADP intracelular levando a vasodilatação da musculatura lisa, efeito que foi inibido por glibenclamida, bloqueador seletivo para K_{ATP} nas artérias cerebrais, coronarianas, renais e músculo esquelético. Estas observações sugerem um papel fundamental de canais K_{ATP} na vasodilatação observada durante o processo da hipóxia (TAGUCHI, H., et., al., 1994; LOUTZENHISER, R. D. & PARKER, M. J., 1994), mas ainda não há relatos sobre a participação desses canais em hipóxia uterina, fato que impulsiona e sustenta a hipótese do estudo atual sobre os efeitos do resveratrol em útero sob normóxia e hipóxia.

Os canais para K^+ incluem: (I) canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de alta condutância (BK_{Ca}); (II) canais para K^+ sensíveis ao ATP; (III) canais para K^+ sensíveis a voltagem (K_v); (IV) canais para potássio retificadores de entrada (K_{ir}) e (V) canais para potássio com domínio de dois poros (K_2P). Contudo, tem sido estabelecido que os três primeiros participam majoritariamente no processo de relaxamento de músculos lisos (NELSON; QUAYLE, 1995; JACKSON, 2005), fato que evidencia a importância de estudos que tenham foco na análise da participação dos canais para potássio em efeitos relaxantes e/ou contráteis na musculatura lisa uterina.

Objetivos

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar os efeitos do resveratrol em útero isolado de camundongos tanto em normóxia como em modelos de hipóxia.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em normóxia:

- Avaliar o possível efeito relaxante do resveratrol frente às contrações fásicas e espontâneas em útero isolado de camundongos;
- Investigar o mecanismo de ação tocolítica do resveratrol em útero isolado de camundongo em normais condições de oxigenação, observando seu efeito no tônus, frequência e amplitude das contrações uterinas fásicas;
- Caracterizar o antagonismo da contração induzida por ocitocina de maneira cumulativa na presença e na ausência do resveratrol;
- Avaliar o efeito do resveratrol sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina;
- Observar os efeitos do resveratrol no tocante à tônus, frequência e amplitude das contrações uterinas induzidas por ocitocina;

Sob hipóxia:

- Avaliar o efeito regenerativo do resveratrol em útero isolado de camundongos;
- Avaliar o efeito protetor do resveratrol em útero isolado de camundongo;
- Realizar uma comparação entre os efeitos uterinos do resveratrol e tempol em modelos uterinos;
- Avaliar a participação dos canais de potássio no mecanismo de ação do efeito regenerativo do resveratrol em úteros;
- Avaliar a participação dos canais de cálcio no mecanismo de ação do efeito regenerativo do resveratrol em útero;
- Avaliar a participação dos K_{ATP_s} no mecanismo de ação do efeito regenerativo do resveratrol em úteros sob hipóxia.

Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Os protocolos experimentais foram realizados utilizando camundongos *Swiss* fêmeas pesando entre 30 e 40g, todas procedentes da Universidade de Newcastle (Austrália) (n = 6).

Antes dos experimentos os animais foram mantidos sob rigoroso sistema de controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo pellets (Purina) com livre acesso a água, com ventilação e temperatura (21°C) controladas e constantes, submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 h sendo o período claro das 06h00 às 18h00.

Todos os animais foram eutanasiados seguindo os princípios de cuidados com animais aprovados pelo comitê (University of Newcastle Animal Care and Ethics Committee), com certidão de número: A-2009-153 (ANEXO I).

3.2 DROGAS E REAGENTES

O bicarbonato de sódio (NaHCO₃), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl₂), cloreto de sódio (NaCl), fosfato de magnésio (MgSO₄) e glicose foram obtidos da Merck & Co, Inc. (Whitehouse Station, NJ, EUA), cloreto de tetraetilamônio (TEA⁺), glibenclamida,, nifedipino, o sulfóxido de dimetileno (DMSO), a ocitocina e o resveratrol (dissolvido em DMSO) foram obtidos da Sigma Aldrich.

O Tempol (Sigma Aldrich) foi dissolvido em água destilada para formar uma concentração final de 100 µM.

Uma análise de controle do veículo utilizado (DMSO) foi realizada para descartar uma possível atividade relaxante e/ou contrátil

3.3 SOLUÇÕES NUTRITIVAS

Foi utilizada solução nutritiva de Krebs, aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). O pH era ajustado para valores entre 7,2 - 7,4 com solução de HCl ou NaOH (1N) e mantida a temperatura constante de 37 ± 1°C. A composição desta solução está descrita no quadro 1.

Tabela 1- Composição da solução de Krebs

Substância	Concentração (mM)
NaCl	118,0
KCl	4,60
CaCl ₂	2,50
MgSO ₄	5,70
Glicose	11,00
NaHCO ₃	25,00

3.4 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DA SUBSTÂNCIA EM ESTUDO

Resveratrol foi solubilizado em DMSO e diluído em água destilada para obtenção da solução estoque (1M) a qual era estocada em “freezer” a uma temperatura de -20°C, sendo novamente diluída em água destilada de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. A concentração final de DMSO nas cubas nunca excedera 0,01% (v/v). Nesta concentração o DMSO é desprovido de efeito contrátil ou relaxante significativo no órgão estudado, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores realizados, nos quais foi observado que o DMSO não possui efeito relaxante em útero isolado de camundongo (100µM).

3.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para aferir as mudanças na contratilidade do tecido, o mesmo foi suspenso verticalmente a um transdutor de força isométrica (Relva FT.03 ADInstruments) sob tensão de 0,5 g num período de estabilização de 45 minutos em todos os protocolos. O índice da função contrátil avaliada foi considerada em força (em gramas). Antes do estudo, as normas foram estabelecidas para eliminar o tecido que não conseguisse gerar, pelo menos, 0,2 g de força desenvolvida durante o período de equilíbrio inicial. As respostas foram registradas em um sistema de aquisição de dados PowerLab (ADInstruments) e Software Gráfico.

Estudos de base foram realizados para selecionar a duração do tempo de hipóxia, seguindo tensões desenvolvidas após 5, 30 ou 60 min de hipóxia. Após 60 minutos de hipóxia, um grande número de preparações tornaram-se inviáveis. Desta forma 30 min (minutos) foi escolhido como tempo de hipóxia a ser testado no estudo, pois neste tempo o tecido uterino se manteve viável em relação a tônus, frequência e amplitude das contrações. As concentrações do resveratrol e tempol foram escolhidas com base em curvas de dose resposta e

literatura anterior (NOVAKOVIC, R., 2013). Esses dois fármacos foram utilizados em 100 μ M como concentração máxima.

3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.6.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO EM NORMÓXIA.

3.6.1.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL NO TÔNUS, NA AMPLITUDE E NA FREQUÊNCIA DAS CONTRAÇÕES UTERINAS FÁSICAS E ESPONTÂNEAS.

Os camundongos fêmeas foram tratadas 24h antes do início dos experimentos com dietilestilbestrol (1 mg/kg s.c.) para indução do estro e um dia após essa informação foi confirmada por análise de um esfregaço vaginal (VILELA, M. G., et. al., 2007). Decorrido este tempo, os animais foram eutanasiados. Após abertura da cavidade abdominal, era feita a dissecação do útero, colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs a 37°C. Em seguida, os dois cornos uterinos foram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de vidro (5 mL). Para estabilização da preparação, esta foi mantida em repouso por 45 minutos antes do contato com qualquer agente, sob tensão de repouso de 0,5g, efetuando, neste período, a renovação da solução nutritiva a cada 15 minutos.

Sendo o útero um órgão de contração bifásica e que possui contrações involuntárias, tornou-se de grande importância a avaliação do possível efeito relaxante do resveratrol tanto em contrações fásicas espontâneas como em contrações induzidas por agente contrátil.

Nos experimentos que tinham como objetivo a avaliação do efeito do resveratrol frente à contrações fásicas espontâneas e/ou sobre o tônus induzido, após o período de estabilização, o resveratrol era adicionado às cubas de maneira cumulativa sobre o tônus sustentado e o efeito relaxante era observado, considerando os seguintes aspectos: tônus, amplitude e frequência das contrações uterinas. Todos foram calculados considerando-se os últimos

10 minutos de efeito e fazendo-se uma média com as contrações selecionadas nesse determinado tempo.

Os valores de CE_{50} (Concentração da substância em estudo que produz 50% do seu efeito máximo) foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença de resveratrol.

Os dados de relaxamento produzido pelo resveratrol em útero isolado de camundongo referentes à tônus, amplitude e frequência, foram calculados estatisticamente da mesma maneira.

3.6.2 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES PARA OCITOCINA NO MECANISMO DE AÇÃO TOCOLÍTICO DE RESVERATROL.

3.6.2.1 ANTAGONISMO DA CONTRAÇÃO INDUZIDA POR OCITOCINA.

O útero foi montado como descrito no item 3.6.1.1. Após o período de estabilização, duas curvas concentrações-resposta cumulativas similares à ocitocina (10^{-11} – 10^{-5} M) foram obtidas. Em seguida, na ausência da ocitocina, o resveratrol era incubado por 15 minutos em diferentes concentrações (3,10 e $30\mu\text{M}$) e em experimentos diferentes e independentes. Após este período, ainda na presença do resveratrol, uma nova curva concentração-resposta cumulativa à ocitocina era obtida. Os resultados foram avaliados comparando-se a porcentagem da resposta contrátil na presença do resveratrol com aquela obtida pela amplitude média das curvas controle na ausência do mesmo (controle).

O tipo de antagonismo exercido pelo resveratrol foi analisado com base nos valores da inclinação do gráfico de Schild (ARUNLAKSHANA; SCHILD, 1959) e sua potência pelo valor de CE_{50} (VAN ROSSUM, 1963)

3.6.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL NO TÔNUS, AMPLITUDE E FREQUÊNCIA SOBRE AS CONTRAÇÕES UTERINAS INDUZIDAS POR OCITOCINA.

O útero foi montado como descrito no item 3.6.1.1. Após o período de estabilização, foram obtidas duas curvas concentrações-resposta simples de amplitude similares induzidas por ocitocina, de amplitudes similares (Controle), em preparações diferentes, registrada através de transdutores isométricos acoplados a um sistema de aquisição digital.

Durante a fase tônica sustentada da segunda resposta, o resveratrol foi adicionado cumulativamente à cuba sobre o tônus induzido e sustentado e os seguintes fatores: tônus, amplitude e frequência foram observados e calculados posteriormente.

O relaxamento produzido por resveratrol foi expresso como a porcentagem reversa da contração inicial produzida pelo agente contrátil utilizado.

A CE_{50} foi obtida a partir dos valores das médias (calculadas pelo uso da regressão não linear de cada curva concentração-resposta de relaxamento para resveratrol de cada um dos experimentos).

3.6.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB HIPÓXIA

3.6.4.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO REGENERATIVO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB HIPÓXIA

O útero foi montado como descrito no item 3.6.1.1. Após o período de estabilização de 45 minutos sob uma tensão de repouso de 0,5g e após verificar se as contrações uterinas espontâneas estavam estáveis e viáveis, era feita a troca dos gases utilizados durante o experimento com o objetivo de expor o tecido em questão à hipoxia.

A mistura carbogênica foi fechada e logo após foi acionado um dispositivo de gás nas cubas composto por N₂ e CO₂ (95% e 5%, respectivamente). O tecido permaneceu exposto a estas condições citadas por 30 minutos. Após 30 minutos de exposição à lesões causadas pela hipóxia, o resveratrol era adicionado às cubas na concentração de 100µM e o efeito era observado e calculado posteriormente.

O efeito produzido pelo resveratrol no tônus uterino foi calculado e expresso o valor da CE₅₀ que foi obtida a partir dos valores das médias (calculadas pelo uso da regressão não linear de cada curva concentração-resposta de relaxamento para resveratrol).

3.6.4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB HIPÓXIA

O útero foi montado como descrito no item 3.6.1.1. Após o período de estabilização de 45 minutos sob uma tensão de repouso de 0,5g e após verificar se as contrações uterinas espontâneas estavam estáveis o resveratrol era incubado por 15 minutos, em seguida era feita a troca dos gases utilizados durante o experimento com o objetivo de expor o tecido em questão à hipóxia na presença do polifenol. A mistura carbogênica era fechada e logo após era acionado um dispositivo de gás nas cubas composto por N₂ e CO₂ (95%, 5%, respectivamente). O tecido permaneceu exposto a estas condições citadas por 30 minutos.

O efeito protetor do resveratrol no útero foi calculado de acordo com a comparação do tempo de resistência do útero à queda brusca de tônus observado na exposição do tecido à hipóxia. Foi realizada a comparação estatística entre o tempo que o útero leva para entrar em falha durante a hipóxia na presença e na ausência do resveratrol e esses dados foram expresso como valor da CE₅₀ que foi obtida a partir dos valores das médias.

3.6.5 COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DO TEMPOL E RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB HIPÓXIA

O útero era montado como descrito no item 3.6.1.1. Após o período de estabilização de 45 minutos sob uma tensão de repouso de 0,5g e após verificar se as contrações uterinas espontâneas estavam estáveis era feita a troca dos gases utilizados durante o experimento com o objetivo de expor o tecido em questão à hipoxia. A mistura carbogênica era fechada e logo após era acionado um dispositivo de gás nas cubas composto por N₂ e CO₂ (95%, 5%, respectivamente). O tecido permaneceu exposto a estas condições citadas por 30 minutos.

Após 30 minutos de exposição a lesões causadas pela hipóxia, o tempol ou resveratrol (100µM) foram adicionados às cubas na concentração em diferentes experimentos e os possíveis efeitos regenerativos obtidos foram observados, calculados e comparados posteriormente. Foi realizada a comparação estatística entre CE₅₀ correspondentes à média de efeito do tempol e resveratrol.

3.6.6. AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO NO MECANISMO DE AÇÃO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO SOB HIPÓXIA.

O útero foi montado como descrito no item 3.6.1.1. Após o período de estabilização de 45 minutos sob uma tensão de repouso de 0,5g e após verificar se as contrações uterinas espontâneas estavam estáveis foi feita a troca dos gases utilizados durante o experimento com o objetivo de expor o tecido em questão à hipóxia com uma mistura de gases nas cubas composto por N₂ e CO₂ (95%, 5%, respectivamente) e após 15 minutos o TEA⁺ (10mM), que nesta concentração é um bloqueador não seletivo para os canais de potássio, foi adicionado. O tecido permaneceu exposto a estas condições

citadas por 30 minutos. Em seguida o resveratrol (100 μ M) foi adicionado à cuba na presença do TEA⁺ e o efeito foi observado (LATORRE et al., 1989).

O efeito observado foi expresso com os valores de CE₅₀ e foram calculados a partir dos experimentos, na ausência e na presença de 10 mM de TEA⁺.

3.6.7 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA CÁLCIO NO MECANISMO DE AÇÃO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO SOB HIPÓXIA.

O útero foi montado como descrito no item 3.6.1.1. Após o período de estabilização de 45 minutos sob uma tensão de repouso de 0,5g e após verificar se as contrações uterinas espontâneas estavam estáveis foi feita a troca dos gases utilizados durante o experimento com o objetivo de expor o tecido em questão à hipóxia com uma mistura de gases nas cubas composto por N₂ e CO₂ (95%, 5%, respectivamente) e após 15 minutos nifedipino (1 μ M), um bloqueador para os canais de cálcio foi adicionado. O tecido permaneceu exposto a estas condições citadas por 30 minutos. Em seguida o resveratrol (100 μ M) foi adicionado à cuba na presença do nifedipino e o efeito foi observado (LATORRE et al., 1989).

O efeito observado foi expresso com os valores de CE₅₀ e foram calculados a partir dos experimentos, na ausência e na presença de 10 mM de nifedipino.

3.6.8 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS K_{ATP}s, SUBTIPOS DE CANAIS PARA POTÁSSIO NO MECANISMO DE AÇÃO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO SOB HIPÓXIA

O útero foi montado como descrito no item 3.6.1.1. O tecido permanecia em repouso por 45 minutos em contato com a solução de Krebs. Após este período foi induzida hipóxia e após 15 minutos de exposição, o bloqueador

glibenclamida, foi incubado pelo período de 15 minutos, totalizando assim 30 minutos de exposição do tecido à hipóxia na presença do bloqueador seletivo para os canais de potássio sensíveis ao ATP. Dessa forma, foi adicionado à cuba 3×10^{-5} M de glibenclamida, um bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (HUGHEST; HOLLINGSWORTH, 1997), por 15 minutos. Após esse tempo, resveratrol (100 mM) era adicionado e o efeito era observado na presença dos bloqueadores. O efeito produzido pelo resveratrol foi expresso como a CE_{50} e comparado com o efeito observado na ausência do bloqueador. Foi observado também que o efeito regenerativo do polifenol após a lavagem do tecido, com o objetivo de eliminar o efeito do bloqueador e confirmar a viabilidade do tecido, mostrando apenas a possível influência do bloqueador no efeito do resveratrol em útero isolado de camundongo em modelo de hipóxia.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando o $p < 0,05$. As comparações estatísticas entre duas variáveis foram realizadas por meio da utilização do teste t de Student não pareado e ANOVA oneway.

Nas curvas concentração-resposta, os valores de $E_{m\acute{a}x}$ (efeito máximo em porcentagem de relaxamento) e de CE_{50} (concentração responsável por 50% do $E_{m\acute{a}x}$) foram obtidas por regressão não linear.

Os dados foram analisados e plotados no programa estatístico GraphPad Prism 6.0[®].

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO TOCOLÍTICA DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB NORMÓXIA

4.1.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL NO TÔNUS, AMPLITUDE E FREQUÊNCIA DAS CONTRAÇÕES UTERINAS ESPONTÂNEAS

Resveratrol, nas concentrações de 1, 3, 10, 30 e 100 μM , relaxou o útero isolado de camundongos (Figura 2) bem como diminuiu a amplitude e frequência das contrações uterinas de maneira significativa e dependente de concentração (Figura 3A, 3B e 3C). Os valores de CE_{50} nos experimentos nos quais foi observado tônus, amplitude e frequência, foram $10,34 \pm 0,91$; $11,11 \pm 0,90$ e $6,85 \pm 0,90$ respectivamente ($n = 6$).

Resveratrol mostrou-se mais potente em diminuir a frequência uterina quando comparado aos efeitos no tônus e amplitude (Figura 3).

A responsividade do útero ao resveratrol foi restaurada 15 minutos após a retirada do mesmo da cuba indicando que o efeito do polifenol é reversível neste órgão e comprovando a não toxicidade do mesmo neste órgão.

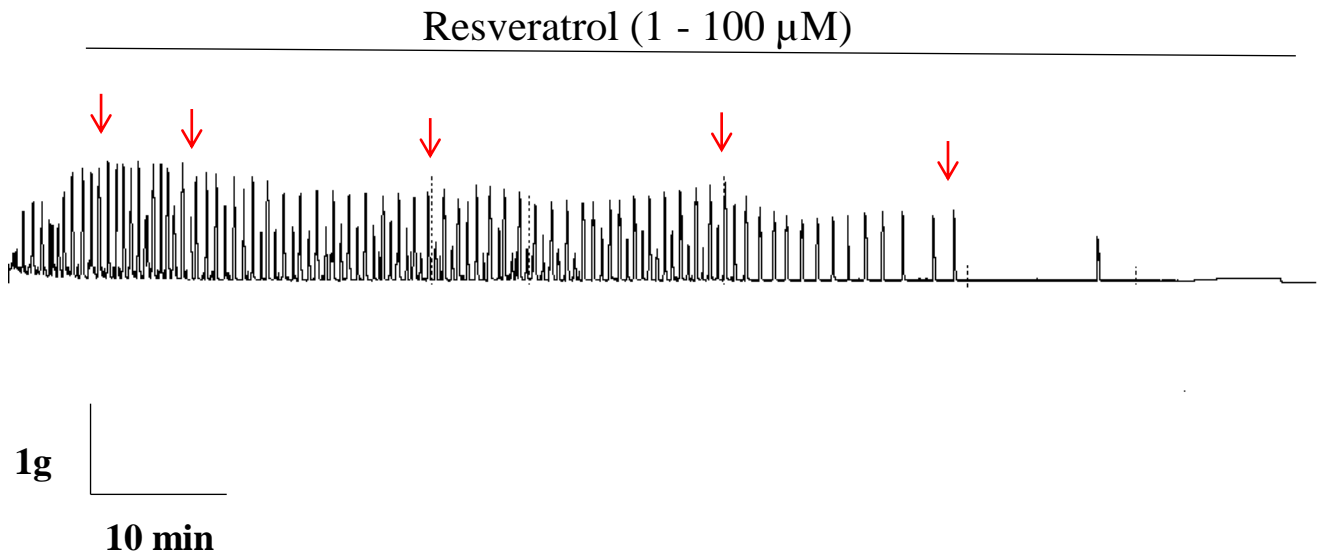
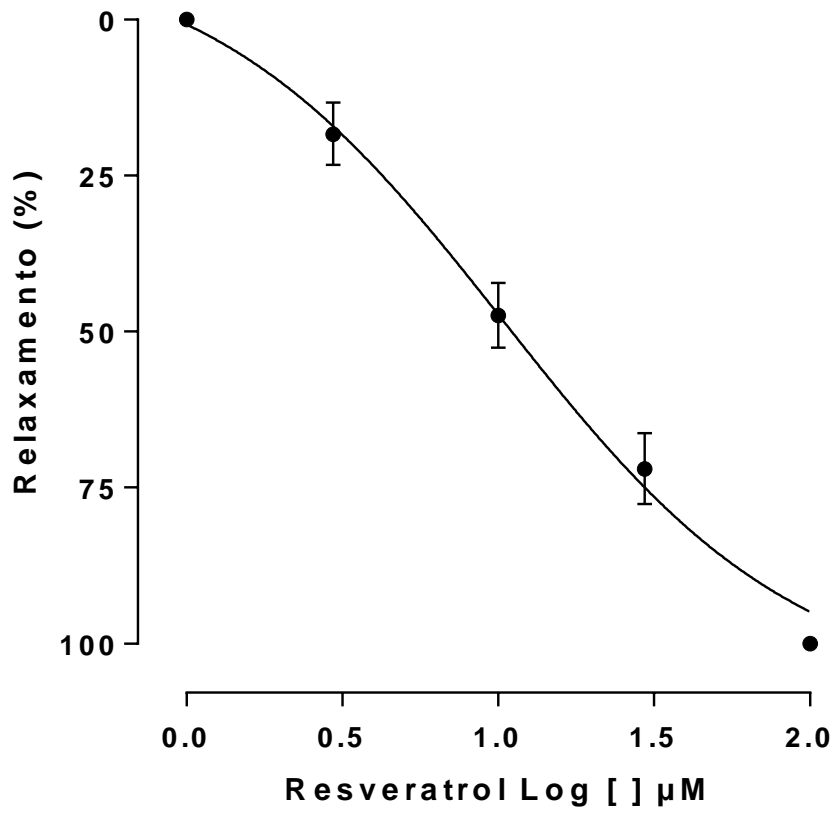
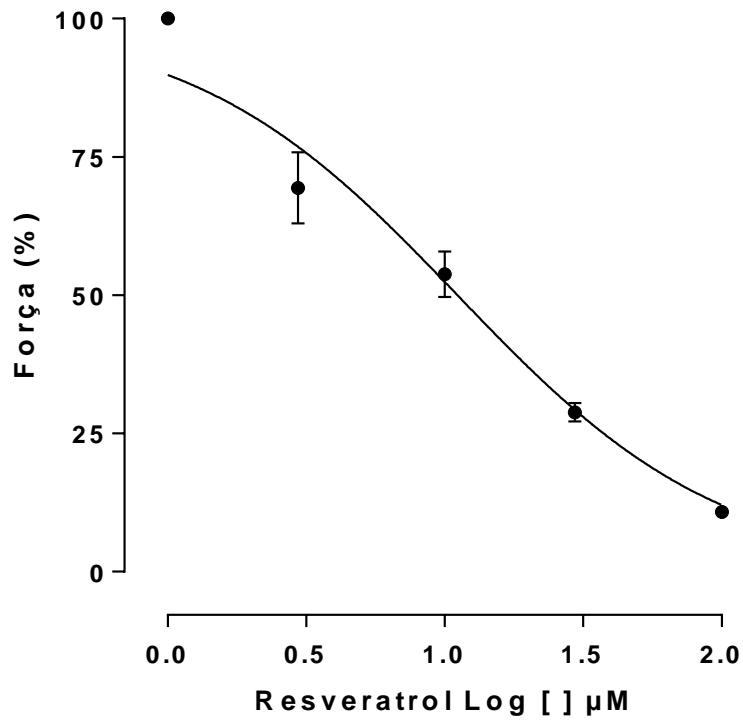


Figura 2: Registro representativo do efeito do resveratrol nas contrações fásicas espontâneas. As setas para baixo representam a adição cumulativa das concentrações (1-100 μ M) do resveratrol

3A



3B



3C

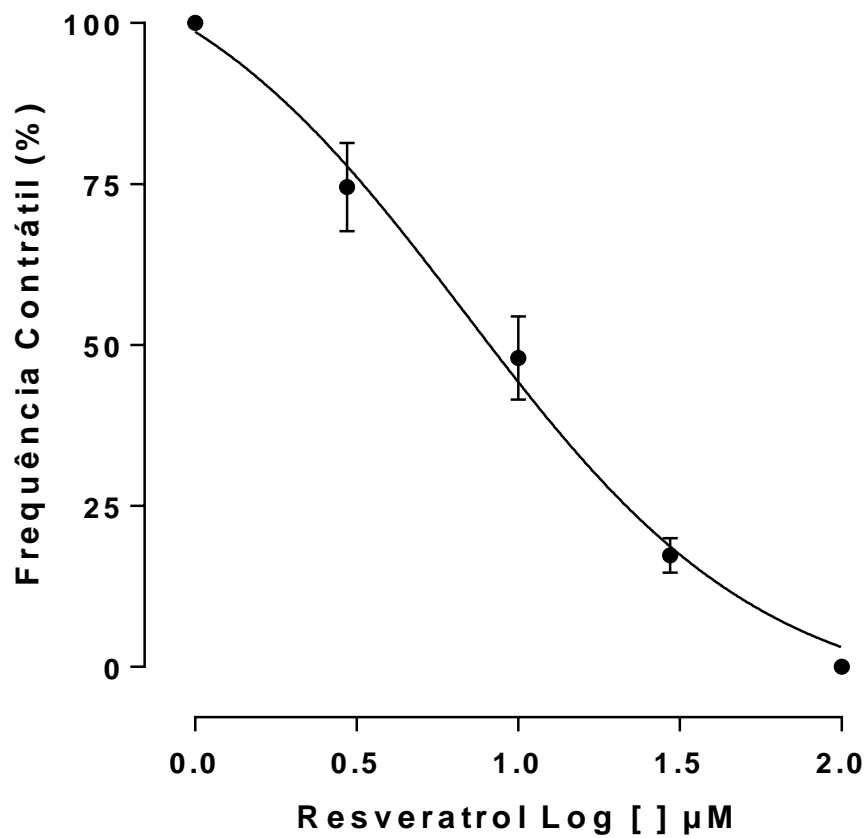


Figura 3: Curva concentração-resposta ao resveratrol. Efeito sobre o tônus (A), amplitude (B) e frequência (C) das contrações uterinas espontâneas (n = 6).

4.1.2 ANTAGONISMO DA CONTRAÇÃO INDUZIDA POR OCITOCINA

Resveratrol, testado nas concentrações de 3, 10 e 30 μM , inibiu de maneira dependente de concentração ($r^2 = 0,96 \pm 0,006$) as contrações cumulativas induzidas por ocitocina em útero isolado de camundongos *swiss* (Figura 4).

As curvas cumulativas para ocitocina foram desviadas para a direita de maneira não paralela e com redução do efeito máximo (E_{max}) (Figura 5).

Os valores de E_{max} (controle = 100.0 %; 3 μM = $79,98 \pm 0,01$ %; 10 μM = $43,81 \pm 0,2$ %; 30 μM = $28,34 \pm 0,9$ %) ($n = 6$), diminuíram de maneira significativa (Tabela 1). O antagonismo foi do tipo não competitivo com diminuição nos valores de CE_{50} e confirmado pelo valor de “slope” que diferiu significativamente da unidade (Figura 5).

A potência do resveratrol em antagonizar as contrações cumulativas induzidas por ocitocina foi determinada pelo valor de CE_{50} e a eficácia pelos valores de E_{max} .

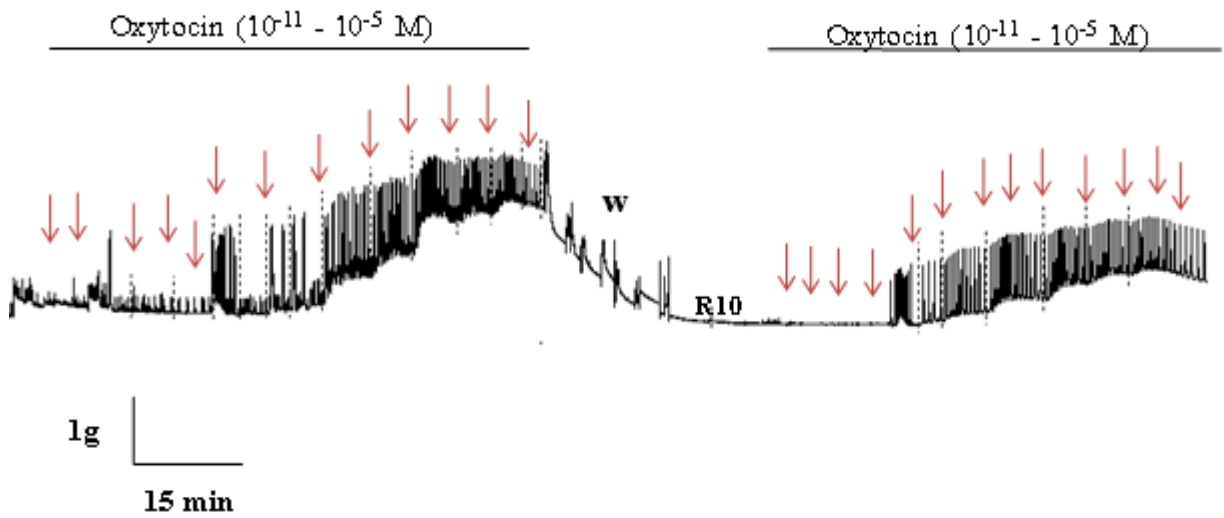


Figura 4: Registro representativo das contrações induzidas por concentrações cumulativas de ocitocina ($10^{-11} - 10^{-5}$ M) na ausência e na presença do resveratrol.

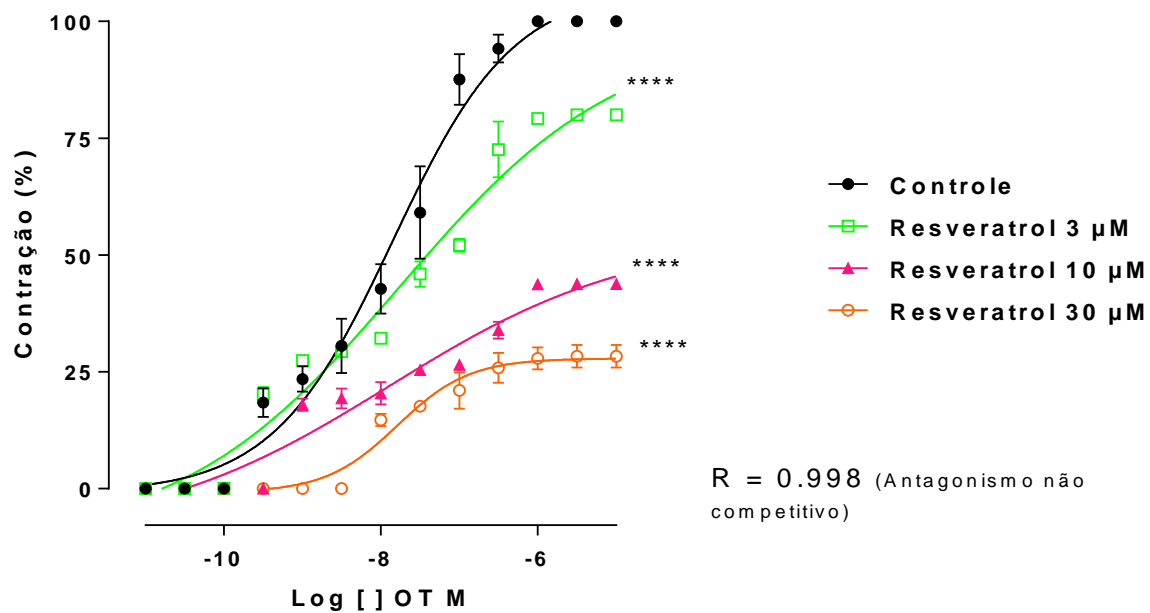


Figura 5: Curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina na ausência (●) e na presença do resveratrol nas concentrações de 3 μM (□), 10 μM (▲) e 30 μM (○) em útero isolado de camundongos ($n = 6$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way” seguido por Bonferroni, **** $p < 0,0001$ (controle vs. resveratrol).

4.1.3 EFEITO DO RESVERATROL SOBRE AS CONTRAÇÕES TÔNICAS INDUZIDAS POR OCITOCINA.

Resveratrol (1 – 130 μM) relaxou de maneira significativa e dependente de concentração o útero pré-contraído por ocitocina ($\text{CE}_{50} = 15,38 \pm 0,66$) (Figura 6). Ademais, o resveratrol apresentou efeito significativo para tônus, amplitude e frequência ($n = 6$) (Figura 7A, 7B e 7C respectivamente). No entanto, resveratrol mostrou-se cerca aproximadamente 8 vezes mais potente em diminuir a frequência das contrações uterinas ($\text{CE}_{50} = 5,72 \pm 1,92$) quando comparado com o seu efeito sob a amplitude das mesmas ($\text{CE}_{50} = 46,14 \pm 1,13$).

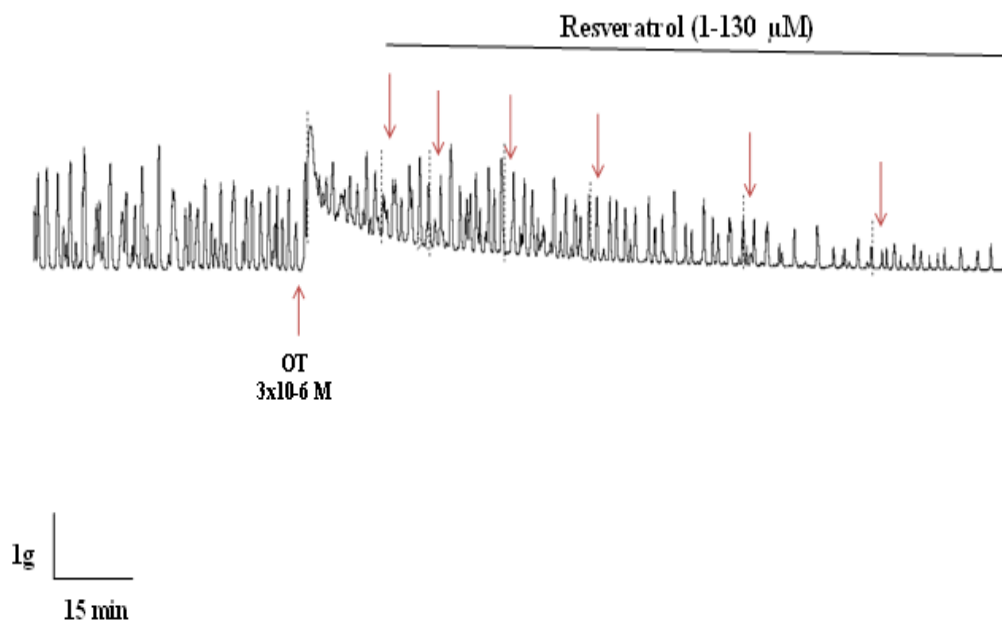
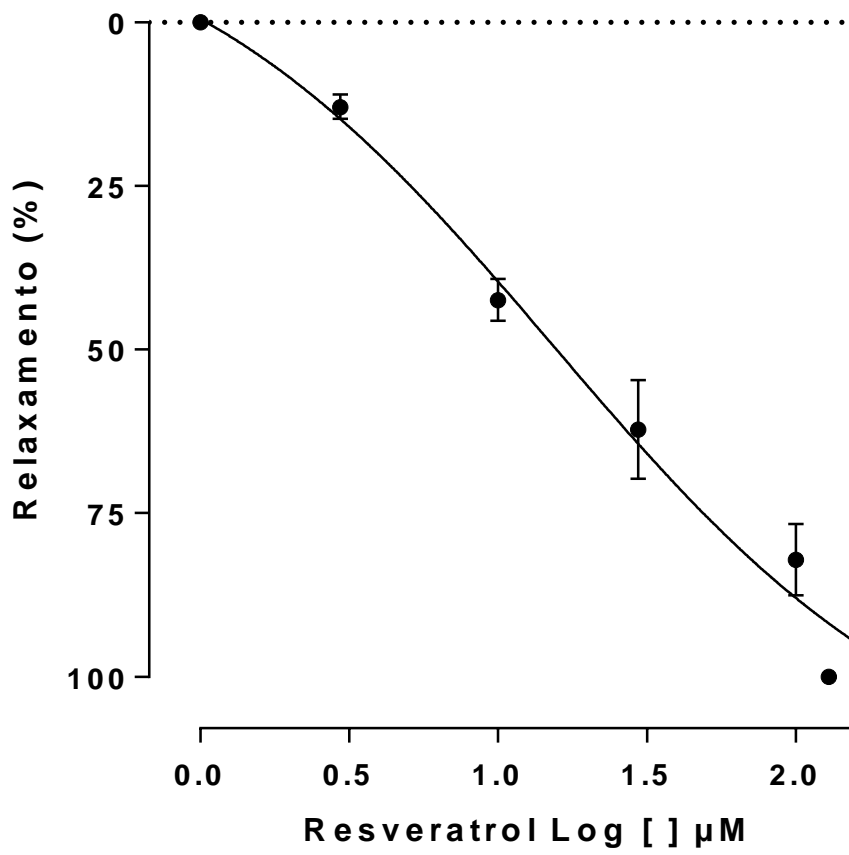
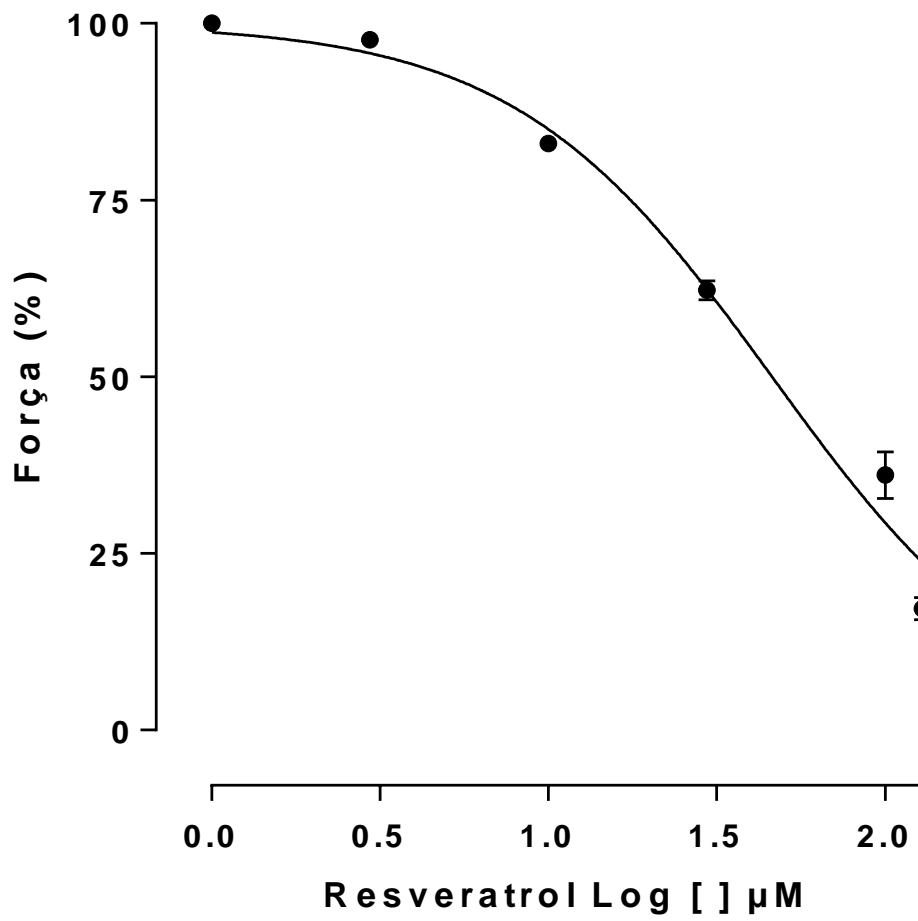


Figura 6: Registros representativos do efeito de resveratrol (1 – 130 μM) sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina em útero isolado de camundongo. As setas para baixo representam a adição cumulativa das concentrações do resveratrol

7A



7B



7C

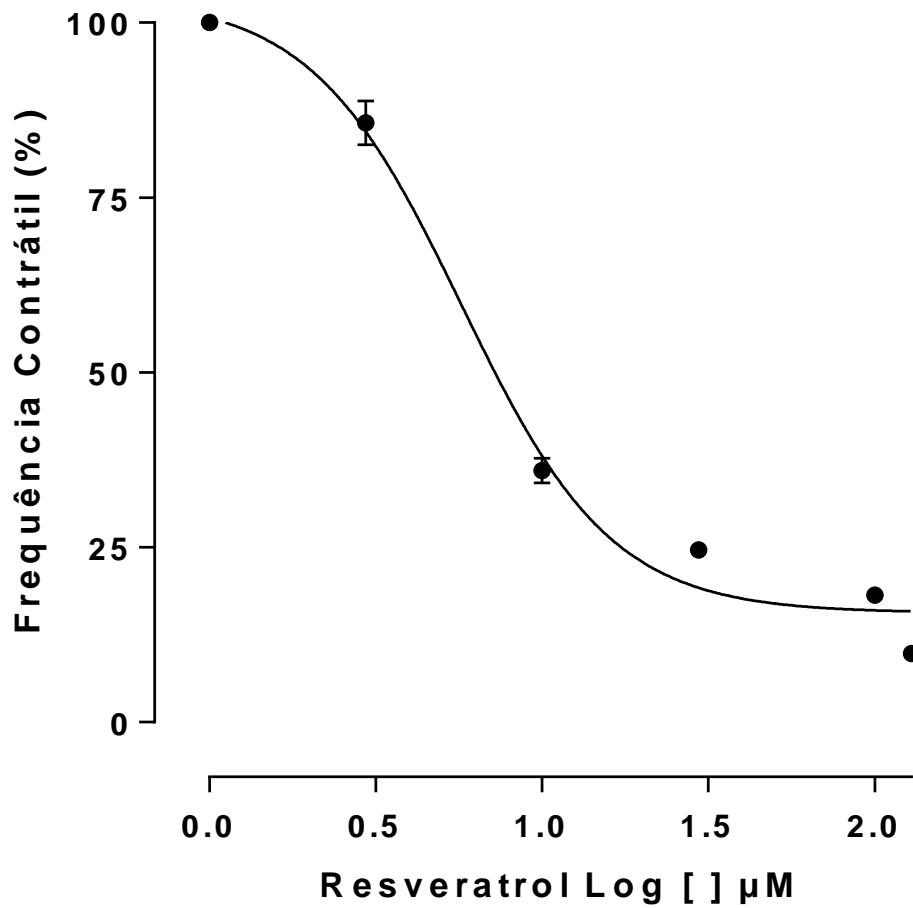


Figura 7: Efeito do resveratrol sobre o tônus (A), amplitude (B) e frequência (C) das contrações tônicas induzidas por ocitocina em útero isolado de camundongo (n = 6).

4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB HIPÓXIA

4.2.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO REGENERATIVO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB HIPÓXIA

O resveratrol (100 μ M) foi adicionado ao banho após 30 minutos de exposição do tecido à hipóxia (Figura 8). Observou-se que, adicionando o resveratrol, o tônus contrátil foi melhorado na presença do polifenol. Dado esse observado quando comparamos o valor contrátil do tônus na presença com o tônus uterino na ausência do resveratrol, ambas as experiências realizadas em modelos de hipóxia.

Na presença do resveratrol (contração = $51,18 \pm 4,5$ %) o útero tem 5 vezes mais tônus contrátil quando comparado nas condições de ausência (contração = $10,67 \pm 1,6$ %) (n = 6) (Figura 9).

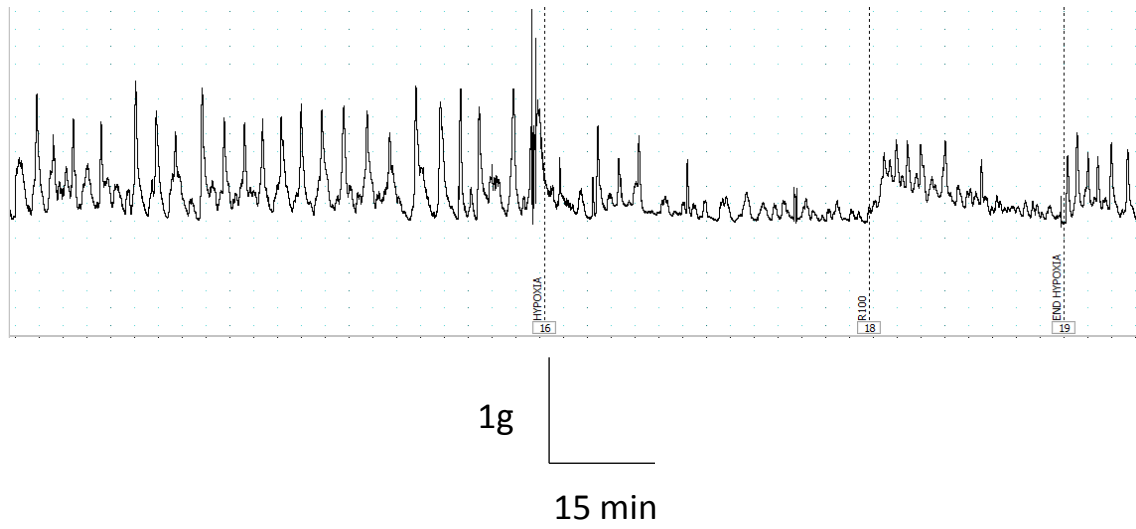


Figura 8: Registros representativos do efeito regenerativo do resveratrol (100 μ M) em útero isolado de camundongo exposto à 30 minutos de hipóxia.

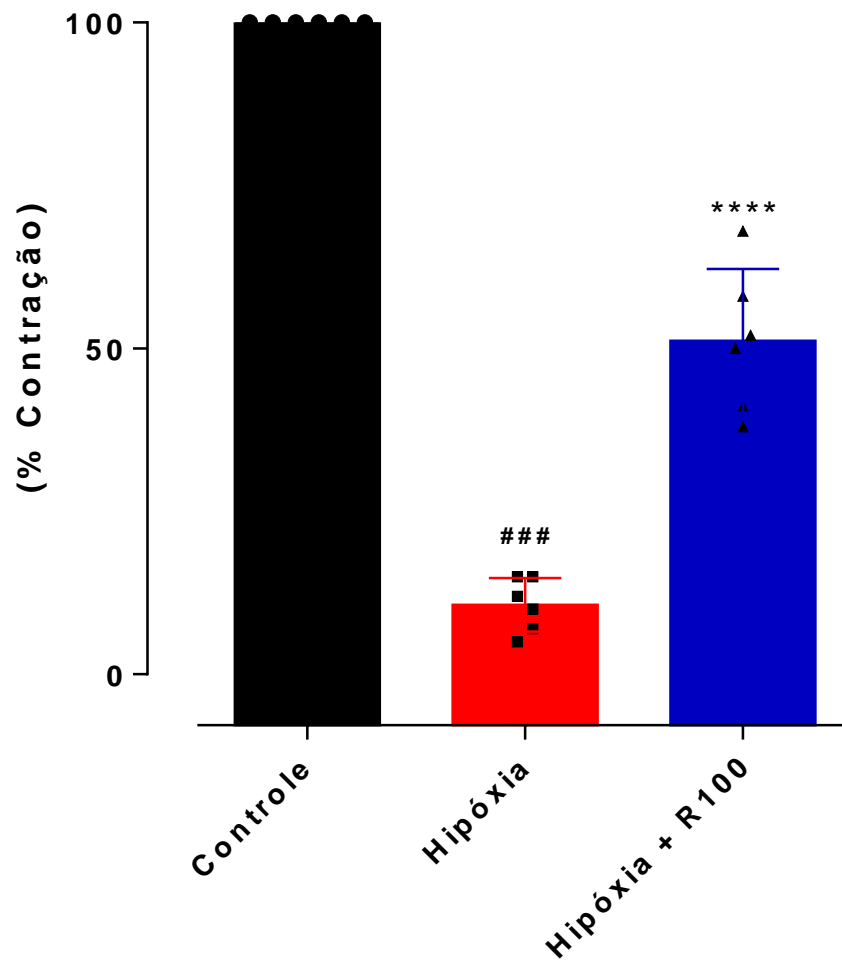


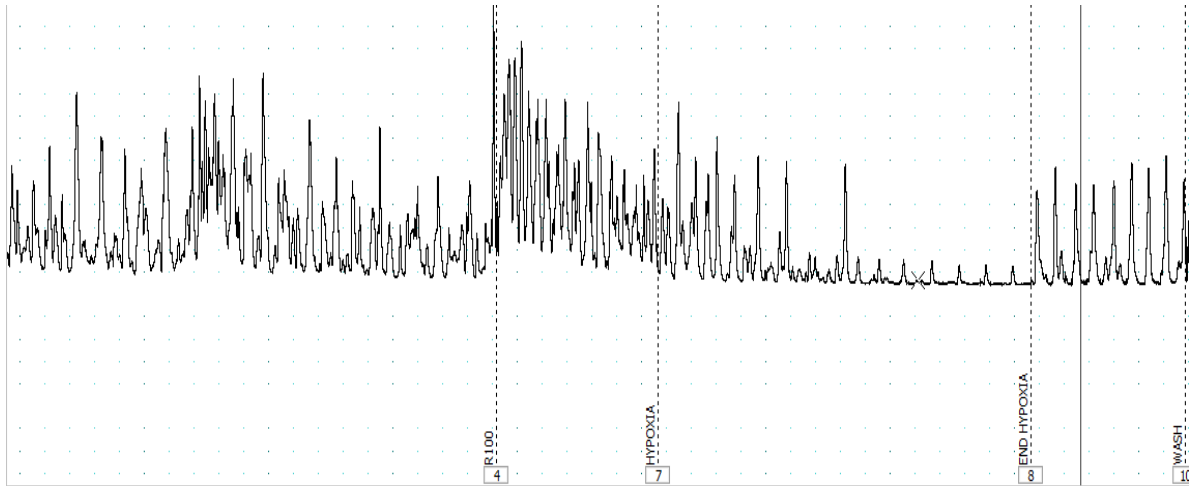
Figura 9: Efeito regenerativo do resveratrol (100 uM) após 30 minutos de hipoxia em útero. Símbolos e barras verticais representam a média e E.P.M., respectivamente. One-way e teste t **** $p < 0,0001$ (Hypoxial vs. hipóxia + resveratrol); ### $p < 0,0001$ (Controle vs. Hipóxia); (n = 6).

4.2.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB HIPÓXIA

Após o período de estabilização, o resveratrol na concentração de 100 μ M (R100) foi adicionado ao banho durante 15 minutos, tempo após o qual o tecido foi exposto a hipóxia durante 30 minutos na presença do polifenol. (Figura 10)

Em experiências, na ausência de resveratrol, o útero, em aproximadamente 10 minutos, tinha valor máximo de tônus contrátil de apenas 25% em comparação com o controle (100% de contração).

No entanto, na presença do resveratrol, com 10 minutos de exposição à hipóxia, o útero foi observado com tônus contrátil de aproximadamente 75% de contração (n = 6). Estes dados foram observadas em momentos: 0, 10, 20, 30 minutos de hipóxia (Figura 11).



1
10

Figura 10: Registros representativos do efeito protetor do resveratrol (100 μ M) em útero isolado de camundongo exposto à 30 minutos de hipóxia.

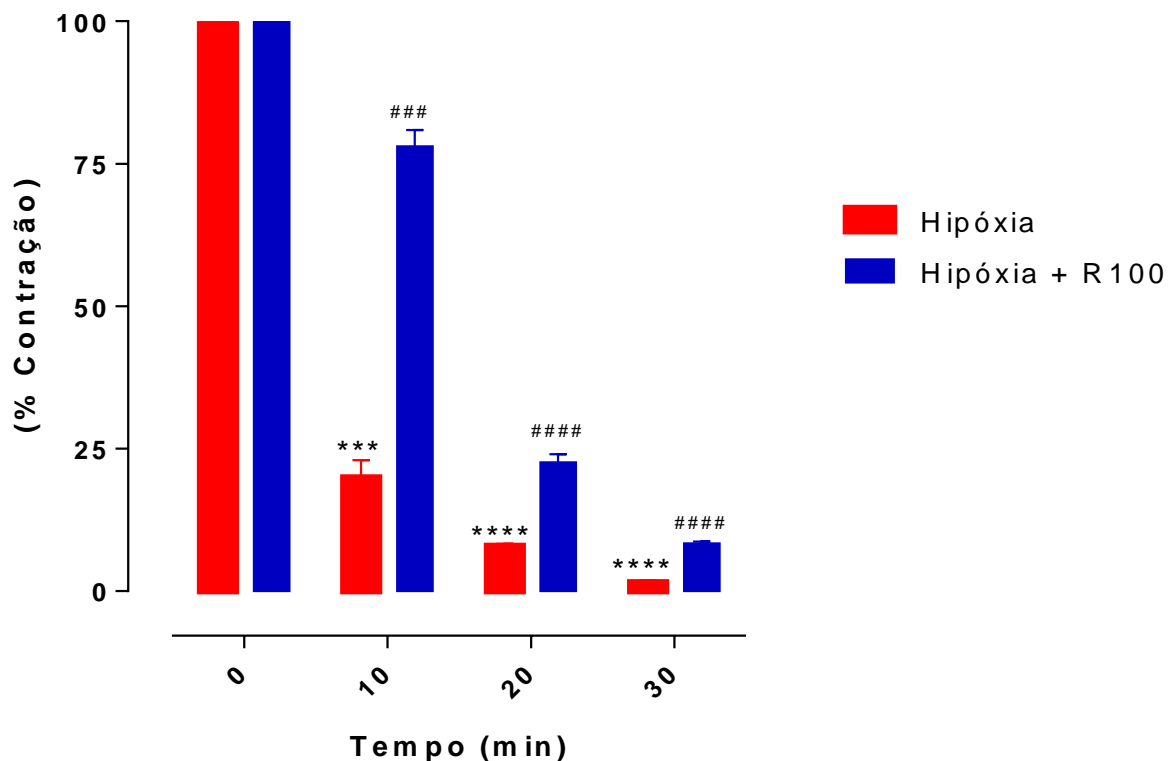


Figura 11: Efeito protetor do resveratrol (100 μ M) após 30 minutos de hipóxia em útero. Símbolos e barras verticais representam a média e S.D.M., respectivamente. One-way e teste t *** p < 0,001; **** p < 0.0001 (Hipoxia controle vs. Hipoxia 10, 20, 30 min / EC50), #### p < 0,001, ##### p < 0.0001 (Hipoxia vs. Hipoxia + Resveratrol) (n = 6).

4.2.3 COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DO TEMPOL E RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGO SOB HIPÓXIA

Realizou-se uma comparação entre os efeitos regenerativos do resveratrol (contração = $51,18 \pm 4,50$ %) e tempol (contração = $19,73 \pm 0,80$ %) (n = 6), observou-se que o efeito do resveratrol foi de 3 vezes melhor quando se comparam os valores médios do tônus contrátil do dois antioxidantes. Sendo o resveratrol em níveis funcionais mais potente e eficaz (Figura 12).

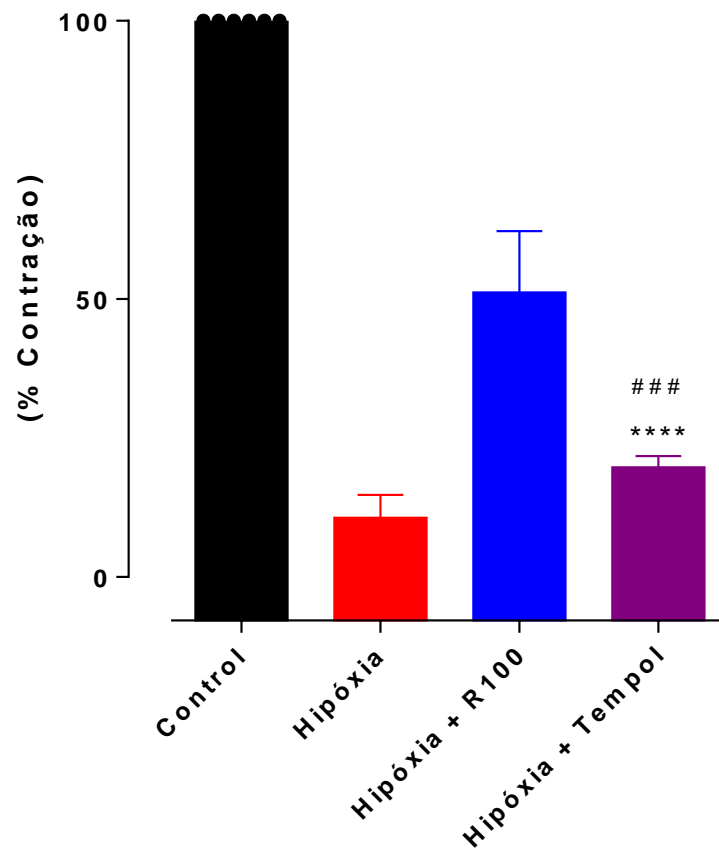


Figura 12: Comparação dos efeitos do resveratrol (100 uM) e tempol (100 uM) após 30 minutos de hipoxia em útero. Símbolos e barras verticais representam a média e S.D.M., respectivamente. One-way e teste t **** $p < 0,0001$ (Hypoxial vs. hipóxia + resveratrol vs hipóxia + tempol), ### $p < 0,05$ (Hipóxia vs. Hipóxia + Tempol) (n = 6).

4.2.4 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO NO MECANISMO DE AÇÃO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO SOB HIPÓXIA

Em útero de camundongos fêmeas, o efeito de resveratrol (contração = $51,18 \pm 4,50$ %) foi atenuada após a incubação do tecido com TEA⁺ (contração = $21,25 \pm 1,90$ %) (10 mM), nessa concentração, um bloqueador não seletivo para os canais para potássio (n = 6) (Figura 13).

O efeito do resveratrol não demonstrou melhoras significativas quando os canais para potássio encontram-se bloqueados.

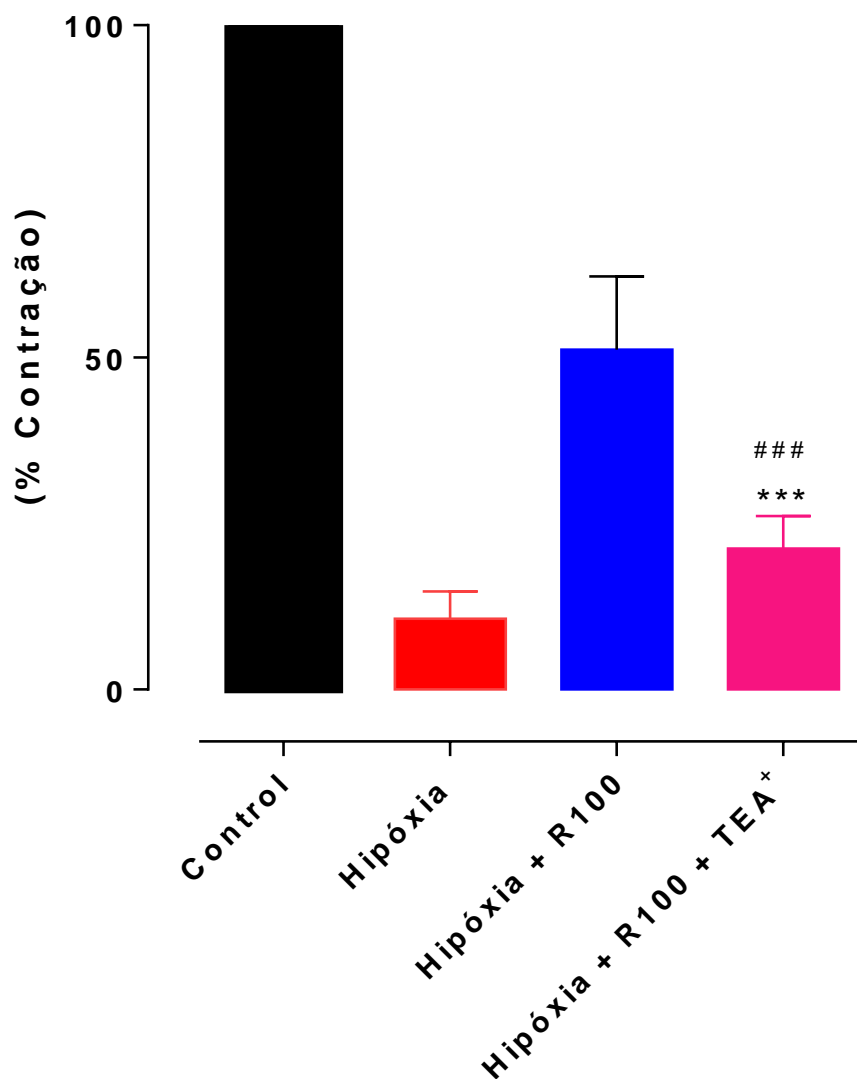


Figura 13: Avaliação do efeito de resveratrol na presença de TEA⁺ (10mM) em útero em modelos de hipóxia. Símbolos e barras verticais representam a média e S.D.M., respectivamente. One-way ANOVA seguido por teste de Bonferroni e test t, *** p< 0.001 (Hipoxia vs. Hipoxia + Resveratrol + TEA), ### p< 0.001 (Hipoxia + Resveratrol vs. Hipoxia + Resveratrol + TEA) (n = 6).

4.2.5 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA CÁLCIO NO MECANISMO DE AÇÃO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO SOB HIPÓXIA

Em útero de camundongos fêmeas, o efeito de resveratrol (contração = 51,18 ± 4,50 %) foi praticamente abolido após a incubação do tecido com nifedipino (contração = 4,46 ± 1,40 %) (n = 6), um bloqueador não seletivo para os canais de cálcio (Figura 14).

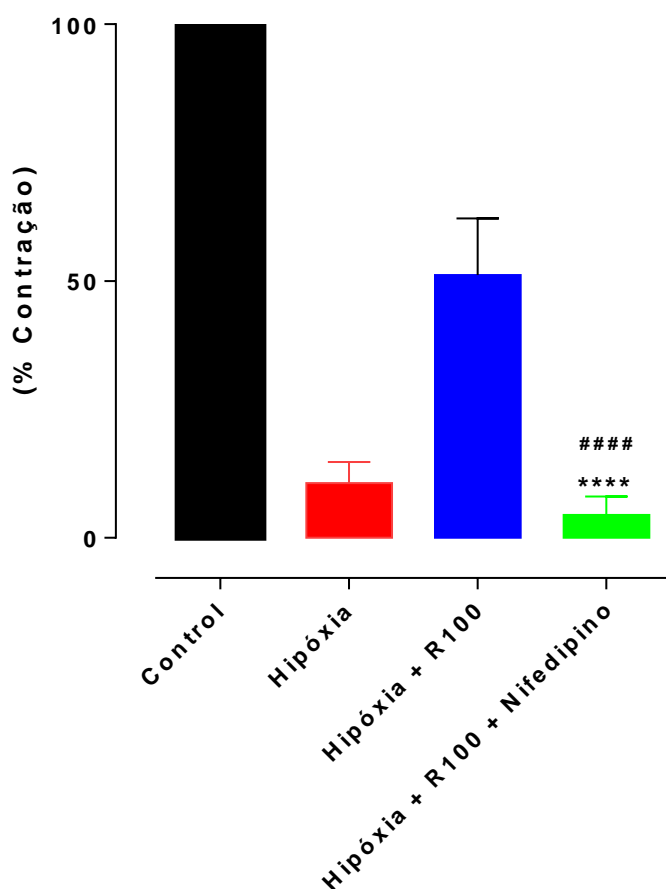


Figura 14: Avaliação do efeito de resveratrol na presença de nifedipino em útero isolado de camundongo em modelos de hipóxia. Símbolos e barras verticais

representam a média e S.D.M., respectivamente. One-way ANOVA seguido por teste de Bonferroni *** $p < 0,0001$ (Hipóxia +R100 vs. Hipóxia +R100+ Nifedipino), #### $p < 0,0001$ (Hipóxia vs. Hipóxia+R100+ Nifedipino) (n = 6).

4.2.6 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP (K_{ATP} s) NO MECANISMO DE AÇÃO DO RESVERATROL EM ÚTERO ISOLADO DE CAMUNDONGOS SOB HIPÓXIA.

Em útero de camundongos fêmeas, foi observado que o efeito contrátil e regenerativo do resveratrol (contração = $51,18 \pm 4,50$ %) foi praticamente abolido após a incubação do tecido com glibenclamida, um bloqueador específico para os K_{ATP} s (contração = $2,24 \pm 1,04$ %) (n = 6) (Figura 15).

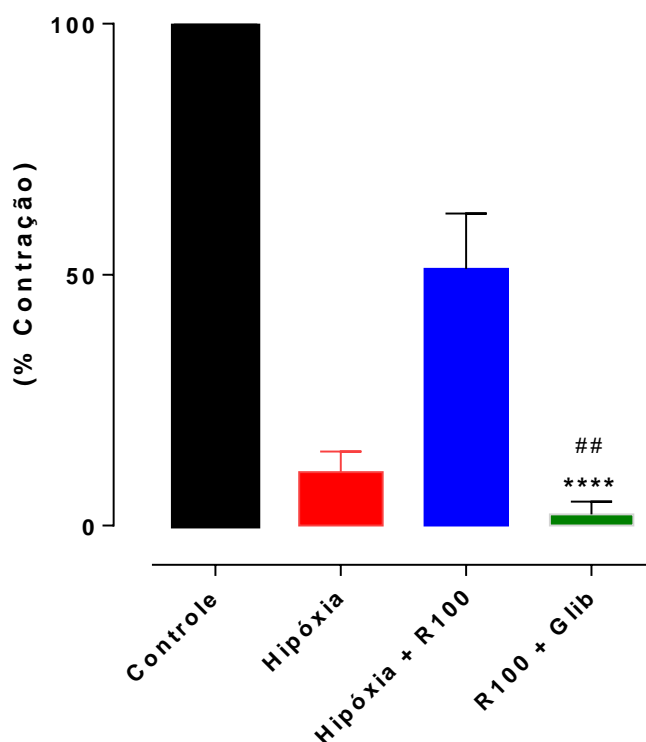


Figura 15: Avaliação do efeito de resveratrol na presença de glibenclamida em útero isolado de camundongo em modelos de hipóxia. Símbolos e barras verticais representam a média e S.D.M., respectivamente. One-way ANOVA seguido por teste de Bonferroni *** $p < 0,0001$ (Hipóxia +R100 vs. Hipóxia +R100+ glibenclamida), ## $p < 0,001$ (Hipóxia vs. Hipóxia+R100+ Glibenclamida) (n = 6).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho utilizou-se útero isolado de camundongos fêmeas para avaliar os possíveis efeitos tocolíticos do antioxidante resveratrol em tecidos tanto em condições normais de oxigenação (normóxia), como em modelos de hipóxia, assim como objetivou-se elucidar também o seu possível mecanismo de ação. Foi evidenciado farmacologicamente neste trabalho que o polifenol resveratrol exerce efeito relaxante em útero isolado de camundongos fêmeas em condições normais de oxigenação e que quando se induz hipóxia nesse mesmo tecido, nas mesmas condições experimentais, o resveratrol por sua vez, apresenta efeito contrátil, regenerativo e protetor frente à hipóxia.

Avaliou-se a possível participação dos canais para cálcio e potássio, em especial os K_{ATP_s} neste efeito observado, além de fazer uma comparação do efeito regenerativo do resveratrol com o efeito do antioxidante bem descrito pela literatura, o tempol a fim de avaliar sua potência em regenerar o tônus contrátil após 30 minutos de hipóxia. Com bases nos resultados obtidos juntamente com experimentos anteriores em útero sob normóxia, fica evidente que o resveratrol apresenta efeito tocolítico dual e que este efeito torna-se dependente dos níveis de oxigênio do tecido em questão.

O útero é um órgão miogênico e o tipo de músculo liso nele contido é capaz de manter contrações sem sinais do sistema nervoso ou participação hormonal nenhuma. Isso não quer dizer que agonistas não venham a ter nenhum papel na sua contratilidade; na verdade, eles são moduladores potentes da contração (WRAY, 1993).

Alguns estudos tentam esclarecer quais as células do miométrio funcionam como “células de marcapasso” ou mesmo se todas as células possuem essa atividade (HOROWITZ et al., 1999), mas muitos estudos ainda são necessários para que essa pergunta seja respondida.

Assim como alguns outros órgãos, o útero é um órgão oco, revestido de musculatura lisa bem diferenciada, possuindo três camadas: endométrio, miométrio e serosa, ainda em relação ao útero, tem havido um progresso

notável para o entendimento da fisiologia e fisiopatologia do útero, o que resultou em muitas intervenções importantes que afetam a concepção e contracepção, bem como a função menstrual, quadros patológicos como câncer do colo do útero, disfunção das contrações no trabalho de parto, abortos espontâneos, quadros de pré-eclâmpsia, entre outros. Embora haja crescente conscientização da importância potencial da função anormal da camada muscular do útero (miométrio), há relativamente poucos estudos sobre o papel do miométrio em doenças mais frequentes da reprodução, necessitando assim de estudos mais detalhados (AGUILLAR; MITCHELL, 2010).

Assim como em úteros não gravídicos, no tocante à gravidez, torna-se imprescindível o papel do miométrio. O parto humano é uma sequência complexa de eventos que envolve processos coordenados de dilatação cervical e contração uterina. Para a maior parte do tempo da gravidez humana, o miométrio mantém-se relativamente quiescente, permitindo o desenvolvimento do feto. Para o fim da gravidez, existe uma mudança relativamente gradual da quiescência miometrial. A transformação do útero muscular de repouso para contrátil foi denominado "ativação" e observado toda uma transformação quando se compara o útero gravídico com o não gravídico, é demonstrado uma grande diferença na histologia da camada muscular, população de receptores, expressão de proteínas, entre outros fatores (LYE, 1992).

A ativação e preparação do útero para o trabalho de parto, faz com que esse órgão seja totalmente alterado no tocante ao seu aparelho contrátil. Uma vez que o útero entra em trabalho de parto, um processo denominado "estimulação" inicia as poderosas contrações coordenadas para expulsão do feto. Isto ocorre principalmente devido à ocitocina e aumento da expressão de receptores que desencadeiam toda uma via de sinalização contrátil ao se ligar com o hormônio em questão, o que o torna um importante hormônio em todo o processo contrátil uterino (THEOBOLD, G. W., et al., 1969).

A dismenorreia, por exemplo, é uma síndrome caracterizada por um ou mais sintomas que se manifestam no período pré ou intramenstrual. É um processo fisiológico que apresenta quadros dolorosos. A dor geralmente é mais

intensa no primeiro dia da menstruação e, em mais de 50% dos casos, é acompanhada por outros sintomas como náuseas, vômitos, palidez, cefaleia, diarreia, vertigem e desmaio (FONSECA, 2000). Essa contração exagerada que culmina na dor, promove a redução do fluxo vascular uterino, causando hipóxia e isquemia, aumentando ainda mais o quadro doloroso (BORTOLETO, 1995).

Acredita-se que cerca de 50% a 90% das mulheres apresentem cólica uterina em algum momento de suas vidas, sendo que 10% das pacientes tornam-se incapazes de desenvolver suas atividades habituais em decorrência da dor (MOTTA, 2000).

Dados como os citados anteriormente tornam-se muito importantes e devem ser bem analisados, visto que fármacos utilizados como relaxante muscular uterino podem prevenir e/ou aliviar tais dores e desconfortos sendo úteis na terapêutica. O alívio observado por mulheres que utilizam fármacos que agem na musculatura lisa uterina pode ser atribuído ao efeito do mesmo agir em algum ou todos os aspectos que formam a contração: tônus, amplitude e/ou frequência (MOTTA, 2007), ou seja, um fármaco pode tanto aliviar cólicas uterinas por diminuir a frequência e amplitude das contrações assim como induzir relaxamento no tônus muscular como um todo. Desta maneira torna-se de extrema importância de analisar o efeito de determinadas substâncias na frequência, amplitude e tônus contrátil isoladamente.

Inicialmente trabalhou-se para responder se o resveratrol teria efeito relaxante em útero isolado de camundongos e se esse efeito seria relevante em condições normais de oxigenação. Para tanto, primeiramente observou-se o efeito do resveratrol frente às contrações fásicas observadas no tônus espontâneo uterino, livre da influência contrátil de qualquer ferramenta farmacológica, sendo observado assim apenas o tônus espontâneo contrátil.

Foi observado que o resveratrol nas concentrações de 1, 3, 10, 30 e 100 μ M relaxou o útero isolado de camundongos bem como diminuiu a amplitude e frequência das contrações uterinas espontâneas de maneira significativa e dependente de concentração (Figura 3A, 3B e 3C). Fato que nos leva a concluir parcialmente que o resveratrol tem efeito potente e eficaz frente

às contrações fásicas uterinas espontâneas, observou-se também que o resveratrol mostrou-se mais potente em diminuir a frequência uterina. Esses dados foram confirmados quando se comparou os valores das médias dos resultados obtidos. Logo, num quadro de dor provocado por exarcebação de tônus, frequência ou amplitude contrátil, ao administrar o resveratrol como fármaco de escolha, provavelmente seria observado alívio com a melhoria do quadro doloroso.

A ocitocina é um pequeno hormônio peptídeo com vários locais de ação no corpo humano. Ela regula um grande número de processos relacionados com a reprodução de todas as espécies. Existem diversos estudos sobre sua capacidade para estimular a contractilidade uterina. Isto é conseguido por múltiplos mecanismos que envolvem a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático tanto em útero gravídico como não gravídico (SHMYGOL, A., et. al., 2006).

O receptor da ocitocina pertence à família dos receptores acoplados à proteína G e que se distribuem de maneiras distintas de acordo com a fase estral uterina. Depois de ligada ao seu receptor, haverá uma ativação da fosfolipase-C por acoplamento a $\text{Gq} / \text{G11}$ com consequente produção de segundos mensageiros e por fim, contração muscular lisa (KU, C. Y., et. al., 1995). Para confirmar ou descartar a hipótese de que o resveratrol estaria agindo em nível de receptores de ocitocina, receptores esses, responsáveis majoritariamente pelas cascatas de transdução de sinal em útero no tocante às contrações, decidiu-se caracterizar o bloqueio exercido pelo polifenol frente às curvas concentração resposta cumulativas induzidas por ocitocina.

Foi observado um desvio das curvas para direita, de forma não paralela e com redução do E_{max} (Figura 5), sugerindo um antagonismo do tipo não competitivo, que foi confirmado pelo valor de “slope” do gráfico de Schild o qual diferiu significativamente da unidade, concluindo que resveratrol não está agindo em nível de receptores de ocitocina de maneira direta para promover seu efeito tocolítico, mas que de alguma maneira o resveratrol interfere na ligação da ocitocina ao seu receptor correspondente, o que atrapalha a eficácia da contração observada na presença do polifenol estudado.

Tendo em vista que os mecanismos envolvidos na manutenção da fase tônica da contração são diferentes em relação aos da fase fásica e que o útero por esta razão é um órgão bifásico, ou seja, apresenta contrações com os dois componentes: fásico e tônico (ABDELLATIF, 1989; HONDA; TAKANO; KAMIYA, 1996), resolveu-se então verificar se o resveratrol além de relaxar as contrações espontâneas fásicas, promoveria também o relaxamento do útero pré-contraído com ocitocina, promovendo assim efeito relaxante sobre o componente tônico.

Resveratrol (1 – 130 μM) relaxou de maneira significativa e dependente de concentração o útero pré-contraído por ocitocina ($\text{CE}_{50} = 15,38 \pm 0,66$), apresentando efeito significativo para tônus, amplitude e frequência ($n = 6$) (Gráfico 7A, 7B e 7C respectivamente). No entanto, resveratrol mostrou-se cerca de aproximadamente 8 vezes mais potente em diminuir a frequência das contrações uterinas ($\text{CE}_{50} = 5,72 \pm 1,92$) quando comparado com o seu efeito sob a amplitude das mesmas ($\text{CE}_{50} = 46,14 \pm 1,13$). Caso o resveratrol fosse utilizado na terapêutica para alívio de dores causadas por contrações exacerbadas, o efeito seria provocado pela diminuição da frequência das contrações e não pela amplitude. Observou-se também que para o relaxamento total do útero, neste caso, utilizou-se uma concentração a mais de resveratrol (130 μM) quando comparado aos resultados em tônus espontâneo. Esse fato é explicado por nesse tipo de experimento o útero se encontrar pré-contraído com ocitocina, o que dificulta o relaxamento muscular. Com estas condições pode-se mimetizar quadros patológicos de descontroles contráteis.

Assim, tendo em vista os resultados preliminares, pode-se até então concluir que em útero isolado de camundongos em condições normais de oxigenação, o resveratrol possui efeito relaxante significativo e dependente de concentração, apresentando este efeito tanto no tônus como na frequência e na amplitude das contrações uterinas avaliadas e que esse efeito é observado no tônus espontâneo fásico e sob contrações tônicas induzidas.

O íon Ca^{2+} é o principal sinal responsável pela ativação da contração do músculo liso (NEERING; MORGAN, 1980; MORGAN; MORGAN, 1982) sendo responsável também por desencadear uma variedade de processos celulares

nos neurônios, músculos e muitas células não excitáveis tendo como umas das suas funções, a sinalização celular (BERRIDGE; DUPONT, 1995; BERRIDGE, 1997; BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998, BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000; BOOTMAN; LIPP; BERRIDGE, 2001).

A contração do músculo liso é iniciada principalmente pelo aumento da $[Ca^{2+}]_c$, e pode ser alcançada tanto via despolarização de membrana, levando ao aumento da $[Ca^{2+}]_c$ através dos canais para cálcio dependentes de voltagem (Cav), como pela ligação do agonista a um receptor, que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003), originalmente designados por acoplamentos eletromecânico e fármaco mecânico, respectivamente (SOMLYO; SOMLYO, 1968). Agonistas como a ocitocina ligam-se a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata de fosfoinositídeos, usualmente através da produção de IP3 (1,3,5 trisfosfato de fosfatidil inositol) mediada pelas proteínas Gq e G11, estimulando, assim a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). Os agonistas contráteis podem também elevar a $[Ca^{2+}]_c$ através de receptores de rianodina e estimular a entrada de Ca^{2+} através dos múltiplos tipos de canais presentes no retículo sarcoplasmático (McFADZEAN; GIBSON, 2002).

A principal porta de entrada para o Ca^{2+} que vem do meio extracelular são os canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav) (CATTERALL, 2000), os quais estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). Os Cav são canais iônicos proteicos formados por 4 ou 5 subunidades distintas: a subunidade $\alpha 1$, que é a maior delas e constitui o poro do canal, além de possuir o sensor de voltagem que controla sua abertura; a subunidade $\alpha 2$ que está ligada a subunidade γ e a subunidade β que é intracelular (CATTERALL et al., 2005)

Vários agentes contráteis causam uma resposta contrátil bifásica no músculo liso, em especial no útero, consistindo em uma contração inicial transiente – componente fásico, seguido por uma contração sustentada – componente tônico, que se desenvolve lentamente e é mantida durante o

período de exposição principalmente pelo influxo do Ca^{2+} pelos Ca_v (VAN BREEMEN; BOLTON, 1979).

É descrito que os mecanismos envolvidos na manutenção da fase tônica da contração são diferentes dos mecanismos envolvidos na fase fásica (ABDELLATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989; HONDA; TAKANO; KAMIYA, 1996), tendo a abertura dos Ca_v , um passo comum das duas vias. Fato esse que torna importante a avaliação do efeito do resveratrol nas duas condições contráteis.

Sabendo que o resveratrol promoveu efeito relaxante tanto frente o componente fásico como tônico, pode-se inferir que o mesmo provavelmente esteja agindo em útero isolado de camundongo em condições normais de oxigenação, por meio do bloqueio dos Ca_v levando o tecido assim ao relaxamento muscular. Todavia, outros experimentos são necessários para a confirmação dessa hipótese.

É descrito na literatura os efeitos da hipóxia em diversos músculos e órgãos, como útero e coração, esses efeitos acarretam muitas vezes um mau funcionamento dos mesmos assim como podem influenciar no mecanismo de ação de muitos fármacos utilizados na terapêutica em casos de doenças (EINSNER, D. A., et. al., 1989).

Sabe-se que a hipóxia causa redução do tônus, da amplitude e da frequência das contrações uterinas, devido a uma diminuição da circulação sanguínea e prejudicando assim o funcionamento de toda maquinaria contrátil. Essas alterações podem culminar em problemas relacionados à distribuição inadequada de oxigênio em todo o tecido e posteriormente causar danos irreversíveis (WRAY, 1993). Diante destas informações sobre hipóxia fez-se necessária uma triagem prévia para analisar a resposta do tecido estudado à exposição à hipóxia. Analisou-se essas respostas frente aos tempos de 10, 20, 30 e 45 minutos e foi evidenciado que os experimentos seriam realizados com o tempo padrão de 30 minutos, pois com esse tempo os efeitos das hipóxia podiam ser bem observados e o tecido permanecia funcional.

A visível perda de tônus, amplitude e frequência uterinas em condições de hipóxia e essa perda pode ser explicada por desregulações nos níveis de ATP, fosfato e variações de pH que são observadas durante os experimentos. A hipóxia pode agravar o quadro de muitas doenças uterinas, como: câncer de colo de útero, ovário, cólicas menstruais e pode também complicar e dificultar o trabalho de parto normal, levando muitas mulheres a optarem por uma intervenção cirúrgica para induzir o parto por não terem contrações suficientemente fortes para que o mesmo ocorra de maneira natural (ZUI, R., 2013).

O maior problema em casos de hipóxia uterina é a deficiente suplementação do oxigênio no tecido como um todo e em casos de gravidez, esse fato pode prejudicar e/ou levar o feto à óbito e em casos de útero não gravídico, pode causar fortes dores (JANG, M., 1997).

Sabendo dessa informação, passou-se a investigar o efeito do resveratrol em útero isolado de camundongos em modelos de hipóxia, visto que o resveratrol é um potente antioxidante utilizado na terapêutica devido a suas inúmeras atividades biológicas já comprovadas cientificamente.

O resveratrol tem atividade antioxidante, sendo utilizados em várias dietas suplementares, pode também atuar de modo similar ao estrogênio e substituir parcialmente este hormônio nos tratamentos pós-menopausa, relacionando-o ainda mais com o aparelho reprodutor feminino (ARICHI, H., et. al., 1982; FRÉMONT, L., 2000; JANG, M., 1997; PINTO, M. et. al., 1999).

Dessa forma, primeiramente resolveu-se investigar se o resveratrol possui efeito regenerativo do tônus uterino após a exposição do tecido a 30 minutos de hipóxia. Ao adicionar o resveratrol na concentração de 100 μM , o útero voltava a funcionar (Figura 9) retomando cerca de 50% da força contrátil que havia perdido devido às lesões e danos causados pela hipóxia. Levando a concluir parcialmente que o resveratrol possui efeito regenerativo potente e estatisticamente significativo, fazendo o útero retomar o seu funcionamento, mecanismo esse provavelmente diferente do mecanismo de ação relaxante do resveratrol em útero em condições normais de oxigenação. Observou-se efeito relaxante em útero em condições normais de oxigenação e efeito contrátil

quando o útero se encontrava em meio a hipóxia, ou seja, efeito dual em útero isolado de camundongo.

Após avaliar o efeito regenerativo do resveratrol após 30 minutos de hipóxia em útero isolado de camundongos, investigou-se também se o resveratrol teria também um efeito protetor no mesmo tecido estudado. E foi evidenciado nos experimentos que ao adicionar o resveratrol na mesma concentração utilizada em experimentos prévios (100 μ M) e posteriormente induzir hipóxia por 30 minutos na presença do polifenol, o resveratrol foi capaz de proteger o útero contra os efeitos lesivos da hipóxia, tornando o tecido mais resistente quando comparado ao controle (Figura 12).

Na ausência do resveratrol, o útero em condições de hipóxia, perde cerca de 75% da força contrátil nos 10 primeiros minutos de hipóxia, enquanto que na presença do antioxidante com o mesmo tempo teste, o útero perde apenas 25% da sua forças (Figura 11). Esses dados foram observados nos tempos de 0, 10, 20 e 30 minutos (tempos teste analisados em experimentos de triagem prévia) de hipóxia na presença e ausência do resveratrol e estatisticamente se mostraram relevantes e com o efeito dependente de concentração, levando-nos a confirmar que além de regenerativo, o resveratrol também possui efeito protetor significativo em útero contra o mau funcionamento contrátil causado pela hipóxia. Este fato suporta a idéia de que um vez utilizado na terapêutica em processos patológicos uterinos que envolvam hipóxia, como por exemplo, câncer de colo de útero, o resveratrol pode apresentar tanto efeito paliativo como profilático.

Com o objetivo de elucidar um pouco mais o mecanismo de ação do resveratrol na hipóxia, avaliou-se e comparou-se o efeito regenerativo do resveratrol com o efeito observado do tempol, que é um antioxidante mimético da superóxido dismutase (SOD) e desta forma fazer uma breve comparação entre os dois efeitos dos antioxidantes utilizados para assim avaliar o quanto seria potente o efeito do resveratrol e dessa forma darmos continuidade aos nossos estudos.

O efeito do resveratrol (100 μ M) mostrou-se mais potente quando comparado ao tempol aproximadamente 3 vezes, dados estes evidentes

quando comparamos os valores das CE_{50} . Ficou evidenciado que provavelmente o mecanismo de ação do resveratrol em promover o efeito regenerativo em útero na condição de hipóxia é diferente do mecanismo de ação do tempol nesse órgão nas mesmas condições em nível funcional (Figura 12), no entanto mais experimentos são necessários para comparar o mecanismo de ação do resveratrol com o tempol, relacionando sua atividade antioxidante e musculatura uterina em condições de hipóxia.

Muitos canais para potássio têm sido descritos nas células musculares lisas incluindo aqueles modulados por ATP, Ca^{2+} , O_2 e voltagem (TAGGART, M. J., 1997). Qualquer efeito de hipóxia sobre a musculatura lisa uterina e conseqüentemente sobre estes canais afetará o potencial de repouso da membrana e é portanto, susceptível de afetar a força e frequência das contrações. (TAGGART, M. J., 1996).

Os canais para K^+ são reguladores fundamentais da excitabilidade celular. Eles estão envolvidos em várias funções fisiológicas, tais como, potencial de membrana celular e secreção de hormônios e de neurotransmissores. Sua atividade pode ser regulada por voltagem, Ca^{2+} ou por neurotransmissores e conseqüentemente as vias de sinalização que eles estimulam (ALEXANDER, S. P. H., et. al., 2007). Esses fatos tornam os canais de potássio um alvo importante a ser investigado no mecanismo de ação de muitas drogas em experimentos que possuem o músculo liso como alvo específico do seu estudo, como por exemplo o resveratrol.

O resveratrol, em experimentos utilizando TEA^+ (10 mM), nessa concentração, bloqueador não específico dos canais para potássio, em modelos de hipóxia mostrou que, os canais de potássio provavelmente estão envolvidos no seu mecanismo de ação em regenerar o músculo uterino, pois na presença do bloqueador o efeito regenerativo do resveratrol mostrou-se estatisticamente diminuído. Dessa maneira pode-se inferir que provavelmente, em condições de hipóxia o resveratrol promove efeito regenerativo contrátil por bloquear os canais para potássio, processo inverso ao que se observa no mecanismo de ação do resveratrol em útero em normóxia em experimentos realizados por R. NOVAKOVIC, et al., 2013 (Figura 13).

Mudanças nos níveis de cálcio citosólico também podem acontecer durante o processo de hipóxia, devido principalmente a um bloqueio dos Cav que ocorre em resposta a uma queda e acidificação consequente do meio, que leva o tecido a tornar-se mais ácido (HEATON, R. C., et. al., 1993).

É bem descrito na literatura que a principal porta de entrada para o Ca²⁺ que vem do meio extracelular são os canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav) (CATTERRALL, 2000), os quais estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). Assim, passamos a analisar uma possível participação dos canais para cálcio dependentes de voltagem no efeito regenerativo contrátil do resveratol.

Nestes experimentos, nos quais foi utilizado nifedipino como bloqueador dos Cav, observou-se que na presença do bloqueador, o efeito do resveratrol foi significativamente diminuído quando comparado aos dados obtidos na ausência do polifenol. Ao analisar os valores numéricos tratados estatisticamente, pode-se concluir que o efeito do resveratrol (contração% = $51,18 \pm 4,5$) foi praticamente abolido após a incubação do tecido com nifedipino (contração% = $4,46 \pm 1,4$) (Figura 14).

Esses dados corroboram com a hipótese de que os canais para cálcio provavelmente estão envolvidos no efeito regenerativo promovido pelo resveratrol em útero isolado de camundongos em modelo de hipóxia, ou seja, nestas condições o resveratrol promove efeito regenerativo e contrátil por ativar canais para cálcio.

A atividade e distribuição de canais iônicos depende não apenas da musculatura lisa em questão, mas do estado de desenvolvimento do tecido, no caso do útero é levado em consideração se o mesmo está em período gestacional ou não (KHAN, SMITH, MORRISON & ASHFORD, 1993; WEIR & ARCHER, 1995; URENA, FRANCO-OBREGON & LOPEZ-BARNEO, 1996).

Tais diferenças podem também explicar grande parte da diversidade encontrada entre os músculos lisos. Qualquer efeito de hipóxia sobre estes canais afetará o potencial de repouso da membrana e é portanto, susceptível de afetar a força e frequência das contrações, o que torna de extrema importância a observação e estudo tanto do tônus, frequência como amplitude

das mesmas. Um ponto geral a considerar é que muitos canais de iônicos requerem um nível basal de fosforilação para serem ativados, e, portanto, uma diminuição em ATP pode reduzir o fluxo de corrente (TEWARI & SIMARD, 1994; HILGEMANN, 1997), embora alguns canais de K^+ não sejam ativados por fosforilação (KLOCKNER & ISENBERG, 1985)).

Os K_{ATP_s} estão presentes em músculo liso e têm sido propostos como uma ligação importante entre o metabolismo celular e atividade elétrica, e em particular, faz parte do mecanismo subjacente à dilatação de arteríolas coronárias e cerebrais durante a hipóxia. Relatos mostram que os K_{ATP_s} representam os subtipos de canais para potássio com participação mais significativa nos efeitos causados pela hipóxia (STANDEN, QUAYLE, DAVIES, BRAYDEN, HUANG & NELSON, 1989; DAUT, MAIER-RUDOLPH, VON BECKERATH, MEHRKE, GUNTHER & GOEDEL-MEINEN, 1990; DART & STANDEN, 1995; TAGUCHI et al., 1997). Na hipóxia, a queda dos níveis de ATP e o aumento nos níveis de ADP acontece junto com uma diminuição do pH intracelular, esses efeitos conduzem à abertura do canal e hiperpolarização da célula muscular lisa. Isto irá resultar em relaxamento da musculatura em questão (ZHANG & BOLTON, 1996), ainda assim o papel dos K_{ATP_s} em hipóxia uterina permanece com muitos questionamentos e precisa de muitos outros estudos e esclarecimentos.

Sabendo da importância dos níveis de ATP e canais iônicos na musculatura lisa em hipóxia, passamos a analisar a possível participação dos canais para potássio sensíveis ao ATP no efeito do resveratrol em úteros em modelos de hipóxia.

Para avaliar a possível participação dos K_{ATP_s} no efeito regenerativo do resveratrol em úteros em modelos de hipóxia, utilizou-se glibenclamida, um bloqueador específico desses canais citados.

Observou-se que na presença do bloqueador, o efeito regenerativo do resveratrol, mostrado por percentagem de contração foi diminuído significativamente. Na ausência do bloqueador o efeito do resveratrol (% contração = $51,18 \pm 4,50$) mostrou-se cerca de aproximadamente 23 vezes maior do que na presença do mesmo (% contração = $2,24 \pm 1,40$) (Figura 15),

ou seja, quando os canais para potássio sensíveis ao ATP estão bloqueados, o efeito do resveratrol é praticamente abolido, fato que nos leva a concluir que provavelmente esses canais estão envolvidos no efeito regenerativo e contrátil do polifenol em útero isolado de camundongos em modelo de hipóxia. Em suma, o resveratrol em útero isolado de camundongo em modelos de hipóxia, induz efeito regenerativo e contrátil por possivelmente bloquear canais para potássio sensíveis ao ATP.

Com base nos achados deste trabalho, pode-se inferir que o resveratrol possui efeito dual em útero isolado de camundongo e que o efeito observado depende totalmente das condições de oxigenação oferecida ao tecido.

Resveratrol possui efeito relaxante em útero em condições normais de oxigenação tanto frente às contrações fásicas como sobre o componente tônico da contração uterina. Esse efeito relaxante é observado tanto nas frequências como na amplitude e tônus das contrações.

Resveratrol, em modelos de hipóxia uterina apresentou efeito contrátil, protetor e regenerativo. Observou-se também que o efeito regenerativo do resveratrol é mais potente e significativo que o do tempol e que esse efeito é explicado pela ativação de canais para cálcio e bloqueio dos canais de potássio, mais especificamente os K_{ATPs} .

Estes resultados são as bases iniciais para novos estudos com resveratrol, para que futuramente seja estabelecida uma utilização clínica, segura e eficaz, desta droga. Ele permite ainda que novos ensaios sejam projetados visando aprofundar suas características farmacológicas, uma vez que este composto mostrou-se seguro e eficaz e, testes humanos no tocante à sua toxicidade e doses e/ou concentrações testadas, tornando-se futuramente uma ferramenta terapêutica eficaz no auxílio de muitos tratamentos de doenças que acometam o sistema reprodutor feminino, como por exemplo, câncer de colo de útero.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho nos permite concluir que o resveratrol:

Em normóxia:

- Possui efeito relaxante frente às contrações fásicas e espontâneas em útero isolado de camundongo;
- Antagoniza de maneira não competitiva os receptores de ocitocina para promover efeito tocolítico;
- Induz relaxamento em útero pré contraído com ocitocina;
- Mostrou efeito relaxante no tocante à frequência, amplitude e tônus

Sob hipóxia:

- Possui efeito contrátil e regenerativo em útero isolado de camundongos;
- Protege o útero contra as lesões causadas pela hipóxia;
- Tem o efeito regenerativo mais potente que o antioxidante tempol;
- Apresentou a participação dos canais de potássio, bloqueando-os no seu mecanismo contrátil observado em útero em hipóxia;
- Possui o envolvimento dos CA_v no seu mecanismo contrátil em útero em modelo de hipóxia, ativando-os;
- Induz efeito contrátil e regenerativo em útero em hipóxia por provavelmente bloquear os K_{ATP_s} .

Referências

7. REFERÊNCIAS

ABDELLATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphospholinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Sciences**, v. 45, p. 757-786, 1989.

AGUILAR, H. N. & MICTHELL, B. F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. **Human Reproduction Update**, v. 16 p. 725-44, 2010

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.

ARCE, L. TENA, M. T.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. Determination of trans-resveratrol and other polyphenols in wines by a continuous flow sample clean-up system followed by capillary electrophoresis separation. **Analytica Chimica Acta**, v. 359, p. 27-38, 1998.

ARICHI, H.; KIMURA, Y.; OKUDA, H.; BABA, K.; KOZAWA, M.; ARICHI, S. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* on lipid metabolism. **Chem. Pharm. Bull.** v. 30, n. 5, p. 1766-1770, 1999.

ARUNLAKSHANA, O.; SCHILD, H. O. Some quantitative uses of drug antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 14, p. 48 - 58, 1959.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 679-688, 2009

BERRIDGE, M. J ; DUPONT, G. Spatial and temporal signalling by calcium. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 6, p. 267 – 274, 1995.

BERRIDGE, M. J. Elementary and global aspects of calcium signalling. **Journal of Physiology**, v. 499, p. 291 – 306, 1997.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP, P. Calcium – a life and death signal. **Nature**. v. 395, p. 645 – 648, 1998.

BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signaling. **Natural Reviews**, v. 1, p. 11-21, 2000.

BLAUSTEIN, M. P. Sodium/Calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Current Topics in Membranes and Transport**, v. 34, p. 289-330, 1989

BOLTON, T. B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth-muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979.

BORTOLETO, C.C.R. Dismenorréia primária, etiopatogenia e terapêutica. **Femina**, v. 23, p. 439-443, 1995

CARAFOLI, E. Calcium signaling: a tale for all seasons. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v. 99, p. 1115 - 1122. 2002.

CATTERALL, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Annual Review of Cell & Developmental Biology**, v. 16, p. 521-555, 2000.

CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 411-425, 2005.

DART, C. & STANDEN, N. B. Activation of ATP-dependent K⁺ channels by hypoxia in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. **Journal of Physiology** 483, 29-39, 1995

DART, C. & STANDEN, N. B. Activation of ATP-dependent K⁺ channels by hypoxia in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. **Journal of Physiology** 483, 29-39. 1995.

DAUT, J., MAIER-RUDOLPH, W., VON BECKERATH, N., MEHRKE, G., GUNTHER, K. & GOEDEL-MEINEN, L. Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. **Science** 247, 1341-1344, 1990.

DAWSON, M. J. & S. WRAY. The effects of pregnancy and parturition on phosphorus metabolites in rat uterus studied by ³¹P nuclear magnetic resonance. **J. physiol. Lond.**368:19-31,1985.

DJOKO B, CHIOU RY, SHEE JJ, LIU, Y. W. Characterization of immunological activities of peanut stilbenoids, arachidin-1, piceatannol, and resveratrol on lipopolysaccharide-induced inflammation of RAW 264.7 macrophages. **J Agric Food Chem** 55:2376– 2383, 2007

ERTEL, E. A.; CAMPBELL, K. P.; HARPOLD, M. M.;HOFMANN, F.; MORI, Y.; PEREZ-REYES, E.; SCHWARTZ, A.; SNUTCH, T. P.; TANABE, T.; BIRNBAUMER, L.; TSIEN, R. W.; CATTERALL, W. A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, v. 25, p. 533-535, 2000.

EUN-JUNG PARK & PEZZUTO, J. M., The pharmacology of resveratrol in animals and humans. **Biochimica et Biophysica Acta** 1852, p1071–1113, 2015

FONSECA. Dismenorréia. In: Halbe, H.W., São Paulo editor. **Tratado de Ginecologia**, 3, 748-54, 2000.

FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho–Kaibuchi, K-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells.**Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 32-39, 2001.

FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho–Kaibuchi, K-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells.**Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 32-39, 2001.

GARRETT, R.H.; GRISHAM, C.M. **Biochemistry**. Londres : Saunders College, p. 1100, 1995.

GOH, S.S., et al., The red wine antioxidant resveratrol prevents cardiomyocyte injury following ischemia-reperfusion via multiple sites and mechanisms. **Antioxid Redox Signal**, 9(1): p. 101-13, 2007.

GREISS, F. C., Effect of labour on uterine blood flow. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 93:917-923, 1965.

HILLIS, W. E.; HART, J. H.; YAZAKI, Y. Polyphenols of *Eucalyptus sideroxylon*. *Phytochemistry Oxford* , v.13, n. 8, p. 1591-1595, 1974.

HONDA, K.; TAKANO, Y.; KAMIYA, H. Involvement of protein kinase C in muscarinic agonist-induced contractions of guinea pig ileal longitudinal muscle. *General Pharmacology*, v. 27, n. 6, p. 957-961, 1996.

HOROWITZ, B., WARD, S. M. & SANDERS, K. M. Cellular and molecular basis for electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles. *Annual Reviews of Physiology* 61, 19–43, 1999.

JACKSON W. F. Hypoxia does not activate ATP-sensitive K⁺ channels in arteriolar muscle cells. *Microcirculation*. v 7:137–45, 2000.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI O. G.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W. W.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; MEHTA, R. G.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derivated from grapes. *Science*. v. 275, n. 5297, p. 218-220, 1997.

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

KHAN, R. N., SMITH, S. K., MORRISON, J. J. & ASHFORD, M. L. J. Properties of large-conductance K⁺ channels in human myometrium during pregnancy and labour. *Proceedings of the Royal Society B* 251, 9—15, 1993

KHAN, R. N., SMITH, S. K., MORRISON, J. J. & ASHFORD, M. L. J. Properties of large-conductance K⁺ channels in human myometrium during pregnancy and labour. *Proceedings of the Royal Society B* 251, 9-15, 1993.

KIMURA, Y.; OHMINAM, H.; OKUDA, H.; BABA, K.; KOZAWA, M.; ARCHI, S. Effects of stilbene components of roots of *Polygonum* ssp. on liver injury in peroxidised of oil fed rats. **Plant Med** , v. 49, n. 1, p. 51-54, 1983.

KLOCKNER, U. & ISENBERG, G. Action potentials and net membrane currents of isolated smooth muscle cells (urinary bladder of the guinea-pig). **Pflugers Archiv** 405, 329-339, 1985.

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

KOSTERIN, S. A., BABICH, L. G., SHLYKOV, S. G. & ROVENETS, N. A. Mg²⁺, ATP-dependent Ca²⁺ transport in endoplasmic reticulum of myometrial cells. **Biochemistry** 61, 53—58, 1996

KU, C. Y.; HALL, I.P.; WASHABAU, R.J.; TAKAGI, K.; KOTLIKOFF, M.I. β -Adrenergic agonists regulate K_{Ca} channels in airway muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 1, p. 371-379, 1995.

KUBO, M.; KIMURA, Y.; SHIN, H.; HANEDA, T.; TANI, T.; NAMBA, K. Studies on the antifungal substance of crude drug: 2. On the roots of *Polygonum cuspidatum* (Poligona-ceae). **Shoyakugaku Zasshe**. v. 18, n. 6, p. 1025-1028, 1979.

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

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

LEE, M.H., CHOI, B. Y., KUNDU, J. K., SHIN, Y. K., NA, H. K., SURH, Y. J., Resveratrol suppresses growth of human ovarian cancer cells in culture and in a murine xenograft model: eukaryotic elongation factor 1A2 as a potential target. **Cancer Res** 69:7449–7458, 2009.

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

LOUTZENHISER R. D, PARKER MJ. Hypoxia inhibits myogenic reactivity of renal afferent arterioles by activating ATP-sensitive K⁺ channels. . **Circ Res**; 74:861–9, 1994.

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

LYE. S. J. Evidence for an intrinsic control of myometrial contractile periodicity in sheep during pregnancy. **J Reprod Fertil**; 96: 337–45, 1992B

McFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **The British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1-13, 2002.

MORGAN, J. P.; MORGAN, K. G. Vascular smooth muscle: the first recorded Ca²⁺ transients. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 395, p. 75–77, 1982.

MOTTA, E. V., Dismenorréia – Como diagnosticar e tratar. **Rev Bras Med**, p.57, n. 5, 2007.

NEERING, I. R.; MORGAN, K. G. Use of aequorin to study excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscle. **Nature**, v. 288, p. 585–587, 1980.

NELSON MT, HUANG Y, BRAYDEN JE, HESCHELER J, STANDEN NB. Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K⁺ channels. **Nature**.v. 344:770–3, 1990.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 – 2002. **Journal of Natural Products**, v.66, p. 1022–1037, 2003

R. NOVAKOVIC, B. ILIC, B. BELESLIN-COKIC, N. RADUNOVIC, H. HEINLE, R. SCEPANOVIC, L. GOJKOVIC-BUKARICA. The effect of resveratrol on contractility of non-pregnant rat uterus: the contribution of k⁺ channels. **journal of physiology and pharmacology**. 64, 6, 795-805, 2013

PACE-ASCIAK, C. R.; ROUNOVA, O.; HAHN, S. E.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy hu-man subject. **Clinica Chimica Acta**. v. 246(1-2) p. 163-182, 1996.

PAN, Z.; MA, J. Retrograde activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**. v. 33, p. 375 - 384, 2003.

PATEL, K. R., SCOTT, E., BROWN. V., A. GESCHER AJ, STEWARD WP, et al. Clinical trials of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1215: 161 169; 2011

PINTO, M. C.; GARCÍA-BARRADO, J. A.; MACÍAS, P. Resveratrol is a Potent Inhibitor of the Dioxygenase Activity of Lipoxygenase. **J. Agric Food. Chem.**v. 47, p.4842-4846, 1999.

PIROLA L, FROJDO S. Resveratrol: one molecule, many targets. **IUBMB Life** 60: 323-332; 2008

PUPO, M.T.; GALLO, M. B. C. *Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais*. Química Nova, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

QUAYLE JM, BONEV AD, BRAYDEN JE, NELSON MT. Calcitonin gene-related peptide activated ATPsensitive K⁺ currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A. **J Physiol**. 475:9–13, 1994.

QUEST, U. Potassium channel openers: pharmacological and clinical aspects. **Fundamentals in Clinical Pharmacology**, v. 6, p. 279-293, 1992.

QUEST, U.; COOK, N. S. Moving together: K⁺-channel openers and ATP-sensitive K⁺-channels. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 10, p. 431-435, 1989.

RATNA, W. N.; SIMONELLI J. A. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and na-ringenin on estrogen-mediated gene expression. **Life Science**. v. 70, p. 1577-1589, 2002.

RAY, P.S., et al., The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. **Free Radic Biol Med**, 27(1-2): p. 160-9, 1999.

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

RIZZON & MIELE. Analytical characteristics and discrimination of Brazilian commercial grape juice, nectar, and beverage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2006

SCHNEIDER, Y.; VINCENT, F.; DURANTON, B.; BADOLO, L.; GOSSÉ, F.; BERGMANN, C.; SEILER, N.; RAUL, F. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. **Cancer Letters**, v. 158, p. 85-91, 2000.

SHAHIDI & NACZK. Comparison of Phenolic Compounds of Some Edible Plants of Iran and India. **Pakistan Journal of Nutrition** 7 (4): 582-585, 2008

SHMIGOL, A., EISNER, D. A. & WRAY, S. Properties of voltage-activated [Ca²⁺]_i transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. **Journal of Physiology**, 511,803–81.1998.

SOLEAS, G. J., DIAMANDIS, E. P., GOLDBERG, D. M. Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry**. v 30, n. 2, 1997.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiology Reviews**, v. 83, p. 1325-1358, 2003.

STANDEN, N. B., QUAYLE, J. M., DAVIES, N. W., BRAYDEN, J. E., HUANG, Y. & NELSON, M. T. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle. **Science** 245, 177-180, 1989.

STEWART, J. R.; CHRISTMAN, K. L.; O'BRIAN, C. A. Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: Inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation. **Biochemical Pharmacology** , v. 60, n. 9, p. 1355-1359, 2000.

SUBBARAMAIAH, K.; CHUNG, W. J.; MICHALUART, P.; TELANG, N.; TANABE, T.; INOUE, H.; JANG, M.; PEZZUTO, J. M.; DANNENBERG, A. J. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry** , v. 273, n. 34 (Aug. 21), p. 21875-21882, 1998.

TAGGART, M. J., BURDYGA, TH., HEATON, R. C. & WRAY, S. Stimulus-dependent modulation of smooth muscle intracellular calcium and force by altered intracellular pH.. **Pflugers Archiv** 432, 803-811, 1996.

TAGGART, M. J., MENICE, C. B., MORGAN, K. G. & WRAY, S. Effect of metabolic inhibition on intracellular Ca^{2+} , phosphorylation of myosin regulatory light chain and force in rat smooth muscle. **Journal of Physiology** 499, 485-496, 1997.

TAGUCHI H, HEISTAD DD, KITAZONO T, FARACI FM. ATP-sensitive K^+ channels mediate dilatation of cerebral arterioles during hypoxia. **Circ Res.**; 74:1005–8, 1994.

TAGUCHI, H., HEISTAD, D. D., KITAZONO, T. & FARACI, F. M. ATP-sensitive K^+ channels mediate dilation of cerebral arterioles during hypoxia. **Circulation Research** 74, 1005-1008, 1997.

TEWARI, K. & SIMARD, J. M. Protein kinase A increases availability of calcium channels in smooth muscle cells from guinea pig basilar artery. **Pflugers Archiv** 428, 9-16, 1996.

THEOBOLD GW, ROBARDS MF, SUTER T. Changes in myometrial sensitivity to oxytocin in man during the last six weeks of pregnancy. **J Obstet Gynaecol Br Common**; 76: 385-90, 1969

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.

URENA, J., FRANCO-OBREGON, A. & LOPEZ-BARNEO, J. Contrasting effects of hypoxia on cytosolic Ca²⁺ spikes in conduit and resistance myocytes of the rabbit pulmonary artery. **Journal of Physiology** 496, 103-109, 1996.

VAN BREEMEN, C.; AARONSON, P.; LOUTZENHISER, R. Sodium-Calcium interaction in mammalian smooth muscle. **Pharmacology Reviews**, v. 30, p.167-208, 1979

VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**. v. 143, p. 299-330, 1963.

VILELA, M. G., JUNIOR, J. L., SILVA, J. G., Determination of estrous cycle in rats by vaginal lavage. **Feminina UFMG**. v 35, n 10, 2007.

WATTERSON, K. R.; RATZ, P. H.; SPIEGEL, S. The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. **Cellular Signalling**, v. 17, p. 289-298, 2005.

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

WEIR, E. K. & ARCHER, S. L. The mechanism of acute pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. **FASEB Journal** 9, 183—189, 1995.

WESTON, A. H.; EDWARDS, G. Recent progress in potassium channel opener pharmacology. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 1, p. 47-54, 1992.

WILLIAMS, L. D., BURDOCK, G., A. EDWARDS, J. A., BECK, M., BAUSCH, J. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. **Food and Chemical Toxicology** 47: 2170–2182; 2009

WRAY, S. Uterine contraction and physiological mechanism of modulation. **Am J. Physiol.** 246, 1993.

WYNN, R. M., Biology of the uterus. **London:Plenum**, p. 733., 1977.B

ZBIKOWSKA, H. M.; OLAS, B.; WACHOWICZ, B.; KRAJEWSKI, T. Response of blood platelets to resvera-trol. **Platelets (Abigdon)**, v. 10, n. 4, p. 247-252, 1999.

ZHANG, H.-L. & BOLTON, T. B. ATP-sensitive potassium channels and their modulation by nucleotides and potassium channel openers in vascular smooth muscle cells. In *Smooth Muscle Excitation*, ed. Bolton, T. B. & Tomita, T., pp. 139—154. **Academic Press, London**, 1996.

8 DOUTORADO SANDUÍCHE

1. Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDE)

Período: Setembro 2014 – Agosto 2015

Orientador estrangeiro: Eugene Nalivaiko, Phill Jobling, PhD. Carta em anexo (Anexo V)

Local: University of Newcastle - Medical Science Centre – Newcastle/NSW – Austrália

9 ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS

Alyne S. Carvalho, Drielle D. Guimaraes, Bruna P. V. Dantas, Juliana N. Carreiro, Leonidas G. Mendes-Junior, Maria S. França-Silva, Matheus M.O. Monteiro, Naiane F.B. Alves, Suênia K.P. Porpino, Thyago M. Queiroz and Valdir A. Braga*

Brain Angiotensin-II-derived Reactive Oxygen Species: Implications for High Blood Pressure. **J. Hypertens, 2012** (Anexo III)

ARTIGO PRODUTO DA TESE SUBMETIDA

Juliana N. Carreiro, Phillip Jobling, Dirk. Van Helden, Eugene Nalivaiko, Valdir A. Braga*

Resveratrol promotes protection and recovery of uterine contractions during hypoxia, 2016 (Anexo IV)

Anexos

ANEXO I



ANIMAL RESEARCH AUTHORITY

Issued on the recommendation of The University of Newcastle Animal Care and Ethics Committee.

To: **Professor Dirk Van Helden (Chief Investigator)**
Other Investigators: **Dr Abula Yusufjiang, Associate Professor Derek Laver, Associate Professor Liz Milward, Associate Professor Eugene Nalivaiko, Mr Ye Win Oo, Doctor Phil Jobling, Mr Paul Johnson, Mr Peter Dosen, Mr Daniel Johnstone, Doctor Karen Kerr, Doctor Mohammad Imtiaz, Professor Hikaru Hashitani, Mr Owen Hamill, Mr Yury Nikolaev, Mr Karl Crosby, Dr Kalana Maduwage, Miss Ayumi Kamiya, Professor Andrew Boyle, Doctor Rebecca Lim, Mr Mark Gradwell, Miss Livia Petiz, Miss Brianna Coulter, Ms Juliana da Nobrega Carreiro, Mr Dan Johnstone, Doctor Jay Horvat, Miss Kristy Martin, Mr Samuel Kelsey, Mr Md Khadem Ali, Mr Ali Shahandeh, Doctor Thomas Wellings, Maurilio da Silva Morrone, Nauana Somensi, Mr Jason Woods, Miss Ritambhara Aryal,**
Address: **School of Biomedical Sciences and Pharmacy**

The persons named above are authorised by the University of Newcastle (an accredited research establishment) to conduct the following research:

Title: **Cellular mechanisms involved in control of body organs including blood and lymphatic vessels**
Number: **A-2009-153**
Project Summary: **The research aims are to advance knowledge on lymphatic,**

cardiac, skeletal and brain disorders using guinea pigs, mice, rats and/or toads.

Safety Reference No:

As approved by the University of Newcastle Animal Care and Ethics Committee, under whose supervision the above persons are authorised to carry out animal research.

Conditions to which the authority is subject:

Type	Review/Meeting Date	Decision	Provisions
------	---------------------	----------	------------

No specific conditions apply

Dates between which the authority remains in force: From **01-Jul-2015** to **30-Jun-2016**

Designated land in or on which the business of animal research is to be carried out:
Designated accredited lands, or field locations, as outlined in the Initial application.

Animals approved under this Authority:

Species and Strain	Group Name	Sex / Reproductive Status	Number	Housing Location	Comments
Mouse~Lab~1~MS~Mouse~Balb/c-Fox1nu~Unknown~Fox1nu~Mus musculus	01	Either	30	MSB Animal Facility	
Mouse~Lab~1~N~Mouse~Unspecified~~~Mus musculus	01	Either	1630	Medical Sciences Building (MSB)	
Mouse~Lab~1~N~Mouse~Unspecified~~~Mus musculus	02	Female-Pregnant	10	Medical Sciences Building (MSB)	

Mouse~Lab~1~GM~Mouse~AKR~HFE~HFE KO~Mus musculus	01	Either	40	MSB Anim al Facilit y	
Mouse~Lab~1~N~Mouse~AKR~~~Mus musculus	01	Either	40	MSB Anim al Facilit y	
Mammal~Lab~3~N~Guinea Pig~Unspecified~~~Cavia porcellus	01	Either	120	MSB Anim al Facilit y	
Rat~Lab~2~N~Rat~Unspecified~~~Rattus norvegicus	01	Either	680	MSB Anim al Facilit y	
Amphibian~Feral~24~N~Amphibian~Cane Toad~~~Bufo marinus	01	Either	240	Medic al Scien ces Buildi ng (MSB)	
Mouse~Lab~1~GM~Mouse~AKR~Tfr2~Tfr2~Mus musculus	01	Either	40	MSB Anim al Facilit y	
Mouse~Lab~1~GM~Mouse~AKR~HFExTfr2~HFE xTfr2~Mus musculus	01	Either	40	MSB Anim al Facilit y	
Mouse~Lab~1~MS~Mouse~C57BL/6~NOD~NOD/ LtJ~Mus musculus	01	Either	40	Medic al Scien ces Buildi ng (MSB)	
Mouse~Lab~1~MS~Mouse~C57BL/6~W/Wv~WBB	01	Either	40	Medic	

6F1/J-KitW/KitW-V/J~Mus musculus				al Scien ces Buildi ng (MSB)	
Mouse~Lab~1~GM~Mouse~C57BL/6~Pdgfra-GFP~B6.129S4-Pdgfra_tm11(EGFP)Sor/J KI~Mus musculus	01	Either	40	Medic al Scien ces Buildi ng (MSB)	
Mouse~Lab~1~GM~Mouse~B6C3~Dementia-Tg(APPswe/PSEN1dE9)~Mus musculus	Deme ntia	Either	40	Medic al Scien ces Buildi ng (MSB)	
Mouse~Lab~1~GM~Mouse~C57BL/6~K3~Tg(Thy1-MAPT*K369I)K3Gotz~Mus musculus	K3	Either	40	Medic al Scien ces Buildi ng (MSB)	

Professor Kevin Hall

Deputy Vice-Chancellor (Research and Innovation)

Date Issued: **22-Oct-2015**

Authorised Authority held by Research Services, The University of Newcastle.

ANEXO II



Education Ministry - MEC
 Coordination of Improvement of Higher Education Personnel - CAPES
 General Coordination for scholarships abroad - CGBE
 International Relations Directorate - DRI
 Setor Bancário Norte, Quadra 2, Bloco L, Lote 6 - CEP: 70040-020 - Brasília, BRAZIL
 Tel.: (61) 2022-6952 - E-mail: pesquisadorvisitante@capes.gov.br

Brazil, April/2014.
 Project: 088/2012.

To Whom It May Concern,

We certify that Mrs. Juliana da Nóbrega Carreiro, was awarded a Fellowship Doctoral Sandwich Coordination of Improvement of Higher Education Personnel - CAPES, the Science Without Borders Program, to study in University of Newcastle - Australia. This statement is a commitment of time from July/2014 to June/2015, with the following benefits:

The scholarship consists of :

- * Monthly payment of A\$ 19.800,00 in the period from July/2014 to June/2015.
- Shift - Aid for the purchase of airfare roundtrip to AUT , in the amount of :
- A portion of US\$ 3.412,00 for scholarships of up to twelve months duration.
- Health - Aid amounting to A\$ 1.320,00 in a lump sum, which will be paid equivalent in Real in Brazil .
- Help -Installation A\$ 1.300,00 in a lump sum, whose equivalent in real will be paid in Brazil

The CAPES reserves the right to suspend or terminate the scholarship at any time, as specified in the Term Commitment, if the beneficiary does not meet the requirements listed.

Note: When the beneficiary is a public servant of Union, State, County and Local Authorities Foundations, must note the Decree N.º 91. 800/1985 and the Law N.º 8.112/1990 (article 95, paragraphs 1º and 2º).

Sincerely,



Lúcia Filgueiras Martins de Oliveira
 Coordenadora-Geral de Bolsas e Projeções
 DRI/CAPES

ANEXO III



Hypertension:

Open Access

Carvalho et al., J Hypertens 2012, 1:3
<http://dx.doi.org/10.4172/2167-1095.1000107>

Review Article

Open Access

Brain Angiotensin-II-derived Reactive Oxygen Species: Implications for High Blood Pressure

Alyne S. Carvalho, Drielle D. Guimaraes, Bruna P. V. Dantas, Juliana N. Carreiro, Leonidas G. Mendes-Junior, Maria S. França-Silva, Matheus M.O. Monteiro, Naiane F.B. Alves, Suênia K.P. Porpino, Thyago M. Queiroz and Valdir A. Braga*

Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

Abstract

Hypertension and its relation to free radicals have been matter of continuous research worldwide. This review is based on the premise that some forms of neurogenic hypertension is, in part, caused by the formation of Angiotensin-II (Ang II)-derived reactive oxygen species within the brain, especially in areas along the Subfornical Organ-Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus-Rostral Ventrolateral Medulla pathway (SFO-PVN-RVLM pathway). Here we will discuss the recent contribution of our laboratory and others regarding the mechanisms by which neurons in the Rostral Ventrolateral Medulla (RVLM) are activated by Ang II, how they communicate with the SFO and PVN and more importantly, how Ang II-derived Reactive Oxygen Species (ROS) participate along the SFO-PVN-RVLM pathway in the pathogenesis of neurogenic hypertension.

Keywords: Superoxide; Sympathetic; Angiotensin; Subfornical organ; Rostral ventrolateral medulla

Introduction

The mechanisms underlying neurogenic hypertension have been matter of continuous research worldwide. This review focus on the hypothesis that neurogenic hypertension is, in part, caused by the formation of Angiotensin-II (Ang II)-derived reactive oxygen species in key cardiovascular nuclei, especially in the Rostral Ventrolateral Medulla (RVLM).

Ang II is the major effector of the Renin–Angiotensin–Aldosterone System (RAAS). This system consists mainly of a 2-step enzymatic cascade catalyzed by renin and Angiotensin-Converting Enzyme (ACE), generating Ang II [1], the effect of Ang II is mediated by Ang II receptors. Two isoforms of Ang II receptor have been identified: type 1 receptor (AT1R) and type 2 receptor (AT2R). In general, it is accepted that cardiovascular effects of Ang II such as vasoconstriction, regulation of fluid and drinking behavior are ascribed to AT1R. Besides, AT1R is involved in the progression of cardiovascular diseases including hypertension, atherosclerosis, cardiac hypertrophy and heart failure [2,3].

An additional component of the RAAS family, angiotensin-converting enzyme2 (ACE2) cleaves Ang I and Ang II into Ang 1-9 and Ang 1-7, respectively [4]. Studies show that ACE2 promotes beneficial effects, such as important in vasodilatation, natriuresis and to inhibit heart failure. These effects seems to be related with inhibition of oxidative stress, since ACE2 deficiency leads to an Ang II-mediated activation of the NADPH oxidase system and exacerbated oxidative stress leading to hypertension [4,5]. Abundant evidence now points to oxidative stress as a key mechanism in Ang II-dependent neurogenic hypertension [6,7]. Furthermore, it has become evident that reactive oxygen species are important in the increase in blood pressure elicited by Ang II administered peripherally or directly in the Central Nervous System (CNS). However, considering that Ang II is composed by eight amino acids, which makes it incapable of crossing the Blood Brain Barrier (BBB), the mechanisms underlying how circulating Ang II acts within the brain to eventually modulate sympathetic activity and induce hypertension remain unknown. The most accepted hypothesis is that angiotensin II, as any other circulating lipophobic substance, acts on neurons in specialized regions of the brain known as the

Circumventricular Organs (CVOs), which partially lack the normal BBB, in order to alter the function of other brain regions protected by this important barrier that “filters” what enters the CNS. As a result, activation of the CVOs triggers the local production of Ang II in brain areas protected by BBB, mainly the RVLM, which in turn alters sympathetic drive. Here we will discuss the recent advances regarding the mechanisms by which neurons in the RVLM are activated by Ang II/ROS and how Ang II-derived reactive oxygen species participate along the SFO-PVN-RVLM pathway in the context of neurogenic hypertension.

Reactive Oxygen Species in the Brain

The pathways for production of reactive oxygen species in mammalian cells have been revised elsewhere [8]. The first evidence that Ang II activates NADPH oxidase in vascular smooth muscle cells to produce ROS was presented by Griendling and colleagues [9]. More recently, accumulating evidence from our laboratory and others suggest that, like vascular cells, neurons also require ROS to carry out crucial functions related to central control of blood pressure [10-15].

There is compelling evidence that superoxide anion is necessary to elicit the vasopressor, bradycardic, and dipsogenic responses produced by intracerebroventricular (ICV) administration of Ang II in conscious mice [16]. It has also been shown that Ang II causes robust increases in superoxide production in cultured SFO neurons. In addition, adenoviral-mediated delivery of cytoplasmically targeted superoxide dismutase (SOD) selectively to the SFO abolishes the cardiovascular and dipsogenic actions of Ang II in normotensive mice and prevents

*Corresponding author: Valdir Andrade Braga, PhD, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, Caixa Postal 5009, 58.051-970, João Pessoa, PB, Brazil, Tel: (55) 83 3216 7511; E-mail: valdir@cbiotec.ufpb.br

Received May 22, 2012; Accepted July 24, 2012; Published July 26, 2012

Citation: Carvalho AS, Guimaraes DD, Dantas BPV, Carreiro JN, Mendes-Junior LG, et al. (2012) Brain Angiotensin-II-derived Reactive Oxygen Species: Implications for High Blood Pressure. J Hypertens 1:107. doi:10.4172/2167-1095.1000107

Copyright: © 2012 Carvalho AS, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ANEXO IV

Manuscript Details

Manuscript number	ANIREP_2016_13
Title	Resveratrol promotes protection and recovery of uterine contractions during hypoxia
Article type	Research Paper

Abstract

The effect of resveratrol in normoxic and hypoxic uteri was evaluated in this study. Resveratrol (1, 3, 10, 30, 100 μ M) relaxed the uterus of mice and decreased the amplitude and frequency of uterine contractions. The polyphenol (3, 10, 30 μ M) inhibited the oxytocin-induced cumulative contractions in the isolated uterus. The cumulative curves were shifted to the right in a non-parallel manner and with reduced Emax. The EC50 values increased from 9.2 ± 0.1 (control) to 3.1 ± 0.02 , 2.9 ± 0.01 and 1.5 ± 0.03 in the presence of resveratrol. Noncompetitive antagonism was the confirmed effect. Resveratrol exhibited a regenerative effect after hypoxia. With resveratrol (% contraction = 51.18 ± 4.5), the uterus was five times more functional than without (contraction % = 10.67 ± 1.6). We observed that in the presence of resveratrol, after 10 minutes of hypoxia, uterus was capable of approximately 75% contraction. We compared the effect of resveratrol with tempol and observed that resveratrol (% contraction = 51.18 ± 4.5) was three times better (% contraction = 19.73 ± 0.8). The effect of resveratrol (% contraction = 51.18 ± 4.5) was attenuated after incubation with tetraethyl ammonium (% contraction = 21.25 ± 1.9), indicating that potassium channels are involved in the effect of resveratrol in the hypoxic uterus. The effect of resveratrol (% contraction = 51.18 ± 4.5) was reduced following incubation with nifedipine (% contraction = 4.46 ± 1.4). We conclude that the beneficial effect induced by resveratrol in hypoxic uterus is mediated by activation of potassium channels, particularly KATP channels.

Keywords uterus; resveratrol; hypoxia; antioxidant; tocolytic; potassium channels

Taxonomy Animal Reproduction, Animal Pharmacology, Animal Nutrition

Corresponding Author Valdir Braga

Corresponding Author's Institution Universidade Federal da paraiba

Order of Authors Juliana Carreiro, Phillip Jobling, Dirk van Helden, Eugene Nalivaiko, Valdir Braga

Suggested reviewers Jacqueline Phillips, Eduardo Colombari, Deoclecio Chianca Jr