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

RAFAEL DE ALMEIDA TRAVASSOS

Caracterização do mecanismo de ação relaxante do alcaloide isoquinolínico 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquilina (MTHP) em aorta isolada de rato

João Pessoa - PB
2015

RAFAEL DE ALMEIDA TRAVASSOS

Caracterização do mecanismo de ação relaxante do alcaloide isoquinolínico 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquilina (MTHP) em aorta isolada de rato

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOLOGIA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo

João Pessoa - PB

2015

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

T779c Travassos, Rafael de Almeida.
Caracterização do mecanismo de ação relaxante do alcaloide isoquinolínico 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquilina (MTHP) em aorta isolada de rato / Rafael de Almeida Travassos. - João Pessoa, 2015.
132 f. : il.

Orientação: Demetrius Antonio Machado de Araújo.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Óxido nítrico. 3. Endotélio. 4. Canais de cálcio. 5. Canais de potássio. I. Araújo, Demetrius Antonio Machado de. II. Título.

UFPB/BC CDU 547.9(043)

Elaborado por Larissa Silva Oliveira de Mesquita - CRB-15/746

RAFAEL DE ALMEIDA TRAVASSOS

Caracterização do mecanismo de ação relaxante do alcaloide isoquinolínico 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquilina (MTHP) em aorta isolada de rato

Aprovado em: ____ /____ / ____

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientador

_____

Profa. Dra. Rosimeire Ferreira dos Santos
(Universidade Federal do Piauí)
Examinadora Externa

_____

Prof. Dr. Enéas Ricardo de Morais Gomes
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Externo

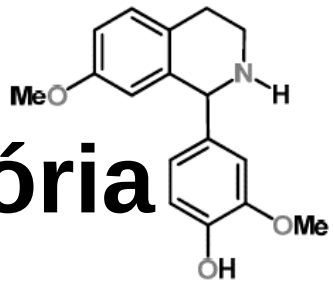
_____

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Interna

_____

Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Interna

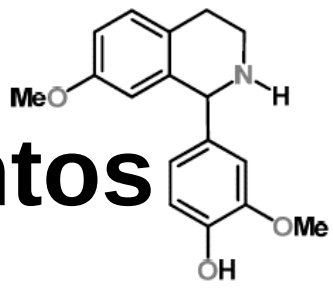
Dedicatória



Aos meus pais e irmã,

Antonio Eustaquio Resende Travassos, Martha Helena de Almeida Travassos e Renata de Almeida Travassos, que me apoiaram em todas as etapas desde o início, dando-me os suportes material e espiritual para que eu não desanimasse diante das adversidades. Por terem norteado minha formação ética e moral, que carregarei por toda minha vida. Exemplos de luta e coragem conseguiram fazer com que eu desse o melhor de mim naquilo que me propus a fazer.

Agradecimentos



Ao Prof. Dr. Demétrius Antonio Machado de Araújo por ter aceitado o desafio da minha orientação, pelos exemplos incontestáveis de mestre e de pesquisador dinâmico apaixonado pelo que faz.

Ao Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga pela abertura do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial para a realização dos experimentos em nível funcional.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva pelos inestimados anos de orientação, aprendizagem e amizade no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas.

Ao Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues por ceder a substância para a realização desse trabalho.

À Aliny Vasconcelos pela amizade e ajuda mais que fundamental nos experimentos eletrofisiológicos.

A todos os que formam o Laboratório Biotecnologia Celular e Molecular, em especial a Dra. Teresa Cristina (TCris) que está sempre disposta e sorridente.

A todos os colegas das turmas de Mestrado e Doutorado do PgPNSB, com quem convivi durante as disciplinas.

A José Crispim Duarte, pela forma que conduz o Biotério “Prof. Thomas George”, pelo auxílio técnico ao Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, sempre que solicitado.

Ao Sr. Luís C. Silva e Sr. Adriano S. Cordeiro, pelo trabalho executado no Biotério.

À Mônica R. da Silva, por toda a alegria que transmite e contagia a todos. Muito obrigado pelos diálogos confortantes, por sempre estar torcendo pelo nosso sucesso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte técnico-científico e financeiro.

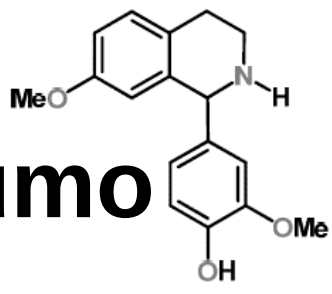
À Coordenação da Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB), em nome dos professores Dr. Joean Fechine Tavares e Dr. José Maria Barbosa Filho pela seriedade na condução do curso.

À Universidade Federal da Paraíba, instituição que me formou como profissional de Farmácia e responsável pelo meu aperfeiçoamento profissional.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a produção dessa Tese de Doutorado.

Muito Obrigado
Rafael de Almeida Travassos

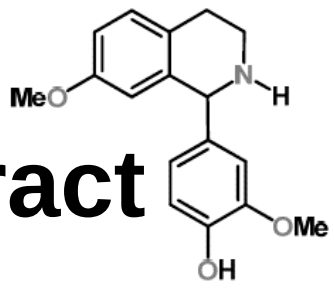
Resumo



RESUMO

Os produtos naturais são uma fonte rica de compostos para a descoberta de novos medicamentos. A importância destes produtos naturais na descoberta e inspiração de drogas é comprovada e sua síntese é de interesse significativo. Os alcaloides isoquinolínicos são comumente encontrados em uma variedade de produtos naturais e em compostos biologicamente ativos. O alcaloide isoquinolínico sintético inédito, 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MTHP), demonstrou que o MTHP apresentou atividade relaxante em artéria mesentérica superior de ratos normotensos através da via NO-GMPc. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar o mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato. As contrações isométricas foram monitoradas e os parâmetros de potência e eficácia relativa foram determinados a partir de curvas concentrações-resposta cumulativas. O MTHP relaxou de maneira significante e dependente de concentração os anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina na presença (CE_{50} = 2,7 ± 0,2 x 10^{-6} M) e na ausência (CE_{50} = 5,7 ± 1,1 x 10^{-5} M) de endotélio funcional, sendo 21 vezes mais potente na presença do endotélio. Na presença de L-NAME, ODQ e Indometacina, a potência relaxante do MTHP foi atenuada em 17, 24 e 36 vezes, respectivamente. Esses resultados sugerem a participação de fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE) no mecanismo de ação do alcaloide. No entanto, na presença de atropina, um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos, a potência relaxante do MTHP não foi alterada, descartando a participação desses receptores. MTHP relaxou os anéis de artéria aorta pré-contraídos com 30 ou 80 mM de KCl, sendo 3 vezes mais potente para KCl 30, sugerindo uma modulação positiva de canais para K^+. No entanto, em contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644, um ativador dos Ca_V1, MTHP relaxou a aorta de maneira significante e dependente de concentração, sugerindo um bloqueio do influxo de cálcio por esses canais e esse bloqueio se dá por um antagonismo do tipo não competitivo. Na presença de 10 mM de TEA^+, bloqueador não seletivos dos canais de K^+, MTHP teve sua potência atenuada cerca de 14 vezes, confirmando a participação desses canais. Na presença de glibenclamida e de 4-AP, a potência relaxante do MTHP não foi alterada, descartando os K_{ATP} e K_V. No entanto, na presença de 1 mM de TEA^+, de Apamina e $BaCl_2$, sua potência foi atenuada cerca de 12, 13 e 74 vezes respectivamente, sugerindo a participação dos BK_{Ca}, SK_{Ca} e K_{ir} no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP. Na presença do Y-27632, um inibidor da ROCK, a potência relaxante do MTHP não foi alterada, descartando a participação da via RhoA/ROCK. MTHP não interfere com a viabilidade e apoptose celular em miócitos de aorta de rato marcados com anexina-V e iodeto de propídeo. O MTHP diminuiu a fluorescência induzida por 300 mM de KCl em miócitos de aorta carregados com Fluo-3 e inibiu as correntes de Ba^{2+} através dos Ca_V. Estes resultados sugerem que o MTHP promove vasorelaxamento via FRDE, por uma modulação positiva da óxido nítrico sintase e das cicloxigenases, bem como a ativação da ciclase de guanilil solúvel. Além disso, o alcaloide diminui o influxo de cálcio por um bloqueio direto dos Ca_V-L, bem como por uma modulação positiva dos canais BK_{Ca}, SK_{Ca} e K_{ir}. Todos esses eventos levam a uma redução da $[Ca^{2+}]_i$ e consequente relaxamento do musculo liso vascular.

Palavras-chave: óxido nítrico, endotélio, canais de cálcio, canais de potássio.



Abstract

ABSTRACT

Natural products are a rich source of compounds for the discovery of new drugs. The importance of these natural products in the discovery and inspiration drug is proven and their synthesis is of significant interest. The isoquinoline alkaloids are commonly found in a variety of natural products and biologically active compounds. The novel synthetic isoquinoline alkaloid, 1- (3-methoxy-4-hydroxyphenyl) -7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (MTHP), showed relaxing activity on the superior mesenteric artery of normotensive rats by the NO-cGMP pathway. The aim of this study was to investigate the vasorelaxant action mechanism of MTHP in rat aorta. Isometric contractions were monitored, and relative potency and efficacy parameters were determined from cumulative concentration-response curves. The MTHP relaxed significantly and concentration-dependent manner the rings of aorta precontracted with phenylephrine in the presence (EC_{50} = 2.7 ± 0.2 x 10^{-6} M) and absence (EC_{50} = 5.7 ± 1.1 x 10^{-5} M) of a functional endothelium, being 21 times more potent in the presence of endothelium. In the presence of L-NAME, ODQ and indomethacin, the relaxing potency of MTHP was decreased at 17, 24 and 36 times, respectively. These results suggest the involvement of EDRF in alkaloid mechanism of action. However, in the presence of atropine, non-selective antagonist of muscarinic receptors, the relaxing potency of MTHP is not changed, discarding the involvement of these receptors. MTHP relaxed the aorta rings precontracted with 30 or 80 mM KCl, 3 times more potent for 30 KCl, suggesting upregulation of K^+ channels. However, on contractions induced by S-(-)-Bay K8644, an activator of Ca_V1, MTHP relaxed significantly and concentration-dependent manner, suggesting a blocking calcium influx through these channels and that locking takes place by antagonism of the non-competitive type. In the presence of glibenclamide and 4-AP, the relaxing potency of MTHP is not changed, discarding K_{ATP} and K_V in MTHP mechanism. However, in the presence of 1 mM TEA^+, apamin and $BaCl_2$, its potency was decreased about 12, 13 and 74 times, respectively, suggesting the involvement of BK_{Ca}, SK_{Ca} and K_{ir} on the vasorelaxant action mechanism of MTHP. In the presence of Y-27632, an inhibitor of ROCK, the relaxing potency of MTHP not changed, discarding the participation of the RhoA/ROCK pathway. MTHP does not interfere with cell viability and apoptosis in rat aorta calls labeled annexin-V and propidium iodide. The MTHP decreased fluorescence induced by 300 mM KCl in myocytes loaded with Fluo-3 and inhibited Ba^{2+} currents through Ca_V. These results suggest that MTHP promotes vasorelaxation via EDRF by a upregulation of NOS and cyclooxygenase, as well as activation of soluble guanylyl cyclase (GCs). Furthermore, the alkaloid decreases calcium influx by blocking a direct Ca_V-L, as well as by positive modulation of SK_{Ca}, BK_{Ca} and K_{ir} channels. All these events lead to a reduction of $[Ca^{2+}]_i$ and consequent relaxation of vascular smooth muscle.

Keywords: nitric oxide, endothelium, calcium channels, potassium channels.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de endotélio funcional, em aorta isolada de rato..... 67

Gráfico 2 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 10^{-4} M de L-NAME, em aorta isolada de rato com endotélio funcional..... 70

Gráfico 3 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 3×10^{-5} M de ODQ, em aorta isolada de rato com endotélio funcional..... 71

Gráfico 4 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 10^{-5} M de indometacina, em aorta isolada de rato com endotélio funcional..... 74

Gráfico 5 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 10^{-6} M de atropina, em aorta isolada de rato com endotélio funcional..... 75

Gráfico 6 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 30 mM (■) ou por 80 mM (■) de de KCl, em aorta isolada de rato com endotélio funcional..... 78

Gráfico 7 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN (■), 80 mM de KCl (■) ou 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (■), em aorta isolada de rato com endotélio funcional..... 81

Gráfico 8 - Curvas concentrações-resposta cumulativas ao S-(-)-Bay K8644 (A) na ausência (■) e na presença do MTHP nas concentrações de10^{-5} (□), 3 x 10^{-5} (●), 10^{-4} (○), 3 x 10^{-4} M (♦) em aorta isolado de rato com endotélio funcional (n = 3). O gráfico (**B**) representa o log (DR-1) em função do log da concentração molar do MTHP 83

Gráfico 9 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 10 mM de TEA^+, em aorta isolada de rato com endotélio funcional..... 86

Gráfico 10 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 10^{-5} M de glibenclamida, em aorta isolada de rato com endotélio funcional..... 89

Gráfico 11 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 10^{-5} M de glibenclamida, em aorta isolada de rato com endotélio funcional..... 90

Gráfico 12 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 1 mM de TEA^+, em aorta isolada de rato com endotélio funcional 92

Gráfico 13 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 5 x 10^{-8} M de apamina, em aorta isolada de rato com endotélio funcional..... 93

Gráfico 14 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 3 x10^{-5} M $BaCl_2$, em aorta isolada de rato com endotélio funcional 94

Gráfico 15 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 10^{-6} M de Y-27632, em aorta isolada de rato com endotélio funcional..... 97

Gráfico 16 - Porcentagem de miócitos viáveis (sem marcação) (**A**), inviáveis (marcados com PI) (**B**), em apoptose precoce (marcados com anexina V) (**C**) e em apoptose tardia ou necrose (marcação dupla) (**D**), na ausência (controle) e na presença de MTHP 100

Gráfico 17 - Curva concentração resposta ao MTHP sobre as correntes de Ba^{2+} em células musculares lisas de aorta de rato**.** Gráfico de barras mostrando os valores do pico de corrente na ausência (controle) e na presença do MTHP (30, 100, 300 e 1000 μM) **(A).** Curva concentração-resposta para o MTHP, mostrando a inibição dependente de concentração das correntes de Ba^{2+} **(B)** 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da Solução de Krebs 47

Tabela 2 - Solução de Krebs despolarizante com 30 mM de KCl..... 48

Tabela 3 - Solução de Krebs despolarizante com 80 mM de KCl..... 48

Tabela 4 - Composição da Solução Salina Fisiológica (SSF) para dissociação de células de artéria aorta..... 48

Tabela 5 - Composição da Solução Salina Fisiológica (SSF) com baixa concentração de cálcio para dissociação de células de artéria aorta 49

Tabela 6 - Composição da solução interna da pipeta para medir as correntes de cálcio 49

Tabela 7 - Composição da solução externa para medir as correntes de cálcio ... .49

Tabela 8 - Valores de CE_{50} (M) e E_{max} (%) do MTHP na ausência (controle) e na presença de L-NAME, ODQ, indometacina e atropina em aorta de rato com endotélio funcional..... 76

Tabela 9 - Valores de CE_{50} (M) e E_{max} (%) do MTHP na ausência (controle) e na presença de bloqueadores de canais para potássio em aorta de rato com endotélio funcional..... 95

Tabela 10 - Porcentagem da viabilidade, apoptose e necrose em miócitos isolados de aorta de rato 98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Núcleos isoquinolínico (**A**), tetrahidroisoquinolínico (**B**) e tetrahidroisoquinolínico 1-substituído (**C**) 30

Figura 2 - Rota biossintética para a formação da estrutura benzilisoquinolínica 32

Figura 3 - Reação de Picted-Spegler: síntese do 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi 1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MTHP) 34

Figura 4 – Mecanismo fármaco-mecânico de contração do músculo liso via $G_{q/11}$-$PLC_{\beta 1}$ 37

Figura 5 – Via de sensibilização ao cálcio para a manutenção da contração do músculo liso via $G_{12/13}$-ROCK 38

Figura 6 – Mecanismo fármaco-mecânico do relaxamento da musculatura lisa pela ativação da via G_s-AC-PKA e NO-CG_s-PKG..... 41

Figura 7 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato pré-contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença (**B**) de endotélio funcional..... 66

Figura 8 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença de L-NAME (**B**) e ODQ (**C**)..... 69

Figura 9 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença de indometacina (**B**) e atropina (**C**).....73

Figura 10 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 30 mM (A) e 80 mM (**B**) de KCl.....77

Figura 11 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN (**A**), 80 mM de KCl (**B**) e 3 x 10^{-7} M S-(-)-Bay K8644 (**C**).....80

Figura 12 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença de 10 mM de TEA^+ (**B**).....85

Figura 13 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença de 1 mM de 4-AP (**B**) e 10^{-5} M de glibenclamida (**C**).....88

Figura 14 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença de 1 mM de TEA^+ (**B**), 5 x 10^{-8} M de apamina (**C**) e 3 x 10^{-5} M de $BaCl_2$ (**D**).....91

Figura 15 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença de 10^{-6} M de Y-27632 (**B**).....96

Figura 16 – Dot plots representativos de miócitos isolados de aorta de rato. População (“gate”) (**A**); controle negativo (ausência de marcação) (**B**); Anexina-V/PI na ausência de MTHP (controle) (**C**); Anexina-V/PI na presença de 3x10^{-6} M (**D**) e 10^{-5} M (**E**) de MTHP..... 99

Figura 17 – Traçado representativo na ausência (controle, em preto) (**A**) e na presença de 1000 µM do MTHP (em laranja) (**B**) sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} em células musculares lisas de aorta de rato (n = 7) 102

LISTA DE ABREVIATURAS

$[(Ca^{2+})_4$-CaM]	complexo cálcio-calmodulina
4-AP	4-aminopiridina
AC	adenilil ciclase
AMPc	monosfofato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
BK_{Ca}	canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância
CaM	calmodulina
Ca_V	canais de cálcio dependentes de voltagem
Ca_V1	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 1
Ca_VL	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L
Ca_VT	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo T
CE_{50}	concentração de uma substância necessária para produzir 50% de seu efeito máximo
CI_{50}	concentração de uma substância necessária para inibir 50% do seu efeito máximo
COX	ciclo-oxigenase
CsCl	cloreto de césio
DAG	diacilglicerol
e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
GCs	guanilil ciclase solúvel
$G_{i/o}$	proteína G_i ou proteína G_o
$G_{q/11}$	proteína G_q ou proteína G_{11}

$G_{12/13}$	proteína G_{12} ou proteína G_{13}
G_s	proteína G_s
GPCR	receptor acoplado à proteína G
IP_3	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP_3 R	receptor de IP_3
K_{ATP}	canais de potássio sensíveis ao ATP
K_{ir}	canais de potássio retificadores de entrada
K_V	canais de potássio dependentes de voltagem
L-NAME	Nω nitro L arginina metil éster
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do óxido nítrico
PGs	prostaglandinas
PKA	proteína cinase dependente de AMPc
PKG	proteína cinase dependente de GMPc
PLC	fosfolipase C
PLA_2	fosfolipase A_2
PLD	fosfolipase D
PMCA	Ca^{2+}-ATPase da membrana plasmática
Rho	pequena proteína G ligante de GTP
RyR	receptor de rianodina
RS	retículo sarcoplasmático
SERCA	Ca^{2+}-ATPase do retículo endo-sarcoplasmático
SK_{Ca}	canais de potássio ativados por cálcio de pequena condutância
TEA^+	íon tetraetilamônio

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções que seguem o Sistema Internacional de Unidades (S.I.).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **27**

1.1 Produtos naturais, síntese orgânica e o planejamento racional de moléculas biologicamente ativas 28

1.2 Alcaloides isoquinolínicos 30

1.2.1 Alcaloide feniltetrahidroisoquinilínico 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MTHP) 33

1.3 Mecanismos de contração e relaxamento da musculatura lisa 34

2 OBJETIVOS **43**

2.1 Geral 44

2.2 Específicos 44

3 MATERIAL E MÉTODOS **45**

3.1 MATERIAL 46

3.1.1 Produto teste 46

3.1.2 Animais 46

3.1.3 Substâncias e reagentes 46

3.1.4 Soluções Nutritivas 47

3.1.5 Equipamentos 50

3.2 MÉTODOS 51

3.2.1 Preparação da solução-estoque da substância teste 51

3.2.2 Estudo do mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato 51

3.2.2.1 Avaliação do efeito vasorelaxante do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta isolada de rato na presença e na ausência de endotélio funcional 51

3.2.2.2 Avaliação da participação do endotélio vascular no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato 53

3.2.2.3 Avaliação da participação dos metabólitos da via da cicloxigenase ou dos receptores muscarínicos no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato 53

3.2.2.4 Avaliação do efeito vasorelaxante do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou 80 mM de KCl em aorta isolada de rato 54

3.2.2.5 Avaliação do efeito vasorelaxante do MTHP sobre a dinâmica do Ca^{2+} em aorta isolada de rato 54

3.2.2.5.1 Efeito do MTHP nas contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644 em aorta isolada de rato 54

3.2.2.5.2 Efeito do MTHP frente as concentrações cumulativas induzidas por S-(-)-Bay K8644 em aorta isolada de rato 55

3.2.2.6 Avaliação da participação do canais de potássio no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato 56

3.2.2.6.1 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina na ausência e na presença de TEA^{+} 55

3.2.2.6.2 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio....56

3.2.2.7 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina na ausência e na presença de Y-27632 57

3.2.3 Obtenção dos miócitos de aorta de rato 57

3.2.4 Avaliação do efeito do MTHP sobre a viabilidade e apoptose celular em miócitos isolados de aorta de rato 58

3.2.5 Eletrofisiologia 59

3.2.5.1 Avaliação do efeito do MTHP sobre as correntes de cálcio do tipo L, em miócitos de aorta de rato recém dispersos, na configuração “whole cell” 61

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA **61**

4 RESULTADOS **65**

4.1 Estudo do mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato 65

4.1.1 Avaliação do efeito vasorelaxante do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta isolada de rato na presença e na ausência de endotélio funcional 65

4.1.2 Avaliação da participação do endotélio vascular no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato 68

4.1.3 Avaliação da participação dos metabólitos da via da cicloxigenase ou dos receptores muscarínicos no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato 72

4.1.4 Avaliação do efeito vasorelaxante do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou 80 mM de KCl em aorta isolada de rato 76

4.1.5 Avaliação do efeito vasorelaxante do MTHP sobre a dinâmica do Ca^{2+} em aorta isolada de rato 79

4.1.5.1 Efeito do MTHP nas contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644 em aorta isolada de rato 79

4.1.5.2 Efeito do MTHP frente as concentrações cumulativas induzidas por S-(-)-Bay K8644 em aorta isolada de rato 82

4.1.6 Avaliação da participação do canais de potássio no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato 84

4.1.6.1 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina na ausência e na presença de TEA^{+}.....84

4.1.6.2 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio 87

4.1.7 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina na ausência e na presença de Y-27632 95

4.1.8 Avaliação do efeito do MTHP sobre a viabilidade e apoptose celular em miócitos isolados de aorta de rato.....98

4.1.9 Eletrofisiologia 101

4.1.9.1 Avaliação do efeito do MTHP sobre as correntes de cálcio do tipo L, em miócitos de aorta de rato recém dispersos, na configuração “whole cell” 101

5 DISCUSSÃO **104**

6 CONCLUSÕES **117**

REFERÊNCIAS **119**

ANEXOS 131

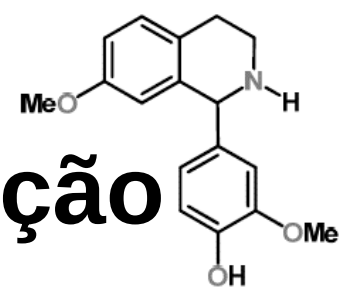
ANEXO A - Espectro de RMN ^{13}C-APT (125 MHz, CDCl3) do 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MTHP).....132

ANEXO B - Expansão do espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MTHP). 133

ANEXO C - Espectro de RMN de ^{1}H x ^{13}C– HMQC (500 MHz, $CDCl_3$) do 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MTHP).....134

ANEXO D - – Certidão de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do CBiotec CEUA No 0605/13.....135

Introdução



1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais, síntese orgânica e o planejamento racional de moléculas biologicamente ativas

Produtos naturais são uma fonte rica em compostos para a descoberta ou que servem de inspiração na obtenção de novos fármacos. É bem relatado na literatura que os produtos naturais derivados de animais, plantas e micro-organismos tem sido utilizados para o tratamento de diversas doenças humanas. A natureza produz a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Entretanto, é o reino vegetal que vem dando a contribuição mais significativa para o fornecimento de novas moléculas usadas na prevenção e tratamento de diversas patologias (MONTANARI; BOLZANI, 2001; MORA-PALE et al., 2014; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Com o desenvolvimento da química orgânica, que se deu em conjunto ao estudo das plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos com base científica, alguns princípios ativos de plantas medicinais foram isolados e identificados, a exemplo da morfina, quinina, cânfora e cocaína (MONTANARI; BOLZANI, 2001; WANG et al., 2011). O isolamento de produtos naturais em forma pura, no final do século XIX, foi decisivo para a indústria farmacêutica. (WANG et al., 2011; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Nas últimas décadas, a pesquisa de produtos naturais derivados de plantas tem progredido e despertado novamente o interesse da indústria farmacêutica. Aproximadamente 30% de todas os fármacos disponíveis como na terapia, são produtos naturais ou derivados deles (CALIXTO, 2005, FEHER; SCHMIDT, 2013).

Uma análise dos medicamentos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos, entre 1981 e 2010, mostrou que 34% desses medicamentos foram produtos naturais ou derivados diretos, a exemplo das estatinas, drogas anticâncer e imunossupressores (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Ainda nesse contexto e no mesmo período de 1981 a 2010, apenas 36% das 1073 novas substâncias químicas podem ser

classificadas como verdadeiramente sintéticas, ou seja, desprovida de inspiração natural na sua origem (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Um fator limitante na utilização de produtos naturais como matéria-prima para o desenvolvimento de novos medicamentos é o baixo rendimento ou as baixas concentrações das substâncias selecionadas, o que inviabiliza a produção e a comercialização desses produtos em larga escala. No entanto, a síntese orgânica destas substâncias e de seus derivados planejados, permite a identificação do grupamento farmacofórico e que se module o perfil farmacológico desejado (COSTA, 2009).

Faz-se então necessária a realização de um planejamento racional da molécula candidata a fármaco, que compreende as etapas de descoberta, otimização e desenvolvimento do protótipo. Entende-se por descoberta a etapa destinada à eleição do alvo terapêutico utilizando estratégias de modificação molecular da Química Medicinal. Dentre os métodos para a obtenção de novos fármacos, a modificação ou variação molecular, é a metodologia mais utilizada. Outras ferramentas que são úteis na descoberta de novas moléculas é o emprego de técnicas computacionais como a modelagem molecular e a “Quantitative Structure Activity Relationship” (QSAR) (LIMA, 2007).

A otimização compreende o melhoramento da molécula original, através de modificações planejadas que podem identificar os diferentes níveis de contribuição farmacofórica, fornecer informações sobre a conformação ativa e antecipar o índice de reconhecimento molecular pelo alvo selecionado. Todas essas informações visam o aumento da potência, eficácia, afinidade, redução da toxicidade, adequação do perfil farmacocinético e estabelecimento da “Structure Activity Relationship” (SAR). A fase de desenvolvimento do protótipo objetiva a otimização de suas propriedades farmacocinéticas e farmacotécnicas, viabilizando a forma farmacêutica e seu uso na clínica (MONTANARI; BOLZANI, 2001; LIMA, 2007).

Diversas estratégias estão disponíveis atualmente para a sintetize novos fármacos. Um aspecto interessante relacionado ao estudo de plantas medicinais é o uso dos compostos naturais biologicamente ativos como modelo para a síntese de protótipos análogos mais potentes e seletivos e de fácil obtenção (BARREIRO, 2002; MONTANARI, 1995).

Nesse contexto, a necessidade constante de novas substâncias terapêuticas mais eficazes, com baixa toxicidade e mais específicas, são os desafios que impulsionam as pesquisas na obtenção e descoberta de novos fármacos ou novas classes terapêuticas, a serem empregadas como ferramentas farmacológicas na pesquisa pré-clínica e/ou matéria-prima para a produção de novos medicamentos (BARREIRO, 2002).

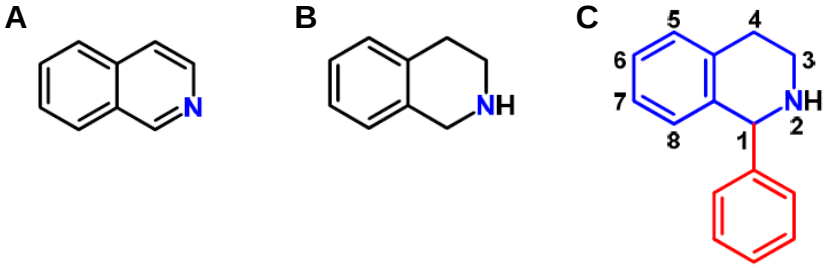
1.2 Alcaloides isoquinolínicos

Alcaloides são metabólitos secundários produzidos por uma variedade de organismos, como, bactérias, fungos, animais marinhos, microrganismos e plantas. São amplamente distribuídos na natureza, com diversas estruturas, possuindo importantes atividades farmacológicas (BHADRA; KUMAR, 2011).

O conceito mais aceito é o que define alcaloides como sendo substâncias orgânicas cíclicas contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo, com baixo peso molecular e que são divididos em subclasses por apresentarem vias de síntese não evolutivamente relacionadas (SIMÕES et al., 2004; BHADRA; KUMAR, 2011)

Inseridos nessa classe está a subclasse dos alcaloides isoquinolínicos, que são um dos grupos de compostos mais abundantes no reino vegetal, compreendendo aproximadamente 20 categorias. Os anéis isoquinolínico (Figura 1A), tetrahidroisoquinolínico (Figura 1B) e o tetrahidroisoquinolínico 1-substituído (Figura 1C) são estruturas comumente encontradas em uma variedade de produtos naturais e em compostos biologicamente ativos (GRUNDON, 1976; AMAT et al., 2010; AWUAH; CAPRETTA, 2010).

Figura 1 – Núcleos isoquinolínico (**A**), tetrahidroisoquinolínico (**B**) e tetrahidroisoquinolínico 1-substituído (**C**)



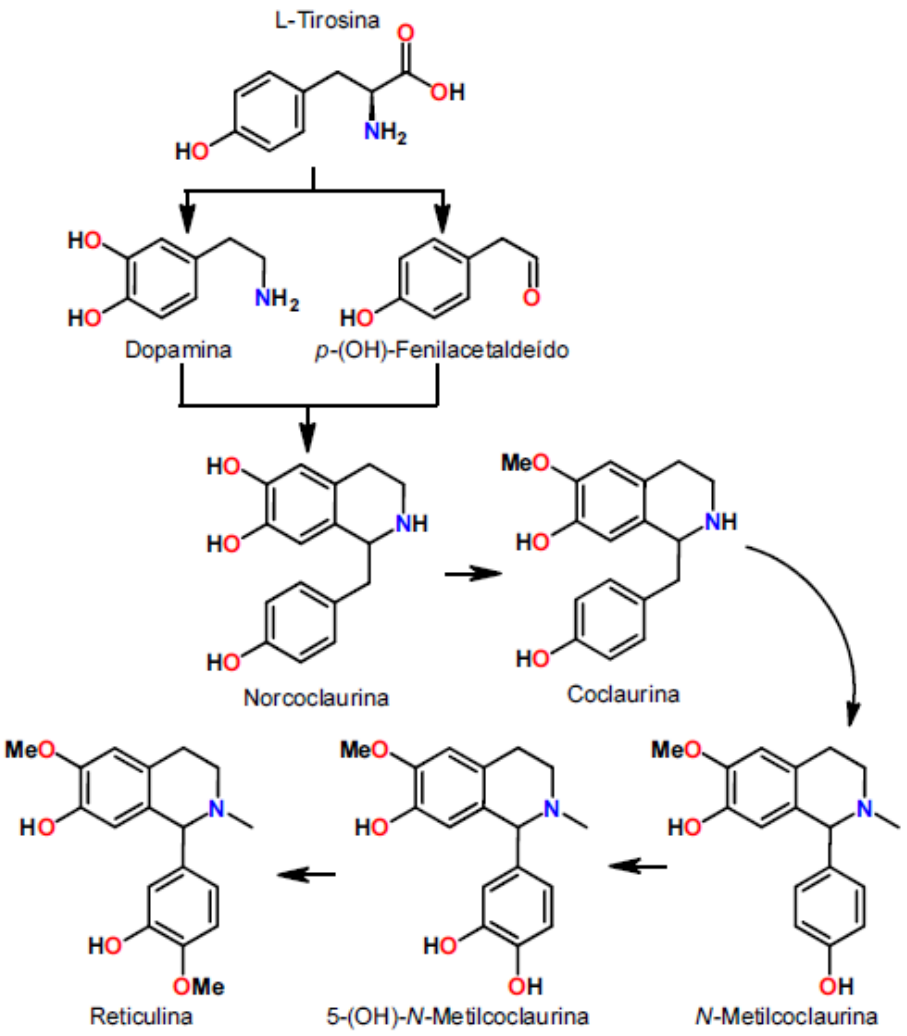
Fonte: Cordeiro, (2012).

A origem biossintética dessa subclasse de alcaloides se inicia pela rota do ácido chiquímico a partir de carboidratos. O ácido chiquímico é responsável pela formação dos aminoácidos aromáticos como a L-fenilalanina e L-tirosina, sendo esses os precursores dos alcaloides isoquinolínicos.

Os alcaloides isoquinolínicos, em grande parte deriva dos benzilisoquinolínicos, e a formação biossintética tem início com a reação de condensação de duas unidades fenólicas, ambas derivadas do aminoácido L-tirosina, a dopamina e o 3,4-di-hidróxi-fenilacetaldeído (Figura 2) (AMAT et al., 2010).

Várias atividades farmacológicas já são descritas para esses compostos. Dentre elas podemos destacar: antitussígena, analgésica, antidepressiva, cólicas estomacais e intestinais, relaxante muscular (BISSET, 1985; CORDELL; QUINNBEATTIE; FARNSWORTH, 2001); atividade inibitória do crescimento de células de carcinoma humano de nasofaringe (WARTHEN; GOODEN; JACOBSON, 1969); atividade citotóxica e antitumoral (SONNET; JACOBSON, 1971; MARTINEZ-VAZQUEZ et al.,2005); atividade antimicrobiana (SHOKEEN et al., 2005); antiprotozoária (TEMPONE et al., 2005), atividade citotóxica contra artemia salina; antiplaquetária (CHANG et al.,1998a; CHANG et al., 1998b); atividade anti-inflamatória por diminuir a expressão de COX2 *in vitro* e *in vivo* e inibição da ativação de macrófagos (KUO; CHI; LIU, 2004; LUO et al., 2010); diminuição da produção de NO por inibir a expressão da enzima óxido nítrico sintase em osteoblastos (CHAEA et al., 2007).

Figura 2 – Rota biossintética para a formação da estrutura benzilisoquinolínica



Fonte: Cordeiro, (2012).

Além dessas atividades, é relatada atividade hipotensora para vários alcaloides isoquinolínicos, como por exemplo a *discretamina,* isolada de *Duguetia magnolioidea* Maas, que produz efeito hipotensor por vasodilatação periférica via óxido nítrico/CGs em ratos normotensos não anestesiados (SILVA et al., 2009); a *beberina*, alcaloide isoquinolínico encontrado em várias famílias como Berberidaceae, Papaveraceae, Fumaraceae, Menispermaceae dentre outras (PREININGER, 1986), que apresenta efeito hipotensor e bradicárdico em ratos quando administrada por via intravenosa (CHUN; YIP; LAU, 1979); o *CPU-23*

(1-{1-[(6-metoxi)-naft-2-il]}-propil-2-(1-piperidine)-acetil-6,7-dimetoxi-1,2,3,4,-tetr

ahidroisoquinolina), uma tetrahidroisoquinolina substituída que possui efeito hipotensor dose-dependente em ratos *Sprague-Dawley*, espontaneamente hipertensos (SHR), Wistar Kioto (WKI) e normotensos (DONG et al., 1992) e a *DL-tetrahidropalmatina*, um alcaloide encontrado nas plantas da espécie *Carydalis* que ao ser administrado intravenosamente em ratos anestesiados induz hipotensão, bradicardia e diminuição na liberação de serotonina hipotalâmica (5-HT) (CHUEH et al.,1995).

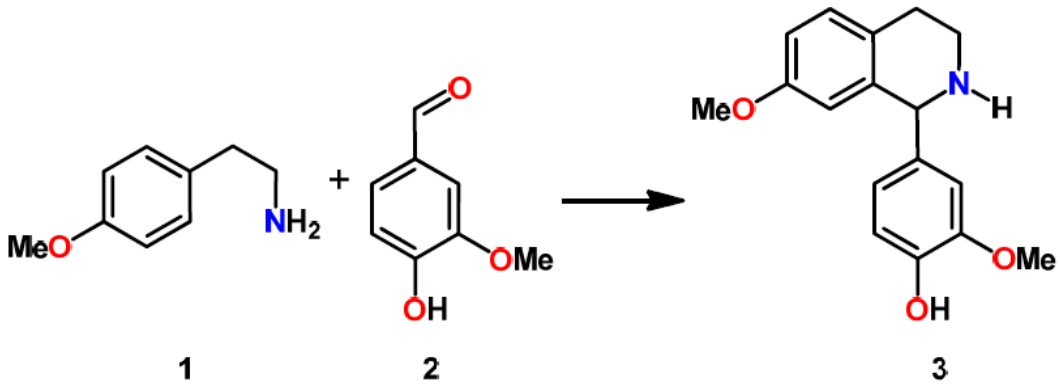
A importância destes produtos naturais na descoberta, inspiração e síntese de novas drogas é significativa para a indústria de insumos farmacêuticos (STÖCKIGT et al., 2011). Em especial, as tetrahidroisoquinolinas 1-substituídas, embora simples, são de grande interesse não apenas como alcaloides em si, mas também como intermediários chave, úteis na síntese de alcaloides mais complexos (AMAT et al., 2010).

1.2.1 Alcaloide tetrahidroisoquinilínico 1-substituído 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MTHP)

O alcaloide tetrahidroisoquinolínico 1-substituído, objeto do nosso estudo, foi obtido por síntese orgânica através da reação de Picted-Spegler utilizando uma 4-metoxifeniletilamina (**1**) e uma vanilina (**2**), obtendo-se como produto final uma isoquinolina inédita o 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (**3**) (Figura 3).

O produto da reação foi purificado, obtendo-se 3,5 g do alcaloide (93,45% de rendimento). A substância apresentava-se na forma de um líquido oleoso de coloração amarelo claro. A caracterização deste composto inédito se deu através da análise dos espectros de RMN ^{1}H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) uni e bidimensional (Anexo A, B e C) (CORDEIRO, 2012).

Figura 3 - Reação de Picted-Spegler - síntese do 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi 1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MTHP)



Fonte: Cordeiro, (2012).

Cordeiro (2012) e colaboradores observaram algumas atividades farmacológicas para esse alcaloide: atividade anti-inflamatória (em camundongos) por redução significativa da liberação de IL-1, IL-6, IL-10 e TNF-α em modelo de peritonite induzida por zimosan e atividade hipotensora em ratos normotensos não anestesiados mediado por relaxamento de artéria mesentérica superior via NO/GMPc e produtos das cicloxigenases.

1.3 Mecanismos de contração e relaxamento da musculatura lisa

A regulação da contratilidade do músculo liso é um mecanismo biológico fundamental que subjaz funções fisiológicas, como por exemplo a capacidade de resposta das vias aéreas, motilidade gastrointestinal e a manutenção da pressão arterial.

Vários distúrbios clínicos estão associados à desregulação da atividade do músculo liso, como a doença isquêmica cardíaca, hipertensão, enxaqueca, retenção urinária, parto pré-maturo, constipação intestinal, dismenorreia, diarreia, asma, dentre outros (KIM et al., 2008; WEBB, 2003; WIRTH; OFFERMANNS, 2012). Dessa forma, ensaios farmacológicos utilizando como modelo experimental a musculatura lisa, contribuem para o desenvolvimento de futuros fármacos e/ou ferramentas farmacológicas que venham a auxiliar no tratamento das diversas doenças.

Uma fator essencial para se compreender a regulação da contratilidade dessa musculatura é a concentração intracelular de íons cálcio ($[Ca^{2+}]_i$). O Ca^{2+} desempenha um papel essencial em diversos processos biológicos, como a regulação enzimática, expressão gênica, tráfego de proteína, proliferação celular, apoptose e a coordenação do acoplamento excitação-contração dos músculos esquelético, cardíaco e liso (CARAFOLI; BRINI, 2007).

No músculo liso, assim como nos outros tipos musculares, o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ é inexorável à contração, no entanto, os elementos contráteis da musculatura lisa tem propriedades fisiológicas, bioquímicas e celulares únicas em comparação aos músculos estriados (KIM et al., 2008).

Em geral, existem duas fontes deste íon na célula: uma extracelular que permite o influxo de Ca^{2+}, 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).

A principal porta de entrada para o Ca^{2+} que vem do meio extracelular são os canais para cálcio abertos por voltagem (Ca_V) (CATTERALL, 2011), os quais estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis, sendo formado por 5 subunidades: a subunidade α1, que é a maior delas e constitui o poro do canal, além de possuir o sensor de voltagem que controla sua abertura; as subunidades α2 e δ estão ligadas por uma ponte dissulfeto, formando um dímero, a subunidade β que é intracelular e a subunidade γ transmembranar (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011; CATTERALL, 2011).

A entrada de cálcio em músculo liso visceral é controlada pelo potencial de membrana, uma vez que este determina a abertura dos Ca_V (SHMIGOL; EISNER; WRAY, 1998; WRAY et al., 2001). Os Ca_V1 (ativados por alta voltagem e sensíveis à diidropiridinas) são os principais, e muitas vezes o único tipo de canal para Ca^{2+} expresso em muitos músculos lisos (THORNELOE; NELSON, 2005; WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005).

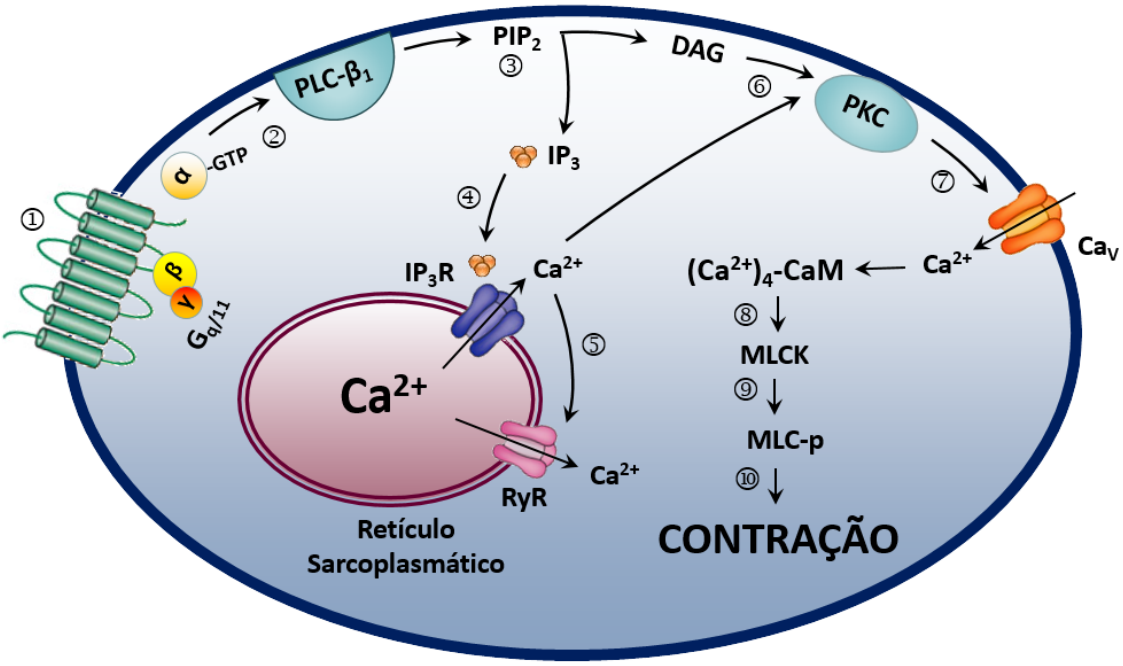
No músculo liso, a contração pode ser alcançada quer através da despolarização da membrana (acoplamento eletromecânico), levando a um aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e contração muscular, ou induzida por um agonista (acoplamento fármaco-mecânico) que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A ativação de receptores acoplados à proteína $G_{q/11}$ presentes na membrana plasmática de músculos lisos pode ativar

a fosfolipase C-β_1 (PLC-β_1) promovendo a hidrólise do 4,5 bisfosfato de fosfatidil inositol (PIP_2) em diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3), que estimulam a liberação de Ca^{2+} do RS via receptor de IP_3 (IP_3R) (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001), liberação de cálcio induzida por IP_3 (IICR). Além disso, no RS há os receptores de rianodina (RyR), que são canais de Ca^{2+} ativados pelo próprio Ca^{2+} previamente liberado via IP_3R num processo denominado de liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} (CICR) (Figura 4) (SANDERS, 2001; McFADZEAN; GIBSON, 2002; MCHALE et al., 2006).

O primeiro alvo para o Ca^{2+} aumentado no meio citosólico é a calmodulina (CaM), um membro da família de proteínas ligantes de Ca^{2+} do músculo liso. A ligação de 4 íons Ca^{2+} a CaM proporciona uma mudança conformacional nesta proteína e sua subsequente interação com a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). Esta associação resulta em uma mudança conformacional no complexo [$(Ca^{2+})_4$-CaM-MLCK] expondo o sítio catalítico da MLCK. Essa série de eventos leva à ativação da MLCK e subsequente fosforilação na Ser^{19} da subunidade regulatória da cadeia leve da miosina de 20 kDa (MLC20). A fosforilação da MLC20 é o evento regulatório para a produção da força em musculatura lisa e permite a ativação do mecanismo de ciclização das pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina, com consequente desenvolvimento da contração (Figura 4) (GARRET; GRISHAM, 1995; REMBOLD, 1996; OGUT; BROZOVICH, 2003).

O músculo liso possui um sistema de manutenção da contração mesmo em baixa $[Ca^{2+}]_i$ através de um balanço entre processos de fosforilações/desfosforilações observados na via alternativa, conhecida como via de sensibilização ao cálcio, que contribui para a contração do músculo liso, a modulação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP). Esse mecanismo se dá a partir da pequena proteína G (RhoA) e o seu alvo Rho cinase (ROCK) que desempenham um papel importante na regulação da atividade da MLCP. A MLCP consiste em 3 subunidades: uma catalítica, PP1c; uma regulatória, MYPT1 e outra de 20 kDa de função ainda desconhecida (SOMLYO; SOMLYO, 2003; MURTHY, 2006; COLE, 2011). A ROCK, uma cinase de serina/treonina, fosforila a subunidade de ligação da miosina da MLCP, inibindo a sua atividade e, assim, promovendo o estado fosforilado da MLC.

Figura 4 – Mecanismo fármaco-mecânico de contração do músculo liso via $G_{q/11}$-$PLC_{\beta 1}$



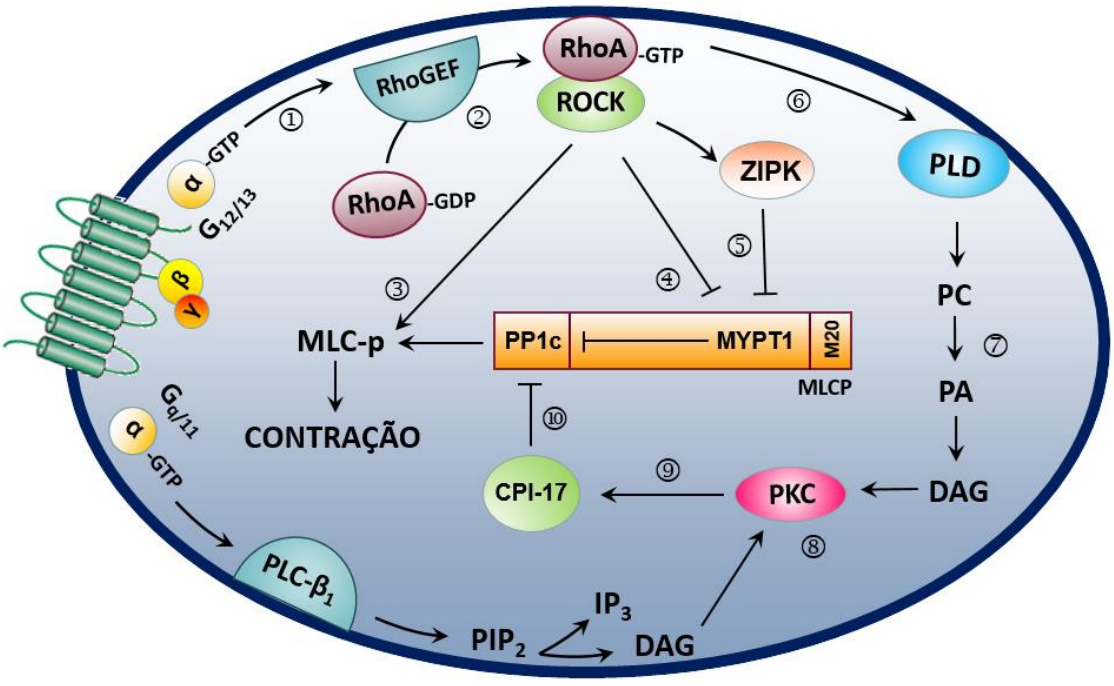
(1) O agonista se liga ao receptor GPCR na membrana plasmática e as proteínas $G_{q/11}$ trocam GDP por GTP em sua subunidade α, tornando-se ativa; **(2)** a subunidade $\alpha_{q/11}$ GTP ligado, ativa a enzima PLC-β_1; **(3)** a PLC-β_1 hidrolisa o fosfolipídio de membrana PIP_2 em IP_3 e DAG; **(4)** o IP_3 ativa o IP_3R na membrana do RS, liberando Ca^{2+} dos estoques; **(5)** o Ca^{2+} liberando ativa o RyR aumentando a liberação de Ca^{2+} para o citoplasma; **(6)** o Ca^{2+} liberado pelo RS se liga na PKC e a transloca para a membrana, onde é ativada pelo DAG; **(7)** a PKC uma vez ativada, fosforila o Ca_V na membrana da célula promovendo um influxo de Ca^{2+} para o citoplasma; **(8)** o aumento global de $[Ca^{2+}]_i$ favorece a formação do complexo $(Ca^{2+})_4$-CaM que ativa a MLCK; **(9)** a MLCK ativada fosforila a MLC; **(10)** a MLC fosforilada favorece sua interação com os filamentos finos de actina, desencadeando a contração do músculo liso.

Fonte: Autor, (2015).

Inibidores farmacológicos da ROCK bloqueiam a sua atividade por competir com o sítio de ligação do GTP na enzima (UEHATA et al., 1997; CHITALEY; WEBER; WEBB, 2001). A inibição da MLCP é iniciada pela ativação da RhoA, dependente das proteínas G heterotriméricas $G_{12/13}$ e $G_{q/11}$, via uma pequena proteína G associada a um fator de troca de nucleotídios de guanina (RhoGEFs). A RhoGEFs faz com que a RhoA troque GDP por GTP e uma vez RhoA-GTP ligado estimula a sua cinase associada (ROCK) e uma fosfolipase D (PLD) específica para fosfatidilcolina, liberando ácido fosfatídico que é desfosforilado a diacilglicerol (DAG) levando a ativação sustentada da proteína cinase C (PKC) (EXTON, 1997; MURTHY, 2006). A ativação da PKC pode

resultar da ativação, dependente de $G_{q/11}$, da fosfolipase C (PLC) que forma DAG a partir da hidrólise do 4,5-bisfosfato de inositol (PIP_2). A ROCK e a PKC agem isoladas ou cooperativamente para inibir a atividade da MLCP (SOMLYO; SOMLYO, 2003). Embora a ROCK fosforile diretamente a MLC20 (TOTSUKAWA et al., 2000), sua ação principal na sensibilização ao cálcio parece ser a inibição da MLCP, esta ação se dá pela fosforilação direta dos resíduos de Thr^{697} e Thr^{855} da subunidade regulatória da fosfatase da miosina (MYPT1) (COLE; WELSH, 2001; SOMLYO; SOMLYO, 2003). A ROCK pode também ativar uma proteína cinase independente de Ca^{2+}, mais conhecida como proteína cinase de interação "zipper" (ZIPK). A ZIPK pode fosforilar diretamente a MLC20, no entanto seu alvo principal é o resídio de Thr^{696} da MYPT1 o qual é fosforilado inibindo a ação da MLCP (MURTHY, 2006). A PKC pode fosforilar o resíduo de Thr^{38} da proteína inibitória endógena CPI-17, aumentando assim sua potência inibitória sobre a subunidade catalíca da MLCP (PP1c) por mais de 1.000 vezes, inibindo assim a ação da fosfatase (Figura 5) (SOMLYO; SOMLYO, 2003; MURTHY, 2006; FEHER, 2012).

Figura 5 – Via de sensibilização ao cálcio para a manutenção da contração do músculo liso via $G_{12/13}$-ROCK



(1) O agonista se liga ao receptor GPCR na membrana plasmática e as proteínas $G_{12/13}$ trocam GDP por GTP em sua subunidade α, tornando-se ativa. A subunidade $\alpha_{12/13}$ GTP ligado, ativa a RhoGEF; **(2)** a RhoGEF promove a troca de GDP por GTP da RhoA, sendo translocada para a membrana e ativando a ROCK, que tem vários alvos intraceluares: **(3)** fosforila a MLC; **(4)** inibe a MLCP via MYPT1; **(5)** fosforila a ZIPK que inibe a MLCP via MYPT1. **(6)** A RhoA-GTP ligado também pode ativar a PLD; **(7)** a PLD cliva a PC em PA, o qual é desfosforilado a DAG ativando a PKC; **(8)** o DAG também pode ser formado através da via $G_{q/11}$-$PLC_{\beta 1}$ aumentando a ativação PKC; **(9)** a PKC uma vez ativa, fosforila a CPI-17 ativando-a; **(10)** a CPI-17 inibe a ação da MLCP via PP1c. Todos esses eventos favorecem a MLC em seu estado fosforilado, e consequentemente a sua interação com os filamentos finos de actina, mantendo a contração.

Fonte: Autor, (2015).

O movimento dos íons K^+ através de canais localizados na membrana plasmática 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, levando a uma despolarização (KNOT et al., 1996).

No músculo liso vascular, o tônus basal pode ser regulado por vários tipos de canais para K^+, entre eles: canais para K^+ abertos por voltagem (K_V); canais para potássio de grande condutância ativados por cálcio (BK_{Ca}); canais para K^+ de pequena condutância ativados por Ca^{2+} (SK_{Ca}); canais para K^+ retificadores de entrada (K_{ir}); canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), entre outros (THORNELOE; NELSON, 2005; STOTT; JEPPS; GREENWOOD, 2014). Sendo que, a repolarização ou hiperpolarização de membrana ocorre devido, principalmente, a ativação dos BK_{Ca}, que são ativados quando a $[Ca^{2+}]_i$ se eleva na ordem de μM, e a ativação dos K_V, em decorrência à despolarização de membrana (LEDOUX et al., 2006). Tal ativação leva a uma redução no influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V por sua inibição e, consequentemente, a uma redução da $[Ca^{2+}]_i$ (LEDOUX et al., 2006).

O relaxamento no músculo liso ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de uma substância que estimula a inibição do mecanismo contrátil. Independente do mecanismo, o processo requer uma diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ e aumento da atividade da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) (SOMLYO et al., 1994).

Quando falamos em relaxamento de musculatura lisa vascular, a produção de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF) é de extrema importância. Inúmeros trabalhos descrevem a participação do endotélio vascular em relaxamentos induzidos por uma gama de substâncias químicas (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; FURCHGOTT, 1983, MONCADA et al., 1993).

Eicosanoides, como as prostaciclinas (PGI_2), derivadas do ácido araquidônico (AA) são constitutivamente produzidos pelas células endoteliais e regulam a função vascular. Ao se ligar em seus receptores acoplados a proteína G_s no músculo liso vascular, ativam a adenilil ciclase (AC), resultando na metabolização do ATP em monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (TRIGGLE; DING, 2011).

Um outro EDRF e uma das moléculas sinalizadoras mais importantes sintetizadas pela célula endotelial é o óxido nítrico (NO), um radical livre, gasoso, lipofílico, incolor, com uma meia vida relativamente curta (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). A produção de NO, promovida pela conversão enzimática do aminonoácido L-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS), é constituída de duas etapas. A primeira é uma N-hidroxilação do grupo guanidina da L-arginina, formando um intermediário N^{ω}-hidróxi-L-arginina (L-NOHA) na presença de O_2 e cofatores essenciais como NAD(P)H e (6R-)5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina (BH4), na segunda etapa, L-NOHA é metabolizada em L-citrulina e NO (RAFIKOV, et. al. 2011).

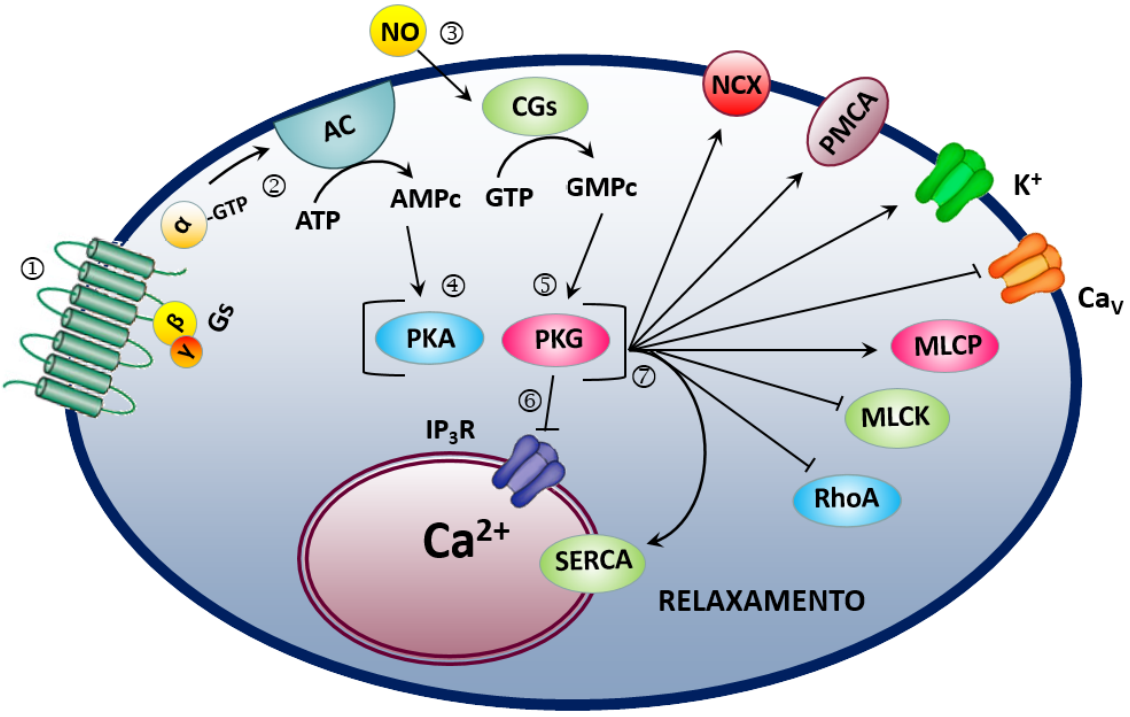
Devido à sua característica lipofílica, o NO funciona como um mensageiro parácrino e/ou autócrino que rapidamente se difunde através das células da musculatura lisa adjacentes, e pode atuar estimulando a ciclase da guanilil solúvel (CGs) citoplasmática, metabolizando o GTP em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (FURCHGOTT, 1983; VANHOUTTE; BOULANGER, 1995).

O aumento na [GMPc] ativa a proteína cinase G (PKG), enquanto que o aumento na [AMPc] ativa tanto a PKA como a PKG, quando em altas concentrações (REMBOLD, 1996).

Ambas as proteínas cinases (PKA e PKG) com sua atividade aumentada irão favorecer o relaxamento da musculatura lisa por diversos mecanismos, dentre os quais podemos destacar: (**1**) aumento na atividade da Ca^{2+}-ATPase

tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA) através da PKG ou da PKA, levando a um aumento do seqüestro e da saída de Ca^{2+}, respectivamente, diminuindo assim a $[Ca^{2+}]_i$; (**2**) diminuição da formação do IP_3, levando a uma diminuição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares; (3) redução da $[Ca^{2+}]_i$ pelo AMPc-PKA ou GMPc-PKG por diminuir o influxo de Ca^{2+} indiretamente por hiperpolarização via abertura de canais para potássio ou por ação direta nos Ca_V1 bloqueando-os, (**4**) diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ por estimulação do trocador Na^+/ Ca^{2+} (NCX) (BLAUSTEIN, 1989), (**5**) redução da liberação de Ca^{2+} do RS pela PKG, mas não pela PKA através da fosforilação dos IP_3R (MURTHY, 2006; BERRIDGE, 2009a); (**6**) inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo $[(Ca^{2+})_4$-CaM], causando uma redução nos níveis de MLC20 fosforilada (REMBOLD, 1996); (**7**) inativação da RhoA por fosforilação do resíduo Ser^{188}, translocando-a para o citosol; (**8**) fosforilação do resíduo de Ser^{695} da MYPT1 impedindo a fosforilação do resíduo de Thr^{695} pela ROCK; (**9**) fosforilação do telokin (ativador endógeno da MLCP), sendo esse um mecanismo independente da RhoA (MURTHY, 2006) (Figura 6).

Figura 6 – Mecanismo fármaco-mecânico do relaxamento da musculatura lisa pela ativação da via G_s-AC-PKA e NO-CG_s-PKG



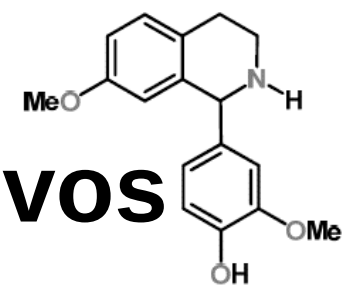
(1) O agonista se liga ao receptor GPCR na membrana plasmática e a proteína G_s troca GDP por GTP em sua subunidade α, tornando-se ativa. **(2)** A subunidade α_s GTP ligado, ativa a adenilil ciclase (AC) que converte ATP em AMPc. **(3)** O NO estimula a CGs que converte GTP em

GMPc. Os nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc, ativam suas proteínas cinases correspondentes, PKA **(4)** e PKG **(5)**. **(6)** Fosforilação do IP_3R pela PKG mas não pela PKA. **(7)** Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: aumentam a atividade da SERCA e PMCA, ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX), ativam canais de K^+ e inibem os Ca_V; todos esses eventos levam a diminuição do cálcio intracelular. Além disso PKA e PKG podem ativar MLCP via MYPT1, inibir a MLCK e a RhoA. Todos esses eventos impedem a fosforilação da MLC e consequentemente a sua interação com os filamentos finos de actina, favorecendo o relaxamento.

Fonte: Autor, (2015).

Diante dessa premissa e de diversos dados da literatura que demonstram o desbalanço entre a vasoconstricção simpática e o vasorelaxamento dependente de NO serem decisivos na manutenção da pressão arterial e que o NO predomina em vasos de larga condutância, a exemplo da aorta (ARNAL et al., 1993; ZICHA et al., 2001; PECHÁNOVÁ et al., 2004); associado ao fato de que Cordeiro (2012) em triagem farmacológica preliminar evidenciou que o MTHP promove relaxamento dependente de endotélio em leito mesentérico de ratos normotensos, decidimos investigar um possível efeito desse alcaloide isoquinolínico, em aorta isolada de rato.

Objetivos



2 OBJETIVOS

2.1 Geral

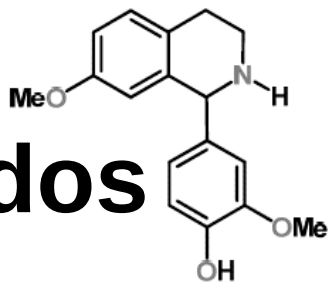
Caracterizar o efeito vasorelaxante do alcaloide isoquinolínico, o 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (MTHP), em aorta isolada de rato.

2.2 Específicos

Elucidar o mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta de rato avaliando:

- os fatores relaxantes derivados do endotélio e a participação das vias NO-GMPc e PGI_2/AMPc;
- o envolvimento dos receptor muscarínicos no endotélio vascular;
- a participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_V);
- a modulação de canais de potássio e seus subtipos envolvidos;
- o envolvimento da via de sensibilização ao cálcio - RhoA/ROCK;
- a interferência do MTHP sobre a viabilidade celular em miócitos de aorta;
- o efeito do MTHP sobre as correntes de Ca^{2+} através dos Ca_V.

Material e Métodos



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Produto teste

O alcaloide isoquinolínico, 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (MTHP), foi sintetizado e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues do Departamento de Biotecnologia do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da UFPB.

3.1.2 Animais

Eram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvergicus*) pesando entre 250 e 350 g, todos procedentes do Biotério Prof. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba.

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada à base de ração com acesso à água *ad libitum*, com ventilação e temperatura (21 ± 1 ºC) controladas. Os experimentos eram executados no período de 08 às 20 h, sendo todos os procedimentos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do CBiotec (CEUA/CBiotec), certidão n° 0605/2013 (Anexo D).

3.1.3 Substâncias e reagentes

O cloridrato de L(-)-fenilefrina (FEN); cloridrato de acetilcolina (ACh); 4-aminopiridina (4-AP); cloreto de bário ($BaCl_2$); sulfato de atropina; tetraetilamônio (TEA^+); apamina; cloridrato de glibenclamida; o *N*ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME); ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3,α-quinoxalino-1-ona); Y-27632; indometacina; S-(-)-1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-3-ácido piridinecarboxílico (BAYK 8644); ácido etilenoglicol-bis-(β-aminoetiléter) *N, N, N', N'*-tetraacético (EGTA); ácido (N-[2-

hidrohietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]) (HEPES); dimetilsulfóxido (DMSO); ditiotreitol; papaína; hialuronidase; albumina sérica bovina (BSA) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O iodeto de propídio, anexina V e o Fluo-3 AM foram obtidos da Invitrogen™ Life Thecnologies, Molecuar Probes® (EUA). A colagenase foi obtida da Worthington Biochemical Corporation (EUA).

O fosfato monossódico anidro (NaH_2PO_4), a glicose ($C_6H_{12}O_6$), o fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), o cloreto de sódio (NaCl), o sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4.7H_2O$), o cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2.2H_2O$), o bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) e o cloreto de potássio (KCl) foram obtidos da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) foi obtida da White Martins (Brasil).

A indometacina foi dissolvida juntamente com o bicarbonato de sódio (NaHCO3) a 5% em água destilada, o ODQ e a glibenclamida foram dissolvidos com DMSO e o S-(-)-Bay K8644 foi dissolvido em etanol absoluto. As demais soluções estoques foram dissolvidas em água destilada. As concentrações utilizadas de $NaHCO_3$ (5%), DMSO e etanol absoluto nas soluções não apresentaram qualquer efeito sobre as preparações controle (dados não demonstrados).

3.1.4 Soluções Nutritivas

De acordo com os experimentos realizados, eram utilizadas soluções nutritivas (ajustada em pH 7,4), aeradas com mistura carbogênica e mantidas a 37 °C, cujas composições estão discriminadas nas tabelas a seguir:

Tabela 1 - Composição da Solução de Krebs

Composição	Concentração (mM)
NaCl	118,0
KCl	4,6
KH_2PO_4	1,1
$MgSO_4$	5,7
$CaCl_2$	2,5
$NaHCO_3$	25,0
Glicose	11,0

Tabela 2 - Solução de Krebs despolarizante com 30 mM de KCl

Composição	Concentração (mM)
NaCl	92,6
KCl	30,0
KH_2PO_4	1,1
$MgSO_4$	5,7
$CaCl_2$	2,5
$NaHCO_3$	25,0
Glicose	11,0

Tabela 3 – Solução de Krebs despolarizante com 80 mM de KCl

Composição	Concentração (mM)
NaCl	42,6
KCl	80,0
KH_2PO_4	1,1
$MgSO_4$	5,7
$CaCl_2$	2,5
$NaHCO_3$	25,0
Glicose	11,0

Tabela 4 – Composição da Solução Salina Fisiológica (SSF) para dissociação de células de artéria aorta

Composição	Concentração (mM)
NaCl	137,0
KCl	5,6
$MgCl_2$	1,0
$CaCl_2$	2,6
NaH_2PO_4	0,44
Na_2HPO_4	0,42
$NaHCO_3$	4,17
Glicose	5,0
HEPES	10,0

Tabela 5 – Composição da Solução Salina Fisiológica (SSF) com baixa concentração de cálcio para dissociação de células de artéria aorta

Composição	Concentração (mM)
NaCl	137,0
KCl	5,6
$MgCl_2$	3,5
$CaCl_2$	0,05
NaH_2PO_4	0,44
Na_2HPO_4	0,42
$NaHCO_3$	4,17
Glicose	5,0
HEPES	10,0

Tabela 6 – Composição da solução interna da pipeta para medir as correntes de cálcio.

Composição	Concentração (mM)
CsCl	130,0
EGTA	10,0
HEPES	10,0
$MgCl_2$	4,0
TEA-CI	10,0

Tabela 7 – Composição da solução externa para medir as correntes de cálcio

Composição	Concentração (mM)
NaCl	126,0
$BaCl_2$	20,0
NaCl	126,0
HEPES	10,0
Glicose	10,0
CsCl	5,4

3.1.5 Equipamentos

Para o registro das contrações isométricas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (10 mL) e conectados a transdutores de força isométricos modelo TRI201AD Panlab (Cornellà, BCN, Espanha) acoplados a um amplificador Quad Bridge modelo Powerlab 4/35 ADInstruments. Este, por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição de dados com o software LabChart® 7 Pro versão 7.3.1 para aquisição e análise dos dados. O sistema continha uma bomba termostática modelo LE 13206 Panlab Harvard Apparatus, que controlava a temperatura das cubas.

Os valores de pH eram aferidos através de um pHmetro digital modelo PG2000 GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil).

As substâncias eram pesadas em balança analítica modelo FA-2104N CETALC (São Paulo, SP, Brasil) e os animais em balança semianalítica GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil).

A determinação da viabilidade celular e apoptose em miócitos isolados de aorta de rato foi utilizado um citômetro de fluxo FACSCanto II BD Immunocytometry Systems (San Jose, CA, EUA).

Os estudos eletrofisiológicos foram realizados através da técnica de “patch-clamp” (HAMILL et al., 1981), utilizando um amplificador de “patch-clamp” modelo EPC 10 *USB* (HEKA Eletronics Inc., Alemanha), um microscópio invertido, modelo Axio Vert.A1 (Carl-Zeiss, Alemanha), uma mesa pneumática antivibração (TMC, EUA), micromanipulador hidráulico de alta precisão (Narishige, Japão) e gaiola de Faraday (TMC, EUA). Para aquisição dos dados foi utilizado o software PatchMaster® v2x32 e Fitmaster® (HEKA Elektronik, Alemanha).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação da solução-estoque da substância teste

O alcaloide sintético isoquinolínico, 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (MTHP), era dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) formando uma solução de concentração de 10^{-1} M (solução-estoque), que foi estocada a -20 °C, sendo diluída em água destilada de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. A concentração final de DMSO nas cubas nunca excedeu 1% (v/v), nessa concentração o DMSO não possui efeito relaxante significante em aorta isolada de rato.

3.2.2 Estudo do mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato

3.2.2.1 Avaliação do efeito vasorelaxante do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta isolada de rato na presença e na ausência de endotélio funcional

Os ratos eram eutanasiados por decapitação em guilhotina. Os anéis aórticos de 3-5 mm eram obtidos livres de tecido conjuntivo e adiposo a partir da aorta torácica. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis eram suspensos individualmente por uma haste de aço inoxidável em cubas para banhos de órgãos isolados (10 mL) contendo solução de Krebs a 37 °C. e aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2). As preparações eram estabilizadas por um período de 60 min, durante o qual eram mantidas sob uma tensão de repouso de 1 g. Durante esse período, a solução fisiológica era renovada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização, era induzida uma contração com fenilefrina (FEN) na concentração de 3×10^{-7} M. A integridade do endotélio vascular era verificada pela adição de acetilcolina (ACh) (10^{-6} M) à cuba, durante a fase tônica da primeira contração induzida por FEN (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Anéis sem endotélio funcional eram obtidos pela remoção

mecânica da camada endotelial, através do atrito provocado por haste metálica em contato com a parede interna do vaso. O endotélio vascular era considerado funcional, quando apresentavam relaxamento induzido por ACh igual ou superior a 50% (em relação à força máxima da contração inicial) e a retirada do endotélio era confirmada quando não havia relaxamento, ou esse era inferior a 10%. Os experimentos foram realizados com anéis de aorta na presença e na ausência de endotélio funcional (AJAYA; GILANI; MUSTAFAA, 2003).

Após a verificação do endotélio funcional, as preparações eram lavadas a cada 15 min durante um período total de 30 min e então uma segunda contração era induzida pela adição de 3×10^{-7} M de FEN. Durante a fase tônica dessa segunda contração, o MTHP (10^{-8} a 3×10^{-4} M) era adicionado à cuba de maneira cumulativa, sendo avaliado o seu efeito relaxante na presença e na ausência de endotélio funcional. As concentrações foram adicionadas em incremento de 3 vezes para obter-se as concentrações que produzissem de 0% até seu efeito máximo.

Após o efeito máximo (E_{max}) induzido pelo MTHP ser atingido, a solução do banho era trocada a cada 15 min, durante um período total de 30 min. Decorrido esse tempo, uma terceira contração era induzida por FEN, onde era observado se a tensão máxima alcançada era de magnitude similar à primeira contração, o que é indicativo da reversibilidade do efeito relaxante do MTHP. A reversibilidade foi rotineiramente observada para assegurar que o relaxamento do tecido não foi ocasionado por um possível dano ao órgão.

O relaxamento produzido por MTHP foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por FEN, onde o relaxamento máximo era obtido quando a tensão registrada era reduzida aos níveis basais. Os valores de CE_{50} (concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo) para o MTHP foram calculados por regressão não linear a partir das curvas de relaxamento na presença e na ausência de endotélio funcional.

3.2.2.2 Avaliação da participação do endotélio vascular no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato

Após o período de estabilização, os anéis aórticos com endotélio funcional eram obtidos e montados como descrito no item 3.2.2.1. Antes da obtenção da segunda contração induzida por FEN, os anéis eram incubados por 30 minutos, com 10^{-4} M de L-NAME, um inibidor competitivo da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) (REES et al., 1990; MONCADA; HIGGS, 1993) ou durante 15 min com 10^{-5} M de ODQ, um bloqueador seletivo da ciclase de guanilil solúvel (CGs) (GARTHWAITE et al., 1995). Após o período de incubação, os anéis aórticos eram contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN e sob o componente tônico desta contração era adicionado cumulativamente a cuba concentrações crescentes do MTHP (10^{-8} a 10^{-3} M). O relaxamento foi obtido como descrito anteriormente e a potência relaxante da substancia era avaliada comparando-se os valores de CE_{50} na ausência e na presença dos bloqueadores.

3.2.2.3 Avaliação da participação dos metabólitos da via da cicloxigenase ou dos receptores muscarínicos no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato

Após o período de estabilização, os anéis aórticos, com endotélio funcional, eram obtidos e montados como descrito no item 3.2.2.1. Antes da obtenção da segunda contração induzida por FEN, os anéis eram incubados por 15 min com 10^{-5} M de indometacina, um inibidor não seletivo das cicloxigenases (SIGTHORSSON et al., 2000) ou com 10^{-6} M de atropina, um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos (BARNES, 2000). Após o período de incubação, os anéis aórticos eram contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN e sob o componente tônico desta contração era adicionado cumulativamente a cuba concentrações crescentes do MTHP (10^{-8} a 10^{-3} M). O relaxamento foi obtido como descrito anteriormente e a potência relaxante da substancia era avaliada comparando-se os valores de CE_{50} na ausência e na presença dos bloqueadores.

3.2.2.4 Avaliação do efeito vasorelaxante do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou 80 mM de KCl em aorta isolada de rato

Após o período de estabilização, os anéis aórticos, com endotélio funcional, eram obtidos e montados como descrito no item 3.2.2.1. Após 30 minutos decorridos da primeira contração, uma segunda resposta contrátil era induzida por soluções de Krebs despolarizantes com 30 ou 80 mM de KCl (SORDI et al., 2011). Após a formação do componente tônico da contração o MTHP (10^{-8} a 10^{-3} M) era adicionado cumulativamente a cuba. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por 30 ou 80 mM de KCl e sua eficácia (E_{max}) foi obtida para contrações induzidas por solução de 30 ou 80 mM de KCl em anéis de aorta com endotélio funcional. O relaxamento foi obtido como descrito anteriormente e a potência relaxante da substância era avaliada comparando-se os valores de CE_{50}.

3.2.2.5 Avaliação do efeito vasorelaxante do MTHP sobre a dinâmica do Ca^{2+} em aorta isolada de rato

3.2.2.5.1 Efeito do MTHP nas contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644 em aorta isolada de rato

Após o período de estabilização, os anéis aórticos, com endotélio funcional, eram obtidos e montados como descrito no item 3.2.2.1. Após 30 minutos decorridos da primeira contração induzida por FEN a aorta era parcialmente despolarizada pela adição de 10 mM de KCl (por 10 minutos), concentração capaz de potencializar o efeito de ativadores de canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_V) (ZHENG et al., 1991). Em seguida, uma contração era induzida pela adição de 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644, um ativador dos Ca_V1 por se ligar em sua subunidade α1 (FERRANTE et al., 1989). Após a formação do componente tônico da contração era adicionado cumulativamente a cuba concentrações crescentes do MTHP (10^{-8} a 10^{-3} M). O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo S-(-)-Bay K8644.

3.2.2.5.2 Efeito do MTHP frente as concentrações cumulativas induzidas por S-(-)-Bay K8644 em aorta isolada de rato

Após o período de estabilização, os anéis aórticos, com endotélio funcional, eram obtidos e montados como descrito no item 3.2.2.1. Após 30 minutos decorridos da primeira contração induzida por FEN a aorta era parcialmente despolarizada pela adição de 10 mM de KCl (por 10 minutos), concentração capaz de potencializar o efeito de ativadores de canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_V) (ZHENG et al., 1991). Em seguida, uma curva concentração-resposta cumulativa ao S-(-)-Bay K8644, um ativador dos Ca_V1 por se ligar em sua subunidade α1, era obtida (controle). Após lavagem da preparação e uma nova estabilização de 30 min, o MTHP era adicionado a cuba nas concentrações de 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4} e 3 x 10^{-4} M, para observarmos o tipo de bloqueio exercido nos Ca_V1. Após 15 minutos de incubação com o MTHP, adicionava-se 10 mM de KCl por 10 minutos e em seguida um nova curva cumulativa ao S-(-)-Bay K8644 era obtida.

O tipo de antagonismo exercido pelo MTHP foi analisado com base nos valores da inclinação do gráfico de Schild (ARUNLAKSHANA; SCHILD, 1959) e sua potência pelo valor do pD'_2, que é definido como logaritmo negativo (na base 10) da concentração molar de um antagonista que reduz a 50% uma resposta máxima de um agonista (VAN ROSSUM, 1963).

3.2.2.6 Avaliação da participação do canais de potássio no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato

3.2.2.6.1 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina na ausência e na presença de TEA^+

Após o período de estabilização, os anéis aórticos, com endotélio funcional, eram obtidos e montados como descrito no item 3.2.2.1. Antes da obtenção da segunda contração induzida por FEN, os anéis eram incubados com 10 mM de TEA^+ por 10 minutos. Nessa concentração, TEA^+ é um bloqueador não seletivo dos canais de potássio (NIU et al., 2008). Após transcorrido o tempo necessário para o bloqueio de todos os tipos de canais de potássio era induzida

uma nova contração com 3 x 10^{-7} M de FEN e com a formação do componente tônico era adicionado o MTHP (10^{-8} a 10^{-3} M) de forma cumulativa.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pela FEN. Os valores de CE_{50} foram obtidos como descrito anteriormente e comparados na ausência e na presença bloqueador.

3.2.2.6.2 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio

Após o período de estabilização, os anéis aórticos, com endotélio funcional, eram obtidos e montados como descrito no item 3.2.2.1. Antes da obtenção da segunda contração induzida por FEN, os anéis eram incubados, em experimentos distintos, com TEA^+ (1 mM por 30 minutos) que nessa concentração é um bloqueador seletivo dos BK_{Ca} (HAN et al., 2009), $BaCl_2$ (3 x 10^{-5} M por 30 minutos), um bloqueador seletivo dos K_{IR} (TEP-AREENAN; KENDALL; RANDALL, 2003), 4-AP (1 mM por 15 minutos), um bloqueador seletivo dos K_V (NEVALA et al., 2001; RATTMANN et al., 2009), apamina (5 x 10^{-8} M por 20 minutos), um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} (ISHIDA et al., 1999), glibenclamida (10^{-5} M por 30 minutos), um bloqueador seletivo dos canais K_{ATP} (ERSOY et al. , 2008) e $BaCl_2$ (3 x 10^{-5} M por 30 minutos), um bloqueador seletivo dos K_{ir} (ANDERSSON et al., 2000; TEP-AREENAN; KENDALL; RANDALL, 2003), após os tempos necessários para o bloqueio de cada tipo de canal de potássio era induzida uma contração com 3 x 10^{-7} M de FEN e após a formação do componente tônico dessa contração era adicionado o MTHP (10^{-8} a 10^{-3} M) de forma cumulativa.

O relaxamento produzido pelo MTHP foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de CE_{50} foram calculados como descrito anteriormente e comparados na ausência e na presença de cada bloqueador, em preparações distintas.

3.2.2.7 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina na ausência e na presença de Y-27632

Após o período de estabilização, os anéis aórticos, com endotélio funcional, eram obtidos e montados como descrito no item 3.2.2.1. Antes da obtenção da segunda contração induzida por FEN, os anéis eram incubados com Y-27632 (10^{-6} M por 10 minutos) um inibidor seletivo da Rho cinase (RhoK) (CHITALEY; WEBB, 2002). Após o período de incubação, os anéis aórticos eram contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN e sob o componente tônico desta contração era adicionado cumulativamente a cuba concentrações crescentes do MTHP (10^{-8} a 10^{-3} M). O relaxamento foi obtido como descrito anteriormente e a potência relaxante da substancia era avaliada comparando-se os valores de CE_{50} na ausência e na presença do bloqueador.

3.2.3 Obtenção dos miócitos de aorta de rato

As células musculares lisas dissociadas enzimaticamente foram provenientes da artéria aorta de ratos como descrito no item 3.2.2.1. Os segmentos eram livres de tecido conjuntivo e adiposo, mantidos sob aeração carbogênica durante todo procedimento. Todo o processo ocorreu em uma solução fisiológica (SSF baixo-Ca^{2+}). O procedimento para dissociação descrito por Xu et al., (1999) foi adaptado como detalhado a seguir. Uma vez dissecado, o tecido foi transferido para um tubo Falcon (15 mL), contendo papaína (0,7 mg/mL), albumina sérica bovina (BSA - 1 mg/mL) e ditiotreitol (DTT- 1 mg/mL) que foram diluídos em 3 mL de SSF normal, permanecendo 30 minutos em temperatura de 37 °C. Em seguida, as amostras foram transferidas para a um segundo tubo Falcon (15 mL) contendo 3 mL de solução SSF baixo-Ca^{2+}, colagenase (1 mg/mL), hialuronidase (0,9 mg/mL) e BSA (1 mg/mL) para a digestão do tecido por um período entre 15 e 30 minutos. Transcorrido esse tempo o tecido era centrifugado (1200 rpm) por 1 minuto e 30 segundos. O sobrenadante era desprezado e o *pellet* formado era lavado e ressuspenso com a ajuda de uma pipeta Pasteur em 1 ou 3 mL de SFF baixo-Ca^{2+}.

3.2.4 Avaliação do efeito do MTHP sobre a viabilidade celular em miócitos isolados de aorta de rato

Para avaliarmos o efeito do MTHP sobre a viabilidade celular e apoptose em miócitos de aorta de rato foi utilizado um citômetro de fluxo FACSCanto II BD.

Os miócitos foram obtidos como descrito no item 3.2.3. Em seguida foi realizada a quantificação dos miócitos por mililitro em câmara de Neubauer para padronizar o número de células (aproximadamente 10^6 células/mL) nas marcações analisadas.

As células foram visualizadas em gráfico de pontos (*dot plot*) bidimensional onde foram analisados os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), em escala linear, para identificação das populações celulares e exclusão de *debris*. Em seguida, realizou-se um "gate" eletrônico único em torno das células de interesse para excluir células inviáveis da região analisada. Além disso, foram feitos *dot plots* para análise em escala logarítmica de cada marcador. Cada amostra foi lida em duplicata e, de cada uma, foram adquiridos 20.000 eventos.

Para determinação de viabilidade e apoptose celular foi utilizada a marcação com o reagente Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen™ Molecular® Probes, EUA), composto por anexina-V conjugada ao fluoróforo Alexa Fluor® e do corante intracitoplasmático iodeto de propídeo (PI: *Propidium Iodide*).

Este ensaio consiste na ligação eficiente da proteína anexina-V aos resíduos do fosfolipídio fosfatidilserina (FS). Na célula viável, estes resíduos se encontram na face interna da membrana plasmática. Entretanto, quando o processo de morte celular programada (apoptose) é iniciado, estes resíduos são rapidamente translocados para a face externa da membrana, permitindo a ligação da proteína anexina-V. O PI, marcador padrão de viabilidade, é usado para distinguir células viáveis de não-viáveis, uma vez que células viáveis com membrana intacta são impermeáveis ao corante, enquanto que membranas de células mortas ou danificadas são permeáveis. Além disso, o PI é usado em conjunto com a anexina-V para permitir a identificação de células em estágio inicial e final de apoptose (VAN ENGELAND et al., 1996).

Portanto, neste ensaio é possível determinar a proporção de células vivas (anexina-V^-/PI^-); células em estágio inicial de apoptose onde ocorre apenas a exposição da FS na face externa da membrana plasmática com consequente marcação com a anexina-V (anexina-V^+/PI^-); células em estágio tardio de apoptose ou em necrose onde além da exposição da FS, a membrana plasmática sofre colapso e se torna permeável ao PI, fazendo com que a célula possua dupla marcação (anexina-V^+/PI^+).

Os miócitos (6 x 10^4 células) foram transferidos para tubos de citometria previamente identificados, onde foram acrescentados:

Tubo 1: Células + 20 µL *Binding Buffer* (controle negativo)
Tubo 2: Células + 5 µL de anexina V-Alexa Fluor
Tubo 3: Células + 5 µL de PI
Tubo 4: Células + Anexina V/PI (5 µL de cada marcador)
Tubo 5: Células + AnexinaV/PI + **MTHP** CE_{50} (3 x 10^{-6} M)
Tubo 6: Células + AnexinaV/PI + **MTHP** 3 x CE_{50} (10^{-5} M)

As células foram incubadas por 15 min na ausência e por 30 min na presença da droga teste, a temperatura ambiente (25 °C), na ausência de luz. Por fim, 400 µL *Binding Buffer* 1X foram adicionados a cada tubo e as amostras analisadas em citômetro de fluxo no período máximo de 1 hora. Os dado foram adquiridos com auxílio do programa FACSDiva e analisados através da porcentagem de células encontradas em cada um dos quadrantes do *dot plot* pelo programa FlowJo vX.0.7.

3.2.5 Eletrofisiologia

Para os registros de "patch-clamp" os miócitos de aorta de rato foram obtidos como descrito no item 3.2.3 e foram realizados no modo “whole-cell voltage clamp". (HAMILL et al, 1981).

Os registros eletrofisiológicos foram obtidos sob a platina de um microscópio invertido (Carl-Zeiss, Alemanha), posicionado sobre uma mesa antivibratória com suspensão pneumática (TMC, EUA). Um micromanipulador hidráulico de alta precisão (Narishige, Japão) foi usado para movimentação do

eletrodo responsável pelo registro das correntes, e outro micromanipulador foi utilizado para posicionar a pipeta de perfusão, contendo a solução controle ou o MTHP. O uso da gaiola de Faraday (TMC, EUA) minimizou as interferências elétricas no sistema preparado.

As correntes foram obtidas por meio de um amplificador (HEKA 10, Alemanha), filtradas por filtro passa-baixa a 2,0 kHz, convertidas em sinais digitais com frequência de 10 kHz. Correntes de vazamento ("leakage") foram removidas com auxílio do protocolo P/4, no qual quatro pulsos de amplitude igual a ¼ do pulso teste foram aplicados e a resposta de corrente, foi então, somada e subtraída da corrente do pulso teste. As células que apresentaram valores altos para a resistência em série (acima de 5 MΩ) ou que não se mantiveram estáveis, não foram utilizadas na análise. As correntes foram adquiridas e analisadas em um computador PC-compatível usando-se o "software" PatchMaster© e Fitmaster© (HEKA Elektronik, Alemanha).

As micropipetas de vidro foram fabricadas por meio de um estirador ("puller") vertical de 2 estágios (Narishige, Japão). As mesmas foram preenchidas com solução interna de pipeta (Tabela 6) ajustada para pH 7,2 com CsOH. Foram utilizadas resistências entre 2.5-5 MΩ para as micropipetas. Um fino fio de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) foi introduzido na micropipeta e o conjunto foi acoplado a um pré-amplificador ("headstage") que, por sua vez, estava conectado à entrada do amplificador. As células foram banhadas por uma solução externa (Tabela 7), ajustada para pH 7,4 com NaOH. Todas as soluções foram submetidas a um filtro com porosidade ("mesh") de 0,22 μm. A osmolaridade das soluções foi ajustada com glicose, para valores de aproximadamente 310 mOsm para a solução da micropipeta e de 330 mOsm para a solução (externa) de banho.

Os gigaselo (resistência ≥ 1GΩ) foram obtidos por meio de uma suave sucção feita no interior da micropipeta, e em seguida por meio de uma sucção mais vigorosa as células encontravam-se na configuração "wholle-cell". Esta última permitiu romper o pequeno fragmento de membrana que separava a solução interna, contida na pipeta, do citoplasma da célula em estudo. O aumento brusco do transiente capacitivo indicou a obtenção da configuração de "wholle-cell". Todos os registros foram realizados em células submetidas a um sistema de perfusão (Dagan, EUA) que consistiu de uma pipeta de vidro com

aproximadamente 100 µm de diâmetro interno que estava conectada à saída de uma válvula solenoide, alimentada por reservatórios de 5 mL, um deles contendo solução fisiológica sem adição do MTHP (controle) e outros compartimentos contendo a solução externa adicionada com concentrações testes do composto.

Com auxílio da válvula solenoide foi possível selecionar os compartimentos que estavam ligados à pipeta de perfusão, estabelecendo assim, um fluxo do seu conteúdo. Os fluxos (~0,1 mL/min) foram impulsionados pela força da gravidade.

3.2.5.1 Avaliação do efeito do MTHP sobre as correntes de cálcio do tipo L, em miócitos de aorta de rato recém dispersos, na configuração "whole-cell"

Foi caracterizado o efeito do MTHP sobre as correntes de cálcio através dos canais de cálcio sensíveis a voltagem do tipo L (Ca_V-L). As correntes através do Ca_v-L foram avaliadas usando o Ba^{2+} (I_{Ba}) como íon carreador. Os miócitos de aorta recém dispersos foram obtidos como descrito no item 3.2.3, mantidos em um potencial de "holding" de -80 mV e as correntes de Ba^{2+} foram registradas, utilizando o protocolo no qual a célula era despolarizada para +10 mV, com a frequência de estimulação 0,1Hz.

As correntes de bário foram medidas na situação controle, com a célula perfundida por solução extracelular (Tabela 7) e, na situação teste, perfundindo-se a célula com solução extracelular contendo 30, 100, 300 e 1000 µM do MTHP.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos foram expressos como média ± e.p.m. e analisados estatisticamente empregando-se o teste t (não-pareado) ou análise de variância (ANOVA) one-way seguido do pós-teste de Bonferroni e as diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando os valores de $p < 0,05$.

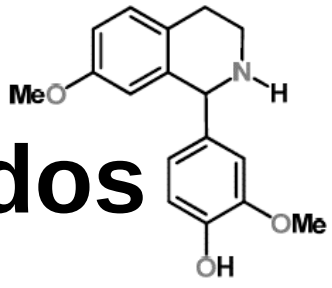
Para os experimentos *in vitro*, usando órgãos isolados, as curvas mostrando a relação concentração-resposta de uma substância foram ajustadas por uma regressão não-linear descrita pela equação:

$$Y = min + (max-min)/(1+10^{((Log(CE50-X)*S)})$$

Onde “X” é o logaritmo na base 10 da concentração molar da substância testada, “Y” é a resposta relaxante da substância testada em percentagem, “min” é o menor efeito assumido para “Y”, “max” é o maior efeito assumido para “Y” e “S” é o valor da constante de Hill (MOTULSKY; CHRISTOPOULOS, 2003). A partir dessa equação, foram calculados os valores de CE_{50} (concentração molar de uma substância em que ela é capaz de causar 50% de seu efeito máximo), servindo como parâmetro de potência relativa de uma substância, e o E_{max} (valor médio, em percentagem, do efeito máximo obtido por uma substância em relação ao maior valor possível num dado tecido), servindo como parâmetro de eficácia relativa entre duas substâncias (NEUBIG et al., 2003).

Os registros eletrofisiológicos foram normalizados em pA/pF usando o programa FitMaster® (HEKA Instruments, Alemanha) sendo extraída a media ± e.p.m. de um número significativo de células.

Resultados



4 RESULTADOS

4.1 Estudo do mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato

4.1.1 Avaliação do efeito vasorelaxante do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta isolada de rato na presença e na ausência de endotélio funcional

O MTHP (10^{-8} a 3×10^{-4} M, n = 5) relaxou de maneira significante e dependente de concentração os anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina na presença ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,2 \times 10^{-6}$ M, $R^2 = 0,98 \pm 0,003$) e na ausência ($CE_{50} = 5,7 \pm 1,1 \times 10^{-5}$ M, $R^2 = 0,99 \pm 0,004$) de endotélio funcional (Figura 7; Gráfico 1, A e B; Tabela 8), com eficácia (E_{max}) de 96,3 ± 2,2 e 91,7 ± 2,2%, respectivamente.

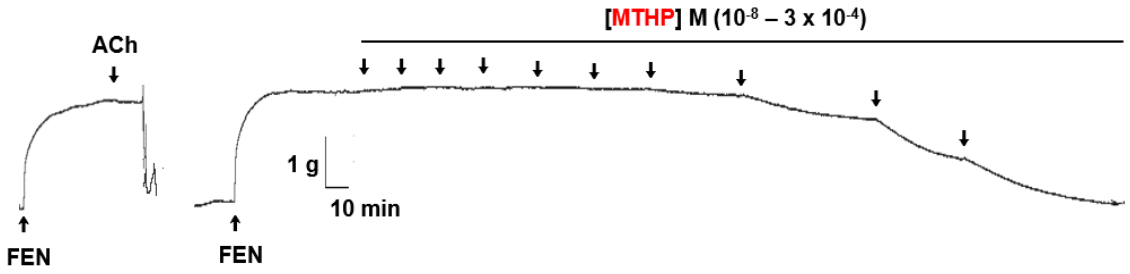
Comparando-se os valores de CE_{50} podemos observar que o alcalóide foi cerca de 21 vezes mais potente em relaxar os anéis de aorta na presença de endotélio funcional.

Uma vez que os parâmetros de potência (CE_{50}) e de eficácia (E_{max}) do MTHP foram melhores quando os anéis de aorta apresentavam endotélio funcional, todos os experimentos a seguir foram realizados nessas condições.

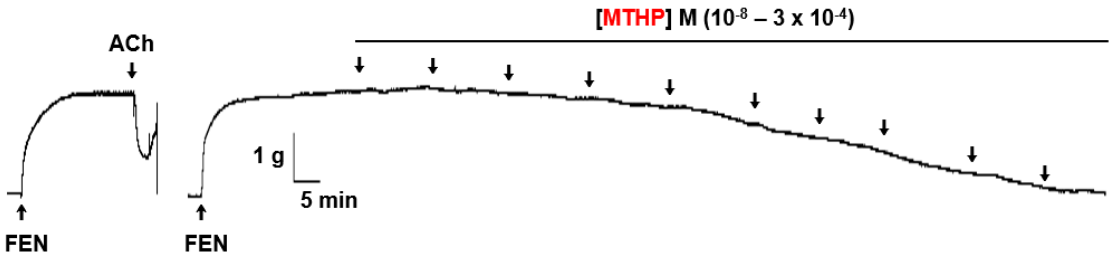
Em até 1 h após a retirada do MTHP da cuba, o agente contrátil produziu contrações com a mesma amplitude em relação a contração inicial, indicando que o efeito do alcaloide é reversível neste órgão.

Figura 7 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato pré-contraídos com 3×10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença (**B**) de endotélio funcional.

A

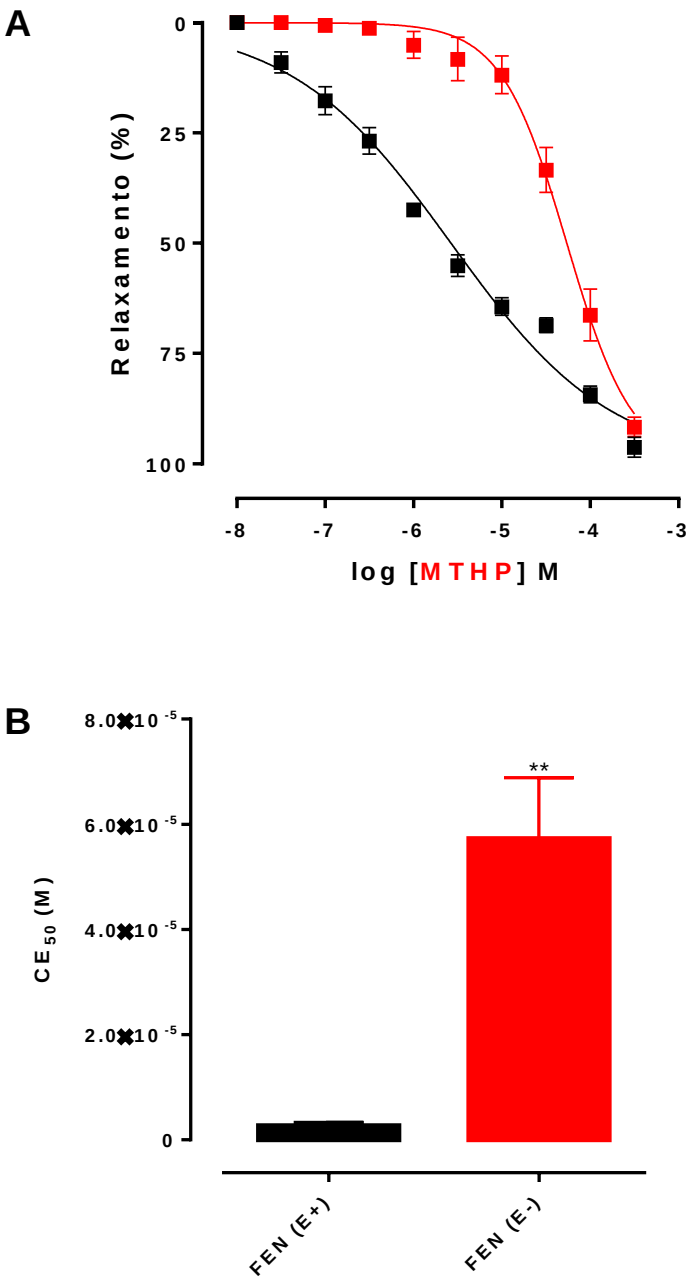


B



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do MTHP de 10^{-8}, 3×10^{-8}, 10^{-7}, 3×10^{-7}, 10^{-6}, 3×10^{-6}, 10^{-5}, 3×10^{-5}, 10^{-4} e 3×10^{-4} M, respectivamente.

Gráfico 1 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de endotélio funcional, em aorta isolada de rato.



Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t,* não pareado, $^{**}p < 0{,}0015$ (FEN (E+) *vs.* FEN (E-)), n = 5.

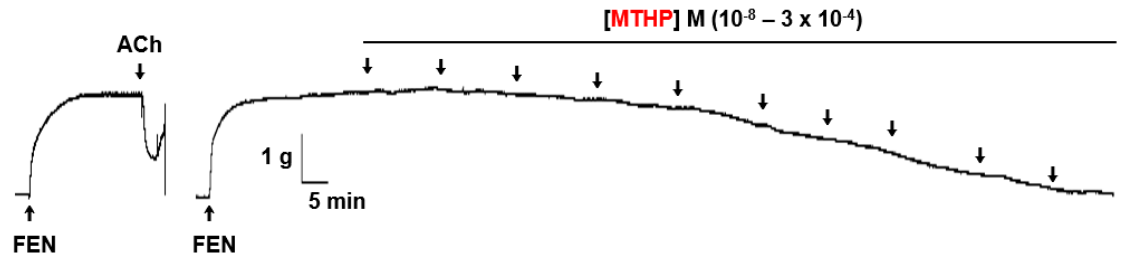
4.1.2 Avaliação da participação do endotélio vascular no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato

O MTHP (de 10^{-8} a 10^{-3} M, n = 5) relaxou a aorta isolada de rato com endotélio funcional pré-contraída com 3×10^{-7} M de fenilefrina de maneira significante e dependente de concentração tanto na ausência ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,2 \times 10^{-6}$ M), como na presença de 10^{-4} M de L-NAME ($CE_{50} = 4,6 \pm 1,0 \times 10^{-5}$ M) (Figura 8; Gráfico 2, A e B; Tabela 8), um inibidor competitivo da sintase do óxido nítrico (NO) ou na presença de 3×10^{-5} M de ODQ ($CE_{50} = 1,9 \pm 0,1 \times 10^{-4}$ M) (Figura 9; Gráfico 3, A e B; Tabela 8), um inibidor seletivo da ciclase de guanilil solúvel (CGs); com eficácia (E_{max}) de 96,3 ± 2,2; 90,0 ± 2,5 e 98,0 ± 1,6%, respectivamente.

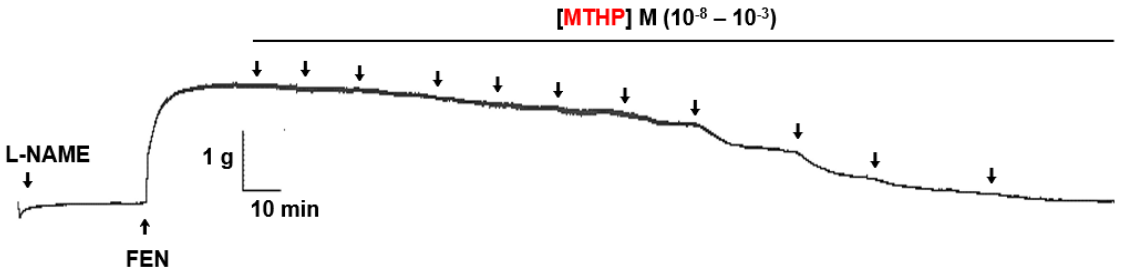
A potência relaxante do MTHP foi reduzida cerca de 17 vezes ($p < 0,0031$) quando comparada ao relaxamento na ausência do L-NAME e cerca de 24 vezes ($p < 0,0001$) quando comparada ao relaxamento na ausência do ODQ.

Figura 8 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença de L-NAME (**B**) e ODQ (**C**).

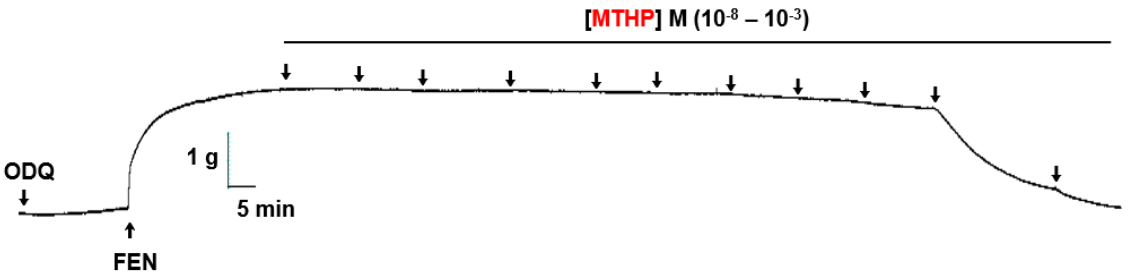
A



B

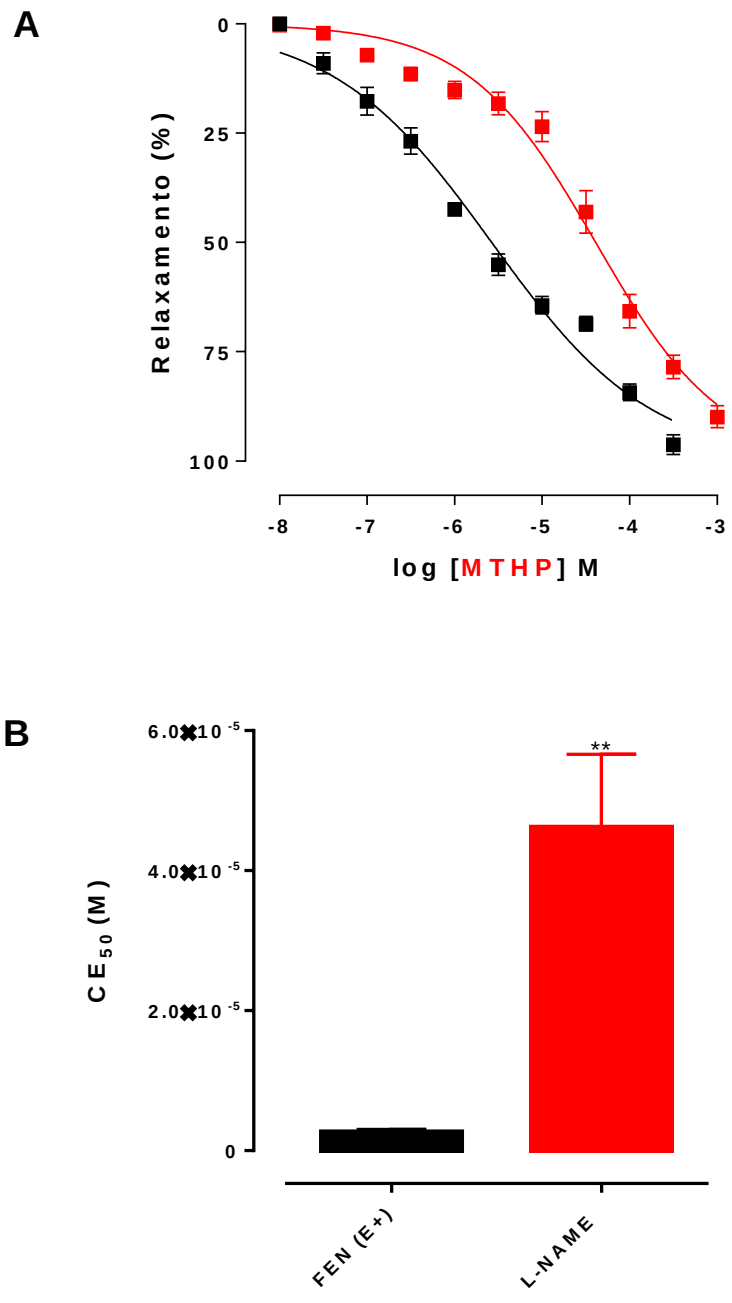


C



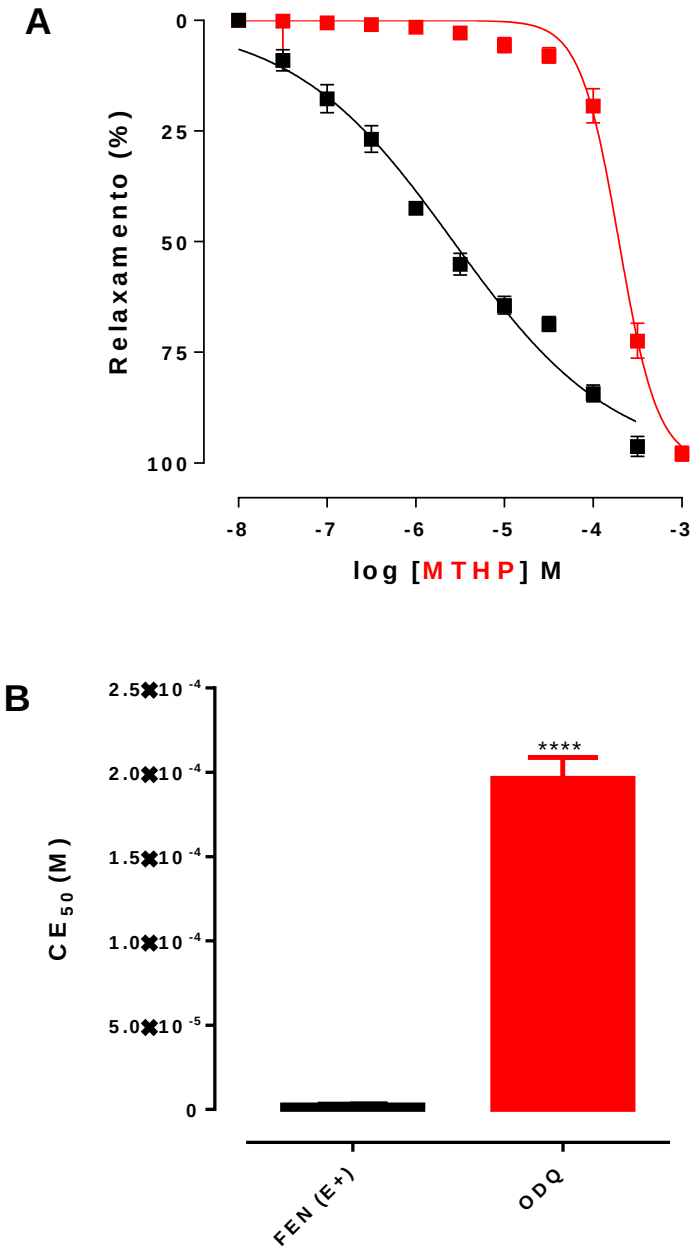
As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do MTHP de 10^{-8}, 3 x 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4} e 3 x 10^{-4} M (**A**); e 10^{-8}, 3 x 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4}, 3 x 10^{-4} e 10^{-3} M (**B**) e (**C**), respectivamente.

Gráfico 2 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 10^{-4} M de L-NAME, em aorta isolada de rato com endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t,* não pareado, $^{**}p < 0{,}0031$ (FEN (E+) *vs.* L-NAME), n = 5.

Gráfico 3 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 3×10^{-5} M de ODQ, em aorta isolada de rato com endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t,* não pareado, ****p < 0,0001 (FEN (E+) *vs.* ODQ), n = 5.

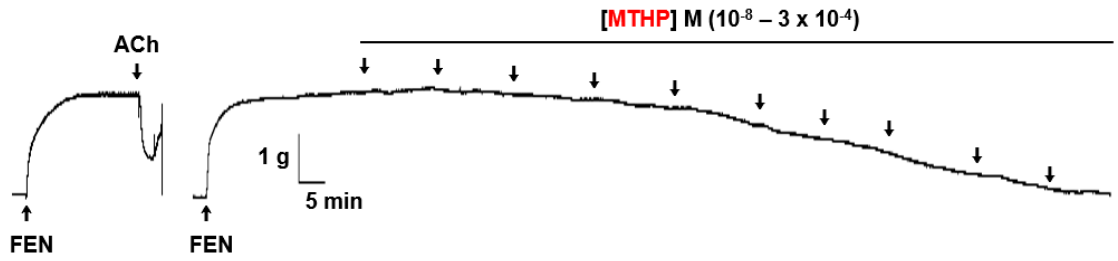
4.1.3 Avaliação da participação dos metabólitos da via da cicloxigenase ou dos receptores muscarínicos no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato

O MTHP (de 10^{-8} a 10^{-3} M, n = 5) relaxou a aorta isolada de rato com endotélio funcional pré-contraída com 3×10^{-7} M de fenilefrina de maneira significante e dependente de concentração tanto na ausência ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,2 \times 10^{-6}$ M), como na presença de 10^{-5} M de indometacina ($CE_{50} = 9,8 \pm 1,7 \times 10^{-5}$ M), um inibidor não seletivo das cicloxigenases ou na presença de 10^{-6} M de atropina ($CE_{50} = 4,9 \pm 1,1 \times 10^{-6}$ M), um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos; com eficácia (E_{max}) de 96,3 ± 2,2; 100 e 98,6 ± 1,4%, respectivamente.

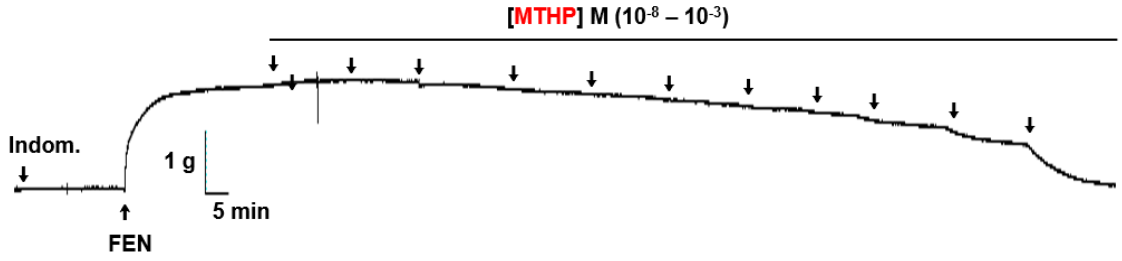
A potência relaxante do MTHP foi reduzida cerca de 36 vezes ($p < 0,0005$) quando comparada ao relaxamento na ausência de indometacina (Figura 10; Gráfico 4, A e B; Tabela 8). No entanto, a potência vasorelaxante do MTHP não foi alterada ($p > 0,087$) na presença de atropina (Figura 9; Gráfico 5, A e B; Tabela 8).

Figura 9 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença de indometacina (**B**) e atropina (**C**).

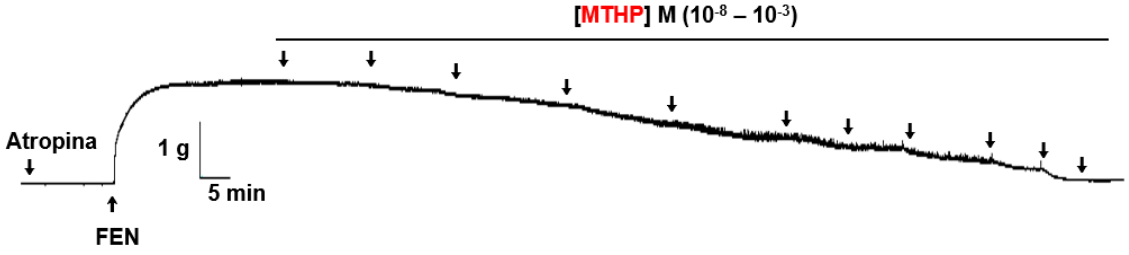
A



B

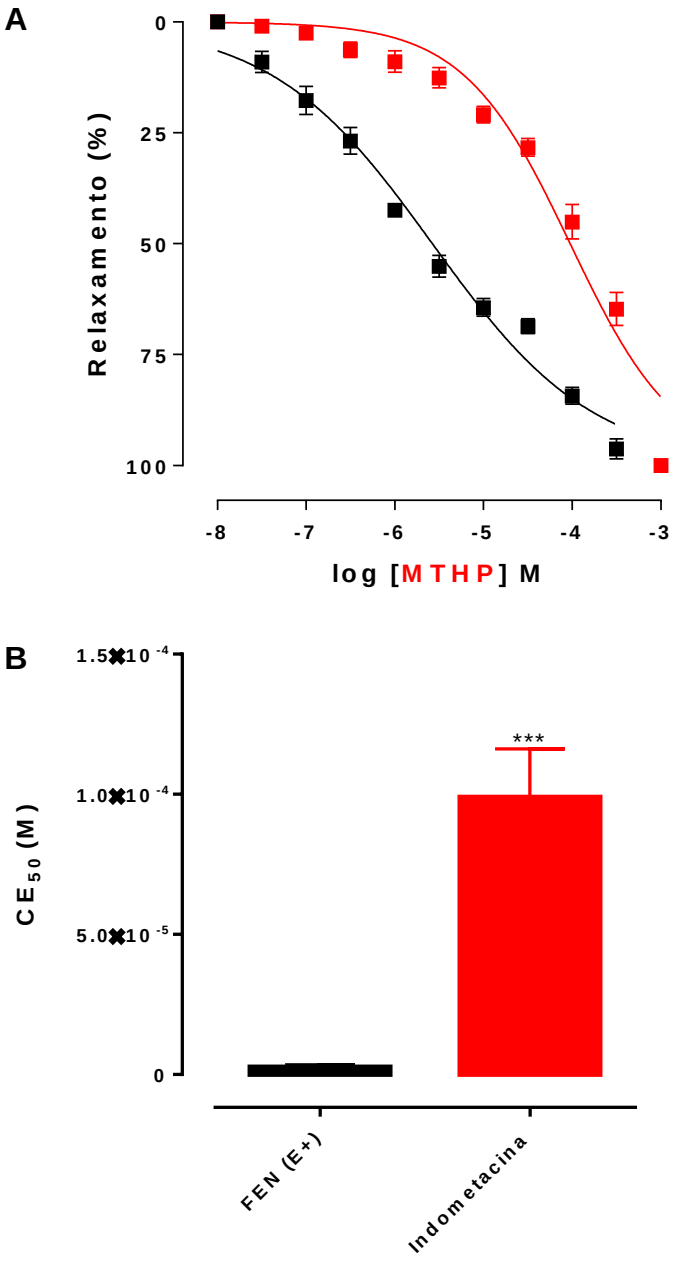


C



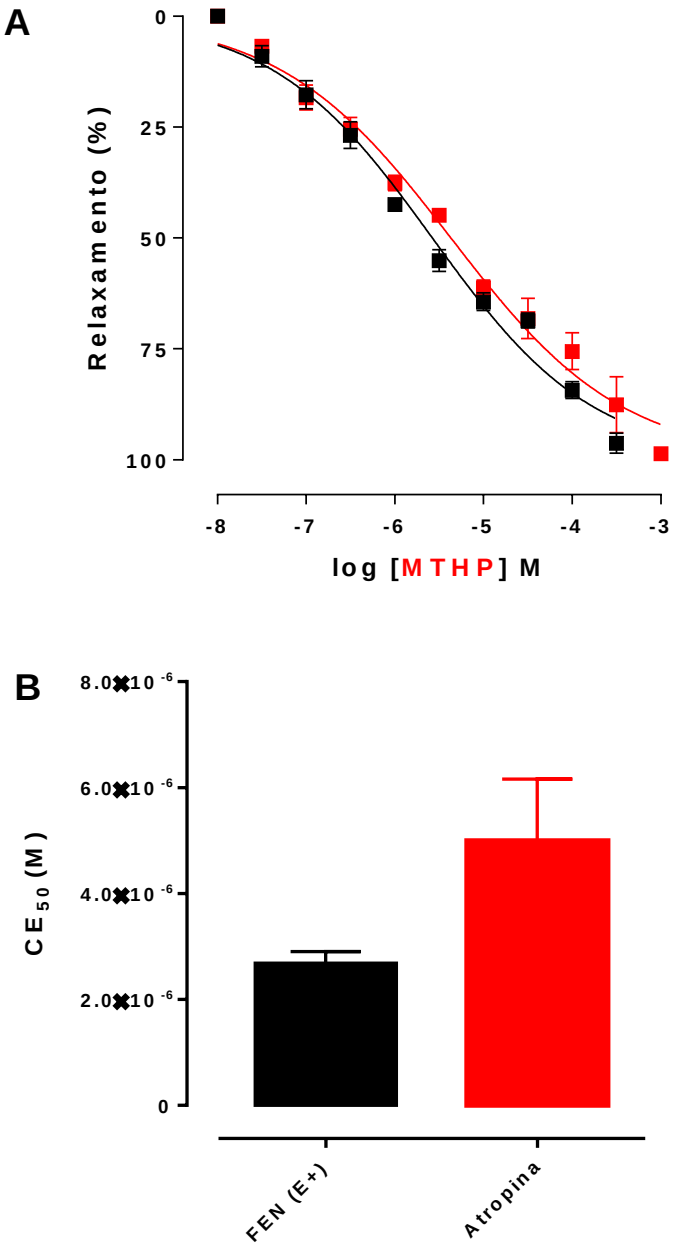
As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do MTHP de 10^{-8}, 3 x 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4} e 3 x 10^{-4} M (**A**); e 10^{-8}, 3 x 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4}, 3 x 10^{-4} e 10^{-3} M (**B**) e (**C**), respectivamente.

Gráfico 4 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 10^{-5} M de indometacina, em aorta isolada de rato com endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t,* não pareado, ****p* < 0,0005 (FEN (E+) *vs.* Indometacina), n = 5.

Gráfico 5 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 10^{-6} M de atropina, em aorta isolada de rato com endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t,* não pareado, $p > 0{,}087$ (FEN (E+) *vs.* Atropina), n = 5.

Tabela 8 - Valores de CE_{50} (M) e E_{max} (%) do MTHP na ausência (controle) e na presença de L-NAME, ODQ, indometacina e atropina em aorta de rato com endotélio funcional

Condição Experimental	CE_{50} (M)	E_{max} (%)
Controle	$2,7 \pm 0,2 \times 10^{-6}$	96,3 ± 2,2
L-NAME	$4,6 \pm 1,0 \times 10^{-5}$ *	90,0 ± 2,5
ODQ	$1,9 \pm 0,1 \times 10^{-4}$ **	98,0 ± 1,6
Indometacina	$9,8 \pm 1,7 \times 10^{-5}$ ***	100
Atropina	$4,9 \pm 1,1 \times 10^{-6}$	98,6 ± 1,4

Teste *t*, não pareado, * $p < 0,0031$, ** $p < 0,0001$, *** $p < 0,0005$ (controle *vs.* bloqueadores), n = 5.

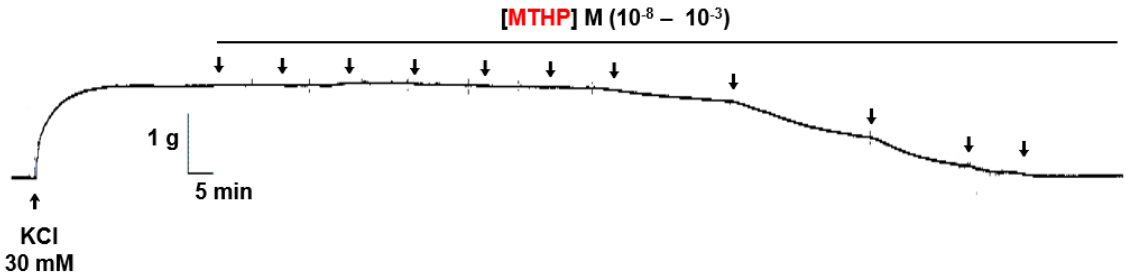
4.1.4 Avaliação do efeito vasorelaxante do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou 80 mM de KCl em aorta isolada de rato

O MTHP (de 10^{-8} a 3×10^{-4} M, n = 5), adicionado de maneira cumulativa a cuba, relaxou os anéis de aorta de rato com endotélio funcional mais efetivamente quando pré-contraídos com moderadas concentrações de KCl (30 mM) ($CE_{50} = 2,3 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ M) do que com elevadas concentrações (80 mM) ($CE_{50} = 7,0 \pm 1,3 \times 10^{-5}$ M) desta solução (Figura 10; Gráficos 6, A e B), com eficácia máxima (E_{max}) de 98,6 ± 1,2 e 95,4 ± 1,7%, respectivamente.

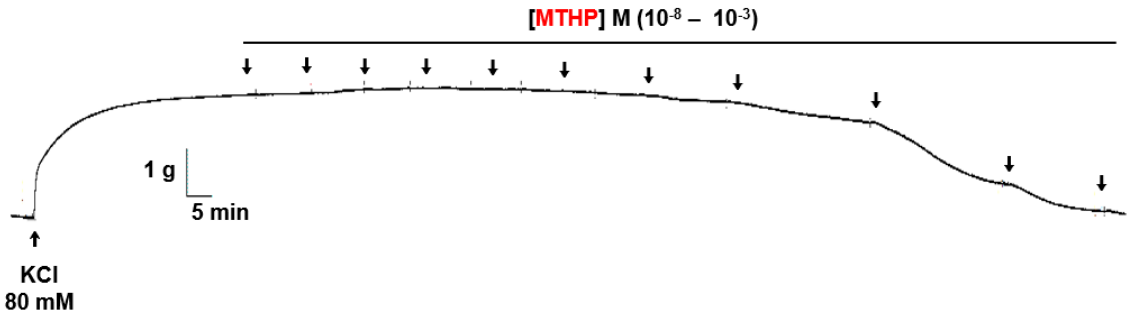
A potência relaxante do MTHP foi atenuada em cerca de 3 vezes ($p < 0,001$) quando o órgão era pré-contraído com elevadas concentrações (80 mM) de KCl como podemos observar pelos valores de CE_{50}.

Figura 10 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 30 mM (**A**) e 80 mM (**B**) de KCl.

A

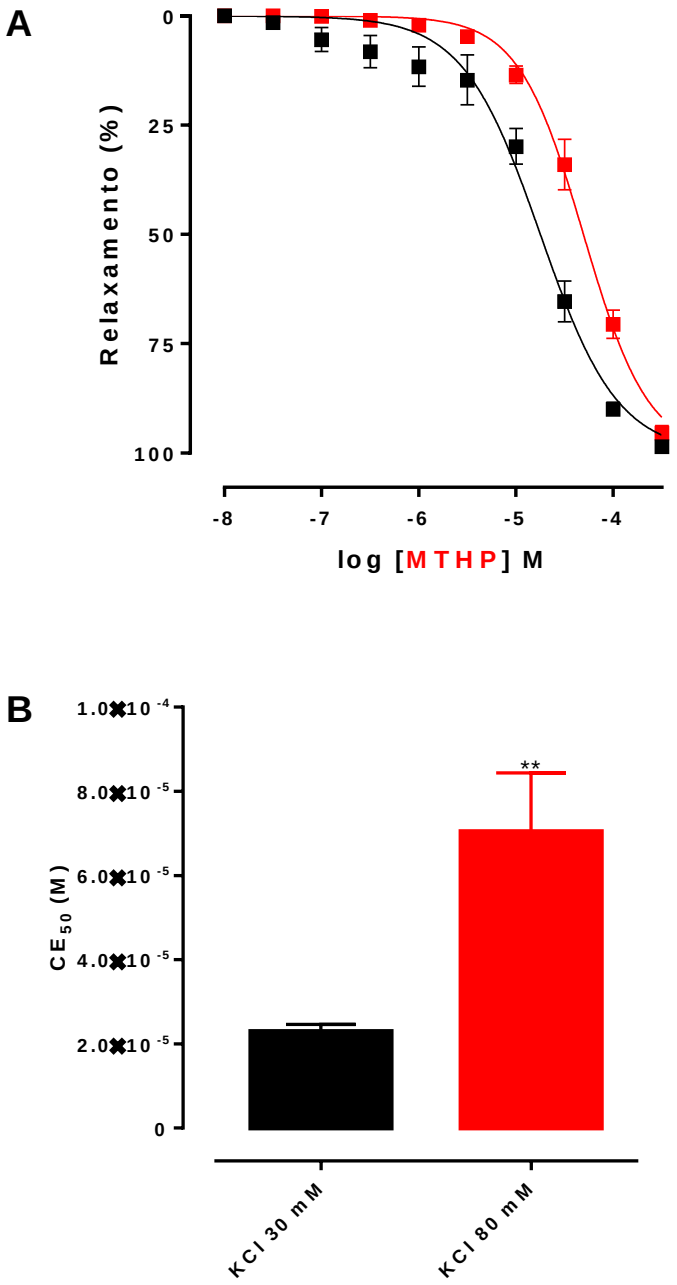


B



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do MTHP de 10^{-8}, 3 x 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4}, 3 x 10^{-4} e 10^{-3} M, respectivamente.

Gráfico 6 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 30 mM (■) ou por 80 mM (■) de KCl, em aorta isolada de rato com endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t,* não pareado, ** $p < 0{,}001$ (KCl 30 mM *vs.* KCl 80 mM), n = 5.

4.1.5 Avaliação do efeito vasorelaxante do MTHP sobre a dinâmica do Ca^{2+} em aorta isolada de rato

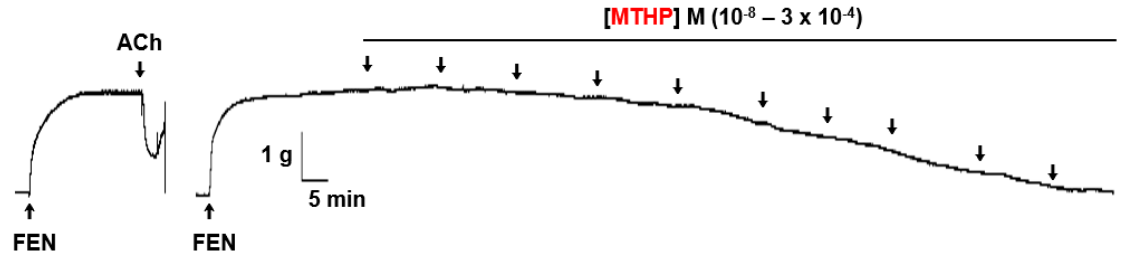
4.1.5.1 Efeito do MTHP nas contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644 em aorta isolada de rato

O MTHP (de 10^{-8} a 10^{-3} M, n = 5) relaxou de maneira significante e dependente de concentração a aorta isolada de rato com endotélio funcional pré-contraída com 3 x 10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (CE_{50} = 9,8 ± 1,6 x 10^{-5} M), um agonista dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 1 (Ca_V1), com eficácia máxima (E_{max}) de 99,0 ± 0,6%.

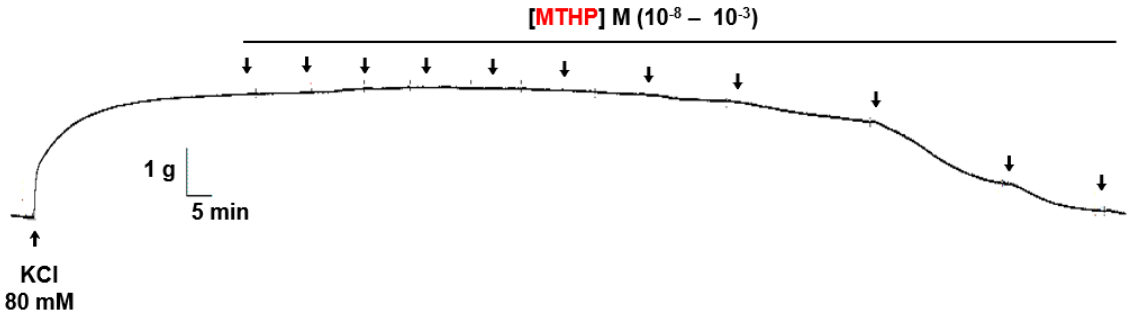
A potência relaxante do MTHP foi reduzida cerca de 12 vezes (p < 0,0004) quando comparada ao relaxamento induzido pelo alcaloide quando a aorta era pré-contraída com FEN (CE_{50} = 2,7 ± 0,2 x 10^{-6} M), no entanto, não apresentou diferença quando essa contração foi induzida por elevadas concentrações (80 mM) de KCl (Figura 11; Gráfico 7, A e B).

Figura 11 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN (**A**), 80 mM de KCl (**B**) e 3 x 10^{-7} M S-(-)-Bay K8644 (**C**).

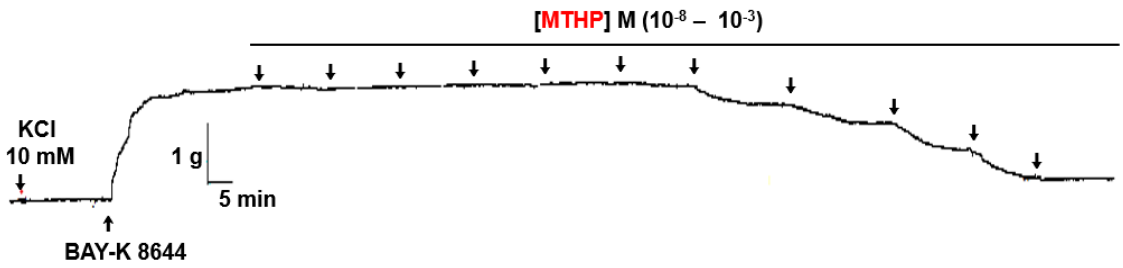
A



B

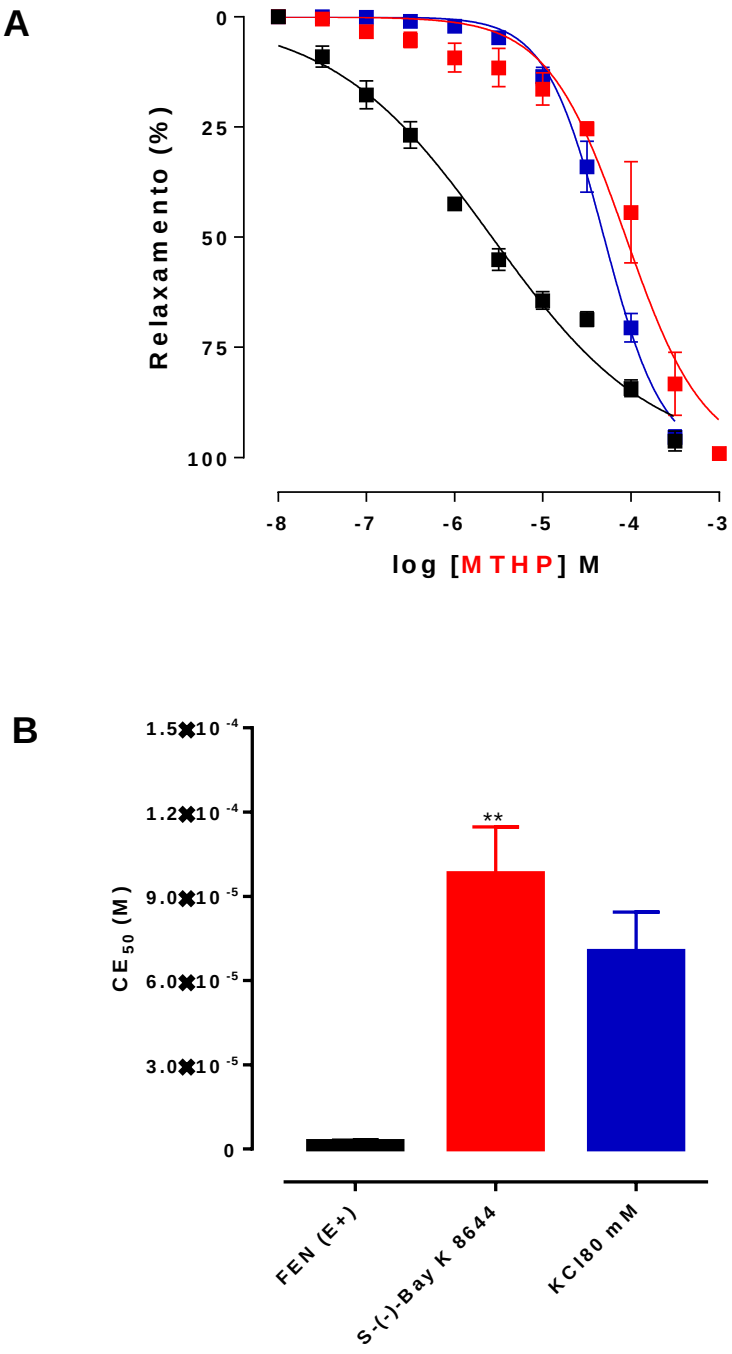


C



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do MTHP de 10^{-8}, 3 x 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4} e 3 x 10^{-4} M (**A**); e 10^{-8}, 3 x 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4}, 3 x 10^{-4} e 10^{-3} M (**B**) e (**C**), respectivamente.

Gráfico 7 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3 x 10^{-7} M de FEN (■), 80 mM de KCl (■) ou 3 x 10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (■), em aorta isolada de rato com endotélio funcional.

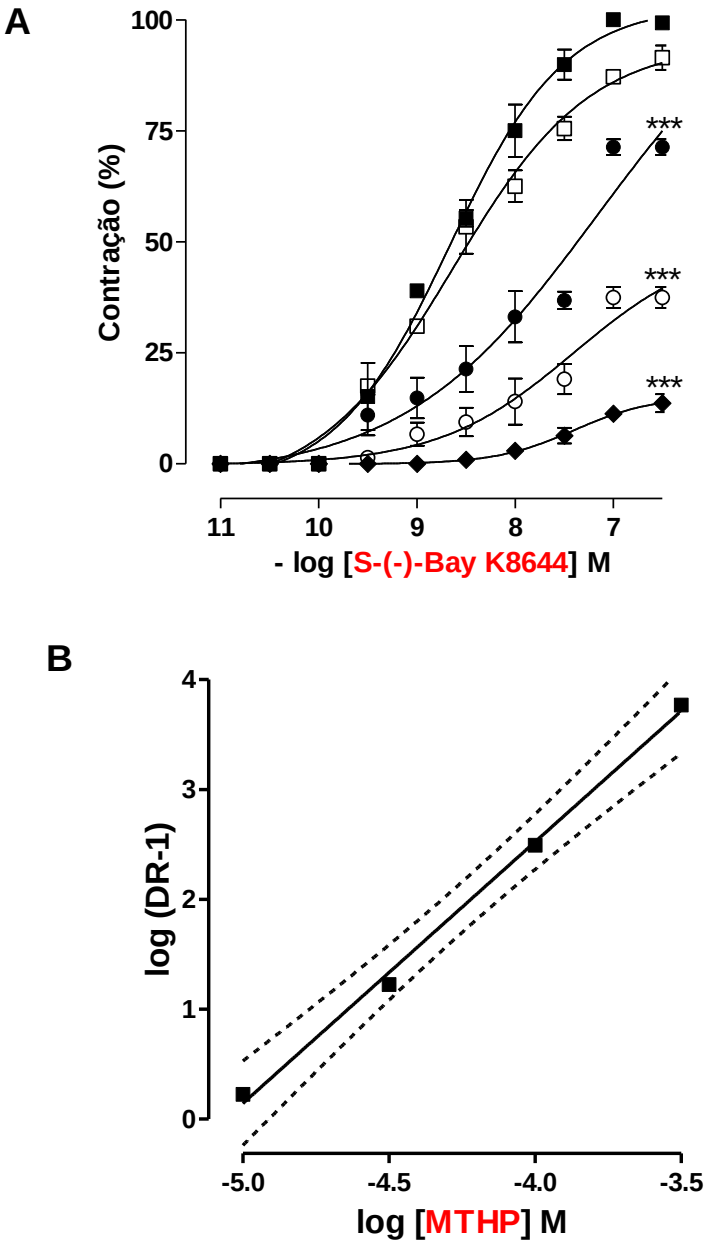


Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t,* não pareado, ** $p < 0{,}0004$ (FEN (E+) *vs.* S-(-)-Bay K8644), n = 5.

4.1.5.2 Efeito do MTHP frente as concentrações cumulativas induzidas por S-(-)-Bay K8644 em aorta isolada de rato

O MTHP, nas concentrações de 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4} e 3 x 10^{-4} M, inibiu de maneira significante e dependente de concentração (r^2 = 0,99 ± 0,05) as contrações cumulativas induzidas por S-(-)-Bay K8644 (10^{-11} a 3 x 10^{-7} M) com desvio da curva controle para a direita de maneira não paralela e com redução do E_{max} (91,51 ± 2,7; 71,33 ± 1,7; 37,50 ± 2,3; 13,67 ± 2,03%, respectivamente) (Gráfico 8A). A análise do gráfico de Schild (Gráfico 8B) indica um antagonismo do tipo não competitivo exercido pelo MTHP que foi confirmado pelo valor de "Slope" = 2,38 ± 0,14 que diferiu significantemente da unidade. A potência do MTHP em antagonizar as contrações cumulativas induzidas por S-(-)-Bay K8644 foi determinada pelo valor de pD'_2 = 5,06 ± 0,03.

Gráfico 8 - Curvas concentrações-resposta cumulativas ao S-(-)-Bay K8644 (A) na ausência (■) e na presença do MTHP nas concentrações de10^{-5} (□), 3 x 10^{-5} (●), 10^{-4} (○), 3 x 10^{-4} M (♦) em aorta isolado de rato com endotélio funcional (n = 3). O gráfico (**B**) representa o log (DR-1) em função do log da concentração molar do MTHP.



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. MTHP).

4.1.6 Avaliação da participação do canais de potássio no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato

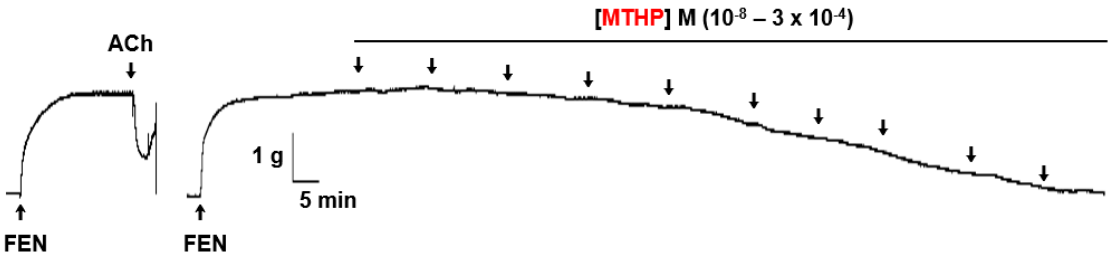
4.1.6.1 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina na ausência e na presença de TEA^+

O MTHP (de 10^{-8} a 3×10^{-4} M, n = 5) relaxou a aorta de rato com endotélio funcional pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN de maneira significante e dependente de concentração tanto na ausência (curva controle) ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,2 \times 10^{-6}$ M) como na presença de 10 mM de TEA^+ ($CE_{50} = 3,8 \pm 0,8 \times 10^{-5}$ M), onde nessa concentração é um bloqueador não seletivo dos canais para potássio, com eficácia máxima (E_{max}) 96,3 ± 2,2 e 98,8 ± 1,2%, respectivamente.

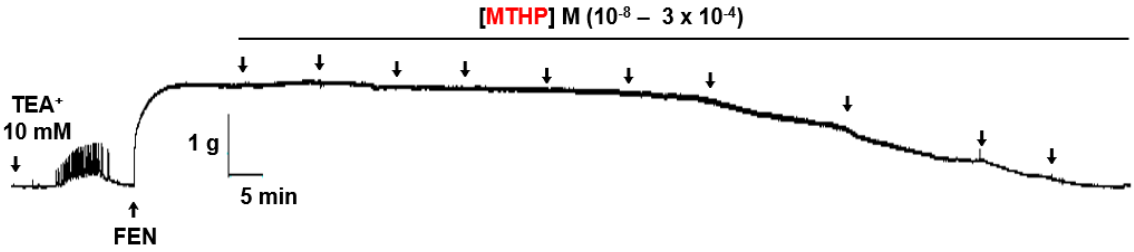
A potência relaxante do MTHP foi reduzida cerca de 14 vezes ($p < 0,0028$) quando comparada ao relaxamento na ausência de 10 mM de TEA^+ (Figura 12; Gráfico 9, A e B; Tabela 9).

Figura 12 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença de 10 mM de TEA^+ (**B**).

A

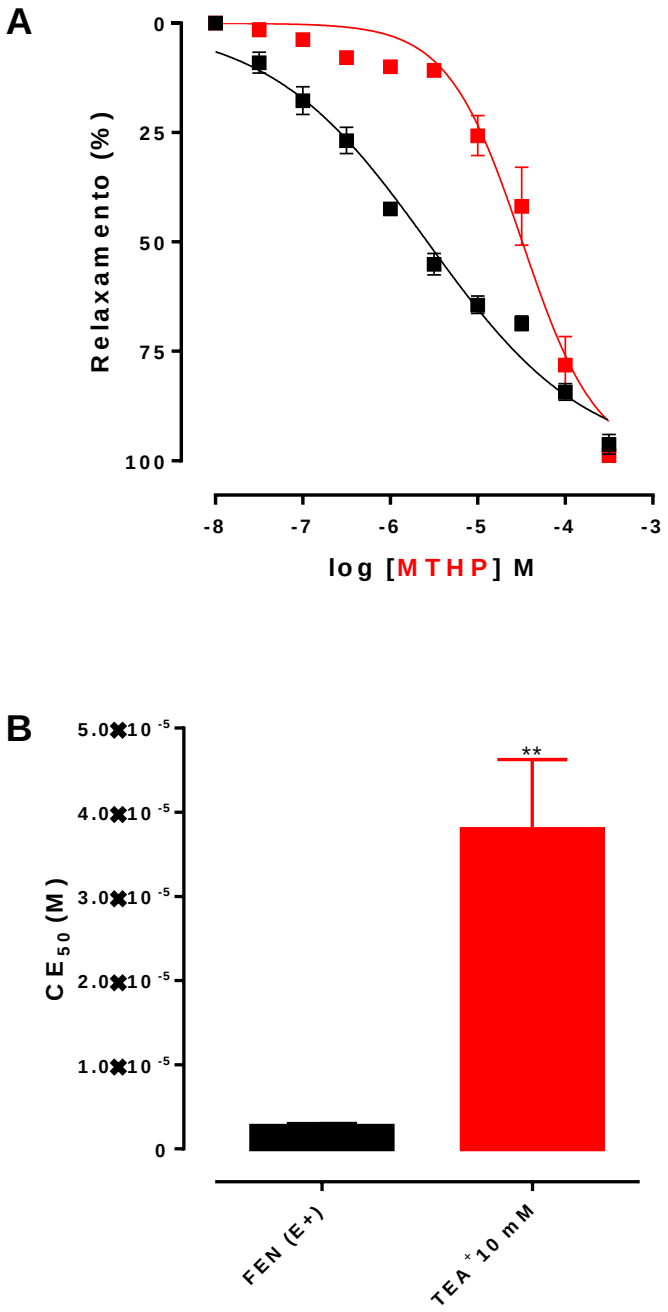


B



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do MTHP de 10^{-8}, 3 x 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4} e 3 x 10^{-4} M, respectivamente.

Gráfico 9 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 10 mM de TEA^+, em aorta isolada de rato com endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t,* não pareado, ** $p > 0{,}0028$ (FEN (E+) *vs.* TEA^+ 10 mM), n = 5.

4.1.6.2 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio

O MTHP (de 10^{-8} a 10^{-3} M) relaxou a aorta de rato com endotélio funcional pré-contraída com 3 x 10^{-7} M de FEN de maneira significante e dependente de concentração tanto na ausência (curva controle) como na presença de 1 mM de 4-AP (bloqueador seletivo dos K_V), 10^{-5} M de glibenclamida (bloqueador seletivo dos K_{ATP}), 1 mM de TEA^+ (bloqueador seletivo dos BK_{Ca}), 5 x 10^{-8} M de apamina (bloqueador seletivo dos SK_{Ca}) e 3 x 10^{-5} M de $BaCl_2$ (bloqueador seletivos dos Kir).

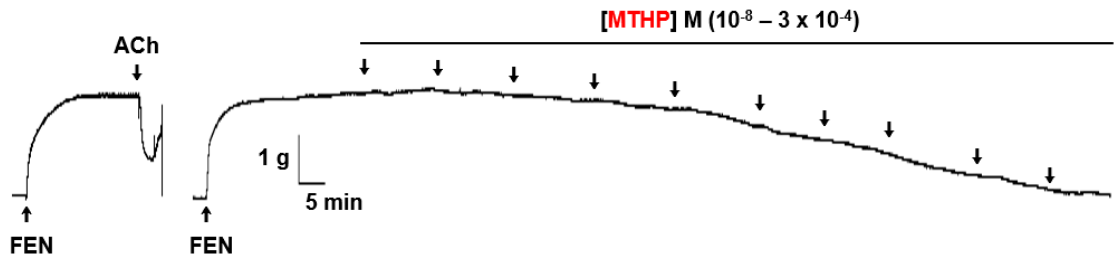
Na presença de 1 mM de 4-AP e 10^{-5} M de glibenclamida a curva de relaxamento do MTHP em aorta de rato pré-contraída com 3 x 10^{-7} M de FEN com endotélio funcional não foi alterada. Por outro lado, na presença de 1 mM de TEA^+ e 5 x 10^{-8} M de apamina a curva de relaxamento do MTHP foi desviada para a direita de maneira significante.

A potência relaxante do MTHP (CE_{50} = 2,7 ± 0,2 x 10^{-6} M) não foi alterada na presença de 4-AP (2,8 ± 0,4 x 10^{-6} M) (Figura 13; Gráfico 10, A e B; Tabela 9) ou de glibenclamida (CE_{50} = 2,0 ± 0,7 x 10^{-6} M) (Figura 13; Gráfico 11, A e B; Tabela 9), como podemos observar pelos valores de CE_{50} que não apresentam diferença significante entre si.

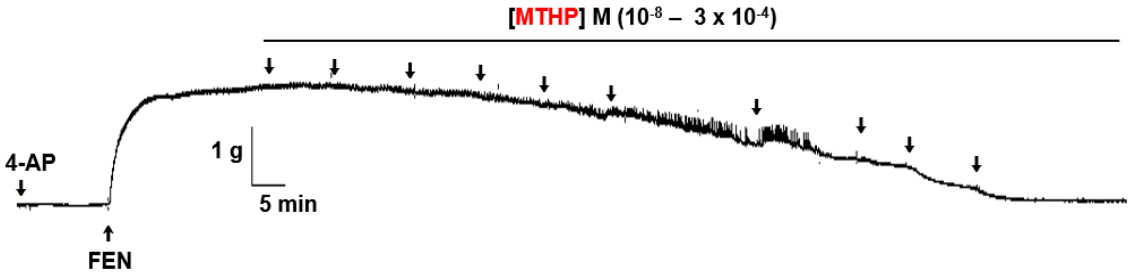
Por outro lado, sua potência foi atenuada de maneira significante cerca de 12 vezes na presença de 1 mM de TEA^+ (CE_{50} = 3,2 ± 0,4 x 10^{-5} M) (Figura 14; Gráfico 12, A e B; Tabela 9), cerca de 13 vezes na presença de 5 x 10^{-8} M de apamina (CE_{50} = 3,7 ± 0,7 x 10^{-5} M) (Figura 14; Gráfico 13, A e B; Tabela 9) e cerca de 74 vezes na presença de 3 x 10^{-5} M de $BaCl_2$ (CE_{50} = 2,0 ± 0,2 x 10^{-4} M) (Figura 14; Gráfico 14, A e B; Tabela 9).

Figura 13 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença de 1 mM de 4-AP (**B**) e 10^{-5} M de glibenclamida (**C**).

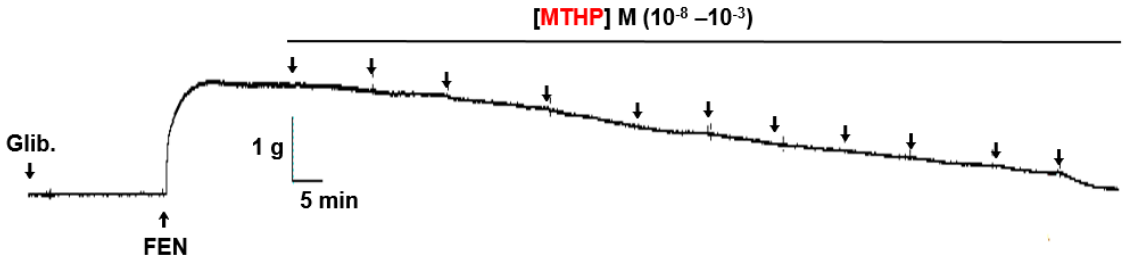
A



B

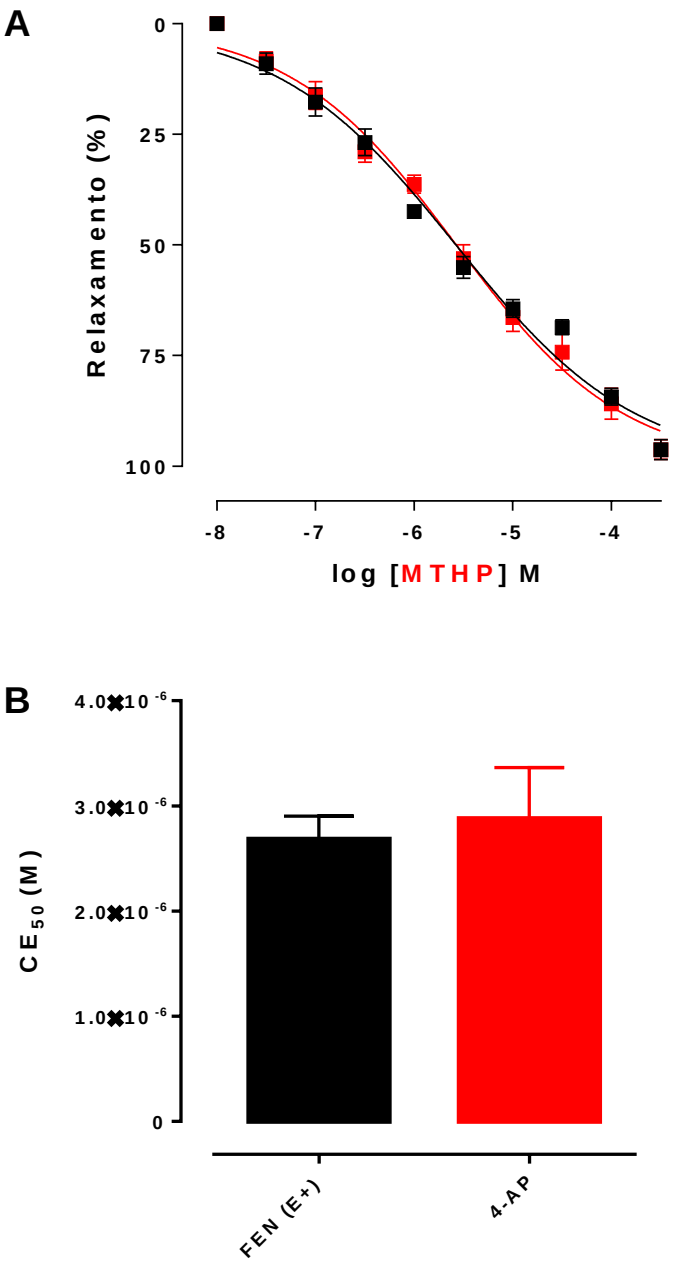


C



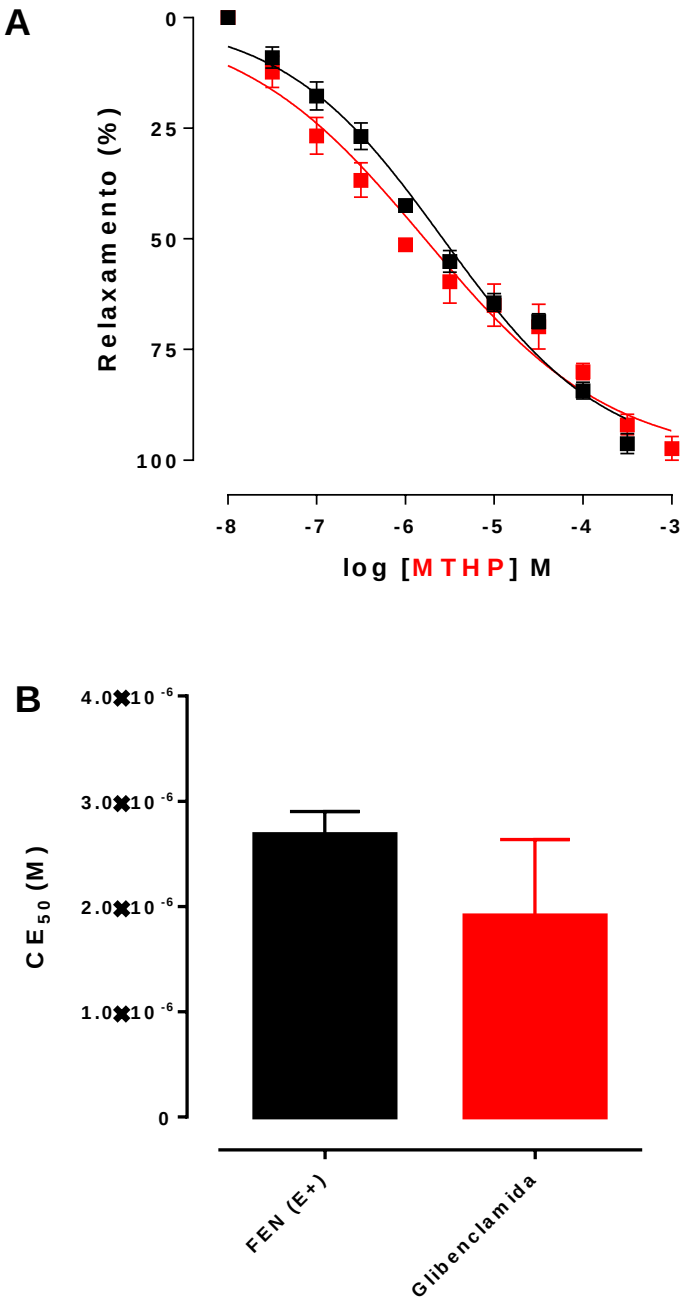
As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do MTHP de 10^{-8}, 3 x 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4} e 3 x 10^{-4} M (**A**) e (**B**); e 10^{-8}, 3 x 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4}, 3 x 10^{-4} e 10^{-3} M (**C**), respectivamente.

Gráfico 10 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 1 mM de 4-AP, em aorta isolada de rato com endotélio funcional.



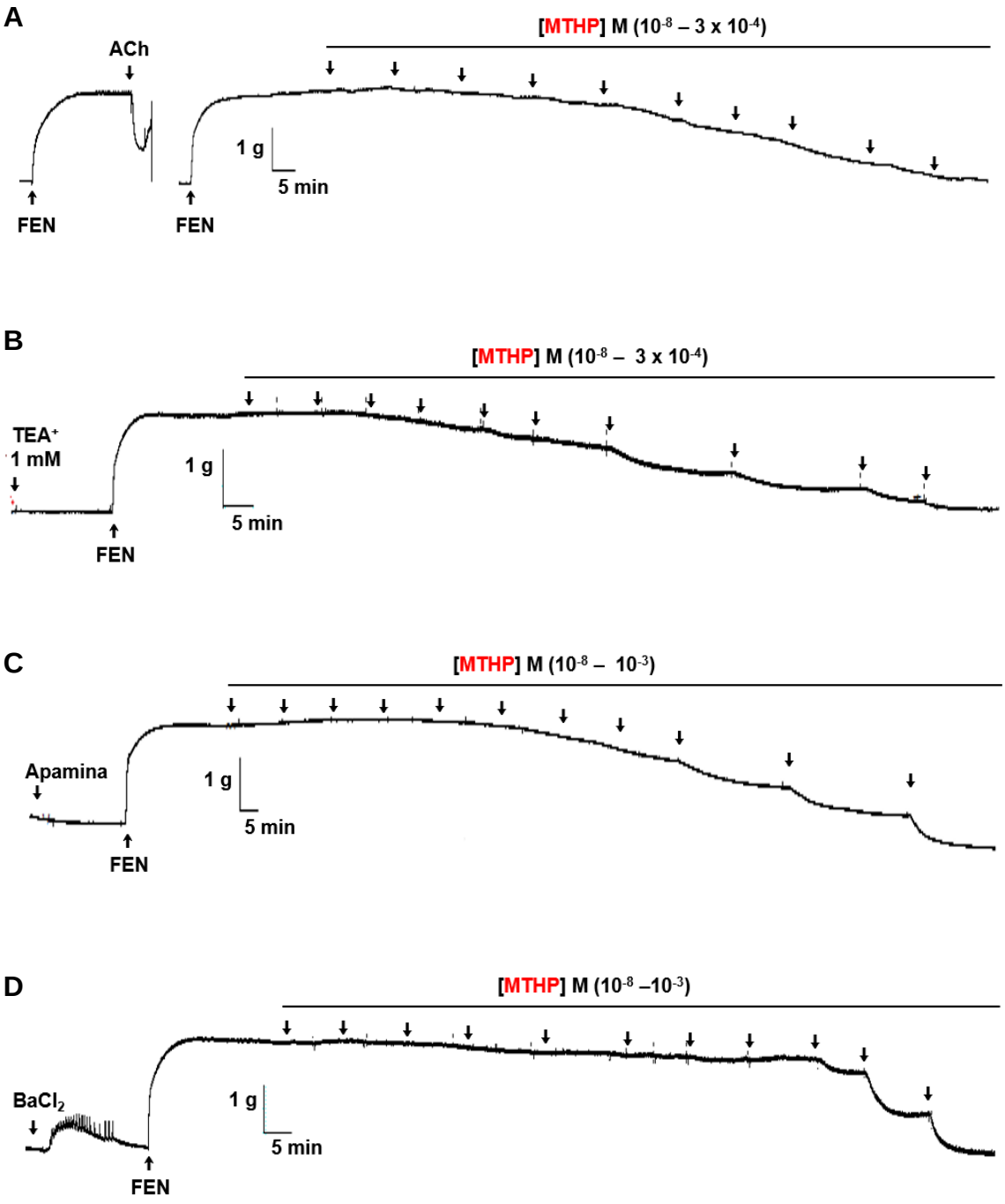
Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t,* não pareado, $p > 0{,}728$ (FEN (E+) *vs.* 4-AP), n = 3.

Gráfico 11 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 10^{-5} M de glibenclamida, em aorta isolada de rato com endotélio funcional.



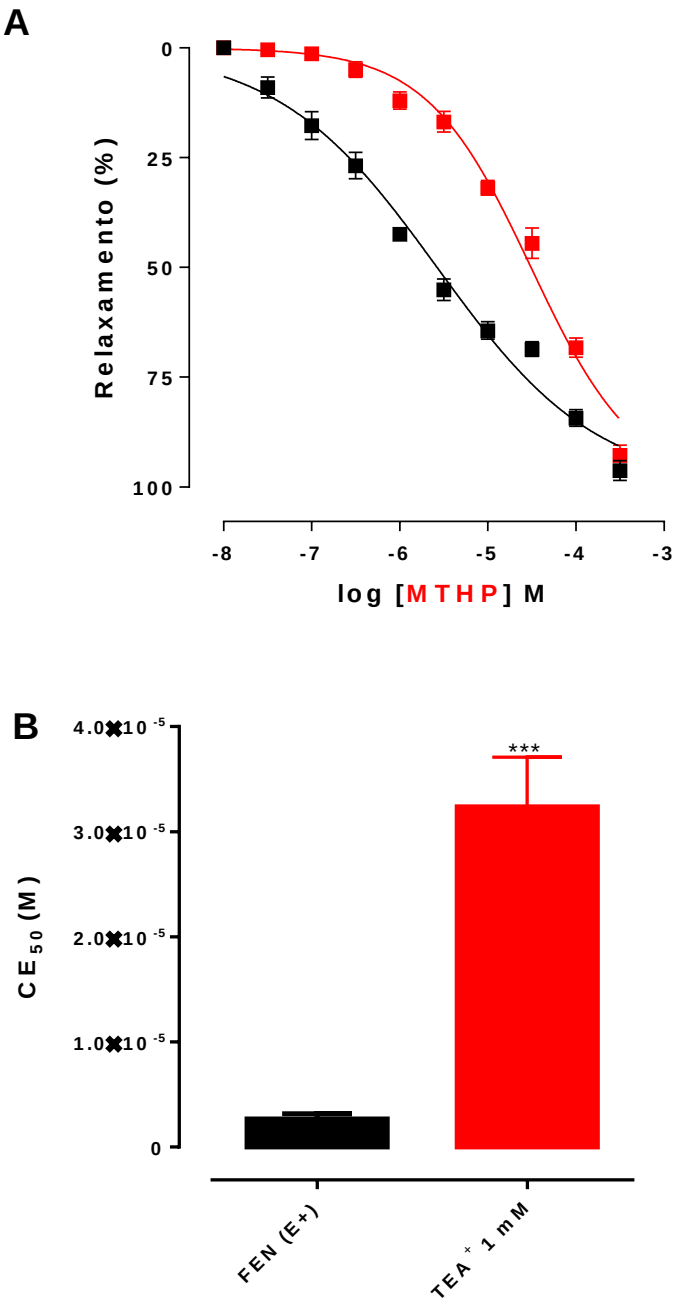
Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t,* não pareado, $p > 0{,}251$ (FEN (E+) *vs.* glibenclamida), n = 3.

Figura 14 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença de 1 mM de TEA^+ (**B**), 5 x 10^{-8} M de apamina (**C**) e 3 x 10^{-5} M de $BaCl_2$ (**D**).



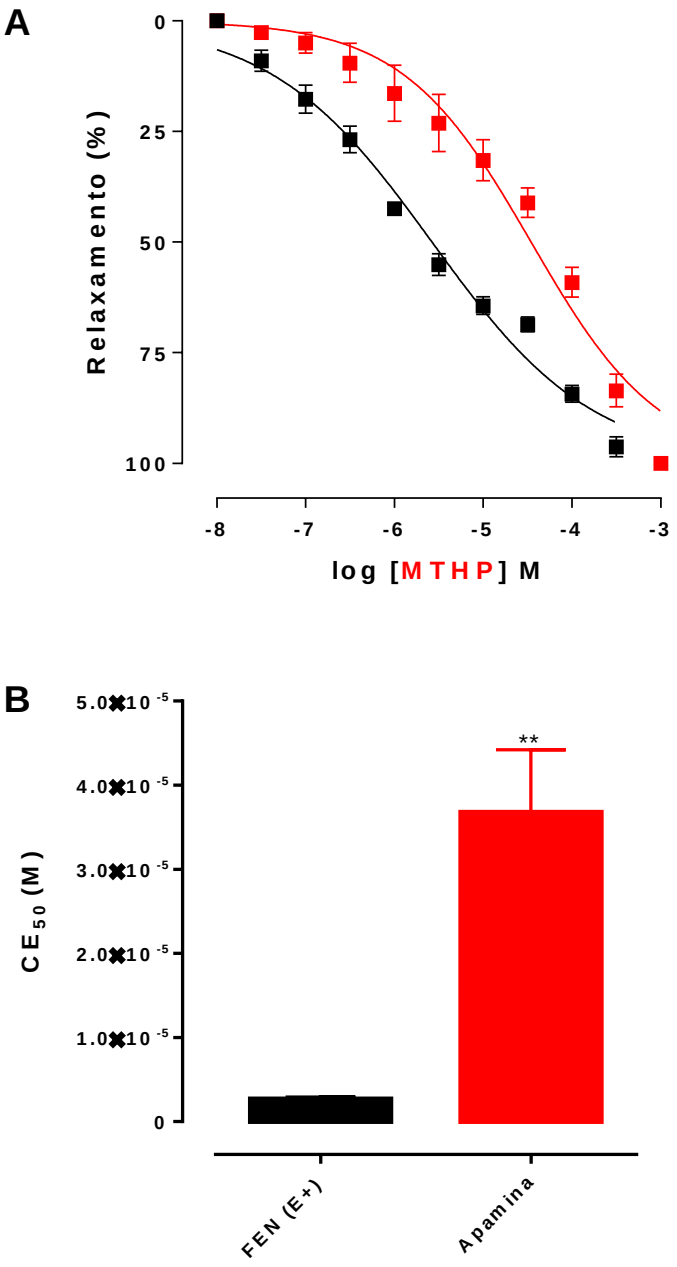
As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do MTHP de 10^{-8}, 3 x 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4} e 3 x 10^{-4} M (**A**) e (**B**); e 10^{-8}, 3 x 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4}, 3 x 10^{-4} e 10^{-3} M (**C**) e (**D**), respectivamente.

Gráfico 12 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 1 mM de TEA^+, em aorta isolada de rato com endotélio funcional.



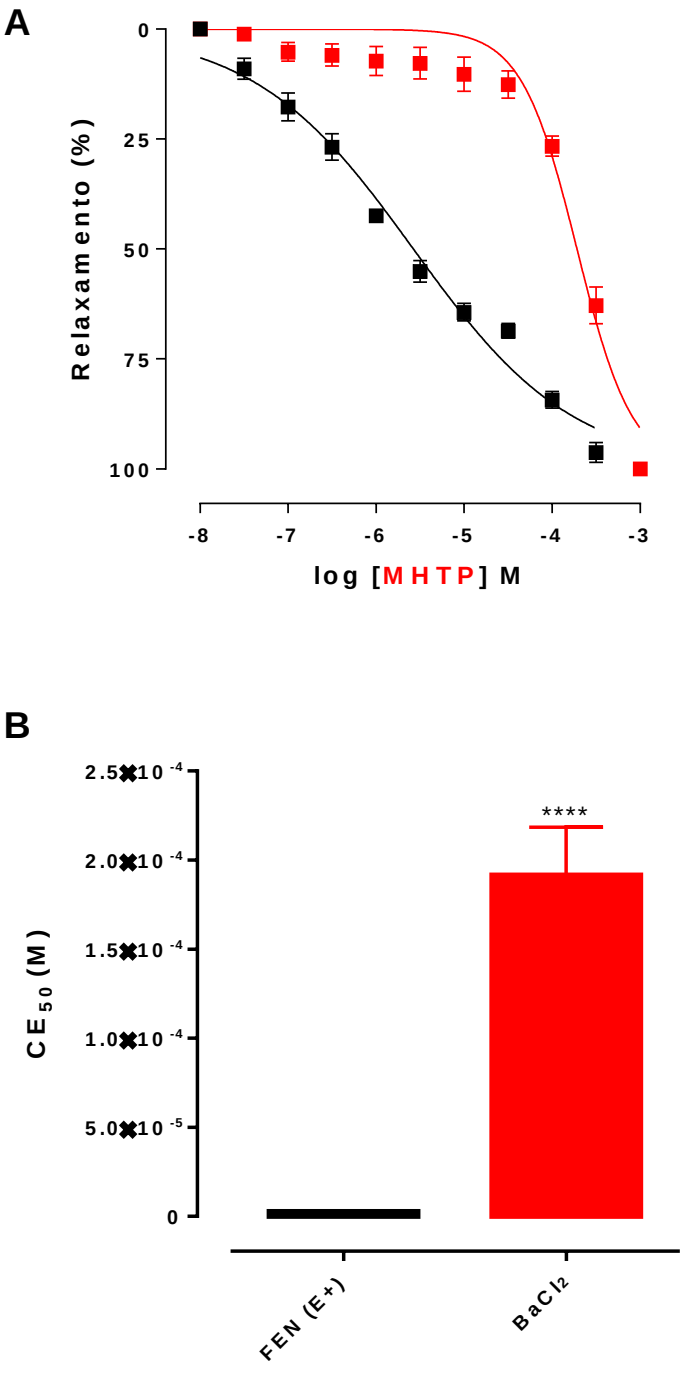
Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t,* não pareado, *** $p < 0{,}0002$ (FEN (E+) *vs.* TEA^+ 1 mM), n = 5.

Gráfico 13 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 5×10^{-8} M de apamina, em aorta isolada de rato com endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t,* não pareado, ** $p < 0,017$ (FEN (E+) *vs.* Apamina), n = 5.

Gráfico 14 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 3×10^{-5} M $BaCl_2$, em aorta isolada de rato com endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t,* não pareado, *** $p < 0{,}0001$ (FEN (E+) *vs.* $BaCl_2$), n = 3.

Tabela 9 - Valores de CE_{50} (M) e E_{max} (%) do MTHP na ausência (controle) e na presença de bloqueadores de canais para potássio em aorta de rato com endotélio funcional

Condição Experimental	CE_{50} (M)	E_{max} (%)
Controle	$2,7 \pm 0,2 \times 10^{-6}$	96,3 ± 2,2
TEA^+ 10 mM	$3,8 \pm 0,8 \times 10^{-5}$ *	98,8 ± 1,2
4-AP	$2,8 \pm 0,4 \times 10^{-6}$	96,2 ± 1,2
Glibenclamida	$2,0 \pm 0,7 \times 10^{-6}$	97,3 ± 2,3
TEA^+ 1 mM	$3,2 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ **	93,0 ± 2,3
Apamina	$3,7 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ ***	100
$BaCl_2$	$2,0 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ ****	100

Teste *t*, não pareado, * $p < 0,0028$, ** $p < 0,0002$, *** $p < 0,017$, **** (controle *vs.* bloqueadores).

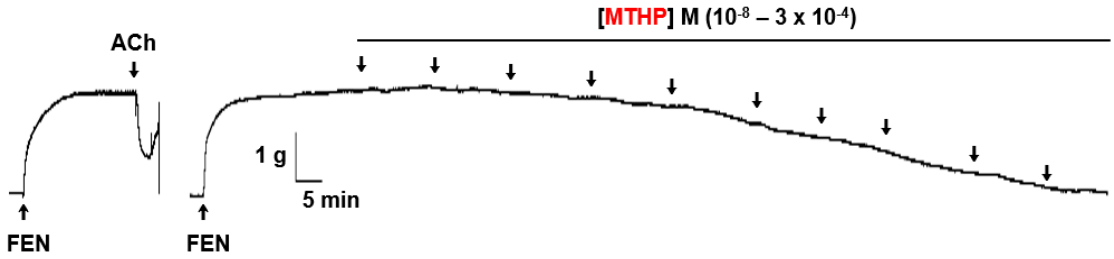
4.1.7 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina na ausência e na presença de Y-27632

O MTHP (de 10^{-8} a 10^{-3} M) relaxou a aorta de rato com endotélio funcional pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN de maneira significante e dependente de concentração tanto na ausência (curva controle) ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,2 \times 10^{-6}$ M) como na presença de 10^{-6} M de Y-27632 ($CE_{50} = 3,0 \pm 0,4 \times 10^{-6}$ M), um inibidor seletivo da Rho cinase (RhoK), com eficácia máxima (Emax) 96,3 ± 2,2 e 100%, respectivamente.

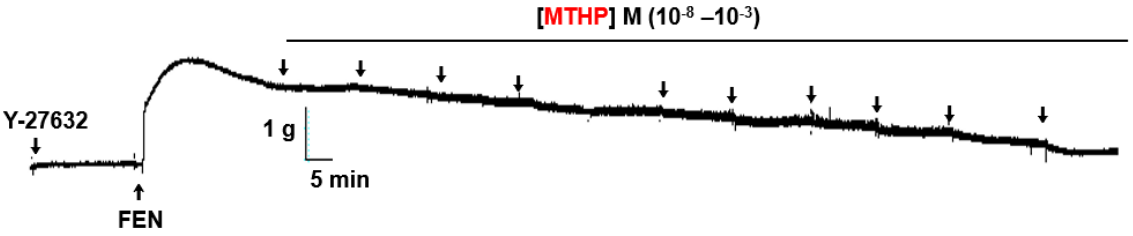
A potência relaxante do MTHP não alterada na presença do Y-27632 como podemos observar pelos valores de CE_{50} que não apresentam diferença significante entre si (Figura 15; Gráfico 15, A e B).

Figura 15 – Registros representativos do efeito relaxante do MTHP em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-contraídos com 3 x 10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença de 10^{-6} M de Y-27632 (**B**).

A

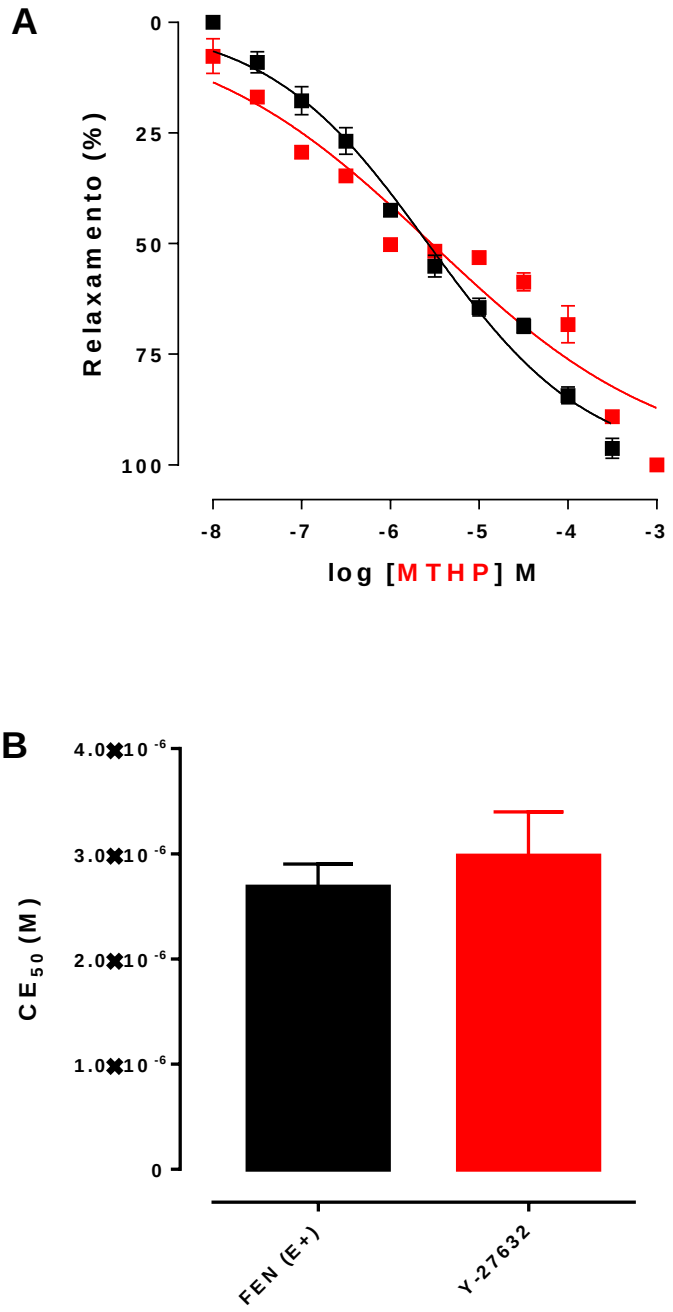


B



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do MTHP de 10^{-8}, 3 x 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4} e 3 x 10^{-4} M (**A**); e 10^{-8}, 3 x 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4}, 3 x 10^{-4} e 10^{-3} M (**B**), respectivamente.

Gráfico 15 - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de CE_{50} (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 10^{-6} M de Y-27632, em aorta isolada de rato com endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t,* não pareado, $p > 0{,}513$ (FEN (E+) *vs.* Y-27632), n = 3.

4.1.8 Avaliação do efeito do MTHP sobre a viabilidade e apoptose celular em miócitos isolados de aorta de rato

O MTHP, nas concentrações de 3 x 10^{-6} (CE_{50}) e 10^{-5} M (3 vezes o valor da CE_{50}), não modificou de maneira significante a porcentagem de miócitos viáveis (Anexina-V^-/PI^-) (Tabela 10, Figura 17, Gráfico 16A), inviáveis (células PI^+) (Tabela 10, Figura 16, Gráfico 16B), em apoptose precoce (Anexina-V^+) (Tabela 10, Figura 16, Gráfico 16C) e em apoptose tardia ou necrose(Anexina-V^+/PI^+) (Tabela 10, Figura 16, Gráfico 16D) quando comparado ao controle.

Esses resultados sugerem que o MTHP, nas concentrações testadas, não interferiu com a viabilidade e não induziu apoptose na população de miócitos estudada.

Tabela 10 – Porcentagem da viabilidade, apoptose e necrose em miócitos isolados de aorta de rato

Condição Experimental	Viáveis	Inviáveis	Apoptose Precoce	Apoptose Tardia
Controle	49,5 ± 6,6%	7,4 ± 0,6%	3,8 ± 0,5%	44,4 ± 1,4%
MTHP (3 x 10^{-6} M)	61,1 ± 9,6%	3,1 ± 2,2%	4,2 ± 0,2%	31,5 ± 7,2%
MTHP (10^{-5} M)	67,7 ± 7,4%	3,4 ± 1,8%	4,7 ± 0,6%	24,1 ± 4,9%

Valores expressos como media ± e.p.m. de experimentos realizados em duplicata. Test *t*, não pareado, $p > 0,05$ (controle *vs*. MTHP).

Figura 16 – *Dot plots* representativos de miócitos isolados de aorta de rato. População ("*gate*") (**A**); controle negativo (ausência de marcação) (**B**); Anexina-V/PI na ausência de MTHP (controle) (**C**); Anexina-V/PI na presença de $3x10^{-6}$ M (**D**) e 10^{-5} M (**E**) de MTHP.

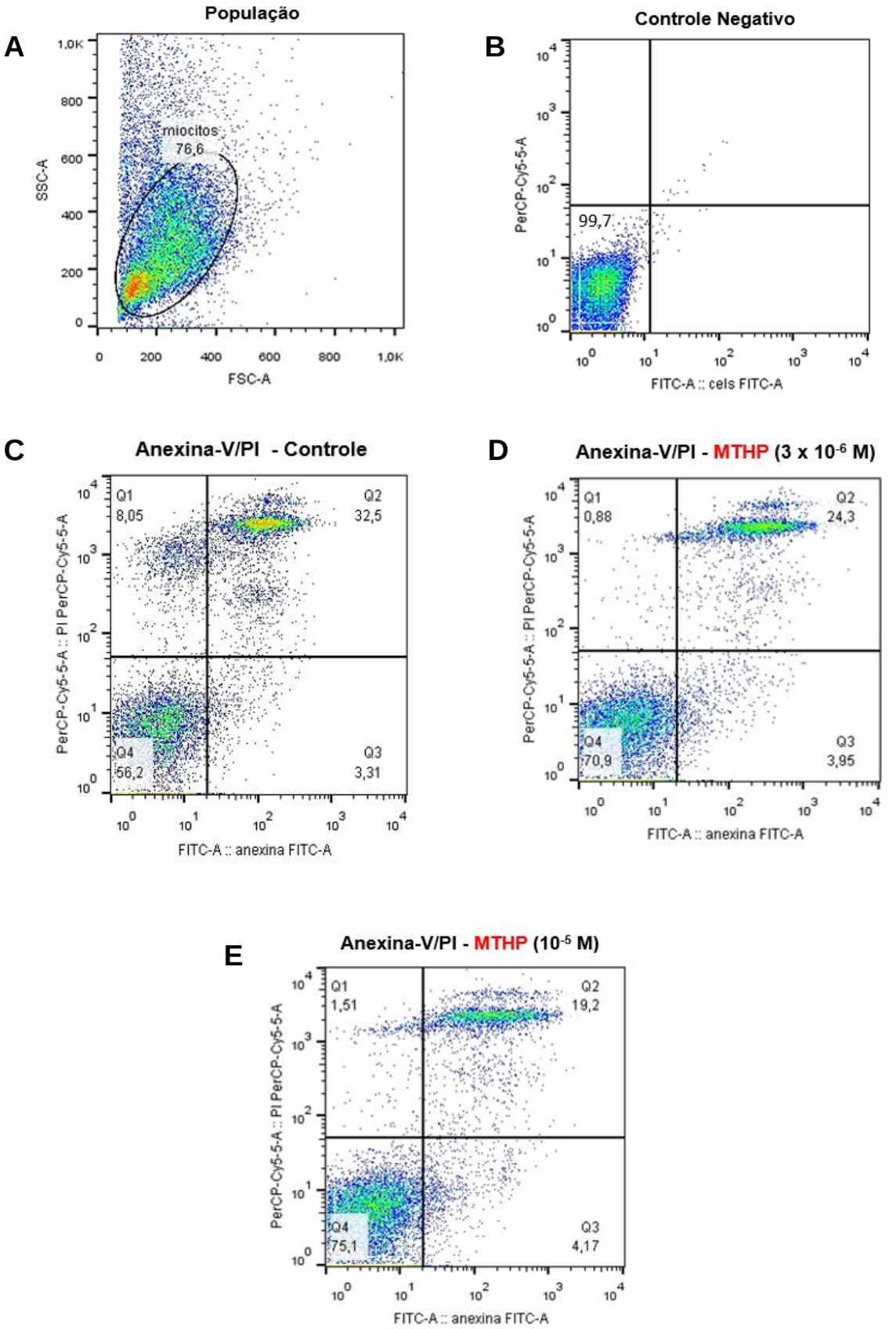
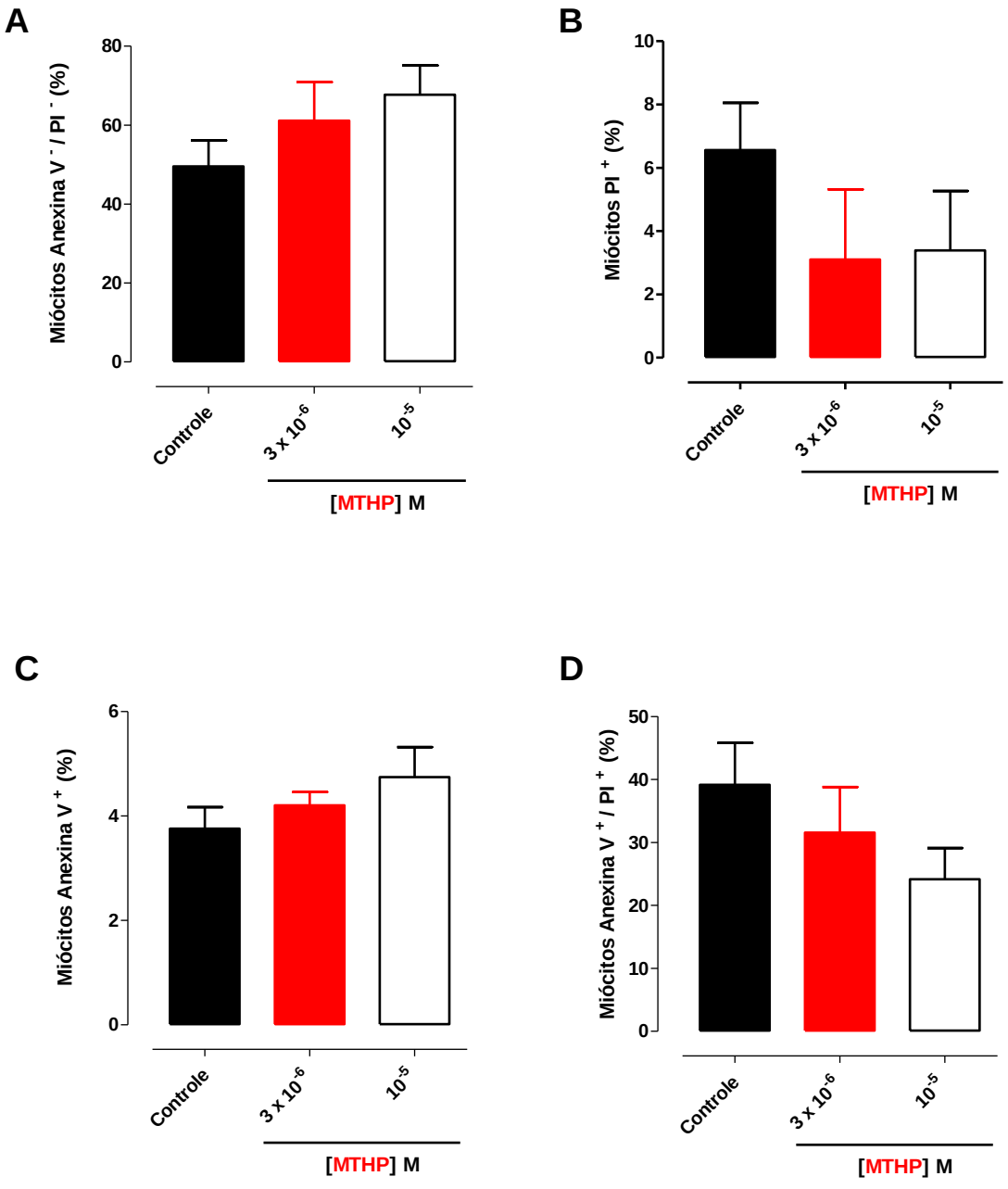


Gráfico 16 – Porcentagem de miócitos viáveis (sem marcação) (**A**), inviáveis (marcados com PI) (**B**), em apoptose precoce (marcados com anexina V) (**C**) e em apoptose tardia ou necrose (marcação dupla) (**D**), na ausência (controle) e na presença de MTHP.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test *t,* não pareado $p > 0,05$ (controle *vs.* MTHP).

4.1.9 Eletrofisiologia

4.1.9.1 Avaliação do efeito do MTHP sobre as correntes de cálcio do tipo L, em miócitos de aorta de rato recém dispersos, na configuração “whole cell”

As correntes de entrada de Ba^{2+} através dos canais para Ca^{2+}, nas células recém dispersas de artéria aorta, apresentaram característica típica de correntes sensíveis à voltagem do tipo-L. As correntes de Ba^{2+} foram registradas, utilizando o protocolo no qual a célula era despolarizada para +10 mV, partindo de um potencial “holding” de -80 mV, com a frequência de estimulação 0,1Hz. É importante mencionar que em nossos experimentos só foram utilizadas as correntes Ba^{2+} nas células que mantiveram-se estáveis.

O MTHP reduziu as correntes de bário (I_{Ba}) (Figura 18) de -8,84 ± 0,35 pA/pF (controle) para -8,23 ± 0,56 pA/pF, -5,67 ± 1,02 pA/pF, -3,87 ± 0,62 pA/pF e -1,71 ± 0,6178 pA/pF na presença de 30 µM, 100 µM, 300 µM e 1000 µM da perfusão com MTHP (n = 7), respectivamente (Gráfico 17A). Apresentando uma CI_{50} de 164 ± 1,28 µM (Gráfico 17B).

Figura 17 – Traçado representativo na ausência (controle, em preto) **(A)** e na presença de 1000 µM do MTHP (em laranja) **(B)** sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} em células musculares lisas de aorta de rato (n = 7).

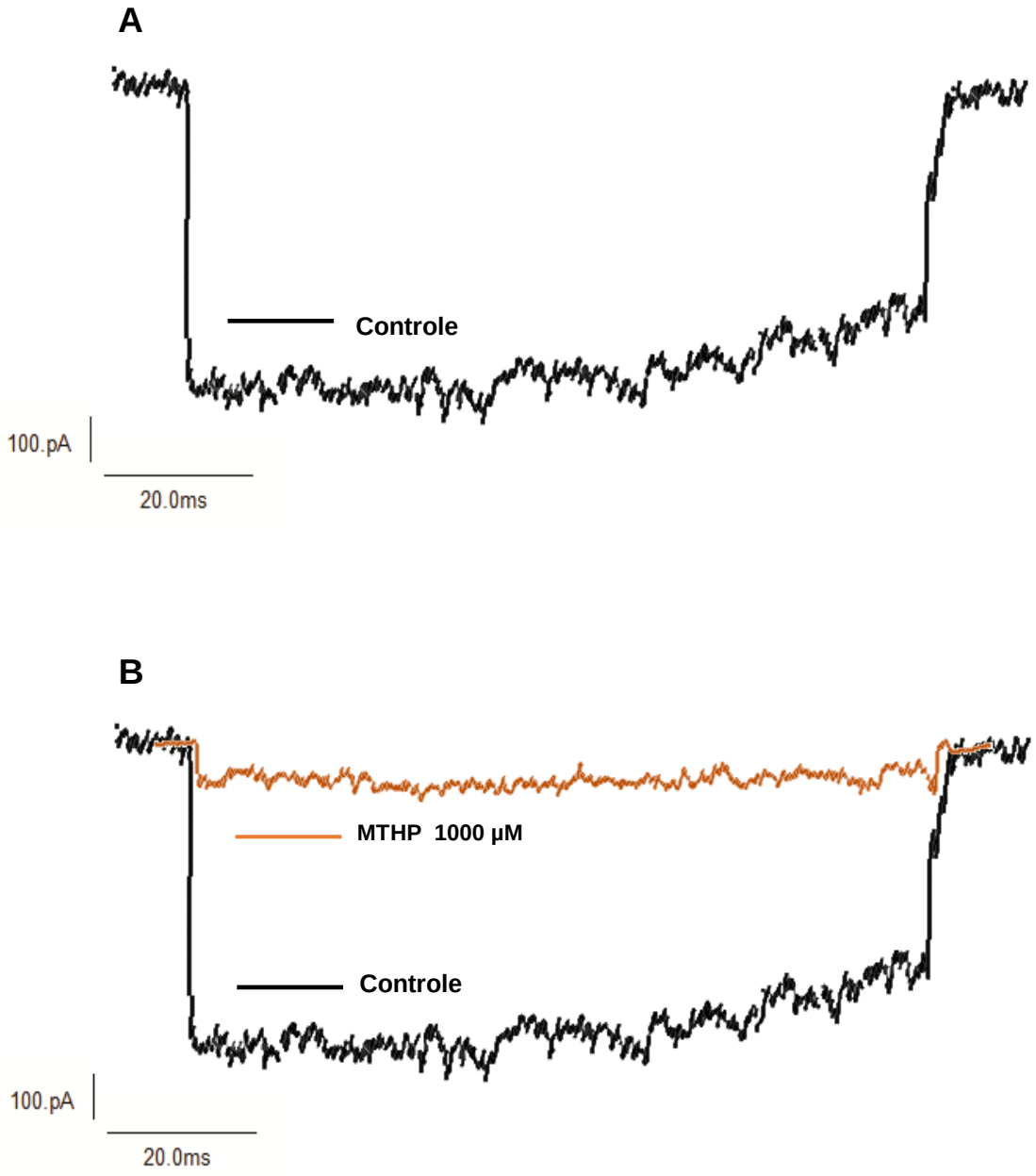
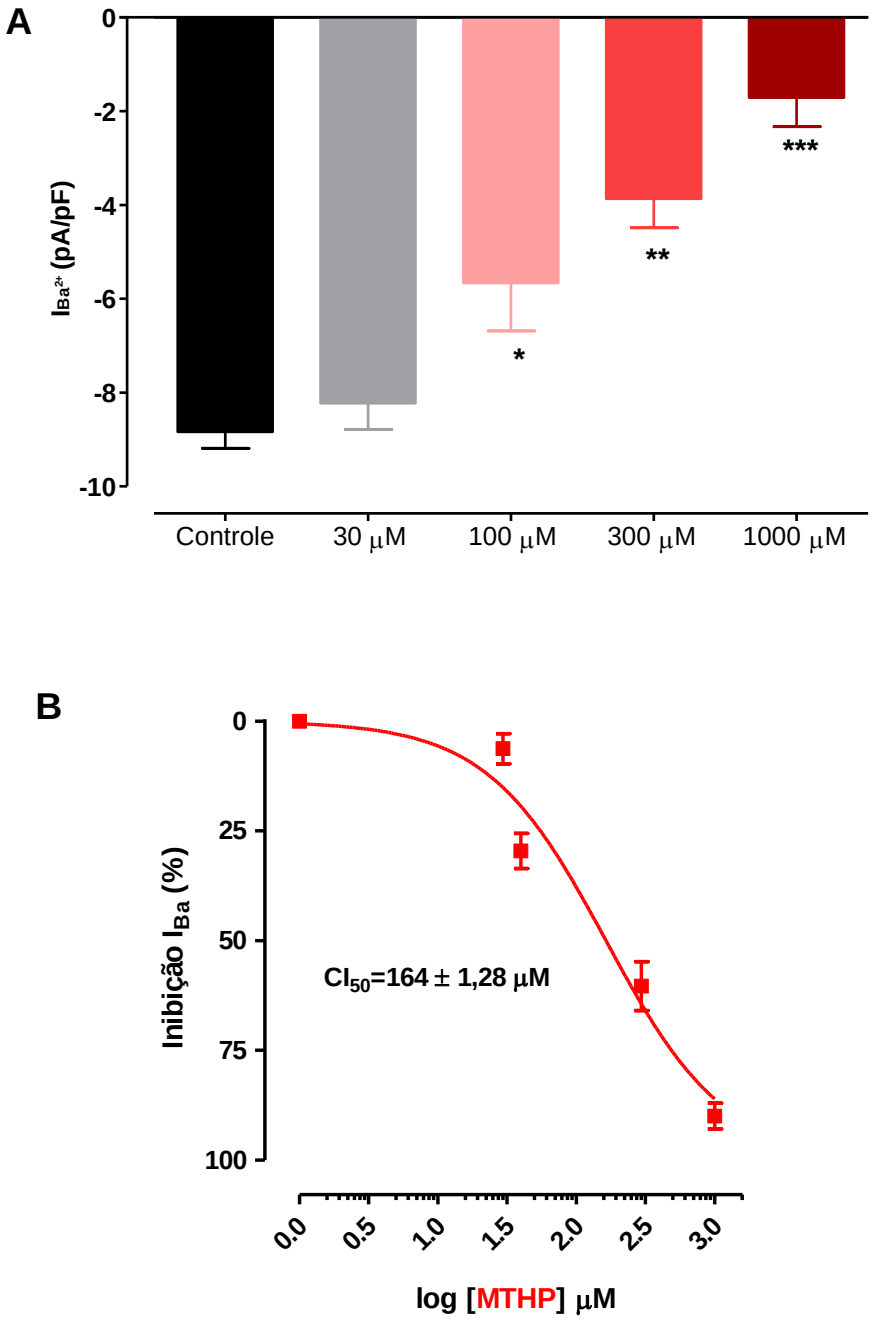
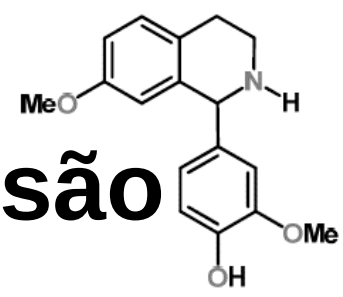


Gráfico 17 - Curva concentração resposta ao MTHP sobre as correntes de Ba^{2+} em células musculares lisas de aorta de rato**.** Gráfico de barras mostrando os valores do pico de corrente na ausência (controle) e na presença do MTHP (30, 100, 300 e 1000 μM) **(A).** Curva concentração-resposta para o MTHP, mostrando a inibição dependente de concentração das correntes de Ba^{2+} **(B).**



As colunas e as barras verticais (**A**) os símbolos e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t,* não pareado, **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001 (controle *vs.* MTHP), n = 7.

Discussão



5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o efeito vasorelaxante do alcaloide isoquinolínico 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (MTHP) em animais normotensos, caracterizando a farmacodinâmica destes efeitos. Visando os resultados parciais incluídos na tese, estas considerações deter-se-ão sobre os aspectos relacionados ao conjunto de dados no que diz respeito à: (a) modelos experimentais em musculatura lisa de aorta *in vitro* e (b) abordagens celulares em miócitos recém dispersos de aorta de rato.

O resultado mais relevante deste estudo foi a caracterização, pelo menos em parte, do mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta de ratos normotensos, que envolve a participação de fatores relaxantes derivados do endotélio vascular, por uma modulação positiva da sintase do óxido nítrico (NOS), da ciclase de guanilil solúvel (CGs) e das cicloxigenases (COXs); o bloqueio do influxo de cálcio, via Ca_V-L, além da modulação positiva de canais para potássio, em especial os SK_{Ca}, $BK_{Ca\ e}$ K_{ir}, o que levaria a redução da $[Ca^{2+}]_i$ e consequentemente ao relaxamento desse órgão.

Uma desregulação no tônus vascular pode ter repercussões graves no organismo, como o surgimento da hipertensão arterial sistêmica (HAS). A HAS tem alta prevalência, representando um fator de risco para doenças cardiovasculares, além de ser considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública, responsáveis por alta frequência de internações, ocasionando custos médicos e socioeconômicos elevados (FUCHS, 2004). Assim, substâncias que venham a regular o tônus basal ou que relaxem a musculatura lisa vascular seriam drogas com potencial utilização terapêutica.

Como descrito anteriormente, diversas atividades farmacológicas já foram listadas para alcaloides isoquinilínicos, dentre as quais, vários apresentam atividade hipotensora, como a discretamina (SILVA et al., 2009), a beberina (CHUN; YIP; LAU, 1979), o CPU-23 (DONG et al., 1992), a *DL-tetrahidropalmatina* (CHUEH et al.,1995), dentre outros. Além disso, Cordeiro (2012) e colaboradores, evidenciaram que o alcaloide isoquinolínico, 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MTHP), objeto dessa tese, apresentou efeito hipotensor em ratos normotensos, não

anestesiados, mediado por relaxamento de leito vascular mesentérico superior via NO/GMPc e produtos das cicloxigenases, *in vivo* e *in vitro*. Dessa forma, o delineamento desse estudo foi direcionado a investigar uma possível ação vasorelaxante do MTHP sobre o músculo liso vascular de aorta de ratos normotensos.

Com base nessas premissas, foi-se investigar se o MTHP estaria alterando o tônus basal vascular e se apresentaria alguma atividade vasorelaxante em aorta isolada de rato pré-contraída com fenilefrina, na ausência e na presença de endotélio funcional. O MTHP não alterou o tônus basal da aorta de rato, entretanto induziu relaxamento concentração-dependente tanto na presença como na ausência de endotélio funcional (Figura 7, Gráfico 1, Tabela 8), sendo 21 vezes mais potente quando o endotélio estava preservado, sugerindo uma participação importante dos fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE), além de um outro mecanismo independente dessa camada de células. Esses dados corroboram o que foi observado por Cordeiro (2012) em leito mesentérico. Uma vez que a potência relaxante do MTHP foi mais pronunciada quando os anéis apresentavam endotélio, todos os experimentos em nível funcional foram realizados nessa condição.

O endotélio apresenta uma função importante na regulação do tônus múscular liso vascular através da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE) (TÖRÖK, 2008), incluindo o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE), os ácidos epoxieicosatrienoicos, as prostaciclinas (PGI_2) e o óxido nítrico (NO) (EDWARDS; FÉLÉTOU; WESTON, 2010). Assim, estudos que introduzem novas substâncias capazes de relaxar artérias através do estímulo da liberação do NO endotelial têm sido relatados (SCHINI-KERT et. al., 2010).

O NO, no sistema cardiovascular, é principalmente produzido no endotélio pela sintase do NO endotelial (eNOS), também conhecida como NOS 3 (FÖRSTERMANN et al., 1995; GATH et al., 1996). Para avaliarmos a participação dessa enzima no mecanismo de ação do MTHP, utilizamos um inibidor seletivo dessa enzima, o L-NAME, análogo da L-Arginina não hidrolisável pela eNOS (REES et al., 1990). Observamos que na presença de L-NAME a potência relaxante do MTHP foi reduzida em torno de 17 vezes (Figura 9, Gráfico 2, Tabela 8), sugerindo assim, que a eNOS participa do seu mecanismo de ação.

A sinalização NO-GMPc exerce um importante papel na regulação do tônus vascular (GARDINER et al., 1990). Em camundongos "*knockout*" para a CGs ocorre um aumento significativo da PA, ausência de relaxamento induzido por NO em aorta e agregação plaquetária, fazendo com que eles morram de forma prematura (FRIEBE et al., 2007). Estados hipertensivos levam a uma diminuição na produção de fatores vasodilatadores e/ou uma sensibilidade adicional a agentes vasoconstritores, devido a uma diminuição na oferta de NO e da atividade basal da CGs. (TADDEI et al., 1998; CHEN et al., 2001a).

A CGs é o principal e mais importante alvo de ligação do NO. A sua interação com a CGs se dá através de sua ligação com Fe^{2+} do grupo heme prostético presente na enzima, rompendo a ligação Fe^{2+}-Histidina, o que funciona como gatilho inicial da mudança conformacional da enzima e sua subsequente ativação (FRIEBE; KOESLING, 2003).

Para avaliarmos se a CGs, e consequentemente a via NO-GMPc, teria participação no mecanismo vasorelaxante do MTHP, utilizamos o ODQ que é um inibidor competitivo dessa enzima por oxidação do ferro no grupo heme. Os resultados mostraram que na presença de ODQ a potência relaxante do MTHP foi reduzida em torno de 24 vezes (Figura 8, Gráfico 3, Tabela 8). Portanto, há de se considerar uma modulação positiva da CGs no efeito vasorelaxante do MTHP.

Além do NO, outras substâncias derivadas do endotélio, como a protaciclina (PGI_2), podem estar envolvidas no relaxamento de substâncias endotélio dependentes. Nos vasos, as PGI_2 são formadas em células endoteliais a partir da enzima ciclooxigenase (COX) e se difundem para as células musculares (VANHOUTTE, 2009). O mecanismo de ação da PGI_2 envolve a ativação de receptores acoplados a proteína G_s, ativação da ciclase de adenilil e aumento $[AMPc]_i$, levando a ativação da PKA e consequente vasodilatação (VANHOUTTE, 2011). Para verificar a influência dos prostanóides no relaxamento induzido pelo MTHP, foi utilizado a indometacina e constatamos que o relaxamento induzido pelo alcaloide foi atenuado em 36 vezes (Figura 9, Gráfico 4, Tabela 8), sugerindo que produtos formados a partir da via da COX participam deste efeito.

A liberação do NO e outros fatores relaxantes é consequente da ação de mediadores endoteliais estimulados por diversas substâncias endógenas que

agem em receptores localizados na membrana das células endoteliais, como a acetilcolina (FURCHGOTT, 1983). Adicional a este conceito, nossos resultados demonstraram que a atropina (um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos) não alterou a potência relaxante do MTHP em aorta de ratos normotensos (Figura 9, Gráfico 5, Tabela 8), descartando a participação desses receptores no mecanismo de ação do alcaloide.

O MTHP ao modular positivamente a NOS, CGs e a COX, promove o aumento de nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc, com consequente ativação de proteínas cinases como PKA e PKG, respectivamente. Ambas as proteínas fazem parte de uma família de serina/treonina cinases, pois fosforilam seus alvos proteicos nestes resíduos de aminoácidos (HOFMANN et al., 2006). Dois dos substratos proteicos que a PKA e a PKG podem fosforilar, e que estão presentes no músculo liso vascular são os canais de cálcio e potássio.

A fosforilação dos canais de potássio favorece a sua ativação, enquanto que para os Ca_V, leva ao seu bloqueio. A ativação de canais de potássio leva a hiperpolarização da membrana plasmática e consequente bloqueio indireto dos Ca_V, que também podem ser bloqueados pela fosforilação direta de seus resíduos de serina/treonina.

Um protocolo experimental simples de ser executado e que se baseia nas propriedades eletroquímicas da membrana celular é através de elevações moderadas (30 mM) da concentração de K^+ extracelular, que reduz a saída desse íon levando a uma pequena despolarização da célula muscular, suficiente para promover abertura de Ca_V; e através do aumento elevado (80 mM) da concentração extracelular de K^+, que reduz de maneira mais intensa o efluxo desse íon promovendo uma grande despolarização, suficiente para abrir uma grande quantidade de Ca_V (GURNEY, 1994). Dessa forma, abridores de canal de K^+ são mais eficientes em promover seu efeito relaxante em condições de aumento moderado (30 mM) da concentração externa de K^+ enquanto que, em níveis maiores de K^+ externo são desprovidos desse efeito. Uma vez que em altas concentrações de K^+ (80 mM), o potencial de membrana da célula muscular lisa está muito próximo do potencial de reversão do K^+, onde o fluxo resultante de potássio e a hiperpolarização são evitados, substâncias ditas bloqueadoras de canais de Ca^{2+} são mais eficientes em relaxar o órgão nestas condições. Esta

propriedade diferencia substâncias ditas abridoras de canal de K^+ de bloqueadores de canal de Ca^{2+} (GURNEY, 1994; NELSON; QUAYLE, 1995).

Com o intuito de verificar se o efeito relaxante do MTHP sobre a aorta isolada de rato, poderia envolver o bloqueio direto dos Ca_V ou indireto através da ativação dos canais de potássio, avaliou-se o efeito do alcaloide sobre a contração tônica induzida por 30 ou 80 mM de KCl. Analisando os resultados, podemos observar que o MTHP foi 3 vezes mais potente em relaxar o órgão pré-contraído com elevações moderadas de K^+ extracelular (Figura 10, Gráfico 6), sugerindo que o alcaloide promove uma modulação positiva em canais de potássio, levando a um bloqueio indireto dos Ca_V, via hiperpolarização de membrana. No entanto, a eficácia do MTHP também foi máxima quando o órgão era pré-contraído com elevadas concentrações de potássio extracelular (Figura 10, Gráfico 6). Em conjunto, esses resultados indicam que o MTHP promove um bloqueio do influxo de cálcio tanto de forma direta, bloqueando os Ca_V, como de forma indireta via hiperpolarização de membrana por modulação positiva de canais para potássio.

Uma característica da via de sinalização do Ca^{2+} é que esse íon participa do controle de um grande número de processos celulares, tais como: sinapse neuronal, secreção de fluidos, agregação plaquetária, diferenciação e proliferação celular, metabolismo, exocitose, fertilização e contração muscular. O Ca^{2+}, um regulador celular universal, é um sinal primário responsável pela ativação da maquinaria contrátil do músculo liso (BERRIDGE, 2009b).

A família dos Ca_V é formada por 10 membros, classificados de acordo com sua sequência homóloga primária de aminoácidos e suas funções fisiológicas (CATTERALL, 2011). Esses 10 membros são divididos em subfamílias: Ca_V1 ou Ca_V-L ($Ca_V1.1$, $Ca_V1.2$, $Ca_V1.3$ e $Ca_V1.4$), onde o “L” vem do inglês “*large*” indicando que esses canais necessitam de uma grande variação no potencial de membrana para serem ativados, são sensíveis a di-hidropiridina e são os principais Ca_V envolvidos no processo de excitação-contração; a subfamília Ca_V2, os Ca_V-P/Q ($Ca_V2.1$); os Ca_V-N ($Ca_V2.2$); os Ca_V-R ($Ca_V2.3$), que também necessitam de uma grande despolarização para serem ativados, são insensíveis a di-hidropiridinas e expressos, principalmente, em neurônios e a subfamília dos Ca_V3 ou Ca_V-T ($Ca_V3.1$, $Ca_V3.2$ e $Ca_V3.3$), onde o “T” vem do inglês “*transiente*”, estes são ativados por uma fraca despolarização e são transitórios, são

insensíveis à di-hidropiridinas e estão expressos em uma variedade de tipos celulares (CATTERALL, 2011).

Uma importante localização da subfamília dos Ca_V1, que são alvos de bloqueadores de canais de Ca^{2+} usados na terapêutica, são as células musculares cardíacas e lisas (WATERMAN, 2000). Esses canais possuem como sítio de ligação para seus bloqueadores a subunidade α1. Então para corroborarmos a hipótese de que o MTHP poderia estar bloqueando influxo de cálcio através dos do Ca_V, pré-contraímos os anéis aórticos utilizando o S-(-)-Bay K8644 que é um típico agonista dos Ca_V1, que ativam o canal por se ligar na sua subunidade α1. Como podemos observar na figura 11 e gráfico 7, o MTHP relaxou de maneira significante e dependente de concentração a aorta pré-contraída com S-(-)-Bay K8644, sugerindo a participação dos Ca_V1 no mecanismo relaxante do alcaloide. A potência relaxante do MTHP não apresentou diferença significante quando comparamos as contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644 e as induzidas por 80 mM de KCl (Gráfico 7), sendo esta mais uma evidência da participação do bloqueio do influxo de cálcio mediado pelos Ca_V1, e que esse bloqueio se dá pelo menos em parte, por ação do MTHP de forma direta no canal.

Assim, para caracterizar o bloqueio exercido pelo MTHP sobre os Ca_V1, avaliamos qual seria o tipo de antagonismo exercido frente às curvas concentrações-respostas cumulativas induzida por S-(-)-Bay K8644. Observamos um desvio da curva controle para a direita, de maneira não paralela e com redução do efeito máximo, característica de um antagonismo do tipo não competitivo (Gráfico 8). O antagonismo do tipo não competitivo pode ocorrer quando há ligação do antagonista ao mesmo sítio de ligação do agonista (antagonismo pseudo-irreversível) ou em um sítio distinto (antagonismo alostérico) (BLUMENTHAL, GARRISON, 2011). O perfil do Gráfico 8 representa um antagonismo pseudo-irreversível, uma vez que não houve saturação do efeito, ou seja, a inibição da resposta contrátil do S-(-)-Bay K8644 na presença do MTHP não atingiu um valor limitante, característica observada no antagonismo alostérico.

É bem descrito na literatura que os canais de K^+ desempenham um papel importante na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular, sendo a contração do músculo liso dependente do balanço entre o aumento da

condutância ao íon K^+, levando a uma repolarização/hiperpolarização, e a diminuição de sua condutância levando a uma despolarização (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). A atividade desses canais pode ser regulada por voltagem, Ca^{2+} ou neurotransmissores (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011), sendo o fluxo dos íons K^+ por canais presentes na membrana plasmática que regula o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V (THORNELOE; NELSON, 2005).

Para a evidência de que o MTHP estaria modulando positivamente canais de K^+ para exercer seu efeito vasorelaxante em aorta de rato, utilizou-se como ferramenta farmacológica o TEA^+, que na concentração de 10 mM é um bloqueador não seletivo desses canais (NIU et al., 2008). Observou-se que a curva de relaxamento obtida para o MTHP foi deslocada para a direita na presença do bloqueador, com redução da potência relaxante em aproximadamente 14 vezes (Figura 12, Gráfico 9, Tabela 9). Sugerindo assim a participação desses canais no efeito relaxante do alcaloide e corroborando com os resultados observados anteriormente onde o MTHP foi 3 vezes mais potente em relaxar a aorta pré-contraída com elevações moderadas de potássio extracelular.

O músculo liso vascular expressa vários tipos de canais de potássio, incluindo os K_{ATP}, K_{ir}, K_V e os K_{Ca} (KO et al., 2008; EDWARDS; FÉLÉTOU; WESTON, 2010). Uma vez que foi confirmada a participação desses canais no mecanismo de ação do MTHP, surgiu a necessidade de identificarmos qual(ais) subtipo(s) de canal(ais) de potássio estaria(m) envolvido(s), para isso utilizou-se bloqueadores seletivos desses canais.

Os K_V possuem uma grande importância na manutenção do potencial de repouso de diversos órgãos (GORDIENKO; ZHOLOS; BOLTON, 1999) e constituem a maior e mais diversificada família de canais de potássio em humanos, com 12 subfamílias conhecidas (K_V1-K_V12). Os genes que os codificam já foram identificados tanto no genoma humano como de outros animais (CHANDY et al., 2012). Estes canais em células musculares lisas constituem um mecanismo essencial na regulação da despolarização e consequente vasoconstrição como também parecem estar envolvidos na repolarização. A ativação de canais K_V aumenta efluxo de K^+, resultando em hiperpolarização de membrana. Estes canais são ativados por despolarização da membrana e têm participação na regulação de retroalimentação negativa ao

longo do potencial de membrana associado a outros canais para K^+ (JACKSON, 2000; JACKSON, 2005; STOOT; JEEPS; GREENWOOD, 2014). Para avaliarmos a participação desse canal no mecanismo relaxante do MTHP, foi utilizado a 4-AP, um bloqueador seletivo desses canais (RATTMANN et al., 2009). A potência relaxante do MTHP não foi alterada na presença desse bloqueador (Figura 13, Gráfico 10, Tabela 9), sugerindo assim que esses canais não participam do mecanismo de ação da droga teste.

Os K_{ATP}, que são seletivos para K^+ e ativados por uma diminuição na concentração intercelular de ATP, foram inicialmente identificados em miócitos ventriculares (NOMA, 1983). Posteriormente, os K_{ATP} com características semelhantes foram demonstrados em muitos outros tecidos, incluindo o músculo liso vascular (TERAMOTO, 2006). Esse canal tanto pode ser inibido por ATP intracelular como por sulfonilureias como, por exemplo, a glibenclamida e a tolbutamida, e por baixa concentração de Ba^{2+} extracelular (STANDEN et al., 1989; SANBORN, 2000). Para verificar a hipótese de que o MTHP poderia estar ativando os canais K_{ATP} para exercer seu efeito relaxante em aorta de rato, avaliou-se a atividade espasmolítica desse alcaloide na ausência e na presença de glibenclamida, um bloqueador seletivo desses canais (ERSOY et al., 2008). Como a curva de relaxamento não foi atenuada na presença desse bloqueador essa hipótese foi descartada (Figura 13, Gráfico 11, Tabela 9).

Existem 3 subtipos de canais de potássio sensíveis ao cálcio (K_{Ca}), são eles os canais $K_{Ca}1.1$ ou BK_{Ca}, os $K_{Ca}2.1$; 2.2 e 2.3 ou SK_{Ca} e os $K_{Ca}3.1$ ou IK_{Ca}. Todos esses subtipos são expressos no músculo liso vascular, sendo os dois primeiros em maior quantidade. Os BK_{Ca} são canais que respondem a variações na $[Ca^{2+}]_i$ de maneira dependente de voltagem. Eles tem um papel importante na homeostase contrátil do músculo liso vascular e não contribuem para o desenvolvimento da hipertensão, pelo contrário, eles funcionam como um mecanismo compensatório para limitar a vasoconstrição excessiva (STOOT; JEPPS; GREENWOOD, 2014).

Os SK_{Ca} estão constitutivamente associados a CaM, que medeia a abertura do canal através da ligação com o Ca^{2+} (BERKEFELD; FAKLER; SCHULTE, 2010). Os canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de pequena condutância (SK_{Ca}) geram uma corrente hiperpolarizante em células excitáveis após a

geração do potencial de ação, e assim levam ao relaxamento do músculo liso (STOOT; JEPPS; GREENWOOD, 2014).

A participação desses canais no efeito vasorelaxante do MTHP foi avaliada utilizando bloqueadores seletivos, 1 mM TEA^+, que nessa concentração bloqueia seletivamente os BK_{Ca} e a apamina para o bloqueio dos SK_{Ca} (ISHIDA et al., 1999). A potência relaxante do MTHP foi reduzida em torno de 12 vezes na presença de 1 mM de TEA^+ e cerca de 13 vezes na presença de apamina, sugerindo que os BK_{Ca} e os SK_{Ca} participam do mecanismo de ação do alcaloide (Figura 14, Gráfico 12 e 13, Tabela 9).

Os canais K_{ir} estão presentes numa grande variedade de células excitáveis e não excitáveis, incluindo células de músculo liso vascular. Este tipo de canal de potássio caracteriza-se por apresentar sempre um influxo de íons K^+ superior à saída para qualquer valor de voltagem. A atividade destes canais depende da hiperpolarização, da despolarização e também da concentração extracelular de K^+. Estudos tem demonstrado que a função desses canais está alterada na hipertensão, provavelmente por uma diminuição na expressão e na função nas musculatura lisa vascular (NELSON; QUAYLE, 1995; JACKSON, 2000).

Embora a corrente K^+ para fora da célula pelos K_{ir} seja pequena, em condições fisiológicas o potencial de membrana da célula é positivo em relação ao potencial de reversão do K^+, o que gera um gradiente eletroquímico, levando o potássio a sair da célula por difusão passiva (NELSON; QUAYLE, 1995; JACKSON, 2000). A participação desses canais no efeito vasorelaxante do MTHP foi avaliada utilizando-se um bloqueador seletivo, o $BaCl_2$ (ANDERSSON et al., 2000; TEP-AREENAN; KENDALL; RANDALL, 2003). A potência relaxante do MTHP foi reduzida em torno de 74 vezes na presença de $BaCl_2$, sugerindo que os K_{ir} tem um importante papel no mecanismo de ação do alcaloide (Figura 15, Gráfico 14, Tabela 9).

A RhoA e a ROCK têm sido intensamente estudadas nos últimos anos e participam de uma variedade de funções fisiológicas importantes, incluindo contração do músculo liso, proliferação, adesão e migração celular e aspectos da resposta inflamatória (RIENTO; RIDLEY, 2003). Nesse sentido, anormalidades nessa via estão associadas com várias doenças cardiovasculares, inclusive hipertensão (WIRTH 2010). Alterações na atividade

e sinalização da via RhoA/ROCK tem sido propostas como fatores contribuintes para o aumento da resistência vascular periférica nos quadros de hipertensão (UEHATA et al. 1997; WEBER; WEBB, 2001; ASANO; NOMURA, 2003). Além disso, estudos tem demonstrado que o relaxamento induzido pelo NO endógeno ocorre principalmente através da inibição da via RhoA/ROCK em aorta de rato.

Nesse contexto, testamos a responsividade à fenilefrina em artéria aorta na presença de Y-27632, um inibidor seletivo da ROCK (MARTINSEN et al., 2012; LEE et al., 2013). Caso a via RhoA/ROCK estivesse envolvida no mecanismo de ação do MTHP era esperado que sua potência relaxante fosse aumentada na presença do Y-27632. No entanto, o que nós observamos foi que a potência relaxante do alcaloide não foi alterada mediante o bloqueio da ROCK (Figura 15, Gráfico 15), sugerindo assim que a via de sensibilização ao cálcio RhoA/ROCK não está envolvida no mecanismo de ação do MTHP.

Até o momento, evidenciamos que o mecanismo de ação do MTHP em aorta de rato dá-se através do bloqueio dos Ca_V, em especial dos Ca_V1, além da ativação/modulação positiva dos canais de K^+, em especial dos subtipos BK_{Ca}, SK_{Ca} e K_{ir}, o que acarretaria em uma hiperpolarização de membrana com consequente fechamento indiretos dos Ca_V.

Para nos assegurarmos que o vasorelaxamento observado até então, promovido pelo MTHP, está se dando pelo mecanismo de ação proposto e não por um dano celular no miócito, avaliamos a viabilidade e o grau de apoptose dessas células, na presença e na ausência do alcaloide. Neste contexto, a proteína anexina-V associada a corantes de viabilidade (PI) vem sendo amplamente estudada e utilizada para detectar apoptose em diversos modelos biológicos (GYLYS et al., 2004).

A anexina-V tem sido bastante utilizada como um marcador de apoptose, por ser uma proteína capaz de se ligar fortemente a fosfolipídios de carga negativa, especificamente à fosfatidilserina. Esse fosfolipídio reside constitutivamente da face interna da membrana e, logo no início do processo de apoptose, são rapidamente translocados para a face externa, em resposta a agentes indutores de apoptose (TAIT et al., 2004; BRUMATTI et al., 2008).

Entretanto, a translocação da fosfatidilserina também é observada em situações de necrose, assim a Anexina-V deve ser utilizada em conjunto com corantes vitais como o iodeto de propídio (PI), que são capazes de penetrar nas

células quando a integridade da membrana plasmática está alterada, o que ocorre apenas nos estágios de apoptose tardia ou de necrose celular. Células vivas apresentam membranas intactas e, portanto, impermeáveis ao PI (VERMES et al., 1995; BAATOUT et al., 2004).

Como a externalização da fosfatidilserina ocorre no início do processo de apoptose, antes da membrana ter sua permeabilidade comprometida, a anexina-V pode ser usada para identificar células em estágio precoce de apoptose. Células em estágio avançado de apoptose ou em necrose apresentam membrana desestruturada e, consequentemente, permeável ao PI; logo a associação desses dois marcadores permite identificar as células viáveis (sem marcação), células apoptóticas (podendo distinguir entre precoce ou tardia) e células em necrose (BAATOUT et al., 2004). O MTHP, nas concentrações testadas, não interferiu com o perfil de células viáveis, inviáveis, em apoptose precoce e tardia/necrose quando comparado ao controle (Figura 16, Gráfico 16, Tabela 10); confirmando que o efeito vasorelaxante observado se deve ao mecanismo de ação da droga e não por um possível dano celular.

Independente do mecanismo de ação, para que ocorra o relaxamento da musculatura lisa faz-se necessário a redução da $[Ca^{2+}]_i$, uma vez que o desencadeamento da contração e parte da manutenção desta contração depende do aumento da $[Ca^{2+}]_i$ (SOMLYO; SOMLYO, 1994). Para comprovarmos os achados em nível funcional de que o MTHP estaria inibindo o influxo de cálcio através dos Ca_V, seja ou indiretamente, verificamos se o MTHP estaria exercendo um efeito direto sobre as correntes de cálcio (I_{Ca}) através dos Ca_V-L.

Foram realizados registros de corrente na configuração “whole-cell voltage clamp”, onde foi verificado que o alcaloide inibiu as correntes de bário (I_{Ba}) (Figura 17) através dos Ca_V de maneira significante e dependente de concentração (Gráfico 17), apresentando uma CI_{50} de 164 ± 1,28 µM. Estes resultado comprovam a hipótese levantada nos estudos em nível funcional de que o MTHP promove um bloqueio direto sobre os Ca_V.

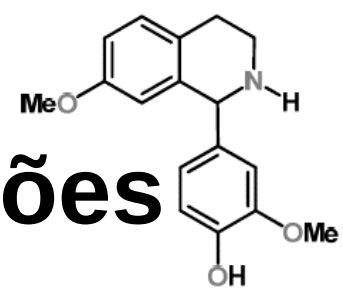
Tomados em conjunto, os resultados aqui apresentados fornecem, pelo menos em parte, a caracterização do mecanismo de ação relaxante do MTHP em aorta de ratos normotensos. Este evento parece envolver fatores relaxantes

derivados do endotélio, onde o MTHP induz uma modulação positiva da NOS e das cicloxigenases, bem como a ativação da ciclase de guanilil solúvel (CGs).

Além disso, o alcaloide isoquinolínico diminui o influxo de cálcio por um bloqueio direto dos Ca_V-L, bem como por uma modulação positiva dos canais BK_{Ca}, SK_{Ca} e Kir. Todos esses eventos levam a uma redução da $[Ca^{2+}]_i$ e consequente relaxamento do musculo liso vascular. Não podemos descartar outras vias de sinalização intracelular, ainda não investigadas, e que podem ter um grande papel no efeito relaxante do MTHP sobre o músculo liso vascular de aorta de ratos normotensos, ainda sendo necessárias futuras investigações para a obtenção de uma visão total do mecanismo de ação pelo qual o alcaloide exerce seus efeitos.

Os efeitos produzidos pelo MTHP têm um papel crucial no controle da homeostase vascular, *in vitro*; revelando a importância do estudo de substâncias que contenham a propriedade de modular a produção endógena de NO e de outros fatores relaxantes endoteliais, bem como de canais iônicos, especialmente os de cálcio e potássio, tendo as produtos inspirados naturais como uma importante fonte de inspiração para a síntese de novas moléculas.

Conclusões



6 CONCLUSÕES

Conforme demonstrado, os resultados do presente estudo nos permitem concluir que o mecanismo de ação vasorelaxante do 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MTHP) em aorta de rato:

- envolve a participação de fatores relaxantes derivados do endotélio, provavelmente através do envolvimento do óxido nítrico sintase, das cicloxigenases e da ciclase de gualil solúvel;
- não envolve a participação dos receptores muscarínicos;
- envolve o bloqueio dos canais de cálcio dependentes de voltagem, em especial os do tipo L;
- envolve a modulação positiva dos canais de K^+, em especial os BK_{Ca}, SK_{Ca} e K_{ir} ;
- não interfere com o perfil apoptótico e de viabilidade celular em miócitos;
- inibi corrente de maneira concentração-dependente através dos Ca_V.

Referências

REFERÊNCIAS

AJAYA, M.; GILANIB, A. H.; MUSTAFAA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 74, p. 603–612, 2003.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5rd edition. **British Journal of Pharmacology**, v. 164 Suppl 1, p. S142-143, 2011.

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

ANDERSSON, D. A.; ZYGMUNT, P. M.; MOVAHED, P.; ANDERSSON, T. L. G.; HOGESTATT, E. D. Effects of inhibitors of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels, inwardly-rectifying potassium channels and Na^+/K^+ ATPase on EDHF relaxations in the rat hepatic artery. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 129, p. 1490-1496, 2000.

AMAT, M.; ELIAS, V.; LLOR, N.; SUBRIZI, F.; MOLINS, E.; BOSCH, J. A. General Methodology for the Enantioselective Synthesis of 1-Substituted Tetrahydroisoquinoline Alkaloids. **European Journal of Organic Chemistry,** v.21, p.4017–4026, 2010.

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

ARNAL, J.; AMRANI, A.; CHATELLIER, G., et al. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. **Hypertension**., v.22, p.380–387. 1993.

ASANO, M.; NOMURA, Y. "Comparison of inhibitory effects of Y-27632, a Rho kinase inhibitor, in strips of small and large mesenteric arteries from spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats." Hypertens Res 26(1): 97-106, 2003

AWUAH, E.; CAPRETTA, A. Strategies and Synthetic Methods Directed Toward the Preparation of Libraries of Substituted Isoquinolines. **J. Org. Chem**., v.75, p. 5627-5634, 2010.

BAATOUT, S. et al. Effect of curcuma on radiation-induced apoptosis in human cancer cells. **International journal of oncology**, v. 24, n. 2, p. 321-329, 2004.

BARNES, P.J. The pharmacological properties of tiotropium. **Chest** 117, 63–66, 2000.

BARREIRO, E.J., Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, p. 1172-1180, 2002.

BERKEFELD, H.; FAKLER, B.; SCHULTE, U. Ca2+-Activated K+ Channels: From Protein Complexes to Function. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 4, p. 1437-1459, 2010.

BERRIDGE, M. J. Cell Signalling Pathways. In**: Cell Signalling Biology**. Portland Press Limited, p. 1-118, 2009a.

BHADRA, K.; KUMAR, G. S. Therapeutic potential of nucleic acid-binding isoquinoline alkaloids: Binding aspects and implications for drug design. **Medicinal Research Reviews**, v.31, p.821-862, 2011.

BISSET, N.G. Plants as a source of isoquinoline alkaloids. In: PHILLIPSON, J.D.; ROBERTS, M.F.; ZENK, M.H. *The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids*. 8.ed. Berlin, New York: Springer-Verlag, p.79-101, 1985.

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

BLUMENTHAL, D. K.; GARRISON, J. C. Pharmacodynamics: molecular mechanisms of drug action. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (Ed.) **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.** 12th ed. San Diego, CA: The McGraw-Hill Companies, Inc. 2011.

BRUMATTI G, SHERIDAN C, MARTIN SJ. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. **Methods**; 44:235-240, 2008.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, p. 131-134, 2005.

CARAFOLI, E.; BRINI, M. **Calcium signalling and disease: molecular pathology of calcium**. [S.l.]: Springer, 2007.

CATTERALL, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels, **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, p. 1-24, 2011.

CHAEA, H.-J., KIM, H.-R., KANG, Y. J., HYUN, K. C., KIM, H. J., SEO, H. G., LEE, J. H. et al. Heme oxygenase-1 induction by (S)-enantiomer of YS-51 (YS-51S), a synthetic isoquinoline alkaloid, inhibits nitric oxide production and nuclear factor-κB translocation in ROS 17/2.8 cells activated with inflammatory stimulants. **International Immunopharmacology**, v.12, p.1559-1568, 2007.

CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; GUTMAN, G. A.; LAZDUNSKI, M.; MCKINNON, D.; PARDO, L. A.; ROBERTSON, G. A.; RUDY, B.; SANGUINETTI, M. C.; STÜHMER, W.; WANG, X. Voltage-gated potassium channels. Last modified on 11/10/2012. Acesso em 11/10/2014. IUPHAR database (IUPHAR-

DB),http://www.iupharb.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=81&family Type=IC.

CHANG, F.R.; WEI, J.L.; TENG, C.M.; WU, Y.C. Antiplatelet aggregation constituents from Annona purpurea. Journal Natural Products, v.61, p.1457-1461, 1998a.

CHANG, F.R.; WEI, J.L.; TENG, C.M.; WU, Y.C. Two new 7-Dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of Annona purpurea. Phytochemistry, v.49, n.7, p.2015-2018, 1998b.

CHITALEY, K.; WEBER, D.; WEBB, R. C. RhoA/Rho-kinase, vascular changes, and hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 3, n. 2, p. 139-144, 2002.

CHUEH, F.Y.; HSIEH, M.T.; CHEN, C.F.; LIN, M.T**.** Hypotensive and bradycardic effects of dl-tetrahydropalmatine mediated by decrease in hypothalamic serotonin release in the rat. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.69, p. 177-180, 1995.

CHUN, Y. T.; YIP, T. T.; LAU, K. L. A biochemical study on the hypotensive effect of berberine in rats. **General Pharmacology: Vascular System**, v.10, p. 177-182, 1979.

COLE, W.C.; WELSH, D.G. Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** v. 510, p. 160-173, 2011.

CORDEIRO, M. B. **Aplicação da reação de Picted-Spengler na síntese de alcaloides fenil tetra hidroisoquinolínicos inéditos**. 2012. 113f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Farmacoquímica) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

CORDELL, G. A., QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research: PTR,** v.15, p. 183-205, 2001.

COSTA, P.R.R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 58-66, 2009.

DONG, H.; LEE, C.-M.; HUANG, W.-L.; PENG, S.-X. Cardiovascular effects of substituted tetrahydroisoquinolines in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.107, p.262-268, 1992.

EDWARDS, G.; FÉLÉTOU, M.; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. **Pflugers Archiv - European Journal of Physiological**. v. 459, p. 863-879, 2010.

ERSOY, S. ORHAN, I. TURAN, N.N. SAHAN, G. ARK, M. TOSUN F. Endothelium-dependent induction of vasorelaxation by *Melissa officinalis* L. ssp. officinalis in rat isolated thoracic aorta. **International Journal of Phytomedicine**, v. 15; p. 1087-1092, 2008.

EXTON, J. H. New developments in phospholipase D. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 25, p. 15579-15582, 1997.

FEHER, J. Smooth Muscle. **Quantitative Human Physiology**, p. 283-293, 2012.

FEHER, M.; SCHMIDT, J.M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, v. 43, n. 1, p. 218-227, 2013.

FERRANTE, J.; LUCHOWSKI, E,; RUTLEDGE, A.; TRIGGLE, D.J. Binding of a 1,4-dihydropyridine calcium channel activator, S(-)-Bay K8644, to cardiac preparations. **Biochemical and Byophysics Research Communications,** v. 158, n. 1, p. 149-154, 1989.

FÖRSTERMANN, U.; KLEINERT, H.; GATH, I., et al. Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types. **Adv Pharmacol**, v.34, p.171-186. 1995.

FRIEBE, A.; MERGIA, E.; DANGEL, O., et al. Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.104, p.7699-7704. 2007.

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.

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

FURCHGOTT, R. F. Role of the endothelium in responses of vascular smoth muscles. **Cir. Res.,** v.53, p. 557-573, 1983.

GARDINER, S.; COMPTON, A.; BENNETT, T., et al. Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. **Hypertens**., v.15, p.486–492. 1990.

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

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C.L.; NIELSEN, E. B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol. Pharmacol.**; 48: 184-188, 1995.

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

GRUNDON, M. F. The Alkaloids. **Royal Society of Chemistry**, 1976.

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

GYLYS, K.H.; FEIN, J.A.; WILEY, D.J. Rapid annexin-V labeling in synaptosomes. **Neurochem** Int; 44:125-131, 2004.

HAMILL, O. P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B.; SIGWORTH, F. J. Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patcher. **Pflugers Arch**. v. 391, p. 85-100, 1981.

HARVEY, A.L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R.J. The re‐emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**. p. 1 – 19, 2015.

HOFMANN, F.; FEIL, R.; KLEPPISCH, T.; SCHLOSSMANN, J. Function of cGMP-Dependent Protein Kinases as Revealed by Gene Deletion. **Physiological Reviews,** v. 86, p. 1–23, 2006.

ISHIDA, K.; KINOSHITA, H.; KOBAYASHI, S.; SAKABE, T. Thiopentone inhibits endothelium-dependent relaxations of rat aortas regulated by endothelial Ca^{2+}-dependent K^+ channels. **European Journal of Pharmacology**, v. 371, n. 2-3, p.179-185, 1999.

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

JACKSON, W. F.; Potassium channels in the peripheral microcirculation. **Microcirculation**. V.12(1), p.113-27, 2005.

KIM, H. R.; APPEL, S.; VETTERKIND, S.; GANGOPADHYAY, S. S.; MORGAN, K. G. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6a, p. 2165-2180, 2008.

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.

KO, E. A.; HAN, J.; JUNG, I. D.; PARK, W. S. Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth muscle cells. **Journal smooth muscle research**. v. 44, p. 65-81, 2008.

LEDOUX, J.; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. **Physiology**, v. 21, p. 69-78, 2006.

LEE, K.; JUNG,J.; YANG, G.; HAM,I.; BU, Y.; KIM, H.; HOI,Y. Endothelium-Independent Vasorelaxation Effects of Sigesbeckia glabrescens (Makino) Makino on Isolated Rat Thoracic Aorta. **Phytotherapy Research,** v. 27, p. 1308-1312, 2013.

LIMA, L. M., Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, 30, 1456-1468, 2007.

MARTINEZ-VÁZQUEZ, M.; LOZANO, D.G.C.; ESTRADA-REYES, R.; GONZÁLEZLUGO, N.M.; APAN, T.R.; HEINZE, G. Bio-guided isolation of the cytotoxic corytenchine and isocoreximine from roots of *Annona cherimolia*. ***Fitoterapia***, v.76, p.733-736, 2005.

MARTINSEN, A.; YERNA, X.; RATH, G.; GOMEZ, E.L.; DESSY, C.; MOREL, N. Different Effect of Rho Kinase Inhibition on Calcium Signaling in Rat Isolated Large and Small Arteries. **Vascular Research,** v. 49, p. 522-523, 2012.

MASUMOTO, A., HIROOKA, Y., SHIMOKAWA, H., HIRONAGA, K., SETOGUCHI, S. e TAKESHITA, A. Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. **Hypertension** 38(6): 1307-1310, 2001.

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

MCHALE, N.; HOLLYWOOD, M.; SERGEANT, G.; THORNBURY, K. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 570, n. 1, p. 23-28, 2006.

MONCADA, S.; PALMER, R.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology (Review). **Pharmacol. Rev.,** v.43, p. 109–142, 1991.

MONCADA, S; HIGGS, E. A. The L-arginine – nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**, v. 29, p. 2002 – 2012, 1993.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MONTANARI, C.A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Quimica Nova**, 18, p.56-64, 1995.

MORA PALE, M.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, S.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S.; KOFFAS, M. A. G. Biochemical strategies for enhancing the *in vivo* production of natural products with pharmaceutical potential. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 25, p. 86-94, 2014.

MOTULSKY, H. J.; CHRISTOPOULOS, A. In: **Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting.** GraphPad Software Inc., 2003.

MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 345-374, 2006.

NELSON MT, QUAYLE JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am J Physiol.** v. 268, p. C799–C822, 1995.

NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. **Pharmacological Reviewes**, v. 55, p. 597–606, 2003.

NEVALA, R.; PAUKKU, K.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Calcium-sensitive potassium channel inhibitors antagonize genistein- and daidzein-induced arterial relaxation in vitro. **Life Sciences**, v. 69, p. 1407–1417, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**. v. 75, p. 311−335, 2012.

NIU, LONG-GANG; ZHANG, MING-SHENG; LIU, YU; XUE, WEN-XIN; LIU, DAN-BING; ZHANG, JUN; LIANG, YUE-QIN. Vasorelaxant effect of taurine is diminished by tetraethylammonium in rat isolated arteries. **European Journal of Pharmacology.** v. 580, p. 169-174, 2008.

NOMA, A. ATP-regulated K+ channels in cardiac muscle. **Nature**, v. 305, n. 5930, p. 147-148, 1983.

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

PECHÁNOVÁ, O.; DOBESˇOVA´, Z.; ZICHA, J., et al. Vasoactive systems in L-NAME hypertension: the role of inducible nitric oxide synthase. **J. Hypertension**., v.22, p.167-173. 2004.

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

PREININGER, V. Chapter 1 Chemotaxonomy of Papaveraceae and Fumariaceae. **The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology** v.29, p. 1-98, 1986

RAFIKOV, R.; FONSECA, F. V.; KUMAR, S.; PARDO, D.; DARRAGH, C.; ELMS, S.; FULTON, D.; BLACK, S. M., eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. **J Endocrinol.,** v. 210(3), p.271-84, 2011.

RATTMANN, Y. D.; CRESTANI, S.; LAPA, F. R.; MIGUEL, O. G.; MARQUES, M. C. A.; SILVA-SANTOS, J. E.; ADAIR R.S. SANTOS, A. R. S. Activation of muscarinic receptors by a hydroalcoholic extract of Dicksonia sellowiana Presl.

HooK (Dicksoniaceae) induces vascular relaxation and hypotension in rats. **Vascular Pharmacology,** v. 50, p. 27–33, 2009.

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

REES, D.D.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Role of endothelium derived nitric oxide in the regulation of blood pressure**. Proc. Natl. Acad. Sci**., v.86, p.3375-3378. 1990.

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

RIENTO, K.; RIDLEY, A. J. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. **Nat Rev Mol Cell Biol** 4(6): 446-456, 2003.

SANBORN, B. M. Relationship of Ion Channel Activity to Control of Myometrial Calcium. **Journal of the Society Gynecologic Investigation.,** v. 7, p. 4–11, 2000.

SANDERS, K. M. Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1438-1449, 2001.

SCHINI-KERTH VB, AUGER C, ETIENNE-SELLOUM N, CHATAIGNEAU T. Polyphenol-induced endothelium-dependent relaxations role of NO and EDHF. **Adv. Pharmacol**., v.60, p.133-75, 2010.

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

SHOKEEN, P.M.S.C.; RAY, K.M.D.; BALA, M.M.D.; TANDON, V. Preliminary studies on activity of Ocimum sanctum, Drynaria quercifolia, and Annona squamosa against Neisseria Gonorrhoeae. **Sexually Transmitted Diseases**, v.32, p.106-111, 2005.

SIGTHORSSON, G., CRANE, R., SIMON, T., HOOVER, M., QUAN, H., BOLOGNESE, J., BJARNASON, I. COX-2 inhibition with rofecoxib does not increase intestinal permeability in healthy subjects: a double blind crossover study comparing rofecoxib with placebo and indomethacin. **Gut** 47, 527–532, 2000.

SILVA, D. F; PORTO, D. L.; ARAÚJO, I. G. A.; DIAS, K. L. G.; CAVALCANTE,K. V. M.; VERAS, R. C.; TAVARES, J. F. et al. Endothelium-derived nitric oxide is involved in the hypotensive and vasorelaxant effects induced by discretamine in rats. **Pharmazie**, v.64, p. 327-331,2009.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENEL,E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento.** 5ª ed., Editora UFRGS/UFSC, 2004.

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

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

SONNET, P.E.; JACBSON, M. Tumor inhibitors II: Cytotoxic alkalids from *Annona purpurea*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.60, p.1254-1256, 1971.

SORDI, R., FERNANDES, D., HECKERT, B.T., ASSREUY, J. Early potassium channel blockade improves sepsis-induced organ damage and cardiovascular dysfunction. **British Journal of Pharmacology** 163, 1289–1301, 2011.

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

STÖCKIGT, J.; ANTONCHICK, A. P.; WU, F.; WALDMANN, H. The Pictet-Spengler Reaction in Nature and in Organic Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, p.8538-8564, 2011.

STOOT, J.B.; JEPPS, T.A.; GREENWOOD, I.A. K_V7 potassium channels: a new therapeutic target in smooth muscle disorders. **Drug Discovery Today**, v. 19, n.4, p. 1-3. 5-8, 2014.

TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L., et al. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. **Circulation**, v.97, p.2222-2229. 1998.

TAIT, J.F.;GIBSON, D.F., SMIT, H.C. Measurement of the affinity and cooperativity of annexin V-membrane binding under conditions of low membrane occupancy. **Anal Biochem**; 329:112-119, 2004.

TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S.E.T.; ANDRADE, H.F.J.; AMORIM-GUALDA, N.C.; YOGI, A.; CARVALHO, C.S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; FISCHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. ***Phytomedicine***, v.12, p.382-390, 2005.

TEP-AREENAN, P.; KENDALL, D. A.; RANDALL, M. D. Mechanisms of vasorelaxation to testosterone in the rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 465 p. 125– 132, 2003.

TERAMOTO, N. Physiological roles of ATP-sensitive K^+ channels in smooth muscle, **The Journal of Physiology,** v. 572, p. 617-624, 2006.

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, n. 3, p. 215-242, 2005.

TÖRÖK J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. **Physiol. Res.**, 57(6):813-25, 2008.

TOTSUKAWA, G.; YAMAKITA, Y.; YAMASHIRO, S.; HARTSHORNE, D.J.; SASAKI, Y.; MATSUMURA, F. Distinct Roles of Rock (Rho-Kinase) and Mlck in Spatial Regulation of Mlc Phosphorylation for Assembly of Stress Fibers and Focal Adhesions in 3t3 Fibroblasts. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, n. 4, p. 797-806, 2000.

TRIGGLE, C.R.; DING, H., The endothelium in compliance and resistance vessels. **Front. Biosci.**, (Schol Ed), v.1 (3), p.730-44, 2011.

UEHATA, M., ISHIZAKI, T., SATOH, H., ONO, T., KAWAHARA, T., MORISHITA, T., TAMAKAWA, H., YAMAGAMI, K., INUI, J., MAEKAWA, M. e NARUMIYA, S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature** 389(6654): 990-994, 1997.

VAN ENGELAND, M.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. A novel assay to measure loss of membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. **Cytometry**, v. 24, p. 131-139, 1996.

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

VANHOUTTE, PM. COX-1 and Vascular Disease. **Clin. Pharmacol. Ther.,** 86: (2) 212–215, 2009.

VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions in hypertension: when prostacyclin becomes ugly. **Hypertension**. Mar:57(3):526-31, 2011.

VANHOUTTE, P. M.; BOULANGER, C. M. Function the endothelium in arterial hypertension. **La Revue Du Praticieu**, V.45, Issue 20,p-2513-2518, 1995.

VERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINGSPERGER C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J Immunol Methods**, 184 (1):39-51, 1995.

WALJI, R.; WIKTOROWICZ, M. Governance of matural health products regulation: An iterative process. **Health Police**, v. 111, p. 86-94, 2013.

WANG, B.; DENG, J.; GAO, Y.; ZHU, L.; HE, R.; XU, Y. The screening toolbox of bioactive substances from natural products: A review. **Fitoterapia**, v. 8; p. 1141-1151, 2011.

WARTHEN, D.; GOODEN, E.L.; JACOBSON, M. Tumor inhibitors: liriodenine, a cytotoxic alkaloids from *A. glabra. Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.58, p.637- 638, 1969.

WATERMAN, S. A. Voltage-gated calcium channels in autonomic neuroeffector transmission. **Progress in Neurobiology**, v. 60, n. 2, p. 181-210, fev 2000.

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

WEBER, D. S.; WEBB, R. C. Enhanced relaxation to the rho-kinase inhibitor Y-27632 in mesenteric arteries from mineralocorticoid hypertensive rats. **Pharmacology** 63(3): 129-133, 2001.

WIRTH, A.; OFFERMANNS, S. G-Protein-Coupled Receptors in Smooth Muscle. **Muscle — Fundamental Biology and Mechanisms of Disease**, p. 1145-1153, 2012.

WIRTH, A.Rho kinase and hypertension. **Biochim Biophys Acta** 1802(12): 1276-1284, 2010.

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium signalling in smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 38, p. 397-407; 2005.

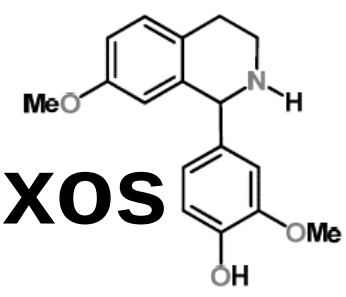
WRAY, S.; KUPITTAYANANT, S.; SHMIGOL, A.; SMITH, R. D.; BURDYGA, T. V. The physiological basis of uterine contractility: a short review. **Experimental Physiology,** v. 86, p. 239–246, 2001.

XU, C.; LU, Y.; TANG, G., WANG, R. Expression of Voltage-Dependent K^+ Channel Genes in Mesenteric Artery Smooth Muscle Cells. **American Journal of Physiology**. v. 277 p. G1055 - G1063, 1999.

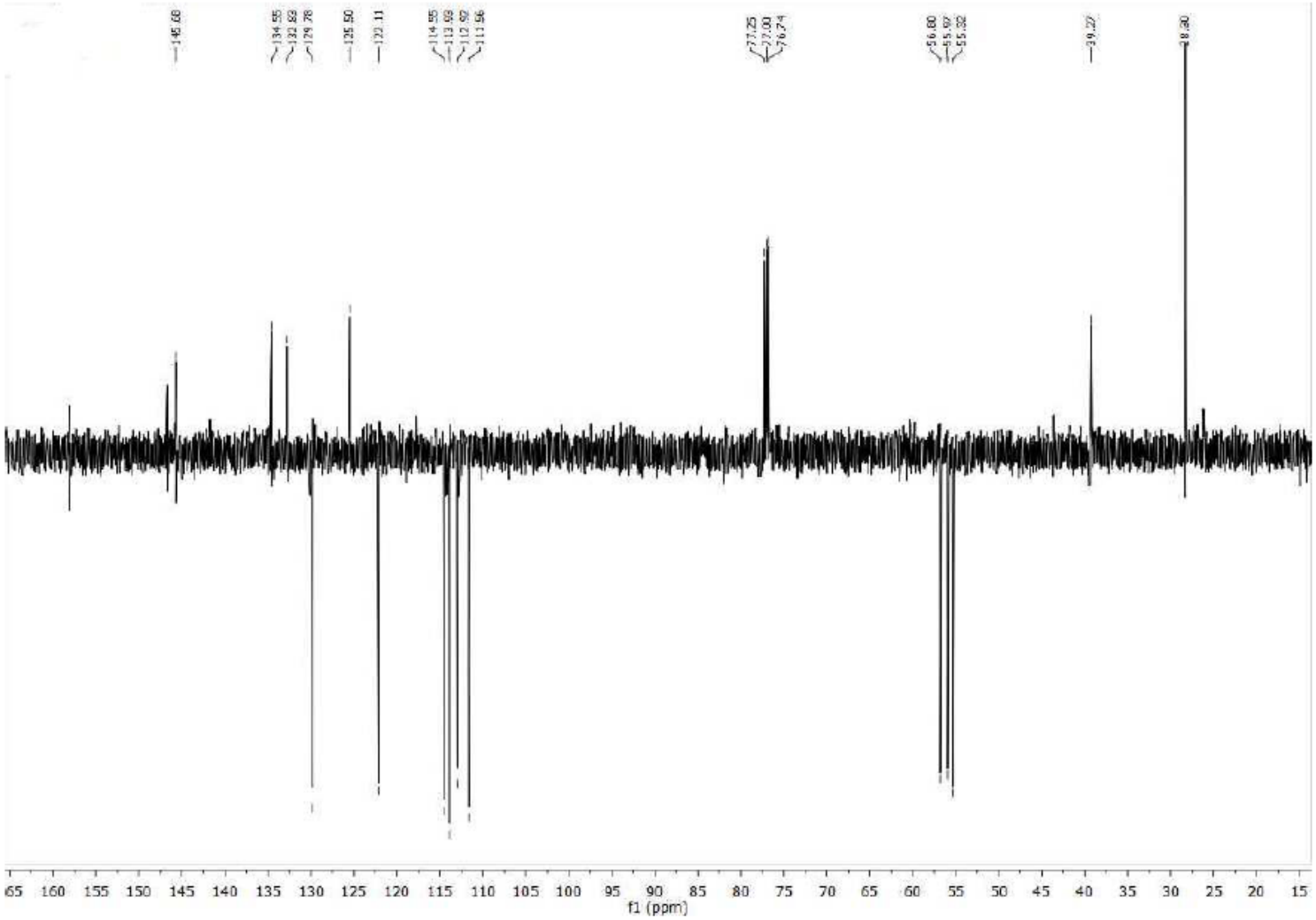
ZICHA, J.; DOBESˇOVA´, Z.; KUNESˇ, J. Relative deficiency of nitric oxide-dependent vasodilation in salt-hypertensive Dahl rats: the possible role of superoxide anions. **J Hypertens**, v.19, p.247–254. 2001.

ZHENG, W.; RAMPE, D.; TRIGGLE, D.J. Pharmacological, radioligand biding, and eletrophysiological characteristics of FLP 64176, a novel nondihydropyridine Ca^{2+} channel activator, in cardiac and vascular preparations. **Molecular Pharmacology,** v. 40, p. 734-741, 1991.

Anexos

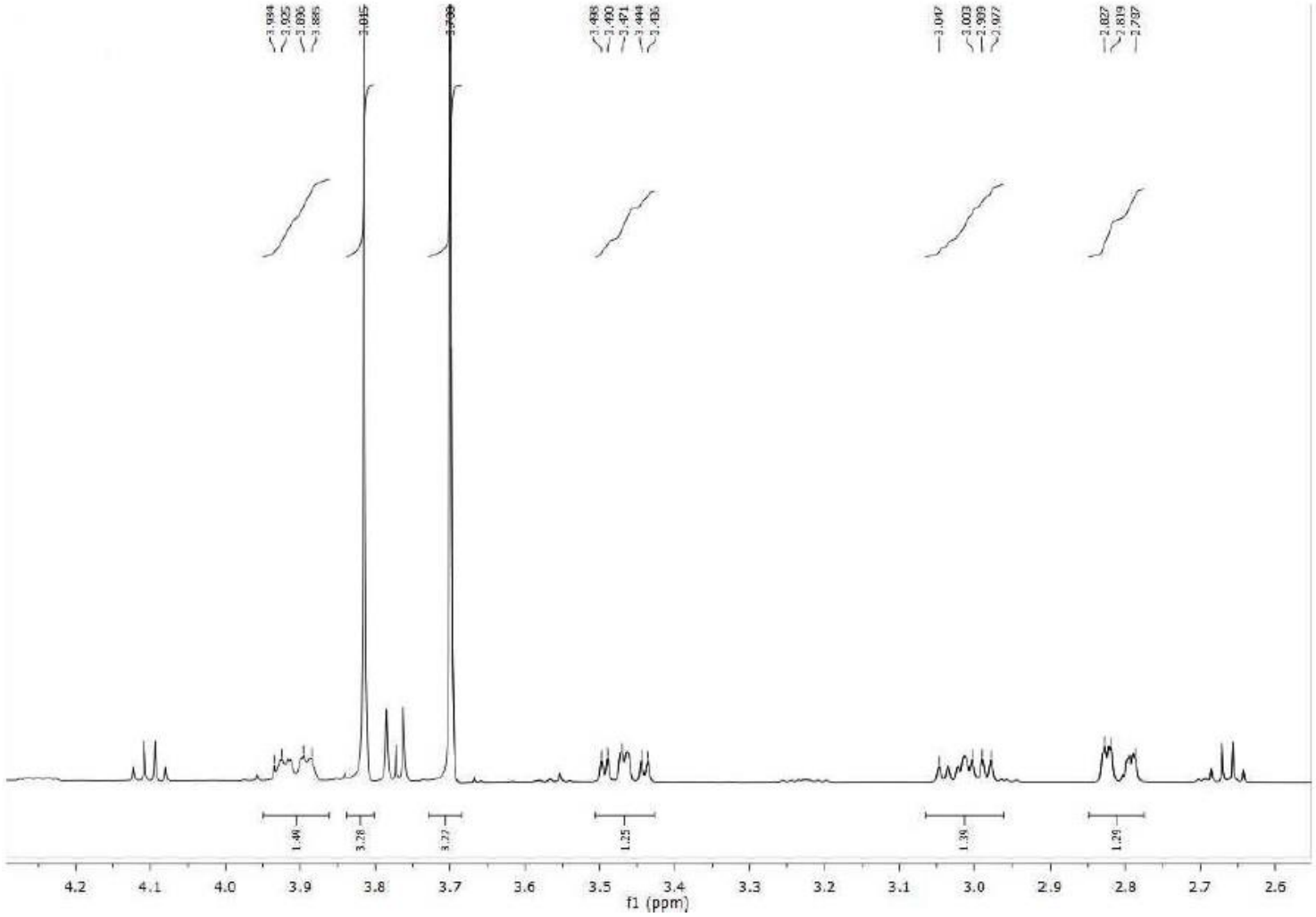


ANEXO A - Espectro de RMN ^{13}C-APT (125 MHz, CDCl3) do 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MTHP).



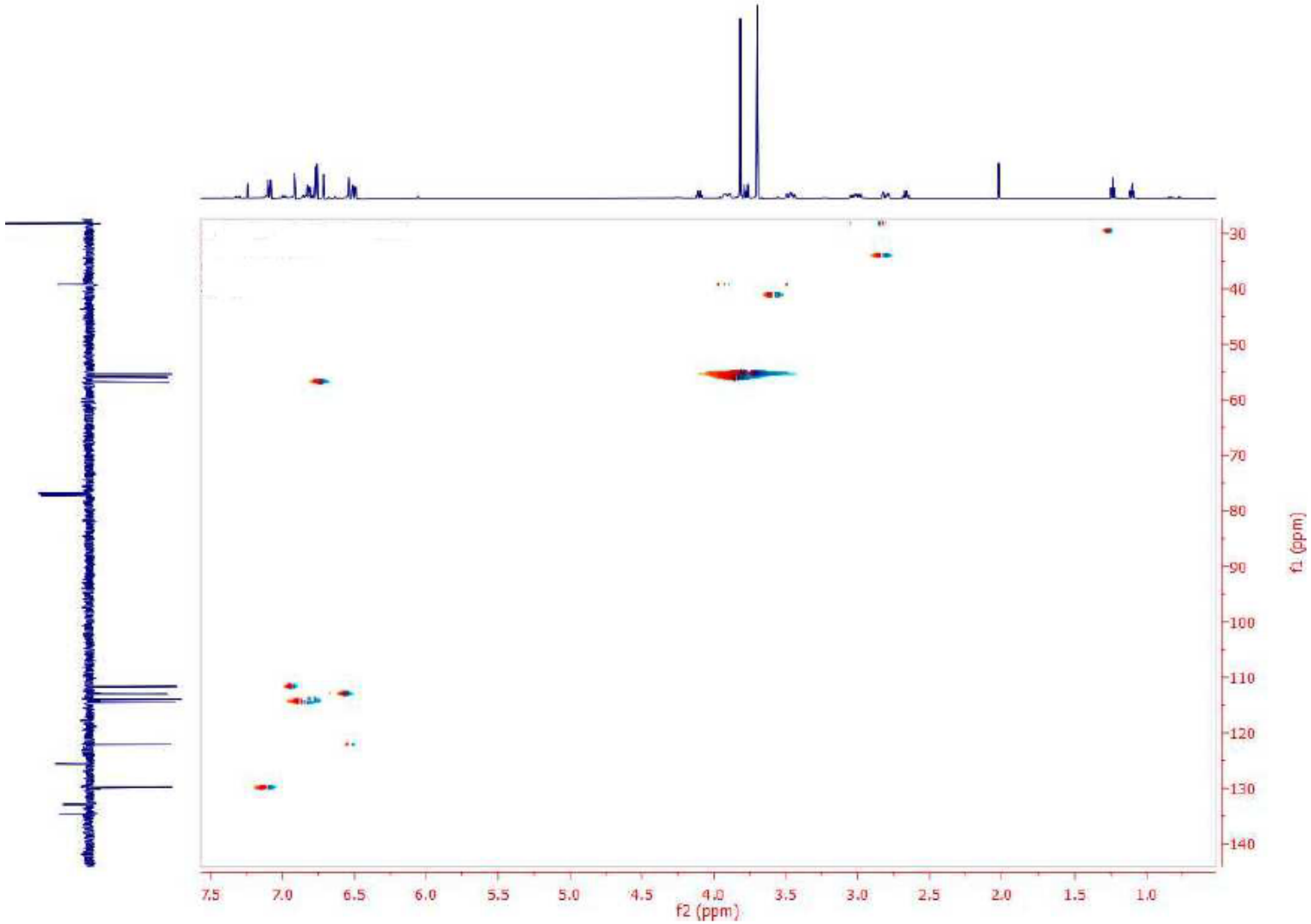
Fonte: Cordeiro, (2012).

ANEXO B - Expansão do espectro de RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MTHP).



Fonte: Cordeiro, (2012).

ANEXO C - Espectro de RMN de ^{1}H x ^{13}C– HMQC (500 MHz, $CDCl_3$) do 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MTHP).



Fonte: Cordeiro, (2012).

ANEXO D – Certidão de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do CBiotec CEUA Nº 0605/13.

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

CBiotec
Centro de Biotecnologia
UFPB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I D Ã O

João Pessoa, 28 de maio de 2013.
CEUA Nº **0605/13**

Ilmo(a). **Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo**
Departamento **Biotecnologia** - **CBiotec** - **UFPB**

Orientando(a) : **Rafael de Almeida Travassos**, (**Doutorado**)

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **27/05/13** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS COM ATIVIDADE MODULADORA SOBRE CANAIS IÔNICOS EM MUSCULATURA LISA DE AORTA DE RATO.**

Com previsão de empregar **130 Ratos WISTAR; 8 Camundongos SWISS Machos; 8 Camundongos SWISS Fêmeas; - ANIMAIS PROVÉM DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**
Para serem utilizados no período de **01/06/2013** a **31/07/2013**

Atenciosamente,

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

Fonte: Autor, (2015).