

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

MÔNICA MOURA DE ALMEIDA

**Participação de Canais Potencial
Receptor Transiente (TRP) no
mecanismo de ação vasorrelaxante
de rotundifolona em artéria
mesentérica de rato**

João Pessoa - 2012

Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato

MÔNICA MOURA DE ALMEIDA

**Participação de Canais Potencial
Receptor Transiente (TRP) no
mecanismo de ação vasorrelaxante
de rotundifolona em artéria
mesentérica de rato**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA

**Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
Coorientadora: Profa. Dra. Darízy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos**

João Pessoa – PB

Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato

A447p Almeida, Mônica Moura de.

Participação de canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato / Mônica Moura de Almeida.- João Pessoa, 2012.

160f. : il.

Orientador: Isac Almeida de Medeiros

Co-orientadora: Darízy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

1. Produtos Naturais. 2. Canais TRP. 3. Rotundifolona – efeito vasorrelaxante. 4. Canais TRPM8.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

MÔNICA MOURA DE ALMEIDA

**Participação de Canais Potencial
Receptor Transiente (TRP) no
mecanismo de ação vasorrelaxante
de rotundifolona em artéria
mesentérica de rato**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

Orientador

Profa. Dra. Maria Teresa Riggio Lima-Landman

Examinador Externo

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

Examinador Interno

Dedicatória

Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato

Dedico este trabalho aos meus pais, Francisco de Assis Cordeiro de Almeida e Asilda Pereira Moura de Almeida, e ao meu irmão Wendell Moura de Almeida por todo amor, compreensão, amizade e incentivo.

Agradecimentos

Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato

À Deus por cada dia que Ele me concede e por me guiar com amor e cuidado, me dando forças para vencer qualquer obstáculo e superar minhas fraquezas.

Ao Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros, meu orientador, pelas oportunidades que abriu para mim, sendo a pessoa que me proporcionou o primeiro contato com a pesquisa, e por todo o apoio, incentivo e compreensão ao longo de minha iniciação científica e pós-graduação, sempre depositando confiança e crédito no meu trabalho e na minha pessoa. Muito obrigada por ter acreditado em mim e me dado essas oportunidades.

À Profa. Dra. Darízy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos, minha coorientadora, que esteve presente em todos os momentos de minha vida acadêmica e no desenvolvimento desse trabalho, por todo incentivo, apoio, compreensão e amizade. Além de ser uma excelente professora e dentre tantas qualidades eu a admiro por acreditar no potencial de cada pessoa, muito obrigada por ter acreditado em mim também e por ter me incentivado tanto.

Ao Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras, por sua participação em todo o processo de elaboração desse trabalho e discussões construtivas.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho e sua aluna Daysiane, pela parceria firmada para o desenvolvimento deste trabalho, cedendo a substância utilizada nesse estudo.

Ao Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz, da UFMG, pelo apoio e por disponibilizar seu laboratório, tempo e conhecimentos, para a realização de experimentos, para melhora desse trabalho e meu crescimento científico.

À Profa Dra. Maria Aparecida Gomes e ao Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero pela colaboração e por disponibilizarem seu laboratório para realização de experimentos.

Aos alunos de Iniciação Científica envolvidos diretamente nesse trabalho, Cínthia Guedes Chaves, Ana Letícia Braz de Sousa e Emerson Tavares de Sousa pela ajuda na bancada, amizade e momentos de descontração.

À Fabio de Souza Monteiro, pela amizade, companheirismo, incentivo e compreensão, sendo sempre uma pessoa disposta a ajudar em

todo e qualquer momento, e que participou de todos os momentos desse mestrado.

Ao Prof. Dr. Jacicarlos Lima de Alencar que foi meu orientador durante um ano que passei como aluna de iniciação PIVIC na área de farmacologia.

À Nayara Macêdo Magalhães e Luciano Augusto de Araújo Ribeiro pelos ensinamentos e orientações durante a iniciação científica.

Aos demais amigos do laboratório, pela convivência, amizade, discussões construtivas e incentivo.

Aos técnicos José Crispim Duarte, Luís Cordeiro da Silva e Adriano Cordeiro pela capacidade e prazer com que realizam os seus trabalhos, que diretamente contribuíram para o bom desempenho deste.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pelo compromisso e apoio.

Aos amigos (as) Pós-Graduandos (as), pelo convívio e por tudo o que aprendi com cada um deles.

À Raquel Bezerra de Sá de Sousa Nogueira, minha grande amiga e colega de mestrado, por todo o apoio e todos os momentos de descontração.

Aos professores deste Programa, que cada um a seu modo, foi capaz de contribuir para a minha formação.

Às secretárias Tânia Maria Alves de Araújo e Caroline Manguiera, por sua competência à frente da secretaria deste programa, sempre dispostas a resolver os problemas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

Mônica Moura de Almeida

Resumo

Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato

RESUMO

Introdução: A superfamília Potencial Receptor Transiente (TRP) de canais catiônicos se destaca por exibir uma grande diversidade de mecanismos de ativação, e são alvos de compostos derivados de plantas. **Objetivo:** Investigar o papel de canais TRP na resposta vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica superior de ratos Normotenso de Lyon (LN). **Métodos e Resultados:** Anéis de artéria sem endotélio foram suspensos em hastes metálicas para registro de tensão isométrica. Em meio nominalmente sem Ca^{2+} , os anéis foram submetidos a contrações sucessivas com FEN para depleção dos estoques de Ca^{2+} e contraídos com CaCl_2 (10^{-2} M). O efeito máximo ($E_{\text{máx}}$) das contrações com CaCl_2 na presença de nifedipino (10^{-6} M) ($E_{\text{máx}} = 31,66 \pm 2,27$ %) foi significativamente atenuado na presença de nifedipino mais rotundifolona (3×10^{-4} e 3×10^{-3} M) ($E_{\text{máx}} = 9,30 \pm 2,38$ e $1,12 \pm 0,31$ %) e nifedipino mais mentol (10^{-4} e 10^{-3} M) ($E_{\text{máx}} = 10,96 \pm 1,34$ and $1,52 \pm 0,82$ %). Rotundifolona causou relaxamento de vasos pré-contraídos com FEN ($E_{\text{máx}} = 100,32 \pm 3,88$ %; $pD_2 = 3,59 \pm 0,04$, $n = 6$). O efeito vasorrelaxante induzido por rotundifolona foi significativamente atenuado na presença de Gd^{3+} (10^{-4} M) ($E_{\text{máx}} = 83,74 \pm 5,71$ %; $pD_2 = 3,15 \pm 0,06$); Gd^{3+} ($2,25 \times 10^{-5}$ ou 2×10^{-6} M) ($pD_2 = 3,18 \pm 0,06$ e $3,32 \pm 0,03$ %) ou BCTC ($E_{\text{máx}} = 76,30 \pm 2,15$ %; $pD_2 = 3,46 \pm 0,04$), mas não na presença de vermelho de rutênio, La^{3+} or Mg^{2+} , nem após dessensibilização do TRPV1 com capsaicina. Mentol também causou o relaxamento de vasos pré-contraídos com FEN ($E_{\text{máx}} = 105,07 \pm 3,07$ %; $pD_2 = 3,72 \pm 0,02$). O efeito vasorrelaxante induzido por mentol foi significativamente potencializado na presença de vermelho de rutênio (10^{-5} M), um bloqueador não seletivo de canais TRP ($pD_2 = 4,12 \pm 0,04$, $n = 6$) e significativamente atenuada na presença de La^{3+} (8×10^{-5} M), bloqueador não seletivo de canais TRP ($E_{\text{máx}} = 89,05 \pm 1,61$ %); Mg^{2+} ($2,25 \times 10^{-3}$ M), bloqueador seletivo dos canais TRPM3, 6 e 7 ($E_{\text{máx}} = 90,76 \pm 2,94$ %); Gd^{3+} (10^{-4} M), bloqueador de canais TRPV4, TRPC1, 3 and 6, TRPM3 and 4 ($E_{\text{máx}} = 73,82 \pm 5,44$ %); Gd^{3+} ($2,25 \times 10^{-5}$ M), bloqueador de canais TRPC3 and 6, TRPV4 ($E_{\text{máx}} = 88,04 \pm 2,33$ %); Gd^{3+} (2×10^{-6} M), bloqueador seletivo do TRPC6 ($E_{\text{máx}} = 89,30 \pm 3,61$ %) ou BCTC (2×10^{-6} M), bloqueador dos TRPM8 e TRPV1 ($E_{\text{máx}} = 66,77 \pm 6,05$ %), e após a dessensibilização do TRPV1 com capsaicina (10^{-5} M) ($E_{\text{máx}} = 88,96 \pm 4,50$). A tensão basal foi reduzida por mudança na temperatura do banho de 37°C para 25°C e 18°C ($E_{\text{máx}} = 21,15 \pm 0,78$ e $28,84 \pm 1,03$ %). Essa resposta foi significativamente potencializada por rotundifolona (3×10^{-3} M) ($E_{\text{máx}} = 28,01 \pm 1,81$ e $38,45 \pm 1,98$ %) ou mentol (10^{-3} M) ($E_{\text{máx}} = 29,87 \pm 1,25$ e $43,03 \pm 2,22$ %). Semelhante ao mentol, os efeitos induzidos por rotundifolona foram atenuados em meio sem Ca^{2+} mais EGTA ($E_{\text{máx}} = 20,42 \pm 1,97$ e $30,90 \pm 2,58$ %) ou na presença de BCTC ($E_{\text{máx}} = 17,05 \pm 1,94$ e $26,48 \pm 3,39$ %), mas não quando os vasos foram pré-tratados com vermelho de rutênio ou capsaicina. O RNAm e a proteína do canal TRPM8 são expressos em artéria mesentérica de ratos LN. **Conclusões:** Esses dados sugerem que rotundifolona induz relaxamento dependente de concentração em artéria mesentérica devido à inibição de canais ROC e SOC (provavelmente TRPC1 e TRPC6) e ativação de canais TRPM8.

Abstract

Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato

ABSTRACT

Introduction: The Transient Receptor Potential (TRP) superfamily of cation channels is remarkable since it displays greater diversity in activation mechanisms, and are targets for plant-derived compounds. **Aim:** To investigate the role of TRP channels in the vasorelaxant response of rotundifolone in the superior mesenteric artery from Lyon Normotensive (LN) rats. **Methods and Results:** Endothelium-denuded artery rings were suspended by platinum hooks for isometric tension recordings. In nominally free-Ca²⁺ medium, the rings were submitted to successive phenylephrine (Phe) contractions to deplete Ca²⁺-stores and contracted to CaCl₂ (10⁻² M). The maximum response (MR) of CaCl₂-contractions in presence of nifedipine (10⁻⁶ M) (MR = 31.66 ± 2.27 %) were significantly attenuated in the presence of nifedipine plus rotundifolone (3 x 10⁻⁴ and 3 x 10⁻³ M) (MR = 9.30 ± 2.38 and 1.12 ± 0.31 %) or nifedipine plus menthol (10⁻⁴ and 10⁻³ M) (MR = 10.96 ± 1.34 and 1.52 ± 0.82 %). Rotundifolone caused relaxation of vessels pre-contracted with Phe (MR = 100.32 ± 3.88 %; pD₂ = 3.59 ± 0.04, n = 6). The vasorelaxant effect induced by rotundifolone was significantly attenuated in the presence of Gd³⁺ (10⁻⁴ M) (MR = 83.74 ± 5.71 %; pD₂ = 3.15 ± 0.06); Gd³⁺ (2.25 x 10⁻⁵ or 2 x 10⁻⁶ M) (pD₂ = 3.18 ± 0.06 and 3.32 ± 0.03 %) or BCTC (MR = 76.30 ± 2.15 %; pD₂ = 3.46 ± 0.04), but no in the presence of ruthenium red, La³⁺ or Mg²⁺, nor after TRPV1 desensitization with capsaicin. Menthol caused relaxation of vessels pre-contracted with Phe (MR = 105.07 ± 3.07 %; pD₂ = 3.72 ± 0.02). The vasorelaxant effect induced by menthol was significantly potentiated in the presence of ruthenium red (10⁻⁵ M), a non-selective TRP channels blocker (pD₂ = 4.12 ± 0.04, n = 6). Also, the vasorelaxant response of menthol was significantly attenuated in the presence of La³⁺ (8 x 10⁻⁵ M), non-selective TRP channels blocker (MR = 89.05 ± 1.61 %); Mg²⁺ (2.25 x 10⁻³ M), TRPM3, 6 and 7 selective blocker (MR = 90.76 ± 2.94 %); Gd³⁺ (10⁻⁴ M), TRPV4, TRPC1, 3 and 6, TRPM3 and 4 channels blocker (MR = 73.82 ± 5.44 %); Gd³⁺ (2.25 x 10⁻⁵ M), TRPC3 and 6, TRPV4 channels blocker (MR = 88.04 ± 2.33 %); Gd³⁺ (2 x 10⁻⁶ M), TRPC6 selective blocker (MR = 89,30 ± 3,61 %) or BCTC (2 x 10⁻⁶ M), TRPM8 and TRPV1 channels blocker (MR = 66.77 ± 6.05 %), and after TRPV1 desensitization with capsaicin (10⁻⁵ M) (RM = 88.96 ± 4.50). The basal tension was reduced by change in the thermostat temperature from 37 °C to 25°C and 18°C (MR = 21.15 ± 0.78 and 28.84 ± 1.03 %). This response was significantly potentiated by rotundifolone (3 x 10⁻³ M) (MR = 28.01 ± 1.81 and 38.45 ± 1.98 %) or menthol (10⁻³ M) (MR = 29.87 ± 1.25 and 43.03 ± 2.22 %). **In the way** similar to menthol, the effects induced by rotundifolone were attenuated in free-Ca²⁺ medium plus EGTA (MR = 20.42 ± 1.97 and 30.90 ± 2.58 %) or in the presence of BCTC (MR = 17.05 ± 1.94 and 26.48 ± 3.39 %), but not when the vessels were pre-treated with ruthenium red or capsaicin. The RNAm and the protein of the TRPM8 channel are expressed in the superior mesenteric artery from LN rats. **Conclusions:** These data suggest that rotundifolone induces concentration-dependent relaxation in the mesenteric artery **due** to inhibition of ROC and SOC channels (probably TRPC1 and TRPC6) and activation of TRPM8 channels.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
BAPTA	Ácido 1,2-Bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético
BCTC	N-(4-tertiaributil-phenil)-4-(3-cloropiridin-2-il)tetrahidropirazina-1(2H)-carboxamida
BSA	Albumina sérica bovina
BK _{Ca}	Canais para K ⁺ sensíveis à Ca ²⁺ de grande condutância
Ca ²⁺	Cálcio
Ca _v	Canais de cálcio sensíveis a voltagem
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
[Ca ²⁺]	Concentração de cálcio
[Ca ²⁺] _c	Concentração de cálcio citoplasmática
[Ca ²⁺] _i	Concentração de cálcio intracelular
°C	Graus Celsius
CE ₅₀	Concentração da substância que produz 50 % de seu efeito máximo
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis-(β-aminoetiléter) N,N,N',N'- tetraacético
E _{máx}	Efeito máximo
e.p.m.	Erro padrão da média
FEN	Fenilefrina
Gd ³⁺	Gadolínio
GdCl ₃	Cloreto de gadolinio
K ⁺	Potássio
Kg	Quilograma
La ³⁺	Lantânio
LaCl ₃	Cloreto de lantânio
M	Molar
Mg ²⁺	Magnésio

mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitros
Ms	Milisegundos
MSCC	Canais de Cálcio Sensíveis a Estímulos Mecânicos
μL	Microlitro
n	Número de experimentos
Na ⁺	Íon sódio
O ₂	Oxigênio
<i>P</i>	Significância Estatística
PLC	Fosfolipase C
ROC	Canal de Cálcio Operado por Receptor
ROT	Rotundifolona
rpm	Rotação por minute
S5	Quinto segmento transmembranar
S6	Sexto segment transmembranar
SAC	Canal ativado por estiramento
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
SOCs	Canais de Cálcio Operados por Estoques
TRP	Potencial Receptor Transiente
TRPA1	Receptor TRP proteínas transmembranas ancrinas 1
TRPC	Receptor TRP classic
TRPM	Receptor TRP melastatina
TRPML	Receptor TRP muculipina
TRPN	Receptores TRP mecanoreceptores potencial C
TRPP	Receptor TRP policistina
TRPV	Receptor TRP vanilóide
WKY	Wistar Kyoto

Lista de Figuras

Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura de um monômero de canal TRP, mostrando os seus seis segmentos transmembranares e a formação de de tetrâmeros (Homo- ou Hetero-) (Adaptado de FIRTH; REMILLARD; YUAN 2007).

Figura 2. Representação esquemática da estrutura das subfamílias de canais TRP. a) Subfamílias de canais TRP pertencentes ao Grupo 1. b) Subfamílias de canais TRP pertencentes ao Grupo 2. c) Subfamílias de canais TRP encontradas em vermes, moscas, camundongos e humanos (VENKATACHALAM; MONTELL, 2007).

Figura 3. Representação esquemática da estrutura das sete subfamílias de canais TRP, mostrando as principais diferenças estruturais observadas entre elas. (YIN; KUEBLER, 2010).

Figura 4: Representação esquemática da entrada de Ca^{2+} pelos canais TRPC1 (SOC) e TRPC3 e 6 (SOC e ROC) (Adaptado de FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007).

Figura 5. Representação esquemática de canais TRP termossensíveis presentes em neurônios sensoriais periféricos da raiz dorsal e gânglio trigêmeo (Adaptado de MCKEMY, 2005).

Figura 6. Foto da espécie *Mentha x villosa* Hudson

Figura 7: Estrutura química, fórmula molecular e massa molecular de rotundifolona e mentol.

Figura 8. Aparato utilizado para os experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

Figura 9. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de rotundifolona ou mentol sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato LN com (acima) e sem endotélio (abaixo).

Figura 10. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação da reversibilidade da contração induzida por FEN após o efeito vasorrelaxante de rotundifolona ou mentol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio.

Figura 11. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação do efeito de rotundifolona ou mentol sobre o tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato LN com (acima) ou sem endotélio (abaixo).

Figura 12. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação da reprodutibilidade do efeito vasorrelaxante de rotundifolona ou mentol sobre as contrações induzidas por FEN em artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio.

Figura 13. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação do efeito de rotundifolona ou mentol sobre o influxo de cálcio dependente de canais ROC e SOC em artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio.

Figura 14. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação da participação de canais TRP no efeito de rotundifolona ou mentol em artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio.

Figura 15. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação da participação do TRPV1 no efeito de rotundifolona ou mentol em artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio.

Figura 16. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação do efeito de rotundifolona ou mentol sobre os efeitos da diminuição da temperatura no tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio.

Figura 17. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação a participação do influxo de cálcio nos efeitos da diminuição da temperatura no tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio.

Figura 18. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação a participação do influxo de cálcio no efeito de rotundifolona ou mentol sobre os efeitos da diminuição da temperatura no tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio.

Figura 19. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação a participação de canais TRP no efeito de rotundifolona ou mentol sobre os efeitos da diminuição da temperatura no tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio.

Figura 20. Representação esquemática da estrutura do “sanduíche” para o processo de transferência de proteínas de proteínas do gel para a membrana.

Figura 21. Registro original mostrando o efeito de rotundifolona (10^{-7} - 3×10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos LN sem endotélio pré-contraídos com FEN. As setas indicam o momento de adição das substâncias.

Figura 22. Registro original mostrando o efeito de mentol (10^{-7} - 3×10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos LN, com endotélio (A) e

sem endotélio (**B**), pré-contraídos com FEN. As setas indicam o momento de adição das substâncias.

Figura 23. Comparação dos efeitos de rotundifolona e mentol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos LN. Curva concentração-resposta para rotundifolona (\square) ou mentol (\circ) ($n = 12$ e 6 , respectivamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos LN sem endotélio, pré-contraídos com FEN.

Figura 24. Efeito de mentol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos LN. Curva concentração-resposta para mentol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos LN com endotélio (\bullet) ou sem endotélio (\circ), pré-contraídos com FEN ($n = 6$) e curva concentração-resposta para o veículo (\blacksquare) ($n = 5$). Teste t student, $*p < 0,05$ (sem endotélio vs com endotélio).

Figura 25. Registro original mostrando a reversão da contração induzida por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos LN sem endotélio, após o efeito vasorrelaxante induzido por 10^{-3} M (**A**) e 3×10^{-3} M (**B**) de mentol. As setas indicam o momento de adição ou remoção de substâncias.

Figura 26. Reversibilidade da contração induzida por FEN em anéis de artéria mesentérica superior de rato LN sem endotélio, após a adição de mentol. Gráfico em barras mostrando porcentagem de contração induzida por FEN em anéis de artéria mesentérica superior de rato LN sem endotélio, antes e após a adição de 10^{-3} ou 3×10^{-3} M de mentol ($n = 5$). ANOVA “one way” seguido do pós-teste de Bonferroni, $*p < 0,05$ (Mentol 3×10^{-3} M vs FEN).

Figura 27. Registro original do efeito de rotundifolona sobre o tônus basal de anéis sem endotélio de artéria mesentérica superior isolada de rato LN.

Figura 28. Registro original do efeito de mentol sobre o tônus basal de anéis com endotélio (**A**) e sem endotélio (**B**) de artéria mesentérica superior isolada de rato LN.

Figura 29. Efeito de mentol sobre o tônus basal de artéria mesentérica de rato LN, com endotélio $n = 5$ (\bullet) e sem endotélio $n = 6$ (\circ). ANOVA “two way” seguido do pós-teste de Bonferroni, $*p < 0,05$ (Sem endotélio vs com endotélio).

Figura 30. Registro original mostrando a reprodutibilidade do efeito vasorrelaxante de 3×10^{-3} M de rotundifolona em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos LN sem endotélio.

Figura 31. Reprodutibilidade do efeito vasorrelaxante de rotundifolona em anéis de artéria mesentérica superior de rato LN. Gráfico em barras mostrando que o efeito vasorrelaxante de rotundifolona (3×10^{-3} M) foi reprodutível em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos LN sem endotélio ($n = 6$).

Figura 32. Registro original mostrando a reprodutibilidade do efeito vasorrelaxante de 10^{-3} M de mentol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos LN sem endotélio.

Figura 33. Reprodutibilidade do efeito vasorrelaxante de mentol em anéis de artéria mesentérica superior de rato LN. Gráfico em barras mostrando que o efeito vasorrelaxante de mentol (10^{-3} M) foi reprodutível em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos LN sem endotélio (n = 6).

Figura 34. Registro original mostrando o efeito de rotundifolona no influxo de cálcio dependente de canais ROC e SOC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio. Contrações de CaCl_2 na ausência (A e D, respectivamente) e na presença de 10^{-6} M de nifedipino (B e E, respectivamente) e na presença de 10^{-6} M de nifedipino juntamente com 3×10^{-5} ou 3×10^{-3} M de rotundifolona (C e F, respectivamente).

Figura 35. Registro original mostrando o efeito de mentol no influxo de cálcio dependente de canais ROC e SOC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio. Contrações de CaCl_2 na ausência (A e D, respectivamente) e na presença de 10^{-6} M de nifedipino (B e E, respectivamente) e na presença de 10^{-6} M de nifedipino juntamente com 10^{-5} ou 10^{-3} M de mentol (C e F, respectivamente).

Figura 36. Participação de canais ROC e SOC no mecanismo de ação de rotundifolona em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio. Gráfico em barras mostrando o efeito de rotundifolona (3×10^{-5} , 3×10^{-4} ou 3×10^{-3} M, n = 5) sobre as contrações induzidas por CaCl_2 em anéis de artéria mesentérica superior de rato LN, na presença de nifedipino 10^{-6} M. ANOVA “one way” seguido do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (vs CaCl_2 10^{-2} M), #p < 0,05 (vs Nifedipino 10^{-6} M + CaCl_2).

Figura 37. Participação de canais ROC e SOC no mecanismo de ação de mentol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio. Gráfico em barras mostrando o efeito de mentol (10^{-5} , 10^{-4} ou 10^{-3} M, n = 5) sobre as contrações induzidas por CaCl_2 em anéis de artéria mesentérica superior de rato LN, na presença de nifedipino 10^{-6} M. ANOVA “one way” seguido do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (vs CaCl_2 10^{-2} M), #p < 0,05 (vs Nifedipino 10^{-6} M + CaCl_2).

Figura 38. Efeito vasorrelaxante de rotundifolona sobre o tônus pré-contraído com FEN de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência n = 12 (□) ou presença de 10^{-5} M de vermelho de rutênio n = 6 (▲). Teste t student (vs controle).

Figura 39. Efeito vasorrelaxante de mentol sobre o tônus pré-contraído com FEN de anéis de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência n = 6 (○) ou presença de 10^{-5} M de vermelho de rutênio n = 6 (▲). Teste t student, *p < 0,05 (vs controle).

Figura 40. Efeito vasorrelaxante de rotundifolona sobre o tônus pré-contraído com FEN de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência n = 12 (□) ou presença de 8×10^{-5} M de La^{3+} n = 7 (▼). Teste t student (vs controle).

Figura 41. Efeito vasorrelaxante de mentol sobre o tônus pré-contraído com FEN de anéis de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência n = 6 (○) ou presença de 8×10^{-5} M de La^{3+} n = 4 (▼). Teste t student, *p < 0,05 (vs controle).

Figura 42. Efeito vasorrelaxante de rotundifolona sobre o tônus pré-contraído com FEN de anéis de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência n = 12 (□) ou presença de $2,25 \times 10^{-3}$ M de Mg^{2+} . n = 5 (◆). Teste t student (vs controle).

Figura 43. Efeito vasorrelaxante de mentol sobre o tônus pré-contraído com FEN de anéis de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência n = 6 (○) ou presença de $2,25 \times 10^{-3}$ M de Mg^{2+} n = 5 (◆). Teste t student, *p < 0,05 (vs controle).

Figura 44. Efeito vasorrelaxante de mentol sobre o tônus pré-contraído com FEN de anéis de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência n = 6 (○) ou presença de $2,5 \times 10^{-5}$ M de Gd^{3+} n = 5 (▽). Teste t student, *p < 0,05 (vs controle).

Figura 45. Efeito vasorrelaxante de mentol sobre o tônus pré-contraído com FEN de anéis de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência n = 6 (○) ou presença de 10^{-4} M de Gd^{3+} n = 5 (■). Teste t student, *p < 0,05 (vs controle).

Figura 46. Efeito vasorrelaxante de rotundifolona sobre o tônus pré-contraído com FEN de anéis de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência n = 12 (□) ou presença de $2,5 \times 10^{-5}$ M de Gd^{3+} n = 5 (▽). Teste t student, *p < 0,05 (vs controle).

Figura 47. Efeito vasorrelaxante de mentol sobre o tônus pré-contraído com FEN de anéis de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência n = 6 (○) ou presença de $2,5 \times 10^{-5}$ M de Gd^{3+} n = 5 (▽). Teste t student, *p < 0,05 (vs controle).

Figura 48. Efeito vasorrelaxante de rotundifolona sobre o tônus pré-contraído com FEN de anéis de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência n = 12 (□) ou presença de 2×10^{-6} M de Gd^{3+} n = 5 (△). Teste t student, *p < 0,05 (vs controle).

Figura 49. Efeito vasorrelaxante de mentol sobre o tônus pré-contraído com FEN de anéis de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência n = 6 (○) ou presença de 2×10^{-6} M de Gd^{3+} n = 5 (△). Teste t student, *p < 0,05 (vs controle).

Figura 50. Efeito vasorrelaxante de rotundifolona sobre o tônus pré-contraído com FEN de anéis de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência $n = 12$ (□) ou presença de 2×10^{-6} M de BCTC $n = 6$ (■). Teste t student, $*p < 0,05$ (vs controle).

Figura 51. Efeito vasorrelaxante de mentol sobre o tônus pré-contraído com FEN de anéis de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência $n = 6$ (○) ou presença de 2×10^{-6} M de BCTC $n = 4$ (■). Teste t student, $*p < 0,05$ (vs controle).

Figura 52. Efeito vasorrelaxante de rotundifolona sobre o tônus pré-contraído com FEN de anéis de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência $n = 12$ (□) ou presença da dessensibilização com 10^{-5} M de capsaicina $n = 6$ (●). Teste t student (vs controle).

Figura 53. Efeito vasorrelaxante de mentol sobre o tônus pré-contraído com FEN de anéis de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio na ausência $n = 6$ (○) ou presença da dessensibilização com 10^{-5} M de capsaicina $n = 5$ (●). Teste t student, $*p < 0,05$ (vs controle).

Figura 54. Efeito de 3×10^{-4} , 10^{-3} e 3×10^{-3} M de rotundifolona ($n = 5$, 7 e 6 respectivamente) sobre o tônus basal de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio em temperaturas frias. ANOVA “two way” seguido do pós-teste de Bonferroni, $*p < 0,05$ (18°C vs 25°C vs 37°C); $\#p < 0,05$ (Rotundifolona vs controle).

Figura 55. Efeito de 10^{-4} , 3×10^{-4} , 10^{-3} e 3×10^{-3} M de mentol ($n = 5$, 5 , 8 e 5 respectivamente) sobre o tônus basal de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio em temperaturas frias. ANOVA “two way” seguido do pós-teste de Bonferroni, $*p < 0,05$ (18°C vs 25°C vs 37°C); $\#p < 0,05$ (Mentol vs controle).

Figura 56. Efeito de rotundifolona sobre o tônus basal de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio em temperaturas frias, na ausência ou presença de EGTA ($n = 5$). ANOVA “two way” seguido do pós-teste de Bonferroni, $*p < 0,05$ (18°C vs 25°C vs 37°C); $\#p < 0,05$ (vs Controle); $\nabla p < 0,05$ (vs Rotundifolona).

Figura 57. Efeito de mentol sobre o tônus basal de artéria mesentérica de rato LN sem endotélio em temperaturas frias, na ausência ou presença de EGTA ($n = 5$). ANOVA “two way” seguido do pós-teste de Bonferroni, $*p < 0,05$ (18°C vs 25°C vs 37°C); $\#p < 0,05$ (vs Controle); $\nabla p < 0,05$ (vs Mentol).

Figura 58. Efeito de rotundifolona em temperaturas frias, na ausência ou presença de 10^{-5} M de vermelho de rutênio, 10^{-5} M de capsaicina ou 2×10^{-6} M de BCTC ($n = 6$, 5 e 5). ANOVA “two way” seguido do pós-teste de Bonferroni, $*p < 0,05$ (18°C vs 25°C vs 37°C); $\#p < 0,05$ (vs Controle); $\nabla p < 0,05$ (vs Rotundifolona).

Figura 59. Efeito de mentol em temperaturas frias, na ausência ou presença de 10^{-5} M de vermelho de rutênio, 10^{-5} M de capsaicina ou 2×10^{-6} M de BCTC (n = 6, 4 e 6). ANOVA “two way” seguido do pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ (18°C vs 25°C vs 37°C); # $p < 0,05$ (vs Controle); $\nabla p < 0,05$ (vs Mentol).

Figura 60. Expressão do RNAm para síntese do TRPM8 em artéria mesentérica de rato LN (n = 2). Gráfico em barras mostrando a razão entre o RNAm do TRPM8 e o da proteína constitutiva β – actina (acima) e as imagens representativas do gel (abaixo). Os valores da densitometria foram normalizados pelos níveis de β -actina nos mesmos animais.

Figura 61. Expressão da proteína TRPM8 em artéria mesentérica de ratos LN. Gráficos em barras mostrando a expressão protéica da proteína TRPM8 em três ratos (acima) e as imagens representativas de western blot (abaixo). Os valores da densitometria foram normalizados pelos níveis protéicos de β -actina nos mesmos ratos LN.

Figura 62. Representação esquemática da provável via de sinalização do efeito vasorrelaxante induzido por rotundifolona em artéria mesentérica de rato LN. 1) Ativação de canais BK_{Ca} ; 2) Bloqueio de canais Cav; 3) Ativação de canais TRPM8 4) Bloqueio de canais TRPC1 e 6; (Adaptado de INOUE et al., 2006).

Figura 63. Representação esquemática da provável via de sinalização do efeito vasorrelaxante induzido por mentol em artéria mesentérica de rato LN (Adaptado de INOUE et al., 2006).

Lista de Tabelas

Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da solução de Tyrode normal (pH = 7,4)

Tabela 2. Composição da solução de Tyrode sem cálcio com EGTA (pH = 7,4)

Tabela 3. Comparação entre os valores de $E_{máx}$, pD_2 , slope Hill e R_2 para o efeito vasorrelaxante de rotundifolona e mentol em artéria mesentérica superior de ratos LN.

Tabela 4. Valores de $E_{máx}$, pD_2 , slope Hill e R_2 para o efeito de mentol sobre o tônus basal de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato LN com e sem endotélio.

Tabela 5. Valores de $E_{máx}$, pD_2 , slope Hill e R_2 para o efeito vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica superior de rato LN, na ausência ou presença de bloqueadores.

Tabela 6. Valores de $E_{máx}$, pD_2 , slope Hill e R_2 para o efeito vasorrelaxante de mentol em artéria mesentérica superior de rato LN, na ausência ou presença de bloqueadores.

Tabela 7. Valores de $E_{máx}$, pD_2 , slope Hill e R_2 para o efeito vasorrelaxante de rotundifolona ou mentol em artéria mesentérica superior de rato LN, antes e após tratamento com capsaicina.

Tabela 8. Valores de $E_{máx}$ para o efeito induzido por temperaturas frias e rotundifolona sobre o tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato LN.

Tabela 9. Valores de $E_{máx}$ para o efeito induzido por temperaturas frias e mentol sobre o tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato LN.

Tabela 10. Valores de $E_{máx}$ para o efeito induzido por temperaturas frias e rotundifolona sobre o tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato LN, na ausência ou presença de EGTA.

Tabela 11. Valores de $E_{máx}$ para o efeito induzido por temperaturas frias e mentol sobre o tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato LN, na ausência ou presença de EGTA.

Tabela 12. Valores de $E_{máx}$ para o efeito induzido por temperaturas resfriantes e rotundifolona sobre o tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato LN, na ausência ou presença de bloqueadores.

Tabela 13. Valores de $E_{máx}$ para o efeito induzido por temperaturas resfriantes e mentol sobre o tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato LN, na ausência ou presença de bloqueadores.

Sumário

Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	47
2.1 Geral	48
2.2 Específicos	48
3 MATERIAL	49
3.1 Animais	50
3.2 Isolamento e identificação de rotundifolona	50
3.3 Preparação da solução de rotundifolona e mentol	51
3.4 Substâncias e reagentes	51
3.5 Soluções fisiológicas	52
3.6 Aparelhos	53
4 MÉTODOS	54
4.1 Preparações de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos de Lyon (LN)	55
4.2 Protocolos experimentais utilizando artéria mesentérica superior isolada de rato LN	56
4.2.1 Avaliação do efeito vasorrelaxante de rotundifolona ou mentol	56
4.2.2 Investigação da manutenção da capacidade contrátil induzida por fenilefrina após administração de rotundifolona ou mentol	57
4.2.3 Investigação do efeito de rotundifolona ou mentol sobre o tônus basal	58
4.2.4 Investigação da reprodutibilidade do efeito vasorrelaxante de rotundifolona ou mentol	59

4.2.5	Investigação da participação de canais ROC e SOC no efeito vasorrelaxante de rotundifolona ou mentol	60
4.2.6	Investigação da participação de canais TRP no efeito vasorrelaxante de rotundifolona ou mentol	62
4.2.7	Investigação da participação de TRPV1 no efeito vasorrelaxante de rotundifolona ou mentol	63
4.2.8	Investigação da influência de rotundifolona ou mentol nos efeitos induzidos por temperaturas resfriantes	64
4.2.9	Investigação da participação da $[Ca^{2+}]_i$ no mecanismo de alteração do tônus vascular induzido por temperaturas resfriantes, rotundifolona ou mentol ...	65
4.2.10	Investigação da participação de canais TRPM8 no efeito de rotundifolona ou mentol sobre o relaxamento induzido por diminuição da temperatura	66
4.2.11	Investigação da expressão do RNAm do TRPM8	68
4.2.12	Investigação da expressão protéica do TRPM8	69
4.3	Análise estatística	71
5	RESULTADOS	72
5.1	Efeito vasorrelaxante induzido por rotundifolona e mentol	73
5.2	Reversibilidade da contração induzida por fenilefrina após administração de rotundifolona ou mentol	77
5.3	Efeito de rotundifolona e mentol sobre o tônus basal	78
5.4	Reprodutibilidade do efeito vasorrelaxante induzido por rotundifolona e mentol	81
5.5	Participação de canais ROC e SOC no mecanismo de ação de rotundifolona e mentol	84
5.6	Participação de canais TRP no mecanismo de ação de rotundifolona e mentol	89
5.7	Participação de TRPV1 no mecanismo de ação de mentol, mas não de rotundifolona	100

5.8 Influência de rotundifolona e mentol nos efeitos vasculares induzidos por temperaturas resfriantes	102
5.9 Envolvimento do Ca^{2+} extracelular no efeito relaxante induzido por rotundifolona e mentol em artéria mesentérica submetida a temperaturas resfriantes	106
5.10 Participação de canais TRPM8 no efeito de rotundifolona e mentol em artéria mesentérica submetida a temperaturas resfriantes	109
5.11 Expressão do RNAm do canal TRPM8	113
5.12 Expressão protéica do canal TRPM8	114
6 DISCUSSÃO	115
7 CONCLUSÕES	135
8 PERSPECTIVAS	137
REFERÊNCIAS	139

ALMEIDA, M. M.

Introdução

Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato

1 INTRODUÇÃO

O papel das proteínas de canal presentes na membrana plasmática é regular o fluxo de diferentes íons entre a célula e o meio extracelular. Cada canal tem uma permeabilidade típica a diferentes íons, condutância, mecanismos de fechamento e abertura (gating), agonistas e antagonistas típicos, dependência de voltagem e características regulatórias adicionais. A ativação de canais pode ocorrer diretamente, por voltagem ou ligação de ligantes, ou indiretamente, por meio de cascata de eventos moleculares e produção de segundos mensageiros (MINKE; COOK, 2002; ver revisão MONTELL, 2005).

Atualmente, é conhecido que diversos canais iônicos exercem influência no potencial da membrana plasmática e na $[Ca^{2+}]_i$, apresentando extrema importância na regulação da contratilidade do músculo liso (THORNELOE; NELSON, 2005). Os principais canais que aumentam a $[Ca^{2+}]_c$ são os canais de cálcio sensíveis à voltagem (Ca_v) e os canais catiônicos não-seletivos, localizados na membrana plasmática, e os receptores de IP_3 e de ryanodina, localizados na membrana do retículo sarcoplasmático (LEDOUX et al., 2006).

Canais TRP

Dentre os canais catiônicos não-seletivos destacam-se os canais Potencial Receptor Transiente (TRP), os quais têm atraído a atenção por serem canais catiônicos, na sua maioria, permeáveis ao Ca^{2+} que podem ser ativados por uma grande diversidade de estímulos e que possuem graus diferentes de seletividade. Os canais TRP foram assim denominados, pois quando ativados esses canais permitem o influxo de cargas positivas para a célula, gerando uma despolarização. Entretanto esta despolarização não se caracteriza por um potencial de ação e sim um potencial receptor transiente, podendo ou não vir a gerar um potencial de ação (CLAPHAM, 2003).

A estrutura primária dos monômeros de canais TRP mostra a presença de seis domínios transmembranares com um domínio formador de poro entre o

quinto (S5) e sexto (S6) segmentos, e as regiões C e N-terminais direcionadas para o lado intracelular da célula. Esses monômeros se agrupam formando homotetrâmeros, pela junção de monômeros iguais, ou heterotetrâmeros, pela junção de monômeros diferentes. Essa estrutura é comum a vários canais presentes em várias formas de vida, desde bactérias até mamíferos, incluindo os canais sensíveis à voltagem (MINKE; COOK, 2002; CLAPHAM et al., 2005; INOUE et al., 2006) (Figura 1).

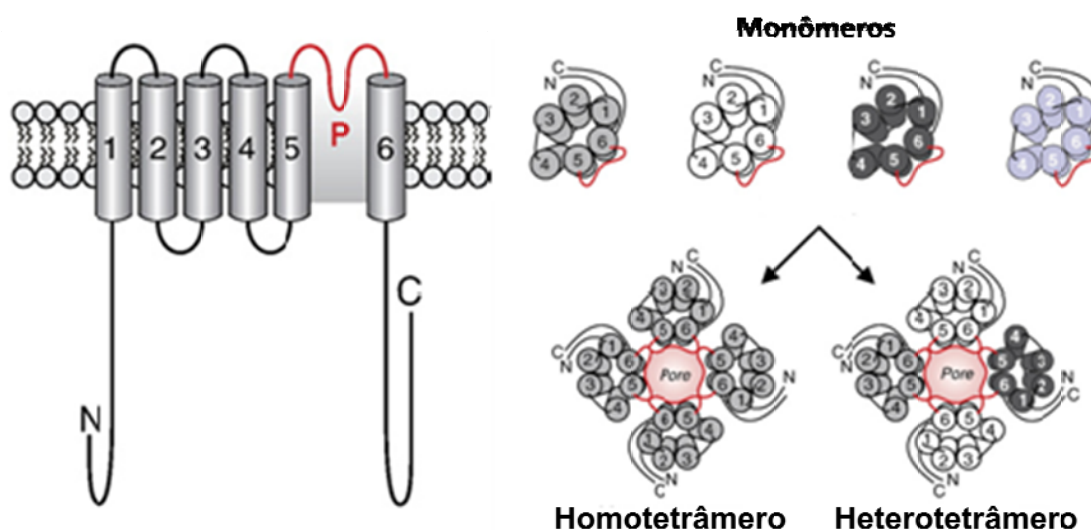


Figura 1. Representação esquemática da estrutura de um monômero de canal TRP, mostrando os seus seis segmentos transmembranares e a formação de de tetrâmeros (Homo- ou Hetero-) (Adaptado de FIRTH; REMILLARD; YUAN 2007).

No entanto, apesar das similaridades topográficas entre os canais TRP e os sensíveis a voltagem, os canais TRP são atualmente apenas distantemente relacionados a esses canais (CLAPHAM et al, 2005). Essa diferença ocorre porque os resíduos de aminoácidos carregados positivamente, característica dos canais sensíveis a voltagem, não estão preservados na maioria dos membros da família de canais TRP (INOUE et al., 2006).

Os canais TRP foram inicialmente descobertos no sistema visual de mutantes *trp* de *Drosophila melanogaster* (MINKE, 2006; INOUE et al., 2006). Atualmente tem sido demonstrado que esses canais estão presentes e funcionam em uma grande variedade de organismos multicelulares, inclusive

em humanos. Esses canais são expressos em vários órgãos, tais como cérebro, coração, rim, testículos, pulmão, fígado, baço, ovários, intestino, próstata, placenta, útero e tecidos vasculares, e em muitos tipos de células, incluindo neurônios (sensoriais e aferentes primários), células endoteliais vasculares, epiteliais e musculares lisas (MINKE; COOK, 2002; ver revisão MONTELL, 2005).

A superfamília de canais TRP é dividida em dois grupos dependendo das sequências e diferenças topológicas apresentadas por esses canais (MONTELL; RUBIN, 1989; MONTELL, 2005; PHELPS; GAUDET, 2007). O grupo 1 apresenta uma forte sequência homológica e sua maior região abrange os seis segmentos transmembranares incluindo o poro que é formado entre o quinto e sexto segmento (MONTELL; BIRNBAUMER; FLOCKERZI, 2002). Já o grupo 2 está distantemente relacionado, pelo fato de suas proteínas compartilharem uma diferente sequência homológica nos segmentos transmembranares e também conter uma alça separando o primeiro e o segundo domínios transmembranares (PALMER; AYDAR; DJAMGOZ, 2005) (Figura 2).

O grupo 1 é dividido em cinco subfamílias: canais TRP clássicos (TRPC), TRP receptores vanilóides (TRPV), TRP melastatinas ou TRP longos (TRPM), TRP mecanoreceptores potencial C (TRPN), TRP proteínas transmembranas ancrinas (ANKTM ou TRPA). Já o grupo 2 possui duas subfamílias: canais TRP receptores policistinas (TRPP) e TRP receptores mucopolipinas (TRPML) (VENKATACHALAM; MONTELL, 2007). Nos mamíferos foram encontrados 28 membros de TRPs pertencentes às subfamílias C, V, M, A, ML e P (MONTELL, 2005; PHELPS; GAUDET, 2007) (Figura 2).

A nomenclatura de cada subfamília de canais é baseada na ordem de descoberta, substâncias que os ativam, funções fisiológicas, genes ou doenças relacionados, ou ainda características estruturais.

Os canais TRP clássicos (TRPC) recebem esse nome porque foram os primeiros a serem descobertos e por serem a subfamília de canais TRP mais intimamente relacionada com os canais TRP de *Drosophila* (MONTELL, 2005).

Os canais TRP receptores vanilóides (TRPV) recebem esse nome por serem ativados por compostos contendo o grupo vanilil, como por exemplo

ALMEIDA, M. M.

capsaicina e vanilina. Os canais TRP melastatinas ou TRP longos (TRPM) recebem esse nome porque a diminuição na expressão dos genes que codificam essas proteínas gera o aparecimento de melanoma. Os canais TRP receptores mucolipinas (TRPML) recebem esse nome por estarem envolvidos no transporte de lipídios e proteínas entre lisossomos e endossomos e pelo fato de que mutações nos genes que codificam essas proteínas geram o aparecimento de mucopolidose. Os canais TRP receptores policistinas (TRPP) recebem esse nome porque mutações nos genes que codificam essas proteínas podem causar o aparecimento de doença renal policística (MONTELL, 2005).

Outras subfamílias são ainda denominadas baseando-se em alguma diferença estrutural observada, como é o caso dos canais TRP proteínas transmembranas ankirinas 1 (ANKTM1 ou TRPA1) que possuem ankirinas repetidas na sua estrutura, ou ainda pelo mecanismo de ativação, como é o caso dos canais TRP mecanorreceptores potencial C (TRPN), que são ativados por estímulos mecânicos (MONTELL, 2005).

Algumas diferenças estruturas podem ainda ser observadas entre as subfamílias de canais TRP. Algumas subfamílias de canais TRP possuem um motivo de 25 aminoácidos, denominado de domínio TRP, contendo a caixa TRP (EWKFAR) na região C-terminal do sexto segmento transmembrana (S6). O domínio TRP e a caixa TRP estão presentes em todos os genes TRPC e TRPM, mas não em outros canais TRP. Além disso, os domínios citoplasmáticos N-terminais de canais TRPC, TRPV e TRPA contém ankirinas repetidas, enquanto que apenas os canais TRPC e TRPM contém sequências ricas em prolina justamente na porção C-terminal do domínio TRP, denominado como caixa TRP 2 (YIN; KUEBLER, 2010) (Figura 3).

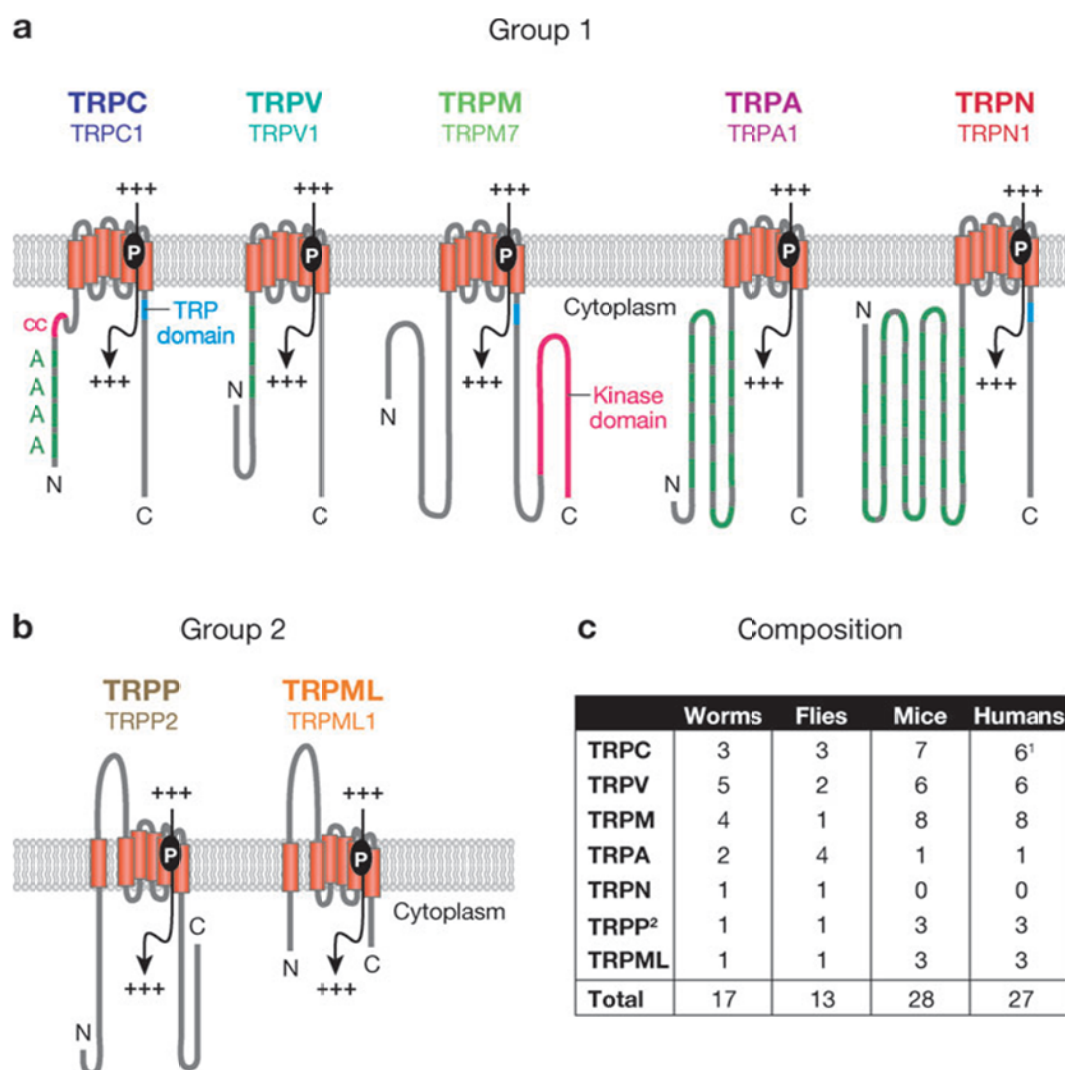


Figura 2. Representação esquemática da estrutura das subfamílias de canais TRP. a) Subfamílias de canais TRP pertencentes ao Grupo 1. b) Subfamílias de canais TRP pertencentes ao Grupo 2. c) Subfamílias de canais TRP encontradas em vermes, moscas, camundongos e humanos (VENKATACHALAM; MONTELL, 2007).

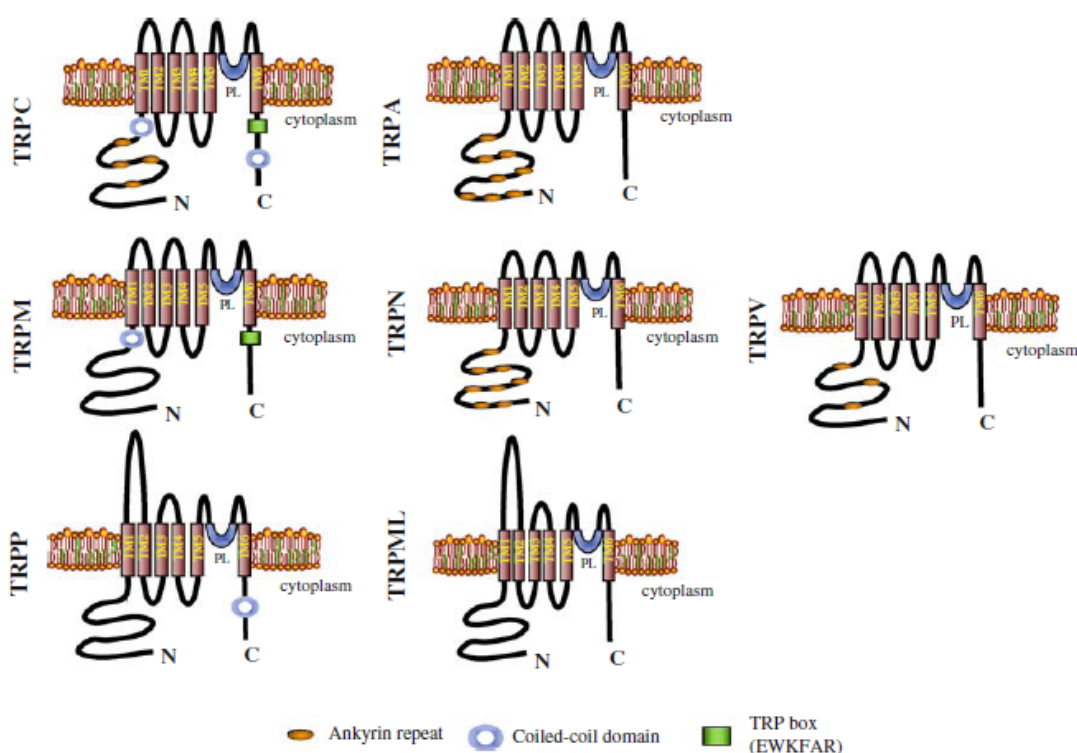


Figura 3. Representação esquemática da estrutura das sete subfamílias de canais TRP, mostrando as principais diferenças estruturais observadas entre elas. (YIN; KUEBLER, 2010).

Os canais TRP participam na fisiologia sensorial, atuando na visão, paladar, olfato, audição, tato, sensações térmicas e osmossensações, e detectam mudanças no ambiente local das células (VENKATACHALAM; MONTELL, 2007), agindo como sensores celulares que respondem a estímulos físicos, mecânicos e químicos (CLAPHAM, 2003; NILIUS; VOETS, 2005; PHELPS; GAUDET, 2007).

Dentre os fatores que podem ativar os canais TRP podemos citar receptores acoplados a proteína G, agentes picantes, por exemplo, a capsaicina, lipídeos, ácidos, calor, estresse de cisalhamento e hiposmolaridade (exemplo de ativadores dos canais TRPV), estresse oxidativo, elevação de Ca^{2+} intracelular, exposição a temperaturas baixas ou agentes resfriantes, tais como mentol e icilina (ativadores dos canais TRPM). Além disso, alguns canais TRP são proteínas termorreceptoras, presentes em terminações nervosas livres de neurônios especializados que inervam a

superfície corporal e a cavidade oral, sendo responsáveis pela sensação de calor e frio (ZUKER, 2002; CLAPHAM et al., 2005; INOUE, et al., 2006).

Os canais TRP desempenham diversas funções no sistema cardiovascular, tais como vasoconstrição, vasodilatação via liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e produção de óxido nítrico na célula endotelial, proliferação de células musculares e respostas miogênicas, sendo ainda possíveis candidatos a canais operados por estoques (SOCs) (DIETRICH et al., 2005b; INOUE, et al., 2006), canais operados por receptor (ROCs) (HOFMANN et al., 1999; INOUE et al., 2001; YANG et al., 2006) e canais de Ca^{2+} mecanossensíveis (MSCC) (READING et al., 2005; INOUE, et al., 2006).

As células musculares lisas vasculares expressam alguns canais TRP, como por exemplo, os TRPC1, 3 e 6; TRPM2, 3, 4, 6, 7 e 8 e TRPV2, 3 e 4. Outros canais TRP por sua vez foram detectados em células endoteliais, como por exemplo, os canais TRPC3 e 4; TRPV3 e 4 e TRPA1 (GRAZIANI et al. 2004; INOUE, et al., 2006; YANG et al., 2006; EARLEY; GONZALES; GARCIA, 2010).

Os canais TRPC1 e TRPC6 são expressos em artéria mesentérica de coelho (SALEH et al., 2008; LARGE; SALEH; ALBERT, 2009) e de rato (HILL et al., 2006). Os canais TRPC3 são expressos em artéria cerebral de rato (READING et al., 2005), artéria coronária de coelho (PEPPIATT-WILDMAN et al., 2007), e em aorta de rato (LIU et al., 2009). Os canais TRPV2, TRPV4 e TRPM4 são expressos em artéria pulmonar e aorta de rato (YANG et al., 2006) e em artéria mesentérica de rato (INOUE, et al., 2006). Os canais TRPV3, TRPM2 e TRPM3 são expressos em artéria pulmonar e aorta de rato (YANG et al., 2006). Os canais TRPM6 e TRPM7 são expressos em artéria mesentérica e aorta de rato (CHUBANOV et al., 2004; HE et al., 2005) e o TRPM7 em em artéria pulmonar e aorta de rato (YANG et al., 2006). Os canais TRPM8 são expressos em artéria pulmonar e aorta de rato (YANG et al., 2006) e foram recentemente descrito em artérias mesentérica, femoral e caudal de rato (JOHNSON et al., 2009).

O TRPC1 é descrito como um canal operado por depleção de estoques (SOC), envolvido na reestocagem de Ca^{2+} para os estoques intracelulares

(BEECH et al., 2003; BERGDAHL et al., 2003; KUNICHIKA et al., 2004; DIETRICH et al., 2005b). Adicionalmente, TRPC1 atua na contração e proliferação da célula muscular lisa vascular (BERGDAHL et al., 2003), e como um canal catiônico mecanossensível ativado por estiramento (SAC) que induz despolarização de membrana e ativa canais Ca_v nas células musculares lisas (MAROTO et al., 2005; THORNELOE et al., 2005) (Figura 4).

Os canais TRPC3 e TRPC6 atuam como canais operados por receptor (ROC) (HOFMANN et al., 1999; JUNG et al., 2002; LARGE, 2002; LIN et al., 2004; YANG et al., 2006) e como canal operado por depleção de estoques (SOC) (LIN et al., 2004; JACKSON, 2006). Os canais do tipo ROC são abertos em resposta a ativação de receptores transmembranares acoplados a PLC, de forma independente de PKC, ou seja, são ativados diretamente pelo DAG (HOFMANN et al., 1999; INOUE et al., 2001; YANG et al., 2006), enquanto os canais do tipo SOC são ativos pela depleção de estoques (SOC), envolvido na reestocagem de Ca^{2+} para os estoques intracelulares (DIETRICH et al., 2005b) (Figura 4).

Nas células musculares lisas, o canal TRPC3 encontra-se acoplado ao trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX1), ativo em células musculares cardíacas, neuronais e células endócrinas. O funcionamento normal do trocador NCX1 permite o influxo de Na^+ e efluxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática, diminuindo dessa forma a $[Ca^{2+}]_c$. No entanto, esse trocador é capaz de modular os sinais de Ca^{2+} celulares de uma maneira bidirecional, ou seja, o aumento da entrada de Na^+ por canais TRPC3 fazem com que o trocador NCX1 funcione de modo reverso. A atuação reversa do trocador resulta em um aumento na $[Ca^{2+}]_c$ e uma diminuição na $[Na^+]_c$, e conseqüentemente em ativação dos canais Ca_v e reestocagem de Ca^{2+} nos estoques intracelulares. Dessa forma, o canal TRPC3 atua como SOC (ROSKER et al., 2004; EDER et al., 2005) (Figura 4).

Adicionalmente, foi descrito que o TRPC6 desempenha um papel crítico na despolarização induzida por pressão intravascular, causando contração de pequenas artérias e arteríolas (WELSH et al., 2002) conhecido como efeito *Bayliss*, e atua como canal mecanossensível (SAC) (READING et al., 2005). Recentemente, foi observado que a perda de função de TRPC6 leva a diminuição do tônus vascular de artéria e na contratilidade do músculo liso de

traquéia, causando hipotensão e redução na contratilidade das vias aéreas (DIETRICH et al., 2003, 2005a).

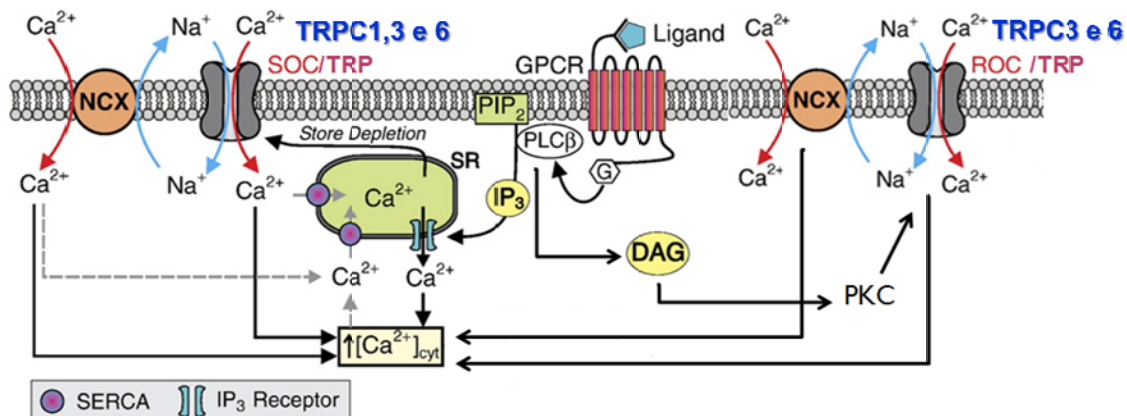


Figura 4: Representação esquemática da entrada de Ca^{2+} pelos canais TRPC1 (SOC) e TRPC3 e 6 (SOC e ROC) (Adaptado de FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007).

O TRPM4 é um canal que exerce um papel importante na despolarização e contração de artéria cerebral de rato, via PKC, em resposta ao aumento de pressão intraluminal (EARLEY; WALDRON; BRAYDEN, 2004; GONZALES et al., 2010, CRNICH et al., 2010).

O TRPM7 é um canal catiônico constitutivamente ativado que regula a $[\text{Mg}^{2+}]_c$ (NADLER et al., 2001; RUNNELS; YUE; CLAPHAM, 2001). O Mg^{2+} é o segundo cátion divalente mais abundante no músculo liso vascular. O aumento na $[\text{Mg}^{2+}]_i$ atenua a vasoconstrição induzida por agonistas (KONRAD; SCHLINGMANN; GUDERMANN, 2004; FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007) e diminui a proliferação das células musculares lisas vasculares, observada durante a hipertensão (TOUYZ, 2006; FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007).

O TRPM8 é um canal localizado na membrana plasmática e na membrana do retículo sarcoplasmático que, quando ativado, permite o influxo de Ca^{2+} através da membrana e liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. O canal TRPM8 contribui para a manutenção do tônus vasomotor em artéria caudal (JOHNSON et al., 2009) e para o vasorrelaxamento de artéria mesentérica e caudal pré-contraídas (SILVA, 2008; JOHNSON et al., 2009).

O TRPV2 é um canal mecanossensível, sensível ao aumento da osmolaridade em aorta de camundongo (MURAKI et al., 2003; YANG et al., 2006)

O TRPV4 é um canal que quando ativado permite a entrada de Ca^{2+} gerando a ativação de receptores de rianodina e canais BK_{Ca} no músculo liso de arteria cerebral de rato, induzindo vasorrelaxamento (EARLEY et al., 2005).

O TRPV1 não é expresso no músculo liso vascular, mas está presente em neurônios sensitivos cujas terminações nervosas localizam-se próximas às células musculares lisas vasculares. Quando ativados, os canais TRPV1 induzem a liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) que por sua vez atua sobre o músculo liso vascular induzindo vasorelaxamento (ZYGUMUNT et al., 1999; REID, 2005; GRADIN et al., 2008).

Embora sejam expressos em músculo liso de artérias, as funções dos canais TRPV3, TRPM2, TRPM3 e TRPM6 no sistema vascular ainda não estão esclarecidas (EARLEY, 2010).

Além das funções desempenhadas no sistema vascular, alguns canais TRP são importantes como sensores de temperatura. Os principais canais TRP envolvidos são os canais TRPV1, 2, 3 e 4 e TRPM8 (Figura 5). Os principais canais que funcionam como sensores de calor em mamíferos são o receptor de vanilóide do subtipo 1 (TRPV1 ou VR1) e o receptor semelhante ao de vanilóide do tipo 1 (VRL-1 ou TRPV2) (CATERINA et al., 1999; ZUKER, 2002).

O TRPV1 é ativado por temperaturas moderadas (37 - 43 °C) e por compostos vanilóides, como a capsaicina, substância presente nas pimentas de chili (BRAUCHI; ORIO; LATORRE, 2004; VOETS et al., 2004; PHELPS; GAUDET, 2007), o endocanabinóide anandamida (ZYGUMUNT et al., 1999, VENKATACHALAM; MONTELL, 2007), o analgésico tópico cânfora (XU; BLAIR; CLAPHAM, 2005; VENKATACHALAM; MONTELL, 2007) e a piperina, substância pungente presente na pimenta preta (MCNAMARA; RANDALL; GUNTHORPE, 2005; VENKATACHALAM; MONTELL, 2007) e a alicina, presente no alho (MACPHERSON et al., 2005; VENKATACHALAM; MONTELL, 2007). O TRPV2 responde a temperaturas acima de 50 °C (JULIUS; BASBAUM, 2001; ZUKER, 2002), mas não é ativado por capsaicina (CATERINA, 1999; ZUKER, 2002). Os canais TRPV3 e TRPV4 são ativados

ALMEIDA, M. M.

em temperaturas mornas (33 - 39 °C e 27 - 34 °C, respectivamente) (MONTELL, 2005; PHELPS; GAUDET, 2007).

Os principais canais iônicos que respondem a estímulos frios são os canais TRPM8. Esses canais foram identificados através de estudos eletrofisiológicos de neurônios sensoriais primários sensíveis ao frio, que revelaram um influxo de cálcio ativado por baixas temperaturas e pelo mentol com propriedades biofísicas semelhantes. Nesse estudo, foi identificado um DNA complementar que codifica um receptor responsivo ao mentol e a temperaturas frias, o qual consiste em um canal catiônico da família dos canais TRP, denominado de CMR1 (receptor of cold-menthol type 1) (CLAPHAM; RUNNELS; STRUBING, 2001; MCKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002; ZUKER, 2002). Posteriormente esse mesmo canal foi identificado por Peier e colaboradores, sendo denominado de TRPM8 (PEIER et al., 2002; ZUKER, 2002).

Os canais TRPM8 (CMR1 ou TRP-P8) são ativados por temperaturas moderadamente frias (8 - 27 °C) e por compostos refrescantes como mentol, eucaliptol (ambos compostos de origem natural) e icilina (PEIER et al., 2002; MCKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002; ZUKER, 2002; CHUANG; NEUHAUSSER; JULIUS, 2004; INOUE, et al., 2006; COLBURN et al., 2007; DHAKA et al., 2007; BAUTISTA et al., 2007; PHELPS; GAUDET, 2007; BÖDDING; WISSENBACH; FLOCKERZI, 2007). Os TRPM8 apresentam permeabilidade relativamente alta para íons Ca^{2+} e pequena seletividade entre cátions monovalentes (canal catiônico não-seletivo), e sua ativação gera influxo de Na^+ e Ca^{2+} e despolarização da membrana. Esses canais apresentaram dessensibilização depois de exposição a estímulos frios ou mentol, e após aplicações subsequentes de mentol houve menor aumento nos níveis de Ca^{2+} citoplasmático e surgimento de efluxo de K^+ com repolarização da membrana. Porém a adaptação para temperaturas frias pode ser revertida depois do retorno à temperatura ambiente (PEIER et al., 2002; MCKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002; ZUKER, 2002; HARTENECK, 2005; HUI; GUO; FENG, 2005)

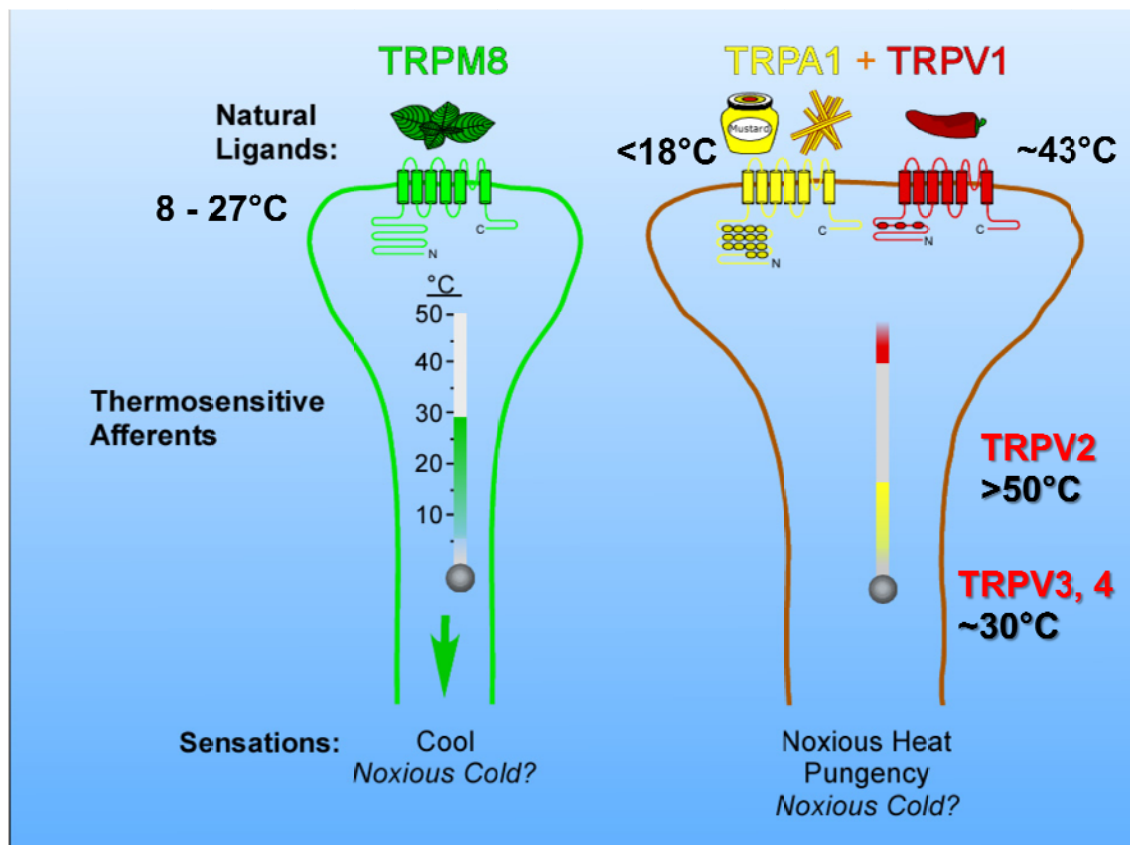


Figura 5. Representação esquemática de canais TRP termossensíveis presentes em neurônios sensoriais periféricos da raiz dorsal e gânglio trigêmeo (Adaptado de MCKEMY, 2005).

O TRPM8 não é regulado somente pela temperatura, visto que a voltagem e o pH também alteram a ativação do canal (VOETS et al., 2004; BRAUCHI; ORIO; LATORRE, 2004; HUI; GUO; FENG, 2005; PHELPS; GAUDET, 2007). O sensor de voltagem está no segmento transmembranar S4 e na alça entre S4 e S5. O sensor de voltagem está, de alguma forma, correlacionado com a ativação do TRPM8 pela temperatura e por agonistas, uma vez que mutações nos resíduos envolvidos na ativação por voltagem também alteram a ativação por temperatura e agonistas. (VOETS et al., 2007; PHELPS; GAUDET, 2007; SOKABE; TOMINAGA, 2009; YANG et al., 2010).

Os canais TRPM8 e TRPV1 apresentam significativa sobreposição em relação a estrutura, ativação e atividade farmacológica. Ambos são ativados por despolarização, embora não possuam a sequência completa do sensor de voltagem no segmento transmembranas S4 dos canais sensíveis a voltagem. O

mecanismo para ativação térmica do TRPV1 por temperaturas quentes e do TRPM8 por temperaturas frias também parece ser semelhante, uma vez que suas respectivas temperaturas de ativação e ligantes conduzem a mudanças nos limiares de voltagem em direção a potenciais de membrana mais fisiológicos (VOETS et al., 2004; BRAUCHI; ORIO; LATORRE, 2004; PHELPS; GAUDET, 2007; SOKABE; TOMINAGA, 2009; YANG et al., 2010). Além disso, diversas substâncias atuam como agonista ou antagonista de ambos, embora já se conheçam substâncias seletivas para um ou outro, como é o caso da capsaicina que atua como agonista seletivo do TRPV1 (DANNERT et al., 2007), do composto WS-12 que atua como agonista seletivo do TRPM8, (SHERKHELI et al., 2008) ou do SB – 366791 (WEIL et al., 2005) e ABT-102 (SUROWY et al., 2008; HONORE et al., 2009) que atuam como antagonistas seletivos do TRPV1.

A importância dos Produtos Naturais

As plantas medicinais são utilizadas desde a antiguidade para o tratamento de diversas doenças humanas, incluindo a hipertensão, sob a forma de preparações caseiras e, ainda hoje, a maioria dos medicamentos é derivada de plantas, seja na forma de extratos ou de compostos isolados (MCNEILL; JURGENS, 2006). Ainda hoje os produtos naturais, especialmente os de origem vegetal, continuam sendo fontes de substâncias potencialmente aplicáveis com propriedades biológicas, farmacológicas ou terapêuticas (HARVEY, 2000).

Além de sua utilização na terapêutica, os produtos naturais e seus derivados podem ser utilizados para investigação de processos fisiológicos e fisiopatológicos e descoberta de novos alvos envolvidos nesses processos, tais como enzimas, receptores, transportadores ou canais iônicos, os quais poderiam constituir sítio de ação de fármacos (SIMMONDS, 2003). Adicionalmente, os produtos naturais têm desempenhado importante papel na identificação funcional dos canais TRP em vários tecidos biológicos, o que enfatiza a importância dos produtos naturais para avaliar o papel funcional dos

ALMEIDA, M. M.

canais TRP no sistema cardiovascular e em outros sistemas biológicos (ver revisão: CALIXTO et al., 2005).

Dentre os vários constituintes presentes nas plantas encontram-se os óleos essenciais, também denominados de óleos voláteis ou essências, que apresentam aroma intenso, volatilidade, imiscibilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos (COSTA, 1975).

O Brasil possui uma grande diversidade de plantas aromáticas, sendo essas plantas e seus óleos essenciais utilizados na medicina popular, sob a forma de chás e infusos, como sedativos, estomáquicos, antiespasmódicos, antidiarréico (FREISE, 1935; ITOKAWA; AIYAMA; IKUTA, 1981; KIUCHI et al., 1992; BEZERRA, 1994; COELHO-DE-SOUZA et al., 1997; COELHO-DE-SOUZA; CRIDDLE; LEAL-CARDOSO, 1998; MAGALHÃES et al., 1998), antiparasitários, antimicrobianos, analgésicos, diuréticos, hipotensores (LUZ et al., 1984; MENDONÇA, 1989; MENDONÇA et al., 1991), antimaláricos (KLAYMAN, 1985), antihemorroidários (PRUDENTE et al., 1993), anti-sifilíticos (MENDONÇA, 1989) e no tratamento de rinite alérgica (BEZERRA, 1994).

Os óleos essenciais são constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos, fenil-propanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; LAVABRE, 1993). Os monoterpenos são compostos orgânicos de ocorrência natural que constituem os componentes majoritários dos óleos essenciais derivados de plantas.

Diversos monoterpenos apresentam aplicações nos campos farmacêutico e de cosméticos. Do ponto de vista farmacêutico são utilizados como antimicrobianos (ÍSCAN et al., 2002), anestésicos, analgésicos (GALEOTTI et al., 2001, 2002; XU; BLAIR; CLAPHAM, 2005), anti-inflamatórios (SANTOS; RAO, 2001), antipruriginosos (UMEZU; SAKATA; ITO, 2001; ANAND, 2003). Além disso, estudos mostraram a presença de atividades antiespasmódica (HILLS; ARONSO, 1991; COELHO-DE-SOUZA et al., 1997; MAGALHÃES et al., 1998) e miorrelaxante (ALBUQUERQUE et al., 1995).

Embora os mecanismos de ação para as várias atividades dos monoterpenos ainda não sejam completamente conhecidos, tem sido demonstrado que vários desses compostos ativam, inativam ou modulam canais iônicos (PRIESTLEY et al., 2003; HALL et al., 2004; GRANGER;

ALMEIDA, M. M.

CAMPBELL; JOHNSTON, 2005; PARK et al., 2003; MAGYAR et al., 2002; SZENTANDRASSY et al., 2004; VOGT-EISELE et al., 2007).

Os monoterpenos também têm sido relatados na literatura como agonistas ou antagonistas dos canais TRPs (PEIER et al., 2002; MCKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002; BEHRENDT et al., 2004; MOQRICH et al., 2005; XU; BLAIR; CLAPHAM, 2005, XU et al, 2006; MACPHERSON et al., 2006; VOGT-EISELE et al, 2007; PATEL; ISHIUJI; YOSIPOVITCH, 2007)

A cânfora, o carvacrol, o timol e o mentol foram relatados por ativarem os canais TRPV3 (MACPHERSON, et al., 2006; VOGT-EISELE et al.,2007). O mentol é o ativador clássico dos TRPM8, que também pode ser ativado por outros monoterpenos tais como: pulegol, eucaliptol, linalol e geraniol (CALIXTO et al., 2005). Carvacrol é um conhecido ativador do TRPA1 (VOGT-EISELE et al.,2007) e inibidor dos canais TRPL de *Drosophila* (TRP-like) que pertence a subfamília dos TRPC (MINKE; COOK, 2002; HARDIE; RAGHU, 2001; MONTELL 2005; SCOTT; ZUKER, 1998; MINKE; PARNAS, 2006) como também inibe em mamíferos os TRPM7 expressos em células HEK e ectopicamente expressos em uma cultura primária de neurônio CA3-CA1 do hipocampo do cérebro (PARNAS et al.,2009). Mentol, timol, eugenol, carveol também bloqueiam o canal TRPL enquanto borneol e cânfora o ativam (PARNAS et al.,2009).

***Mentha x-villosa* Hudson**

O gênero *Mentha L.*, pertencente à família Lamiaceae, é originário da região mediterrânea e parte da Ásia, sendo atualmente encontrado em quase todo o mundo, principalmente em regiões temperadas. Esse Gênero é constituído por cerca de 13 espécies e vários híbridos (HARLEY, 1973).

A espécie *Mentha x villosa* Hudson, também chamada de *M. crispa* ou *M. rotundifolia* é popularmente conhecida como hortelã-da-folha-miúda, hortelão-rasteira e hortelã-de-panela. A hortelã-da-folha-miúda é uma planta herbácea, rasteira, com raiz fibrosa, caule avermelhado, ereto, ramoso, com folhas aromáticas opostas variando de 2-5 cm de tamanho, limbo oval-lanceolado com borda serrilhada e superfície rugosa e glabra, pecíolo de 2-3 mm e sem inflorescências (MATOS, 1994) (Figura 6).

Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato



Figura 6. Foto da espécie *Mentha x villosa* Hudson

No nordeste brasileiro, as folhas de *Mentha x villosa* Hudson são muito usadas na medicina popular e na indústria fitoterápica, atuando como estomáquico, ansiolítico, contra cólicas menstruais, antidiarréico (MATOS, 1994), e no tratamento de amebíase, giardíase e tricomoníase (BORBA et al., 1990a, 1990b; BORBA; MELO, 1988; BORBA; BARBOSA-FILHO; PADOVANI, 1991).

Estudos mostram que o óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson apresenta atividades antibacteriana (BARBOSA-FILHO et al., 1992; ARRUDA et al., 2006), analgésica (ALMEIDA; HIRUMA; BARBOSA-FILHO, 1996), contracturante em músculo esquelético de sapo (FOGAÇA et al., 1997), hipotensora e bradicárdica em ratos anestesiados com uretana (SOUSA, 1999) e com pentobarbital (LAHLOU et al., 2001) e vasorrelaxante, por meio da inibição das contrações promovidas por solução despolarizante de KCl (60 mM) em aorta de cobaia (SOUSA, 1999). Além disso, em estudo realizado em nosso

ALMEIDA, M. M.

laboratório foi demonstrado que o óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson apresentou atividade hipotensora e vasorrelaxante em ratos Wistar normotensos (GUEDES et al., 2004a).

Rotundifolona

No óleo essencial das folhas de *Mentha x villosa* Hudson foram detectados 23 compostos químicos, sendo o constituinte majoritário (63,47%) o 1,2-epoxi-p-ment-4(8)-en-3-ona também denominado de óxido de piperitenona ou rotundifolona (HIRUMA; ALMEIDA; BARBOSA-FILHO et al., 1992), que é uma cetona monoterpênica de peso molecular igual a 166,219 g (BUCKINGHAM, 1994).

Na literatura é relatado que a rotundifolona apresenta atividade analgésica (ALMEIDA; HIRUMA; BARBOSA-FILHO, 1996), espasmolítica em íleo de cobaia (SOUSA et al., 1997), hipotensora e bradicárdica em ratos anestesiados com uretana (SOUSA, 1999) e com pentobarbital (LAHLOU et al., 2001), bem como inibição das contrações promovidas por solução despolarizante de KCl (60 mM) e PDB (dibutirato de forbol) em aorta de cobaia e leito mesentérico de rato perfundido (SOUSA, 1999).

Em estudos realizados em nosso laboratório, Guedes e colaboradores (2002; 2004b) observaram que rotundifolona promoveu efeito hipotensor e bradicárdico em ratos Wistar normotensos e em ratos com hipertensão induzida (hipertensão secundária), envolvendo ação cardíaca direta e diminuição na resistência vascular periférica total. Nesse estudo também foi observado que a rotundifolona promoveu efeito vasorrelaxante em aorta de animais normotensos de maneira dependente e independente de endotélio funcional. A via dependente de endotélio envolve a ativação dos receptores muscarínicos M_3 e liberação de óxido nítrico e prostaciclina, enquanto que a via independente de endotélio funcional envolve bloqueio dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) e dos receptores de IP_3 da membrana do retículo sarcoplasmático.

Em outros estudos realizados em nosso laboratório, Silva (2008) observou que a rotundifolona promoveu hipotensão e bradicardia em ratos

espontaneamente hipertensos não anestesiados, possivelmente por diminuição da resistência vascular periférica total.

Nesse estudo também foi observado que a rotundifolona promoveu vasorelaxamento em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos de Lyon (LN) e hipertensos de Lyon (LH) de maneira dependente e independente de endotélio funcional, por mecanismo que envolve a ativação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) e a inibição dos Ca_v . Nesse estudo também foi observado um aumento transiente da $[Ca^{2+}]_c$ em miócitos de artéria mesentérica superior de rato, o qual parece envolver entrada de cálcio por canais TRP presentes na membrana plasmática e liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (SILVA, 2008).

Dessa forma SILVA (2008) propôs que o mecanismo de ação através do qual rotundifolona promove efeito vasorrelaxante em artéria mesentérica superior isolada de ratos LN parece envolver a ativação de canais TRP, que poderiam ser responsáveis pelo aumento transiente da $[Ca^{2+}]_c$, que por sua vez provavelmente resultaria em ativação dos BK_{Ca} e inativação dos Ca_v , promovendo repolarização e diminuição do influxo de Ca^{2+} , com conseqüente relaxamento da célula muscular lisa vascular. O aumento transiente da $[Ca^{2+}]_c$ induzido por rotundifolona em miócitos de artéria mesentérica superior foi atenuado significativamente na presença de capsazepina, um antagonista competitivo dos receptores TRPV1 e TRPM8, indicando que esses canais TRP poderiam estar envolvidos na resposta biológica induzida por rotundifolona em artéria mesentérica de rato.

Rotundifolona ($C_{10}H_{15}O_2$) possui estrutura química semelhante à do mentol ($C_{10}H_{20}O$), um monoterpeno encontrado em diversas espécies do gênero *Mentha L.* (Figura 7). Além disso, de forma semelhante a mentol (PATEL; ISHIUJI; YOSIPOVITCH, 2007), a rotundifolona provoca sensação resfriante quando aplicada sobre a pele, indicando que provavelmente possa estar agindo em canais TRP responsáveis pela detecção de temperaturas frias, dentre os quais encontra-se o TRPM8, para o qual mentol é descrito como ativador clássico (Figura 5).

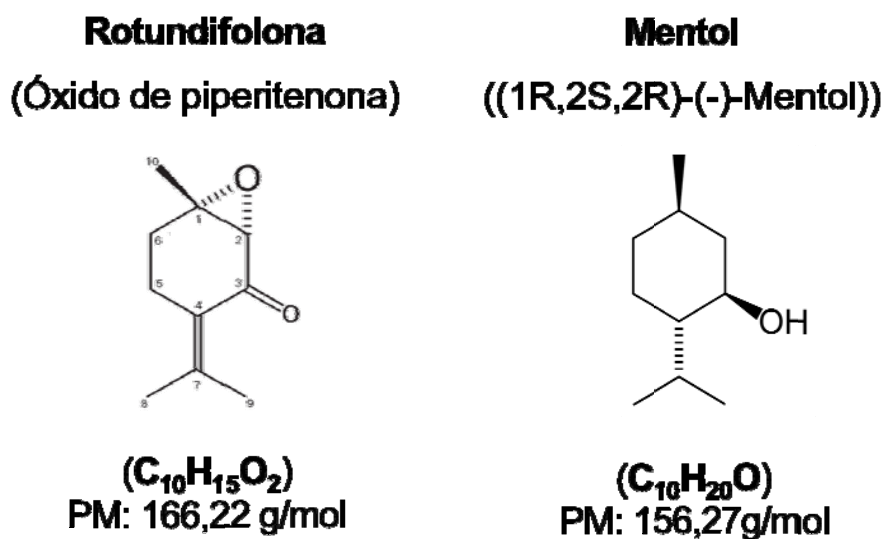


Figura 7: Estrutura química, fórmula molecular e massa molecular de rotundifolona e mentol.

Diante disso, fundamentamos a nossa proposta de trabalho em esclarecer a participação dos canais TRP, em especial dos TRPM8, nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona, com base nos estudos realizados até o momento demonstrando as atividades cardiovasculares desse monoterpene. Dessa forma, contribuiremos para aprofundar o entendimento do mecanismo de ação molecular envolvido na atividade vasorrelaxante induzida por rotundifolona e do funcionamento fisiológico dos canais TRP no sistema vascular.

ALMEIDA, M. M.

Objetivos

Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- ✓ Investigar a participação dos canais TRP, em especial do canal TRPM8, nos efeitos vasculares induzidos por rotundifolona, contribuindo para o entendimento da fisiologia dos canais TRP em tecidos vasculares, bem como com os estudos farmacológicos dos monoterpenos em artéria mesentérica.

2.2 Específicos

- ✓ Investigar a participação dos canais TRPM8 e de outros canais TRP no efeito vasorrelaxante induzido por rotundifolona e mentol em artéria mesentérica de rato LN
- ✓ Investigar a expressão do RNAm e da proteína dos canais TRPM8 em artéria mesentérica de rato LN

ALMEIDA, M. M.

Material

Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato

3 MATERIAL

3.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos normotensos de Lyon (Lyon normotensive rats - LN), com idade de 10 a 14 semanas, pesando entre 250 e 300 g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” da UFPB.

Esses animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura e ventilação, e submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 06h00 às 18h00, tendo livre acesso a água e a uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Purina).

Os animais foram eutanasiados seguindo as normas de cuidados com animais, e os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB, parecer nº 0704/09.

3.2 Isolamento e identificação de rotundifolona

A substância objeto desse estudo foi rotundifolona, um monoterpene isolado do óleo essencial das folhas frescas da espécie *Mentha x villosa* Hudson, obtido do laboratório Hebron.

Os procedimentos de isolamento e identificação de rotundifolona foram realizados conforme descrito por Guedes e colaboradores, (2002). O óleo essencial obtido das folhas de *Mentha x villosa* Hudson (OEMV) foi submetido a uma Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), utilizando-se como eluente o hexano P.A. (Vetec-Química Fina S.A.).

As placas cromatográficas foram reveladas em lâmpada ultravioleta λ 254 nm (Modelo UV LS-25), e mostravam a presença de um constituinte majoritário, a rotundifolona, a qual se apresentava como uma extensa faixa logo acima do ponto de aplicação do OEMV.

A rotundifolona foi então removida das placas cromatográficas e posteriormente recuperada da sílica gel por extração em clorofórmio P.A.

ALMEIDA, M. M.

(Vetec-Química Fina S.A.). Por fim a rotundifolona teve suas propriedades físicas e espectrais comparadas com as amostras-padrões disponíveis no Laboratório de Química do LTF/UFPB.

3.3 Preparação das soluções de rotundifolona e mentol

Para preparar as soluções estoques de rotundifolona, a mesma foi solubilizada em cremofor® (50 µL por mL de solução) e diluída em água destilada. Já o mentol foi solubilizado em cremofor® (50 µL por mL de solução) e etanol absoluto P.A., e diluído em água destilada para obtenção das concentrações desejadas para cada protocolo experimental.

Essas soluções foram conservadas a 0 °C, sendo diluídas em água destilada para obter outras soluções de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental.

O cremofor® (óleo de castor) é um agente emulsivo. Suas concentrações não excederam 0,01% e foram previamente testadas, apresentando ausência de efeito farmacológico.

3.4 Substâncias e reagentes

No preparo das soluções fisiológicas (Tyrode) foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), obtidos da Merck (Brasil), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato de sódio mono-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), obtidos da Vetec (Brasil), e EGTA, obtido da Sigma-Aldrich (EUA).

Durante a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes drogas: cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN), cloridrato de acetilcolina (ACh), vermelho de rutênio, capsaicina, cloreto de lantânio (LaCl_3), cloreto de gadolínio (GdCl_3) e cloreto de magnésio (MgCl_2), obtidos da Sigma-Aldrich (EUA) e BCTC, obtido da Santa Cruz Biotechnology (EUA).

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

O mentol foi obtido da Sigma-Aldrich (EUA) e a rotundifolona foi isolada no laboratório de farmacocinética do LTF e cedida pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa-Filho, da Universidade Federal da Paraíba para a monitoração do mecanismo de ação envolvido na possível atividade vasorrelaxante em artéria mesentérica isolada de rato LN.

3.5 Soluções fisiológicas

Tabela 1. Composição da solução de Tyrode normal (pH = 7,4)

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

Fonte: TANAKA et al, 1999.

Tabela 2. Composição da solução de Tyrode sem cálcio com EGTA (pH = 7,4)

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

Fonte: TANAKA et al, 1999.

3.6 Aparelhos

Os órgãos foram suspensos em cubas de vidro (10 mL) aquecidas à temperatura adequada por bomba termostática modelo 597 (FISATOM, Brasil).

As substâncias foram pesadas em balança analítica modelo AG200 e os animais em balança semi-analítica (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

As contrações isométricas foram registradas através de transdutores de força isométricos modelo FORT-10 conectados a um amplificador modelo TMB4M ou 7003 UGO Basile, ambos da World Precision Instruments (WPI, Sarasota, EUA). O amplificador por sua vez era conectado a uma placa conversora analógico/digital instalada em um microcomputador com o programa de aquisição de dados CVMS (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA).

ALMEIDA, M. M.

Métodos

Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato

4 MÉTODOS

4.1 Preparações de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos de Lyon (LN)

Os ratos normotensos de Lyon (Lyon normotensive - LN) pesando entre 250 - 300 g foram eutanasiados por deslocamento cervical seguido de secção dos vasos cervicais. Através de uma incisão no abdome do animal a artéria mesentérica superior foi identificada, removida e colocada em uma placa de Petri contendo uma solução nutritiva de Tyrode a uma temperatura de $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e aerada com uma mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2).

A artéria mesentérica superior foi livre de tecidos adjacentes e seccionada em anéis de 2 a 3 mm, os quais foram mantidos em cubas para órgãos isolados, contendo 10 mL de solução fisiológica de Tyrode com pH 7,4 a uma temperatura de $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e gaseificada com uma mistura carbogênica. Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (AVS), o qual era conectado a um amplificador (AVS), que por sua vez estava conectado a um sistema de aquisição de dados (AVS) para o registro das tensões isométricas do músculo (Figura 8).

Os anéis foram submetidos a uma tensão constante de 0,75 g por um período de estabilização de uma hora, sendo a solução nutritiva substituída a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Os anéis sem endotélio foram obtidos mecanicamente através do atrito entre as hastes metálicas e as paredes internas do vaso. A presença de endotélio foi verificada pelo relaxamento dos anéis após a adição de 10^{-5} M de ACh sobre o componente tônico da contração induzida por 10^{-5} M de FEN. Foram considerados com endotélio funcional os anéis com relaxamento superior a 90% e sem endotélio funcional os anéis com relaxamentos inferiores a 10 %. Anéis com relaxamentos entre 10 e 90% foram submetidos a remoção do endotélio, seguida por um período de estabilização de 30 minutos e verificação da porcentagem de endotélio, através do método descrito anteriormente (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

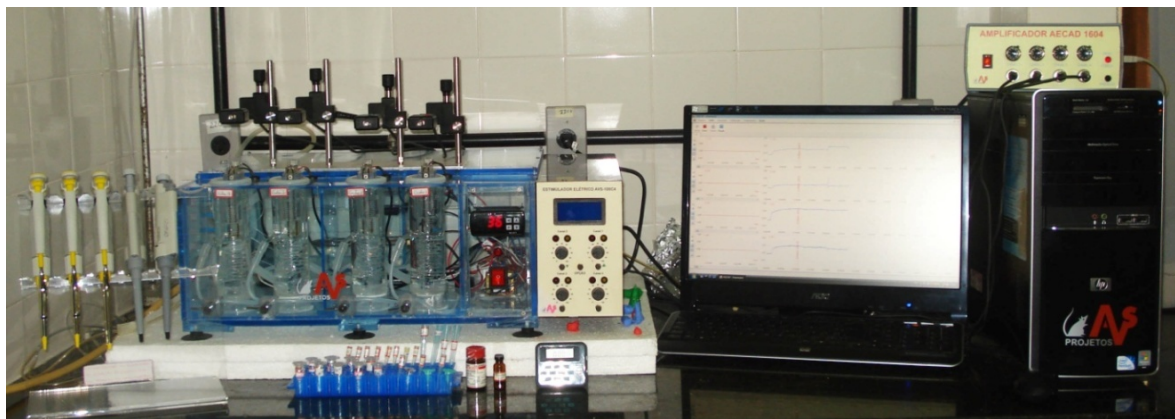


Figura 8. Aparato utilizado para os experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

4.2 Protocolos experimentais utilizando artéria mesentérica superior isolada de rato LN

4.2.1 Avaliação do efeito vasorrelaxante de rotundifolona ou mentol

Os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato LN com ou sem endotélio funcional foram pré-contraídos com FEN (10^{-5} M), e sob o platô foram adicionadas concentrações crescentes de rotundifolona ou mentol (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} , 10^{-3} , 3×10^{-3} M) de forma cumulativa, obtendo-se as curvas concentração-resposta. As respostas obtidas na ausência do endotélio foram comparadas com aquelas obtidas na presença do endotélio funcional. O relaxamento foi expresso como a percentagem de inibição da contração induzida por FEN. O mesmo procedimento foi realizado com o veículo da solução de mentol (cremofor[®] + etanol + água destilada) (Figura 9).

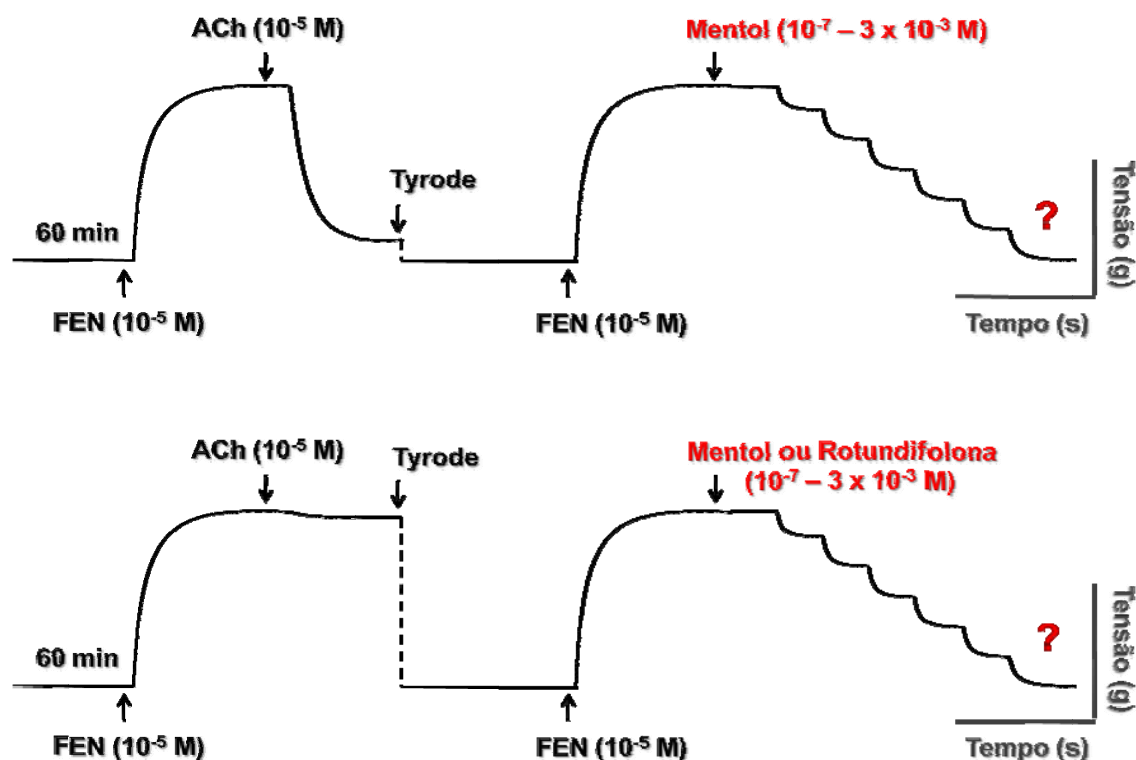


Figura 9. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de rotundifolona ou mentol sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato LN com (acima) e sem endotélio (abaixo).

4.2.2 Investigação da manutenção da capacidade contrátil induzida por fenilefrina após administração de rotundifolona ou mentol

Após a observação do efeito máximo de rotundifolona (3×10^{-3} M) ou mentol (10^{-3} ou 3×10^{-3} M) as preparações foram submetidas a uma estabilização por um período de uma hora, sendo a solução de banho (solução de Tyrode) trocada constantemente a cada 5 minutos, para remoção de rotundifolona ou mentol. Em seguida os anéis de artéria mesentérica foram novamente pré-contraídos com FEN, sendo essa contração comparada com a anterior em porcentagem (Figura 10).

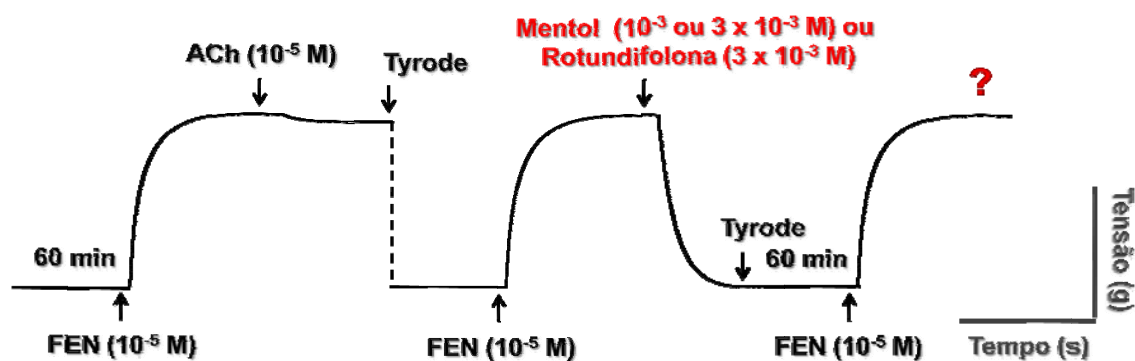


Figura 10. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação da reversibilidade da contração induzida por FEN após o efeito vasorrelaxante de rotundifolona ou mentol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio.

4.2.3 Investigação do efeito de rotundifolona ou mentol sobre o tônus basal

Os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato LN com e sem endotélio foram mantidos no tônus basal (tensão de 0,75 g), sendo em seguida adicionadas concentrações crescentes de rotundifolona ou mentol (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} , 10^{-3} e 3×10^{-3} M) de forma cumulativa, obtendo-se as curvas concentração-resposta. As respostas obtidas na ausência do endotélio foram comparadas com aquelas obtidas na presença do endotélio funcional. A contração foi expressa como a percentagem de aumento do tônus basal em relação à contração previamente induzida por FEN (Figura 11).

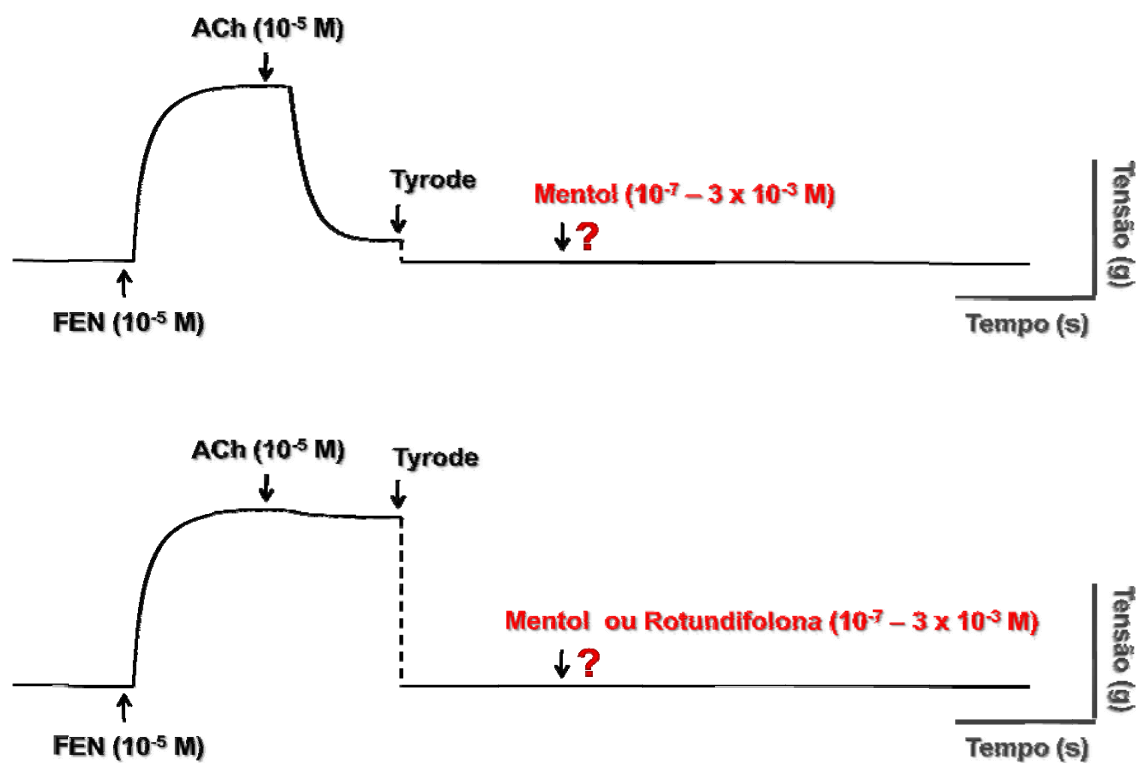


Figura 11. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação do efeito de rotundifolona ou mentol sobre o tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato LN com (acima) ou sem endotélio (abaixo).

4.2.4 Investigação da reprodutibilidade do efeito vasorrelaxante de rotundifolona ou mentol

Os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio funcional foram pré-contraídos com FEN, e sob o platô foi adicionada uma concentração de rotundifolona (3×10^{-3} M) ou mentol (10^{-3} M). Após a observação do efeito máximo da substância e seu respectivo tempo as preparações foram submetidas a nova estabilização por um período de uma hora, sendo a solução de banho (solução de Tyrode) trocada constantemente a cada 5 minutos, para remoção de rotundifolona ou mentol.

Posteriormente os anéis de artéria mesentérica foram novamente pré-contraídos com FEN, e sob o platô foi adicionada a mesma concentração de rotundifolona (3×10^{-3} M) ou mentol (10^{-3} M), aguardando-se o tempo de obtenção de seu efeito máximo. Em seguida as preparações foram mantidas

por mais uma hora de estabilização, sendo a solução de banho (solução de Tyrode) trocada constantemente a cada 5 minutos, para remoção de rotundifolona ou mentol. Posteriormente os anéis de artéria mesentérica foram novamente pré-contraídos com FEN, e sob o platô foi adicionada a mesma concentração de rotundifolona (3×10^{-3} M) ou mentol (10^{-3} M), aguardando-se o tempo de obtenção de seu efeito máximo (Figura 12).

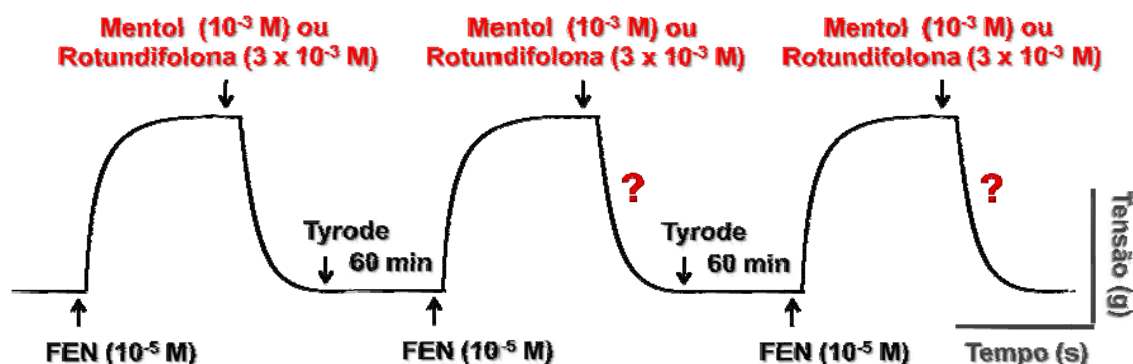


Figura 12. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação da reprodutibilidade do efeito vasorrelaxante de rotundifolona ou mentol sobre as contrações induzidas por FEN em artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio.

4.2.5 Investigação da participação de canais ROC e SOC no efeito vasorrelaxante de rotundifolona ou mentol

Como bem descrito na literatura, a entrada de Ca^{2+} em vários vasos sanguíneos envolvem canais da família dos TRP, principalmente TRPC1 e TRPC6, sendo estes canais relacionados aos operados por estoques (SOC) e operados por receptor (ROC) (DIETRICH et al., 2005b; HOFMANN et al., 1999).

Para investigar a participação de canais ROC e SOC, os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio tiveram a solução de banho trocada por solução de Tyrode sem cálcio com EGTA sendo realizada contração subsequente com FEN. Em seguida os anéis foram lavados com solução de Tyrode sem cálcio com EGTA e realizada nova contração com FEN, sendo esse procedimento repetido até a depleção dos

estoques intracelulares, medida pela ausência da contração com FEN. Tendo sido constatada a ausência de contração significativa induzida por FEN foi induzida uma contração com CaCl_2 (10^{-2} M) na presença de FEN.

Após a formação do platô da fase tônica a preparação foi lavada com solução de Tyrode normal até a tensão chegar ao valor basal. Posteriormente o meio foi novamente trocado por solução de Tyrode sem cálcio com EGTA, sendo realizada novamente a depleção dos estoques intracelulares com FEN. Na sequência foi adicionado 10^{-6} ou 3×10^{-6} M de nifedipino, um inibidor dos Ca_v ($\text{CI}_{50} = 10^{-9}$ M) (WIBO; DEROTH; GODFRANDE, 1888; RATZ; BERG, 2006) e após 30 minutos foi realizada a contração com CaCl_2 na presença de FEN.

O mesmo procedimento foi realizado na presença de rotundifolona ou mentol, 15 minutos após a adição de nifedipino, sendo realizada a contração com CaCl_2 após terem sido decorridos 30 minutos da aplicação de nifedipino.

A contração com CaCl_2 na presença de nifedipino foi comparada com aquela realizada na ausência do mesmo, e a contração com CaCl_2 na presença de nifedipino juntamente com rotundifolona (ROT) ou mentol foi comparada com aquela realizada na presença apenas de nifedipino (Figura 13).

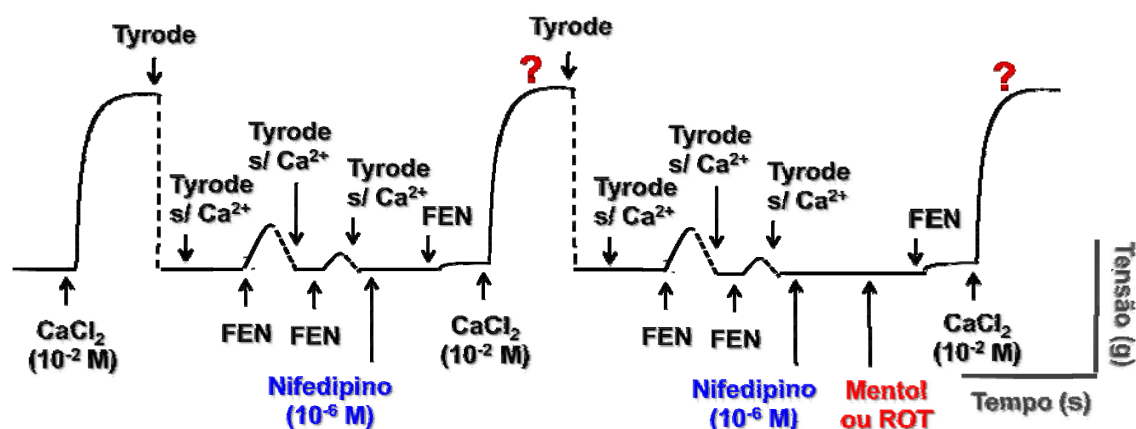


Figura 13. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação do efeito de rotundifolona ou mentol sobre o influxo de cálcio dependente de canais ROC e SOC em artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio.

4.2.6 Investigação da participação de canais TRP no efeito vasorrelaxante de rotundifolona ou mentol

Os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio funcional foram previamente incubados por 30 minutos com vermelho de rutênio (10^{-5} M), bloqueador não-seletivo dos TRPV, TRPC3, TRPM6 e TRPA1; La^{3+} (8×10^{-5} M), bloqueador não-seletivo dos TRPV, TRPC3 e 6, TRPM3, 4 e 7, Gd^{3+} (10^{-4} M), bloqueador não-seletivo dos TRPV4, TRPC1, 3 e 6, TRPM3 e 4; Gd^{3+} ($2,5 \times 10^{-5}$ M), bloqueador dos TRPC3 e 6 e TRPV4; Gd^{3+} (2×10^{-6} M) bloqueador seletivo do TRPC6; Mg^{2+} ($2,25 \times 10^{-3}$ M), bloqueador do TRPM3, 6 e 7 e BCTC (2×10^{-6} M), bloqueador dos TRPV1 e TRPM8 (BEHRENDT et al., 2004; CLAPHAM et al., 2005; MCKEMY, 2005; REUBISH et al., 2009; MALKIA et al., 2009).

Em seguida os anéis foram pré-contraídos com FEN, e sob o platô foram adicionadas concentrações crescentes de rotundifolona ou mentol (10^{-7} a 3×10^{-3} M) de forma cumulativa, obtendo-se as curvas concentração-resposta. As respostas obtidas na presença dos bloqueadores foram comparadas com aquelas obtidas na ausência dos bloqueadores. O relaxamento foi expresso como a percentagem de inibição da contração induzida por FEN (Figura 14).

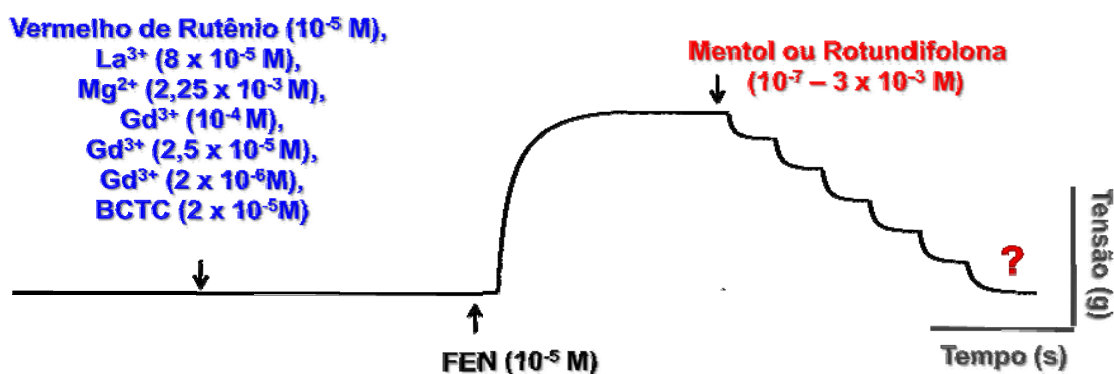


Figura 14. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação da participação de canais TRP no efeito de rotundifolona ou mentol em artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio.

4.2.7 Investigação da participação de TRPV1 no efeito vasorrelaxante de rotundifolona ou mentol

A avaliação da participação do TRPV1 no efeito vasorrelaxante induzido por rotundifolona ou mentol foi realizada mediante a dessensibilização dos canais TRPV1 presentes nas terminações nervosas por meio de exposições repetidas e prolongadas a capsaicina, um agonista seletivo desses canais (INOUE et al., 2006; DANNERT et al., 2007). Para isso foi realizada a pré-incubação dos anéis por 1 hora com capsaicina (10^{-5} M), e posterior contração dos anéis com FEN, sendo adicionada a capsaicina sobre o componente tônico dessa contração. Caso fosse verificado relaxamento induzido pela capsaicina a preparação era lavada sendo novamente pré-incubada a capsaicina no tônus basal por 1 hora e realizada a contração com FEN, sendo em seguida verificada a presença ou ausência de relaxamento com a capsaicina.

O mesmo procedimento foi realizado até que houvesse a ausência de relaxamento induzido por capsaicina. Posteriormente os anéis foram contraídos com FEN e sobre o componente tônico foi adicionado rotundifolona ou mentol de forma cumulativa, obtendo-se as curvas concentração-resposta (Figura 15).

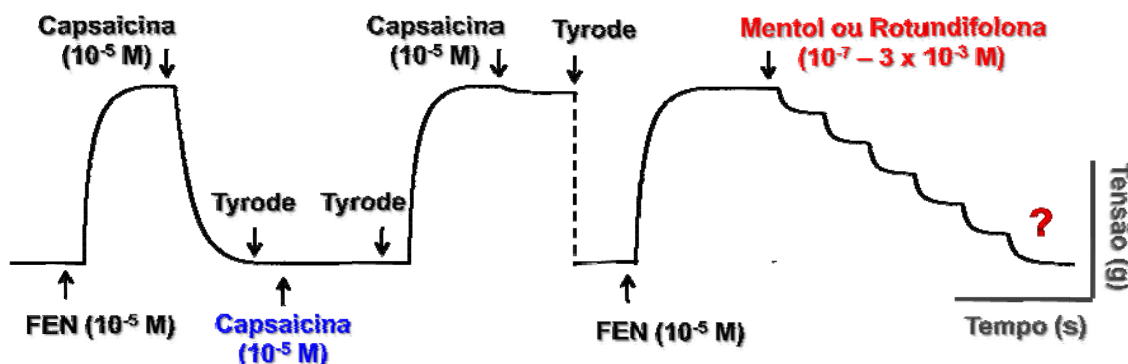


Figura 15. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação da participação do TRPV1 no efeito de rotundifolona ou mentol em artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio.

4.2.8 Investigação da influência de rotundifolona ou mentol nos efeitos induzidos por temperaturas resfriantes

A temperatura a qual os tecidos são submetidos é responsável por alterações transientes na $[Ca^{2+}]_c$ desencadeando respostas fisiológicas. Os canais TRPM8 fazem parte da classe de canais TRP termossensíveis, sendo ativados por temperaturas frias de aproximadamente 8 a 27 °C (INOUE, et al., 2006; YANG et al., 2010)

Os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio funcional foram mantidos no tônus basal (tensão de 0,75 g), a 37 °C por 20 minutos. Em seguida a temperatura do banho e da bomba termostática foi diminuída para 25 °C e os efeitos da mudança de temperatura na tensão dos anéis foram registrados. Posteriormente a temperatura do banho foi diminuída para 18 °C e os efeitos da mudança de temperatura na tensão dos anéis foram registrados.

Em seguida a temperatura foi novamente aumentada para 37 °C, com retorno dos valores de tensão ao tônus basal. Posteriormente os anéis foram tratados com rotundifolona (3×10^{-4} , 10^{-3} ou 3×10^{-3} M) ou mentol (10^{-4} , 3×10^{-4} , 10^{-3} ou 3×10^{-3} M), sendo as alterações na temperatura do banho e da bomba repetidas conforme descrito anteriormente, no entanto na presença dos monoterpenos separadamente. Os valores de tensão (g) registrados para as temperaturas analisadas (37, 25 e 18 °C) foram comparados na presença e na ausência de rotundifolona ou mentol. O relaxamento foi expresso como a percentagem de redução do tônus basal (Figura 16).

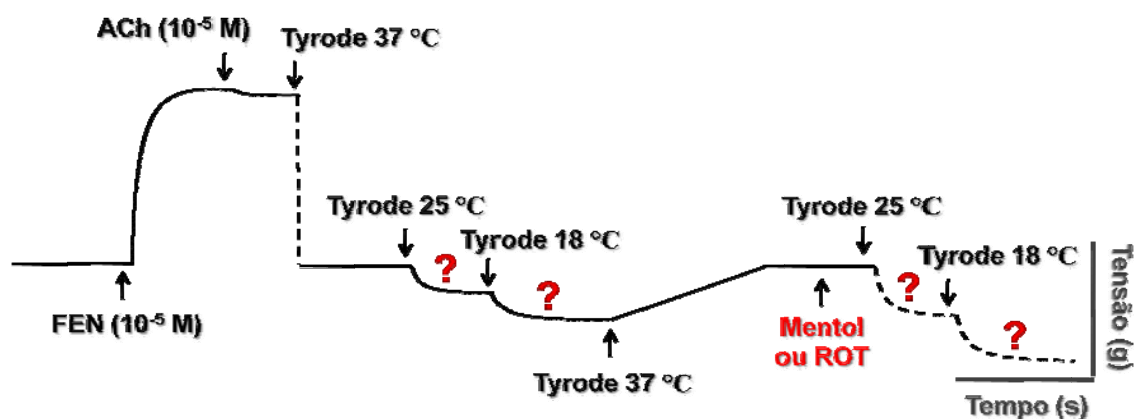


Figura 16. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação do efeito de rotundifolona ou mentol sobre os efeitos da diminuição da temperatura no tônus basal de artéria mesentérica superior isolada de rato LN sem endotélio.

4.2.9 Investigação da participação da $[Ca^{2+}]_e$ no mecanismo de alteração do tônus vascular induzido por temperaturas resfriantes, rotundifolona ou mentol

A resposta induzida por diminuição na temperatura do banho ocorre de forma dependente de temperatura e é decorrente de alteração na $[Ca^{2+}]_c$. A resposta observada é atenuada ou abolida na ausência de Ca^{2+} extracelular ou na presença de quelante de Ca^{2+} (EGTA) (KOCHUKOV et al., 2006; YANG et al., 2006; SOKABE et al., 2008).

Para avaliar a participação do Ca^{2+} extracelular nas respostas induzidas por temperaturas resfriantes, na ausência ou presença de rotundifolona ou mentol, foi realizado o procedimento descrito no item 4.2.8, porém em solução de Tyrode sem Ca^{2+} contendo 2×10^{-3} M de EGTA (Figuras 17 e 18).

ALM

Fig
inve