

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

CIBÉRIO LANDIM MACÊDO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ESPASMOLÍTICA DO FLAVONOIDE 3,6-DIMETIL
ÉTER GALETINA, ISOLADO DE *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke E
INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO EM TRAQUEIA DE COBAIA E
AORTA DE RATO**

João Pessoa - PB

Março - 2012

CIBÉRIO LANDIM MACÊDO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ESPASMOLÍTICA DO FLAVONOIDE 3,6-DIMETIL
ÉTER GALETINA, ISOLADO DE *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke E
INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO EM TRAQUEIA DE COBAIA E
AORTA DE RATO**

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

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

João Pessoa - PB

Março – 2012

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ESPASMOLÍTICA DO FLAVONOIDE 3,6-DIMETIL
ÉTER GALETINA, ISOLADO DE *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke E
INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO EM TRAQUEIA DE COBAIA E
AORTA DE RATO**

M141a Macêdo, Cibério Landim.

Avaliação da ação espasmolítica do flavonoide 3,6-Dimetil éter galetina, isolado de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke e investigação do mecanismo de ação em traqueia de cobaia e aorta de rato/ Cibério Landim Macêdo. - - João Pessoa, 2012.

197f. : il.

Orientadora: Bagnólia Araújo da Silva.

Tese (Doutorado) – UFPB/CCS

1. Produtos naturais. 2. Flavonoide. 3. Canais K^+ . 4. Canais de Ca^{2+} . 5. Farmacologia.

UFPB/BC

CDU : 547.9(043)

CIBÉRIO LANDIM MACÊDO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ESPASMOLÍTICA DO FLAVONOIDE 3,6-DIMETIL
ÉTER GALETINA, ISOLADO DE *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke E
INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO EM TRAQUEIA DE COBAIA E
AORTA DE RATO**

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

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

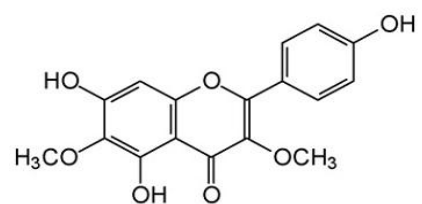
**Profa. Dra. Jeannine Aboulafia
(Universidade Federal de São Paulo)
Examinadora externa**

**Profa. Dra. Liana Clébia Soares Lima de Moraes
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora externa**

**Prof. Dr. Luís Fernando Marques dos Santos
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno**

**Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora interna**

Dedicatória



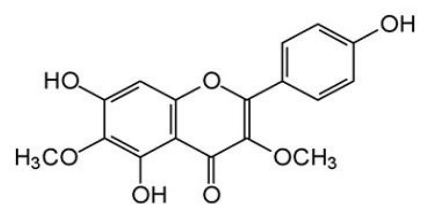
Aos meus queridos e amados pais,
Antônio Macêdo de Jesus (*in memoriam*) e Maria Dolores Landim Macêdo, pela
minha criação, incentivo a educação e aprendizado de como se transformar em
um ser humano de verdade.

A minha filha,
Maria Antonella Landim Macêdo Silva, por ser fonte de energia para que eu possa
dar um passo mais largo na vida a cada dia.

A minha irmã,
Edilane Landim Macêdo, seu esposo Juan José Guerrero Sanchez e meu
sobrinho Juan Felipe Landim Guerrero pela força que me deram em continuar
estudando e lutando na vida.

A minha esposa,
Elane Cristina Silva Landim, pelo companheirismo, amor, incentivo e ensinamento
constante de enxergar a vida através de vários ângulos.

Agradecimentos



A Deus, pela criação do universo e dos seres humanos. Por ter me dado a maravilhosa família que tenho e pela capacidade que me forneceu de raciocinar, refletir, criticar e ser ousado.

A minha família, em especial ao meu querido pai sempre presente nos momentos fáceis e difíceis da vida, por sua coragem, perseverança, dedicação e inteligência, que o fizeram dar um salto enorme na vida. O senhor está eternamente do meu lado.

A minha orientadora Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, pelos constantes ensinamentos acadêmicos, debates sobre temas científicos, maneira diferenciada de transmitir o conhecimento e aqueles do dia a dia que com a experiência de vida dela nos faz enxergar o mundo de forma mais crítica e apurada.

A Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, por ter contribuído diretamente com o meu aprendizado científico, pelo acompanhamento de bancada, pela amizade e por ser uma pessoa especial.

A Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos e a sua doutoranda Daysianne Pereira de Lira pelo fornecimento da substância, objeto de estudo neste trabalho.

A Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa e seu aluno de mestrado Gregório Fernandes Gonçalves pelo auxílio na realização dos ensaios de atividade hemolítica e anti-hemolítica.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas: Aline F. Brito, Ana Carolina C. Correia, Anna Caroline L. Silva, Cybelle A. N. Silva, Daniele I. Janebro, Fabio S. Monteiro, Fabrício M. Garcia, Fernando R. Queiroga, Gislaine A. Oliveira, Iara L. L. Souza, Italo R. R. Martins, Joedna C. Pereira, Joelmir L. V. Silva, Juliana N. Carreiro, Julianeli T. Lima, Luciano A. A. Ribeiro, Luiz Henrique, Polyana C. B. Silva, Rafael A. Travassos, Rosimeire F.

dos Santos, Silvia de Siqueira, Tamyris F. Ferreira e Vicente Carlos O. Costa, pela força que me deram desde o momento que cheguei no LTF até hoje.

A José Crispim Duarte, pela sua amizade, competência e auxílio técnico nos mais variados problemas, a Luís Cordeiro da Silva e Adriano Soares Cordeiro pela colaboração no Biotério e aos demais funcionários do LTF que contribuíram desde a limpeza até a segurança.

Aos meus professores do Programa de Pós-Graduação, Bagnólia A. da Silva, Emídio V. L. da Cunha, Isac A. de Medeiros, Jacicarlos L. de Alencar, José Maria B. Filho, Liana C. S. L. de Moraes, Márcia R. Piuvezam, Margareth F. F. M. Diniz, Reinaldo N. Almeida, Rui O. Macêdo, Temilce S. de Assis, entre outros, muito obrigado pelos ensinamentos.

Aos meus amigos: Antônio Diógenes, Aline Macêdo, Aluizio Pinto, Carlos Henrique, José Odaízo, Juan José, Orlando Junior, Pedro Alisson, Roberto Bezerra, Kleber Vânio, Sarah Rodrigues, Severino Dias, Steno Lacerda e Valéria Araújo, pela amizade e boas conversas.

À Direção do então Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF/UFPB) hoje Centro de Biotecnologia (CBiotec/UFPB) pelo apoio Institucional.

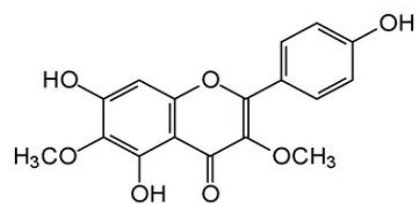
À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, nas pessoas dos Profs. Maria de Fátima Agra e Josean Fechine Tavares.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte técnico científico através do Portal Periódicos.

A todos os amigos de turma do mestrado 2006 e doutorado 2008 e as pessoas que me ajudaram de alguma forma.

Obrigado!

Resumo

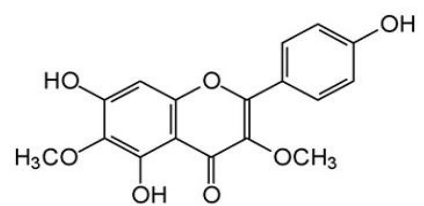


RESUMO

O flavonoide 3,6-dimetil éter galetina (FGAL) foi isolado das partes aéreas de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke e foi investigada sua possível atividade hemolítica em eritrócitos de rato e espasmolítica em vários músculos lisos isolados como útero de rata, íleo e traqueia de cobaia, e aorta de rato. FGAL não causou efeito hemolítico em eritrócitos de ratos, o que é sugestivo de baixa toxicidade. Na triagem farmacológica preliminar realizada em músculos lisos, FGAL apresentou efeito espasmolítico não seletivo nos 4 órgãos testados, apresentando uma maior potência em relaxar a traqueia de cobaia pré-contraída com carbacol e a aorta de rato pré-contraída com fenilefrina (FEN), de maneira independente de epitélio e endotélio funcional, respectivamente. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o mecanismo de ação relaxante de FGAL em traqueia de cobaia e aorta de rato. A observação de que FGAL foi mais potente em relaxar ambos os órgãos pré-contraídos com aumentos moderados na concentração extracelular de KCl do que quando contraídos com aumentos maiores de KCl é sugestivo de que FGAL está agindo por modular positivamente os canais de K^+ , hipótese esta confirmada pela diminuição da potência relaxante de FGAL em ambos os órgãos na presença de tetraetilamônio (TEA^+) 10 mM, bloqueador não seletivo dos canais de K^+ . Para verificar os subtipos de canais de K^+ , usou-se bloqueadores seletivos: em traqueia o efeito de FGAL não foi alterado na presença de TEA^+ 1 mM, bloqueador dos canais K^+ de grande condutância ativados pelo Ca^{2+} (BK_{Ca}), glibenclamida, bloqueador dos canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), $BaCl_2$, bloqueador dos canais de K^+ retificadores de entrada (K_{ir}) ou de 4-AP, bloqueador dos canais de K^+ sensíveis à voltagem (K_V), porém foi reduzido na presença de apamina, bloqueador dos canais de K^+ de pequena condutância ativados pelo Ca^{2+} (SK_{Ca}). Em aorta, o efeito relaxante de FGAL não foi alterado na presença de TEA^+ 1 mM, por outro lado foi reduzido na presença de apamina, glibenclamida, $BaCl_2$ e 4-AP, sugerindo a participação dos SK_{Ca} , K_{ATP} , K_{ir} e K_V na ação vosorrelaxante do flavonoide. O fato de FGAL deslocar para direita com redução do E_{max} as contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante, e por $CaCl_2$ na presença de FEN e verapamil, bloqueador de Ca_V , sugere o envolvimento dos Ca_V e dos ROCs, respectivamente. Ainda em aorta, FGAL inibiu as contrações induzidas por FEN em meio livre de Ca^{2+} , sugerindo inibição da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS). Avaliou-se ainda a participação dos nucleotídeos cíclicos, e observou-se que o relaxamento induzido pela aminofilina, inibidor não seletivo de fosfodiesterases (PDEs) em traqueia e aorta foi potencializado com FGAL, sugerindo a participação de AMPc e/ou GMPc. Em aorta foi avaliado o efeito de FGAL sobre o relaxamento induzido com inibidores seletivos de PDE-3 (milrinona, seletiva para AMPc) e PDE-5 (sildenafil, seletiva para GMPc), sendo que FGAL só potencializou o relaxamento induzido por sildenafil, sugerindo a participação do GMPc. Como os canais de K^+ são modulados negativamente pela PKC, investigou-se uma possível inibição da PKC por FGAL, que relaxou a aorta pré-contraída com o ativador de PKC (PMA), sugerindo inibição dessa enzima. Em conclusão, o mecanismo de ação espasmolítica de FGAL em traqueia envolve modulação positiva dos SK_{Ca} e dos nucleotídeos cíclicos, e em aorta modulação positiva dos K_{ATP} , SK_{Ca} , K_{ir} , K_V ; inibição dos Ca_V e dos ROCs, da liberação de Ca^{2+} do RS, da PDE-5 e PKC.

Palavras-chave: Flavonoide, canais de K^+ , canais de Ca^{2+} .

Abstract



ABSTRACT

The flavonoid galetin 3,6 dimethyl ether (FGAL) was isolated from the aerial parts of *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke and was investigated its possible hemolytic activity in rat erythrocytes and spasmolytic activity in several isolated smooth muscles as rat uterus, guinea pig ileum and trachea, and rat aorta. FGAL showed no hemolytic effect on rat erythrocytes, which is suggestive of a low toxicity. In preliminary pharmacological screening performed in smooth muscle models, FGAL showed non-selective spasmolytic effect in the four organs tested, with a higher potency to relax the guinea pig trachea pre-contracted with carbachol and rat aorta pre-contracted with phenylephrine (FEN) in a functional epithelium and endothelium independent manner, respectively. The aim of this study was to investigate the action mechanism of FGAL relaxing effect in guinea pig trachea and rat aorta. The observation that FGAL was more potent in relaxing both pre-contracted organs with moderate increases in extracellular concentration of KCl than when contracted with larger increases of KCl is suggestive that FGAL modulates the channels positively. This hypothesis was confirmed by decreasing of relaxant potency of FGAL in both organs in the presence of tetraethylammonium (TEA^+) 10 mM, non-selective blocker of K^+ channels. To determine the subtypes of K^+ channel involved, were used selectives blockers: in trachea the effect of FGAL was not altered in the presence of TEA^+ 1 mM, blocker of large conductance calcium-activated K^+ channels (BK_{Ca}); glibenclamide, blocker of sensitive-ATP K^+ channels (K_{ATP}); BaCl_2 , blocker of inward rectifier K^+ channels (K_{ir}) or 4-AP, blocker of voltage activated K^+ channels (K_{V}), but was reduced in the presence of apamin, blocker of small conductance calcium-activated K^+ channels (SK_{Ca}). In aorta, the relaxant effect of FGAL was not altered in the presence of TEA^+ 1 mM, but was reduced in the presence of apamin, glibenclamide, BaCl_2 and 4-AP, suggesting the involvement of SK_{Ca} , K_{ATP} , K_{ir} and K_{V} in vasorelaxant action of flavonoid. The fact of FGAL rightward shifted, with E_{max} reduced the CaCl_2 -induced contractions in depolarizing medium, and CaCl_2 in the presence of verapamil, a voltage activated calcium channel (Ca_{V}) blocker, and FEN, suggests the involvement of Ca_{V} and ROCs (receptor-operated calcium channel), respectively. Also in the aorta, FGAL inhibited FEN induced contractions in Ca^{2+} -free medium, suggesting inhibition of Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum SR. We also evaluated the participation of the cyclic nucleotides pathway, and observed that the trachea and aorta relaxation induced by aminophylline, non selective inhibitor of phosphodiesterases (PDEs), was more potent in the presence of FGAL, suggesting the involvement of cAMP and/or cGMP. On the aorta was assessed FGAL effect on relaxation induced by selective inhibitors of PDE-3 (milrinone, cAMP selective) and PDE-5 (sildenafil, cGMP selective), and FGAL only potentiated the relaxation induced by sildenafil, suggesting the participation of cGMP. Since K^+ channels are modulated negatively by PKC, we investigated a possible inhibition of PKC by FGAL and the flavonoid relaxed the aorta pre-contracted with a PKC activator (PMA), suggesting inhibition of this enzyme. In conclusion, the spasmolytic mechanism of FGAL in trachea involves positive modulation of SK_{Ca} and cyclic nucleotides, and in the aorta involves the positive modulation of K_{ATP} , SK_{Ca} , K_{ir} , K_{V} and inhibition of Ca_{V} , ROCs, Ca^{2+} release of SR, PDE-5 and PKC.

Keywords: Flavonoids, K^+ channels, Ca^{2+} channels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Piptadenia Stipulacea</i> (Benth.) Ducke.....	33
Figura 2 - Estrutura química do flavonoide 3,6-dimetil eter galetina isolado de <i>Piptadenia stipulacea</i>	35
Figura 3 - Fotos de <i>Cavia porcellus</i> (A) e <i>Rattus norvegicus</i> (B).....	51
Figura 4 - Fotos do sistema de aquisição de dados digital.....	55
Figura 5 - Registro representativo do efeito de FGAL sobre a inibição das contrações fásicas induzidas por CCh em útero de rata.....	76
Figura 6 - Registro representativo do efeito de FGAL sobre a inibição das contrações fásicas induzidas por CCh em íleo de cobaia.....	79
Figura 7 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia pré-contraída com carbacol, na ausência (A) e na presença (B) de epitélio.....	82
Figura 8 - Registro representativo do efeito vasorrelaxante de FGAL sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (A) e na presença (B) de endotélio.....	85
Figura 9 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 18 mM de KCl (A) e 60 mM de KCl (B).....	89
Figura 10 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10 mM de TEA ⁺ (B) em traqueia isolada de cobaia.....	92
Figura 11 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 1 mM de TEA ⁺ (B).....	93
Figura 12 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 3×10^{-6} M de glibenclamida (B).....	94
Figura 13 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 3 mM de 4-AP (B).....	95
Figura 14 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10^{-4} M de BaCl ₂ (B).....	94

Figura 15 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL em traqueia isolada de cobaia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 0,5 mM M de apamina (B).....	97
Figura 16 - Registro representativo do efeito relaxante de aminofilina sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10^{-5} M de FGAL(B).....	101
Figura 17 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta de rato pré-contraída com 30 mM de KCl (A) ou 80 mM de KCl (B).....	104
Figura 18 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta pré-contraída com 3×10^{-7} M FEN, na ausência (A) e na presença de TEA ⁺ 10 mM (B).....	107
Figura 19 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta pré-contraída com 3×10^{-7} M FEN, na ausência (A) e na presença de 10^{-5} M de glibenclamida (B).....	108
Figura 20 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta pré-contraída com 3×10^{-7} M FEN, na ausência (A) e na presença de 5×10^{-8} M de apamina (B).....	109
Figura 21 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (A) e na presença de 10^{-4} M de BaCl ₂ (B).....	110
Figura 22 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (A) e na presença de 3 mM de 4-AP (B).....	111
Figura 23 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (A) e na presença de 1 mM de TEA ⁺ (B).....	112
Figura 24 - Registro representativo do efeito relaxante de aminofilina em aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (A) e na presença de 3×10^{-6} M de FGAL (B).....	121
Figura 25 - Registro representativo do efeito relaxante de milrinona sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (A) e na presença de 3×10^{-6} M de FGAL (B).....	124
Figura 26 - Registro representativo do efeito relaxante de sildenafil sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (A) e na presença de 3×10^{-6} M de FGAL (B).....	127
Figura 27 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN (A) ou 10^{-5} M de PMA (B).....	131

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito hemolítico de FGAL em eritrócitos de rato.....	73
Gráfico 2 - Efeito anti-hemolítico de FGAL em eritrócitos de rato.....	74
Gráfico 3 - Efeito de FGAL frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (A) e 10^{-5} M de carbacol (B) em útero isolado de rata.....	77
Gráfico 4 - Efeito de FGAL frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol (A) e por 10^{-6} M de histamina (B) em íleo isolado de cobaia.....	80
Gráfico 5 - Efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com carbacol, na ausência (○) e presença (●) de epitélio funcional.....	83
Gráfico 6 - Efeito vasorrelaxante de FGAL sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de fenilefrina, na ausência (■) e na presença (□) de endotélio funcional.....	86
Gráfico 7 - Efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 18 mM de KCl (Δ) e 60 mM de KCl (▲).....	90
Gráfico 8 - Efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh, na ausência (■) e na presença de TEA ⁺ (10 mM) (▲) (A) ; TEA ⁺ (1 mM) (▼) (B) ; glibenclamida (■) (C) , 4-AP (●) (D) ; BaCl ₂ (◆) (E) , apamina (□) (F)	98
Gráfico 9 - Efeito relaxante de aminofilina sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh, na ausência (■) e na presença (♦) de 10^{-5} M de FGAL.....	102
Gráfico 10 - Efeito vasorrelaxante de FGAL sobre a aorta de rato pré-contraída com 30 mM de KCl (●) e 80 mM de KCl (□).....	105
Gráfico 11 - Efeito vasorrelaxante de FGAL sobre a aorta pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (■) e na presença de TEA ⁺ (10 mM) (▲) (A) ; glibenclamida (■) (B) ; apamina (□) (C) ; BaCl ₂ (◆) (D) ; 4-AP (●) (E) ; TEA ⁺ (1 mM) (▼) (F)	113
Gráfico 12 - Efeito de FGAL frente às curvas concentrações-resposta, em resposta à adição cumulativa de CaCl ₂ , em anéis de aorta de rato na ausência (■) e na presença de 10^{-5} (◇), 3×10^{-5} (□), 10^{-4} (○) e 3×10^{-4} M (▽) de FGAL.....	116

Gráfico 13 - Efeito de FGAL frente às curvas concentrações-resposta, em resposta à adição cumulativa de CaCl_2 , na presença de verapamil e fenilefrina, em anéis de aorta isolada de rato na ausência (◆) e na presença de 3×10^{-6} (Δ), 10^{-5} (\square) e 3×10^{-5} M (O) de FGAL.....	118
Gráfico 14 - Efeito de FGAL frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de FEN, com meio livre de Ca^{2+} em aorta isolada de rato.....	119
Gráfico 15 - Efeito vasorrelaxante de aminofilina sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (■) e na presença (◆) de 3×10^{-6} M de FGAL.....	122
Gráfico 16 - Efeito vasorrelaxante de milrinona sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (■) e na presença (■) de 3×10^{-6} M de FGAL.....	125
Gráfico 17 - Efeito vasorrelaxante de sildenafil sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (■) e na presença (■) de 3×10^{-6} M de FGAL.....	128
Gráfico 18 - Efeito vasorrelaxante de FGAL sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN (■) ou 10^{-5} M de PMA (◆).....	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de CI_{50} do efeito espasmolítico de FGAL em útero de rata e íleo de cobaia.....	87
Tabela 2 - Valores de CE_{50} e pD_2 do efeito espasmolítico de FGAL em traqueia de cobaia e aorta de rato.....	87
Tabela 3 - Valores de pD_2 do efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia pré-contraída com 18 ou 60 mM de KCl.....	90
Tabela 4 - Valores de CE_{50} e pD_2 de FGAL na ausência e na presença de bloqueadores de canais de K^+ em traqueia isolada de cobaia.....	99
Tabela 5 - Valores de pD_2 do efeito relaxante da aminofilina em traqueia de cobaia pré-contraída com CCh na ausência e presença de FGAL.....	102
Tabela 6 - Valores de pD_2 do efeito relaxante de FGAL em aorta de rato pré-contraída com 30 ou 80 mM de KCl.....	105
Tabela 7 - Valores de CE_{50} e pD_2 de FGAL na ausência e na presença de bloqueadores de canais de K^+ em aorta isolada de rato.....	114
Tabela 8 - Valores de pD_2 do efeito relaxante da aminofilina em aorta de rato pré-contraída com FEN na ausência e presença de FGAL.....	122
Tabela 9 - Valores de pD_2 do efeito relaxante de milrinona em aorta de rato pré-contraída com FEN na ausência e presença de FGAL.....	125
Tabela 10 - Valores de pD_2 do efeito relaxante da sildenafil em aorta de rato pré-contraída com FEN na ausência e presença de FGAL.....	128
Tabela 11 - Valores de pD_2 de inibidores de PDE na ausência (-) e na presença (+) de FGAL em aorta isolada de rato.....	129
Tabela 12 - Valores de pD_2 do efeito relaxante de FGAL em aorta de rato pré-contraída com FEN ou PMA.....	132

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das isoformas de fosfodiesterase.....45

Quadro 2 - Substâncias, sais e fornecedores.....51

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Fracionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Piptadenia stipulacea*.....34

Esquema 2 - Fluxograma da metodologia utilizada nos ensaios farmacológicos.....56

Esquema 3 - Proposta de mecanismo de ação para FGAL em traqueia de cobaia.....151

Esquema 4 - Proposta de mecanismo de ação para FGAL em traqueia de cobaia.....152

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
ACh	Acetilcolina
AMPc	Monosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
4-AP	4-aminopiridina
BK_{Ca}	Canais de K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de larga condutância
CaM	Calmodulina
[Ca²⁺]	Concentração de Ca ²⁺
[Ca²⁺]_i	Concentração de Ca ²⁺ intracelular
[Ca²⁺]_c	Concentração de Ca ²⁺ citosólico
Ca_v	Canais de cálcio dependentes de voltagem
Ca_v1	Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 1
Ca_vL	Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L
CCh	Carbacol
CE₅₀	Concentração de uma substância que produz 50 % de seu efeito máximo
CI₅₀	Concentração de uma substância que inibe 50 % do efeito máximo produzido por um agonista
DAG	Diacilglicerol
e.p.m.	Erro padrão da média
E_{max}	Efeito máximo
FEN	Fenilefrina
FGAL	3,6-dimetil éter galeatina

FHDE	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
FRDE	Fator Relaxante Derivado do Endotélio
FRDEp	Fator Relaxante Derivado do Epitélio
Gq/11	Proteína G heterotrimétrica tipos q e 11
Gα_q	Subunidade α da proteína G _q
G_{12/13}	Proteína G heterotrimétrica tipos 12 e 13
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
GTP	Trifosfato de guanosina
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
K_{ATP}	Canais de potássio sensíveis ao ATP
K_v	Canais de K ⁺ dependentes de voltagem
LC20	Cadeia leve da cabeça da miosina de 20 kDa
M	Concentração molar (mols/L)
MLC	Cadeia leve da miosina
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina
MLCP	Fosfatase da cadeia leve da miosina
p	Probabilidade
pD₂	Logarítmo negativo (na base 10) da concentração de uma substância que produz 50 % de seu efeito máximo
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	Proteína cinase A
PKG	Proteína cinase G
PLC	Fosfolipase C
PMCA	Cálcio ATPase da membrana plasmática
R²	Coeficiente de correlação não linear

RhoA	Pequena proteína G Rho ligante de GTP
ROK	Cinase dependente de RhoA
RS	Retículo sarcoplasmático
SERCA	Cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático
SK_{Ca}	Canais de K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de pequena condutância
TEA⁺	Íon tetraetilamônio
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
vs	<i>Versus</i>

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 OBJETIVOS.....	46
2.1 GERAL	47
2.2 ESPECÍFICO.....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 MATERIAL.....	49
3.1.1 Material vegetal.....	49
3.1.2 Animais.....	49
3.1.3 Substâncias e sais.....	50
3.1.4 Soluções nutritivas.....	52
3.1.5 Preparação das soluções-estoque das substâncias em estudo.....	53
3.1.6 Aparelhos.....	53
3.2 MÉTODOS.....	55
3.2.1 Avaliação citotóxica de FGAL em eritrócitos de rato.....	56
3.2.1.1 Efeito hemolítico de FGAL em eritrócitos de rato.....	56
3.2.1.2 Efeito anti-hemolítico de FGAL em eritrócitos de rato.....	56
3.2.2 Triagem farmacológica.....	57
3.2.2.1 Efeito de FGAL frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou carbacol em útero isolado de rata.....	57
3.2.2.2 Efeito de FGAL frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina em íleo isolado de cobaia.....	58
3.2.2.3 Efeito de FGAL sobre o tônus espontâneo e a traqueia de cobaia pré-contráida com carbacol.....	59
3.2.2.4 Efeito de FGAL sobre o tônus espontâneo e a aorta de rato pré-contráida com fenilefrina.....	60

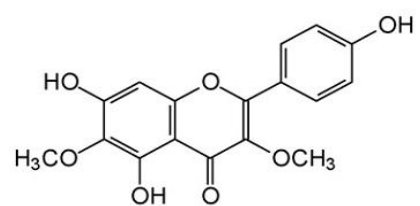
3.2.3 Investigação do mecanismo de ação de FGAL em traqueia de cobaia.....	61
3.2.3.1 Avaliação da participação dos canais de K^+ e de Ca^{2+}	61
3.2.3.1.1 Efeito de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 18 ou 60 mM de KCl em traqueia de cobaia.....	61
3.2.3.2 Investigação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia.....	62
3.2.3.2.1 Efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia na ausência e presença de TEA^+ (10 mM).....	62
3.2.3.2.2 Efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia pré-contraída com CCh na ausência e presença de vários bloqueadores de canais de K^+	62
3.2.3.3 Avaliação da participação de nucleotídeos cíclicos no efeito relaxante de FGAL em traqueia isolada de cobaia.....	63
3.2.3.3.1 Efeito relaxante de aminofilina na ausência e presença de FGAL.....	63
3.2.4 Investigação do mecanismo de ação de FGAL em aorta de rato.....	64
3.2.4.1 Avaliação da participação dos canais de K^+ e de Ca^{2+}	64
3.2.4.1.1 Efeito de FGAL sobre a aorta de rato pré-contraída com 30 ou 80 mM de KCl.....	64
3.2.4.2 Investigação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante de FGAL em aorta isolada de rato.....	64
3.2.4.2.1 Efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia pré-contraída com CCh na ausência e presença de TEA^+ (10 mM).....	64
3.2.4.2.2 Efeito relaxante de FGAL em aorta de rato pré-contraída com FEN na ausência e presença de vários bloqueadores de canais de K^+	65
3.2.4.3 Avaliação do efeito de FGAL sobre o influxo e liberação do RS de Ca^{2+}	66
3.2.4.3.1 Efeito de FGAL frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem cálcio.....	66
3.2.4.3.2 Efeito de FGAL frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ na presença de verapamil e fenilefrina.....	66

3.2.4.3.3 Efeito de FGAL sobre a mobilização de cálcio do retículo sarcoplasmático sensíveis à FEN.....	67
3.2.4.4 Avaliação da participação de nucleotídeos cíclicos no efeito relaxante de FGAL em aorta isolada de rato.....	68
3.2.4.4.1 Efeito vasorrelaxante de aminofilina na ausência e presença de FGAL.....	68
3.2.4.4.2 Efeito vasorrelaxante de milrinona na ausência e presença de FGAL.....	68
3.2.4.4.3 Efeito vasorrelaxante de sildenafil na ausência e presença de FGAL.....	68
3.2.4.5 Avaliação da participação da PKC no efeito relaxante de FGAL em aorta isolada de rato.....	69
3.2.4.5.1 Efeito vasorrelaxante de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por FEN ou PMA.....	69
3.2.4 Análise estatística.....	70
4 RESULTADOS.....	71
4.1 Avaliação citotóxica de FGAL em eritrócitos de rato.....	72
4.1.1 Efeito hemolítico de FGAL em eritrócitos de rato.....	72
4.1.2 Efeito anti-hemolítico de FGAL em eritrócitos de rato.....	73
4.2 Triagem farmacológica.....	74
4.2.1 Efeito de FGAL sobre às contrações fásicas induzidas por ocitocina e carbacol em útero isolado de rata.....	74
4.2.2 Efeito de FGAL sobre às contrações fásicas induzidas por carbacol e por histamina em íleo isolado de cobaia.....	77
4.2.3 Efeito de FGAL sobre o tônus basal e sobre a traqueia de cobaia pré-contráida com carbacol.....	80
4.2.4 Efeito de FGAL sobre o tônus basal e sobre a aorta de rato pré-contráida com fenilefrina.....	83
4.2.5 Comparação entre a potência espasmolítica de FGAL em útero de rato, íleo e traqueia de cobaia e aorta de rato.....	86
4.3 Investigação do mecanismo de ação de FGAL em traqueia de cobaia.....	87

4.3.1 Avaliação da participação dos canais de K^+ e de Ca^{2+}	87
4.3.1.1 Efeito de FGAL sobre a traqueia pré-contraída com 18 ou 60 mM de KCl.....	87
4.3.2 Investigação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia.....	90
4.3.2.2 Efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia pré-contraída com CCh na ausência e presença de vários bloqueadores de canais de K^+	90
4.3.2.3 Comparação entre a potência espasmolítica de FGAL em traqueia de cobaia na ausência e presença dos bloqueadores de canais de K^+	98
4.3.3 Avaliação da participação de nucleotídeos cíclicos no efeito relaxante de FGAL em traqueia isolada de cobaia.....	99
4.3.3.1 Efeito relaxante de aminofilina na ausência e presença de FGAL.....	99
4.4 Investigação do mecanismo de ação de FGAL em aorta de rato.....	102
4.4.1 Avaliação da participação dos canais de K^+ e de Ca^{2+}	102
4.4.1.1 Efeito de FGAL sobre a aorta de rato pré-contraída com 30 ou 80 mM de KCl.....	102
4.4.2 Investigação do envolvimento dos canais de K^+ no efeito relaxante de FGAL em aorta isolada de rato.....	105
4.4.2.2 Efeito relaxante de FGAL em aorta de rato pré-contraída com FEN na ausência e presença de vários bloqueadores de canais de K^+	105
4.4.2.3 Análise comparativa entre os valores da pD_2 de FGAL na ausência e presença dos bloqueadores de canais de K^+	113
4.4.3 Avaliação do efeito de FGAL sobre o influxo e liberação do RS de Ca^{2+}	114
4.4.3.1 Efeito de FGAL frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem cálcio.....	114
4.4.3.2 Efeito de FGAL frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ na presença de verapamil e fenilefrina.....	116
4.4.3.3 Efeito de FGAL sobre a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático sensíveis à FEN.....	118
4.4.4 Avaliação da participação de nucleotídeos cíclicos no efeito relaxante de FGAL em aorta isolada de rato.....	119

4.4.4.1 Efeito vasorrelaxante de aminofilina na ausência e presença de FGAL.....	119
4.4.4.2 Efeito vasorrelaxante de milrinona na ausência e presença de FGAL.....	122
4.4.4.3 Efeito vasorrelaxante de FGAL na presença de sildenafil.....	125
4.4.4.4 Análise comparativa entre os valores da pD_2 de inibidores de fosfodiesterase na ausência e presença de FGAL.....	128
4.4.5 Avaliação da participação da PKC no efeito relaxante de FGAL em aorta isolada de rato.....	129
4.4.5.1 Efeito vasorrelaxante de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por FEN ou PMA.....	129
5 DISCUSSÃO	132
6 CONCLUSÕES	152
REFERÊNCIAS.....	154
ANEXO.....	175
APÊNDICE A.....	177
APÊNDICE B.....	190
APÊNDICE C.....	192

1 Introdução



Os produtos naturais desempenham um papel fundamental na pesquisa farmacológica e na proteção à saúde, pois muitos fármacos são obtidos diretamente de produtos naturais ou, indiretamente, por alterações em suas estruturas químicas (JOHN, 2010). Estima-se que cerca de 40% de todos os medicamentos são obtidos de forma direta ou indireta a partir dos produtos naturais (NEWMAN, 2007).

Os produtos naturais são produzidos por microorganismos, plantas, organismos marinhos, anfíbios e outros animais para fins diversos incluindo, barreiras protetoras, coenzimas e cofatores, para defesa do hospedeiro contra infecção bacteriana e predadores (animais), proteção de seu nicho ecológico, comunicação intra e inter espécies, pigmentos, sinalização celular, expressão gênica e homeostase dos organismos (JOHN, 2010).

Os dados de pesquisas para obtenção de produtos naturais associados à triagem farmacológica realizada a partir de extratos obtidos dos produtos naturais ou utilizando substâncias isoladas a partir de métodos de extração, isolamento e identificação representa um meio importante na obtenção de ferramentas farmacológicas e novos medicamentos utilizados no tratamento de diversas enfermidades que acometem a população.

Por meio dessas investigações várias substâncias foram obtidas, seja naturalmente (tal qual encontradas na natureza) ou por alterações na estrutura original da molécula (derivados semi-sintéticos), as quais são usadas na terapêutica moderna: quinina (antimalárico), pilocarpina (colinesterásico), sildenafil (vasodilatador), vincristina (anticancerígeno), penicilinas, cefalosporinas (antibióticos), ácido acetil salicílico (AAS) e morfina (analgésicos), captopril (anti-hipertensivo), estatinas (anticolesterol), azidovudina (antiviral) (BARREIRO, 2009). Outras substâncias estão sendo investigadas por atuarem em importantes vias de sinalização, como o fumagilim e o TNP-470 (potentes inibidores da angiogênese), FTY720 (imunossupressor), diazonamida A (antitumoral) (HONG, 2011).

Segundo estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), o Brasil hospeda entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o maior do planeta em número de espécies endêmicas (LEWINSONHN; PRADO,

2002). No entanto, somente 10% das espécies vegetais brasileiras têm sido avaliadas com respeito as suas características biológicas e apenas 5% com objetivos fitoquímicos (LUNA et al., 2005).

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

O gênero *Piptadenia* possui cerca de 80 espécies de árvores, arbustos e trepadeiras (CARDOZO, 2006; JOBSON; LUCKOW, 2007). No Brasil, as espécies desse gênero estão presentes nos estados do Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo (CARDOZO, 2006).

Vários metabólitos secundários foram identificados nas espécies desse gênero, como alcaloides (YAMATASO et al., 1972), esteroides (MIYAUCHI; YOSHIMOTO; MINAMI, 1976), taninos (ZELADA; CONI, 1915) e flavonoides (ALVES et al., 2003; CARDOZO, 2006).

A espécie *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke é uma árvore típica da caatinga do nordeste brasileiro (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002) (Figura 1), amplamente distribuída no bioma caatinga, do Piauí à Bahia (BARBOSA et al., 2007) e é conhecida popularmente como "jurema-branca" (FABRICANTE; ANDRADE, 2007), "jurema malícia-da-serra", "carcará" e "calumbi" (FLORENTINO et al., 2007). Essa espécie é muito usada na medicina popular no tratamento dos processos inflamatórios e estudos científicos confirmam sua atividade antibacteriana e antifúngica (CHIAPPETA; DE MELLO, 1984).

Figura 1 - *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke. **A** árvore; **B** galhos



www.cnip.org.br

As cascas do caule e folhas de *P. stipulacea* são usadas na medicina popular na forma de tintura ou decocto para tratar feridas (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002), sendo indicados como cicatrizante (BEZERRA, 2008). Estudos farmacológicos indicam que alguns extratos de *P. stipulacea* são eficazes contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecium* e *Neurospora crassa* (CHIAPPETA; DE MELLO, 1984) e que o extrato etanólico das folhas dessa espécie foi ativo contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a várias drogas e contra cepas de *Candida albicans* (BEZERRA, 2008). Além disso, recentemente foi demonstrado que as frações acetato de etila e aquosa obtidas das partes aéreas dessa espécie apresentam atividades antinociceptiva e anti-inflamatória em camundongos (QUEIROZ et al., 2010).

A partir das partes aéreas de *P. Stipulacea* foi isolado um flavonoide 4',5,7-triidroxi-3,6-dimetoxiflavona (3,6-dimetil éter galetina ou FGAL), na forma de

cristais amarelo claro com ponto de fusão de 199,6 °C, o qual foi descrito pela primeira vez na família Fabaceae (LIRA, 2009) (Esquema 1 e Figura 2).

Esquema 1 - Fracionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *P. stipulacea*

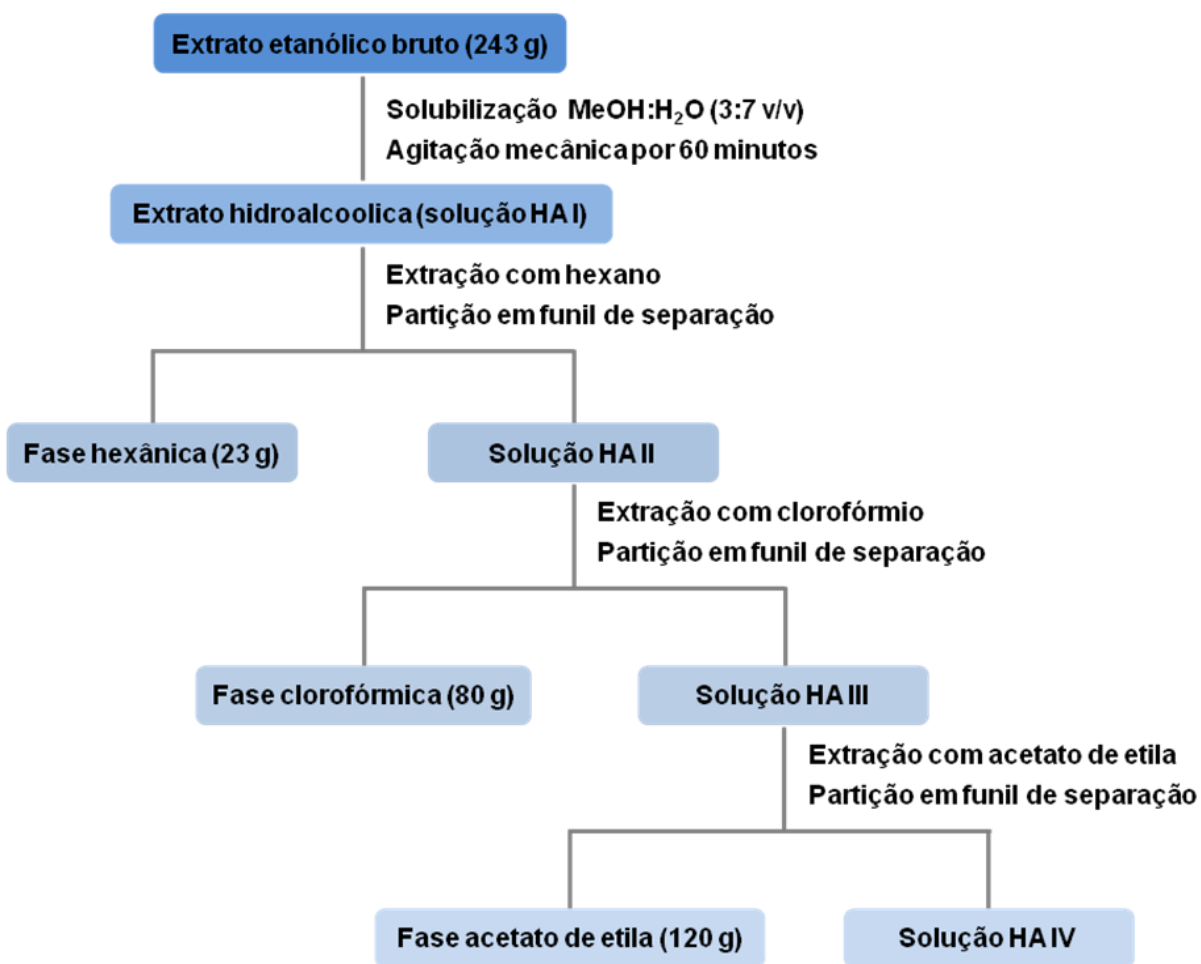
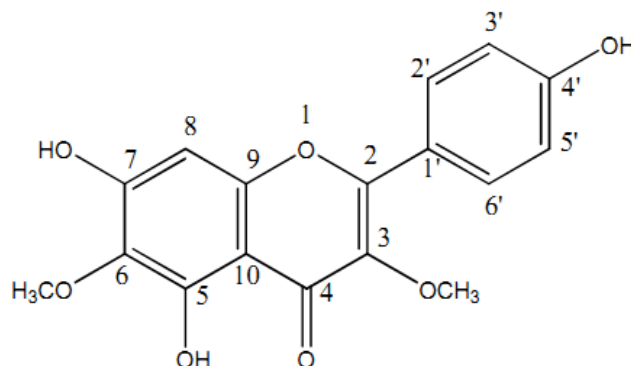


Figura 2 - Estrutura química do flavonoide 3,6-dimetil eter galetina isolado de *Piptadenia stipulacea*.



LIRA, 2009.

Várias atividades farmacológicas vêm sendo descritas para FGAL, como atividade antiviral (ELSOHLY et al., 1997), tratamento de doenças da pele (ROSENBLOOM, 2003), tratamento de doenças periféricas vasculares e neurais (ROSENBLOOM, 2004), anticancerígena (ROSENBLOOM, 2006), inibição da síntese de óxido nítrico (NO) (MORIKAWA et al., 2006), inibição da α -amilase (AL-DABBAS et al., 2006), atividade antioxidante (LEACH et al., 2007) e recentemente, foi demonstrado que esse flavonoide apresenta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em camundongos, provavelmente pela ação antioxidante e inibidora de ciclooxigenase (COX) (QUEIROZ et al., 2010).

Os flavonoides constituem uma classe ampla de substâncias polifenólicas encontradas em plantas. Este grupo inclui várias subclasses, como os flavonóis, flavonas, flavanonas, antrocianidinas, isoflavonas, diidroflavonóis e chalconas (PEREZ-VIZCAINO, 2010). A ampla variedade estrutural destes metabólitos e os diversos estudos químicos, genéticos e enzimológicos refletem o crescente e continuado interesse de químicos, farmacólogos e biólogos nesta classe de compostos (WOLLENWEBER, 1994).

Os flavonoides são os antioxidantes mais abundantes encontrados em dietas comuns. Mais de 4000 flavonoides diferentes foram identificados nos alimentos, as principais fontes são as maçãs, cebolas, amoras,

chocolate, frutas vermelhas, frutas cítricas, nozes e bebidas, como cerveja e vinho (RUSSO et al., 2000).

Várias atividades farmacológicas foram descritas para os flavonoides, como sequestrador de radicais livres, formação de complexos com os metais ferro e cobre, inibição de enzimas envolvidas na síntese de espécies reativas de oxigênio (xantina oxidase, NADPH oxidase e lipoxigenases), inibição da expressão das enzimas sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2), inibição da agregação plaquetária e vasodilatação (MLADENKA et al., 2010).

Além disso, vários flavonoides apresentaram atividade espasmolítica, como: genisteína, quenferol e quercetina em útero de rata, através da participação do monosfato cíclico de adenosina (AMPc) (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997). 3,7,8,4'-tetra-O-metilgossipetina e 3,7-di-O-metilcanferol, obtidos de *Solanum paludosum* Moric, apresentam efeito relaxante em aorta de rato e a ação deles envolve bloqueio do influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (Ca_vL) (SILVA, 2005). Retusina e me-retusina, também isolados de *Solanum paludosum* Moric, apresentam efeito espasmolítico em íleo de cobaia, onde o mecanismo de ação de retusina envolve a participação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) e o mecanismo promovido pelo me-retusina envolve a participação da via fosfodiesterase (PDE) - nucleotídeos cíclicos (SANTOS, 2007). Isoliquiritigenina, isolado de *Glycyrrhiza ularensis*, apresenta atividade antiespasmódica em jejuno, íleo e reto de camundongo, através da inibição de PDEs (SATO et al., 2006). Diplotropina (3,4,5, 8-tetrametoxi-6,7,2",3"-furanoflavona), isolado de *Diplotropis ferruginea* Benth exerce efeito relaxante em íleo de cobaia e útero de rata através da participação dos canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de larga condutância (BK_{Ca}) (LIMA, 2008). Liu e colaboradores (2008) demonstraram que o flavonoide isoliquiritigenina, isolado das raízes de *Glycyrrhiza glabra*, apresenta efeito relaxante em traqueia de cobaia através de vários mecanismos, como ativação da ciclase de guanilil solúvel (CGs), inibição de fosfodiesterase V (PDE V), ativação da via de sinalização PKG/GMPc e abertura de BK_{Ca} .

Vários estudos indicam que os flavonoides apresentam efeito vasorrelaxante em aorta de rato, como: quercetina, quenferol, pentametil, luteolina,

apigenina, catequina, epicatequina. E alguns mecanismos de ação já foram relatados para explicar esse efeito, como: efeito de proteção do NO através do sequestro de radicais livres, ativação de canais de potássio e participação de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (FHDE) (PEREZ-VIZCAINO, 2010).

Os efeitos farmacológicos descritos para os flavonoides permitem utilizar esses metabólitos secundários no tratamento de diversas patologias ocasionadas por distúrbios do músculo liso, como acontece com as alterações que acometem o sistema cardiovascular: hipertensão arterial, aterosclerose, distúrbios na coagulação sanguínea, isquemia do miocárdio (PEREZ-VIZCAINO, 2010), infarto agudo do miocárdio, falência cardíaca e arritmias (MLADENKA et al., 2010).

O músculo liso é o principal responsável pelo controle da maior parte dos órgãos e dos sistemas do corpo. As células musculares lisas estão presentes nas paredes de vários órgãos (estômago, intestinos, bexiga, útero, vias aéreas) e vasos do corpo. Assim, há grande interesse na investigação de drogas, obtidas diretamente das plantas ou seus derivados, que agem sobre o músculo liso. A regulação da contração do músculo liso tem um papel importante em muitos processos fisiopatológicos, onde a contração anormal do músculo liso é importante em condições como a hipertensão arterial, vasoespasmo coronariano e cerebral, asma brônquica, disfunção erétil e complicações durante o parto (WEBB, 2003). Logo, os ensaios farmacológicos na musculatura lisa contribuem para o desenvolvimento de futuros fármacos para serem utilizados no tratamento das diversas enfermidades que acometem esse músculo.

No músculo liso um aumento na concentração de cálcio citoplasmático ($[Ca^{2+}]_c$) é a causa primária para a produção da contração e também está envolvida na proliferação celular no músculo liso (VAN BREEMEN; SAIDA, 1989).

No músculo liso, a contração pode ser alcançada através da despolarização da membrana (acoplamento eletromecânico), levando ao aumento da $[Ca^{2+}]_c$, proveniente do meio extracelular através dos Ca_v , desencadeando o processo de contração muscular. Ou induzida por um agonista (acoplamento fármaco mecânico) que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003). Agonistas como fenilefrina, carbacol ou histamina se

ligam a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata do inositol, através da proteína G_q ou G_{11} mediando a produção de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3), que estimulam a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) e diacilglicerol (DAG), responsável pela ativação da proteína cinase C (PKC) (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). O aumento na $[Ca^{2+}]_c$ favorece a ligação do Ca^{2+} com a proteína calmodulina (CaM), formando o complexo $[4Ca^{2+}\text{-CaM}]$. Este complexo ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) a qual fosforila a cadeia leve da miosina (MLC), promovendo a interação da MLC com os filamentos de actina, desencadeando o processo de contração do músculo liso (WEBB, 2003).

As PKCs representam uma família de proteínas com várias isoformas, divididas em PKCs convencionais (α , β_1 , β_2 e γ), novas (δ , ϵ , η , θ , μ , ν) e atípicas (ζ , λ) (PEREZ-VIZCAINO; COGOLLUDO; MORENO, 2010). As PKCs convencionais (α , β e γ) têm quatro regiões conservadas (C1-C4) e cinco regiões variáveis. A região C1 contém o sítio de ligação do DAG ou ésteres de forbol, a região C2 contém o sítio de ligação do Ca^{2+} e as regiões C3 e C4 contém o sítio de ligação do trisfosfato de adenosina (ATP) e alguns substratos e antagonistas da PKC (SAKAI et al., 2009). Essa enzima é ativada pelo DAG, proveniente do metabolismo do 4,5-bisfosfato de fosfatidil inositol em DAG e IP_3 , e por ésteres de forbol como o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) que ancoram as PKCs em sua conformação ativa nas membranas celulares (STEINBERG, 2008).

Várias isoformas de PKC já foram encontradas no músculo liso, onde a ativação dessa cinase fosforila proteínas alvo específicas, como canais de Ca^{2+} presentes na membrana celular ativando-os e promovendo o influxo de Ca^{2+} e canais de K^+ , inibindo-os, estando implicada com o processo de contração do músculo liso. Os ésteres de forbol ativam diretamente a PKC e promovem a contração do músculo liso (WEBB, 2003; CLARK; PYNE-GEITHMAN, 2005; KO et al., 2010).

Nas células do músculo liso, o aumento na $[Ca^{2+}]_c$ induzida por neurotransmissores ou hormônios resulta da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (principalmente do RS) e por influxo de Ca^{2+} extracelular através dos (1) canais de Ca^{2+} independentes de voltagem: canais operados por receptor

(ROCs), canais operados por estoque (SOCs), canais ativados pelo estiramento (SACs) e (2) canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v) (GUIBERT; DUCRET; SAVINEAU, 2008).

O RS representa a mais importante fonte de Ca^{2+} intracelular, onde a liberação de Ca^{2+} desta organela é principalmente decorrente da ativação dos canais de Ca^{2+} ativados por IP_3 (IP_3R) e também pelos canais de Ca^{2+} ativados pelo próprio Ca^{2+} e sensíveis à cafeína (RyR) um processo denominado de liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} (CICR), ambos receptores permitem a liberação de Ca^{2+} do RS para o citosol aumentando a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (DELLIS et al., 2006; MCHALE et al., 2006).

Várias evidências sugerem que os canais de cálcio independentes de voltagem são estruturalmente relacionados aos receptores potencial transiente (TRPs) (GUIBERT; DUCRET; SAVINEAU, 2008; REN; ALBINSSON; HELLSTRAND, 2010). Esses canais são formados por seis hélices transmembranares (TM1-6), terminal N e C citoplasmático e uma região poro entre o TM5 e TM6 (CLAPHAM; RUNNELS; STRUBING, 2001).

Os ROCs são canais catiônicos não seletivos, permeáveis ao Ca^{2+} , ativados pelo DAG produzido a partir da interação de agonistas (acetilcolina, angiotensina II, noradrenalina, serotonina) ao seu respectivo GPCR, independentes de alterações no potencial de membrana e que não podem ser estimulados por depleção dos estoques de Ca^{2+} intracelular com agentes como tapsigargina. Há relatos que esses canais estão presentes em músculos lisos visceral (intestino e útero) e vascular (aorta e veia porta) (GUIBERT; DUCRET; SAVINEAU, 2008; WANG et al., 2008).

Outro tipo de canal de Ca^{2+} presente na membrana celular é o SOC, que são canais iônicos ativados por uma depleção nos estoques intracelulares de Ca^{2+} . Estudos recentes revelam que uma proteína denominada STIM 1 é requerida para entrada de Ca^{2+} através dos SOCs, funcionando como um sensor de Ca^{2+} do RS e ativando esses canais através de translocação para a membrana plasmática (LIOU et al., 2005; SPASSOVA et al., 2006). Outra proteína recentemente descrita e importante para ativação dos SOCs é a Orai 1 (FESKE et al., 2006).

Uma característica comum dos SOC's é que há um aumento na probabilidade de abertura do canal com a aplicação de pressão, ou seja, sua abertura depende de estiramento da membrana. Diferentes tipos desses canais já foram identificados em vários tipos de músculo liso (vias aéreas, trato gastrintestinal, músculo liso vascular) com diferentes permeabilidades iônicas (Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , Na^+) (GUIBERT; DUCRET; SAVINEAU, 2008).

Outra importante porta de entrada para o Ca^{2+} que vem do meio extracelular são os Ca_v , os quais estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (CATERRAL, 2000; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). São canais iônicos protéicos formados por 4 ou 5 subunidades distintas: a subunidade α_1 , que é a maior delas e constitui o poro do canal, além de possuir o sensor de voltagem que controla sua abertura; a subunidade α_2 que esta ligada a subunidade γ e a subunidade β que é intracelular (CATTERALL et al., 2005).

Pelo menos 10 tipos diferentes de Ca_v subdivididos em três grandes famílias foram até agora descritos: (1) sensíveis a di-hidropiridina e ativados por alta voltagem [Ca_v1 (tipo L)]; (2) insensíveis a di-hidropiridina e ativados por alta voltagem, Ca_v2 (tipos N, P/Q e R); e (3) ativados por baixa voltagem [Ca_v3 (tipo T)], (ERTEL et al., 2000; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). Os Ca_v1 são amplamente expressos no corpo humano (músculo cardíaco, músculo liso, células endócrinas e neurônios) (CATERRALL et al., 2005) e sensíveis a despolarização de membrana em muitos processos celulares essenciais, incluindo ativação da transcrição (DOLMETSCH et al., 2001), exocitose (ARTALEJO; ADAMS; FOX, 1994), contração muscular (CLEEMANN; MORAD, 1991; LOPEZ-LOPEZ et al., 1995), entre outros.

Os Ca_v1 são os principais, e muitas vezes o único tipo de canal de Ca^{2+} expresso em muitos músculos lisos (THORNELOE; NELSON, 2005; WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005). Outro tipo de canal Ca_v envolvido com funções fisiológicas da contração do músculo liso é o $\text{Ca}_v3.2$ ou $\text{Ca}_v\text{-T}$ (SARSERO et al., 1998; CATERRALL et al., 2005).

A subunidade α_1 dos Ca_v é a formadora do poro e fornece o sítio de ligação extracelular para praticamente todos os agonistas e antagonistas, como é o

caso dos derivados di-hidropiridínicos a exemplo do agonista desses canais Bay K8644 (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007).

Os canais de cálcio e potássio estão intimamente relacionados com a regulação do músculo liso (WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005). O movimento dos íons K^+ através de canais localizados na membrana celular regula o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v (THORNELOE; NELSON, 2005).

Os canais de potássio desempenham um papel chave na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular, sendo a contração no músculo liso dependente do balanço entre a ativação desses canais, levando a uma hiperpolarização, e o bloqueio dos mesmos, levando a uma despolarização (KNOT et al., 1996).

Os ativadores de canais de K^+ (cromacalim) são substâncias que incluem um grupo de diversas moléculas com um largo potencial terapêutico (QUEST, 1992; EMPFIELD; RUSSELL; TRAINOR, 1995). Estes compostos ativam os canais de K^+ , causando hiperpolarização de membrana através do aumento do efluxo de K^+ , desta forma causando diminuição do Ca^{2+} intracelular livre e consequente relaxamento do músculo liso (QUEST; COOK, 1989; WESTON; EDWARDS, 1992).

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

Os canais de K^+ ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}) são classificados em 8 tipos (1.1; 2.1-2.3; 3.1; 4.1-4.2 e 5.1), de acordo com a condutância, cinética e farmacologia. O $K_{Ca1.1}$ refere-se a nomenclatura anterior BK_{Ca} , os K_{Ca2} dizem respeito aos SK_{Ca} e os canais $K_{Ca3.1}$ correspondem aos IK_{Ca} (GUTMAN et al., 2011b). Esses canais contribuem para a repolarização do potencial de ação (SAH; FABER, 2002), onde os K_{Ca2} são bloqueados por apamina, os $K_{Ca3.1}$ são bloqueados pelo clotrimazol e os $K_{Ca1.1}$ são bloqueados por toxinas, como caribdotoxina e iberiotoxina, ou por baixas concentrações de TEA^+ . Os canais do tipo

SK_{Ca} e IK_{Ca} são insensíveis à voltagem e ativados por baixa concentração de Ca²⁺ intracelular (< 1,0 μM), em contraste aos BK_{Ca} que são ativados tanto por voltagem como por Ca²⁺ (WEI, et al., 2005).

Até o presente momento já foram identificados 12 tipos de canais K_v (1.1-1.8; 2.1, 2.2; 3.1-3.4; 4.1-4.3; 5.1; 6.1-6.4; 7.1-7.5; 8.1, 8.2; 9.1-9.3; 10.1, 10.2; 11.1-11.3; 12.1-12.3) (GUTMAN et al., 2011a). Esses canais são amplamente expressos na maioria das células do músculo liso vascular. Ativados por despolarização de membrana, promovem efluxo de K⁺, o qual em parte, é responsável por repolarização de membrana e manutenção do potencial de repouso (KO et al., 2010).

Os K_{ATP} são canais iônicos seletivos a passagem do íon K⁺ e ativados por redução na concentração intracelular de ATP. Esses canais estão envolvidos na manutenção do tônus basal e do potencial de repouso da membrana no músculo liso. Estudos demonstram que o bloqueio desses canais, por drogas como a glibenclamida, aumenta o tônus muscular e causa despolarização em músculo liso vascular (NELSON et al., 1990). Esses canais foram inicialmente identificados em miócitos ventriculares (NOMA, 1983). Posteriormente, os K_{ATP} com características semelhantes foram demonstrados em muitos outros tecidos, tais como, células β-pancreáticas, músculo esquelético, neurônios e músculos lisos (TERAMOTO, 2006).

Os K_{ATP} são conhecidos por estarem envolvidos no diabetes, onde o bloqueio dos mesmos por drogas como glibenclamida e tolbutamida é útil no tratamento do diabetes tipo II (KO et al., 2008).

Os K_{ir} são subdivididos em 7 tipos de canais (K_{ir} 1.1; 2.1, 2.2, 2.3, 2.4; 3.1, 3.2, 3.3, 3.4; 4.1, 4.2; 5.1; 6.1, 6.2; 7.1) (ADELMAN et al., 2011) e estão envolvidos com o potencial de repouso e o tônus basal em células musculares lisas de vasos de resistência (KO et al., 2008). Esses canais são bloqueados pelo íon Ba²⁺ (ADELMAN et al., 2011).

Vários estudos têm relatado uma via alternativa que contribui para a contração no músculo liso, a modulação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), principalmente pela pequena proteína ligante de GTP (RhoA), e a sua

cinase associada (ROK), uma proteína cinase serina/treonina (KARAKI et al., 1997; HORI; KARAKI, 1998). Vários agonistas contráteis que aumentam a $[Ca^{2+}]_c$ via GPCRs (principalmente aqueles receptores acoplados as proteínas $G_{12,13}$ ou G_q), levam a ativação direta ou indireta do fator trocador de nucleotídeo de guanina da RhoA (RhoGEF), que é capaz de ativar a RhoA, por trocar GDP por GTP nessa proteína (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A RhoA-GTP ativa sua cinase associada, a ROK, essa, por sua vez, fosforila a MLCP, tornando-a inativa (KIMURA et al., 1996). Assim, a fosforilação da MLC induzida pela MLCK torna-se ainda mais efetiva, auxiliando na contração do músculo liso.

O relaxamento no músculo liso ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de uma substância que estimula a inibição do mecanismo contrátil (MORGAN, 1990). Independentemente, o processo requer uma diminuição da concentração citoplasmática de Ca^{2+} ou aumento da atividade da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) (SOMLYO et al., 1999).

Em músculo liso vascular o relaxamento ocorre através de mecanismos dependentes ou independentes de endotélio. A vasodilatação dependente de endotélio envolve a participação de óxido nítrico (NO), prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE) (NAGAO; VANHOUTTE, 1993; MITCHELL et al., 2008). Com relação ao vasorrelaxamento independente de endotélio existem vários mecanismos que podem estar envolvidos, como bloqueio do influxo de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} transmembranares, inibição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares mediada por agonistas, inibição de algumas etapas do processo contrátil induzida pela ativação da PKC, abertura de canais de K^+ , ativação direta da ciclase de guanilil solúvel, processos esses que levam a inibição do processo de contração (CHEN et al., 2009).

O relaxamento da traqueia também envolve mecanismos dependentes e independentes de epitélio. O NO e a PGE_2 são considerados importantes fatores relaxantes derivados do epitélio (FRDEp) (FARMER et al., 1987; NIJKAMP; VAN; FOLKERTS, 1993) e a via de relaxamento independente de epitélio ocorre de forma semelhante ao mecanismo de relaxamento dos vasos sanguíneos.

O NO ativa diretamente uma ciclase de guanilil solúvel, mas agonistas que induzem relaxamento ao se ligarem aos seus receptores ativam diretamente as ciclasas de guanilil (CG) e de adenilil (CA) particuladas, resultando na formação do monofosfato de guanosina cíclico (GMP_c) e AMP_c, respectivamente. O aumento na concentração de GMP_c ([GMP_c]) e/ou AMP_c ativam as proteínas cinase G (PKG) e/ou proteína cinase A (PKA) resultando na ativação de canais de K⁺ na membrana plasmática e consequente hiperpolarização. A hiperpolarização reduz o influxo de Ca²⁺ através dos Ca_v1, diminuindo, portanto a [Ca²⁺]_c (REMBOLD, 1996). As PKG e/ou PKA fosforilam a Ca²⁺ – ATPase do RS (SERCA) e/ou da membrana plasmática (PMCA), aumentando sua cinética de ativação levando a um aumento do sequestro e da extrusão de Ca²⁺, respectivamente, diminuindo assim a [Ca²⁺]_c; diminuição da formação do IP₃ e consequente diminuição da liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares; redução da [Ca²⁺]_c via AMP_c/PKA por diminuir o influxo de Ca²⁺ indiretamente, por hiperpolarização, ou por agir diretamente nos Ca_v do tipo L inativando-os e diminuição da [Ca²⁺]_c por ativação do trocador Na⁺/Ca²⁺ (BLAUSTEIN, 1989).

O FHDE se refere às vias de sinalização envolvidas na comunicação entre as células endoteliais e os miócitos dos vasos sanguíneos, promovendo o processo de hiperpolarização na célula muscular do vaso. As investigações sobre as substâncias e vias de sinalização envolvidas nesse processo se encontram bastante avançadas.

Atualmente, existem duas grandes vias de sinalização para explicar a ação do FHDE. A via clássica envolve a ativação dos canais SK_{Ca} e IK_{Ca} no endotélio resultando em hiperpolarização das células endoteliais a qual pode ser transmitida para os miócitos através das junções comunicantes, sem o envolvimento de qualquer fator. Além disso, o K⁺ pode sair da célula endotelial através dos canais K_{Ca} e ativar canais K_{ir} e ou Na⁺/K⁺-ATPases presentes no endotélio e nos miócitos. A segunda via de sinalização não envolve hiperpolarização das células endoteliais, mas está associada com a liberação dependente de cálcio de várias substâncias, incluindo NO, prostaciclina e ácidos epoxieicosatrienoicos, os quais ativam K_{ATP} ou BK_{Ca} nos miócitos. Independente da via envolvida, esses processos promovem

vasodilatação. Alterações nas vias de sinalização dos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio estão implicados em patologias como a hipertensão e diabetes (EDWARDS; FÉLÉTOU; WESTON, 2010).

O relaxamento do músculo liso de forma independente de endotélio, pode ocorrer através da inibição de enzimas chamadas de fosfodiesterases, que são enzimas capazes de romper a ligação fosfodiéster do AMPc e GMPc produzindo AMP-5' e GMP-5' (BENDER; BEAVO, 2006), quando a ligação fosfodiéster é rompida esses nucleotídeos cíclicos perdem suas atividades farmacológicas. Até o presente momento foram descritas 11 isoformas de PDEs, de acordo com a sequência dos aminoácidos que formam as proteínas, sensibilidade para inibidores seletivos e distribuição tecidual (BEAVO, 1995; LUGNIER, 2006) (Quadro 1).

Quadro 1 - Classificação das isoformas de fosfodiesterases (PDEs)

Família	Substrato	Distribuição	Inibidor específico
PDE1	AMPc e GMPc	Cérebro	Nimodipina
PDE2	AMPc e GMPc	Coração, medula adrenal, cérebro e fígado	EHNA
PDE3	AMPc e GMPc	Coração, plaquetas, músculo liso vascular, tecido adiposo e fígado	Cilostamina e milrinona
PDE4	AMPc	Cérebro, células inflamatórias, tecido cardiovascular e músculo liso	Rolipram
PDE5	GMPc	Pulmões, coração e vasos sanguíneos	Zaprinast e sildenafil
PDE6	GMPc	Cérebro	Zaprinast e sildenafil
PDE7	AMPc	Músculo esquelético, linfócitos, células endoteliais, cérebro, músculo liso vascular e vias aéreas	BRL 50481
PDE8	AMPc	Testículo, olhos, fígado, músculo esquelético, coração, rins, ovário e cérebro	Desconhecido
PDE9	GMPc	Rins, pulmões e cérebro	Desconhecido
PDE10	AMPc e GMPc	Pulmões e cérebro	Desconhecido
PDE11	AMPc e GMPc	Músculo esquelético, próstata, rins, fígado, pituitária, glândulas salivares e testículo	Desconhecido

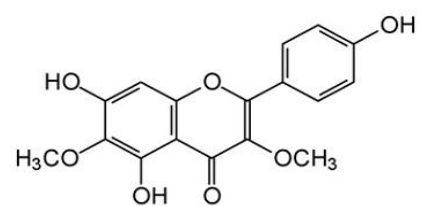
Adaptado de LUGNIER, 2006

Os inibidores de PDE apresentam várias atividades farmacológicas, dependendo do subtipo e localização da enzima envolvida, cardiotônico,

vasodilatador, relaxante de músculo liso, antidepressivo, antitrombótico, broncodilatador, anti-inflamatório, antioxidante, aumento da função cognitiva (JEON et al., 2005; ROJA et al., 2010). Como consequência dessas atividades farmacológicas essas substâncias podem ser utilizadas na terapêutica para o tratamento de diversas enfermidades, como: demência, depressão, esquizofrenia, insuficiência cardíaca congestiva, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, diabetes, artrite reumatoide, esclerose múltipla, disfunção erétil, hipertensão pulmonar (HOOD, 1989; AMSALLENE, 2005; ROJA et al., 2010).

Em levantamento bibliográfico, foram encontrados vários estudos biológicos envolvendo os flavonoides. No entanto, nenhum efeito hemolítico e espasmolítico foram relatados para o flavonoide 3,6-dimetil éter galetina. Diante disso, decidiu-se fazer uma investigação farmacológica visando avaliar uma possível atividade hemolítica, bem como espasmolítica do flavonoide 3,6-dimetil éter galetina em diferentes modelos de músculos liso (íleo e traqueia de cobaia, útero de rata e aorta de rato), e caso esse flavonoide venha a apresentar atividade espasmolítica, elucidar seu mecanismo de ação. A partir da realização desses estudos estaremos colaborando com o desenvolvimento da farmacologia, seja ampliando os conhecimentos sobre a espécie *P. stipulacea*, seja contribuindo para o desenvolvimento de uma futura ferramenta farmacológica ou medicamento.

2 Objetivos



2.1 Objetivo geral

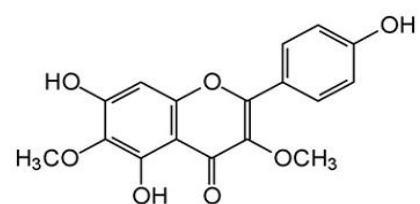
Contribuir para aumentar o conhecimento sobre a espécie *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke e as atividades farmacológicas dos flavonoides, através da investigação da ação espasmolítica e do mecanismo de ação do flavonoide isolado dessa espécie, 3,6-dimetil éter galetina (FGAL), em útero de rata, aorta de rato, íleo e traqueia de cobaia.

2.2 Objetivos específicos

Investigar as possíveis atividades farmacológicas de FGAL:

- ✓ Hemolítica e anti-hemolítica em eritrócitos de rato;
- ✓ Espasmolítica em útero de rata, aorta de rato, íleo e traqueia de cobaia;
- ✓ Participação dos canais de cálcio e/ou de potássio em traqueia e aorta;
- ✓ Determinação do(s) subtipo(s) de canal(is) de cálcio e/ou potássio em traqueia e aorta;
- ✓ Envolvimento na liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático em aorta;
- ✓ Investigação da participação da via dos nucleotídeos cíclicos em traqueia e aorta;
- ✓ Envolvimento da PKC em aorta.

3 Material e métodos



3.1 MATERIAL

3.1.1 Material vegetal

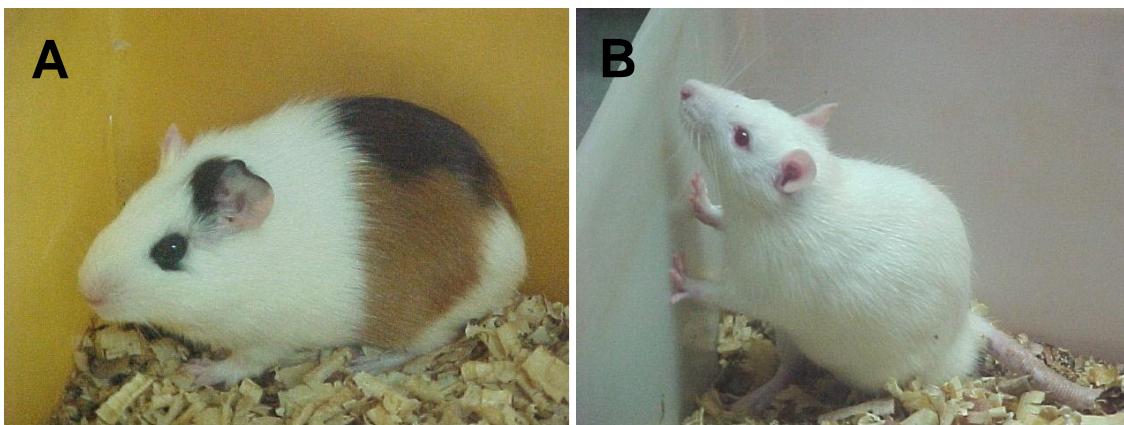
A espécie *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke foi coletada no município de Serra Branca, estado da Paraíba, em abril de 2005. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do setor de botânica do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Uma exsicata da planta se encontra depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) sob código de identificação AGRA 3331 (JPB).

3.1.2 Animais

Foram utilizados cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os gêneros, pesando entre 300 e 500 g, ratas virgens e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 150-250 e 250-350 g, respectivamente, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba (PPGPNSB/UFPB).

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Purina) com livre acesso a água, com ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) controladas e constantes, os quais eram submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h sendo o período claro das 06:00 às 18:00 h.

Para os experimentos *in vitro* em nível funcional, todos os animais eram sacrificados seguindo os princípios de cuidados com animais aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA/PPGPNSB/UFPB), certidão número 0105/10.

Figura 3 - Fotos de *Cavia porcellus* (A) e *Rattus norvegicus* (B)

RIBEIRO, 2007

3.1.3 Substâncias e sais

Quadro 2 - Substâncias, sais e fornecedores

Nome	Fornecedor
Ácido araquidônico (AA), ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), aminofilina, apamina, cloreto de bário (BaCl_2), cremofor [®] , dietilestilbestrol, diidrocloridrato de histamina, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), glibenclamida, tetraetilamônio (TEA^+), triton X-100, verapamil	Sigma-Aldrich (EUA)
Etanol	Reagen (Brasil)
4-aminopiridina (4-AP)	INLAB (Brasil)
Bicarbonato de sódio (NaHCO_3), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de sódio (NaCl)	Fmaia (Brasil)
Carbogênio (95 % de O_2 e 5 % de CO_2)	White Martins (Brasil)
Cloreto de cálcio bi-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glicose, sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Vetec (Brasil)
Cloridrato de acetilcolina (ACh) e cloridrato de carbamilcolina	Merck (Alemanha)

(carbacol)	
Cloridrato de L(-)-fenilefrina (FEN)	Pfizer (EUA)
Fosfato monobásico de potássio ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e fosfato monobásico de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Nuclear (Brasil)
Milrinona	Sanofi-Aventis Farmacêutica (Brasil)
Ocitocina	Eurofarma (Brasil)
Sildenafil	Nutrifarm (Brasil)

MACÊDO, 2012

As partes aéreas de *P. stipulacea* foram secas, moídas e extraídas a frio com etanol, obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB), que após extração líquido/líquido com solventes orgânicos obteve-se as fases hexânica, clorofórmica e acetato de etila. A fase clorofórmica foi submetida à cromatografia em coluna de fase normal, fornecendo o flavonoide 4',5,7-triidroxi-3,6-dimetoxiflavona (3,6-dimetil éter galetina ou FGAL) (Esquema 1). A estrutura química dessa substância foi identificada por técnicas de RMN ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e por comparação com dados na literatura, onde FGAL possui peso molecular de 294 u.m.a. (LIRA, 2009).

3.1.4 Soluções nutritivas

De acordo com os experimentos realizados, foram utilizadas soluções nutritivas, cujas composições estão descritas a seguir, onde essas soluções foram preparadas com água destilada e tiveram seu pH ajustado para 7,4 com NaOH (0,1 N) ou HCl (0,1 N).

Solução de Krebs (mM): NaCl (118), KCl (4,6), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,7), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,1), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,5), glicose (11), NaHCO_3 (25)

Solução de Krebs modificado (mM): NaCl (117), KCl (4,7), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,3), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,2), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,5), glicose (11), NaHCO_3 (25)

Solução de Locke Ringer (mM): NaCl (154), KCl (5,6), MgCl_2 (2,1), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,2), glicose (5,9), NaHCO_3 (5,5)

Solução de Krebs despolarizante com 18 mM de KCl (mM): NaCl (104,5), KCl (18), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,7), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,1), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,5), glicose (11), NaHCO_3 (25)

Solução de Krebs despolarizante com 30 mM de KCl (mM): NaCl (92,5), KCl (30), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,7), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,1), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,5), glicose (11), NaHCO_3 (25)

Solução de Krebs despolarizante com 60 mM de KCl (mM): NaCl (62,5), KCl (60), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,7), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,1), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,5), glicose (11), NaHCO_3 (25)

Solução de Krebs despolarizante com 80 mM de KCl (mM): NaCl (42,5), KCl (80), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,7), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,1), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,5), glicose (11), NaHCO_3 (25)

Solução de Krebs despolarizante e nominalmente sem Ca^{2+} (mM): NaCl (42,5), KCl (80), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,7), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,1), glicose (11), NaHCO_3 (25)

Solução de Krebs despolarizante e livre de Ca^{2+} (mM): NaCl (42,5), KCl (80), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,7), $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,1), glicose (11), NaHCO_3 (25), EDTA (3,0)

3.1.5 Preparação das soluções-estoque das substâncias em estudo

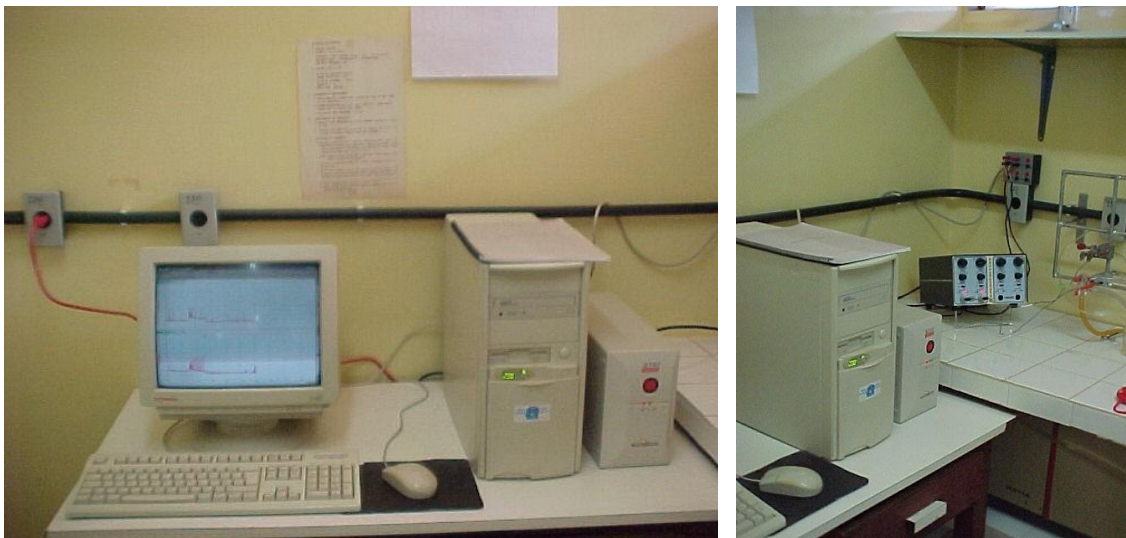
FGAL foi dissolvido em cremofor[®] formando uma solução de concentração de 10^{-2} M (solução-estoque), que foi estocada a -20°C , sendo diluída em água destilada de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental.

A concentração final de cremofor[®] nas cubas nunca excedeu 0,01 % (v/v), nesta concentração o cremofor[®] é desprovido de efeito contrátil ou relaxante.

Os bloqueadores e inibidores utilizados foram dissolvidos em água destilada exceto o ácido araquidônico, glibenclamida e o dietilestilbestrol que foram dissolvidos em etanol PA (95 %), de acordo com as recomendações dos fornecedores. As soluções-estoque na concentração de 10^{-2} M foram armazenadas a -20°C , sendo diluídas com água destilada para obtenção da concentração desejada, imediatamente antes dos protocolos experimentais e conforme a necessidade desses protocolos.

3.1.6 Aparelhos

As contrações isométricas eram registradas através de transdutores de força modelo FORT-10 conectados a um amplificador modelo TMB4M (ambos da World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA), que por sua vez estava conectado a uma placa conversora analógico/digital instalada em um microcomputador rodando o programa BioMed[®] versão Rv2 (BioData, João Pessoa, PB, Brasil) (Figura 4).

Figura 4 - Fotos do sistema de aquisição de dados digital

Ribeiro, 2007.

Os valores do pH eram aferidos através de um pHmetro digital modelo PG 2000 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

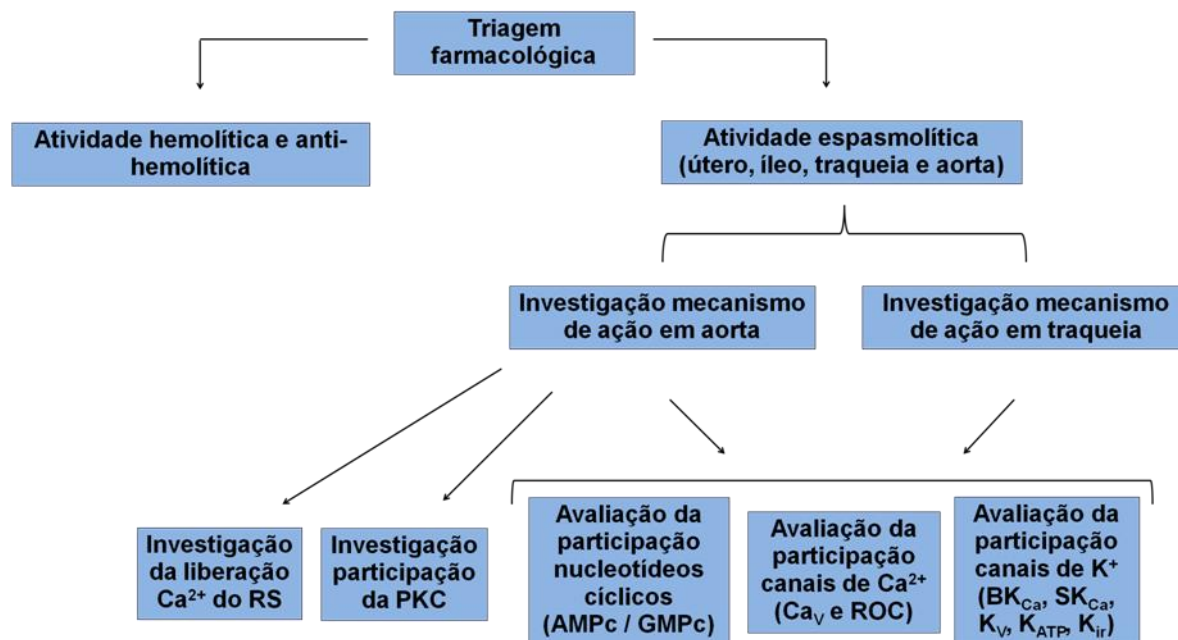
A temperatura das cubas era controlada por uma bomba termostática modelo Polystat 12002 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA).

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

3.2 MÉTODOS

O desenvolvimento da metodologia empregada consta de uma triagem farmacológica inicial das atividades hemolítica e anti-hemolítica, além da investigação espasmolítica em útero de rata, íleo e traqueia de cobaia e aorta de rato. Em seguida, realizou-se a investigação do mecanismo de ação espasmolítico em traqueia e aorta (Esquema 2).

Esquema 2 - Fluxograma da metodologia utilizada nos ensaios farmacológicos.



3.2.1 Avaliação citotóxica de FGAL em eritrócitos de rato

3.2.1.1 Efeito hemolítico de FGAL em eritrócitos de rato

Esse procedimento seguiu a metodologia descrita por Rangel et al. (1997). Os ratos pesando entre 250 e 350 g eram mantidos em jejum por um período de 12 horas, tendo acesso à água *ad libitum* antes do início dos experimentos. Após este período uma amostra de sangue era coletada, em torno de 8 mL, através de uma punção cardíaca e imediatamente misturada com 5 gotas de heparina sob agitação lenta e constante para evitar coagulação. Em seguida, esse sangue era adicionado a tubos de centrífuga na proporção de 5 mL de sangue com 5 mL de solução de NaCl 0,9% e centrifugada a 5000 rpm durante 3 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento era repetido mais duas vezes e o sedimento da última centrifugação era ressuspenso a 0,5% em solução de NaCl (0,9%). FGAL era adicionado a 4 mL da suspensão de eritrócitos nas concentrações de 3×10^{-5} e 10^{-4} M. O controle negativo era montado com suspensão de eritrócitos mais NaCl (em torno de 0% de hemólise) e o controle positivo com suspensão de eritrócitos mais 100 μ L de Triton X-100 a 1% (100% de hemólise). As amostras eram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação lenta e constante. Decorrido este tempo eram centrifugadas a 5000 rpm durante 3 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria a 540 nm e expressa em absorbância, que é diretamente proporcional a taxa de hemólise.

3.2.1.2 Efeito anti-hemolítico de FGAL em eritrócitos de rato

Os eritrócitos eram obtidos conforme descrito no item 3.2.1.1. Em seguida, esses eritrócitos eram adicionados a 4 mL de soluções de NaCl com concentrações diferentes (0,12; 0,36; 0,6 e 0,9%), variando de um meio hipotônico (NaCl 0,12%) a meios isotônicos (NaCl 0,36; 0,6 e 0,9%) na ausência e presença de FGAL 3×10^{-5} e 10^{-4} M. O controle era montado com suspensão de eritrócitos mais NaCl. As amostras eram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação

lenta e constante. Decorrido este tempo eram centrifugadas a 5000 rpm durante 3 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria a 540 nm e expressa em absorbância, sendo a absorbância diretamente proporcional à intensidade de hemólise.

3.2.2 Triagem farmacológica

3.2.2.1 Efeito de FGAL frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou carbacol em útero isolado de rata

O animal foi tratado 24 horas antes com dietilestilbestrol (0,1 mg/kg) via subcutânea para indução do estro. Após este período os animais eram eutanasiados por deslocamento cervical seguido de secção dos vasos. Aberta a cavidade abdominal, fazia-se a dissecação do útero colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Locke Ringer a 32° C sob aeração com carbogênio. Em seguida, os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos individualmente em cubas de vidro (5 mL) através de um fio de algodão, sob tensão de 1,0 grama. Para estabilização da preparação, esta era mantida em repouso por 40 minutos antes do contato com qualquer agente. Durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 10 minutos. Após o período de estabilização eram induzidas duas contrações isotônicas de magnitude similares com ocitocina (10^{-2} UI/mL) ou com carbacol (10^{-5} M), sendo a segunda contração induzida após o retorno da primeira contração ao tônus basal, em concentrações sub-máximas (controle). Após o retorno da segunda contração ao tônus basal, FGAL era incubado por 15 minutos em preparações diferentes, e na presença desse, era induzida uma terceira contração utilizando um dos agonistas. A inibição da contração foi avaliada por comparação das respostas antes (controle, 100%) e após a adição de FGAL à cuba.

A CI_{50} (concentração de uma substância que inibe 50 % do efeito máximo produzido por um agonista) era obtida em cada um dos experimentos, calculados pelo uso da regressão não linear e expressos como $CI_{50} \pm \text{e.p.m.}$

3.2.2.2 Efeito de FGAL frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou histamina em íleo isolado de cobaia

O animal era mantido em jejum por um período de 18 horas (dando-lhe somente água nesse período) e eutanasiado por deslocamento cervical seguido por secção dos vasos. O abdômen era aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento foi retirado e colocado em solução nutritiva de Krebs modificada a 37 °C sob aeração com carbogênio. Após cuidadosa dissecação, o segmento do íleo era seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, suspensos individualmente em cubas de vidro (5 mL) por fios de algodão, sob uma tensão de 1 grama e deixados em repouso por 30 minutos, tempo necessário para perfeita estabilização da preparação. Durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 15 minutos. Após a estabilização do tecido, eram obtidas duas contrações isotônicas de magnitude similares (controle), induzidas por concentrações submáximas de carbacol ou de histamina (10^{-6} M), sendo a segunda contração induzida após o retorno da primeira contração ao tônus basal, em preparações diferentes. Após o retorno da segunda contração ao tônus basal, FGAL era incubado por 15 minutos e na presença deste, induzida uma terceira contração utilizando um dos agonistas.

A CI_{50} foi obtida em cada um dos experimentos, calculados pelo uso da regressão não linear e expressos como $CI_{50} \pm e.p.m.$

3.2.2.3 Efeito de FGAL sobre o tônus basal e sobre a traqueia de cobaia pré-contráida com carbacol

Os cobaias eram eutanasiados por concussão cerebral seguida por secção dos vasos cervicais. O tórax do cobaia era aberto e dissecado, a traqueia foi retirada e limpa de todo o tecido conjuntivo e adiposo. O órgão era dividido em segmentos, contendo 3-4 anéis de cartilagem cada. Esses segmentos eram suspensos individualmente por hastes de aço inoxidável em cubas de vidro (5 mL)

contendo solução nutritiva de Krebs e sob tensão de 1 g. Estes tecidos eram mantidos a uma temperatura de 37° C, aerados com carbogênio, e permaneciam em repouso durante 1 hora, sendo a solução trocada a cada 15 min. Após o período de estabilização, uma primeira contração foi induzida pela adição de 10^{-6} M de carbacol (CCh) à cuba.

A integridade do epitélio da traqueia era verificada pela adição de ácido araquidônico (AA) à cuba na concentração de 10^{-4} M (TSCHIRHART et al., 1987) durante a fase tônica da primeira resposta induzida por carbacol, onde anéis que obtiveram relaxamentos superiores a 50 % (em relação a força de contração inicial) eram considerados com epitélio funcional. Anéis de traqueia sem epitélio eram obtidos através da retirada do mesmo por atrito do lúmen do órgão com uma haste envolta em algodão e embebida com solução de Krebs. A retirada do epitélio foi confirmada pela ausência de relaxamento em resposta à adição de AA à cuba ou quando este relaxamento foi inferior a 10 %, sendo este anel considerado sem epitélio funcional. Em seguida as soluções de banho eram trocadas, sendo as preparações lavadas a cada 15 min com solução de Krebs durante um período total de 30 min. FGAL foi adicionado à cuba durante o tônus basal na concentração de 10^{-5} M ou durante a fase tônica sustentada da segunda curva concentração-resposta ao CCh (o qual permanecerá em contato com o órgão desde a indução da contração até o E_{\max} induzido por FGAL) de maneira cumulativa e nas concentrações de (10^{-8} - 3×10^{-5} M). O relaxamento produzido por FGAL era expresso como a percentagem reversa da força de contração inicial produzida pelos agentes contráteis.

Os valores de pD_2 (logaritmo negativo da CE_{50}) foram expressos como a média \pm e.p.m. dos valores individuais de pD_2 , obtidos a partir dos valores de CE_{50} (concentração de uma substância que produz 50 % de seu efeito máximo) e calculados pelo uso da regressão não linear de cada curva concentração-resposta de relaxamento para FGAL de cada um dos experimentos.

3.2.2.4 Efeito de FGAL sobre o tônus basal e sobre a aorta de rato pré-contráida com fenilefrina

Os ratos eram eutanasiados por deslocamento cervical seguido por secção dos vasos cervicais. O tórax do animal era aberto e dissecado, a aorta torácica era retirada cuidadosamente e anéis aórticos de 3-5 mm eram obtidos livres de tecido conjuntivo e adiposo. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis eram suspensos individualmente por hastes de aço inoxidável conectadas a transdutores de força, em cubas de vidro (5 mL) contendo solução de Krebs à 37 °C e aerados com mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂). Os anéis aórticos eram deixados por um período de 1 hora em repouso, durante o qual eram mantidos sob uma tensão inicial de 1 g. Durante esse período, a solução nutritiva era renovada a cada 15 min para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização, era induzida uma contração com FEN na concentração de 3×10^{-7} M. A integridade do endotélio vascular era verificada pela adição de ACh (10^{-6} M) à cuba durante a fase tônica da primeira contração induzida por FEN (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Anéis sem endotélio funcional eram obtidos pela remoção mecânica da camada endotelial, através do atrito provocado pela haste metálica em contato com a parede interna do vaso. O endotélio vascular era considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentavam relaxamento induzido por ACh igual ou superior a 50 % (em relação à força máxima da contração inicial) e a retirada do endotélio era confirmada quando não havia relaxamento, ou esse era inferior a 10 %. Em seguida, as preparações eram lavadas a cada 15 min durante um período total de 30 min, e então uma segunda contração era induzida pela adição de 3×10^{-7} M de FEN. FGAL foi adicionado à cuba durante o tônus basal na concentração de 10^{-5} M ou durante a fase tônica da segunda contração induzida por FEN (a qual permanecerá em contato com o órgão desde a indução da contração até o E_{\max} induzido por FGAL) de maneira cumulativa (10^{-8} - 3×10^{-5} M), sendo avaliado o seu efeito.

Os valores de pD_2 (logaritmo negativo da CE_{50}) foram expressos como a média \pm e.p.m. dos valores individuais de pD_2 , obtidos a partir dos valores de CE_{50} (concentração de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo) e calculados pelo uso da regressão não linear de cada curva concentração-resposta de relaxamento para FGAL de cada um dos experimentos.

3.2.3 Investigação do mecanismo de ação de FGAL em traqueia de cobaia

3.2.3.1 Avaliação da participação dos canais de K^+ e de Ca^{2+}

3.2.3.1.1 Efeito de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 18 ou 60 mM de KCl em traqueia de cobaia

A traqueia era montada como descrito no item 3.2.2.3, e após o período de estabilização, era induzida uma contração com 10^{-6} M de CCh ou com 60 mM de KCl. Após 30 minutos decorridos da primeira contração, uma segunda resposta contrátil era induzida por 30 ou 80 mM de KCl. Durante a fase tônica sustentada dessa segunda contração, FGAL era adicionado à cuba em concentrações cumulativas de 10^{-8} a 10^{-3} M (RAEBURN; GIEMBYCZ, 1995). O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por KCl e os valores de E_{max} de FGAL foram obtidos para contrações induzidas por 30 ou 80 mM de KCl. Os valores de pD_2 de FGAL foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, nas contrações induzidas por KCl 18 mM ou 60 mM.

3.2.3.2 Investigação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia

3.2.3.2.1 Efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia pré-contraída com CCh na ausência e presença de TEA⁺ (10 mM)

A traqueia era montada segundo o descrito no item 3.2.2.3, e após os procedimentos iniciais, era adicionado à cuba 10 mM de TEA⁺, o qual nessa concentração é usado como bloqueador não seletivo de canais de K⁺ (NIU et al., 2008), por um período de 20 min e uma nova contração com CCh (10⁻⁶ M) era induzida ainda na presença desse bloqueador. Durante a fase tônica sustentada dessa segunda contração FGAL era adicionada à cuba de maneira cumulativa. Simultaneamente eram realizados experimentos onde não havia a pré-incubação da preparação com o bloqueador (controle). O relaxamento produzido por FGAL foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de pD₂ de FGAL foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na presença e na ausência de 10 mM de TEA⁺.

3.2.3.2.2 Efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia pré-contraída com CCh na ausência e presença de vários bloqueadores de canais de K⁺

A traqueia era montada segundo o descrito no item 3.2.2.3, e após os procedimentos iniciais, era adicionado à cuba, em experimentos independentes, 1 mM de TEA⁺, o qual nessa concentração é usado como um bloqueador dos BK_{Ca} (NIU et al., 2008); 3 x 10⁻⁶ M de glibenclamida, um bloqueador dos K_{ATP} (MISHRA; AARONSON, 1999); 3 mM de 4-AP, um bloqueador seletivo dos K_V (COLE et al., 1996); 10⁻⁴ M de BaCl₂, um bloqueador seletivo dos K_{ir} (ORIE et al., 2006); 5 x 10⁻⁸ M de apamina, um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} (VAN DER STAAY et al., 1999); por um período de 20 min e uma nova contração com CCh (10⁻⁶ M) era induzida ainda na presença desses bloqueadores. Durante a fase tônica sustentada dessa segunda

contração FGAL era adicionada à cuba de maneira cumulativa. Simultaneamente eram realizados experimentos onde não havia a pré-incubação da preparação com os bloqueadores (controle). O relaxamento produzido por FGAL foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de pD_2 de FGAL foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na presença e na ausência dos bloqueadores.

3.2.3.3 Avaliação da participação de nucleotídeos cíclicos no efeito relaxante de FGAL em traqueia isolada de cobaia

3.2.3.3.1 Efeito relaxante de aminofilina na ausência e presença de FGAL

A traqueia era montada segundo o descrito no item 3.2.2.3, e após os procedimentos iniciais, FGAL era pré-incubado na concentração de 3×10^{-6} M, por um período de 15 min e uma nova contração com CCh (10^{-6} M) era induzida. Durante a fase tônica sustentada dessa segunda contração aminofilina, um inibidor inespecífico de PDE era adicionada à cuba de maneira cumulativa. Simultaneamente eram realizados experimentos onde não havia a pré-incubação de FGAL. O relaxamento produzido pela aminofilina foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de pD_2 de aminofilina foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na presença e na ausência de FGAL.

3.2.4 Investigação do mecanismo de ação de FGAL em aorta de rato

3.2.4.1 Avaliação da participação dos canais de K⁺ e de Ca²⁺

3.2.4.1.1 Efeito de FGAL sobre a aorta de rato pré-contraída com 30 ou 80 mM de KCl

A aorta era montada como descrito no item 3.2.2.4, e após o período de estabilização, era induzida uma contração com fenilefrina na concentração sub-máxima de 3×10^{-7} M. Após 30 minutos decorridos da primeira contração, uma segunda resposta contrátil era induzida por 30 ou 80 mM de KCl. Durante a fase tônica sustentada dessa segunda contração, FGAL era adicionado à cuba em concentrações cumulativas de 10^{-8} a 10^{-3} M (GURNEY, 1994). O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por KCl e os valores de E_{\max} de FGAL foram obtidos para contrações induzidas por 30 ou 80 mM de KCl. Os valores de pD_2 de FGAL foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, nas contrações induzidas por 30 ou 80 mM de KCl.

3.2.4.2 Investigação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante de FGAL em aorta isolada de rato

3.2.4.2.1 Efeito relaxante de FGAL em aorta de rato pré-contraída com FEN na ausência e presença de TEA⁺ (10 mM)

A aorta era montada segundo o descrito no item 3.2.2.4, e após os procedimentos iniciais, era adicionado à cuba 10 mM de TEA⁺, o qual nessa concentração é usado como bloqueador não seletivo de canais de K⁺ (NIU et al., 2008), por um período de 20 min e uma nova contração com fenilefrina (3×10^{-7} M) era induzida ainda na presença desse bloqueador. Durante a fase tônica sustentada dessa segunda contração FGAL era adicionado à cuba de maneira cumulativa.

Simultaneamente eram realizados experimentos onde não havia a pré-incubação da preparação com o bloqueador (controle). O relaxamento produzido por FGAL foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de pD_2 de FGAL foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na presença e na ausência de 10 mM de TEA^+ .

3.2.4.2.2 Efeito relaxante de FGAL em aorta de rato pré-contraída com FEN na ausência e presença de vários bloqueadores de canais de K^+

A aorta era montada segundo o descrito no item 3.2.2.4 e após os procedimentos iniciais, era adicionado à cuba, em experimentos independentes, glibenclamida, um bloqueador seletivo dos K_{ATP} (MISHRA; AARONSON, 1999) na concentração de 10^{-5} M (MARTINEZ et al., 2004); apamina, um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} (VAN DER STAAY et al., 1999), na concentração de 5×10^{-8} M (ISHIDA et al., 1999); $BaCl_2$, um bloqueador seletivo dos K_{ir} (ORIE et al., 2006), na concentração de 10^{-4} M (NELSON; QUAYLE, 1995; ORIE et al., 2006); 4-AP, um bloqueador seletivo dos K_V (COLE et al., 1996), na concentração de 10^{-3} M (ROHRA; SAITO; OHIZUMI, 2003); TEA^+ (1 mM), o qual nessa concentração é um bloqueador dos BK_{Ca} ; por um período de 20 min e uma nova contração com fenilefrina (3×10^{-7} M) era induzida ainda na presença desse bloqueador. Durante a fase tônica sustentada dessa segunda contração FGAL era adicionado à cuba de maneira cumulativa. Experimentos também eram realizados na ausência dos bloqueadores (controle). O relaxamento produzido por FGAL foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de pD_2 de FGAL foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e presença dos bloqueadores.

3.2.4.3 Avaliação do efeito de FGAL sobre o influxo e liberação do RS de Ca^{2+}

3.2.4.3.1 Efeito de FGAL frente às contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem cálcio

A montagem para este experimento era semelhante ao descrito no item 3.2.2.4. O tecido permanecia em repouso por 60 minutos com a solução de Krebs seguido de mais 15 minutos com a solução despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} , mais 15 minutos com solução de Krebs livre de Ca^{2+} e 15 minutos com solução despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} . Eram induzidas duas curvas similares de maneira concentração-resposta cumulativa para CaCl_2 . Após estas respostas, as preparações eram lavadas e FGAL era incubado na ausência de CaCl_2 em preparações diferentes durante 15 minutos e após este período uma terceira curva cumulativa ao CaCl_2 era obtida na presença de diferentes concentrações de FGAL. Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença de FGAL com àquela obtida pela amplitude média das curvas controle. O E_{max} dessas contrações foi analisado e comparado na ausência e presença de diferentes concentrações de FGAL.

3.2.4.3.2 Efeito de FGAL frente às contrações induzidas por CaCl_2 na presença de verapamil e fenilefrina

A montagem para este experimento era semelhante ao descrito no item 3.2.2.4. O tecido permanecia em repouso por 60 minutos com a solução de Krebs, após esse período era adicionado a cuba 10^{-6} M de verapamil por 10 minutos, seguido de uma contração induzida por 10^{-6} M de FEN e sobre o componente tônico dessa contração eram induzidas duas curvas similares de maneira concentração-resposta cumulativa para CaCl_2 . Após estas respostas, as preparações eram lavadas, verapamil era adicionado a cuba, em seguida FGAL em diferentes concentrações era incubado em preparações diferentes durante 10 minutos e FEN era adicionada a cuba onde sobre o componente tônico dessa contração uma curva

cumulativa ao CaCl_2 era obtida na presença de diferentes concentrações de FGAL (ZHU et al., 2007; SENEJOUX et al., 2010). Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença de FGAL com àquela obtida pela amplitude média das curvas controle. O E_{\max} dessas contrações foi analisado e comparado na ausência e presença de diferentes concentrações de FGAL.

3.2.4.3.3 Efeito de FGAL sobre a mobilização de cálcio do retículo sarcoplasmático sensíveis à FEN

Após um período de estabilização de 1 hora em Krebs normal era adicionado a cuba FEN (10^{-6}M), onde o componente fásico dessas contrações é dependente de cálcio intracelular. O experimento foi realizado de acordo com a seguinte sequência: adição de Krebs normal por 15 minutos seguida da adição de Krebs livre de Ca^{2+} por 10 minutos e após este período adição de FEN a cuba para obtenção de contrações fásicas (2 ou 3) até o esvaziamento dos estoques intracelulares. Em seguida, a solução do banho era trocada por Krebs normal (15 minutos) para promover a reestocagem do Ca^{2+} intracelular, posteriormente o líquido era substituído por Krebs livre de Ca^{2+} (10 minutos) e após este período FEN (10^{-6}M) era adicionada ao banho para obtenção de contrações fásicas. Este procedimento era repetido até a obtenção de duas curvas de magnitude similar à FEN. Em seguida, FGAL era incubado por 15 minutos, em diferentes concentrações e em preparações distintas, e depois uma terceira curva em resposta à FEN era promovida. A inibição da contração fásica foi calculada comparando-se as respostas antes (100%) e depois da adição de FGAL às cubas.

3.2.4.4 Avaliação da participação de nucleotídeos cíclicos no efeito relaxante de FGAL em aorta isolada de rato

3.2.4.4.1 Efeito vasorrelaxante de aminofilina na ausência e presença de FGAL

A aorta era montada segundo o descrito no item 3.2.2.4, e após os procedimentos iniciais, era induzido um contração com 3×10^{-7} M de FEN. Em seguida, aminofilina, um inibidor não seletivo das enzimas fosfodiesterases (PDE) (HIRSH et al., 2004) era adicionada de forma cumulativa na cuba e na ausência e presença de 3×10^{-6} M de FGAL (SATO et al., 2006). O relaxamento produzido pela aminofilina foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pela aminofilina. Os valores de pD_2 de aminofilina foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e presença de FGAL.

3.2.4.4.2 Efeito vasorrelaxante de milrinona na ausência e presença de FGAL

A aorta era montada segundo o descrito no item 3.2.2.4, e após os procedimentos iniciais, era induzido um contração com 3×10^{-7} M de FEN. Em seguida, milrinona, um inibidor seletivo da enzima fosfodiesterase (PDE) III (LUGNIER, C., 2006) era adicionada de forma cumulativa na cuba e na ausência e presença de 3×10^{-6} M de FGAL (SATO et al., 2006). O relaxamento produzido pela milrinona foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pela milrinona. Os valores de pD_2 de milrinona foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e presença de FGAL.

3.2.4.4.3 Efeito vasorrelaxante de sildenafil na ausência e presença de FGAL

A aorta era montada segundo o descrito no item 3.2.2.4, e após os procedimentos iniciais, era induzido um contração com 3×10^{-7} M de FEN. Em seguida, sildenafil, um inibidor seletivo da enzima fosfodiesterase (PDE) V (LUGNIER, C., 2006) era adicionada de forma cumulativa na cuba e na ausência e presença de 3×10^{-6} M de FGAL (SATO et al., 2006). O relaxamento produzido pela sildenafil foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida

pela sildenafil. Os valores de pD_2 de sildenafil foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e presença de FGAL.

3.2.4.5 Avaliação da participação da PKC no efeito relaxante de FGAL em aorta isolada de rato

3.2.4.5.1 Efeito vasorrelaxante de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por FEN ou PMA

A aorta era montada segundo o descrito no item 3.2.2.4, e após os procedimentos iniciais, era adicionado à cuba 3×10^{-7} M de FEN ou 3 μ M de 13-acetato, 12-miristato forbol (PMA), um ativador não seletivo da PKC (STAPLETON, L. M. et al., 2010) para indução da contração. Durante a fase tônica sustentada dessa contração FGAL era adicionado à cuba de maneira cumulativa (ÁLVAREZ, E. et al., 2006). O relaxamento produzido por FGAL foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo PMA. O valor de pD_2 de FGAL foi calculado a partir da curva concentração-resposta na presença de PMA.

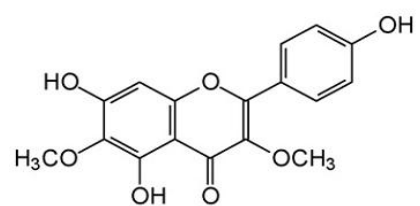
3.2.4 Análise estatística

Os valores da concentração de uma substância que produz uma resposta de 50% de seu efeito máximo (CE_{50}) e a concentração de uma substância que inibe 50% da resposta máxima de um agonista (CI_{50}) e pD_2 (logaritmo negativo na base 10 do valor de CE_{50}) (JENKINSON et al., 1995) foram calculados por regressão não linear e estão apresentados como média \pm erro padrão da média \pm e.p.m.) em todos os experimentos realizados.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente empregando-se os testes “t” (pareado e não pareado) e análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do teste de Bonferroni, onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 5.02 (GraphPad Software Inc., USA).

4 Resultados

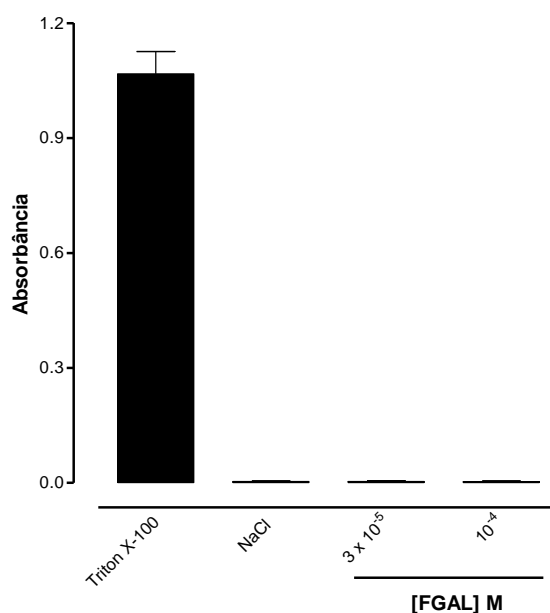


4.1 Avaliação citotóxica de FGAL em eritrócitos de rato

4.1.1 Efeito hemolítico de FGAL em eritrócitos de rato

O flavonoide em estudo não apresentou efeito hemolítico (diretamente proporcional a absorbância) em eritrócitos de rato nas concentrações de 3×10^{-5} e 10^{-4} M, quando comparados ao grupo controle positivo (Triton X-100) e controle negativo (NaCl 0,9%) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Efeito hemolítico de FGAL em eritrócitos de rato.

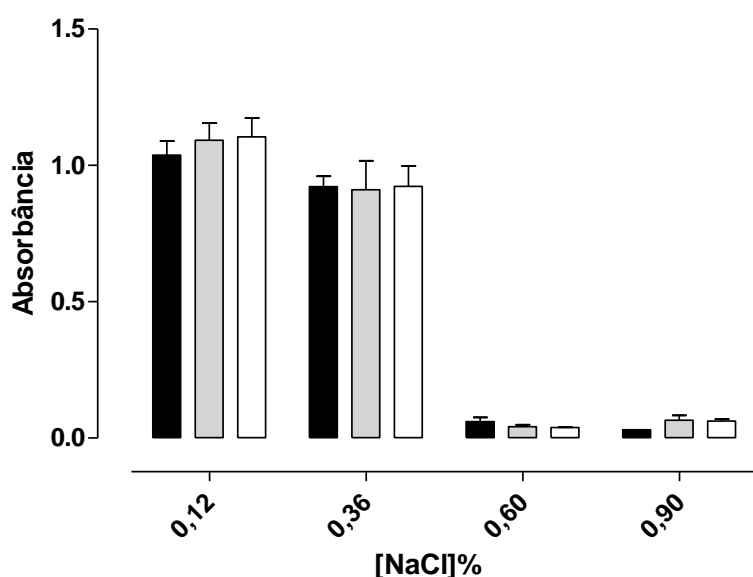


As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. (n = 3 animais). Triton X-100 a 1% (controle positivo) e NaCl (controle negativo) (MACÊDO, 2012).

4.1.2 Efeito anti-hemolítico de FGAL em eritrócitos de rato

FGAL não inibiu a lise dos eritrócitos de rato, expostos as diferentes condições: meios isotônico NaCl 0,9% e hipotônico NaCl (0,12; 0,36 e 0,6%). Uma vez que não houve diferença na taxa de hemólise (diretamente proporcional a absorbância), quando as hemácias foram expostas as diferentes concentrações de NaCl, na ausência e na presença de FGAL (3×10^{-5} e 10^{-4} M) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Efeito anti-hemolítico de FGAL em eritrócitos de rato.



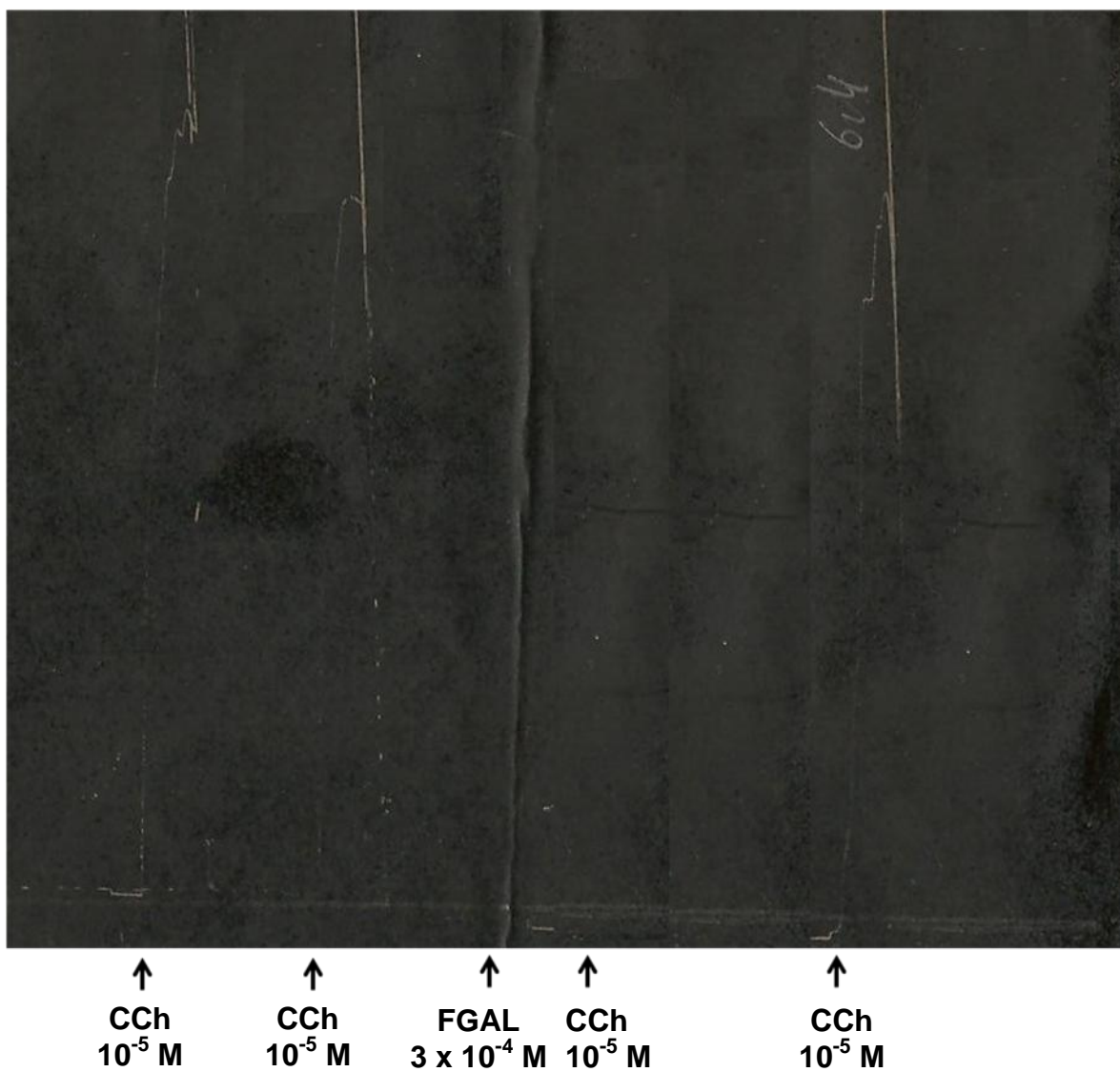
As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. (n = 3 animais). Controle (■); FGAL 3×10^{-5} (▒) e 10^{-4} M (□) (MACÊDO, 2012).

4.2 Triagem farmacológica

4.2.1 Efeito de FGAL frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou carbacol em útero isolado de rata

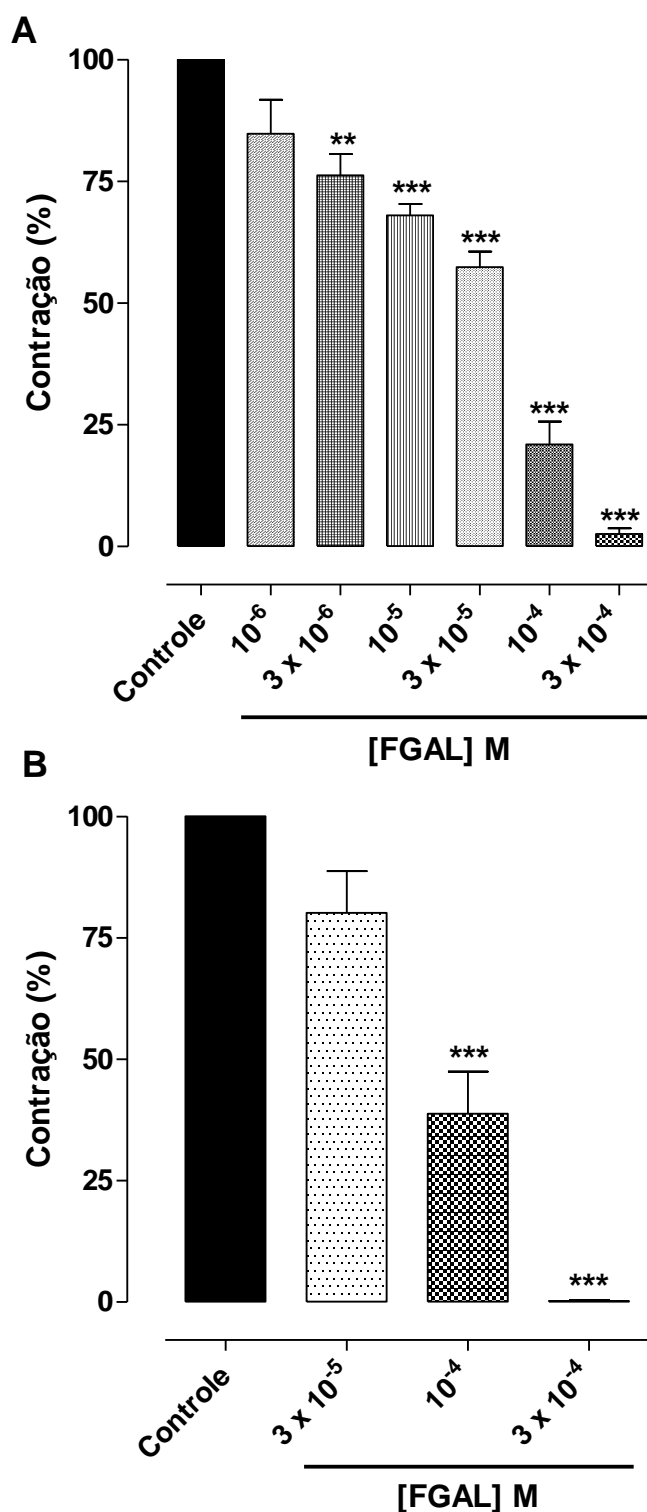
O flavonoide FGAL (10^{-6} – 3×10^{-4} M), pré-incubado por 15 min., inibiu de maneira dependente de concentração as contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e por 10^{-5} M de carbacol em útero isolado de rata. Os valores de CI_{50} de FGAL foram de $2,2 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M frente à ocitocina e de $7,7 \pm 1,3 \times 10^{-5}$ M frente ao carbacol (Gráfico 3). Os valores de CI_{50} apresentaram diferença significativa, sendo que FGAL foi cerca de 3,5 vezes mais potente em inibir as contrações induzidas por ocitocina. A responsividade do útero aos agonistas contráteis testados foi restaurada 1 hora após a retirada de FGAL na concentração de 3×10^{-4} M da cuba (Figura 5).

Figura 5 - Registro representativo do efeito de FGAL sobre a inibição das contrações fásicas induzidas por CCh em útero de rata.



As setas para cima indicam a adição de 10^{-5} M de CCh ou de 3×10^{-4} M de FGAL (MACÊDO, 2012).

Gráfico 3 - Efeito de FGAL frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina **(A)** e 10^{-5} M de carbacol (CCh) **(B)** em útero isolado de rata.

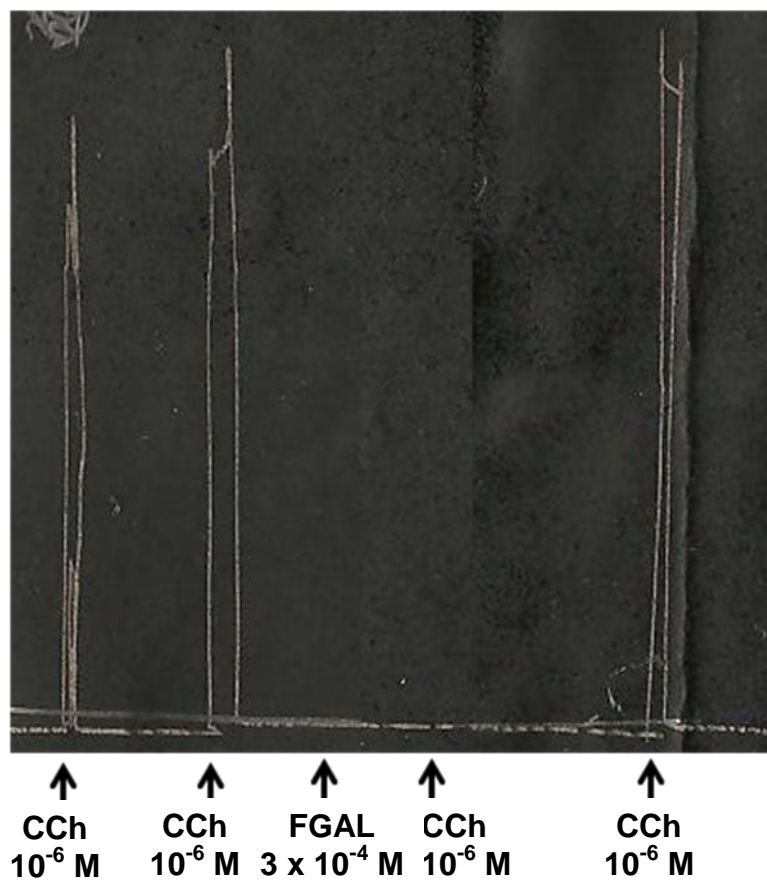


As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (controle vs FGAL; ANOVA "one way" seguido do teste de Bonferroni). (n = 5 animais) (MACÊDO, 2012).

4.2.2 Efeito de FGAL frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou histamina em íleo isolado de cobaia

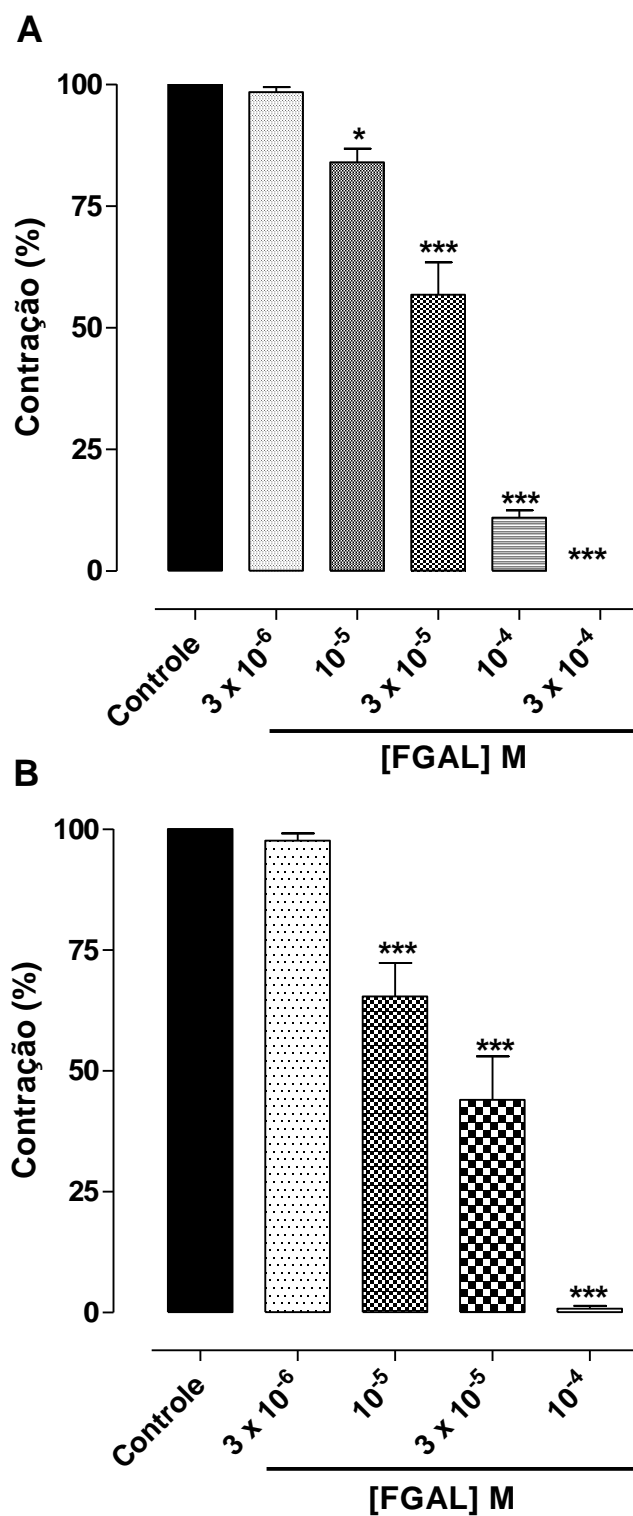
FGAL (3×10^{-6} – 3×10^{-4} M), pré-incubado por 15 min., inibiu as contrações fásicas em íleo isolado de cobaia induzidas por 10^{-6} M de carbacol ou de histamina, de maneira dependente de concentração. Os valores de CI_{50} de FGAL foram de $2,6 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M frente ao carbacol (agonista muscarínico) e de $2,3 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M frente à histamina (agonista histaminérgico) (Gráfico 4). Os valores de CI_{50} não apresentaram diferença significativa. A responsividade do íleo aos agonistas contráteis testados foi restaurada 1 hora após a retirada de FGAL na concentração de 3×10^{-4} M da cuba (Figura 6).

Figura 6 - Registro representativo do efeito de FGAL sobre a inibição das contrações fásicas induzidas por CCh em íleo de cobaia.



As setas para cima indicam a adição de 10^{-6} M de CCh ou de 3×10^{-4} M de FGAL (MACÊDO, 2012).

Gráfico 4 - Efeito de FGAL frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de CCh **(A)** e por 10^{-6} M de histamina **(B)** em íleo isolado de cobaia.



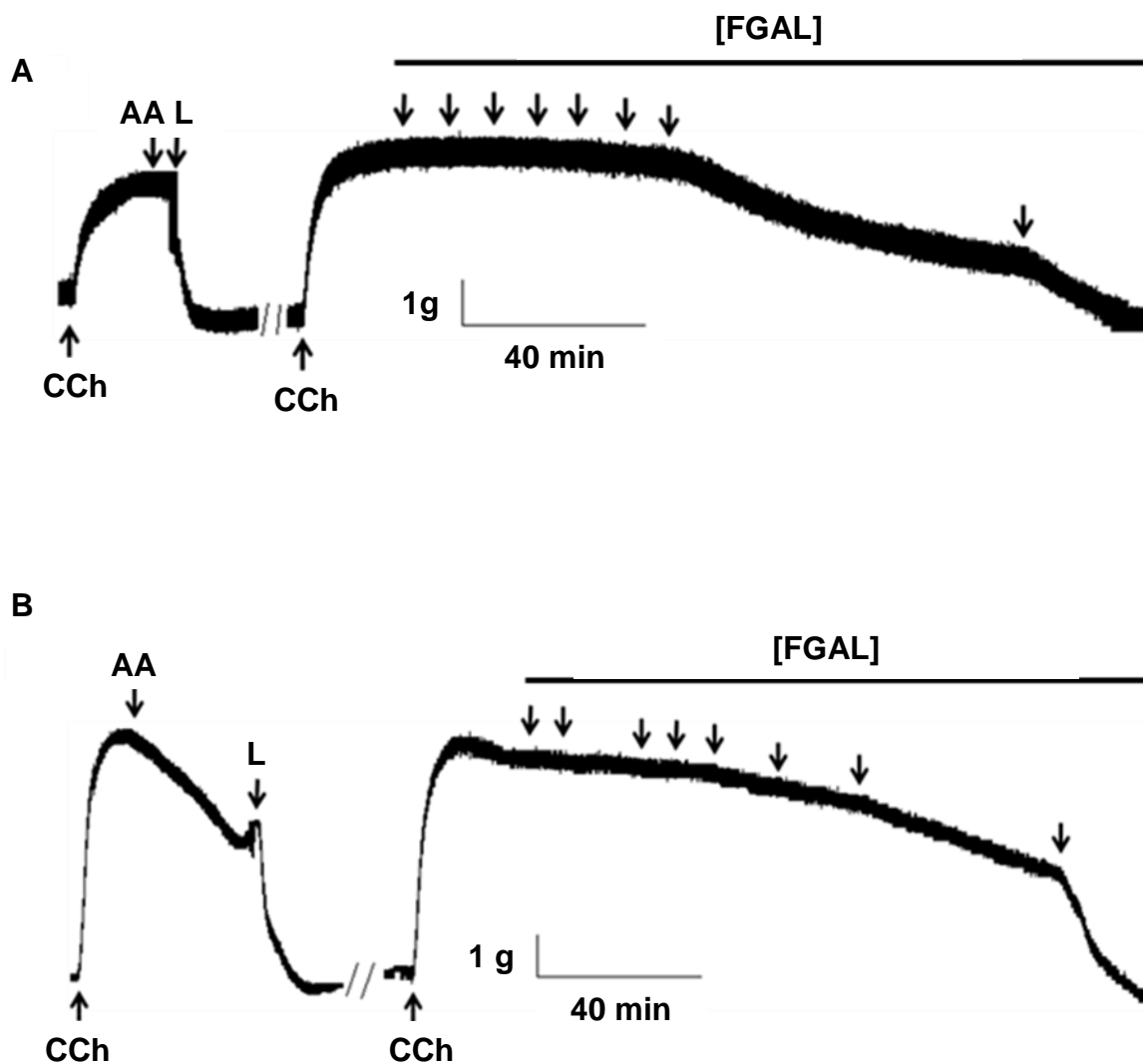
As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (controle vs FGAL; ANOVA "one way" seguido do teste de Bonferroni) ($n = 5$ animais) (MACÊDO, 2012).

4.2.3 Efeito de FGAL sobre o tônus basal e sobre a traqueia de cobaia pré-contrainda com carbacol

FGAL na concentração de 10^{-5} M não alterou o tônus basal da traqueia isolada de cobaia (dados não mostrados). Porém, FGAL (10^{-8} – 3×10^{-5} M) relaxou de maneira dependente de concentração ($R^2 = 0,95$) os anéis de traqueia isolada de cobaia pré-contrainda com CCh (10^{-6} M) na ausência ($pD_2 = 5,11 \pm 0,07$) e na presença ($pD_2 = 5,02 \pm 0,07$) de epitélio funcional e de forma equipotente (Figura 7 e Gráfico 5). O tempo necessário para FGAL relaxar a traqueia de cobaia na ausência e presença de epitélio foi em média 190 ± 14 e 178 ± 10 min, respectivamente, não havendo diferença significativa entre esses tempos. O CCh permaneceu em contato com o órgão desde a indução da contração até o E_{max} induzido por FGAL, cujo tempo foi em média de 205 ± 10 min.

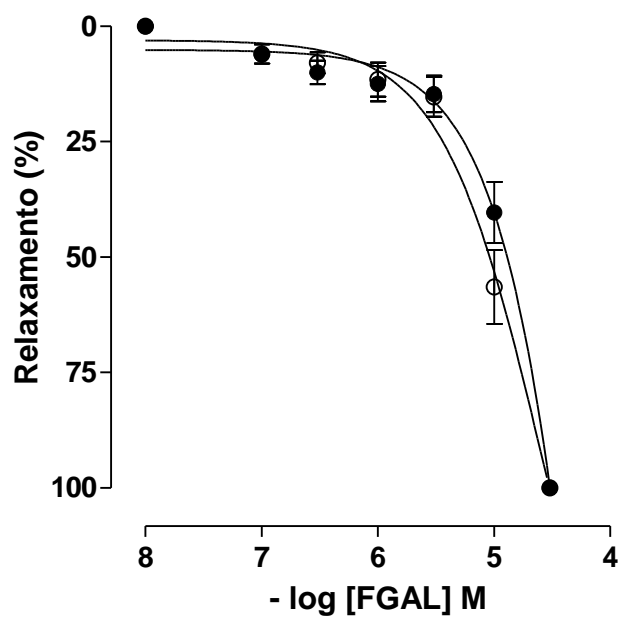
A responsividade da traqueia ao carbacol foi restaurada 2 horas após a retirada de FGAL da cuba (dados não mostrados).

Figura 7 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia pré-contráida com CCh, na ausência (A) e na presença (B) de epitélio.



As setas para baixo sob a barra indicam a adição de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} e 3×10^{-5} M. Carbacol (CCh), ácido araquidônico (AA) (10^{-4} M), lavagem (L) (MACÊDO, 2012).

Gráfico 5 - Efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com carbacol, na ausência (○) e presença (●) de epitélio funcional.



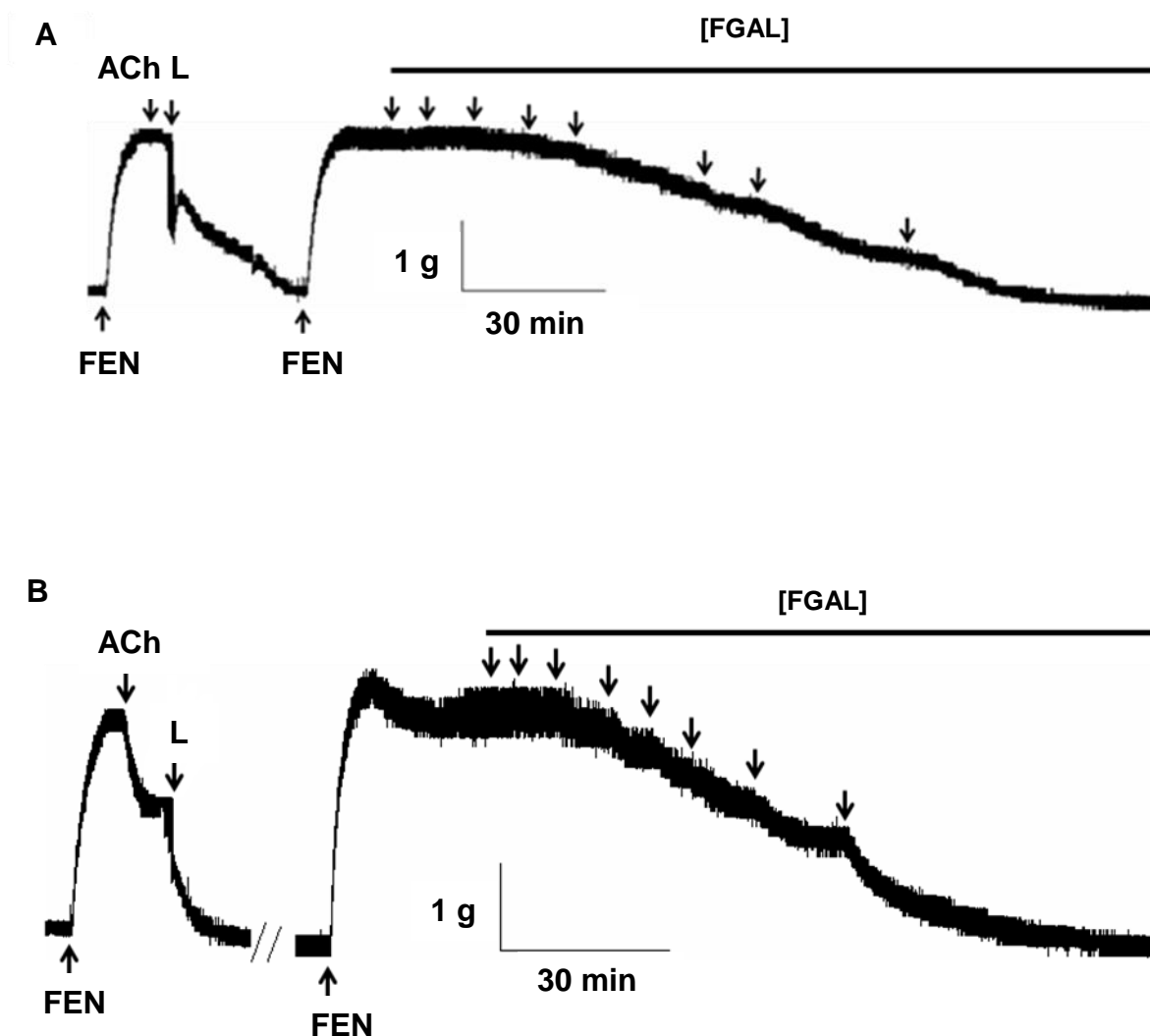
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$ animais). (teste t não-pareado: ausência vs presença de epitélio) (MACÊDO, 2012).

4.2.4 Efeito de FGAL sobre o tônus basal e sobre a aorta de rato pré-contráida com fenilefrina

FGAL na concentração de 10^{-5} M não alterou o tônus basal da aorta isolada de rato (dados não mostrados). Porém, FGAL (10^{-8} – 3×10^{-5} M) relaxou os anéis de aorta de rato, pré-contráidos com fenilefrina (3×10^{-7} M), de maneira equipotente e dependente de concentração ($R^2 = 0,95$), na presença ($pD_2 = 5,31 \pm 0,10$) e na ausência ($pD_2 = 5,35 \pm 0,11$) de endotélio funcional (Figura 8 e Gráfico 6). O tempo médio que FGAL levou para relaxar a aorta de rato foi de 170 ± 20 e 158 ± 14 min para anéis sem e com endotélio funcional, respectivamente. Não houve diferença significativa entre esses valores do tempo de relaxamento do órgão na ausência e presença de endotélio. A FEN permaneceu em contato com o órgão desde a indução da contração até o E_{\max} induzido por FGAL, cujo tempo foi em média de 185 ± 15 min.

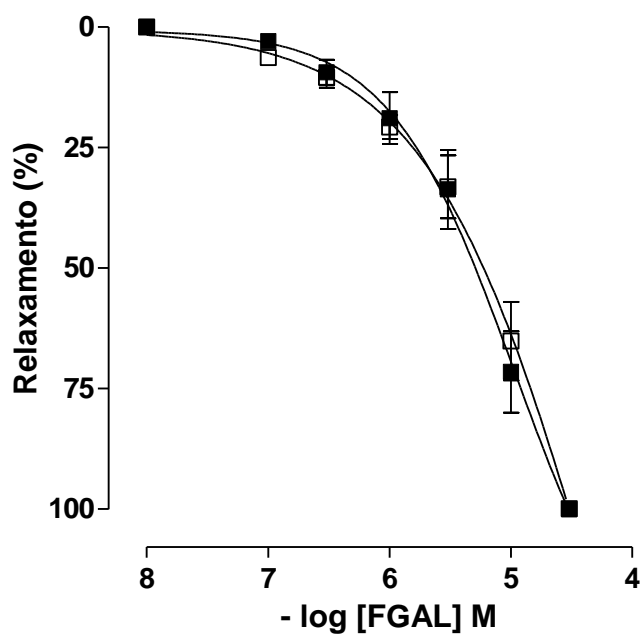
A responsividade da aorta a fenilefrina foi restaurada 2 horas após a retirada de FGAL da cuba (dados não mostrados).

Figura 8 - Registro representativo do efeito vasorrelaxante de FGAL sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (A) e na presença (B) de endotélio.



As setas para baixo sob a barra indicam a adição de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} e 3×10^{-5} M, respectivamente. Fenilefrina (FEN), acetilcolina (ACh), lavagem (L) (MACÊDO, 2012).

Gráfico 6 - Efeito vasorrelaxante de FGAL sobre a aorta de rato pré-contráida com 3×10^{-7} M de fenilefrina, na ausência (■) e na presença (□) de endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$ animais). (teste t não-pareado: ausência vs presença de endotélio) (MACÊDO, 2012).

4.2.5 Comparação entre a potência espasmolítica de FGAL em útero de rato, íleo e traqueia de cobaia e aorta de rato

O flavonoide FGAL apresentou efeito espasmolítico não seletivo nos quatro órgãos testados, como demonstrado nas tabelas 1 e 2 através dos valores de CI_{50} , CE_{50} e pD_2 .

Tabela 1 - Valores de CI_{50} do efeito espasmolítico de FGAL em útero de rata e íleo de cobaia.

Órgão	Agonista	CI_{50} (M)
Útero	CCh	$7,7 \pm 1,3 \times 10^{-5**}$
	Ocitocina	$2,2 \pm 0,4 \times 10^{-5}$
Íleo	Histamina	$2,3 \pm 0,5 \times 10^{-5}$
	CCh	$2,6 \pm 0,4 \times 10^{-5}$

ANOVA “one way” seguido do teste de Bonferroni: $**p < 0,01$ (útero vs íleo) (MACÊDO, 2012).

Tabela 2 - Valores de CE_{50} e pD_2 do efeito espasmolítico de FGAL em traqueia de cobaia e aorta de rato.

Órgão	Agonista	CE_{50} (M)	pD_2
Traqueia	CCh (- epitélio)	$0,8 \pm 0,1 \times 10^{-5}$	$5,11 \pm 0,07$
	CCh (+ epitélio)	$1,0 \pm 0,1 \times 10^{-5}$	$5,02 \pm 0,07$
Aorta	FEN (- endotélio)	$5,0 \pm 0,5 \times 10^{-6}$	$5,35 \pm 0,11$
	FEN (+ endotélio)	$5,4 \pm 0,4 \times 10^{-6*}$	$5,31 \pm 0,10^*$

Teste t . $*p < 0,05$ traqueia (+) epitélio vs aorta (+) endotélio. (-) = ausência e (+) = presença (MACÊDO, 2012).

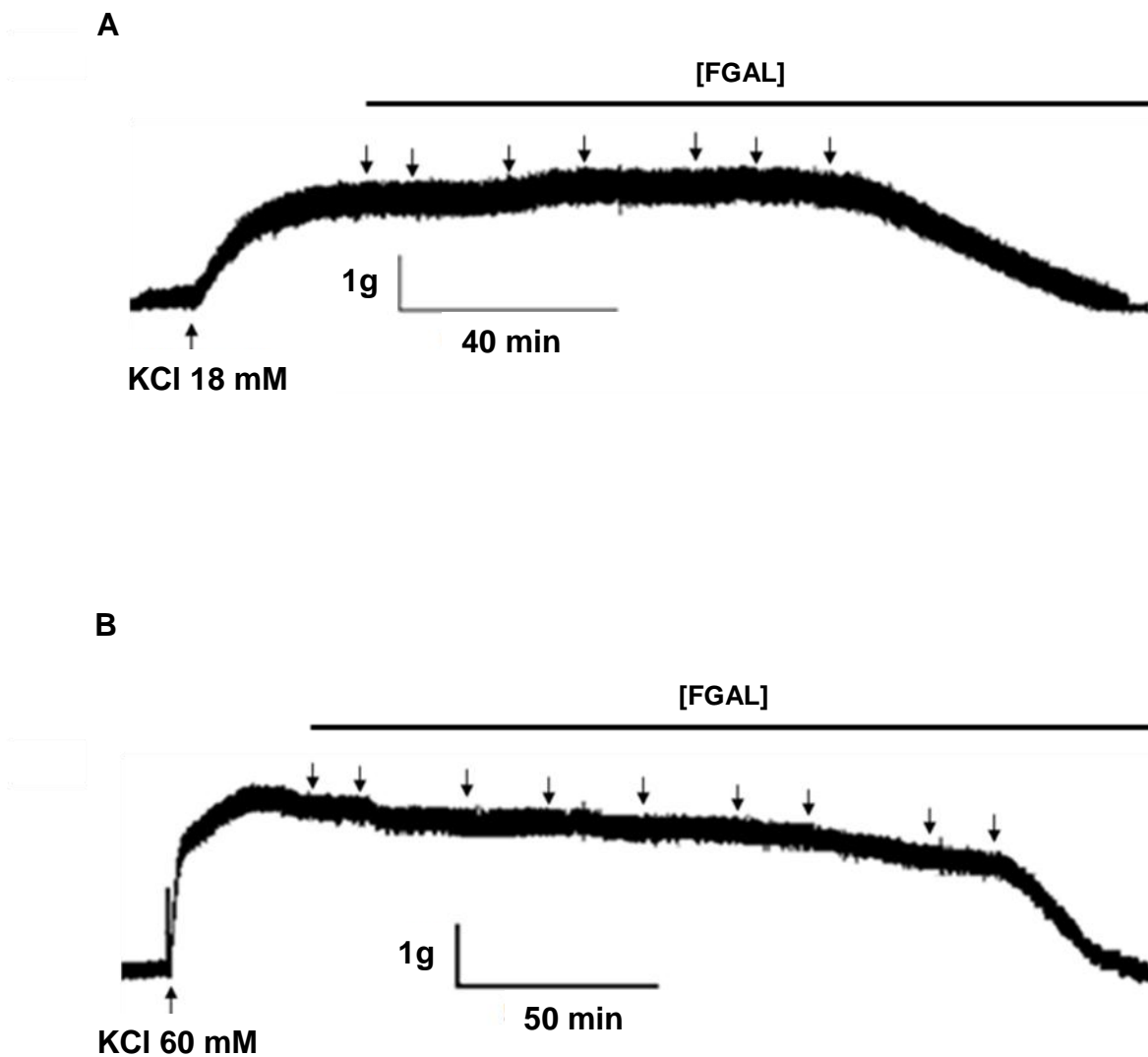
4.3 Investigação do mecanismo de ação de FGAL em traqueia de cobaia

4.3.1 Avaliação da participação dos canais de K^+ e de Ca^{2+}

4.3.1.1 Efeito de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 18 ou 60 mM de KCl em traqueia de cobaia

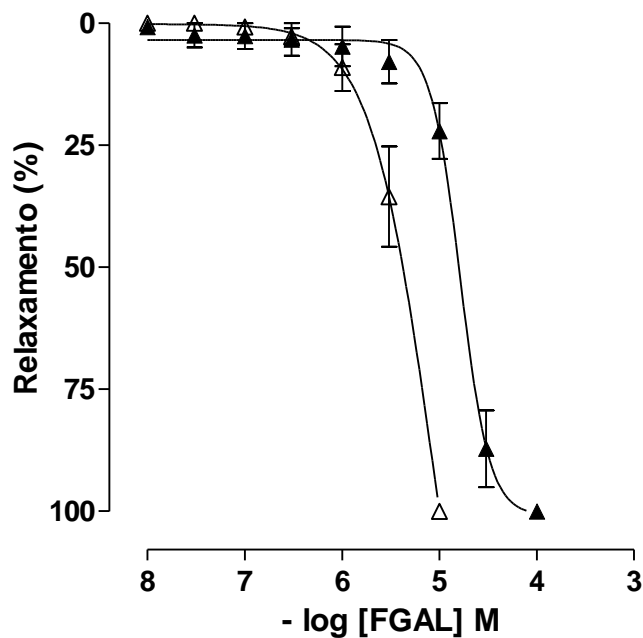
FGAL (10^{-8} – 10^{-4} M) relaxou a traqueia isolada de cobaia pré-contraída tanto com 18 mM de KCl ($pD_2 = 5,50 \pm 0,36$) como com 60 mM de KCl ($pD_2 = 4,80 \pm 0,07$) (Figura 9, gráfico 7 e tabela 3). Os valores do efeito máximo (E_{max}) foram atingidos nas concentrações de 3×10^{-5} e 10^{-4} M, respectivamente. A potência relaxante de FGAL foi cerca de 19 vezes maior quando a traqueia foi contraída com 18 mM de KCl.

Figura 9 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 18 mM de KCl (**A**) e 60 mM de KCl (**B**).



As setas para baixo sob a barra indicam a adição cumulativa de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Gráfico 7 - Efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 18 mM de KCl (Δ) ou 60 mM de KCl (\blacktriangle).



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$ animais) (MACÊDO, 2012).

Tabela 3 - Valores de pD_2 do efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia pré-contraída com 18 ou 60 mM de KCl.

Agente despolarizante	pD_2
KCl 18 mM	$5,50 \pm 0,36^{***}$
KCl 60 mM	$4,80 \pm 0,07$

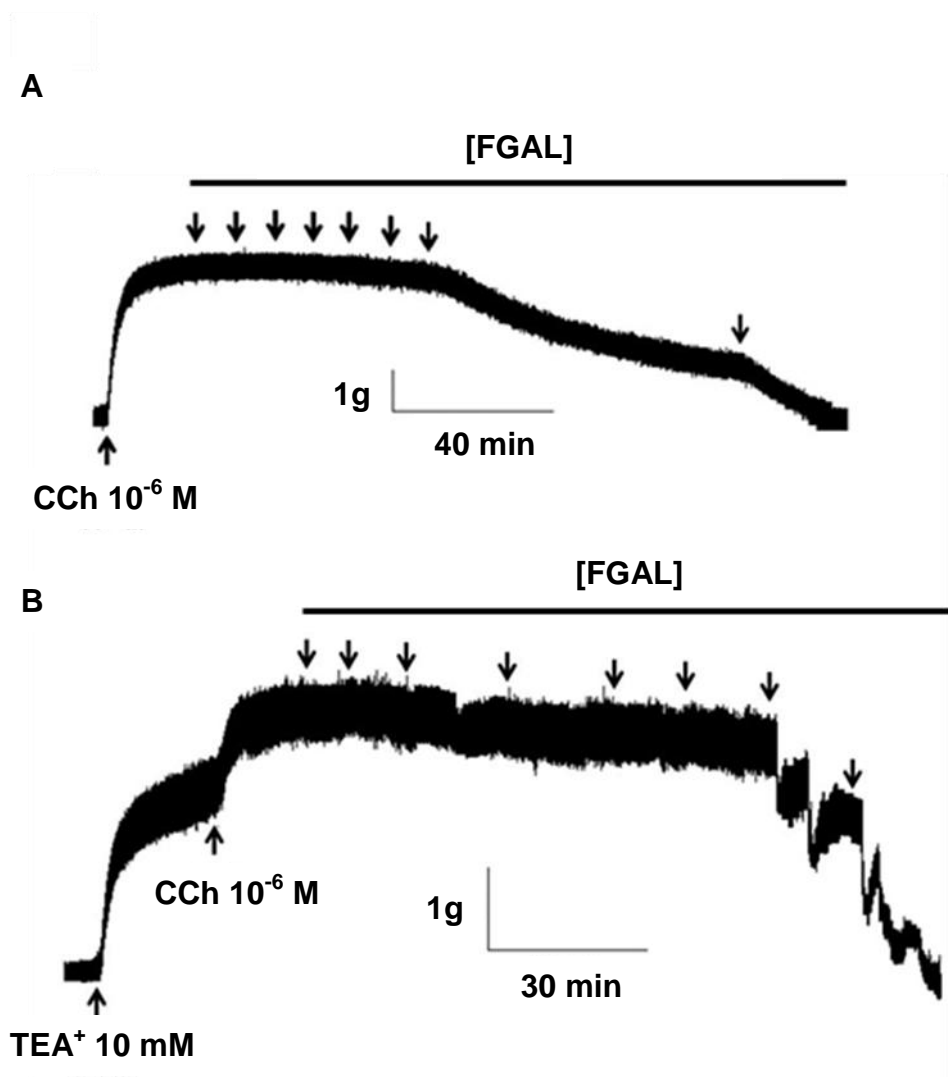
Teste t : $^{***}p < 0,001$ (KCl 18 mM vs KCl 60 mM) (MACÊDO, 2012).

4.3.2 Investigação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia

4.3.2.1 Efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia pré-contraída com CCh na ausência e presença de vários bloqueadores de canais de K⁺

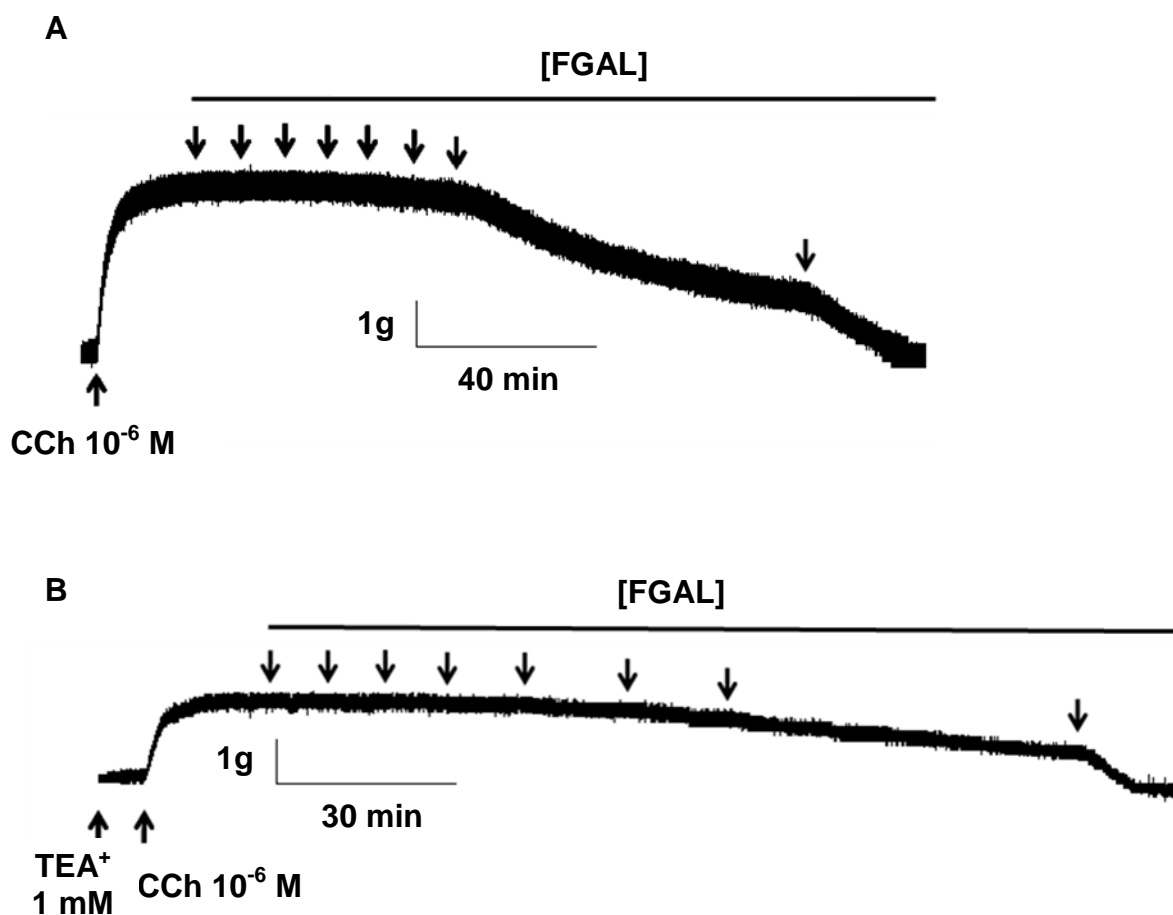
A curva de relaxamento de FGAL ($pD_2 = 5,13 \pm 0,07$) foi desviada para direita de forma significativa na presença de 10 mM de TEA⁺ ($pD_2 = 4,87 \pm 0,02$), que nessa concentração é um bloqueador não seletivo dos canais de K⁺. Porém, não foi desviada de maneira significativa na presença de vários bloqueadores de canais de K⁺, como o TEA⁺ 1 mM ($pD_2 = 5,31 \pm 0,05$), um bloqueador seletivo dos BK_{Ca}; glibenclamida ($pD_2 = 5,25 \pm 0,03$), um bloqueador dos K_{ATP}; 4-AP ($pD_2 = 5,04 \pm 0,06$), um bloqueador seletivo dos K_V; BaCl₂ ($pD_2 = 5,28 \pm 0,06$), um bloqueador seletivo dos K_{ir}. Diferentemente, a curva de relaxamento de FGAL foi deslocada 2 vezes para direita na presença da apamina ($pD_2 = 4,85 \pm 0,06$), um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} (Figuras 10 a 15, gráfico 8 e tabela 4).

Figura 10 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia pré-contrainda com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10 mM de TEA⁺ (B) em traqueia isolada de cobaia.



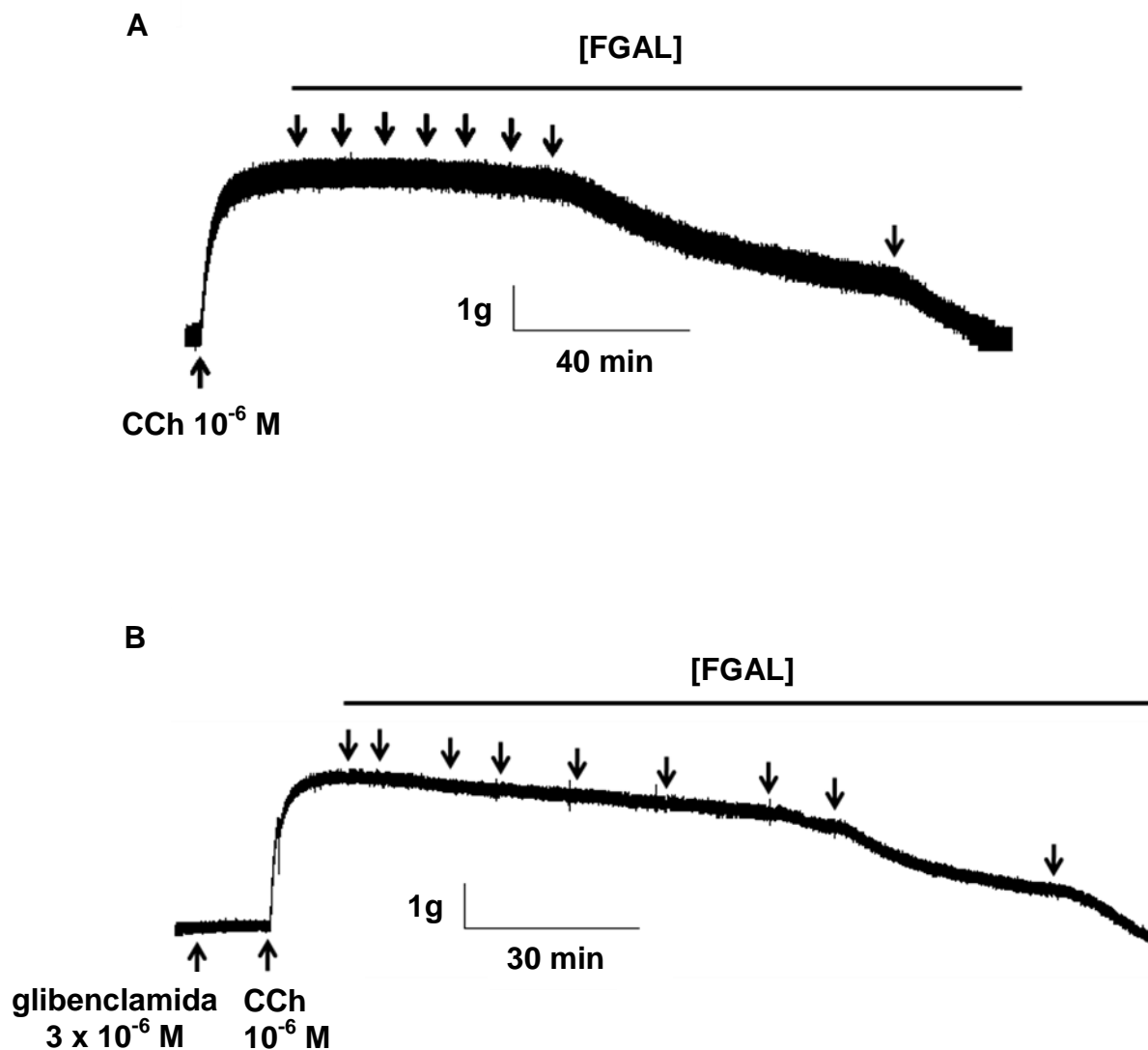
As setas para baixo sob a barra indicam a adição cumulativa de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Figura 11 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia pré-contráida com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 1 mM de TEA⁺ (B).



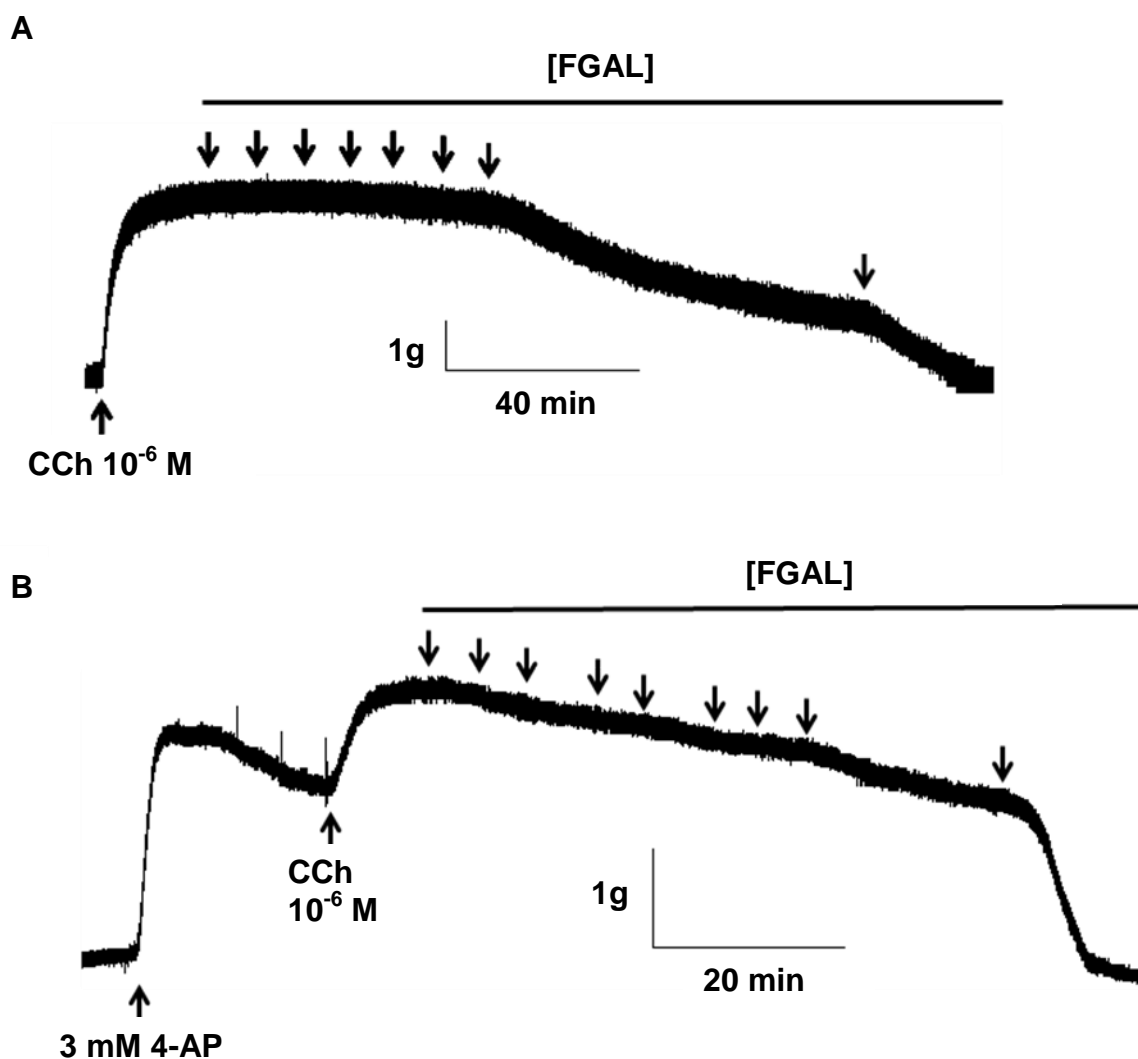
As setas para baixo sob a barra indicam a adição cumulativa de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M, respectivamente. (MACÊDO, 2012).

Figura 12 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) na presença de 3×10^{-6} M de glibenclamida (B).



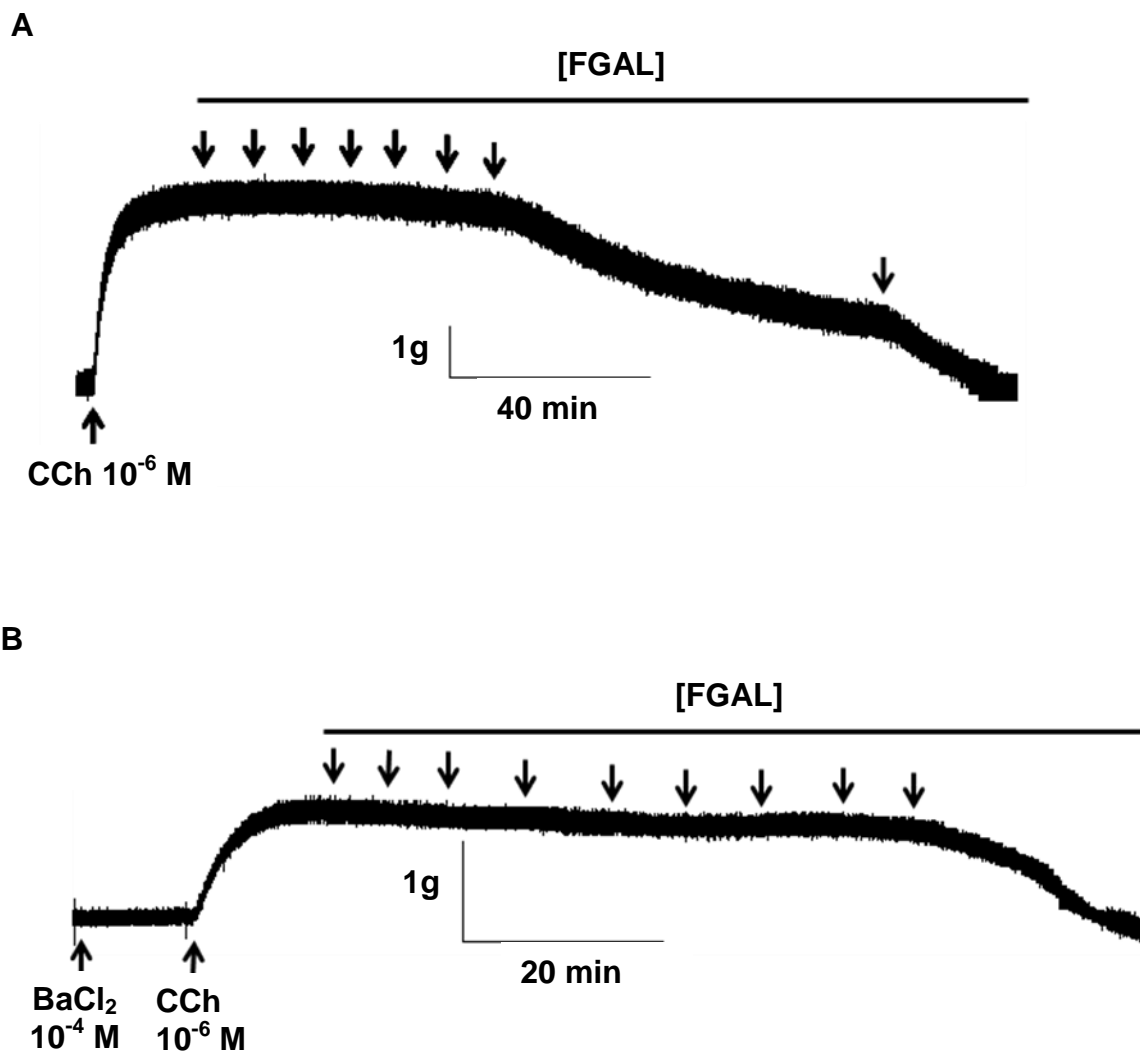
As setas para baixo sob a barra indicam a adição cumulativa de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Figura 13 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 3 mM de 4-AP (B).



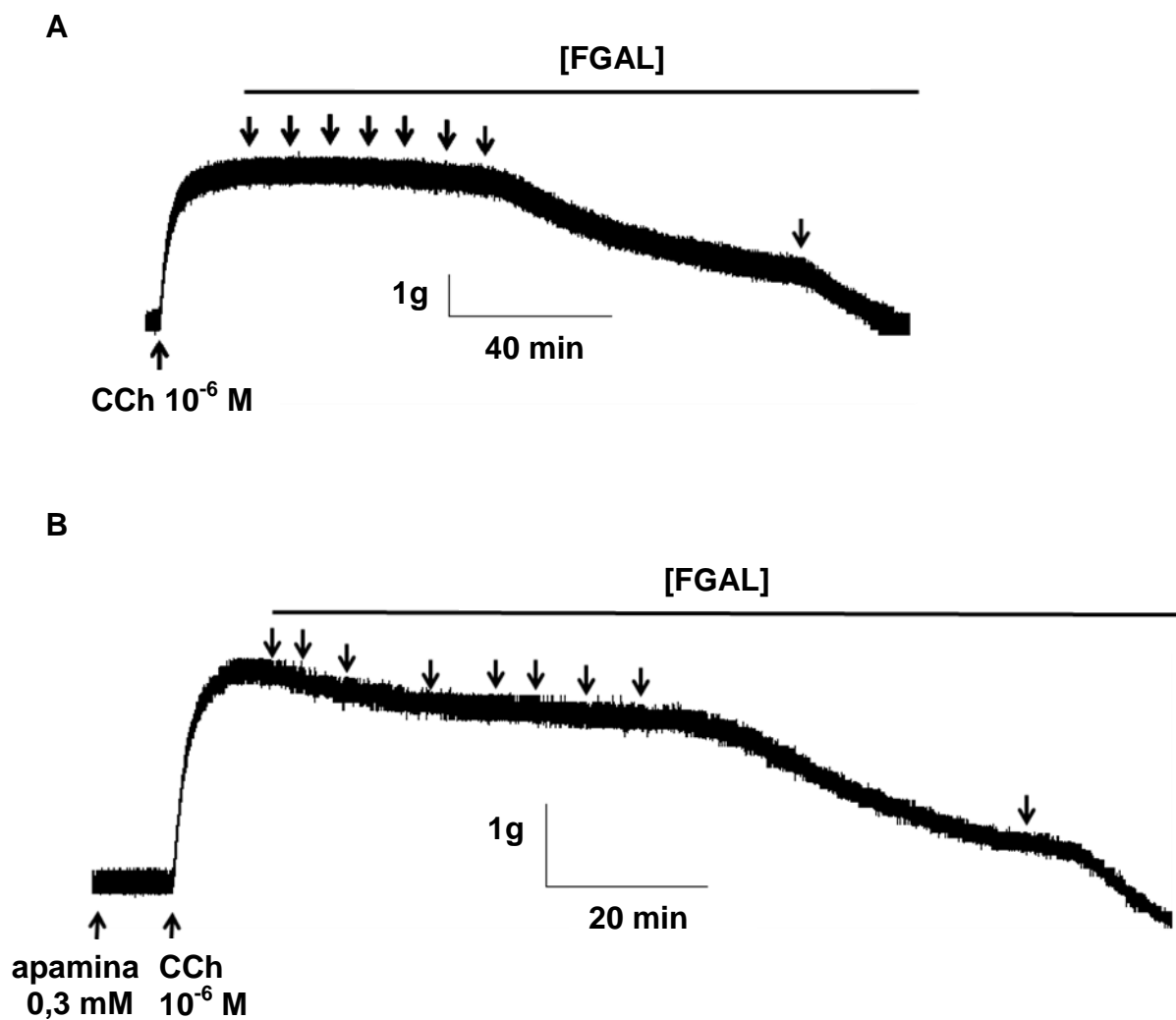
As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} e 3×10^{-5} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Figura 14 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (**A**) na presença de 10^{-4} M de BaCl_2 (**B**).



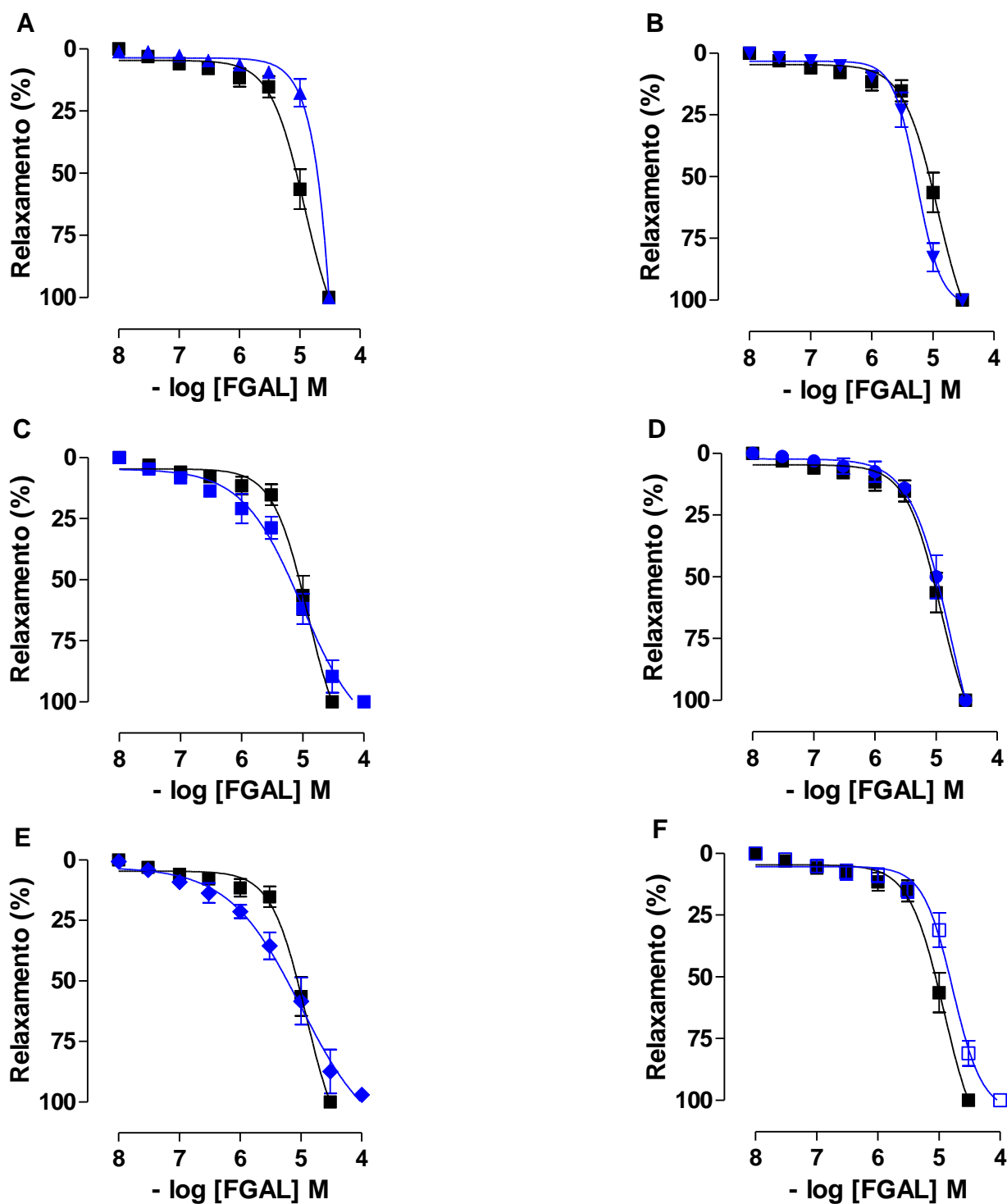
As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Figura 15 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia pré-contrainda com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 0,5 mM de apamina (B).



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Gráfico 8 - Efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia de cobaia pré-contráida com 10^{-6} M de CCh, na ausência (■) e na presença de TEA⁺ (10 mM) (▲) (A); TEA⁺ (1 mM) (▼) (B); glibenclamida (■) (C), 4-AP (●) (D); BaCl₂ (◆) (E), apamina (□) (F).



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5 animais) (MACÊDO, 2012).

4.3.2.2 Comparação entre a potência espasmolítica de FGAL em traqueia de cobaia na ausência e presença dos bloqueadores de canais de K⁺

O flavonoide FGAL apresentou efeito espasmolítico em traqueia isolada de cobaia através da ativação dos SK_{Ca}, como demonstrado pelos valores de CE₅₀ e pD₂ na tabela 4.

Tabela 4 - Valores de CE₅₀ e pD₂ de FGAL na ausência e na presença de bloqueadores de canais de K⁺ em traqueia isolada de cobaia

Condição	CE ₅₀ (M)	pD ₂
FGAL	0,80 ± 0,20 x 10 ⁻⁵	5,12 ± 0,07
FGAL+TEA ⁺ 10 mM	1,40 ± 0,07 x 10 ⁻⁵	4,87 ± 0,02*
FGAL+TEA ⁺ 1 mM	0,50 ± 0,05 x 10 ⁻⁵	5,31 ± 0,05
FGAL+glibenclamida	0,60 ± 0,04 x 10 ⁻⁵	5,25 ± 0,03
FGAL+4-AP	0,96 ± 0,13 x 10 ⁻⁵	5,04 ± 0,06
FGAL+BaCl ₂	0,55 ± 0,07 x 10 ⁻⁵	5,28 ± 0,06
FGAL+apamina	1,15 ± 0,20 x 10 ⁻⁵	4,85 ± 0,06*

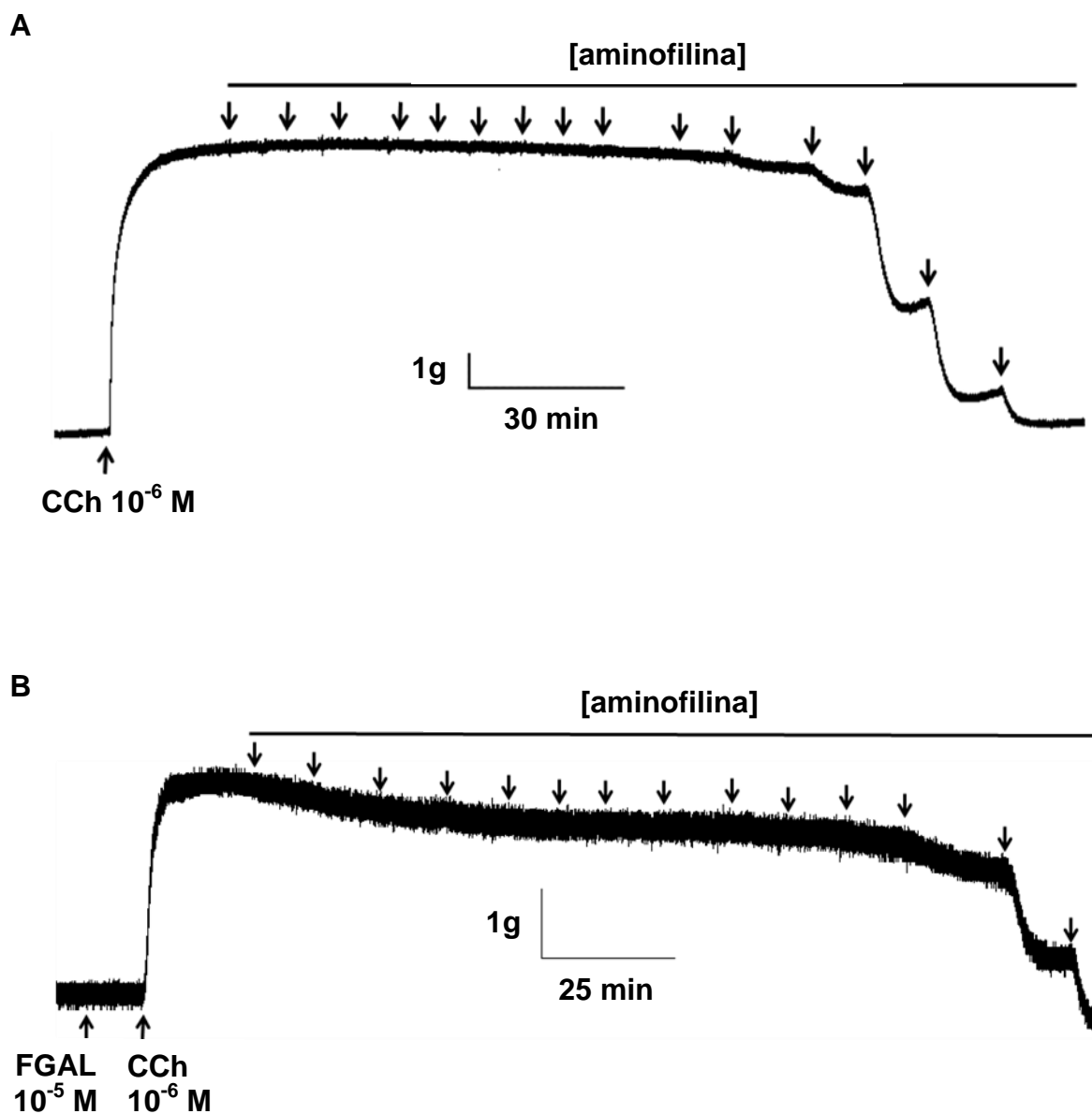
Teste *t*. **p* < 0,05 (FGAL vs FGAL+bloqueadores) (MACÊDO, 2012).

4.3.3 Avaliação da participação de nucleotídeos cíclicos no efeito relaxante de FGAL em traqueia isolada de cobaia

4.3.3.1 Efeito relaxante de aminofilina na ausência e presença de FGAL

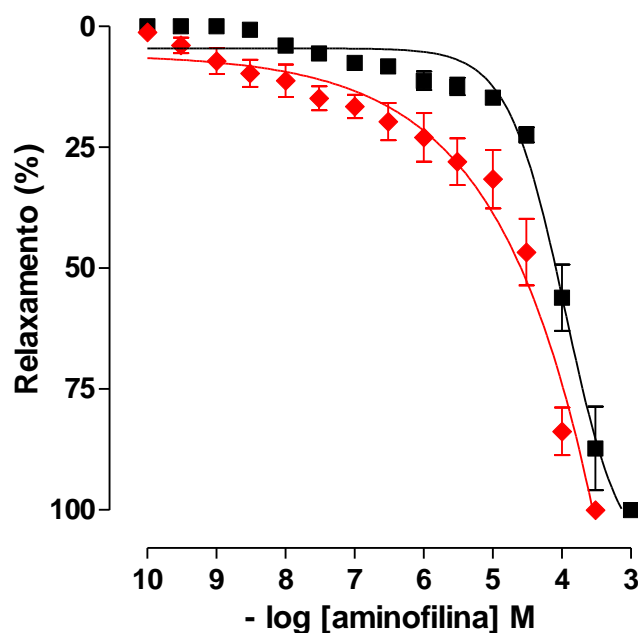
A adição cumulativa de aminofilina (10^{-10} - 10^{-3} M) relaxou os anéis de traqueia isolada de cobaia pré-contraídos com CCh ($pD_2 = 4,12 \pm 0,06$). Esse relaxamento foi potencializado em cerca de 4 vezes na presença de 10^{-5} M de FGAL ($pD_2 = 4,80 \pm 0,20$) (Figura 16, gráfico 9 e tabela 5).

Figura 16 - Registro representativo do efeito relaxante da aminofilina sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10^{-5} M de FGAL (B).



As setas para baixo sob a barra representam a adição cumulativa de aminofilina nas concentrações de 10^{-10} , 3×10^{-10} , 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} e 10^{-3} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Gráfico 9 - Efeito relaxante da aminofilina sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh, na ausência (■) e na presença (♦) de 10^{-5} M de FGAL.



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

Tabela 5 - Valores de pD_2 do efeito relaxante da aminofilina em traqueia de cobaia pré-contraída com CCh na ausência e presença de FGAL.

Condição	pD_2
Aminofilina	$4,12 \pm 0,06$
aminofilina + FGAL	$4,80 \pm 0,20^*$

Teste *t*. * $p < 0,05$ (aminofilina vs FGAL + aminofilina) (MACÊDO, 2012).

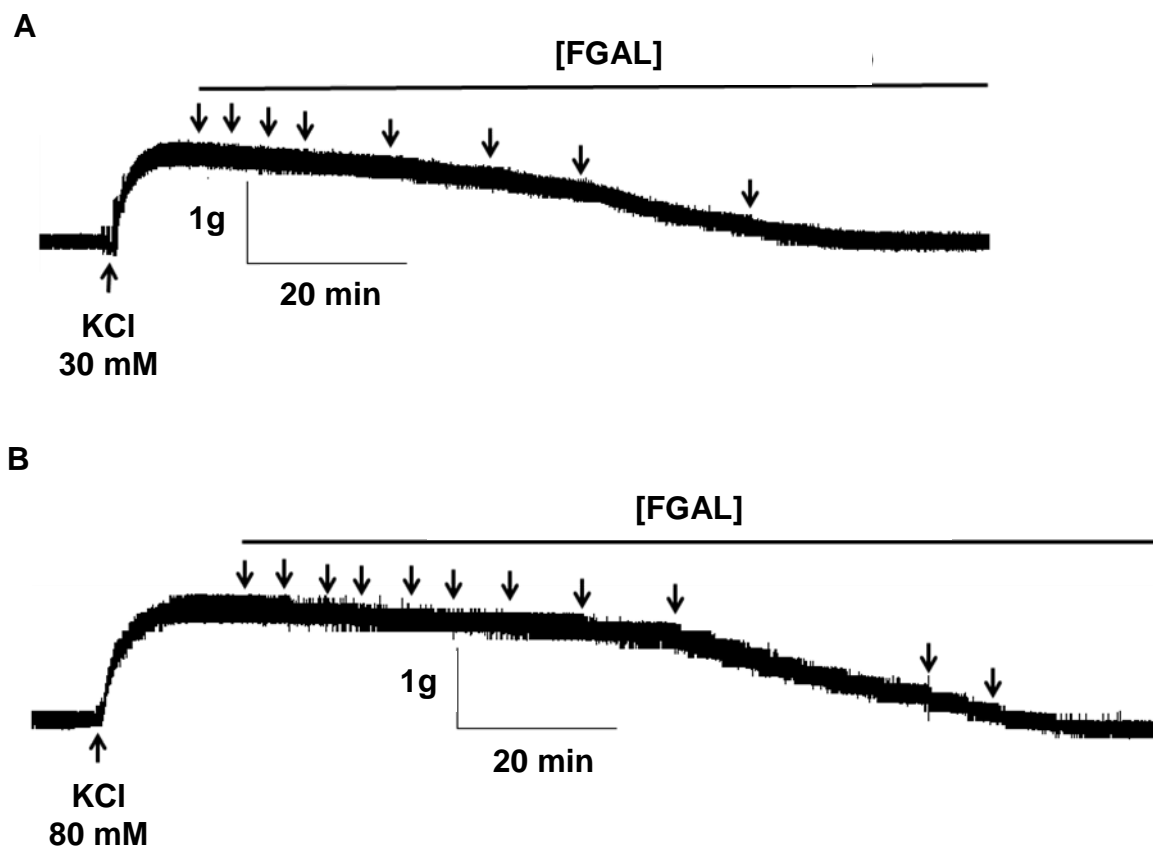
4.4 Investigação do mecanismo de ação de FGAL em aorta de rato

4.4.1 Avaliação da participação dos canais de K^+ e de Ca^{2+}

4.4.1.1 Efeito de FGAL sobre a aorta de rato pré-contráida com 30 ou 80 mM de KCl

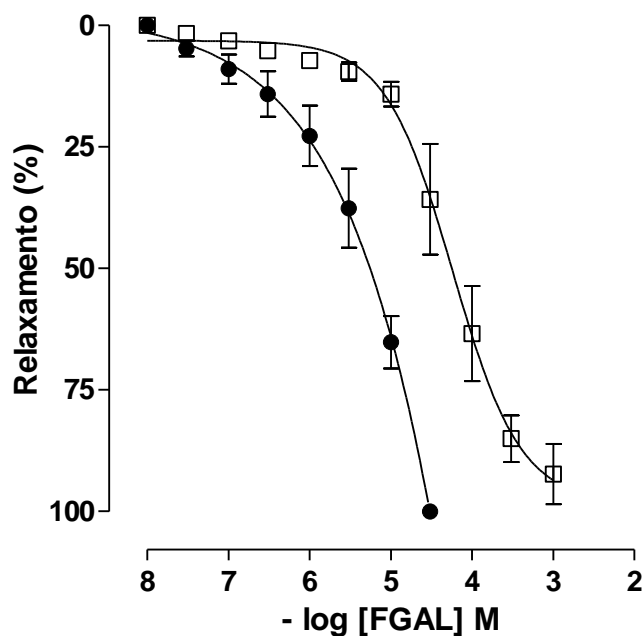
FGAL (10^{-8} – 10^{-3} M) relaxou a aorta isolada de rato pré-contráida com 30 mM de KCl ($pD_2 = 5,50 \pm 0,22$) e 80 mM de KCl ($pD_2 = 4,37 \pm 0,12$), de maneira dependente de concentração (Figura 17, gráfico 10 e tabela 6). O efeito relaxante de FGAL foi 10 vezes mais potente em relaxar a aorta pré-contráida com 30 mM de KCl em relação a 80 mM de KCl. Para as contrações obtidas com 30 mM de KCl o E_{max} foi alcançado na concentração de 3×10^{-5} M. Entretanto, para as contrações obtidas com 80 mM de KCl o E_{max} foi menor (92%) e só foi obtido na concentração de 10^{-3} M.

Figura 17 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta de rato pré-contraindida com 30 mM de KCl (**A**) ou 80 mM de KCl (**B**).



As setas para baixo sob a barra indicam a adição cumulativa de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} e 10^{-3} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Gráfico 10 - Efeito vasorrelaxante de FGAL sobre a aorta de rato pré-contraída com 30 mM de KCl (●) e 80 mM de KCl (□).



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$ animais) (MACÊDO, 2012).

Tabela 6 - Valores de pD_2 do efeito relaxante de FGAL em aorta de rato pré-contraída com 30 ou 80 mM de KCl.

Condição	pD_2
30 mM de KCl	$5,50 \pm 0,22$
80 mM de KCl	$4,37 \pm 0,12^{**}$

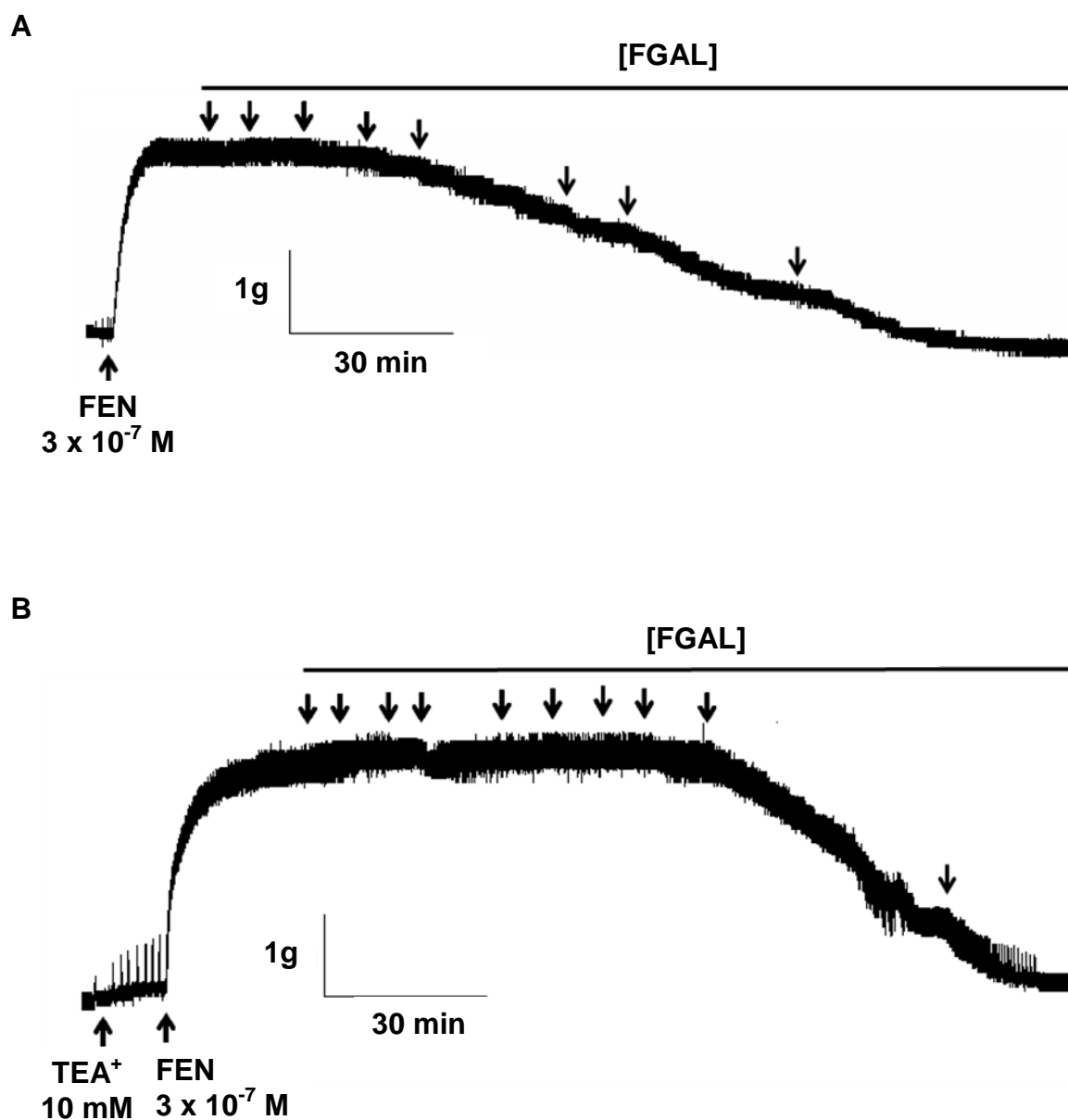
Teste t : $^{**}p < 0,01$ (KCl 30 mM vs KCl 80 mM) (MACÊDO, 2012).

4.4.2 Investigação do envolvimento dos canais de K^+ no efeito relaxante de FGAL em aorta isolada de rato

4.4.2.1 Efeito relaxante de FGAL em aorta de rato pré-contraída com FEN na ausência e presença de vários bloqueadores de canais de K^+

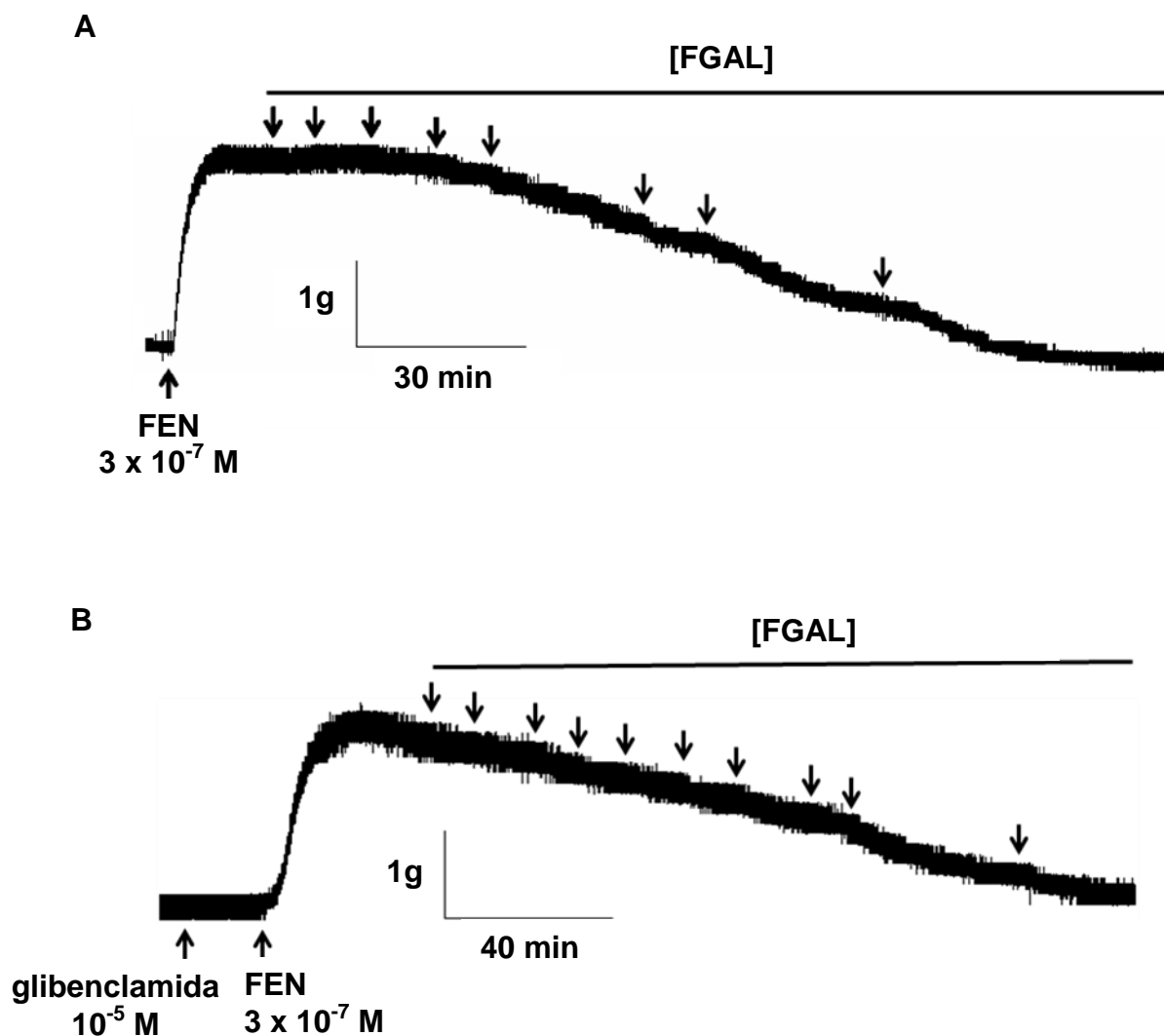
A curva de relaxamento de FGAL ($pD_2 = 5,35 \pm 0,11$) foi desviada para direita de maneira significativa na presença de 10 mM de TEA^+ ($pD_2 = 4,17 \pm 0,06$), o qual nesta concentração é um bloqueador não seletivo dos canais de K^+ , bem como na presença dos seguintes bloqueadores seletivos de canais de K^+ : glibenclamida ($pD_2 = 4,80 \pm 0,05$), potência reduzida 3,2 vezes, um bloqueador dos K_{ATP} ; apamina ($pD_2 = 4,75 \pm 0,11$), potência reduzida 4 vezes, um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} ; $BaCl_2$ ($pD_2 = 4,63 \pm 0,18$), potência reduzida 6,2 vezes, um bloqueador seletivo dos K_{ir} ; 4-AP ($pD_2 = 4,82 \pm 0,11$), potência reduzida 3,4 vezes, um bloqueador seletivo dos K_v . Diferentemente, a curva de relaxamento de FGAL não foi deslocada na presença de TEA^+ (1 mM) ($pD_2 = 5,58 \pm 0,17$), um bloqueador seletivo dos BK_{Ca} (Figuras 18 a 23, gráfico 11 e tabela 7);

Figura 18 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (A) e na presença de TEA⁺ 10 mM (B).



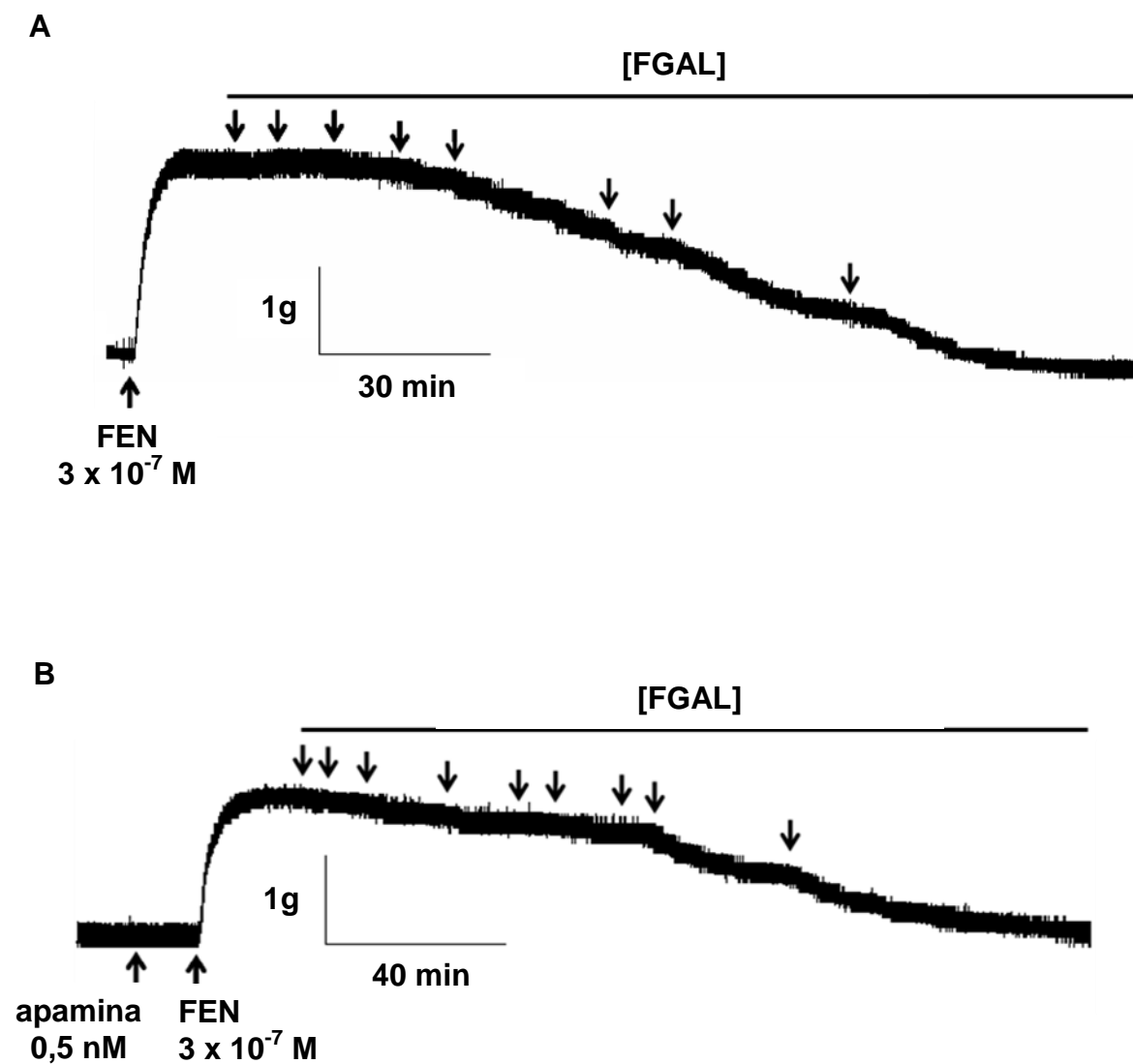
As setas para baixo sob a seta indicam a adição cumulativa de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Figura 19 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta pré-contráida com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (A) e na presença de 10^{-5} M de glibenclamida (B).



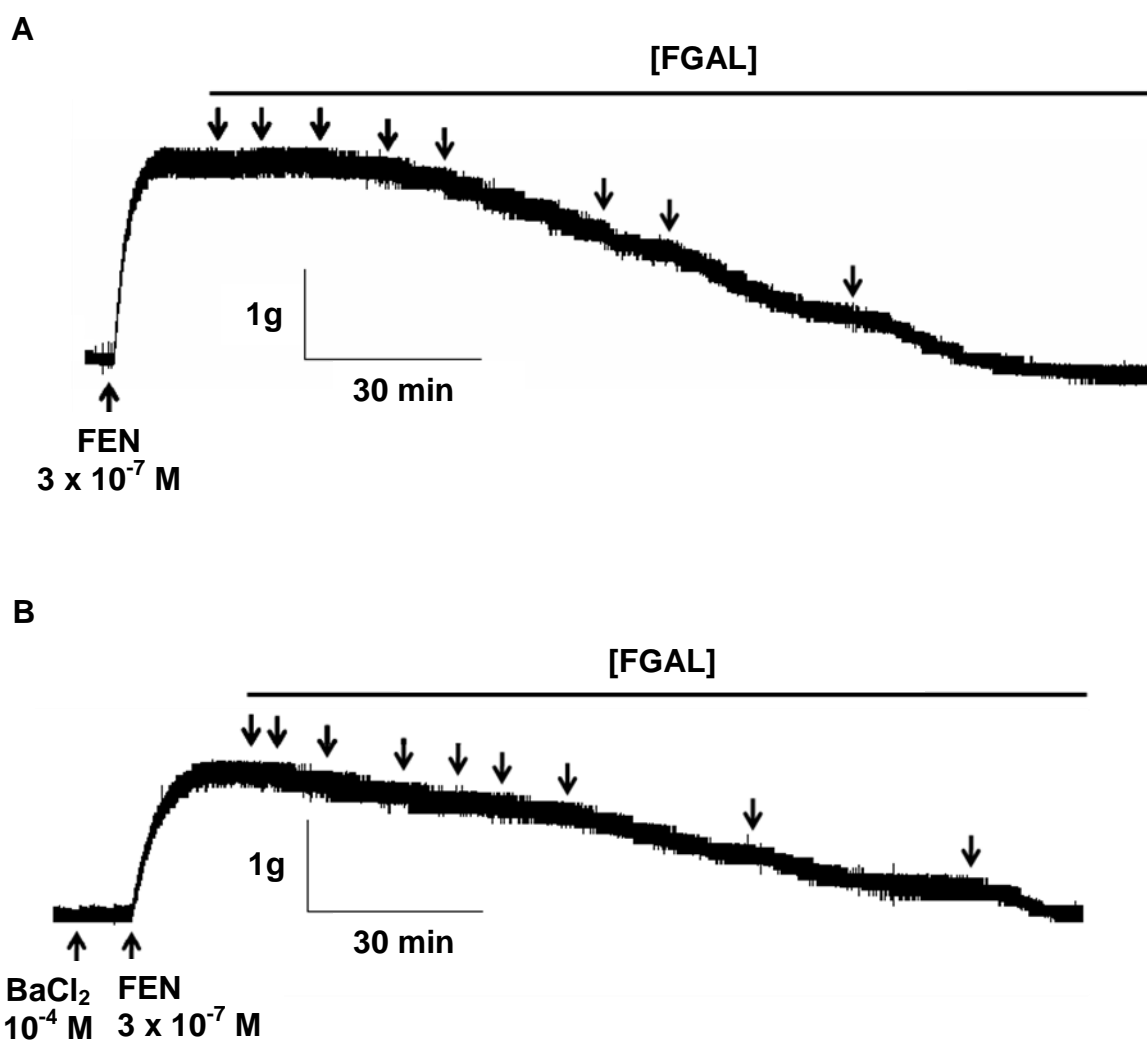
As setas para baixo sob a barra indicam a adição cumulativa de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} , respectivamente (MACÊDO, 2012).

Figura 20 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta pré-contraída com 3×10^{-7} M FEN, na ausência (A) e na presença de 5×10^{-8} M de apamina (B).



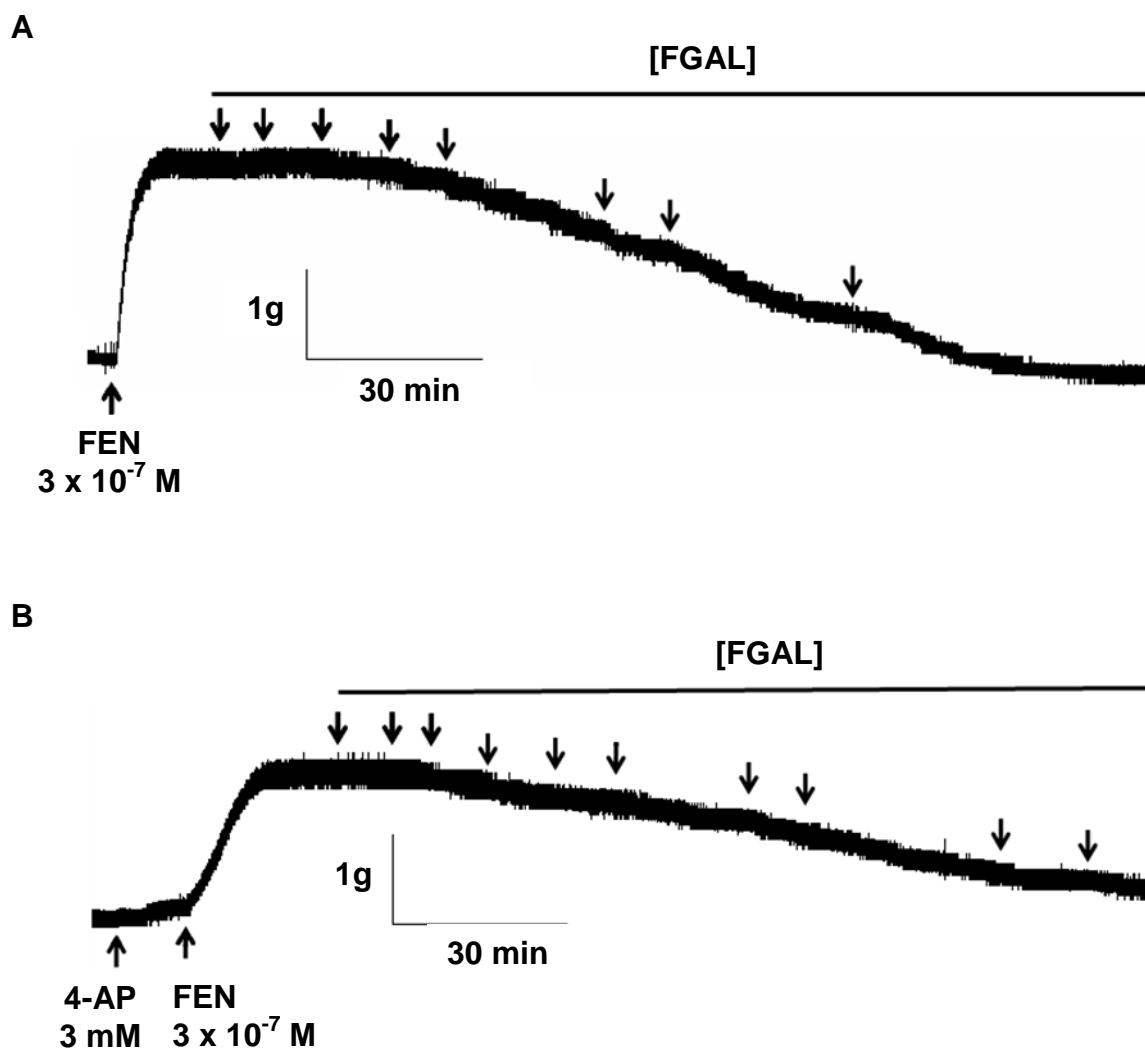
As setas sob a barra indicam a adição cumulativa de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Figura 21 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta pré-contráida com 3×10^{-7} M FEN, na ausência (A) e na presença de 10^{-4} M de BaCl_2 (B).



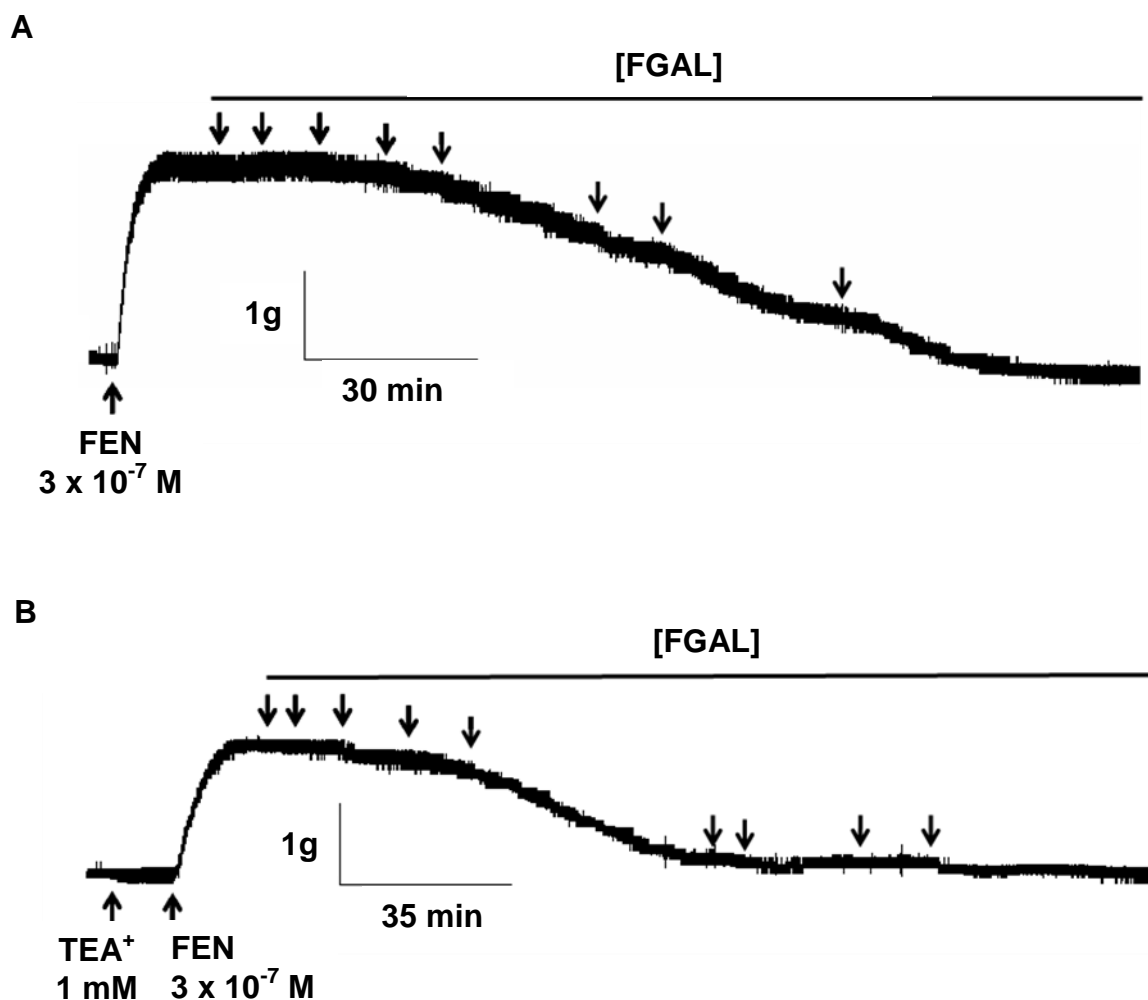
As setas para baixo sob a barra indicam a adição cumulativa de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Figura 22 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta pré-contraída com 3×10^{-7} M FEN, na ausência (A) e na presença de 3 mM de 4-AP (B).



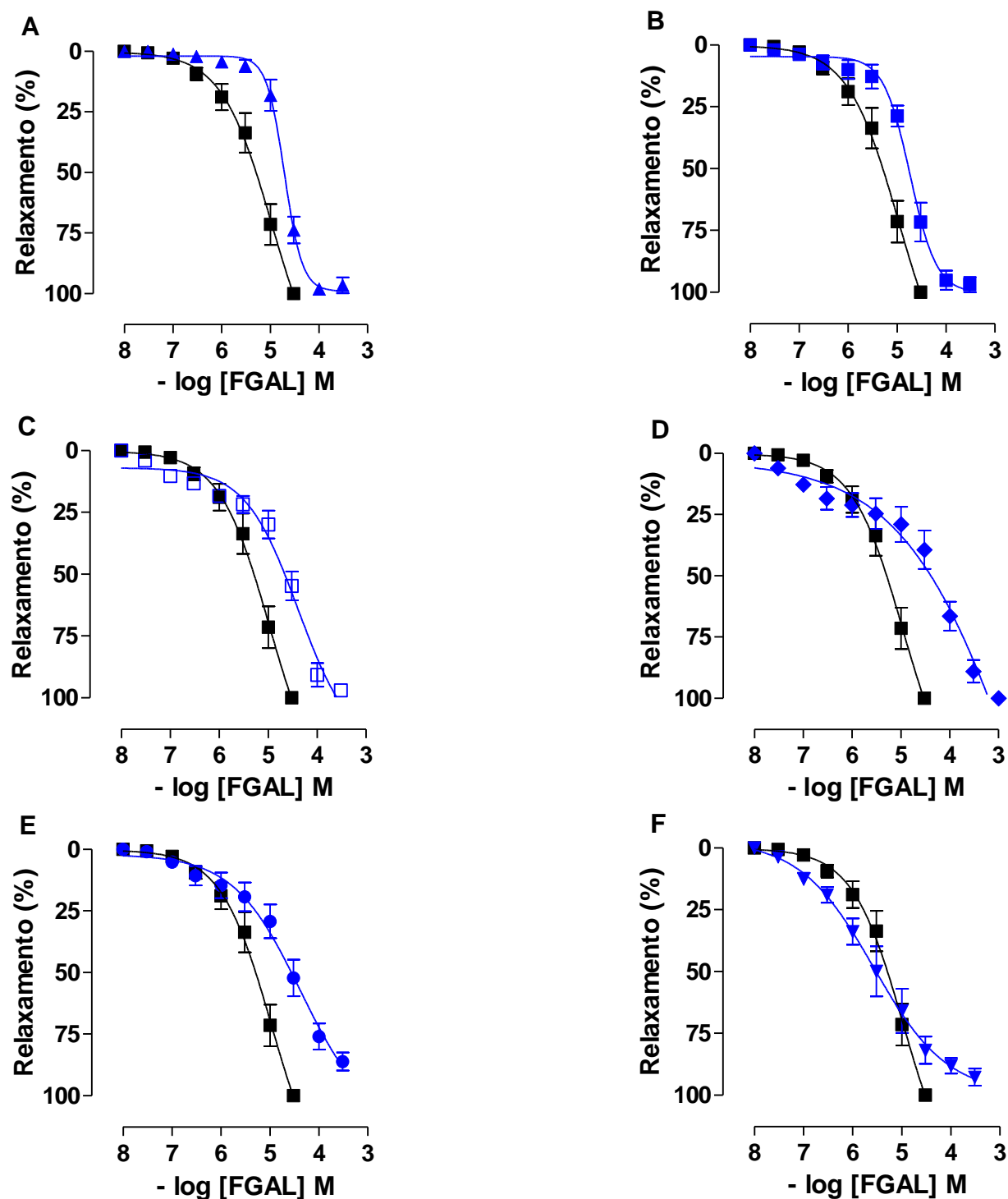
As setas para baixo sob a barra indicam a adição cumulativa de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Figura 23 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta pré-contraída com 3×10^{-7} M FEN, na ausência (A) e na presença de 1 mM de TEA⁺ (B).



As setas para baixo sob a barra indicam a adição cumulativa de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Gráfico 11 - Efeito vasorrelaxante de FGAL sobre a aorta pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (■) e na presença de TEA⁺ (10 mM) (▲) (A); glibenclamida (■) (B); apamina (□) (C); BaCl₂ (◆) (D); 4-AP (●) (E); TEA⁺ (1 mM) (▼) (F).



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5 animais) (MACÊDO, 2012).

4.4.2.2 Análise comparativa entre os valores da pD_2 de FGAL na ausência e presença dos bloqueadores de canais de K^+

O flavonoide FGAL apresentou efeito espasmolítico em aorta isolada de rato através da ativação dos canais de K^+ (K_{ATP} , SK_{Ca} , K_{ir} e K_V) (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores de CE_{50} e pD_2 de FGAL na ausência e na presença de bloqueadores de canais de K^+ em aorta isolada de rato.

Condição	CE_{50} (M)	pD_2
FGAL	$5,0 \pm 0,5 \times 10^{-6}$	$5,35 \pm 0,11$
FGAL+TEA ⁺ (10 mM)	$2,0 \pm 0,3 \times 10^{-5}$	$4,17 \pm 0,06^{**}$
FGAL+glibenclamida	$1,6 \pm 0,2 \times 10^{-5}$	$4,80 \pm 0,05^{**}$
FGAL+apamina	$2,0 \pm 0,5 \times 10^{-5}$	$4,75 \pm 0,11^{**}$
FGAL+BaCl ₂	$3,1 \pm 0,9 \times 10^{-5}$	$4,63 \pm 0,18^{**}$
FGAL+4-AP	$1,7 \pm 0,5 \times 10^{-5}$	$4,82 \pm 0,11^*$
FGAL+TEA ⁺ (1 mM)	$3,5 \pm 1,0 \times 10^{-6}$	$5,58 \pm 0,17$

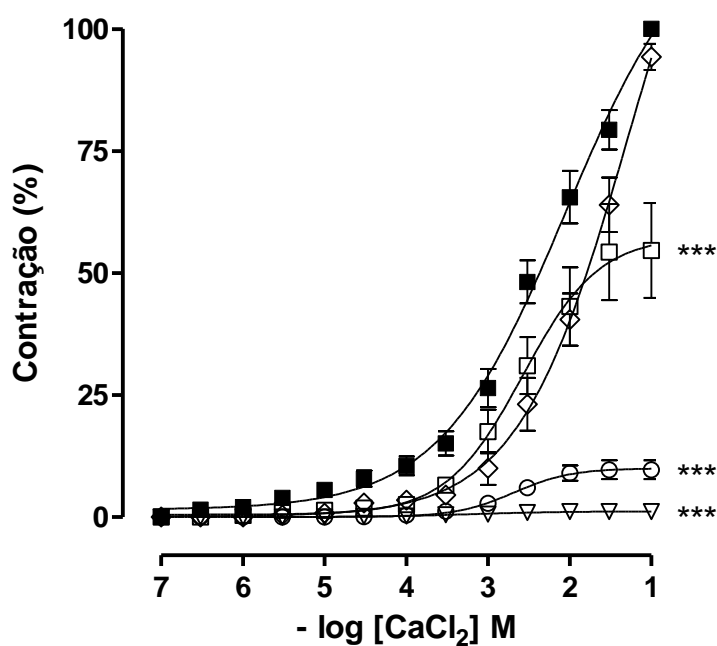
Teste *t*: * $p < 0,05$ (FGAL vs FGAL+4-AP), ** $p < 0,001$ (FGAL vs bloqueadores) (MACÊDO, 2012).

4.4.3 Avaliação do efeito de FGAL sobre o influxo e liberação do RS de Ca^{2+}

4.4.3.1 Efeito de FGAL frente às contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem cálcio

FGAL nas concentrações de 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, inibiu as contrações induzidas pela adição de CaCl_2 (10^{-7} a 10^{-1} M) em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} . As curvas cumulativas ao CaCl_2 foram desviadas para direita de forma não paralela, com inibição do E_{max} o que caracteriza um antagonismo do tipo não competitivo (Gráfico 12). Os valores de E_{max} do CaCl_2 foram 100% (controle) e na presença das concentrações 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M de FGAL foram, respectivamente, de $94,3 \pm 2,7$; $54,6 \pm 9,7$; $9,7 \pm 1,9$; e $1,1 \pm 0,9$ %, apresentando uma redução significativa em relação ao controle.

Gráfico 12 - Efeito de FGAL frente às curvas concentrações-resposta, em resposta à adição cumulativa de CaCl_2 , em anéis de aorta de rato na ausência (■) e na presença de 10^{-5} (◇), 3×10^{-5} (□), 10^{-4} (○) e 3×10^{-4} M (▽) de FGAL.

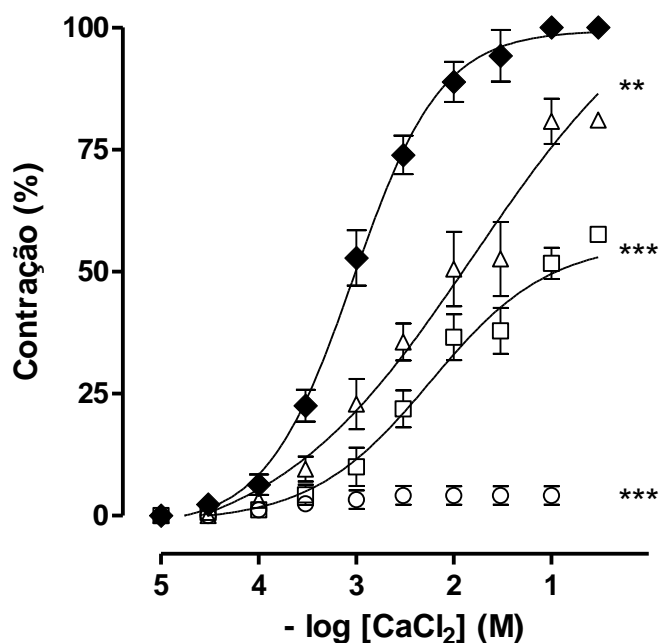


Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$ animais). *** $p < 0,001$ (teste t não-pareado: controle vs FGAL) (MACÊDO, 2012).

4.4.3.2 Efeito de FGAL frente às contrações induzidas por CaCl_2 na presença de verapamil e fenilefrina

FGAL nas concentrações de 3×10^{-6} , 10^{-5} e 3×10^{-5} M, inibiu, as contrações induzidas pela adição de CaCl_2 (10^{-5} a 3×10^{-1} M) na presença de verapamil e de fenilefrina. As curvas cumulativas ao CaCl_2 foram desviadas para direita de forma não paralela e com inibição do E_{\max} (Gráfico 13). Os valores de E_{\max} do CaCl_2 na presença das concentrações de 3×10^{-6} , 10^{-5} e 3×10^{-5} M de FGAL foram, respectivamente, de $81,3 \pm 4,6 \%$, $47,64 \pm 4,6 \%$ e $4,14 \pm 1,9\%$, apresentando uma redução significativa em relação ao controle (100%).

Gráfico 13 - Efeito de FGAL frente às curvas concentrações-resposta, em resposta à adição cumulativa de CaCl_2 , na presença de verapamil e de fenilefrina, em anéis de aorta isolada de rato na ausência (◆) e na presença de 3×10^{-6} (Δ), 10^{-5} (\square) e 3×10^{-5} M (○) de FGAL.

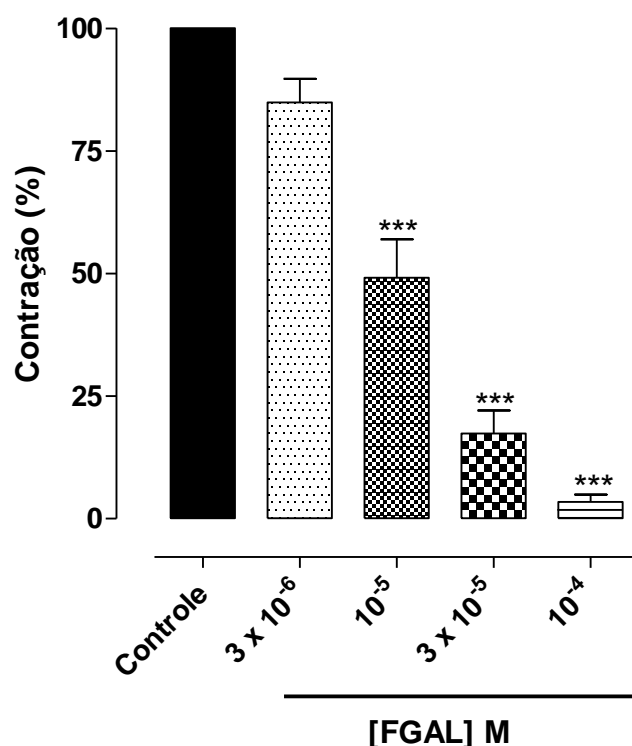


Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$ animais). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (teste t não-pareado: controle vs FGAL) (MACÊDO, 2012).

4.4.3.3 Efeito de FGAL sobre a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático sensíveis à FEN

FGAL (3×10^{-6} – 10^{-4} M) inibiu as contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de FEN em meio livre de Ca^{2+} resultante da liberação de Ca^{2+} a partir do retículo sarcoplasmático (RS) (Gráfico 14) apresentando $\text{CI}_{50} = 1,0 \pm 0,1 \times 10^{-5}$ M e $\text{E}_{\text{max}} = 96,6\%$ obtido na concentração de 10^{-4} M.

Gráfico 14 - Efeito de FGAL frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de FEN, com meio livre de Ca^{2+} em aorta isolada de rato.



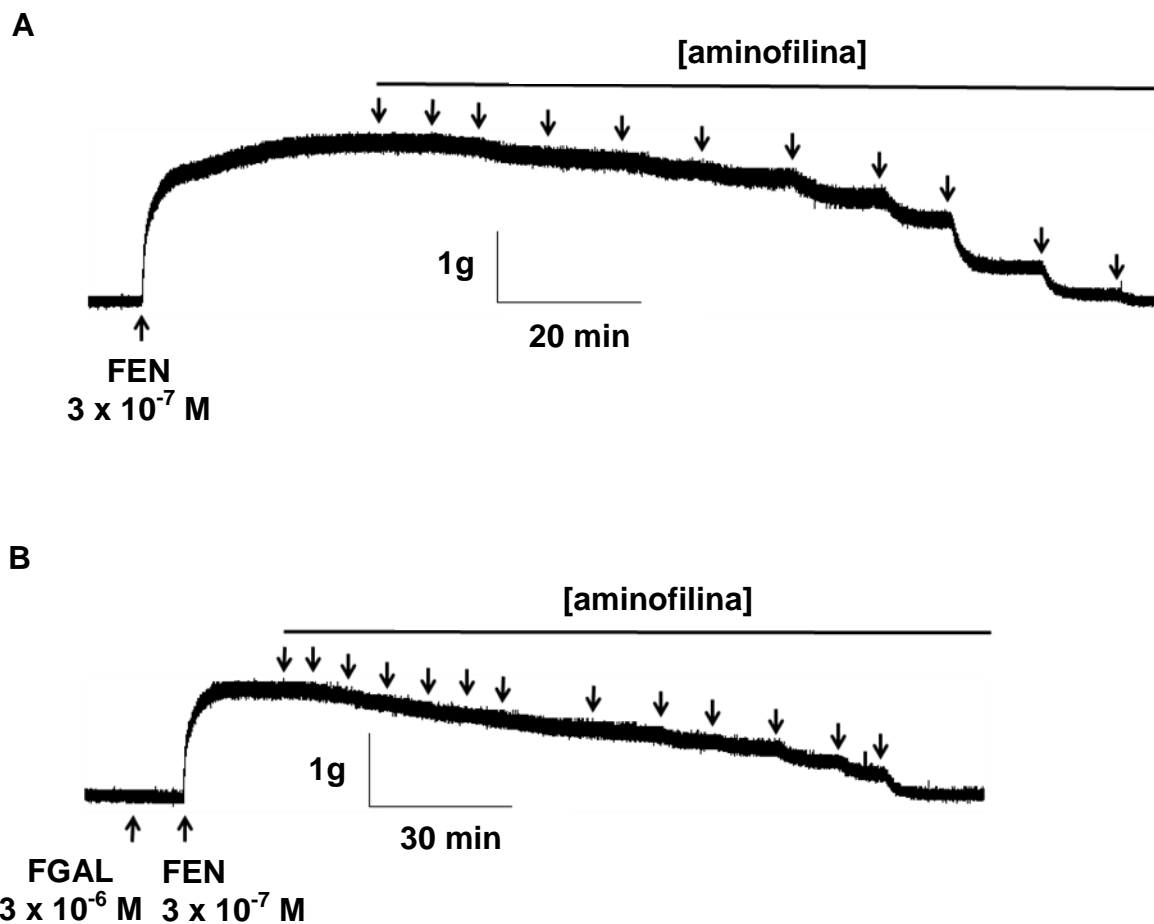
(controle vs FGAL; ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$) ($n = 5$ animais) (MACÊDO, 2012).

4.4.4 Avaliação da participação de nucleotídeos cíclicos no efeito relaxante de FGAL em aorta isolada de rato

4.4.4.1 Efeito vasorrelaxante da aminofilina na ausência e na presença de FGAL

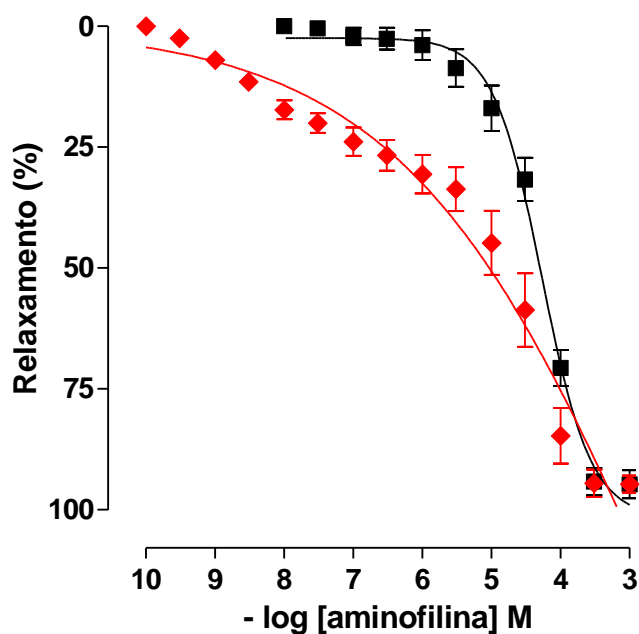
A adição cumulativa da aminofilina (10^{-10} - 10^{-3} M), um inibidor não seletivo de PDE, relaxou os anéis de aorta isolada de rato pré-contraídos com FEN ($pD_2 = 4,36 \pm 0,09$). Esse relaxamento foi potencializado em cerca de 4 vezes na presença de 3×10^{-6} M de FGAL ($pD_2 = 5,13 \pm 0,24$) (Figura 24, gráfico 15 e tabela 8).

Figura 24 - Registro representativo do efeito relaxante de aminofilina em aorta de rato pré-contraindida com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (A) e na presença de 3×10^{-6} M de FGAL (B).



As setas para baixo sob a barra indicam a adição cumulativa de aminofilina nas concentrações de 10^{-10} , 3×10^{-10} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Gráfico 15 - Efeito vasorrelaxante de aminofilina sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (■) e na presença (♦) de 3×10^{-6} M de FGAL.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$ animais) (MACÊDO, 2012).

Tabela 8 - Valores de pD_2 do efeito relaxante da aminofilina em aorta de rato pré-contraída com FEN, na ausência e presença de FGAL.

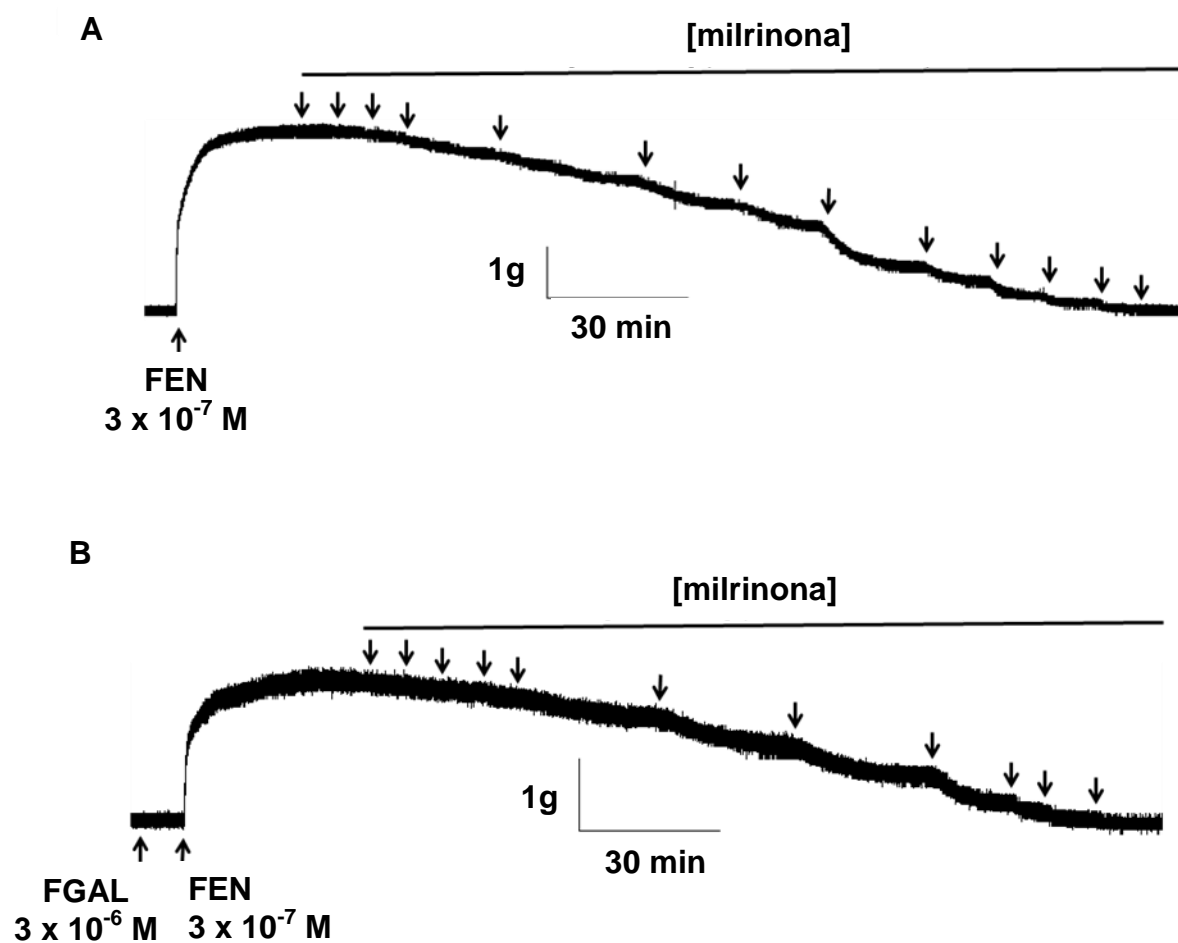
Condição	pD_2
Aminofilina	$4,36 \pm 0,09$
FGAL + aminofilina	$5,13 \pm 0,24^{**}$

Teste t : $^{**}p < 0,01$ (aminofilina vs FGAL + aminofilina) (MACÊDO, 2012).

4.4.4.2 Efeito vasorrelaxante de milrinona na ausência e presença de FGAL

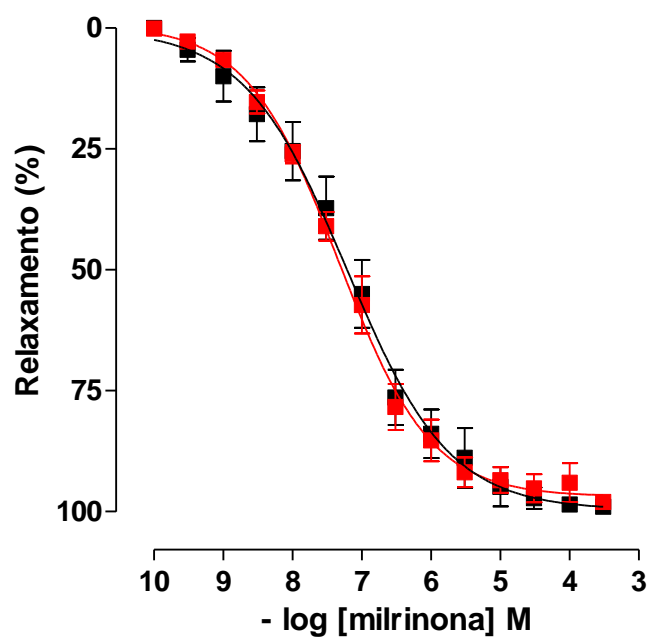
A adição cumulativa de milrinona (10^{-10} - 3×10^{-4} M), um inibidor seletivo de PDE III, relaxou os anéis de aorta isolada de rato pré-contraídos com FEN ($pD_2 = 7,23 \pm 0,23$). Esse relaxamento não foi alterado na presença de 3×10^{-6} M de FGAL ($pD_2 = 7,28 \pm 0,09$) (Figura 25, gráfico 16 e tabela 9).

Figura 25 - Registro representativo do efeito relaxante de milrinona sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M FEN, na ausência (A) e na presença de 3×10^{-6} M de FGAL (B).



As setas para baixo sob a barra indicam a adição cumulativa de milrinona nas concentrações de 10^{-10} , 3×10^{-10} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Gráfico 16 - Efeito vasorrelaxante de milrinona sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (■) e na presença (■) de 3×10^{-6} M de FGAL.



Os símbolos e as barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente ($n = 5$ animais) (MACÊDO, 2012).

Tabela 9 - Valores de pD_2 do efeito relaxante de milrinona em aorta de rato pré-contraída com FEN na ausência e presença de FGAL.

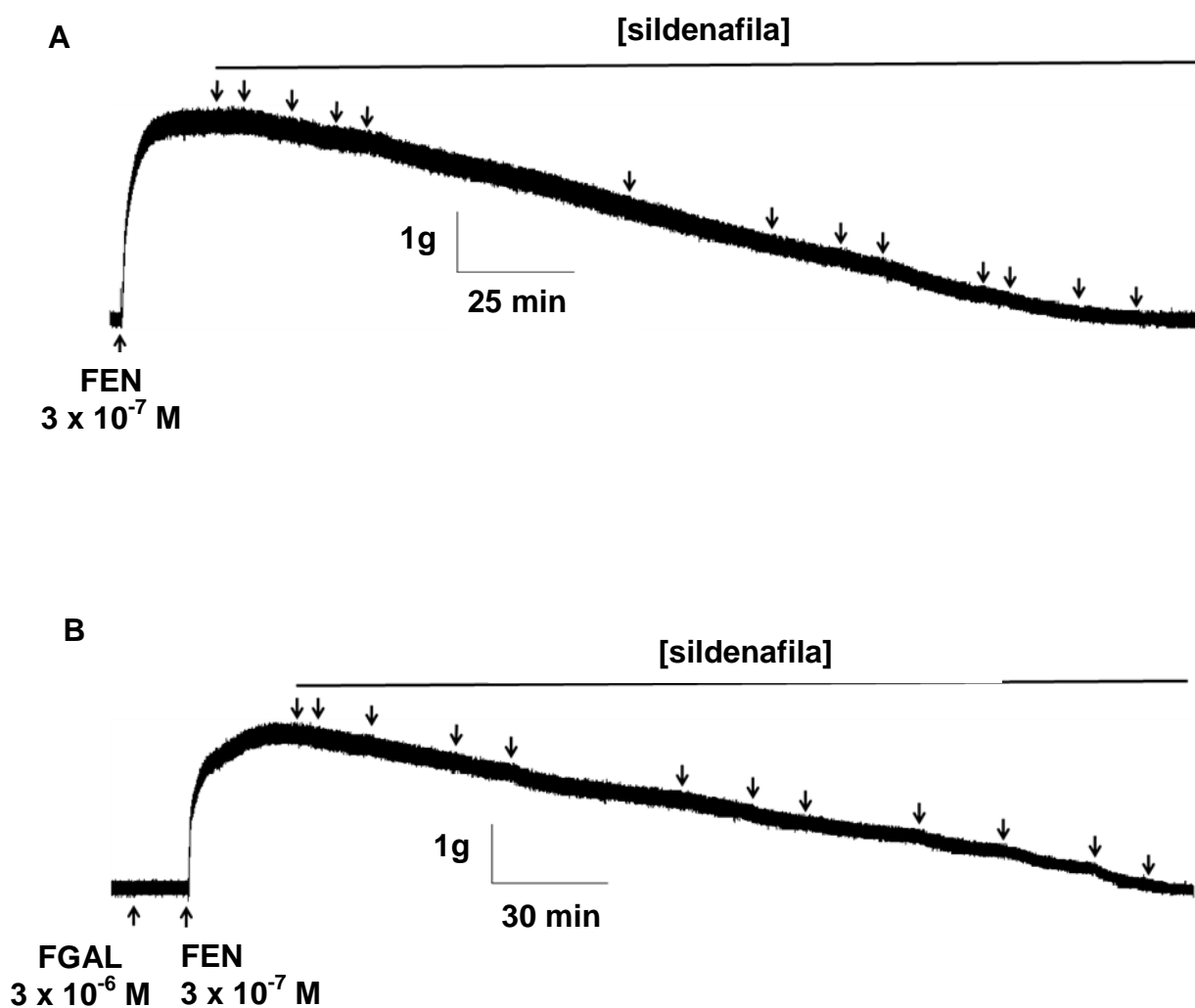
Condição	pD_2
Milrinona	$7,23 \pm 0,23$
FGAL + milrinona	$7,28 \pm 0,09$

Teste t (milrinona vs FGAL + milrinona) (MACÊDO, 2012).

4.4.4.3 Efeito vasorrelaxante de sildenafil na ausência e presença de FGAL

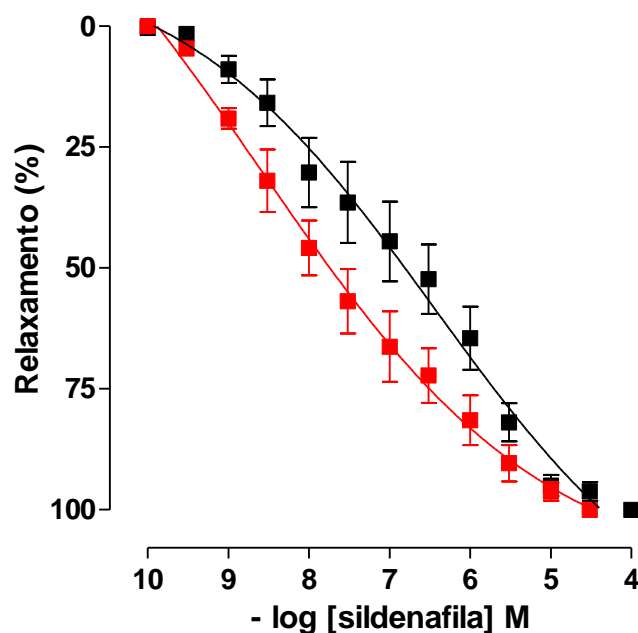
A adição cumulativa de sildenafil (10^{-8} - 10^{-4} M), um inibidor seletivo de PDE V, relaxou os anéis de aorta isolada de rato pré-contraídos com FEN ($pD_2 = 6,84 \pm 0,25$). Esse relaxamento foi potencializado em cerca de 9 vezes na presença de 3×10^{-6} M de FGAL ($pD_2 = 7,62 \pm 0,22$) (Figura 26, gráfico 17 e tabela 10).

Figura 26 - Registro representativo do efeito relaxante de sildenafila sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M FEN, na ausência (A) e na presença de 3×10^{-6} M de FGAL (B).



As setas para baixo sob a barra indicam a adição cumulativa de sildenafila nas concentrações de 10^{-10} , 3×10^{-10} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Gráfico 17 - Efeito vasorrelaxante de sildenafila sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência (■) e na presença (■) de 3×10^{-6} M de FGAL.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$ animais) (MACÊDO, 2012).

Tabela 10 - Valores de pD_2 do efeito relaxante da sildenafila em aorta de rato pré-contraída com FEN na ausência e presença de FGAL.

Condição	pD_2
Sildenafila	$6,84 \pm 0,25$
FGAL + sildenafila	$7,62 \pm 0,22^*$

Teste t : $*p < 0,05$ (sildenafila vs FGAL + sildenafila) (MACÊDO, 2012).

4.4.4.4 Análise comparativa entre os valores da pD_2 de inibidores de fosfodiesterases na ausência e presença de FGAL

Os inibidores de fosfodiesterases (PDE) aminofilina, milrinona e sildenafil relaxaram a aorta de rato pré-contráida com 3×10^{-7} M de FEN, na ausência de FGAL ($pD_2 = 4,36 \pm 0,09$), ($pD_2 = 7,23 \pm 0,23$) e ($pD_2 = 6,84 \pm 0,25$), respectivamente. Na presença de FGAL os valores de pD_2 foram ($pD_2 = 5,13 \pm 0,24$), ($pD_2 = 7,28 \pm 0,09$) e ($pD_2 = 7,62 \pm 0,22$), respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores de pD_2 de inibidores de PDE na ausência (-) e na presença (+) de FGAL em aorta isolada de rato

Inibidor de PDE	pD_2 (- FGAL)	pD_2 (+ FGAL)
aminofilina	$4,36 \pm 0,09$	$5,13 \pm 0,24^*$
milrinona	$7,23 \pm 0,23$	$7,28 \pm 0,09$
sildenafil	$6,84 \pm 0,25$	$7,62 \pm 0,22^*$

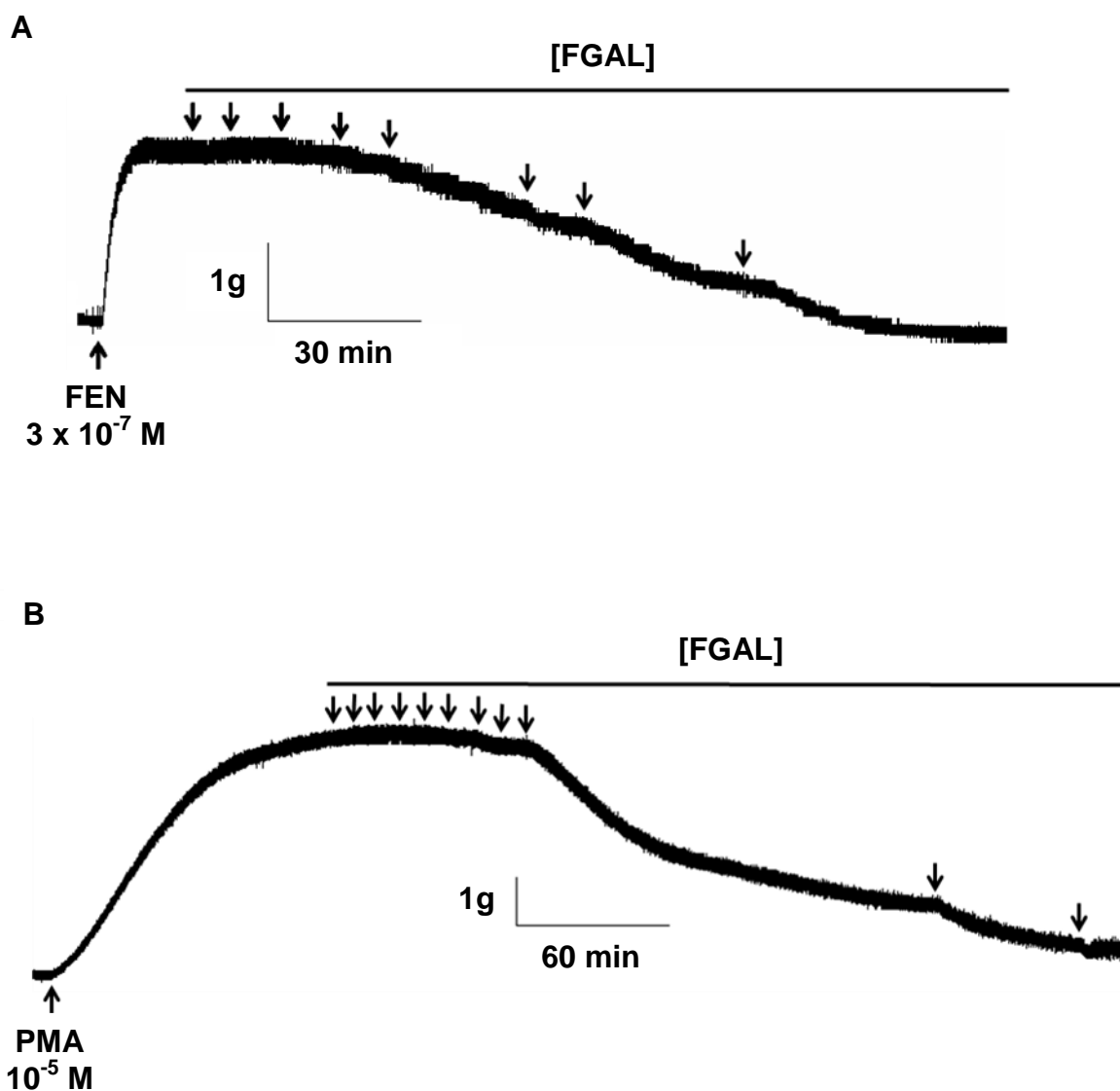
Teste *t* de Student: $*p < 0,05$ (inibidores de PDE vs FGAL + inibidores de PDE) (MACÊDO, 2012).

4.4.5 Avaliação da participação da PKC no efeito relaxante de FGAL em aorta isolada de rato

4.4.5.1 Efeito vasorrelaxante de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por FEN ou PMA

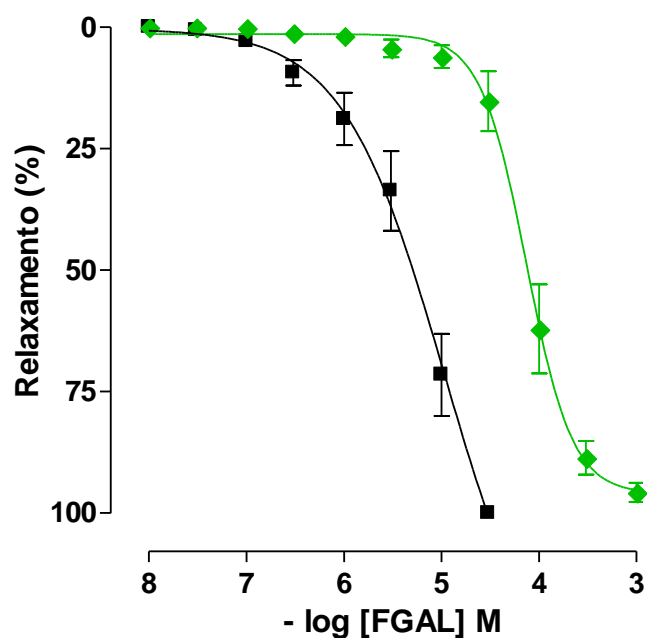
A adição cumulativa de FGAL (10^{-8} - 10^{-3} M) relaxou os anéis de aorta isolada de rato pré-contraídos com 3×10^{-7} M FEN ($pD_2 = 5,36 \pm 0,11$) ou com 10^{-5} M de PMA ($pD_2 = 4,17 \pm 0,1$), um ativador da PKC (Figura 27, gráfico 18 e tabela 12). O E_{max} foi obtido com 3×10^{-5} M de FGAL nas contrações induzidas por FEN, sendo menor nas contrações induzidas por PMA (95,7%) e obtido com uma concentração maior de FGAL (10^{-3} M). O efeito relaxante de FGAL foi reduzido 16 vezes quando a aorta foi pré-contraída com PMA.

Figura 27 - Registro representativo do efeito relaxante de FGAL sobre a aorta de rato pré-contrainda com 3×10^{-7} M FEN (A) ou 10^{-5} M de PMA (B).



As setas para baixo sob a seta indicam a adição cumulativa de FGAL nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} e 10^{-3} M, respectivamente (MACÊDO, 2012).

Gráfico 18 - Efeito vasorrelaxante de FGAL sobre a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de FEN (■) ou 10^{-5} M de PMA (♦).



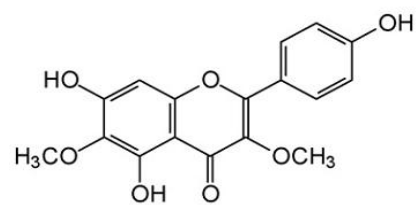
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$ animais) (MACÊDO, 2012).

Tabela 12 - Valores de pD_2 do efeito relaxante de FGAL em aorta de rato pré-contraída com FEN ou PMA.

Condição	pD_2
FEN	$5,36 \pm 0,11$
PMA	$4,17 \pm 0,10^{***}$

Teste " t ": $***p < 0,001$ (FEN vs PMA) (MACÊDO, 2012).

5 Discussão



Neste estudo investigou-se o efeito do flavonoide 3,6-dimetil éter galeatina (FGAL), isolado das partes aéreas de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke em eritrócitos de rato, útero de rata, íleo e traqueia de cobaia e aorta de rato. FGAL não apresentou efeito citotóxico em eritrócitos de rato, mas possui efeito espasmolítico não seletivo nos quatro órgãos testados, sendo mais potente em produzir efeito espasmolítico em aorta.

Inicialmente avaliou-se o efeito citotóxico e citoprotetor de FGAL em eritrócitos de ratos, uma vez que os eritrócitos fornecem um modelo simples para estudar o efeito protetor ou tóxico de uma grande variedade de substâncias (LEXIS; FASSETT; COOMBES, 2006; EISELE et al., 2006), por ser um tipo de célula muito susceptível à lise (BRANDÃO et al., 2005). Dessa forma, esse modelo experimental fornece informações iniciais no que diz respeito à citotoxicidade ou citoproteção de uma determinada substância.

Na avaliação da citotoxicidade de FGAL, verificou-se que esse flavonoide apresenta baixo efeito citotóxico nas concentrações de 3×10^{-5} e 10^{-4} M, evidenciado pela ausência de hemólise (Gráfico 1).

Uma vez que, FGAL não apresentou lise da membrana dos eritrócitos, decidiu-se avaliar se esse flavonoide era capaz de proteger as hemácias contra a lise. Para tanto, os eritrócitos foram expostos a diferentes concentrações de NaCl (0,12; 0,36; 0,60 e 0,90%), ou seja, condições de hipotonia e isotonia, na ausência e na presença de FGAL. Quando as hemácias se encontram em um meio hipotônico há osmose, aumento do volume celular e rompimento da célula; já no meio isotônico as células se encontram em equilíbrio com o meio extracelular, não haverá osmose e essas células não se rompem. Nas concentrações de FGAL avaliadas (3×10^{-5} e 10^{-4} M), esse flavonoide não foi capaz de inibir a lise celular nos diferentes meios aos quais essas células foram submetidas o que sugere que FGAL não apresenta efeito citoprotetor (Gráfico 2).

Portanto, FGAL apresenta baixo efeito citotóxico e não tem efeito citoprotetor nas concentrações investigadas em eritrócitos de rato.

O fato de vários flavonoides serem descritos na literatura por apresentarem efeito espasmolítico, como: genisteína, quenferol e quercetina em

útero de rata (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997), 3,7,8,4'-tetra-O-metilgossipetina e 3,7-di-O-metilcanferol em aorta de rato (SILVA, 2005), retusina e me-retusina em íleo de cobaia (SANTOS, 2007), isoliquiritigenina em jejuno, íleo e reto de camundongo (SATO et al., 2006), diplotropina (3,4,5, 8-tetrametoxi-6,7,2',3'-furanoflavona) em íleo de cobaia e útero de rata (LIMA, 2008); associado ao fato de FGAL ter apresentado baixa toxicidade nas concentrações de 3×10^{-5} e 10^{-4} M, concentrações essas submáxima e máxima, respectivamente, usadas na investigação da atividade espasmolítica; aliado a ausência de estudos no que diz respeito a atividade espasmolítica de FGAL, motivou esse grupo de pesquisa a investigar um possível efeito espasmolítico desse flavonoide em útero de rata, íleo e traqueia de cobaia e aorta de rato.

A investigação preliminar de uma possível atividade espasmolítica de FGAL demonstrou que esse flavonoide inibiu as contrações fásicas induzidas por ocitocina (agonista dos receptores OT) ($CI_{50} = 2,2 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M) e por carbacol (agonista dos receptores muscarínicos) ($CI_{50} = 7,7 \pm 1,3 \times 10^{-5}$ M) em útero de rata, ambos receptores acoplados a proteína $G_{q/11}$ (Gráfico 3). Os valores de CI_{50} apresentaram diferença significativa, sendo que FGAL foi mais potente em inibir as contrações induzidas por ocitocina. Esses resultados são sugestivos de que o efeito espasmolítico de FGAL em útero de rata pode estar acontecendo por bloqueio dos receptores desses agonistas, mas outros experimentos são necessários para confirmar esses dados.

Em íleo de cobaia, FGAL inibiu de maneira equipotente as contrações fásicas induzidas por carbacol (CCh) ($CI_{50} = 2,6 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M) e por histamina ($CI_{50} = 2,3 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M) (Gráfico 4), os quais são agonistas dos receptores muscarínicos (M_3) e histaminérgicos (H_1), respectivamente e compartilham a mesma via de sinalização, após ativação do receptor. O fato de FGAL ter inibido as contrações induzidas por ambos os agonistas utilizados de maneira equipotente é sugestivo de que o flavonoide não está agindo em nível de receptor, mas, possivelmente, em um passo comum da via de sinalização que induz a contração por estes agonistas.

Nas vias aéreas, as células epiteliais modulam o tônus basal e a reatividade do músculo liso por liberação de fatores relaxantes derivados do epitélio (FRDEp) (HASHIBA et al., 1999), tais como óxido nítrico (NO) (NIJKAMP et al., 1993) e prostaglandinas (FARMER et al., 1987). Em condições patológicas, como na asma brônquica, há uma liberação aumentada de mediadores broncoconstritores como a histamina e acetilcolina (ACh) (GROSS, 1988; HOLGATE, 1994).

Dessa forma, decidiu-se investigar se FGAL apresenta ação sobre o tônus basal da traqueia ou sobre esse órgão pré-contraído com CCh. Os ensaios farmacológicos mostraram que o flavonoide em estudo não alterou o tônus basal da traqueia de cobaia. Porém, quando a traqueia foi pré-contraída com carbacol FGAL apresentou efeito relaxante de forma equipotente na ausência ($pD_2 = 5,11 \pm 0,07$) e na presença ($pD_2 = 5,02 \pm 0,07$) de epitélio funcional (Gráfico 5). O fato de FGAL não interferir sobre o tônus basal do músculo liso de traqueia é importante e sugere que essa substância não atua nesse órgão em condições fisiológicas normais. Porém, FGAL apresentou efeito relaxante sobre a traqueia pré-contraída com CCh, o que é muito interessante e sugere que o efeito do flavonoide sobre a traqueia de cobaia ocorre em condições onde esse órgão se encontra contraído, fato esse comum em condições patológicas como na asma, onde há liberação de substâncias broncoconstritoras como a ACh.

O NO apresenta um importante papel nas funções das vias aéreas em condições fisiológicas e patológicas (TOQUE et al., 2010), promovendo o relaxamento das vias aéreas através da ativação da ciclase de guanilil solúvel (CGs), com consequente aumento nas concentrações intracelulares de GMPc (GARTHWAITE et al., 1995). Já as prostaglandinas, formadas a partir do ácido araquidônico, como a PGE_2 e PGI_2 contribuem de forma significativa na regulação do tônus das vias aéreas através do relaxamento do músculo liso (RUAN; ZHOU; CHAN, 2011). A equipotência de FGAL em relaxar a traqueia na ausência e presença de epitélio, sugere que o efeito relaxante desse flavonoide em traqueia de cobaia não envolve a participação de FRDEp, como o NO e prostaglandinas.

Nos vasos sanguíneos, o tônus vascular é determinado pelo estado de contração das células do músculo liso dos vasos, o qual é regulado pela

concentração intracelular de cálcio. O endotélio apresenta uma importante função no processo de regulação do tônus do músculo liso vascular através da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE) (TÖRÖK, 2000), incluindo o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE), óxido nítrico (NO), as prostaciclinas e os ácidos epoxieicosatrienoicos (EDWARDS; FÉLÉTOU; WESTON, 2010). Sabendo-se da importância do tônus do músculo liso vascular sobre a homeostase do organismo, e que várias patologias estão implicadas com alterações no tônus muscular, como a hipertensão arterial, aterosclerose, insuficiência cardíaca e isquemia (PEREZ-VIZCAINO; DUARTE, 2010), resolveu-se avaliar se FGAL altera o tônus muscular da aorta de rato.

A adição de FGAL a aorta em condições de repouso não alterou esse estado, mostrando que o flavonoide não modifica o tônus basal da aorta de rato. Esse fato é bastante interessante e sugere que FGAL não interfere no tônus de vasos sanguíneos fisiologicamente normais. Resultados semelhantes foram obtidos em traqueia.

Em aorta de rato, o efeito vasorrelaxante promovido por FGAL foi independente de FRDE, pois esse flavonoide relaxou a aorta pré-contraída com fenilefrina de maneira equipotente na presença ($pD_2 = 5,31 \pm 0,10$) e na ausência ($pD_2 = 5,35 \pm 0,11$) de endotélio funcional (Gráfico 6). Esse fato sugere que, semelhante a traqueia de cobaia, o efeito de FGAL não envolve as vias de sinalização dependentes do endotélio funcional como FHDE, NO, prostaciclinas e ácidos epoxieicosatrienoicos e indica que o mecanismo de ação de FGAL para promover o efeito vasorrelaxante ocorre em nível de células do músculo liso vascular. Como FGAL apresentou efeito espasmolítico em aorta pré-contraída com fenilefrina, pode-se sugerir que o efeito de FGAL ocorre em condições onde os vasos sanguíneos se encontram com o tônus basal alterado, como é o caso da hipertensão e insuficiência cardíaca, onde essas patologias desencadeiam ativação do sistema nervoso simpático, com liberação de noradrenalina nas terminações nervosas adrenérgicas e adrenalina pelas glândulas suprenais, promovendo vasoconstrição e aumento da resistência vascular periférica.

Uma vez demonstrado que FGAL apresenta efeito espasmolítico não seletivo nos quatro órgãos avaliados e que esse efeito foi mais potente em aorta de rato seguida de traqueia de cobaia, decidiu-se investigar o mecanismo de ação espasmolítico nesses dois órgãos.

Dois mecanismos importantes que participam dos processos de contração e relaxamento do músculo liso envolvem a modulação de canais de K^+ e de Ca^{2+} , onde a ativação de canais de K^+ ou o bloqueio de canais de Ca^{2+} promovem relaxamento nesse músculo (WRAY, BURDYGA, NOBLE, 2005).

A relação entre o aumento da atividade dos canais de K^+ , promovendo hiperpolarização do músculo liso e consequente bloqueio do influxo de Ca^{2+} , desencadeando relaxamento desse músculo vem sendo estudada em vários tipos de músculo liso. Entre esses canais pode-se destacar os SK_{Ca} em aorta de rato (SILVA et al., 1994), BK_{Ca} em traqueia de cão (WADE; SIMS, 1993) e de cobaia (HIRAMATSU et al., 1994), em aorta de coelho (DEMIREL et al., 1994), em miométrio humano (MEERA et al., 1995), em artérias submucosas e mesentéricas de cobaia (HILL et al., 1997) e em íleo de cobaia (HONG; ROAN; CHANG, 1997; SILVA; NOUAILHETAS; ABOULAFIA, 1999).

Em traqueia de cobaia, as fontes de Ca^{2+} extracelulares e intracelulares são importantes no desenvolvimento da tensão muscular. O Ca^{2+} entra na célula através de dois tipos de canais, os canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) e os canais de cálcio operados por receptor (ROCs) (YAMAKAGE et al., 2001; EVANGELISTA et al., 2007). Em condições de elevada concentração de K^+ extracelular, a membrana das células musculares de traqueia se despolariza e ocorre a abertura dos Ca_v , promovendo o influxo de Ca^{2+} (KIRKPATRICK; JENKINSON; CAMERON, 1975). A contração decorrente da ativação dos receptores M_3 por agonistas como acetilcolina (ACh), presentes na membrana plasmática das células musculares lisas de traqueia, promove inicialmente liberação de Ca^{2+} a partir do retículo sarcoplasmático (RS), através dos receptores de IP_3 (contração fásica); seguida do influxo de Ca^{2+} através de canais insensíveis as di-hidropiridinas, os canais de cálcio operados por receptor (ROCs) (CUTHBERT et al., 1994) e dos

canais sensíveis as di-hidropiridinas, os Ca_V (PEREZ-ZOGHBI et al., 2009), promovendo uma contração sustentada.

O bloqueio dos Ca_V pode ocorrer de forma direta sobre o canal, como acontece com os bloqueadores da classe das di-hidropiridinas (nifedipino) ou indiretamente através da ativação dos canais de K^+ (cromacalim), promovendo hiperpolarização e consequente bloqueio dos Ca_V (QUEST, 1992; NAVARRO-GONZALEZ, 2009).

Com o intuito de verificar se o efeito relaxante de FGAL sobre a traqueia de cobaia, poderia envolver o bloqueio direto dos Ca_V ou indireto desses canais através da ativação dos canais de K^+ , avaliou-se o efeito de FGAL sobre a contração tônica induzida por aumento moderado na concentração extracelular de K^+ (KCl 18 mM) ou elevado aumento na concentração extracelular de K^+ (KCl 60 mM). Esse protocolo experimental é simples de ser executado e se baseia nas propriedades eletroquímicas da membrana celular. Assim, um aumento moderado na concentração extracelular de K^+ , reduz o efluxo desse íon e promove uma pequena despolarização na célula muscular suficiente para promover abertura de Ca_V . No entanto, um elevado aumento na concentração extracelular de K^+ , reduz de maneira mais intensa o efluxo desse íon e promove uma grande despolarização, suficiente para abrir uma quantidade maior de Ca_V . Dessa forma, substâncias ativadoras de canais de K^+ são mais eficientes em promover relaxamento quando o aumento na concentração extracelular de K^+ for pequeno e suficiente para que esse íon permaneça saindo da célula para gerar posterior hiperpolarização e consequente relaxamento. As substâncias bloqueadoras diretas de Ca_V são mais eficientes em promover relaxamento quando vários canais de Ca^{2+} se encontram abertos, ou seja, no experimento com elevadas concentrações extracelulares de K^+ (RAEBURN; GIEMBYCZ, 1995).

O fato de FGAL ter sido aproximadamente 19 vezes mais potente em relaxar a traqueia pré-contraída com moderadas concentrações de K^+ extracelular ($\text{pD}_2 = 5,50 \pm 0,36$) em relação a elevadas concentrações de K^+ extracelular ($\text{pD}_2 = 4,80 \pm 0,07$) (Gráfico 7), é sugestivo de que o mecanismo de ação de FGAL envolve a modulação positiva dos canais de K^+ .

Como FGAL relaxou a traqueia de cobaia de forma equipotente nas contrações induzidas por KCl 60 mM ($pD_2 = 4,83 \pm 0,08$) ou CCh ($pD_2 = 5,02 \pm 0,07$) é sugestivo de que, nesse órgão, FGAL não atua sobre os ROCs, mas age sobre os Ca_v , pois o passo comum no mecanismo de ação desses dois broncoconstritores é a ativação dos Ca_v . Caso FGAL atuasse também sobre os ROCs esperava-se que a ação espasmolítica de FGAL fosse mais potente nas contrações induzidas por CCh, uma vez que esse agonista promove contração através da participação dos Ca_v e ROCs (EVANGELISTA et al., 2007). Esses dados corroboram com o experimento utilizado para discriminar se FGAL poderia estar atuando por bloqueio direto ou indireto dos Ca_v . Assim, é possível sugerir que FGAL atua bloqueando os Ca_v , porém de forma indireta através da ativação dos canais de K^+ .

Para comprovar se FGAL estaria realmente modulando positivamente os canais de K^+ , utilizou-se como ferramenta farmacológica o bloqueador não seletivo desses canais, o íon tetraetilamônio (TEA^+) na concentração de 10 mM.

A potência relaxante de FGAL em traqueia de cobaia ($pD_2 = 5,11 \pm 0,07$) foi reduzida 2 vezes na presença de TEA^+ 10 mM, o qual nessa concentração é um bloqueador não seletivo dos canais de K^+ (NIU et al., 2008) ($pD_2 = 4,87 \pm 0,02$) (Gráfico 8), confirmando, dessa forma, a participação dos canais de K^+ no efeito relaxante de FGAL sobre o músculo liso da traqueia.

Diversos tipos de canais de K^+ são expressos pelo músculo liso das vias aéreas, sendo responsáveis pela regulação do potencial de membrana e excitabilidade, induzindo hiperpolarização e relaxamento (CAMPOS-BEDOLLA et al., 2008). Os principais canais de K^+ expressos por esse tecido são: canais de potássio ativados por voltagem (K_v) (ZHAO et al., 2004), canais de potássio retificadores de entrada (K_{ir}) (OONUMA et al., 2002), canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) (SNETKOV; WARD, 1999), canais de potássio ativados por cálcio de pequena condutância (SK_{Ca}) (GUTMAN et al., 2011b) e os canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (MURRAY; BOYLE; SMALL, 1989).

Alguns flavonoides apresentam efeito relaxante em traqueia de cobaia por ativação de canais de K^+ , entre eles isoliquiritigenina ativando os BK_{Ca} (LIU et al., 2008) e isocampferida que ativa os K_{ATP} (LEAL et al., 2006).

Para identificar qual(is) subtipo(s) de canais de K^+ participa(m) do efeito relaxante de FGAL sobre o músculo liso de traqueia, utilizaram-se bloqueadores seletivos desses canais.

A característica da equipotência de FGAL em relaxar a traqueia de cobaia, na ausência ($pD_2 = 5,13 \pm 0,07$) e presença dos bloqueadores seletivos dos canais de K^+ : TEA^+ 1 mM, o qual nessa concentração é um bloqueador seletivo dos $K_{Ca1.1}$ ($pD_2 = 5,31 \pm 0,05$); glibenclamida, bloqueador seletivo dos K_{ATP} ($pD_2 = 5,25 \pm 0,03$); 4-AP, bloqueador dos K_V , ($pD_2 = 5,04 \pm 0,06$); $BaCl_2$, bloqueador dos K_{ir} ($pD_2 = 5,28 \pm 0,06$), demonstra que esses subtipos de canais de K^+ não estão envolvidos no efeito espasmolítico de FGAL. No entanto, na presença de apamina, um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} ($pD_2 = 4,85 \pm 0,06$), a curva de relaxamento foi desviada para direita de maneira significativa, com redução da potência relaxante de FGAL, sugerindo a participação dos SK_{Ca} no efeito relaxante de FGAL sobre o músculo liso de traqueia (Tabela 4), hiperpolarizando a membrana na célula muscular da traqueia de cobaia o que provavelmente causa o bloqueio dos Ca_V e consequente relaxamento. É interessante notar que não existe diferença estatística significativa entre os valores de pD_2 de FGAL na presença do TEA^+ 10 mM ou na presença de apamina, o que reforça a hipótese de que dentre os canais de K^+ testados, apenas o SK_{Ca} está participando do mecanismo de ação relaxante de FGAL. Em experimentos realizados com útero de rata, verificou-se que o flavonoide FGAL bloqueia os canais de potássio K_V , K_{ATP} , SK_{Ca} e BK_{Ca} (CARREIRO, 2012).

Os canais de K^+ podem ser modulados positivamente pela proteína cinase dependente de AMPc (PKA) ou proteína cinase dependente de GMPc (PKG). Entre os canais de K^+ modulados positivamente pela PKA destaca-se os K_V , BK_{Ca} , K_{ATP} e K_{ir} . Outros ensaios farmacológicos mostram que a PKG pode modular positivamente os BK_{Ca} e os K_{ATP} . Além desses canais já descritos, outros canais de K^+ também podem ser modulados por PKA e/ou PKG. Essa modulação promove abertura desses canais, com consequente efluxo do íon K^+ e hiperpolarização da membrana a qual leva ao bloqueio de Ca_V e, portanto, relaxamento do músculo liso (KO et al., 2008). Dessa forma, um aumento nos níveis de AMPc e GMPc promove relaxamento do músculo liso (KOMAS; LUGNIER; STOCLET, 1991). Na maioria dos

tecidos, as concentrações e, portanto, as ações desses nucleotídeos cíclicos são reguladas por enzimas chamadas de fosfodiesterases (PDEs).

Substâncias capazes de aumentar o conteúdo intracelular de AMPc ou GMPc tem seu efeito relaxante potencializado com a inibição das PDEs em vários tecidos, incluindo o músculo liso de traqueia e vascular, devido a um acúmulo do conteúdo total desses nucleotídeos (KOMAS; LUGNIER; STOCLET, 1991; BERNAREGGI et al., 1999; LUGNIER, 2006).

Vários flavonoides isolados de espécies vegetais apresentam efeito inibitório sobre diferentes isoformas de PDEs, podendo-se citar naringenina (PDE 1, 4 e 5), icariina (PDE 5), quercetina (PDE 5), antrocianina (PDE 5) (RAHIMI et al., 2010).

O efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia envolve a participação de nucleotídeos cíclicos (AMPc e/ou GMPc), uma vez que, a potência relaxante promovida pelo inibidor inespecífico de PDEs, aminofilina ($pD_2 = 4,12 \pm 0,06$), foi aumentada na presença de FGAL ($pD_2 = 4,80 \pm 0,19$) (Gráfico 9). Além disso, FGAL inibiu a amplitude da contração induzida por CCh, como pode ser verificado na figura 15, o que reforça a participação dos nucleotídeos cíclicos no efeito relaxante induzido por FGAL. Resultados semelhantes foram obtidos por Liu et al. (2008), os quais demonstraram que o flavonoide isoliquiritigenina relaxa a traqueia de cobaia através da inibição de fosfodiesterases, como a PDE 3, 4 e 5 (ÁLVAREZ et al., 2006). Diferentemente, em útero de rata o efeito espasmolítico de FGAL não envolve a participação de fosfodiesterases (CARREIRO, 2012). Portanto, a inibição de fosfodiesterases colabora com o efeito relaxante de FGAL em traqueia de cobaia.

Em seguida, prosseguiu-se com a investigação do mecanismo de ação de FGAL em aorta de rato. Onde, o fato de não haver diferença significativa entre o relaxamento promovido por FGAL na ausência ou presença de endotélio, sugere que o mecanismo de ação desse flavonoide não envolve as vias de sinalização dependentes de endotélio (NO, prostaciclina, dentre outros) e que ocorre em nível de músculo liso vascular.

Os mecanismos da sinalização de contração do músculo liso vascular são alterados em condições patológicas. A hipertensão sistêmica é caracterizada por pressão arterial elevada, em parte devido ao aumento da resistência vascular como resultado da contratilidade do músculo liso vascular e remodelamento da parede arterial (KHALIL, 2010). Assim, substâncias que apresentam atividade vasorrelaxante são importantes na terapia dos distúrbios que acometem o sistema cardiovascular.

Vários mecanismos podem estar envolvidos no vasorrelaxamento independente de endotélio, incluindo: 1- bloqueio do influxo de Ca^{2+} extracelular através dos canais de Ca^{2+} transmembranares; 2- abertura de canais de K^+ ; 3- inibição da atividade da PKC; 4- inibição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares; 5- ativação direta da CGs; 6- inibição do aparato contrátil (CHEN et al., 2009). Estudos anteriores com flavonoides comprovam que essas substâncias podem produzir vasorrelaxamento por diferentes mecanismos de ação, como: participação de NO (DUARTE et al., 2001a), sequestro de radicais livres e proteção do NO (LOPEZ-LOPEZ, 2004), inibição da PKC (ROMERO et al., 2009), inibição de PDE (PICQ et al., 1989), bloqueio do influxo de cálcio através dos $\text{Ca}_V\text{-L}$ (SILVA, 2005), ativação de canais de potássio (IK_{Ca} , BK_{Ca}) (KHOO et al., 2010; COGOLLUDO et al., 2007).

Levando em consideração que a ativação dos canais de K^+ ou o bloqueio dos Ca_V representam dois importantes mecanismos de ação para promover vasorrelaxamento, e que FGAL promove ativação dos SK_{Ca} em traqueia de cobaia podendo bloquear indiretamente os Ca_V , resolveu-se investigar o envolvimento desses canais no efeito vasorrelaxante de FGAL em aorta de rato. Para tanto, utilizou-se o mesmo protocolo experimental já feito em traqueia alterando apenas as concentrações de K^+ extracelular. Assim, avaliou-se o efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por aumento moderado na concentração extracelular de K^+ (KCl 30 mM) ou elevado aumento na concentração extracelular de K^+ (KCl 80 mM) (GURNEY, 1994).

O fato de FGAL ter sido 10 vezes mais potente em relaxar a aorta pré-contraída com moderadas concentrações de K^+ extracelular ($\text{pD}_2 = 5,50 \pm 0,22$)

em relação a elevadas concentrações de K^+ extracelular ($pD_2 = 4,37 \pm 0,12$) (Gráfico 10), é sugestivo de que o mecanismo de ação de FGAL nesse vaso também envolve a modulação positiva dos canais de K^+ .

Para comprovar se FGAL também está modulando positivamente os canais de K^+ em aorta de rato, utilizou-se como ferramenta farmacológica um bloqueador não seletivo desses canais, o TEA^+ 10 mM (NIU et al., 2008).

FGAL relaxou o músculo liso vascular na ausência ($pD_2 = 5,35 \pm 0,11$) e na presença de TEA^+ 10 mM ($pD_2 = 4,17 \pm 0,06$) (Gráfico 11), com redução na potência relaxante de FGAL em 4 vezes na presença de TEA^+ 10 mM, confirmando a participação de canais de K^+ no efeito relaxante de FGAL em aorta de rato.

Os canais de K^+ são proteínas que apresentam a estrutura física de poro, permeáveis aos íons K^+ , estando presentes na membrana plasmática das células e apresentam várias funções nas células do músculo liso vascular, entre elas manutenção do tônus vascular, controle do potencial de membrana e vasoconstrição (KO et al., 2008).

O músculo liso vascular expressa vários tipos de canais de K^+ , incluindo os K_{ATP} , K_{ir} , K_V , BK_{Ca} , (KO et al., 2008) e os canais SK_{Ca} (ORIE; FRY; CLAPP, 2006; EDWARDS; FÉLÉTOU; WESTON, 2010).

Uma vez que foi confirmado o envolvimento dos canais de K^+ no efeito vasorrelaxante de FGAL, surge a necessidade de investigar qual(is) o(s) tipo(s) de canal(is) de K^+ participam do mecanismo de ação desse flavonoide, para isso utilizou-se bloqueadores seletivos desses canais.

O efeito relaxante de FGAL em aorta de rato foi equipotente na ausência ($pD_2 = 5,35 \pm 0,11$) e na presença de 1 mM de TEA^+ ($pD_2 = 5,58 \pm 0,17$), sugerindo que os BK_{Ca} não estão envolvidos no mecanismo de ação para promover o vasorrelaxamento de FGAL. A ativação desses canais por FGAL também foi investigada em traqueia de cobaia, onde, de forma semelhante ao achado em aorta, os mesmos não estão envolvidos no relaxamento da traqueia. Porém, a curva de relaxamento de FGAL foi desviada para direita, com redução significativa da potência relaxante do flavonoide com outros bloqueadores seletivos para outros canais de K^+ , sendo reduzida cerca de 3 vezes na presença de glibenclamida ($pD_2 = 4,80 \pm 0,05$),

6 vezes na presença de BaCl_2 ($\text{pD}_2 = 4,63 \pm 0,18$), 3 vezes na presença de 4-AP ($\text{pD}_2 = 4,82 \pm 0,11$) e 4 vezes na presença de apamina ($\text{pD}_2 = 4,75 \pm 0,11$), sugerindo a participação dos canais K_{ATP} , K_{ir} , K_{V} e SK_{Ca} , respectivamente no efeito relaxante de FGAL em aorta de rato (Tabela 7). Assim, diferente do observado em traqueia, além dos SK_{Ca} , outros canais de K^+ estão envolvidos no efeito vasorrelaxante de FGAL: K_{ATP} , K_{ir} e K_{V} . Carreiro (2012) demonstrou que em útero de rata FGAL bloqueia os canais de potássio K_{V} , K_{ATP} , SK_{Ca} e BK_{Ca} . Essas diferenças podem ser explicadas pelo fato desses órgãos expressarem de forma diferenciada esses canais.

Resultados semelhantes são descritos na literatura para alguns flavonoides que promovem relaxamento em aorta de rato por modulação de canais de K^+ , como é o caso do pinocembrin que ativa os canais K_{ATP} , K_{Ca} e K_{V} (ZHU et al., 2007); do (-)-epigallocatequina-3-gallate que ativa os canais K_{ATP} , SK_{Ca} , IK_{Ca} e BK_{Ca} (ÁLVAREZ et al., 2006) e a quercetina que promove ativação dos canais IK_{Ca} e BK_{Ca} (KHOO et al., 2010).

O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ na célula muscular lisa vascular ocorre através do influxo desse íon do meio extracelular (NELSON et al., 1990) ou liberação do mesmo a partir dos estoques intracelulares (GUIBERT et al., 1996a). Onde, a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, mediado por ativação de agonistas, contribui para início do desenvolvimento da força de contração, e a manutenção desta contração depende do influxo sustentado de Ca^{2+} através de canais na membrana plasmática (SOMLYO; SOMLYO, 1994). A entrada de Ca^{2+} na célula muscular lisa vascular, de forma semelhante ao que ocorre no músculo liso da traqueia, envolve os Ca_{V} e ROCs (GUIBERT; DUCRET; SAVINEAU, 2008).

Os canais de cálcio operados por voltagem (Ca_{V}) são proteínas transmembranares que fornecem influxo de cálcio para uma variedade de atividades intracelulares em células excitáveis, como é o caso dos vasos sanguíneos, onde essa entrada de cálcio produz vasoconstrição e bloqueadores dos Ca_{V} têm sido usados para tratar transtornos cardiovasculares, como é o caso da hipertensão e da insuficiência cardíaca (NAVARRO-GONZALEZ et al., 2009).

Existem dez membros de Ca_V , que são divididos em dois grupos: ativados por alta voltagem e os ativados por baixa voltagem. Os Ca_V de baixa voltagem são os canais do tipo T, compreendendo três membros: $\text{Ca}_V3.1$, 3.2 e 3.3. Os outros sete membros dos Ca_V são canais ativados por alta voltagem e subdivididos em tipo L ($\text{Ca}_V1.1$, 1.2, 1.3 e 1.4), tipo P/Q ($\text{Ca}_V2.1$), tipo N ($\text{Ca}_V2.2$) e tipo R ($\text{Ca}_V2.3$). Os canais $\text{Ca}_V1.2$ são amplamente expressos em muitos tecidos dos sistemas cardiovascular e nervoso e alterações nesses canais estão relacionados com canalopatias como hipertensão e insuficiência cardíaca (CATERRAL, 2000; LIAO; YU; SOONG, 2009).

O conhecimento atual sobre os papéis dos ROCs no acoplamento contração-excitação do músculo liso é muito menos avançado que a compreensão dos Ca_V . Os ROCs são canais iônicos presentes na membrana plasmática e abertos pelo diacilglicerol (DAG), onde esse lipídio é formado a partir da ligação de agonistas a receptores acoplados a proteína G (GPCR), independente de uma mudança no potencial de membrana (GUIBERT; DUCRET; SAVINEAU, 2008). Esses canais estão envolvidos nos processos de crescimento, apoptose e contração do músculo liso vascular, estando implicados em patologias como hipertensão arterial e pulmonar, insuficiência cardíaca e arritmias (WATANABE et al., 2008).

Ensaio farmacológicos demonstraram que a contração tônica induzida por elevadas concentrações extracelulares de K^+ é devido, principalmente, à despolarização das células do músculo liso e influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V , porém a contração induzida por fenilefrina (FEN) é causada, principalmente, por influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} operados por receptor (ROCs), havendo também a participação dos Ca_V (KARAKI; WEISS, 1988; HOROWITZ et al., 1996; NOGUERA et al., 1997; MORELLO et al., 2006). Uma vez que FGAL relaxou a aorta pré-contraída com elevada concentração de K^+ extracelular (KCl 80 mM) ($\text{pD}_2 = 4,37 \pm 0,12$) ou com FEN ($\text{pD}_2 = 5,31 \pm 0,1$), sendo cerca de 6 vezes mais potente em relaxar esse órgão pré-contraído com FEN, sugere-se que esse flavonoide inibe o influxo de Ca^{2+} tanto através dos Ca_V quanto dos ROCs.

Com o intuito de confirmar o bloqueio dos Ca_V por FGAL, realizaram-se curvas cumulativas ao Ca^{2+} , em meio despolarizante para favorecer a abertura

desses canais, onde as curvas controle de contração induzidas pelo CaCl_2 , na presença de FGAL, foram deslocadas para direita de forma não paralela e com redução significativa do E_{max} , confirmando o bloqueio dos Ca_v (Gráfico 12). E para confirmar o bloqueio dos ROCs por FGAL curvas cumulativas ao Ca^{2+} também foram obtidas, porém na presença do verapamil (bloqueador dos Ca_v) e FEN, usada para ativar os ROCs. Nessas condições as curvas controles de contração induzidas pelo CaCl_2 na presença de FGAL também foram deslocadas para direita de forma não paralela e com redução significativa do E_{max} , confirmando também a participação dos ROCs no vasorrelaxamento induzido por FGAL (Gráfico 13). O fato de FGAL na concentração de 3×10^{-5} M ter antagonizado o efeito contrátil induzido por CaCl_2 na presença de verapamil e FEN e desse flavonoide antagonizar as contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante apenas na concentração de 3×10^{-4} M indica que FGAL atua principalmente por bloqueio de ROCs.

O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ também pode ocorrer por liberação desse íon dos estoques intracelulares, principalmente do RS, que pode se dá através dos receptores de IP_3 (IP_3R) e do receptor de rianodina (RyR) (SAMMELS et al., 2010). Levando em consideração que a inibição da liberação de Ca^{2+} do RS contribui para promover relaxamento do músculo liso, resolveu-se avaliar se FGAL estaria inibindo a liberação de Ca^{2+} . Os ensaios realizados demonstram que FGAL é capaz de inibir a liberação de Ca^{2+} a partir do RS (Gráfico 14) apresentando $\text{CI}_{50} = 1,0 \pm 0,15 \times 10^{-5}$ M e E_{max} na concentração de 10^{-4} M.

O aumento de nucleotídeos cíclicos na célula muscular lisa promove a ativação das proteínas cinases (PKA e/ou PKG) levando a vários eventos intracelulares que promovem a redução na $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Como, bloqueio de Ca_v , ativação de canais de K^+ , ativação de bombas presentes na membrana plasmática e no retículo sarcoplasmático – Cálcio ATPase da Membrana Plasmática (PMCA) e Cálcio ATPase do Retículo Sarcoplasmático (SERCA), respectivamente (KO et al., 2008). Uma vez que o efeito vasorrelaxante promovido por FGAL envolve a ativação dos canais de K^+ os quais podem ser ativados pelas proteínas PKA e/ou PKG, que são proteínas dependentes de AMPc e/ou GMPc, resolveu-se investigar a participação das PDEs no efeito vasodilatador de FGAL em aorta de rato. Onde, as

PDEs são enzimas que hidrolisam AMPc e GMPc, reduzindo, assim, a concentração desses nucleotídeos cíclicos (LUGNIER, 2006).

Alguns flavonoides isolados de diferentes espécies vegetais apresentam efeito inibitório sobre diversas isoformas de PDEs (RAHIMI et al., 2010). É o caso do flavonoide (-)-epigallocatequina-3-gallate que promoveu relaxamento em aorta de rato através da inibição das PDEs I, II, III, IV e V (ÁLVAREZ et al., 2006).

Para tanto, utilizou-se como ferramenta farmacológica o inibidor não seletivo de PDEs aminofilina, o qual promoveu relaxamento da aorta ($pD_2 = 4,36 \pm 0,09$). Quando o órgão foi pré-incubado com FGAL, a curva de relaxamento induzida pelo flavonoide em estudo foi desviada para esquerda, com um aumento cerca de 4 vezes em sua potência relaxante ($pD_2 = 5,13 \pm 0,24$). Esses resultados sugerem que o efeito vasorrelaxante de FGAL em aorta de rato envolve o aumento da concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos (AMPc e/ou GMPc) nas células do músculo liso vascular (Gráfico 15).

Uma vez demonstrado que FGAL pode estar inibindo PDEs, através do uso do inibidor não seletivo dessas enzimas (aminofilina) e levando em consideração que outros flavonoides tem a capacidade de inibir algumas isoformas de PDEs específicas, associado ao fato de que o tecido vascular expressa principalmente as isoformas III e V dessas enzimas (LUGNIER, 2006), o passo seguinte foi investigar qual a isoforma de PDE FGAL estaria inibindo.

A literatura descreve vários ensaios farmacológicos semelhantes aos realizados, utilizando aminofilina em aorta de rato (DUARTE et al., 1993); milrinona, rolipram (inibidores seletivos de PDE 3 e 4, respectivamente) e zaprinast (inibidor seletivo de PDE 5) em aorta de rato (KOMAS; LUGNIER; STOCLET, 1991); IBMX (inibidor não seletivo de PDEs), milrinona e rolipram em jejuno de camundongo (SATO et al., 2006).

A potência relaxante promovida por milrinona ($pD_2 = 7,23 \pm 0,23$) não foi alterada na presença de FGAL ($pD_2 = 7,28 \pm 0,09$), sugerindo que a PDE-III não está envolvida no efeito vasorrelaxante do flavonoide (Gráfico 16). Porém, o efeito vasorrelaxante promovido por sildenafil ($pD_2 = 6,84 \pm 0,25$) foi potencializado na

presença de FGAL ($pD_2 = 7,62 \pm 0,22$), o que sugere a participação dessa enzima no efeito relaxante de FGAL (Gráfico 17).

Outra via que participa ativamente do processo de contração do músculo liso vascular envolve a ativação da proteína cinase dependente de Ca^{2+} (PKC) (WEBB, 2003), onde várias isoformas de PKC (α , β , ϵ , ζ) já foram identificadas no músculo liso vascular, de acordo com a sua dependência de Ca^{2+} (DIXON et al., 1994; LEE; SEVERSON, 1994).

Os canais de K^+ são modulados negativamente pelas proteínas cinases C (PKC). Alguns canais de K^+ já foram descritos por serem bloqueados pela PKC (K_V , BK_{Ca} , K_{ATP} e K_{ir}) (KO et al., 2008).

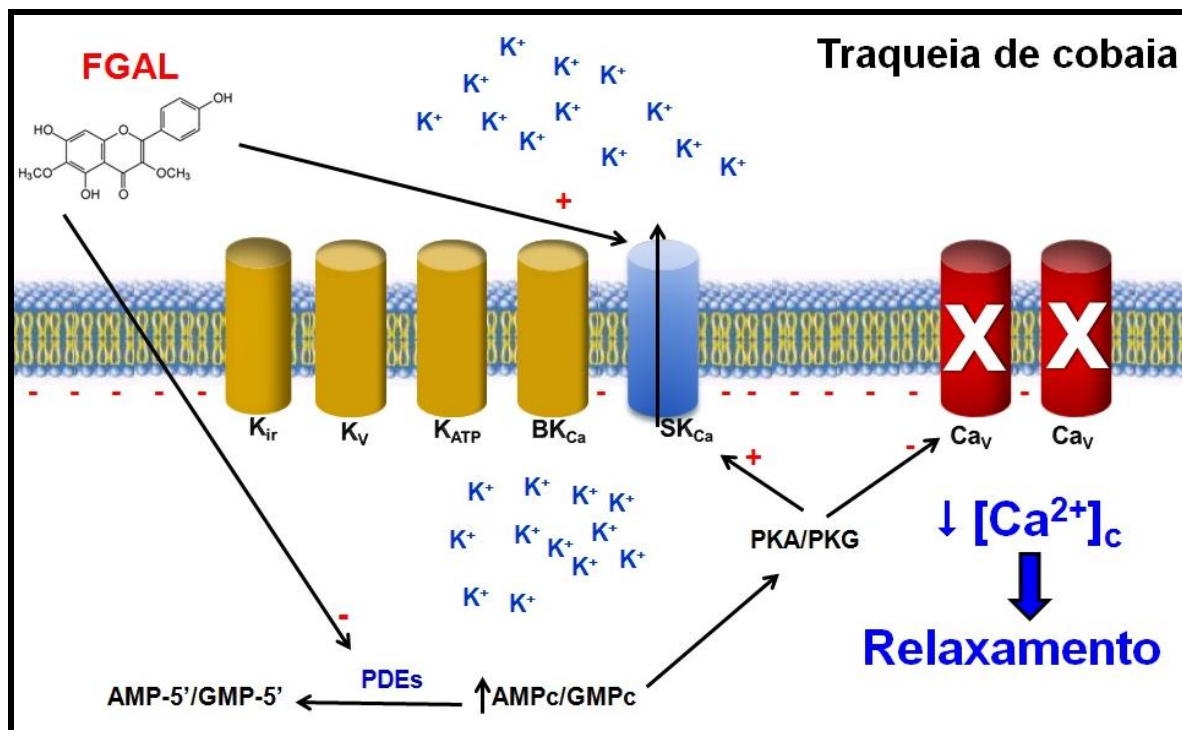
Várias isoformas de PKCs são farmacologicamente ativadas por ésteres de forbol, como o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), que ancora PKCs em suas conformações ativas nas membranas (STEINBERG, 2008).

Para avaliar se FGAL atua modulando negativamente a PKC, participando, dessa forma, do efeito relaxante desse flavonoide em aorta de rato, utilizou-se como ferramenta farmacológica o éster de forbol PMA.

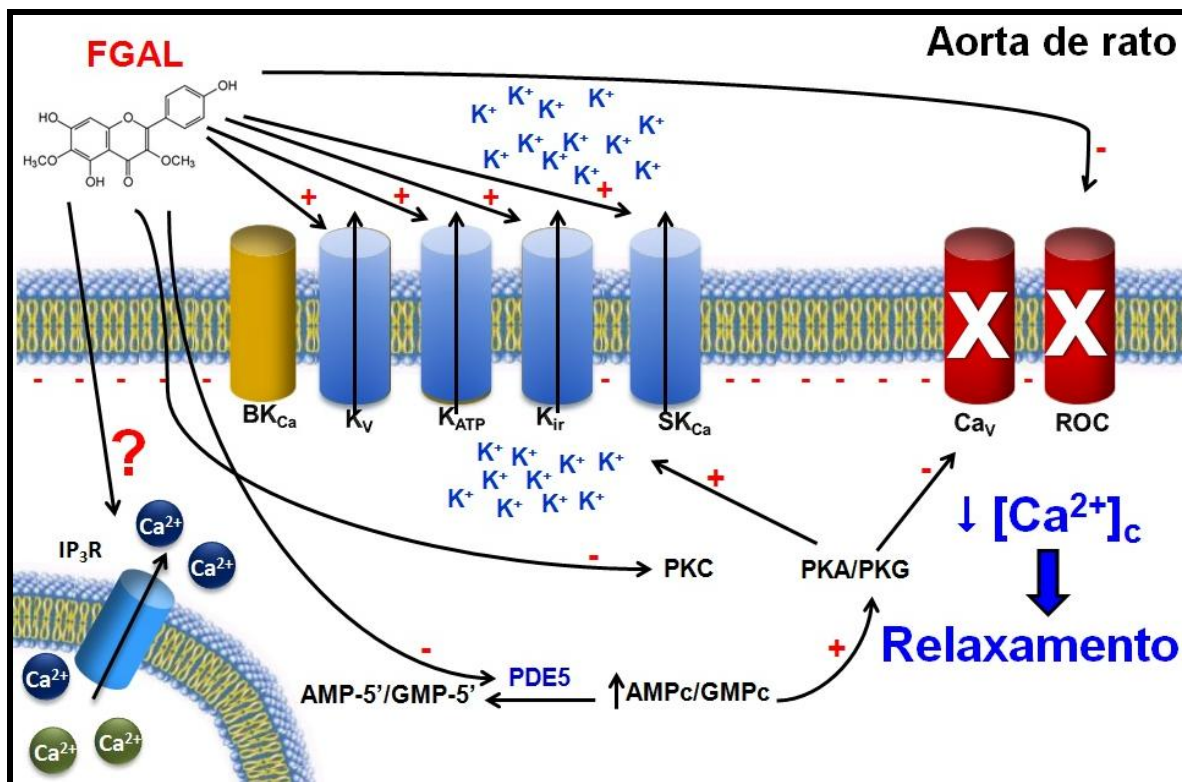
O PMA induziu uma contração lenta e sustentada em aorta de rato. Quando a potência relaxante de FGAL sobre a contração tônica induzida por PMA ($pD_2 = 4,15 \pm 0,10$) foi comparada com aquela obtida por FEN ($pD_2 = 5,35 \pm 0,11$), verifica-se que há uma redução de 16 vezes na potência relaxante de FGAL quando a aorta fora pré-contraída com PMA (Gráfico 18). O fato de FGAL relaxar a aorta pré-contraída com PMA, associado ao lento efeito relaxante, aproximadamente 2 vezes mais lento quando comparado ao relaxamento de FGAL nas contrações induzidas por FEN, sugere que esse flavonoide pode estar inibindo a PKC, mas com baixa seletividade por essa enzima. A diferença entre as potências relaxantes de FGAL quando a aorta fora contraída com PMA ou FEN, pode ser explicada pelas diferenças no que diz respeito ao mecanismo de contração induzido por essas duas substâncias. Enquanto o PMA contrai a aorta por ativação direta da PKC, a FEN atua por ativação da proteína $G_{q/11}$, com consequente ativação da PLC e posterior hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2), com formação de IP_3 e DAG. O IP_3 liga-se a um receptor no RS, permitindo a liberação de Ca^{2+} dos estoques

intracelulares, o DAG ativa Ca_v presentes na membrana plasmática, promovendo influxo de Ca^{2+} , e o aumento intracelular desse íon estimula a liberação do Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} através de receptores de rianodina, presentes na membrana do RS. Dessa forma, pode-se sugerir que além da inibição direta da PKC, outros mecanismos estão envolvidos no efeito vasorrelaxante de FGAL. Se a potência relaxante de FGAL fosse equipotente nas contrações induzidas por PMA e FEN, poder-se-ia sugerir que FGAL estaria atuando principalmente pela inibição da PKC.

Dessa forma, esse trabalho descreve pela primeira vez na literatura a atividade espasmolítica de FGAL em útero de rata, íleo e traqueia de cobaia e aorta de rato, sendo mais potente em aorta, como também, a investigação do mecanismo de ação de FGAL em traqueia e aorta. Além disso, FGAL apresentou potência vasorrelaxante em aorta de rato de forma semelhante ao flavonoide galangim (MORELLO et al., 2006) e mais potente que outros flavonoides, como (-)-epigallocatequina-3-galate (ÁLVAREZ et al., 2006) e pinocembrim (ZHU et al., 2007). Esses estudos sugerem que o flavonoide FGAL é um possível candidato a ser usado futuramente como ferramenta farmacológica ou até mesmo candidato a um futuro medicamento a ser usado no tratamento da hipertensão.

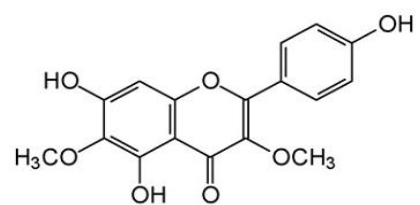
Esquema 3 – Proposta de mecanismo de ação para FGAL em traqueia de cobraia.

FGAL ativa os SK_{Ca} promovendo efluxo de K⁺ com consequente hiperpolarização e bloqueio de Ca_V, inibe PDEs desencadeando aumento nas concentrações intracelulares de AMPc e/ou GMPc o que irá ativar PKA e/ou PKG as quais poderão ativar os SK_{Ca} e inibir os Ca_V, culminando com a redução na [Ca²⁺]_c com consequente relaxamento do músculo liso da traqueia de cobraia (MACÊDO, 2012).

Esquema 4 – Proposta do mecanismo de ação para FGAL em aorta de rato.

FGAL ativa os canais de K^+ (K_V , K_{ATP} , K_{ir} e SK_{Ca}) o que promove efluxo de K^+ , desencadeando hiperpolarização e bloqueio de Ca_V , bloqueia os $ROCs$, inibe a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, inibe a PDE 5 promovendo aumento de AMPc e/ou GMPc o que irá ativar PKA e/ou PKG as quais poderão ativar os K_V , K_{ATP} , K_{ir} e SK_{Ca} e inibir os Ca_V e inibição da PKC, culminando com a redução na $[Ca^{2+}]_c$ com consequente relaxamento do músculo liso da aorta de rato (MACÊDO, 2012).

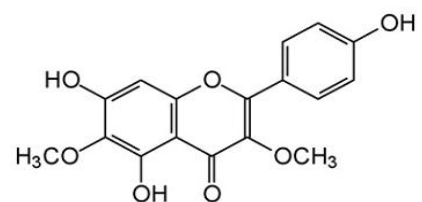
6 Conclusões



No estudo do efeito hemolítico e anti-hemolítico em eritrócitos de rato e espasmolítico em músculos lisos do flavonoide 3,6-dimetil éter galetina (FGAL), isolado das partes aéreas de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke, pode-se concluir que:

- ✓ FGAL não apresenta efeito hemolítico em eritrócito de rato e não protege essas células contra a lise, o que sugere baixa toxicidade;
- ✓ Apresenta efeito espasmolítico não seletivo em útero de rata, íleo e traqueia de cobaia e aorta de rato;
- ✓ O efeito espasmolítico de FGAL em traquéia e aorta independe de fatores relaxantes derivados do epitélio e do endotélio, respectivamente;
- ✓ FGAL foi mais potente em induzir efeito espasmolítico em traqueia e aorta;
- ✓ O tônus basal da traqueia e da aorta não se altera na presença de FGAL;
- ✓ O mecanismo de ação de FGAL em traqueia parece envolver:
 - ativação de canais de K^+ , especificamente dos SK_{Ca} com provável inibição dos Ca_v ;
 - inibição de fosfodiesterases (PDEs);
- ✓ Em aorta, o mecanismo de ação de FGAL parece envolver:
 - ativação de canais de K^+ (K_{ATP} , SK_{Ca} , K_{ir} e K_v);
 - inibição do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v e ROCs;
 - inibição da liberação de Ca^{2+} do RS;
 - inibição da PDE-V e não envolvimento da PDE-III;
 - inibição da PKC;

Referências



ADELMAN, J. P.; CLAPHAM, D. E.; HIBINO, H.; INANOBE, A.; JAN, L. Y.; KARSCHIN, A.; KUBO, Y.; KURACHI, Y.; LAZDUNSKI, M.; MIKI, T.; NICHOLS, C. G.; PEARSON, W. L.; SEINO, S.; VANDENBERG, C. A. Inwardly Rectifying Potassium Channels: $K_{ir}1.1$. IUPHAR database (IUPHAR-DB). Última modificação em 01 jul 2010. Disponível em: <<http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=429>>. Acesso em 22 abr 2011.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Uso de Recursos Vegetais da Caatinga: O caso do Agreste do Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Revista de Ciência e Tecnologia da América (Interiencia)**, v. 27, n. 007, p. 336-346, 2002.

AL-DABBAS, M. M.; KITAHARA, K.; SUGANUMA, T.; HASHIMOTO, F.; TADERA, K. Antioxidant and α -amylase inhibitory compounds from aerial parts of *Varthemia iphionoides* Boiss. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 9, p. 2178- 2184, 2006.

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

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

ÁLVAREZ, E.; CAMPOS-TOIMIL, M.; JUSTINIANO-BASARAN, H.; LUGNIER, C.; ORALLO, F. Study of the mechanisms involved in the vasorelaxation induced by (-)-epigallocatechin-3-gallate in rat aorta. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 269-280, 2006.

ALVES, N. I.; GOMES, M. S.; CARVALHO, M. G.; CARVALHO, A. G. Deslocamentos químico ^1H e ^{13}C de 5-H flavone e 5-H-flavonol isolados de leguminosaeae. **Revista Universidade Rural**, série ciências exatas e da terra, v. 22, p. 81-87, 2003.

AMSALLEM, E.; KASPARIAN, C.; HADDOUR, G.; BOISSEL, J. P.; NONY, P. Phosphodiesterase III inhibitors for heart failure. **Cochrane Database Systematic Reviews**. v.1, CD002230, 2005.

ARTALEJO, C. R.; ADAMS, M. E.; FOX, A. P. Three types of Ca^{2+} channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. **Nature**, v. 367, p. 72-76, 1994.

BARBOSA, M. R. V.; LIMA, I. B.; LIMA, J. R.; CUNHA, J. P.; AGRA, M. F.; THOMAS, W. W. Vegetação e flora no Cariri Paraibano. **O ecologia Brasiliensis**, v. 11, p. 313-322, 2007.

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

BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiological Reviews**, v. 75, p.725-748, 1995.

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological Reviews**, v. 58, p. 488-520, 2006.

BERNAREGGI, M. M.; BELVISI, M. G.; PATEL, H.; BARNES, P. J., GIEMBYEZ, M. A. Anti-spasmogenic activity of isoenzyme-selective phosphodiesterase inhibitors in guinea-pig trachealis. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 327-336, 1999.

BEZERRA, D. A. C. **Estudo fitoquímico bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke**. 2008. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

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

BRANDÃO, R.; LARA, F. S.; PAGLIOSA, L. B.; SOARES, F. A.; ROCHA, J. B. T.; NOGUEIRA, C. W.; FARINA, M. Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 28, p. 397-407, 2005.

CAMPOS-BEDOLLA, P.; VARGAS, M. H.; SEGURA, P.; CARBAJAL, V.; CALIXTO, E.; FIGUEROA, A.; FLORES-SOTO, E.; BARAJAS-LÓPEZ, C.; MENDOZA-PATIÑO N.; MONTAÑO, L. M. Airway smooth muscle relaxation induced by 5-HT_{2A} receptors: Role of Na^+/K^+ -ATPase pump and Ca^{2+} -activated K^+ channels. **Life Sciences**, v. 83, p. 438-446, 2008.

CARDOSO, N. A. R. **Metabólitos especiais isolados dos galhos e folhas de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (Leguminosae) e das flores de *Laseguea erecta* Mull. Arg. (Apocynaceae)**. 2006. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CARREIRO, J. N. **Ação tocolítica do flavonóide 3,6 dimetil éter (FGAL) obtido das partes aéreas de *Piptadenia stipulaceae* Benth Ducke envolve modulação positiva de canais para potássio**. 2012. Dissertação (Mestrado). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

CATTERALL, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. **Annual Review of Cell & Developmental Biology**, v. 16, p. 521-555, 2000.

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

CHEN, G-P.; YE, Y.; LI, L.; YANG, Y.; QIAN, A-B.; HU, S-J. Endothelium-independent vasorelaxant effect of sodium ferulate on rat thoracic aorta. **Life sciences**, v. 84, p. 81-88, 2009.

CHIAPPETA, A. D. A; DE MELLO, J. F. Higher Plants with Biological Activity. Plants of Pernambuco. II. III. **Revista do Instituto de Antibióticos da Universidade Federal do Pernambuco**, v. 11, n. (1/2), p. 99-11, 1984.

CLAPHAM, D. E.; RUNNELS, L. W.; STRUBING, C. The TRP ion channels family. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 387-396, 2001.

CLARK, J. F.; PYNE-GEITHMAN, G. Vascular smooth muscle function: The physiology and pathology of vasoconstriction. **Pathophysiology**, v. 12, p. 35-45, 2005.

CLEEMANN, L.; MORAD, M. Role of Ca^{2+} channel in cardiac excitationcontraction coupling in the rat: evidence from Ca^{2+} transients and contraction. **The Journal of Physiology**, v. 432, p. 283-312; 1991.

COGOLLUDO, A.; FRAZZIANO, G.; BRIONES, A. M.; COBENO, L.; MORENO, L.; LODI, F.; SALAICES, M.; TAMARGO, J.; PEREZ-VISCAINO, F. The dietary flavonoid quercetin activates BK_{Ca} currents in coronary arteries via production of H_2O_2 . Role in vasodilatation. **Cardiovascular Research**, v. 73, p. 424-431, 2007.

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

CUTHBERT, N. J.; GARDINER, P. J.; NASH, K.; POLL, C. T. Roles of Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. L620-L627, 1994.

DELLIS, O.; DEDOS, S. G.; TOVEY, S. C.; TAUFIQ UR, R.; DUBEL, S. J.; TAYLOR, C. W. Ca^{2+} entry through plasma membrane IP_3 receptors. **Science**, v. 313, n. 5784, p. 229-233, 2006.

DEMIREL, E.; RUSKO, J.; LASKEY, R. E.; ADAMS, D. J.; VAN BREEMEN, C. TEA inhibits ACh-induced EDRF release: endothelial Ca^{2+} -dependent K^+ channels contribute to vascular tone. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. H1135-H1141, 1994.

DIXON, B. S.; SHARMA, R. V.; DICKERSON, T.; FORTUNE, J. Bradykinin and angiotensin II: Activation of protein kinase C in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. C1406-1420, 1994.

DOLMETSCH, R. E.; PAJVANI, U.; FIFE, K.; SPOTTS, J. M.; GREENBERG, M. E. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway, **Science**, v. 294, p. 333-339, 2001.

DUARTE, J.; JIMENEZ, R.; VILLAR, I. C.; PEREZ-VISCAINO, F.; JIMENEZ, J.; TAMARGO, J. Vasorelaxant effects of the bioflavonoid chrysin in isolated rat aorta. **Planta Medica**, v. 67, p. 567-569, 2001a.

DUARTE, J.; PÉREZ-VIZCAÍNO, F.; ZARZUELO, A.; JIMÉNEZ, J.; TAMARGO, J. Aminophylline preferentially inhibits chloroethylclonidine-insensitive α -adrenoceptor-mediated contractions in rat aorta. **General Pharmacology**, v. 24, n. 6, p. 1359-1364, 1993.

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

EISELE, K.; LANG, P. A.; KEMPE, D. S.; KLARL, B. A.; NIEMOLLER, O.; WIEDER, T.; HUBER, S. M.; DURANTON, C.; LANG, F. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 210, p.116-122, 2006.

ELSOHLY, H. N.; EL-FERALY, F. S.; JOSHI, A. S.; WALKER, L. A. Antiviral flavonoids from *Alkanna orientalis*. **Planta Medica**, v. 63, n. 4, 384, 1997.

EMPFIELD, J. R.; RUSSELL, K.; TRAINOR, D. A. Potassium channel openers: therapeutic possibilities. **Pharmaceutical News**, v. 6, p. 23-27, 1995.

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

EVANGELISTA, L. G.; COELHO-DE-SOUZA, A.; SANTOS, C. F.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LOPES, E. A. B.; SANTOS, M. V.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 515-522, 2007.

FABRICANTE, J. R.; ANDRADE, L. A. Análise estrutural de um remanescente de caatinga no Seridó Paraibano. **O ecologia Brasiliensis**, v. 11, p. 341-349, 2007.

FARMER, S. G.; HAY, D. W.; RAEBURN D.; FEDAN, J. S. Relaxation of guinea-pig tracheal smooth muscle to arachidonate is converted to contraction following epithelium removal. **British Journal of Pharmacology**, v. 92, p. 231-236, 1987.

FESKE, S.; GWACK, Y.; PRAKRIYA, M.; SRIKANTH, S.; PUPPEL, S. H.; TANASA, B.; HOGAN, P. G.; LEWIS, R. S.; DALY, M.; RAO, A. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. **Nature**, v. 441, p. 902-905, 2006.

FLORENTINO, A. T. N.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Contribuição de quintais agroflorestais na conservação de plantas da Caatinga, Município de Caruaru, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 37-47, 2007.

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

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

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C. L.; NIELSEN, E. B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric-oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H (1, 2, 4) oxadiazolo (4, 3, a) quinoxalin-1-one. **Molecular Pharmacology**, v. 48, p. 184-188, 1995.

GROSS, N. J. Ipratropium bromide. **New England Journal of Medicine**, v. 319, p. 486-494, 1988.

GUIBERT, C.; DUCRET, T.; SAVINEAU, J-P. Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 98, p. 10-23, 2008.

GUIBERT, C.; MARTHAN, R.; SAVINEAU, J. P. Angiotensin II-induced Ca^{2+} -oscillations in vascular myocytes from the rat pulmonary artery. **American Journal of Physiology**, v. 270, p. L637-642, 1996a.

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

GUTMAN, G. A.; ALDRICH, R.; CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; WEI A. D.; WULFF, H. Calcium-Activated Potassium Channels: $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$. IUPHAR database (IUPHAR-DB). Última modificação em 31-01-2011. Disponível em: <<http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=383>>. Acesso em: 04 jun. 2011b.

GUTMAN, G. A.; CHANDY K. G.; GRISSMER, S.; LAZDUNSKI, M.; MCKINNON, D.; PARDO, L. A.; ROBERTSON, G. A.; RUDY, B.; SANGUINETTI, M. C.; STÜHMER,

W.; WANG, X. Voltage-Gated Potassium Channels. IUPHAR database (IUPHAR-DB). Última modificação em 16-11-2010. Disponível em: <<http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=81>>. Acesso em: 22 abr. 2011a.

HASHIBA, K. M.; SATO, T.; HIROTA, K., HASHIMOTO, Y.; MATSUKI, A. The relaxant effect of propofol on guinea pig tracheal muscle is independent of airway epithelial function and beta-adrenoceptor activity. **Anesthesia & Analgesia**, v. 89, p. 191-196, 1999.

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

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

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

HIRAMATSU, T.; KUME, H.; KOTLIKOFF, M. I.; TAKAGI, K.; Role of calcium-activated potassium channels in the relaxation of tracheal smooth muscles by forskolin. **Clinical and Experimental Pharmacology Physiology**, v. 21, p. 367-375, 1994.

HOLGATE, S. T. Antihistamines in the treatment of asthma. **Clinical reviews in allergy immunology**, v. 12, p. 65-78, 1994.

HONG, J. Role of natural product diversity in chemical biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, p. 1-5, 2011.

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

HOOD, W. B. Controlled and uncontrolled studies of phosphodiesterases 3 inhibitors in contemporary cardiovascular medicine. **American Journal of Cardiology**, v. 63, p. 46A-53A, 1989.

HORI, M.; KARAKI, H. Regulatory mechanisms of calcium sensitization of contractile elements in smooth muscle. **Life Science**, v. 62, p. 1689-1633, 1998.

HOROWITZ, A.; MENICE, C. B.; LAPORTE, R.; MORGAN, K. G. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiological Reviews**, p. 76, n. 4, p. 967-1003, 1996.

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

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

JEON, Y. H.; HEO, Y. S.; KIM, C. M.; HYUN, Y. L.; LEE, T. G.; RO, S. Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 62, p. 1198-220, 2005.

JOBSON, R. W.; LUCKOW, M. Phylogenetic study of the genus Piptadenia (Mimosoideae: leguminosae) using plastid trnL-F and trnK/matK sequence data. **Systematic Botany**, v. 32, n. 3, p. 569-575, 2007.

JOHN, J. E. Natural products as lead structures: a role for biotechnology. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 11/12, 2010.

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

KARAKI, H.; WEISS, G. B. Calcium release in smooth muscle. **Life Sciences**, v. 42, n. 2, p. 111-122, 1988.

KHALIL, R. A. Regulation of Vascular Smooth Muscle Function. **Integrated systems physiology: from molecule to function**, 2010.

KHOO, N. K.; WHITE, C. R.; POZZO-MILLER, L.; ZHOU, F.; CONSTANCE, C.; INOUE, T.; PATEL, R. P.; PARKS, D. A. Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 339-347, 2010.

KIMURA, K.; ITO, M.; AMANO, M.; CHIHARA, K.; FUKATA, Y.; NAKAFUKU, M. et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Science**, v. 273, p. 254-248, 1996.

KIRKPATRICK, C. T.; JENKINSON, H. A.; CAMERON, A. R. Interaction between drugs and potassium-rich solutions in producing contraction in bovine tracheal smooth muscle: studies in normal and calcium-depleted tissues. **Clinical and Experimental and Physiology**, v. 2, p. 559-570, 1975.

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

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

KO, E. A.; PARK, W. S.; FIRTH, A. L.; KIM, N.; YUAN, J. X.-J.; HAN, J. Pathophysiology of voltage-gated K⁺ channels in vascular smooth muscle cells: Modulation by protein kinases. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 103, p. 95-101, 2010.

KOMAS, N.; LUGNIER, C.; STOCLET, J-C. Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, p. 495-503, 1991.

LEACH, D.; STEVENSON, L.; GABRIEL, B.; BEATTIE, K. Biologically active compounds isolated from Centipeda and their biological activity as antioxidant and antiinflammatory agents. **PCT Patent Filing**, p. 49, 2007.

LEAL, L. K. A. M.; COSTA, M. F.; PITOMBEIRA, M.; BARROSO, V. M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S. B. Mechanisms underlying the relaxation

induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. **Life Science**, v. 79, p. 98-104, 2006.

LEE, M. W.; SEVERSON, D. L. Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 267, n 3, p. C659-C678, 1994.

LEXIS, L. A.; FASSETT, R. G.; COOMBES, J. S. α -Tocopherol and α -lipoic acid enhance the erythrocyte antioxidant defence in cyclosporine Atreated rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 98, p. 68-73, 2006.

LEWINSONHN, T. M.; PRADO, P. I. Biodiversidade Brasileira – Síntese do Estado Atual do Conhecimento, 1ª. ed., Ed. Pinsky, cap. 1, p. 17-25, São Paulo, 2002.

LIAO, P.; YU, H.; SOONG, T. W. Alternative splicing of voltage-gated calcium channels: from molecular biology to disease. **Pflugers Archiv - European Journal of Physiological**, v. 458, p. 481-487, 2009.

LIMA, J. T. **Mecanismo de ação espasmolítica de diplotropina em íleo de cobaia e útero de rata e estudo comparativo do seu análogo sintético**. 2008. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. UFPB, João Pessoa.

LIOU, J.; KIM, M. L.; HEO, W. D.; JONES, J. T.; MYERS, J. W.; FERRELL-Jr, J. E.; MEYER, T. STIM Is a Ca^{2+} Sensor Essential for Ca^{2+} -Store-Depletion-Triggered Ca^{2+} Influx. **Current Biology**, v. 15, p. 1235-1241, 2005.

LIRA, D. P. **Flavonoides isolados de *Piptadenia stipulaceae* (Benth.) Ducke (Fabaceae)**. 2009. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. UFPB, João Pessoa

LIU, B.; YANG, J.; WEN, Q.; LI, Y. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, relaxes guinea-pig muscle in vitro and in vivo: role of cGMP/PKG pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, p. 257-266, 2008.

LOPEZ-LOPEZ, J. R.; SHACKLOCK, P. S.; BALKE, C. W.; WIER, W. G. Local calcium transients triggered by single L-type calcium channel currents in cardiac cells. **Science**, v. 268, p. 1042-1045, 1995.

LOPEZ-LOPEZ, G.; MORENO, L.; COGOLLUDO, A.; GALISTEO, M.; IBARRA, M.; DUARTE, J.; LODI, F.; TAMARGO, J.; PEREZ-VIZCAINO, F. Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. **Molecular Pharmacology**, v. 65, p. 851-859, 2004.

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

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

MACÊDO, C. L. **Avaliação da ação espasmolítica do flavonoide 3,6-dimetil éter galetina, isolado de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke e investigação do mecanismo de ação em traqueia de cobaia e aorta de rato.** 2012. Tese (Doutorado). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

MARTINEZ, C.; SANCHEZ, M.; HIDALGO, A.; DE BOTO, M. J. Mechanisms of diethylstilbestrol-induced relaxation in rat aorta smooth muscle. **Vascular Pharmacology**, v. 40, n. 4, p. 197-204, 2004.

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

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

MISHRA, S. K.; AARONSON, P. I. A role for a glibenclamide-sensitive, relatively ATP-insensitive K⁺ current in regulating membrane potential and current in rat aorta. **Cardiovascular Research**, v. 44, n. 2, p. 429-435, 1999.

MITCHELI, J. A.; ALI, F.; BAILEY, L.; MORENO, L.; HARRINGTON, L. S. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. **Experimental physiology**, v. 93, n. 1, p. 141-147, 2008.

MLADENKA, P.; ZATLOUKALOVÁ, L.; FILIPSKY, T.; HRDINA, R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. **Free radical biology & medicine**, v. 49, p. 963-975, 2010.

MORELLO, S.; VELLECCO, V.; ALFIERI, A.; MASCOLO, N.; CICALA, C. Vasorelaxant effect of the flavonoid galangin on isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 78, p. 825-830, 2006.

MORGAN, K. The role of calcium in the control of vascular tone as assessed by the Ca^{2+} indicator aequorin. **Cardiovascular drugs and therapy**, v. 4, p. 1355-1362, 1990.

MORIKAWA, T.; ABDEL-HALIM, O. B.; MATSUDA, H.; ANDO, S.; MURAOKA, O.; YOSHIKAWA, M. Pseudoguaiane-type sesquiterpenes and inhibitors on nitric oxide production from *Dichrocephala integrifolia*. **Tetrahedron**, v. 62, n. 26, p. 6435-6442, 2006.

MURRAY, M. A.; BOYLE, J. P.; SMALL, R. C. Cromakalim-induced relaxation of guinea-pig isolated trachealis: antagonism by glibenclamide and by phentolamine. **British Journal of Pharmacology**, v. 98, p. 865-874, 1989.

NAGAO, T.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and endothelium-dependent relaxations. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 1993.

NAVARRO-GONZALEZ, M.; GRAYSON, T. H.; MEANEY, K. R.; CRIBBS, L. L.; HILL, C. E. Non L-Type voltage-dependent calcium channels control vascular tone of the rat basilar artery. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, p. 55-66, 2009.

NELSON, M. T.; HUANG, Y.; BRAYDEN, J. E.; HESCHELER J.; STANDEN, N. B. Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K^{+} channels. **Nature**, v. 344, p. 770-773, 1990.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, 461-477, 2007.

NIJKAMP, F. P.; VAN DER LINDE, H. J.; FOLKERTS, G. Nitric oxide synthesis inhibitors induce airway hyperresponsiveness in the guinea-pig in vivo and in vitro. Role of the epithelium. **American Review of Respiratory Disease**, v. 148, p. 727-734, 1993.

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

NOGUERA, M. A.; IVORRA, M. D.; CHULIÁ, S.; D'OCON, P. Capacitative Ca^{2+} entry associated with $\alpha 1$ -adrenoceptors in rat aorta. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 356, p. 83-89, 1997.

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

OONUMA, H.; IWASAWA, K.; IIDA, H.; NAGATA, T.; IMUTA, H.; MORITA, Y.; YAMAMOTO, K.; NAGAI, R.; OMATA, M.; NAKAJIMA, T. Inward rectifier K^+ current in human bronchial smooth muscle cells: inhibition with antisense oligonucleotides targeted to $\text{K}_{\text{ir}}2.1$ mRNA. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 26, n. 3, p. 371-379, 2002.

ORIE, N. N.; FRY, C. H.; CLAPP, L. H. Evidence that inward rectifier K^+ channels mediate relaxation by the PGI_2 receptor agonist cicaprost via a cyclic AMP-independent mechanism. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 1, p. 107-115, 2006.

ÖZBEK, H.; GÜLER, N.; ERYONUCU. Vasorelaxant effects of sildenafil and verapamil on isolated rat aorta with and without intact endothelium. **International Journal of Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 142-145, 2006.

PEREZ-VIZCAINO, F.; COGOLLUDO, A.; MORENO, L. Reactive oxygen species in signaling in pulmonary vascular smooth muscle. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 174, p. 212-220, 2010.

PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J. Flavonols and cardiovascular disease. **Molecular aspects of medicine**, v. 31, p. 473-494, 2010.

PEREZ-ZOGHBI, J. F.; KARNER, C.; ITO, S.; SHEPHERD, Y. A.; SANDERSON, M. J. Ion channel regulation of intracellular calcium and airway smooth muscle function. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 22, p. 388-397, 2009.

PICQ, M.; DUBOIS, M.; PRIGENT, A. F.; NEMOZ, G.; PACHECO, H. Inhibition of the different cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms separated from rat brain by flavonoid compounds. **Biochemical International**, v. 18, p. 47-57, 1989.

QUEIROZ, A. C.; LIRA, D. P.; DIAS, T. L. M. F.; SOUZA, E. T.; M, C. B. B.; AQUINO, A. B.; SILVA, L. H. A C; SILVA, D. J. C.; MELLA, E. A. C.; AGRA, M. F.; FILHO, J. M. B.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; SANTOS, B. V. O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 377-383, 2010.

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

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

RAEBURN, D.; GIEMBYCZ, M. A. Airways smooth muscle: peptide receptors, ion channels, and signal transduction. Basel; Boston: Birkhäuser Verlag, 1995.

RAHIMI, R.; GHIASI, S.; AZIMI, H.; FAKHARI, S.; ABDOLLAHI, M. A review of the herbal phosphodiesterase inhibitors: futureperspective of new drugs. **Cytokine**, v. 49, p. 123-129, 2010.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 305-309, 1997.

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

REN, J.; ALBINSSON, S.; HELLSTRAND, P. Distinct effects of voltage- and store-dependent calcium influx on stretch-induced differentiation and growth in vascular smooth muscle. **Journal of Biological Chemical**, v. 285, n. 41, 31829-31839, 2010.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Despolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCl_2 . **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p. 847-857, 1997.

RIBEIRO, L. A. A. **Participação da via AC-AMPC-PKA na resposta relaxante induzida pelo ácido 8(17),12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano-302) em músculos lisos**. 2007. Tese (Doutorado). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

ROHRA, D. K.; SAITO, S. Y.; OHIZUMI, Y. Strain-specific effects of acidic pH on contractile state of aortas from Wistar and Wistar Kyoto rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 476, n. 1-2, p. 123-130, 2003.

ROJA, R.; SIMA, G.; HANIEH, A.; SIMA, F.; MOHAMMAD, A. A review of the herbal phosphodiesterase inhibitors; Future perspective of new drugs. **Cytokine**, v. 49, p. 123-129, 2010.

ROMERO, M.; JIMENEZ, R.; SANCHEZ, M.; LOPEZ-SEPULVEDA, R.; ZARZUELO, M. J.; O'VALLE, F.; ZARZUELO, A.; PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J. Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: role of NADPH oxidase, unclouped eNOS and PKC. **Atherosclerosis**, v. 202, p. 58-67, 2009.

ROSENBLOOM, R. A. Flavonoid compositions for the treatment of skin disorders. **Patent Application Publication**, p. 11, 2003.

ROSENBLOOM, R. A. Methods using antioxidant flavonoid compounds for the treatment of peripheral neural and vascular ailments. **Patent Application Publication**, p. 11, 2004.

RUAN, Y. C.; ZHOU, W.; CHAN, H. C. Regulation of smooth muscle contraction by the epithelium: role of prostaglandins. **Physiology**, v. 26, p. 156-170, 2011.

RUSSO, A.; ACQUAVIVA, R.; CAMPISI, A.; SORRENTI, V.; DI GIACOMO, C.; VIRGATA, G.; BARCELLONA, M. L.; VANELLA, A. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. **Cell Biology and Toxicology**, v. 16, p. 91-98, 2000.

SAH, P.; FABER, E. S. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 345-353, 2002.

SAMMELS, E.; PARYS, J. B.; MISSIAEN, L.; SMEDT, H. D.; BULTYNCK. Intracellular Ca^{2+} storage in health and disease: a dynamic equilibrium. **Cell calcium**, v. 47, p. 297-314, 2010.

SANTOS, R. F. **Ação espasmolítica de retusin, flavonóide isolado de *Solanum paludosum* Moric., e de seu derivado metilado em íleo isolado de cobaia.** 2007. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SATO, Y.; AKAO, T.; HE, J-X.; NOJIMA, H.; KURAISHI, Y.; MOROTA, T. ASANO, T.; TANI, T. Glycy coumarin from *Glycyrrhizae radix* acts as a potent astispasmodic through inhibition of phosphodiesterase 3. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 409-414, 2006.

SAKAI, H.; YAMAMOTO, M.; CHIBA, Y.; MISAWA, M. Some different effect of PKC inhibitors on the acetylcholine, and endothelin-1-induced contractions of rat bronchial smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 618, p. 58-62, 2009.

SARSERO, D.; FUJIWARA, T.; MOLENAAR, P.; ANGUS, J. A. Human vascular to cardiac tissue selectivity of L- and T-type calcium channel antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, p. 109-119, 1998.

SENEJOUX, F.; GIRARD, C.; KERRAM, P.; AISA, H. A.; BERTHELOT, A.; BÉVALOT, F.; DEMOUGEOT. Mechanisms of vasorelaxation induced by *Ziziphora clinopodioides* Lam. (Lamiaceae) extract in rat thoracic aorta. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 268-273, 2010.

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

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

SILVA, J. L. V. **Monitoração da atividade vasorelaxante de extrato, fases e flavonóides obtidos de *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae).** 2005. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SNETKOV, V. A.; WARD, J. P. Ion currents in smooth muscle cells from human small bronchioles: presence of an inward rectifier K^+ current and three types of large conductance K^+ channel. **Experimental Physiology**, v. 84, n. 5, p. 835-846, 1999.

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

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

SOMLYO, A. P.; WU, X.; LALKER, L. A.; SOMLYO, A. V. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 134, p. 201-234, 1999.

SPASSOVA, M. A.; SOBOLOFF, J.; HE, L. P. XU, W.; DZIADEK, M. A.; GILL, D. L. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca^{2+} channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 4040-4045, 2006.

STAPLETON, C. M.; JOO, J. H.; KIM, Y-S; LIAO, G.; PANETTIERI Jr., R. A.; JETTEN, A. M. Induction of ANGPTL4 expression in human airway smooth muscle cells by PMA through activation of PKC and MAPK pathways. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 4, p. 507-525, 2010.

STEINBERG, S. F. Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. **Physiological Reviews**, v. 88, p. 1341-1378, 2008.

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

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

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

TOQUE, H. A.; MÓNICA, F. Z. T.; MORGANTI, R. P.; NUCCI, G. D.; ANTUNES, E. Mechanisms of relaxant activity of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in rat tracheal smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 645, p. 158-164, 2010.

TÖRÖK, J. Histamine-induced relaxation in pulmonary artery of normotensive and hypertensive rats: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. **Physiological Research**, v. 49, p. 107-114, 2000.

TSCHIRHART, E.; FROSSARD, N.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutical**, v. 243, n. 1, p. 310-316, 1987.

WADE, G. R.; SIMS, S. M. Muscarinic stimulations of tracheal smooth muscle cell activates large-conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channel. **American Journal of Physiology**, v. 265, p. C658-C665, 1993.

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

VAN DER STAAY, F. J.; FANELLI, R. J.; BLOKLAND, A.; SCHMIDT, B. H. Behavioral effects of apamin, a selective inhibitor of the SK_{Ca} -channel, in mice and rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 8, p. 1087-1110, 1999.

WANG, Y.; DENG, X.; HEWAVITHARANA, T.; SOBOLOFF, J.; GILL, D. L. Stin, orai and TRPC channels in the control of calcium entry signals in smooth muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, p. 1127-1133, 2008.

WATANABE, H.; MURAKABI, M.; OHBA, T.; TAKAHASHI, Y.; ITO, H. TRP channel and cardiovascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 118, p. 337-351, 2008.

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

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

WEI, A. D.; GUTMAN, G. A.; ALDRICH, R.; CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; WULFF, H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 463-472, 2005.

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

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

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

YAMAKAGE, M.; CHENG, X.; TSUJIGUCHI, N.; KAMADA, Y.; NAMIKI, A. Different inhibitory effects of volatile anesthetics on T- and L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels in porcine tracheal and bronchial smooth muscle. **Anesthesiology**, v. 94, p. 683-693, 2001.

YAMATASO, S.; KAWANISHI, K.; KATO, A.; HASHIMOTO, Y. Organic bases from Brazilian Piptadenia species. **Phytochemistry**, v. 11, n. 2, p. 737-739, 1972.

ZELADA, F.; CONI, H. **Contribution to the study of Piptadenia cebil**. Tese, Universidad Nacional de la plata, Buenos Aires, p. 72, 1915.

ZHAO, L. M.; XU, Y. J.; ZHANG, Z. X.; NI, W.; CHEN, S. X. Effect of passive sensitization by serum from allergic asthmatic patients on the activity and expression

of voltage-dependent delayed rectifier potassium channel in human bronchial smooth muscle cells. **Chinese Medical Journal (English)**, v. 117, n 11, p. 1630-1636, 2004.

ZHU, X-M.; FANG, L-H.; LI, Y-J.; DU, G-H. Endothelium-dependent and -independent relaxation induced by pinocembrin in rat aortic rings. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 160-165, 2007.

Anexo A – Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

CERTIDÃO

João Pessoa, 30 de maio de 2010.

CEPA N°. 0105/10

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadores: Profa. Dra. Bagnólia Araújo Silva

Deprtamento/Setor: LTF

Ref.: Investigação do mecanismo de ação espasmolítica de galetina, isolada de Piptadenia stipulaceae Benth (Fabaceae), em aorta de rato e traquéia de cobaia

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

Número de animais: 150 ratos e 120 cobaias.

Período: até novembro de 2011.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB

APÊNDICE A - Artigo publicado na revista Journal of Smooth Muscle Research

Spasmolytic effect of galetin 3,6-dimethyl ether, a flavonoid obtained from *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke

Cibério Landim MACÊDO¹, Luiz Henrique César VASCONCELOS¹,
Ana Carolina de C. CORREIA¹, Italo Rossi Roseno MARTINS¹,
Daysianne Pereira de LIRA¹, Bárbara Viviana de Oliveira SANTOS^{1,2} and
Bagnólia Araújo da SILVA^{1,2}

¹Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Brazil;

²Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de
Ciências Farmacêuticas, Brazil

Received June 21, 2011; Accepted July 30, 2011

Abstract

Piptadenia stipulacea (Benth) Ducke is a tree of the Caatinga, in Northeast Brazil, popularly known as “Jurema-branca”, “Jurema malícia-da-serra”, “Carcará” and “Calumbi”. In folk medicine, a decoction or tincture of its bark and leaves are used to treat wounds and as healing agents. Galetin 3,6-dimethyl ether (FGAL) is a flavonoid isolated from the aerial components of *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. We decided to investigate a possible FGAL spasmolytic effect on preparations of both the guinea pig ileum and trachea, the rat uterus and the male rat aorta. FGAL inhibited oxytocin ($IC_{50} = 2.2 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ M) and carbachol (CCh)-induced ($IC_{50} = 7.7 \pm 1.3 \times 10^{-5}$ M) phasic contractions in the rat uterus, but was more effective in the inhibition of the oxytocin-induced contractions. In the guinea pig ileum, FGAL equipotently inhibited CCh ($IC_{50} = 2.8 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ M) and histamine-induced ($IC_{50} = 2.3 \pm 0.5 \times 10^{-5}$ M) phasic contractions. FGAL equipotently and concentration-dependently relaxed guinea pig trachea preparations pre-contracted with CCh, both in the absence ($EC_{50} = 0.8 \pm 0.1 \times 10^{-5}$ M) and presence ($EC_{50} = 1.0 \pm 0.1 \times 10^{-5}$ M) of a functional epithelium. FGAL also relaxed preparations of the rat aorta pre-contracted with phenylephrine in both the absence ($EC_{50} = 5.0 \pm 1.1 \times 10^{-6}$ M) and presence ($EC_{50} = 5.4 \pm 1.2 \times 10^{-6}$ M) of a functional endothelium. FGAL shows a non-selective spasmolytic effect on each of the smooth muscle preparations we have tested, but with a greater effect on those from the rat aorta. The relaxant effect on preparations of both the guinea pig trachea and the rat aorta seems to not involve the epithelium or endothelium-derived relaxing factors.

Key words: *Piptadenia stipulacea*, spasmolytic effect, smooth muscle, galetin 3,6-dimethyl ether

Introduction

The genus *Piptadenia* (Fabaceae) comprises about 80 species (Cardozo, 2006) of trees, shrubs and vines (Jobson and Luckow, 2007). The species of this genus contain various types of secondary metabolites such as tannins (Zelada and Coni, 1915), steroids (Miyauchi *et al.*, 1976), alkaloids (Yamataso *et al.*, 1972) and flavonoids (Alves *et al.*, 2003; Cardozo, 2006).

Flavonoids exhibit several pharmacological effects: antioxidant and anti-inflammatory (Hämäläinen *et al.*, 2007), antitumor (Izzo, 1996), vascular protective (Beretz and Cazenave, 1988) and spasmolytic on the guinea pig ileum (Macander, 1986; Lima *et al.*, 2005) and trachea (Lima *et al.*, 2011) and the rat uterus (Lima, 2008).

The species *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke is a tree of the Caatinga, in Northeast Brazil (Albuquerque and Andrade, 2002), popularly known as “Jurema-branca” (Fabricante and Andrade, 2007), “Jurema malícia-da-serra”, “Carcará” and “Calumbi” (Florentino *et al.*, 2007). In folk medicine, a decoction or tincture of its bark and leaves are used to treat wounds (Albuquerque and Andrade, 2002), and as healing agents (Bezerra, 2008). Ethyl acetate and aqueous fractions of this species showed antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice (Queiroz *et al.*, 2010).

A flavonoid named galetin 3,6-dimethyl ether (FGAL) (Fig. 1) was isolated from the aerial parts of *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke and identified using NMR, with both ^1H and ^{13}C (uni and bidimensional) (Lira *et al.*, 2009). This flavonoid showed antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice (Queiroz *et al.*, 2010).

Considering that there are no reports in the literature of the spasmolytic effects of FGAL and that many flavonoids show spasmolytic activity, we decided to investigate whether FGAL has a spasmolytic effect on preparations of the guinea pig ileum and trachea, the rat uterus and the male rat aorta.

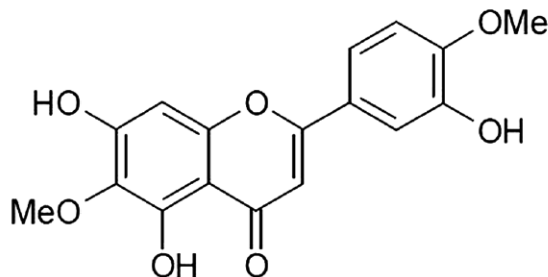


Fig. 1. Chemical structure of galetin 3,6-dimethyl ether (FGAL) (Lira *et al.*, 2009).

Material and Methods

Plant material

Piptadenia stipulacea (Benth.) Ducke was collected in Serra Branca municipality, Paraíba, in April 2005. The botanical material was identified by Maria de Fátima Agra (PhD) of the Department of Botany of LTF and a voucher specimen is deposited in the Herbarium Prof. Lauro

Pires Xavier (JPB), UFPB under the identification code AGRA *et al.* 3331 (JPB).

Extraction and isolation of galetin 3,6-dimethyl ether (FGAL)

Aerial components from the species were milled and extracted at room temperature with ethanol, obtaining a crude ethanol extract which separated into the hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol phases after liquid/liquid extraction with organic solvents. The chloroform phase was subjected to CC-normal phase providing three flavonoids: (1) santin, (2) demethoxycentaureidin and (3) galetin 3,6-dimethyl ether (FGAL). The structures were identified with both ^{13}C (uni and bidimensional) ^1H NMR and by comparison with literature data (Lira *et al.*, 2009).

Animals

Experiments were performed with trachea rings and ileum segments from guinea pigs (*Cavia porcellus*) of both sexes weighing between 300 and 500 g. Aortic rings from male rats and the uterus from virgin rats (*Rattus norvegicus*) were collected from animals weighing between 250–350 g and 150–250 g, respectively. The animals were maintained in a 12 h light-dark cycle (lights on: 06:00–18:00 h) under controlled temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and with free access to food (Purina®, Brazil) and water. All experimental procedures were performed in accordance with guidelines approved by the Animal Research Ethics Committee (CEPA) of LTF/UFPB (protocol CEPA/LTF: 0105/10).

Drugs and salts

Magnesium sulphate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), calcium chloride bihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), potassium chloride (KCl) and magnesium chloride (MgCl_2) were purchased from Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brazil). Monosodium phosphate-1-hydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) and monopotassium phosphate (KH_2PO_4) were purchased from Nuclear (São Paulo, Brazil). Glucose and sodium bicarbonate (NaHCO_3) were purchased from Dinâmica (São Paulo, Brazil). Sodium chloride (NaCl) was purchased from Fmaia (São Paulo, Brazil).

Histamine, Cremophor EL®, diethylstilbestrol, oxytocin, acetylcholine (ACh), arachidonic acid and phenylephrine were obtained from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Ethanol PA was purchased from Reagen Ltda. (Colombo, PR, Brazil). Carbamylcholine hydrochloride (CCh) was purchased from Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ, USA). All substances were dissolved in distilled water except FGAL, which was solubilized in Cremophor EL® (3%), dissolved in distilled water to a concentration of 10^{-2} M, and re-diluted in distilled water as needed for each experimental protocol. The final Cremophor EL® concentration in the organ-bath never exceeded 0.01% (v/v).

Organ preparation

The animals were euthanized following the principles of laboratory animal care in accordance with the guidelines of the bioethics committee. Female rats were pretreated with diethylstilbestrol (1 mg/kg sc) 24 h prior to the experiment to induce estrus, after which time they were sacrificed by cervical dislocation. The trachea and ileum from guinea-pigs, and the male rat

aorta and rat uterus were immediately removed, immersed in Krebs (aorta and trachea), modified Krebs (ileum) and Locke Ringer (uterus) solutions bubbled with carbogen mixture (95% O₂ and 5% CO₂). The solutions composition (mM) were: Krebs: NaCl (118), KCl (4.55), MgSO₄ (5.7), KH₂PO₄ (1.1), CaCl₂ (2.52), NaHCO₃ (25), glucose (11); modified Krebs: NaCl (117), KCl (4.7), MgSO₄ (1.3), NaH₂PO₄ (1.2), CaCl₂ (2.5), NaHCO₃ (25), glucose (11); Locke Ringer: NaCl (154), KCl (5.63), MgCl₂ (2.1), CaCl₂ (2.16), NaHCO₃ (5.95), glucose (5.55). The pH was adjusted to 7.4 by addition of a few drops of a 1N HCl solution. The segment of uterus was cut longitudinally into strips that were 1 to 2 cm in length and about 1 mm wide, and were immersed in organ baths at 32°C (Crankshaw, 2001). The ileum segment was cut transversally into 2 to 3 cm lengths (Daniel *et al.*, 2001), the trachea was divided into segments containing 3–4 cartilage rings each and the aorta cut into 3 mm wide rings. The preparations were immersed in 37°C organ baths with 5 mL of solution, bubbled with carbogen mixture. To register isometric contractions, both aorta and trachea segments were suspended from steel rods and connected to a force transducer (FORT-10) attached to an amplifier (TMB4M), both from World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA), the latter connected to an A/D converter into a PC running Biomed® software (BioData, Brazil). Isotonic contractions of the segments of both the uterus and ileum were suspended by cotton yarn and recorded on smoked kymograph drums using levers. The ileum was stabilized for 30 min, the uterus for 40 min and both the trachea and aorta for 60 min at a preload tension of 1 g (baseline). During the organ resting phase the solution in the bath was changed every 15 min to avoid the accumulation of metabolites.

Experimental procedures

1. Effect of FGAL on oxytocin and CCh-induced phasic contractions in the rat uterus

After the stabilization period, two similar dose-response curves were obtained with submaximal concentrations of oxytocin (10⁻² IU/mL) and CCh (10⁻⁵ M) (control). The contraction process was repeated until a stable response to oxytocin or CCh was obtained. FGAL effects were then determined by preincubating the uterine strips for 15 min with a single concentration in independent experiments before adding oxytocin or CCh. IC₅₀ values were expressed as the mean ± S.E.M. of individual IC₅₀ values and assessed with nonlinear regression.

2. Effect of FGAL on histamine and CCh-induced phasic contractions in guinea pig ileum

After the stabilization period, two similar dose-response curves were obtained with submaximal concentrations of CCh and histamine (10⁻⁶ M) (control). The contraction process was repeated until a stable response to CCh or histamine was obtained. FGAL effects were then determined by preincubating the ileum segments for 15 min with a single concentration in solutions of different concentrations in independent experiments before adding CCh or histamine. IC₅₀ values were expressed as the mean ± S.E.M. of individual IC₅₀ values and assessed with nonlinear regression.

3. Effect of FGAL on CCh-induced tonic contractions in guinea pig trachea in both absence and presence of functional epithelium

After the resting period, the trachea rings were contracted with CCh (10⁻⁶ M) and the isometric tension was recorded. When a stable contraction was attained (15–20 min), arachidonic acid (10⁻⁴ M) was added to the organ bath to confirm the presence of an epithelium (Tschirhart *et*

al., 1987). Epithelium functionality was confirmed by the presence of arachidonic acid-induced relaxation (above 50% of maximal tension). In some trachea rings, the luminal surface was gently rubbed with Krebs-wet cotton to remove the epithelial layer. The absence of epithelium was confirmed when arachidonic acid-induced relaxation was absent or when the relaxation was less than 10% of maximal tension. During the tonic phase of a second response to CCh, FGAL was cumulatively added in an attempt to obtain dose-relaxation curves in both the absence and presence of epithelium. The relaxant effect induced by FGAL was expressed as the reverse percentage of the initial contraction force elicited by CCh.

4. Effect of FGAL on phenylephrine-induced tonic contractions in rat aorta in both absence and presence of functional endothelium

After the resting period, the aortic rings were contracted with phenylephrine (0.3 μ M) and the isometric tension was recorded. When a stable contraction was attained (15–20 min), acetylcholine (1 μ M) was added to the organ bath to confirm the presence of a functional endothelium (Furchgott and Zawadzki, 1980). Endothelium functionality was confirmed by the presence of acetylcholine-induced relaxation (above 50% of maximal tension). In some aortic rings, the luminal surface was gently rubbed with Krebs-wet cotton to remove the endothelial layer. The absence of functional endothelium was confirmed by the absence of acetylcholine-induced relaxation or when the relaxation was inferior to 10% of maximal tension. During the tonic phase of a second response to phenylephrine, FGAL was cumulatively added as an attempt to obtain dose-relaxation curves in both the absence and presence of a functional endothelium. The relaxant effect induced by FGAL was expressed as the reverse percentage of the initial contraction force elicited by phenylephrine.

Statistical analysis

Results were statistically analyzed using the Student's *t*-test and a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's test when appropriate. Differences between values were considered to be significant when a calculated *P* was less than 0.05.

Concentrations producing half-maximal response (EC_{50}) and inhibiting half-maximal effect by an agonist (IC_{50}) were calculated with nonlinear regression, used here to represent the spasmolytic potency, and are presented as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M.) in all experiments.

All data were analyzed with GraphPad Prism® software version 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

Results

Effect of FGAL on oxytocin and CCh-induced phasic contractions in the rat uterus

FGAL inhibited phasic contractions induced by 10^{-2} IU/mL oxytocin ($IC_{50} = 2.2 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ M) and 10^{-5} M CCh ($IC_{50} = 7.7 \pm 1.3 \times 10^{-5}$ M) in the rat uterus (Fig. 2), suggesting a selective effect related to receptors, due to IC_{50} values showing a significant difference, with FGAL being more potent in inhibiting oxytocin-induced contractions. The FGAL inhibitory effect was reversed 1 h after its removal from the organ baths (data not shown).

128

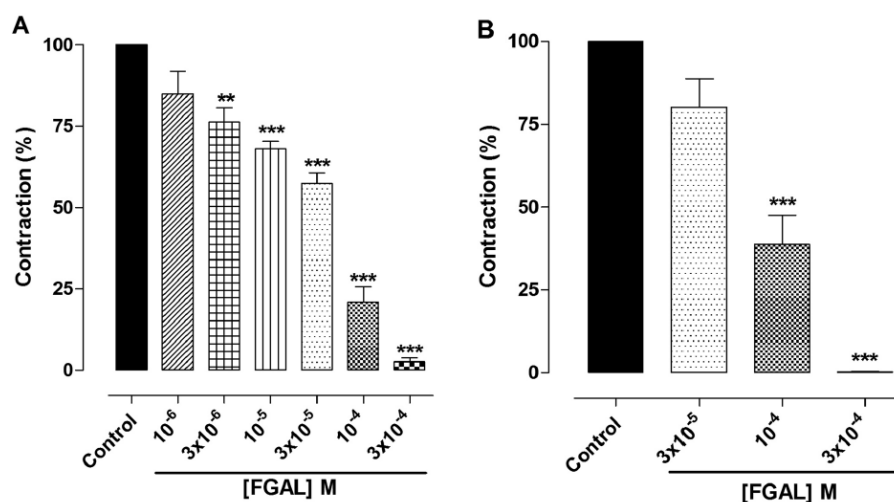
C.L. MACÊDO *et al.*

Fig. 2. Effect of FGAL on the phasic contractions induced by 10^{-2} UI/mL of oxytocin (A) and by 10^{-6} M of CCh (B) in the rat uterus. The results are expressed as mean + S.E.M. **, $P < 0.05$ and ***, $P < 0.001$ (control \times FGAL) ($n = 5$).

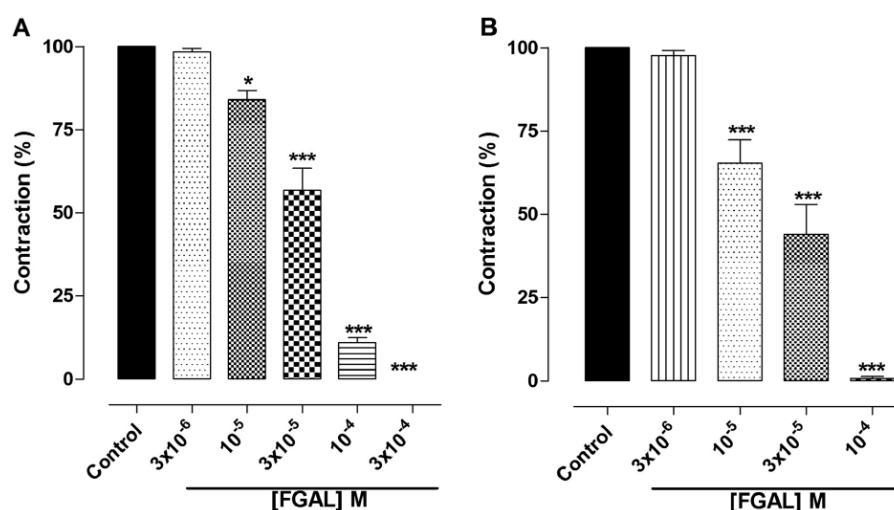


Fig. 3. Effect of FGAL on the phasic contractions induced by 10^{-6} M of CCh (A) and by 10^{-6} M of histamine (B) in the guinea-pig ileum. The results are expressed as mean + S.E.M. *, $P < 0.05$ and ***, $P < 0.001$ (control \times FGAL) ($n = 5$).

Effect of FGAL on histamine and CCh-induced phasic contractions in guinea pig ileum

FGAL inhibited phasic contractions induced by 10^{-6} M histamine ($IC_{50} = 2.3 \pm 0.5 \times 10^{-5}$ M) and 10^{-6} M CCh ($IC_{50} = 2.8 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ M) in the guinea pig ileum (Fig. 3), suggesting an “agonist-

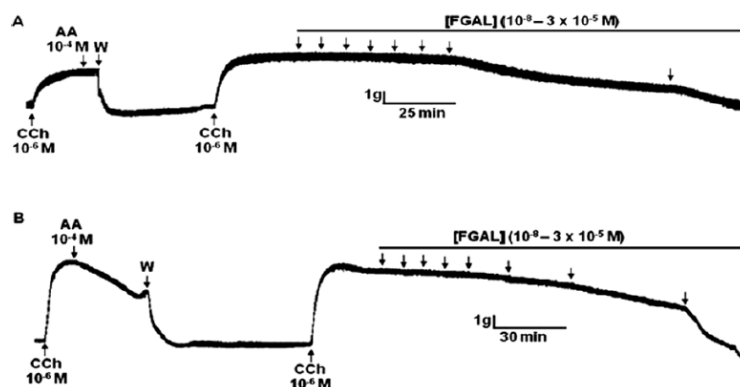


Fig. 4. Original record of the relaxant effect of FGAL on tonic contractions induced by 10^{-6} M CCh in guinea pig trachea rings, in the absence (A) and presence (B) of epithelium. The arrows after the induction of second contraction represent the cumulative addition of FGAL in the concentrations of 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} and 3×10^{-5} M, respectively. W = wash.

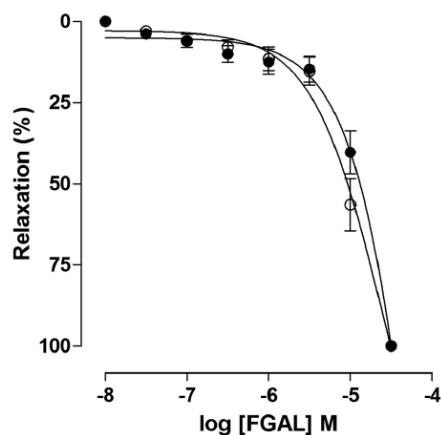


Fig. 5. Effect of FGAL on the tonic contractions induced by CCh in both the absence (\circ) and presence (\bullet) of epithelium in the guinea pig trachea ($n = 5$). Symbols and vertical bars represent the mean \pm SEM, respectively.

related non-selective effect", due to IC_{50} values showing no significant statistical difference. The FGAL inhibitory effect was reversed 1 h after its removal from the organ baths (data not shown).

Effect of FGAL on CCh-induced tonic contractions in guinea pig trachea in the absence and presence of functional epithelium

FGAL (10^{-8} – 3×10^{-5} M) concentration-dependently relaxed trachea rings pre-contracted with CCh (10^{-6} M) in both the absence ($EC_{50} = 0.8 \pm 0.1 \times 10^{-5}$ M) and presence ($EC_{50} = 1.0 \pm$

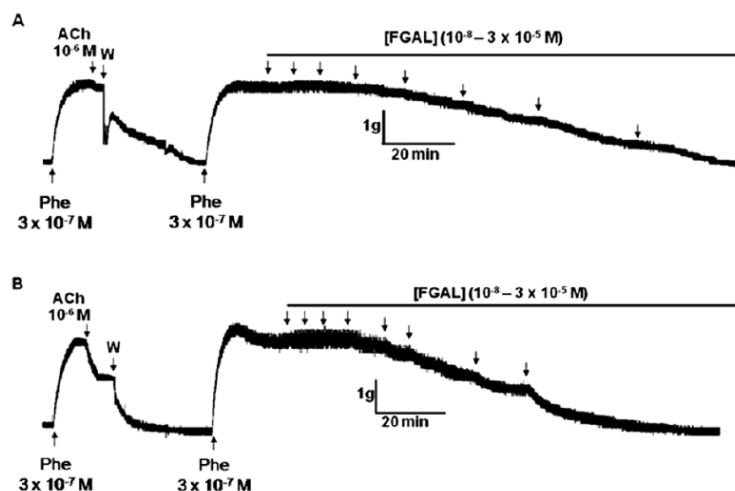


Fig. 6. Original record of the relaxant effect of FGAL on tonic contractions induced by phenylephrine in rings of the male rat aorta, in both the absence (A) and presence (B) of endothelium. The arrows after the induction of second contraction represent the addition of cumulative FGAL in concentrations of 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} and 3×10^{-5} M, respectively. W = wash.

0.1×10^{-5} M) of an epithelium (Figs. 4 and 5). There was no significant difference between the FGAL EC_{50} values. The FGAL relaxant effect was reversed two hours after removing the flavonoid from the tracheal rings (data not shown).

Effect of FGAL on phenylephrine-induced tonic contractions in rat aorta in the absence and presence of an endothelium

FGAL (10^{-8} – 3×10^{-5} M) dose-dependently relaxed aorta rings pre-contracted with phenylephrine (3×10^{-7} M) in both the absence ($EC_{50} = 5.0 \pm 1.1 \times 10^{-6}$ M) and presence ($EC_{50} = 5.4 \pm 1.2 \times 10^{-6}$ M) of a functional endothelium (Figs. 6 and 7). The FGAL relaxant effect was reversed two hours after removing the flavonoid from the aorta rings (data not shown).

Discussion

This study has demonstrated that the flavonoid galetin 3,6-dimethyl ether (FGAL) isolated from *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke shows nonselective spasmolytic effect in the guinea pig ileum and trachea, the male rat aorta and the rat uterus.

Smooth muscle is the main tissue responsible for controlling most hollow organs of the body. Smooth muscle cells are present in the walls of various organs (stomach, intestines, bladder, pulmonary airway, uterus) and vessels in the body. Thus, there is great interest in investigating drugs which act on smooth muscle that are either obtained directly from plants or that are derivatives of these. The regulation of smooth muscle contraction has an important role in many

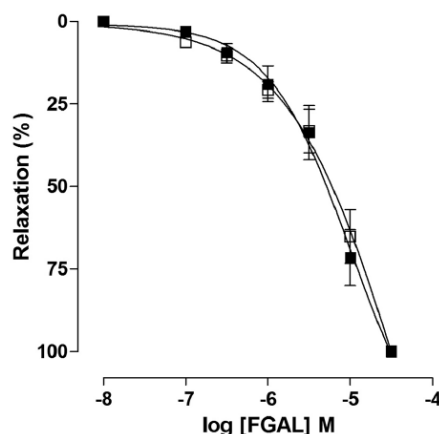


Fig. 7. Effect of FGAL on the tonic contractions induced by phenylephrine in rings of the male rat aorta in both the absence (■) and presence (□) of endothelium ($n = 5$). Symbols and vertical bars represent the mean \pm S.E.M., respectively.

pathophysiological processes where the abnormal contraction of smooth muscle is important, such as in hypertension, cerebral and coronary vasospasm, bronchial asthma, erectile dysfunction and childbirth complications (Webb, 2003).

The mechanism of smooth muscle contraction requires an increase in $[Ca^{2+}]_i$ with the main source of Ca^{2+} being the extracellular fluid. This enters the cytoplasmic compartment during membrane depolarization or after agonist stimuli (Wray *et al.*, 2005).

Substances that act on the uterine smooth muscle producing spasmolytic effect can be used to treat diseases that affect this organ. The investigation of FGAL spasmolytic effects has shown that this flavonoid inhibits CCh ($IC_{50} = 7.7 \pm 1.3 \times 10^{-5}$ M) and oxytocin-induced ($IC_{50} = 2.2 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ M) phasic contractions in the rat uterus. Significant differences were observed among the IC_{50} values suggesting that, in the rat uterus, FGAL acts at the receptor level (Fig. 2).

The intestinal smooth muscle model is an important mean of investigating the mechanisms involved in pathophysiological processes such as diarrhea and intestinal cramps. In the guinea pig ileum, FGAL concentration-dependently inhibited CCh ($IC_{50} = 2.8 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ M) and histamine-induced ($IC_{50} = 2.3 \pm 0.5 \times 10^{-5}$ M) phasic contractions, so equipotent, suggesting that FGAL is not acting at the receptor level in the guinea pig ileum, but probably at a site common of the pathway these agonists (Fig. 3).

One of the most important cell types involved in pulmonary airway diseases are smooth muscle cells, which are implicated in the development of asthma. The tracheal epithelium has an important role in modulating responses to several agonists in the pulmonary airway smooth muscle. The airway epithelial cells modulate the basal tone and reactivity of smooth muscle by releasing epithelium derived relaxant factors (EDRF) (Hashiba *et al.*, 1999), such as nitric oxide (NO) (Nijkamp *et al.*, 1993) and prostaglandins (Farmer *et al.*, 1987). The FGAL relaxant effect in the guinea pig trachea pre-contracted with CCh is concentration-dependent and occurs in both the

absence ($EC_{50} = 0.8 \pm 0.1 \times 10^{-5}$ M) and presence ($EC_{50} = 1.0 \pm 0.1 \times 10^{-5}$ M) of the epithelium (Figs. 4 and 5). This suggests that the FGAL relaxant effect in the guinea pig trachea does not involve epithelium-derived relaxing factors.

Recently, several substances and channels have been described as endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHF): small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels (SK_{Ca}), intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} -channels (IK_{Ca}), nitric oxide (NO), prostacyclin and epoxyeicosatrienoic acids. EDHF pathways are compromised in hypertension and diabetes (Edwards *et al.*, 2010). Consequently, drugs which act on vascular smooth muscle represent an alternative in treating these diseases. The FGAL relaxed rat aorta pre-contracted with phenylephrine in both the absence ($EC_{50} = 5.0 \pm 1.1 \times 10^{-6}$ M) and presence ($EC_{50} = 5.4 \pm 1.2 \times 10^{-6}$ M) of a functional endothelium (Figs. 6 and 7). This effect is concentration-dependent and equipotent, suggesting that the FGAL vasorelaxant effect in the rat aorta does not involve endothelium-derived relaxing factors.

The spasmolytic potency of FGAL in the guinea pig ileum was similar to that obtained with the flavonoid (2,3-*trans*-3,4-*trans*)-3,4,5,8-tetramethoxy-(6,7,2'',3'') furanoflavan which inhibited the phasic contractions induced by both acetylcholine ($IC_{50} = 4.6 \pm 0.8 \times 10^{-5}$ M) and histamine ($IC_{50} = 2.3 \pm 1.1 \times 10^{-5}$ M) (Lima *et al.*, 2005). But, in the guinea pig trachea, the potency of FGAL was higher than the flavonoid 5,6-dimethoxy-7-phenyl-6,7-dihydro-5H-furo [3,2-g] chromen-4,9-dione in the absence ($EC_{50} = 2.7 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ M) or presence ($EC_{50} = 4.2 \pm 0.6 \times 10^{-5}$ M) of epithelium (Lima *et al.*, 2011). The pharmacological potency of FGAL was higher in the rat aorta, both in the absence ($EC_{50} = 5.0 \pm 1.1 \times 10^{-6}$ M) and presence ($EC_{50} = 5.4 \pm 1.2 \times 10^{-6}$ M) of the endothelium. So, FGAL is an interesting candidate as a pharmacological tool in medical practice. However further studies are needed to clarify the mechanism of action of FGAL.

Therefore, we conclude that FGAL shows a nonselective spasmolytic effect in the guinea pig ileum and trachea, the rat uterus and the rat aorta. In both the guinea pig trachea and rat aorta, the relaxant effect seems to not involve epithelium and endothelium-derived relaxant factors, respectively.

Further studies are required to elucidate the mechanism of the spasmolytic action of FGAL in smooth muscles.

Acknowledgements

The authors thank José Crispim Duarte for providing technical assistance. This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for grants and fellowships.

References

- Albuquerque, U.P. and Andrade, L.H.C. (2002). Use of plant resources of the caatinga: the case of the wasteland of the Pernambuco state (Northeast Brazil). *Revista de Ciência e Tecnologia da América (Interciencia)* 27: 336–346.

- Alves, N.I., Gomes, M.S., Carvalho, M.G. and Carvalho, A.G. (2003) Chemical shifts of ^1H and ^{13}C of 5-H flavanone and 5-H-flavonol isolated from Leguminosae. *J. Rural Univ. Serie Exact Sciences and from Earth* **22**: 81–87.
- Beretz, A. and Cazenave, J.P. (1988). The effect of flavonoids on blood-vessel wall interactions. *Progr. Clin. Biol. Res.* **280**: 187–200.
- Bezerra, D.A.C. (2008). Phytochemical, bromatological and microbiological study from *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir. and *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. Dissertation presented on Program of Pos Graduation in Zootechny of Federal University of Campina Grande.
- Cardozo, N.A.R. (2006). Special metabolites isolated from branches and leaves of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr. (Leguminosae) and from flowers of *Laseguia erecta* Mull. Arg. (Apocynaceae). Dissertation presented on Program of Pos Graduation in Organic Chemistry of Federal University of Rio de Janeiro.
- Crankshaw, D.J. (2001). Pharmacological techniques for the in vitro study of the uterus. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **45**: 123–140.
- Daniel, E.E., Kwan, C.Y. and Janssen, L. (2001). Pharmacological techniques for the in vitro study of intestinal smooth muscles. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **45**: 141–158.
- Edwards, G., Félétou, M. and Weston, A.H. (2010). Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflug. Arch.* **459**: 863–879.
- Fabricante, J.R. and Andrade, L.A. (2007). Estrutural analysis of a remaining from Caatinga on Seridó Paraibano. *Oecol. Brasil.* **11**: 341–349.
- Farmer, S.G., Hay, D.W., Raeburn D. and Fedan, J.S. (1987). Relaxation of guinea-pig tracheal smooth muscle to arachidonate is converted to contraction following epithelium removal. *Br. J. Pharmacol.* **92**: 231–236.
- Florentino, A.T.N., Araújo, E.L. and Albuquerque, U.P. (2007). Contribution of agroforestry backyards on conservation of plants from Caatinga, city of Caruaru, PE, Brasil. *Acta Botanica Brasil.* **21**: 37–47.
- Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373–376.
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M. and Moilanen, E. (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit stat-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and no production in activated macrophages. *Mediat. Inflamm.* **2007**: 45673.
- Hashiba, K.M., Sato, T., Hirota, K., Hashimoto, Y. and Matsuki, A. (1999). The relaxant effect of propofol on guinea pig tracheal muscle is independent of airway epithelial function and beta-adrenoceptor activity. *Anesth. Analg.* **89**: 191–196.
- Izzo, A.A. (1996). PAF and the digestive tract, a review. *J. Pharm. Pharmacol.* **48**: 1103–1111.
- Jobson, R.W. and Luckow, M. (2007). Phylogenetic study of the genus *Piptadenia* (Mimosoideae: Leguminosae) using plastid trnL-F and trnK/matK sequence data. *Systematic Botany* **32**: 569–575.
- Lima, J.T., Almeida, J.R.G.S., Barbosa-Filho, J.M., Assis, T.S., Silva, M.S., Cunha, E.V.L., Braz-filho, R. and Silva, B. A. (2005). Spasmolytic action of diplotropin, a furanoflavan from *Diplotropis ferruginea* Benth., involves calcium blockade in guinea-pig ileum. *Z. Naturforsch. B* **60b**: 1093–1100.
- Lima, J.T., Almeida, J.R.G.S., Mota, K.S.L., Lúcio, A.S.S.C., Camara, C.A., Barbosa-Filho, J. M. and Silva, B.A. (2011). Selective spasmolytic effect of a new furanoflavoquinone derivative from diplotropin on guinea-pig trachea. *J. Chem. Pharmaceut. Res.* **3**: 249–258.
- Lima, J.T. (2008). Mechanism of spasmolytic action of diplotropin on guinea pig ileum and rat uterus and comparative study of its synthetic analogue. Thesis (Doctorate) Pos Graduation on Bioactives Synthetic and Natural Products, Center of Health Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.
- Lira, D.P., Queiroz, A.C., Souza, E.T., Agra, M.F., Araújo-junior, J.X., Barbosa-filho, J.M., Moreira, M.S.A.

- and Santos, B.V.O. (2009). Flavonoids from *Piptadenia stipulacea* (Fabaceae): isolation and preliminar analgesic activity. Congress of Brazilian Society of Chemistry.
- Macander, P.J. (1986). Flavonoids affect acetylcholine, prostaglandin E2 and antigen-mediated smooth muscle contraction. *Progr. Clin. Biol. Res.* **213**: 489–492.
- Miyauchi, Y., Yoshimoto, T. and Minami, K. (1976). Extractives of hardwood, IX, Extractives from hertwoos of *Piptadenia sp.* *Mokuzai Gakkaishi* **22**: 47–50.
- Nijkamp, F. P., Van Der Linde, H. J. and Folkerts, G. (1993). Nitric oxide synthesis inhibitors induce airway hyperresponsiveness in the guinea-pig in vivo and in vitro. Role of the epithelium. *Am. Rev. Respir. Disease* **148**: 727–734.
- Queiroz, A.C., Lira, D.P., Dias, Thays, L.M.F., Souza, E.T., Matta, C.B.B., Aquino, A. B., Silva, L.H.A.C., Silva, D.J.C., Mella, E.A.C., Agra, M.F., Bardosa-filho, J.M., Araújo-Júnior, J.X., Santos, B.V.O. and Alexandre-Moreira, M.S. (2010). The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). *J. Ethnopharmacol.* **128**: 377–383.
- Tschirhart, E., Frossard, N., Bertrand, C. and Landry, Y. (1987). Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **243**: 310–316.
- Yamasato, S., Kawanishi, K., Kato, A. and Hashimoto, Y. (1972). Organic bases from Brazilian Piptadenia species. *Phytochem.* **11**: 737–739.
- Zelada, F. and Coni, H. (1915). Contribution to the study of *Piptadenia cebil*. Thesis, Univesidad Nacional de La Plata, Buenos Aires.
- Webb, R.C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv. Physiol. Edu.* **27**: 201–206.
- Wray, S., Burdya, T. and Noble, K. (2005). Calcium signalling in smooth muscle. *Cell Calcium* **38**: 397–407.

APÊNDICE B - Artigo submetido na revista Bulletins of the Pharmaceutical Society of Japan

Bulletins of the Pharmaceutical Society of Japan
Galetin 3,6-dimethyl ether relaxant effect in guinea-pig trachea involves K⁺ and Cav channels and cyclic nucleotides-PDEs
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	BPB-Regular Article
Full Title:	Galetin 3,6-dimethyl ether relaxant effect in guinea-pig trachea involves K ⁺ and Cav channels and cyclic nucleotides-PDEs
First Author:	Cibério Landim Macêdo, Ph.D.
Order of Authors:	Cibério Landim Macêdo, Ph.D. Luiz Henrique César Vasconcelos Ana Carolina de Carvalho Correia, MSc Italo Rossi Roseno Martins, MSc Juliana da Nóbrega Carreiro, MSc Daysianne Pereira Lira, MSc Barbára Viviana Oliveira Santos, Ph.D. Bagnólia Araújo Silva, Ph.D.
Abstract:	Galetin 3,6-dimethyl ether (FGAL) is a flavonoid from Piptadenia stipulaceae (Benth.) Ducke aerial parts and since FGAL showed relaxant action in guinea-pig trachea, we aimed to elucidate the mechanisms involved in that action. Initially, we analyzed FGAL relaxation on guinea-pig trachea contracted by moderated (18 mM) and high (60 mM) elevation of extracellular K ⁺ and FGAL was more potent for KCl 18 mM (pD ₂ = 5.50 ± 0.36) than for KCl 60 mM (pD ₂ = 4.80 ± 0.07) indicating a possible K ⁺ channels participation, that was confirmed when in the presence of 10 mM TEA ⁺ , a non-selective K ⁺ channel blocker, FGAL relaxant potency was reduced (pD ₂ = 5.12 ± 0.07 to 4.87 ± 0.02). Some K ⁺ channels subtypes were investigated using selective blockers, but only in the presence of apamin, a SKCa blocker, FGAL relaxant potency was attenuated (pD ₂ = 4.85 ± 0.06) suggesting SKCa activation. Analyzing our results, and comparing FGAL relaxant potency when KCl 60 mM (pD ₂ = 4.80 ± 0.07) or CCh 10 ⁻⁶ M (pD ₂ = 5.02 ± 0.07) contracted trachea, an equipotency was observed indicating CaV participation, but not ROCs. Aminophylline, a non-selective inhibitor of phosphodiesterases (PDEs) was used to evaluated cyclic nucleotides-PDEs involvement and in flavonoid presence aminophylline-induce relaxation (pD ₂ = 4.12 ± 0.06) was potentiated around 4 folds (pD ₂ = 4.80 ± 0.44) indicating that cyclic nucleotides-PDEs participates. These results suggest that on guinea-pig trachea FGAL-induced relaxation may be mediated by K ⁺ and Ca ²⁺ channels as well as cyclic nucleotides-PDEs.
Manuscript Classifications:	22. Pharmacology
Keywords:	flavonoid; smooth muscle; relaxant action; galetin 3,6-dimethyl ether; ionic channels.

APÊNDICE C – Capítulos de livro

Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins



Edited by Franklin Riet-Correa, Jim Pfister,
Ana Lucia Schild and Terrie Wierenga



Chapter 115

Evaluation of Hemolytic and Spasmolytic Activities of *Sargassum polyceratum* Montagne (Sargassaceae)

A.C.C. Correia¹, C.L. Macêdo¹, F.S. Monteiro¹, F.H.T. Souza¹,
H.L.F. Pessoa², G.E.C. de Miranda⁴, C.S. Dias^{1,3}, J.M. Barbosa-Filho^{1,3},
F.A. Cavalcante⁵, and B.A. Silva^{1,3}

¹Laboratório de Tecnologia Farmacêutica 'Prof. Delby Fernandes de Medeiros',
Universidade Federal da Paraíba, PO Box 5009, João Pessoa, Paraíba 58.051-970,
Brazil; ²Departamento de Biologia Molecular/UFPB, Brazil; ³Departamento de Ciências
Farmacêuticas/UFPB, Brazil; ⁴Departamento de Sistemática e Ecologia CCEN/UFPB,
Brazil; ⁵Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/UFAL, Brazil

Chapter 116

Investigation of Hemolytic and Spasmolytic Activities of the Total Alkaloid Fraction from Root Bark of *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae)

A.C.C. Correia¹, F. de S. Monteiro¹, C.L. Macêdo¹, I.J.L.D. Basílio¹, H.L.F. Pessoa², M.F. Agra^{1,3}, J. Bhattacharyya¹, F.A. Cavalcante⁴, and B.A. Silva^{1,3}

¹Laboratório de Tecnologia Farmacêutica 'Prof. Delby Fernandes de Medeiros' / Universidade Federal da Paraíba, PO Box 5009, João Pessoa, Paraíba 58.051-970, Brazil; ²Departamento de Biologia Molecular/UFPB, Brazil; ³Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPB, Brazil; ⁴Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/UFAL, Brazil

Chapter 117

Hemolytic and Spasmolytic Assays of *Solanum asterophorum* Mart. (Solanaceae)

P.C.B. Silva¹, M.A. de Vasconcelos², L.C.G.C. Lima², L.O. Silva²,
K.M. Silva², A.C.C. Correia³, C.L. Macêdo³, H.L.F. Pessoa⁴, T.M.S. Silva⁵,
B.A. Silva^{3,6}, and F.A. Cavalcante^{1,2}

¹*Programa de Pós-Graduação em Nutrição/Faculdade de Nutrição/Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus A. C. Simões, Maceió, Alagoas, 57072-970, Brazil;* ²*Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/UFAL;* ³*Laboratório de Tecnologia Farmacêutica 'Prof. Delby Fernandes de Medeiros'/UFPB;* ⁴*Departamento de Biologia Molecular/UFPB;* ⁵*Departamento de Química/UFRPE;* ⁶*Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPB, Brazil*

Chapter 118

Evaluation of the Cytotoxic and Spasmolytic Activities of *Solanum asperum* Rich. (Solanaceae)

L.O. Lima¹, A.D.S. Silva¹, P.C.B. Silva², A.C.C. Correia³, C.L. Macêdo³, H.L.F. Pessoa⁴, T.M.S. Silva⁵, B.A. Silva^{3,6}, and F.A. Cavalcante^{1,2}

¹Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, 57010-020, Brazil; ²Programa de Pós-Graduação em Nutrição/FANUT/UFAL;

³Laboratório de Tecnologia Farmacêutica 'Prof. Delby Fernandes de Medeiros'/UFPB;

⁴Departamento de Biologia Molecular/UFPB; ⁵Departamento de Química/UFRPE;

⁶Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPB