

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

FABIO DE SOUZA MONTEIRO

**AÇÃO RELAXANTE DA FRAÇÃO DE ALCALOIDES TOTAIS OBTIDA DE
Solanum paludosum MORIC. ENVOLVE MODULAÇÃO POSITIVA DA VIA DO
ÓXIDO NÍTRICO E DOS CANAIS DE K⁺ EM ÍLEO DE COBAIA E AORTA DE
RATO**

João Pessoa - PB

2013

FABIO DE SOUZA MONTEIRO

**AÇÃO RELAXANTE DA FRAÇÃO DE ALCALOIDES TOTAIS OBTIDA DE
Solanum paludosum MORIC. ENVOLVE MODULAÇÃO POSITIVA DA VIA DO
ÓXIDO NÍTRICO E DOS CANAIS DE K⁺ EM ÍLEO 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

2013

M775a MONTEIRO, Fabio de Souza.

Ação relaxante da fração de alcaloides totais obtida de *Solanum paludosum* Moric. envolve modulação positiva da via do óxido nítrico e dos canais de K⁺ em íleo de cobaia e aorta de rato.-- João Pessoa: 2013.

151f.

Orientadora: Bagnólia Araújo da Silva

Tese (Doutorado) – UFPB/CCS

1. Produtos naturais. 2. *Solanum paludosum*. 3. Atividade espasmolítica. 4. Efeito relaxante. 5. Canais de K⁺. 6. Via do NO

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

FABIO DE SOUZA MONTEIRO

AÇÃO RELAXANTE DA FRAÇÃO DE ALCALOIDES TOTAIS OBTIDA DE *Solanum paludosum* MORIC. ENVOLVE MODULAÇÃO POSITIVA DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO E DOS CANAIS DE K⁺ EM ÍLEO 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. Liana Clébia Soares Lima de Moraes
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora externa**

**Profa. Dra. Gloria Isolina Boente Pinto Duarte
(Universidade Federal de Pernambuco)
Examinadora externa**

**Prof. Dra. Leônia Maria Batista
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora interna**

**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno**

Dedicatória

Aos meus pais,

Marcos Antônio Monteiro e Maria de Fátima de Souza Monteiro, por todo apoio e incentivo que me deram ao longo da minha formação.

A minha irmã,

Marilene de Souza Monteiro, e seu esposo Edivaldo Pereira da Silva e meu sobrinho Eduardo Monteiro Silva, pelos conselhos e a amizade conferida.

A meu irmão,

Marcos Antônio Monteiro Júnior, pelo apoio a mim durante toda a minha trajetória acadêmica e pessoal.

Aos meus primos,

Clodoaldo Dias Monteiro, Claudemir Dias Monteiro, Carmileide Dias Monteiro, Leandro Monteiro, pela força que me deram em continuar estudando e lutando na vida.

Agradecimientos

A Deus, por ter me dado força, coragem, esperança e sonhos para alcançar os objetivos.

A minha orientadora Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, por ter me encaminhado no ramo da pesquisa científica e mostrado as oportunidades e como alcançá-las. Por sua competência em compreender os meus defeitos, nunca desistindo de ensinar e dar conselhos para formação de uma equipe.

À Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, por ter me ajudado a resolver os mais diversos problemas ao longo do doutorado e por sua amizade.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Agra pela contribuição na identificação da espécie em estudo e pelos dados cedidos no tocante às espécies do gênero *Solanum* e sobre a família Solanaceae.

Ao Prof. Dr. Jnanabrata Bhattacharyya (*in memoriam*) e ao seu ex-aluno Prof. Dr. Ionaldo José Lima Diniz Basílio pelo fornecimento da fração de alcaloides totais, objeto de estudo deste trabalho e pelas várias discussões da química dos alcaloides.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas: Ítalo Martins, Ana Carolina Correia, Ana Caroline Silva, Gislaine Oliveira, Luiz Henrique, Layanne Araújo, Iara Souza, Maria da Conceição Silva, Aline Brito, Joedna Pereira, Polyana Silva, Tamyris Ferreira, pela ajuda, compreensão e momentos de descontração no laboratório.

Aos meus professores do Programa de Pós-Graduação, muito obrigado, por todos os ensinamentos.

A Tânia Alves de Araújo e a Caroline Manguiera pela desenvoltura para resolver os assuntos burocráticos da pós-graduação.

A José Crispim Duarte, pela sua amizade, competência e auxílio técnico nos mais variados problemas, que surgiam no dia-a-dia do laboratório.

A Luís Cordeiro da Silva e Adriano Soares Cordeiro pela colaboração no Biotério.

Aos demais funcionários que contribuíram desde a limpeza até a segurança.

Aos meus amigos e colegas da turma do Doutorado de 2009: Ana Karina Maia, Analucia Cabral, Antonileni Medeiros, Carolina Lima, Denise Bezerra, Fabiana Silva, Fabiola Furtado, Giciane Vieira, Hermann Costa, Kelly Samara Mota, Maria Angelica Alves, Marianne Fernandes, Melissa Luciano e Neyres de Jesus, pela amizade e discussões científicas.

Aos demais amigos que estão ou fizeram parte do Programa de Pós-Graduação e Sintéticos Bioativos: Ciberio Macedo, Silvia de Siqueira, Rodrigo Molina, Kiriaki Nurit, Adriana Fernandes, Sócrates Golzio, Fabrício Garcia, Roberto Nascimento, Franklin Nóbrega, Ápio Cláudio, Francisco Júnior, Renata Moura e demais amigos que acreditaram em mim e passaram energia positiva para o meu sucesso.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do CCS nas pessoas de Profa. Maria de Fátima Agra e Josean Fachine Tavares, pela dedicação, empenho e competência.

À Direção do então Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF/UFPB), hoje Centro de Biotecnologia (CBiotec/UFPB) na pessoa do Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga pelo apoio Institucional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, através da concessão da bolsa de estudo.

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

Fabio de Souza Monteiro

Resumo

RESUMO

Solanum paludosum Moric. (Solanaceae), conhecida popularmente como “jurubeba-roxa” no Nordeste do Brasil, é utilizada como sucedânea de *Solanum paniculatum* (“jurubeba-verdadeira”) na medicina popular para tratamento de hipertensão e desordem gastrointestinal. Estudos anteriores, realizados por Monteiro (2009) com a fração de alcaloides totais obtida da casca da raiz desta espécie (FAT-SP) demonstraram que a mesma apresentou atividade espasmolítica em músculos lisos, sendo mais potente em íleo de cobaia e aorta de rato. Em íleo de cobaia, o efeito relaxante envolve atividade antimuscarínica e, em aorta de rato, a participação da via NO/GC. Como a fração possui na sua composição glicoalcaloides e muitos destes são conhecidos por apresentar atividade citotóxica, avaliou-se esta atividade em miócitos da camada longitudinal do íleo de cobaia. Neste trabalho, observou-se que a FAT-SP não apresenta atividade citotóxica nessas células na concentração máxima testada (750 µg/mL), portanto prosseguiu-se com a investigação do mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em íleo de cobaia e aorta de rato até essa concentração. A FAT-SP apresentou um efeito relaxante em íleo de cobaia resistente ao bloqueio simultâneo das vias adrenérgica e colinérgica com guanetidina e atropina, respectivamente, sugerindo-se que há a participação da via NANC; o L-NAME (inibidor competitivo da NOS), reduziu a potência relaxante da FAT-SP, que foi revertida na presença da L-arginina, substrato para a NOS, sugerindo que o neurotransmissor da via NANC pode ser o NO. Porém, não houve redução da potência relaxante na presença de ODQ, inibidor seletivo da GC solúvel, o que sugere a não participação da GC no mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em íleo de cobaia. Por outro lado, a participação dos canais de K⁺ (BK_{Ca} e SK_{Ca}) foi evidenciada pela redução da potência relaxante da FAT-SP na presença de 5 mM de CsCl (bloqueador não seletivo dos canais de K⁺), de 1 mM de TEA⁺ (bloqueador seletivo dos BK_{Ca}) ou 100 nM de apamina (bloqueador seletivo dos SK_{Ca}). Em aorta de rato, observou-se que há a participação da via NO/GMPc/PKG, como evidenciado pela redução da potência relaxante da FAT-SP na presença de 10⁻⁴ ou 3 x 10⁻⁴ M de L-NAME, e da reversibilidade do efeito inibidor na presença da L-arginina, bem como, da redução da potência relaxante na presença de 3 x 10⁻⁵ M de Rp-8-Br-cGMPS, inibidor seletivo da PKG. Ademais, foi demonstrado que há a participação da calmodulina endotelial, pois houve redução da potência relaxante da FAT-SP na presença de 10⁻⁵ M de calmidazolium, inibidor seletivo da calmodulina endotelial; participação dos canais de K⁺ (K_V, SK_{Ca} e K_{ATP}) evidenciado pelos experimentos com 10 mM de TEA⁺ (bloqueador não seletivo dos canais de K⁺), 1 mM de 4-AP (bloqueador seletivo dos K_V), 5 x 10⁻⁸ M de apamina e 10⁻⁵ M de glibenclamida (bloqueador seletivo dos K_{ATP}). Observou-se ainda a inibição parcial da mobilização do Ca²⁺ do RS induzida pelo IP₃, mas não por cafeína (20 mM). Assim, o efeito relaxante da FAT-SP envolve a participação do NO e dos BK_{Ca} e SK_{Ca} em íleo de cobaia, e da calmodulina endotelial, bem como da via NO/GMPc/PKG e canais de K⁺ (K_V, SK_{Ca} e K_{ATP}) em aorta de rato.

Palavras-chave: *Solanum paludosum*, íleo de cobaia, aorta de rato, canais de K⁺ e via do NO.

Abstract

ABSTRACT

Solanum paludosum Moric. (Solanaceae), popularly known as "jurubeba roxa" in Brazil Northeast, is used as a substitute for *Solanum paniculatum* ("jurubeba-verdadeira") in folk medicine to treat hypertension and gastrointestinal disorder. In previous studies performed by Monteiro (2009) with total alkaloid fraction obtained from the root bark of this species (FAT-SP) was shown that its presented spasmolytic activity on smooth muscle, being more potent on guinea pig ileum and rat aorta. On guinea pig ileum, the relaxing effect involved antimuscarinic activity, and on rat aorta the NO/GC pathways. As the fraction has constituted by glycoalkaloids and many are known to exhibit cytotoxic activity, this activity was assessed in longitudinal layer myocytes from guinea pig ileum. In this work, we found that FAT-SP has no cytotoxic activity in these cells even the highest concentration tested (750 µg/mL), then we proceeded with the investigation of the relaxant action mechanism of FAT-SP on guinea pig ileum and rat aorta until that concentration. FAT-SP showed a relaxant effect on guinea pig ileum resistant simultaneous blockade of cholinergic and adrenergic pathways with guanethidine and atropine, respectively, suggesting there is involvement of NANC pathway; L-NAME (NOS competitive inhibitor) reduced FAT-SP relaxing potency, which was reversed in the presence of L-arginine, the substrate for NOS, suggesting that NO may be via NANC neurotransmitter. However, no reduction of the relaxing potency in the presence of ODQ, selective inhibitor of GC soluble, suggesting no participation of the GC in the FAT-SP relaxant action mechanism on guinea pig ileum. In the other hand, K⁺ channels participation (BK_{Ca} and SK_{Ca}) was evidenced by FAT-SP relaxing potency reduction on CsCl 5 mM presence (K⁺ channels nonselective blocker), TEA⁺ 1 mM (BK_{Ca} selective blocker) or apamin 100 nM (SK_{Ca} selective blocker). On rat aorta, it was observed participation pathway NO/cGMP/PKG, as can be evidenced by FAT-SP relaxing potency reduction in L-NAME 3 x 10⁻⁴ or 10⁻⁴ M presence and by inhibitory effect reversibility in L-arginine presence, as well as relaxing potency reduction in Rp-8-Br-cGMP 3 x 10⁻⁵ M presence, PKG selective inhibitor. Also, it was shown endothelial calmodulin participation because FAT-SP relaxing potency was reduced in presence calmidazolium 10⁻⁵ M, endothelial calmodulin selective inhibitor. The channel K⁺ participation (K_V, SK_{Ca} and K_{ATP}) was evidenced by experiments with TEA⁺ 10 mM (K⁺ channels nonselective blocker), 4-AP 1 mM (K_V selective blocker), apamin 5 x 10⁻⁸ M, glibenclamide 10⁻⁵ M (K_{ATP} selective blocker). Further, was showed partial inhibition of Ca²⁺ mobilization induced by IP₃ of RS, but not by caffeine (20 mM). Thus, FAT-SP relaxing effect involves NO, BK_{Ca} and SK_{Ca} participation, on guinea pig ileum and endothelial calmodulin, NO/cGMP/PKG pathway and K⁺ channels (K_V, SK_{Ca} and K_{ATP}) on rat aorta.

Keywords: *Solanum paludosum*, guinea pig ileum, rat aorta, K⁺ channels and NO pathway.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da solamargina	32
Figura 2 – <i>Solanum paludosum</i> Moric.....	33
Figura 3 – Estruturas químicas dos alcaloides esteroidais isolados das cascas das raízes de <i>Solanum paludosum</i>	34
Figura 4 – Fotos de <i>Cavia porcellus</i> (A) e <i>Rattus norvegicus</i> (B).....	45
Figura 5 – Foto do sistema de banhos para órgãos isolados formado por cubas (A), transdutores isométricos (B) e bomba termostática (C).....	53
Figura 6 – Fotos do amplificador (A), microcomputador (B), pHmetro digital (C) e da balança analítica (D)	54
Figura 7 – Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de histamina na ausência (A) e na presença de 3 μ M de guanetidina e 1 μ M de atropina (B) em íleo isolado de cobaia.....	74
Figura 8 – Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10^{-4} M de L-NAME (B) em íleo isolado de cobaia..	77
Figura 9 – Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 5 mM de CsCl (B) em íleo isolado de cobaia	82

Figura 10 – Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 1 mM de TEA⁺ (B) ou 100 nM de apamina (C) em íleo isolado de cobaia.....86

Figura 11 – Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 10^{-4} M (B), 3×10^{-4} M (C) de L-NAME ou 10^{-4} M de L-NAME mais 10^{-3} M de L-arginina (D) em aorta de rato com endotélio funcional... 89

Figura 12 - Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 10^{-5} M do calmidazolium (B) em aorta de rato com endotélio funcional.....93

Figura 13 - Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 3×10^{-5} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS (B) em aorta de rato com endotélio funcional.96

Figura 14 - Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 10 mM de TEA⁺ (B) em aorta de rato com endotélio funcional.....102

Figura 15 – Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 10 mM de TEA⁺ (B) em aorta de rato sem endotélio funcional104

Figura 16 – Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 1 mM de 4-AP (B), 5×10^{-8} M de apamina (C) e 10^{-5} M de glibenclamida (D) em aorta de rato com endotélio funcional108

Figura 17 – Registros típicos representativos do efeito inibitório da FAT-SP frente às contrações fásicas induzidas por cafeína (A) ou por FEN (B) em meio livre de Ca²⁺ em aorta de rato com endotélio funcional111

Figura 18 – Esquema representativo do mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em íleo isolado de cobaia**128**

Figura 19 – Esquema representativo do mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em aorta isolada de rato**129**

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Efeito citotóxico da FAT-SP em miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia. Meio de cultura DMEM (grupo controle) e DMEM mais FAT-SP (grupo teste)72
- Gráfico 2** – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de histamina na ausência e na presença de 3 μM de guanetidina e 1 μM de atropina em íleo isolado de cobaia.....75
- Gráfico 3** – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência e na presença de 10^{-4} M de L NAME ou L-NAME mais L-arginina em íleo isolado de cobaia.....78
- Gráfico 4** – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência e na presença de 10^{-5} M de ODQ em íleo isolado de cobaia.....80
- Gráfico 5** – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de histamina na ausência e na presença de 5 mM de CsCl em íleo isolado de cobaia.....83
- Gráfico 6** – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência e na presença 10^{-5} M de glibenclamida (A) ou em 0,3 mM de 4-AP (B) em íleo isolado de cobaia.....85
- Gráfico 7** – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência e na presença de 1 mM de TEA⁺ ou 100 nM de apamina em íleo isolado de cobaia87
- Gráfico 8** – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência e na presença de 10^{-4} ou 3×10^{-4} M de L-NAME em aorta de rato com endotélio funcional.90

Gráfico 9 – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência e na presença de 10^{-4} M de L-NAME ou 10^{-4} M de L-NAME mais 10^{-3} M de L-arginina em aorta de rato com endotélio funcional.91

Gráfico 10 – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência e na presença de 10^{-5} M de calmidazolium em aorta de rato com endotélio funcional.94

Gráfico 11 – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência e na presença de 3×10^{-5} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS em aorta de rato com endotélio funcional.97

Gráfico 12 – Efeito relaxante (A) e valores de E_{max} (%) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 30 mM ou 80 mM de KCl em aorta de rato com endotélio funcional.99

Gráfico 13 – Efeito relaxante (A) e valores de E_{max} (%) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 30 mM ou 80 mM de KCl em aorta de rato sem endotélio funcional..100

Gráfico 14 – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência e na presença de 10 mM de TEA^+ em aorta de rato com endotélio funcional.....103

Gráfico 15 – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência e na presença de 10 mM de TEA^+ em aorta de rato sem endotélio funcional.....105

Gráfico 16 – Efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência e na presença de 1 mM TEA^+ (A) ou 3×10^{-5} M de BaCl_2 (B) em aorta de rato com endotélio funcional..107

Gráfico 17 – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência e na presença de

1 mM 4-AP, 5×10^{-8} M de apamina ou 10^{-5} M de glibenclamida em aorta de rato com endotélio funcional..**109**

Gráfico 18 – Efeito da FAT-SP frente as contrações fásicas induzidas por 20 mM de cafeína (**A**) ou 10^{-6} M de FEN (**B**) em aorta de rato com endotélio funcional..**112**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução de Krebs modificado	48
Tabela 2 - PSS sem Ca^{2+} ("calcium-free physiological salt solution")	48
Tabela 3 - Meio de Cultura DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Médium")	48
Tabela 4 - PBS ("Physiological Buffer Solution")	49
Tabela 5 - HBSS ("Hank's Balanced Salt Solution")	49
Tabela 6 - Composição da solução de Krebs normal.	50
Tabela 7 - Solução de Krebs despolarizante com 30 mM de KCl	50
Tabela 8 - Solução de Krebs despolarizante com 80 mM de KCl	51
Tabela 9 - Solução de Krebs despolarizante e livre de Ca^{2+}	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$[(Ca^{2+})_4-CaM]$	complexo cálcio - calmodulina
$[Ca^{2+}]_c$	concentração de Ca^{2+} citosólico
4-AP	4-aminopiridina
ACh	acetilcolina
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
BK_{Ca}	canais de potássio ativados por Ca^{2+} de grande condutância
CaM	calmodulina
Ca_v	canais de cálcio dependentes de voltagem
Ca_v1	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 1
Ca_vL	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L
CBiotec	Centro de Biotecnologia
CCh	carbacol
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CE₅₀	concentração molar de uma substância necessária para produzir 50% de seu efeito máximo
CsCl	Cloreto de Césio
DAG	diacilglicerol
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle Médium”
e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
eNOS	sintase do óxido nítrico endotelial
FAT-SP	fração de alcaloide total obtida de <i>Solanum paludosum</i> Moric.
FEN	fenilefrina

G_{q/11}	proteína G _q ou proteína G ₁₁
G_{αq}	subunidade α da proteína G _q
G_{12/13}	proteína G ₁₂ ou proteína G ₁₃
GC	ciclase de guanilil
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	receptor acoplado à proteína G
GTP	trifosfato de guanosina
IK_{Ca}	canais de potássio ativados por Ca ²⁺ de condutância intermediária
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP₃ R	receptor de IP ₃
K_{ATP}	canais de potássio sensíveis ao ATP
K_{Ca}	canais de potássio ativados por Ca ²⁺
K_{ir}	canais de potássio retificadores de entrada
K_v	canais de potássio dependentes de voltagem
L-NAME	<i>N</i> ω-nitro-L-arginina metil éster
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
MLCP	fosfatase da cadeia leve da miosina
NO	óxido nítrico
nNOS	sintase do óxido nítrico neuronal
NANC	não adrenérgico não colinérgico
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazol-[4,3-a]quinoxalina-1-ona
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKG	proteína cinase dependente de GMPc
PLC	fosfolipase C

PMCA	Ca ²⁺ ATPase da membrana plasmática
PPgPNSB	Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
RhoA	pequena proteína G ligante de GTP
ROK	cinase dependente de RhoA
RYR	receptor de rianodina
RS	retículo sarcoplasmático
SERCA	Ca ²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático
SK_{Ca}	canais de potássio ativados por Ca ²⁺ de pequena condutância
TEA⁺	íon tetraetilamônio
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
2 OBJETIVOS.....	41
2.1 Objetivos gerais.....	42
2.2 Objetivos específicos.....	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 MATERIAL	44
3.1.1 Material botânico	44
3.1.2 Obtenção da FAT-SP	44
3.1.3 Preparação da fração de alcaloides totais.....	44
3.1.4 Animais.....	45
3.1.5 Substâncias.....	46
3.1.6 Soluções nutritivas	47
3.1.7 Aparelhos	52
3.2 MÉTODOS	55
3.2.1 Avaliação da citotoxicidade da FAT-SP em miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia	55
3.2.1.1 Cultura de miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia.....	55
3.2.1.1.1 Efeito da FAT-SP sobre a viabilidade celular de miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia	56
3.2.2 Mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em íleo de cobaia.....	58
3.2.2.1 Avaliação da participação da via NANC na ação relaxante da FAT-SP	58

3.2.2.2.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de guanetidina e atropina.	58
3.2.2.2.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de L-NAME ou L-NAME + L-arginina	59
3.2.2.3 Avaliação da participação da ciclase de guanilil (GC) na ação relaxante da FAT-SP. Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de ODQ	60
3.2.2.4 Investigação da participação dos canais de potássio na ação relaxante da FAT-SP	61
3.2.2.4.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl)	61
3.2.2.4.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio	61
3.2.3 Mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em aorta de rato	63
3.2.3.1 Avaliação da via de sinalização NO/PKG na ação relaxante da FAT-SP.....	63
3.2.3.1.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de L-NAME ou L-NAME + L-arginina	63
3.2.3.1.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de calmidazolium	64
3.2.3.1.3 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS	64
3.2.3.2 Investigação da participação dos canais de potássio na ação relaxante da FAT-SP	66
3.2.3.2.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou 80 mM de KCl	66

3.2.3.2.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de TEA ⁺	66
3.2.3.2.3 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio	67
3.2.3.3 Avaliação da participação da mobilização de Ca ²⁺ do retículo sarcoplasmático. Efeito da FAT-SP sobre a mobilização de cálcio do retículo sarcoplasmático sensíveis à cafeína ou ao IP ₃	68
3.2.4 Análise Estatística	69
4 RESULTADOS.....	70
4.1 Avaliação da citotoxicidade da FAT-SP em miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia	71
4.1.1 Cultura de miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia	71
4.1.1.1 Efeito da FAT-SP sobre a viabilidade celular de miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia	71
4.2 Mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em íleo de cobaia	73
4.2.1 Avaliação da participação da via NANC na ação relaxante da FAT-SP	73
4.2.1.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de guanetidina e atropina.	73
4.2.1.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de L-NAME ou L-NAME + L-arginina	76
4.2.2 Avaliação da participação da ciclase de guanilil (GC) na ação relaxante da FAT-SP. Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de ODQ	79
4.2.3 Investigação da participação dos canais de potássio na ação relaxante da FAT-SP	81
4.2.3.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl)	81

4.2.3.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio	84
4.3 Mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em aorta de rato.....	88
4.3.1 Avaliação da via de sinalização do NO na ação relaxante da FAT-SP	88
4.3.1.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de L-NAME ou L-NAME + L-arginina	88
4.3.1.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de calmidazolium.....	92
4.3.1.3 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS	95
4.3.2 Investigação da participação dos canais de potássio na ação relaxante da FAT-SP.....	98
4.3.2.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou 80 mM de KCl.....	98
4.3.2.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de TEA ⁺	101
4.3.2.3 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio	106
4.3.3 Avaliação da participação da mobilização de Ca ²⁺ do retículo sarcoplasmático. Efeito da FAT-SP sobre a mobilização de cálcio do retículo sarcoplasmático sensíveis à cafeína à fenilefrina	110
5 DISCUSSÃO	113
6 CONCLUSÕES	126
REFERÊNCIAS.....	130
APÊNDICE A	149
APÊNDICE B	149

APÊNDICE C 149

APÊNDICE D 149

ANEXO 150

1 Introdução

A busca para o alívio e/ou a cura das doenças pelo homem por milhares de anos era e ainda é conseguida por meio da utilização dos produtos naturais, os quais existiam na forma de tinturas, chás e pós (BALICK; COX, 1997; VIEGAS-JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Antes da “era sintética”, no início do ano de 1900, registrou-se que cerca de 80% dos remédios foram obtidos através de raízes, cascas e folhas (McCHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007).

No entanto, com o desenvolvimento da química computacional, a indústria farmacêutica investiu na ideia de que seria possível a descoberta de moléculas biologicamente ativas para ampliação das possibilidades terapêuticas na espécie humana por meio do planejamento racional de fármacos. Porém, em 2004 a indústria farmacêutica divulgou que esse investimento não correspondeu ao lançamento de fármacos inovadores (VIEGAS-JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Diante disso, houve um ressurgimento dos produtos naturais para a descoberta de novos fármacos ou mesmo de fitoterápicos, o que incentivou a pesquisa científica para a comprovação dos efeitos observados empiricamente (SIXEL; PECINALLI, 2005; LÓPEZ, 2006).

Os produtos naturais continuam sendo fontes de substâncias potencialmente aplicáveis com propriedades biológicas, farmacológicas ou terapêuticas. Entre 25 e 50% dos medicamentos atualmente comercializados devem suas origens aos produtos naturais. A vinblastina, a quinina, a vincristina, a artemisinina, o etoposídeo, o teniposídeo, o paclitaxel e os derivados de camptotecina, topotecano e irinotecano são exemplos de fármacos isolados de plantas que contribuíram de maneira significativa para ampliação das possibilidades terapêuticas na espécie humana (CALIXTO, 2005; KINGSTON, 2011).

Além de sua utilização na terapêutica, os produtos naturais são tradicionalmente empregados na identificação e classificação de receptores e na investigação de funções fisiopatológicas e de sítios de ação de fármacos, atuando, assim, como ferramentas farmacológicas. Exemplos clássicos incluem a nicotina, fisostigmina, muscarina, pilocarpina e atropina utilizadas no estudo de receptores nicotínicos e muscarínicos (SIMMONDS, 2003).

O Brasil detém a maior diversidade biológica do mundo, contando com uma flora rica, na qual se estima existir aproximadamente 55 mil espécies vegetais, que

desperta grande interesse de comunidades científicas em todo o mundo para o estudo, conservação e utilização destes recursos, estando entre os elementos favoráveis ao desenvolvimento de medicamentos a partir de produtos naturais (OMENA, 2007; SOUZA; FELFILI, 2006).

Dessa forma, o Brasil é um importante fornecedor de material botânico para o mercado farmacêutico nacional e internacional, devido à diversidade de plantas que apresenta. Por exemplo, a pilocarpina, indicada principalmente como miótico no controle da pressão intraocular elevada (glaucoma), que é obtida das folhas do *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth, jaborandi (Rutaceae) e o alfa bisabolol com ação anti-inflamatória, cicatrizante e antisséptica suave, que é indicado principalmente para produtos de higiene e cuidado do bebê e de crianças, para cremes de peles delicadas, bronzeadores, dentre outros, sendo obtido da *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, Asteraceae (madeira de candeia) (BRANDÃO et al., 2008; KOROLKOVAS, 2011).

Nesse contexto, destaca-se a região Nordeste do Brasil que apresenta uma flora rica em várias famílias e pouco estudada, entre elas, a Solanaceae que compreende 100 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies (OLMSTEAD et al., 2008). Muitas espécies da família Solanaceae são utilizadas na alimentação humana, por exemplo, a batatinha (*Solanum tuberosum* L.), o tomate (*Solanum lycopersicum* L.), a berinjela (*Solanum melongena* L.) e a pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.); bem como produtoras de drogas de interesse farmacológico, por exemplo, a atropina (*Atropa belladonna* L.), a nicotina (*Nicotiana tabacum* L.), entre outras (AGRA, 2000).

O gênero *Solanum*, pertencente à família Solanaceae, é um dos mais amplos do reino vegetal com cerca de 1700 espécies (BOHS, 2007). No Brasil, o gênero está representado por 260 espécies, das quais 127 são endêmicas (AGRA, 2004). Estas espécies podem ser encontradas na região Sudeste (CARVALHO; COSTA; DUARTE, 2001), Sul (MENTZ; OLIVEIRA, 2004) e Nordeste (AGRA, FREITAS, BARBOSA-FILHO, 2007), sendo que 22 destas são encontradas na Paraíba (AGRA; NURIT-SILVA; BERGER, 2009).

Muitas espécies deste gênero conhecidas como “jurubeba” são utilizadas na medicina popular nordestina no tratamento de várias doenças, dentre as quais se

destacam: disfunções hepáticas e renais (AGRA et al., 2008), asma (ZARGARI, 1992), espasmos musculares, diarreia (ABEBE, 1986), hipertensão e desordens gástricas (RIBEIRO et al., 1986; NYMAN et al., 1998, MESIA-VELA et al., 2002), entre outras.

O gênero *Solanum* tem sido bastante estudado devido, principalmente, às atividades biológicas apresentadas por várias de suas espécies, e tem como característica a produção de uma variedade de glicoalcaloides (FERREIRA et al., 1996).

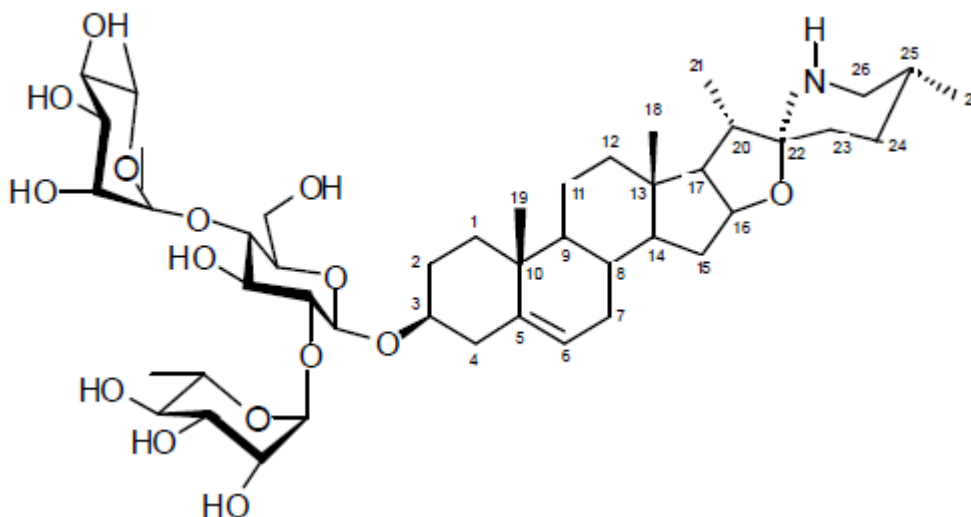
Em relação às atividades biológicas apresentadas por espécies do gênero *Solanum* podemos citar as atividades hipotensora, apresentada por *Solanum paniculatum* L., *Solanum stipulaceum* Roem., Schult., *Solanum melongena* L. e *Solanum sisymbirifolium* Lam. (ALMEIDA et al., 1985; RIBEIRO et al., 1986; SHUM; CHIU, 1991; IBARROLA et al., 2000; RIBEIRO et al., 2002); antitumoral, relatada para *Solanum dulcamara* L. e *Solanum sodomaeum* L. (KUPCHAN et al., 1965; CHAM, 1994); depressora sobre o Sistema Nervoso Central, referida para *Solanum nigrum* L. (PEREZ et al., 1998); antimicrobiana, mencionada para *Solanum torvum* Sw. (CHAH; MUKO; OBOEGBULEM, 2000); moluscicida, apresentada por *Solanum aculeastrum* Dunal (WANYONYI et al., 2002) e antidiarreica apresentada pelas espécies *Solanum paludosum* Moric. e *Solanum asterophorum* Mart (LIMA et al., 2010; SILVA et al., 2012). Além dessas atividades, muitas espécies também apresentam efeito espasmolítico, como por exemplo, *Solanum dulcamara* L. (BOYD, 1928), *Solanum torvum* Sw. (BHAKUNI et al., 1969), *Solanum indicum* L. (ABRAHAM et al., 1986). *Solanum paraibanum* Agra (OLIVEIRA et al., 2001; SILVA, 2007), *Solanum jabrense* Agr & Nee (CAVALCANTE, 2001; CLAUDINO, 2003), *Solanum agrarium* Sendtn., (SANTOS et al., 2004; CORREIA, 2007), *Solanum megalonyx* Sendtn e *Solanum asterophorum* Mart. (OLIVEIRA et al., 2006a,b), *Solanum paniculatum* L. (SILVA, 2006), *Solanum asperum* Rich. (COSTA, 2006; CORREIA, 2007; GARCIA, 2007) e *Solanum paludosum* Moric. (ATAÍDE, 1982; SILVA et al., 2002; DUARTE et al., 2003; SILVA, 2005; SANTOS, 2006; COSTA, 2006; MONTEIRO, 2009; CORREIA et al., 2011).

No gênero *Solanum* estão presentes os glicoalcaloides que se apresentam como alcaloides esteroidais glicosilados que são formados a partir de unidades

isoprênicas. Consistem em dois componentes estruturais básicos: uma parte hidrofóbica (aglicona) com esqueleto colestano de 27 carbonos e outra hidrofílica (Figura 1), com uma cadeia lateral formada por unidades de aldoses (D-glicose, D-galactose, D-xilose e L-ramnose) geralmente ligadas à posição 3-hidroxi das agliconas, podendo conter de uma até quatro unidades de aldoses (SCHREIBER, 1968). Esses glicoalcaloides são produzidos pelas plantas com a finalidade de defesa contra insetos e microrganismos (JADHAV et al., 1997). Além disso, muitos glicoalcaloides são citotóxicos, por exemplo, solamargina de *Solanum incanum* Chinês, que possui potente atividade citotóxica em hepatócitos humanos (Hep3B) e fibroblastos de pele normal (HSU et al., 1996; KUO et al., 2000).

Ademais, muitas atividades biológicas apresentadas por espécies do gênero *Solanum* são atribuídas à presença de glicoalcaloides, por exemplo, as atividades antipirética e anti-inflamatória apresentadas pela fração glicoalcaloídica da espécie *Solanum linguistrinum* Lood. (DELPORTE et al., 1998); antiviral contra *Herpes genitalis*, *Herpes simplex* e *Herpes zoster* apresentada pelos glicoalcaloides solamargina e solasonina de *Solanum americanum* Miller (CHATAING et al., 1999); antibacteriana contra *Corynebacterium sepedonicum* apresentada por α -chaconina e a α -solanina de *Solanum tuberosum* L. (PAQUIN; LACHANCE, 1964); antitumoral atribuída aos glicoalcaloides solamargina e solasonina de *Solanum sodomaeum* L. (CHAM, 1994).

Figura 1 – Estrutura da solamargina (contendo a aglicona com esqueleto esteroidal colestano de 27 carbonos e unidade de aldose)



Fonte: Silva et al., 2006

A espécie *Solanum paludosum* Moric. (Figura 2) está incluída no subgênero *Leptostemonum* que se apresenta na forma de arbusto, sendo conhecida popularmente como “jurubeba”, “jurubeba-roxa” ou “jurubeba-brava”, utilizada na medicina popular para o tratamento de problemas hepáticos, hipertensão e desordem gastrointestinal como sucedânea da espécie *Solanum paniculatum*, uma vez que, é muito semelhante em termos botânicos a esta última (JOACHIMOVITS, 1954; RIBEIRO et al., 1986; AGRA; BHATTACHARYYA, 1999).

Em termos geográficos, a espécie *S. paludosum* possui ampla distribuição, ocorrendo na Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa e no Brasil (de Norte a Sudeste), em áreas costeiras, orlas de matas, restingas, tabuleiros, em solos arenosos, argilo-arenosos e salinos (AGRA, 2004).

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado no Chemical Abstract, NAPRALERT (NATURAL PRoducts ALERT), teses, dissertações e sites de busca, *Solanum paludosum* vem sendo estudada do ponto de vista, botânico, químico e farmacológico.

Figura 2 – Fotografia de *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae)

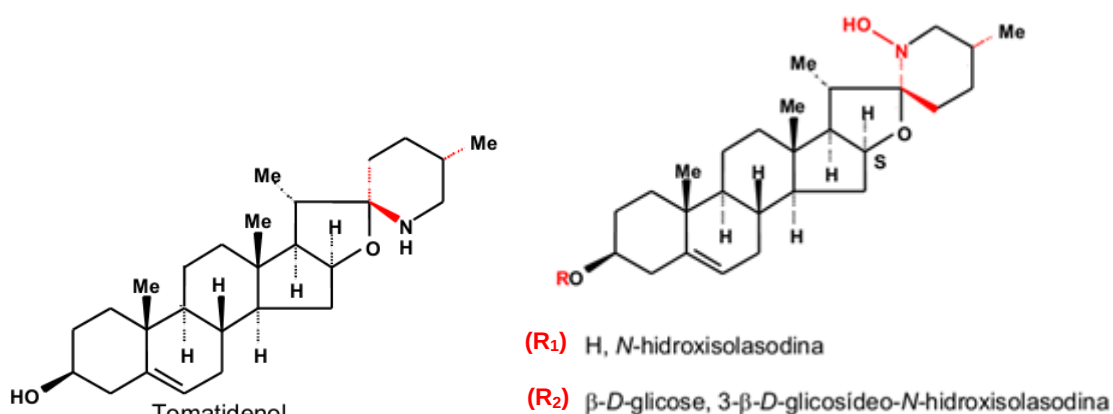


Fonte: Kiriaki N. Silva, 2009

A primeira descrição botânica de *S. paludosum* foi feita por Stefano Moricand (1833-1846), que descreve o seu habitat em lugares pantanosos. Isto originou o nome do epíteto “*paludosum*”, de palustre, alagado (ATAÍDE, 1982). Em outros estudos, foi possível descrever as diferenças macroscópicas e microscópicas das folhas, caules e raízes de *S. paludosum* em relação a outras espécies de *Solanum* (BASÍLIO; AGRA; BHATTACHARYYA, 2007).

Os estudos do ponto de vista químico foram realizados com a casca da raiz, os frutos e as partes aéreas de *S. paludosum*. Os constituintes majoritários isolados da casca da raiz e dos frutos são alcaloides esteroidais e seus glicosídeos (BHATTACHARYYA, 1984; BARBOSA-FILHO et al., 1991; VALVERDE et al., 1993; BASÍLIO, 2008), enquanto que das partes aéreas são os flavonoides (SILVA et. al., 2002).

Figura 3 - Estruturas químicas dos alcaloides esteroidais isolados das cascas das raízes de *Solanum paludosum*: tomatidenol, N-hidroxisolasodina (R_1) e 3- β -D-glicosídeo-N-hidroxisolasodina (R_2)



Fonte: Basílio, 2008

Os estudos farmacológicos realizados no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) demonstraram que os extratos, fases e flavonoides isolados das partes aéreas de *S. paludosum* apresentaram atividade espasmolítica não seletiva em útero de rata, aorta de rato, traqueia e íleo de cobaia

(SILVA et al., 2002; DUARTE et al., 2003; SILVA, 2005; SANTOS, 2006; COSTA, 2006). Além disso, no estudo da investigação dos efeitos citotóxico em eritrócitos de ratos e espasmolítico em músculos lisos da fração de alcaloides totais obtida da casca da raiz de *S. paludosum* (FAT-SP) concluiu-se que a FAT-SP, não apresentou atividade hemolítica em eritrócitos de rato; apresentou atividade espasmolítica não seletiva em útero de rata, aorta de rato, traqueia e íleo de cobaia sendo mais potente em íleo de cobaia e aorta de rato com endotélio funcional e que, no efeito espasmolítico da FAT-SP há a participação de receptores muscarínicos em íleo de cobaia e da via do óxido nítrico/ciclase de guanilil (NO/GC) em aorta de rato (MONTEIRO, 2009).

Há um grande interesse em se investigar drogas obtidas diretamente de plantas ou seus derivados que atuem sobre a musculatura lisa, pois esse músculo é o principal responsável pelo controle da maioria dos órgãos e dos sistemas do corpo (WATTERSON, 2005). As células da musculatura lisa estão presentes nas paredes de vários órgãos do corpo, incluindo os vasos sanguíneos, estômago, intestinos, bexiga e vias aéreas. A regulação/desregulação da contração do músculo desempenha um papel integral em muitos processos fisiopatológicos. Por exemplo, a desregulação da contração do músculo liso é importante na hipertensão, no vasoespasma cerebral e coronário, na asma brônquica, no trabalho de parto e na disfunção erétil (WIRTH; OFFERMANN, 2012).

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

O espasmo é caracterizado por uma contração muscular e este efeito pode ser revertido quando se impede alguma etapa do processo contrátil. Duas formas de acoplamento iniciam a contração de músculos lisos: o eletromecânico e o fármaco-mecânico. No eletromecânico, o início da contração ocorre devido à despolarização da membrana em resposta à estimulação elétrica, choques mecânicos, ligação de um agonista a um receptor de membrana ou elevação da concentração de K^+ no meio extracelular, o que leva a um influxo de Ca^{2+} através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) (REMBOLD, 1996).

O acoplamento fármaco-mecânico envolve a ativação de receptores de membrana presentes na superfície celular, levando, em última instância, a um

aumento da $[Ca^{2+}]_c$. Por exemplo, a ativação de receptores acoplados à proteína $G_{q/11}$ presentes na membrana plasmática de músculos lisos pode ativar a fosfolipase $C-\beta_1$ ($PLC-\beta_1$) promovendo a hidrólise do 4,5 bisfosfato de fosfatidil inositol (PIP_2) em diacilglicerol (DAG) e 1,4,5 trisfosfato de inositol (IP_3), sendo este último responsável pela liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares através de canais sensíveis ao IP_3 , aumentando a $[Ca^{2+}]_c$ (OGUT; BROZOVICH, 2003).

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

Uma via alternativa que contribui para a contração no músculo liso é através da modulação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), principalmente pela pequena proteína ligante de trifosfato de guanosina (RhoA-GTP) 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 receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), principalmente $G_{\alpha_{12,13}}$ ou $G_{\alpha_{q/11}}$, levam a ativação direta ou indireta do fator trocador de nucleotídeo de guanina da RhoA (RhoGEF), que ativa a RhoA, por trocar difosfato de guanosina (GDP) por trifosfato de guanosina (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 (MURTHY, 2005; FEHER, 2012).

A atividade espasmolítica está relacionada com a capacidade de determinadas drogas de inibir o mecanismo de contração do músculo liso. Esta atividade pode ser observada quando antagonistas como a atropina, ao se ligar ao receptor muscarínico acoplado a $G_{q/11}$, impede que ocorra a transdução do sinal que levaria à contração de músculos lisos como os do intestino (BROWN; TAYLOR, 2006).

Outras formas de se observar a atividade espasmolítica é quando o óxido nítrico (NO), formado no endotélio dos vasos pela ação da sintase do óxido nítrico (NOS), ativa uma ciclase de guanilil solúvel (GCs) no músculo levando ao aumento de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) ou ativa diretamente canais de potássio no músculo liso (BOLOTINA et al., 1994; PLANE et al., 1996; WALDRON; COLE, 1999; HOMER; WANSTALL, 2000). O aumento deste nucleotídeo cíclico ativa a proteína cinase G (PKG), a qual irá diminuir o Ca^{2+} citosólico através da fosforilação de substratos proteicos (LOHSE et al., 1998), como a abertura de canais de potássio e bloqueio dos Ca_v na membrana plasmática; ativação de Ca^{2+} -ATPases da membrana plasmática (PMCA) e da membrana do retículo sarcoplasmático (SERCA) (LINCOLN; KOMALAVILAS, 2000; HOFMANN et al., 2006) e ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} na membrana plasmática (BLAUSTEIN, 1989), gerando com isso a diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ levando ao relaxamento do músculo. Além disso, a PKG fosforila a MLCK impedindo sua ativação pelo complexo $[(Ca^{2+})_4-CaM]$ (VAN RIPER; MCDANIEL; REMBOLD, 1997; MURTHY, 2005).

Os canais de Ca^{2+} e K^+ estão intimamente relacionados com a regulação do músculo liso (WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005). A principal porta de entrada para o Ca^{2+} que vem do meio extracelular são os Ca_v (CATTERALL, 2000), os quais estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). A entrada de cálcio em músculo liso é controlada pelo potencial de membrana, uma vez que este determina a abertura dos Ca_v (SHMIGOL; EISNER; WRAY, 1998; WRAY et al., 2001). Os Ca_vL (Ca_v1 , ativados por alta voltagem) sensíveis à di-hidropiridinas 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).

O influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v é regulado através do movimento dos íons K^+ pelos seus canais localizados na membrana (THORNELOE; NELSON, 2005). Os canais de potássio desempenham um papel chave na regulação do potencial de

membrana e na excitabilidade celular, sendo a contração do músculo liso dependente do balanço entre o aumento da condutância ao íon K^+ , levando a uma hiperpolarização, e a diminuição da condutância ao K^+ , levando a uma despolarização (KNOT et al., 1996).

Os canais de potássio são reguladores fundamentais da excitabilidade celular. Eles estão envolvidos em várias funções fisiológicas, tais como, potencial de membrana celular, secreção de hormônios e de neurotransmissores. Sua atividade pode ser regulada por voltagem, por Ca^{2+} , por neurotransmissores e vias de sinalização intracelular (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007).

Os abridores de canais de potássio, como por exemplo, cromacalim, são substâncias que incluem um grupo de diversas moléculas com um largo potencial terapêutico. Estes compostos abrem os canais de potássio, causando hiperpolarização de membrana através do aumento do efluxo de K^+ , desta forma causando diminuição do $[Ca^{2+}]_c$ 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 potássio, entre eles: canais de potássio dependentes de voltagem (K_V); canais de potássio ativados por Ca^{2+} de larga condutância (BK_{Ca}); canais de potássio ativados por Ca^{2+} de pequena condutância (SK_{Ca}); canais de potássio ativados por Ca^{2+} retificador interno (K_{IR}); canais de potássio dependentes de estiramento (SDK); canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), entre outros (KOH; SANDERS, 2001; THORNELOE; NELSON, 2005).

Os canais de potássio ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}) são classificados em 5 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 $K_{Ca1.1}$ são bloqueados por toxinas, como caribdotoxina e iberiotoxina, ou por baixas concentrações de tetraetilamônio (TEA^+), os K_{Ca2} , são bloqueados por apamina e os $K_{Ca3.1}$ são bloqueados pelo clotrimazol. Os canais do tipo SK_{Ca} e IK_{Ca} são insensíveis à voltagem e ativados por baixa concentração de Ca^{2+} intracelular ($< 1,0 \mu M$), em contraste aos BK_{Ca} que são ativados tanto por voltagem como por Ca^{2+} (WEI, et al., 2005).

Os canais de potássio dos tipos 4 e 5 estão incluídos no grupo dos K_{Ca} pois são estruturalmente relacionados, porém está em andamento estudos sobre a função dos mesmos que possa contribuir para uma nomenclatura baseada na função em vez da semelhança estrutural. Além disso, os $K_{Ca4.2}$ e $K_{Ca4.1}$ são ativados por íons Na^+ e Cl^- (YUAN et al., 2003), e $K_{Ca5.1}$ é ativado por alcalinização (OH^-) (SCHREIBER et al., 1998). Portanto, embora sejam estruturalmente relacionado com $K_{Ca1.1}$, esses canais não podem ser corretamente descrito como "ativados por cálcio" baseados em critérios funcionais.

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. 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 canais de potássio que são inibidos por ATP intracelular foram inicialmente identificados em miócitos ventriculares (NOMA, 1983) e são referidos como canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}). 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). Uma característica primária deste canal é ser inibido por ATP intracelular, sulfonilureias como, por exemplo, a glibenclamida e a tolbutamida, e por baixa concentração de Ba^{2+} (STANDEN et al., 1989; SANBORN, 2000). Os K_V possuem uma grande importância na manutenção do potencial de repouso no íleo de cobaia e é bastante distribuído neste órgão (GORDIENKO et al., 1999).

Os K_{ir} são subdivididos em 7 tipos de canais (K_{ir} 1.1; 2.1-2.4; 3.1-3.4; 4.1-4.2; 5.1; 6.1-6.2 e 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 Ba^{2+} (ADELMAN et al., 2011).

A associação entre o aumento da atividade dos canais de potássio e o relaxamento do músculo liso vem sendo estudada em vários tecidos e em diversos canais de potássio, como por exemplo, os SK_{Ca} em aorta de rato (SILVA et al., 1994), os BK_{Ca} em traqueia de porco (YAMAKAGE; HIRSHMAN; CROXTON, 1996), traqueia de cobaia (HIRAMATSU et al., 1994), aorta de coelho (DEMIREL et al., 1994),

miométrio humano (MEERA et al., 1995), artérias submucosas, mesentéricas de cobaia (HILL et al., 1997) e em íleo de cobaia (HONG; ROAN; CHANG, 1997; SILVA; NOUAILHETAS; ABOULAFIA, 1999), os K_{ATP} em artérias mesentérica e renal (ENGBERSEN et al., 2012) e os K_V em íleo de cobaia (LIMA, 2004; CAVALCANTE, 2008).

A fração de alcaloides totais obtida da casca da raiz de *S. paludosum* (FAT-SP) vem sendo monitorada em relação à atividade espasmolítica, demonstrando até o momento este efeito em útero isolado de rata, aorta isolada de rato, íleo e traqueia isolados de cobaia (MONTERIO, 2009). sendo que em íleo de cobaia, o efeito espasmolítico apresentado pela FAT-SP envolve a participação de receptores muscarínicos e, em aorta de rato, a participação da via NO/GMPc. Com o intuito de aprofundar o estudo do mecanismo de ação espasmolítica da FAT-SP em íleo de cobaia e em aorta de rato, decidiu-se realizar outros protocolos experimentais em nível funcional e dessa forma respaldar a utilização dessa espécie na medicina popular.

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

- Contribuir para o estudo farmacológico da família Solanaceae, em particular da espécie *Solanum paludosum* Moric.
- Avaliar o mecanismo de ação relaxante da FAT-SP obtida da casca da raiz da espécie *Solanum paludosum* Moric., com perspectiva de corroborar com o uso popular e/ou que sirva como ferramenta farmacológica para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nos processos fisiopatológicos da musculatura lisa.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial citotóxico da FAT-SP em miócitos da camada longitudinal do íleo de cobaia
- Investigar o mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em íleo de cobaia, avaliando a participação da(os):
 1. via de transmissão não adrenérgica, não colinérgica (NANC);
 2. via de sinalização do NO;
 3. canais de potássio.
- Continuar com a investigação do mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em aorta de rato, avaliando a participação da(os):
 1. via de sinalização do NO;
 2. calmodulina endotelial;
 3. canal(is) de cálcio e/ou potássio;
 4. mobilização de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático.

3 Material e Métodos

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material botânico

A espécie *Solanum paludosum* Moric. foi coletada no município de Santa Rita-PB, em novembro de 2005. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra do Setor de Botânica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A exsicata da planta (Agra & Basílio 6734) está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da UFPB.

3.1.2 Obtenção da FAT-SP

A casca da raiz seca e pulverizada (1,1 kg) de *Solanum paludosum* foi extraída com MeOH:H₂O (95:5) até completa exaustão, observada quando o solvente permaneceu totalmente límpido. A solução extrativa bruta foi concentrada sob pressão reduzida, resultando num extrato metanólico concentrado, marrom-escuro. Acidificada com ácido sulfúrico a 5% (H₂SO₄) sob agitação e deixada em pernoite em refrigeração. No dia seguinte, a solução foi filtrada em Celite e em seguida extraída com éter para remoção do material gorduroso. A solução aquosa resultante foi adicionado hidróxido de amônio (NH₄OH), em banho de gelo, em quantidade suficiente para obter ~ pH 9. Após pernoite e filtração obteve-se a fração de alcaloides totais (precipitado), designada FAT-SP.

3.1.3 Preparação da solução da fração de alcaloides totais para os ensaios farmacológicos

A FAT-SP foi cedida pelo Prof. Dr. Jnanabrata Bhattacharyya (*in memoriam*) e era solubilizada em água destilada até a concentração de 10 mg/mL (solução estoque), conservada a 0 °C e diluída em água destilada de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. As concentrações da FAT-SP eram utilizadas em múltiplos de 3, sendo a concentração submáxima 243 µg/mL. Apenas

a última concentração não seguiu essa sequência, uma vez que a concentração máxima utilizada em experimentos com órgãos isolados é de 500 µg/mL.

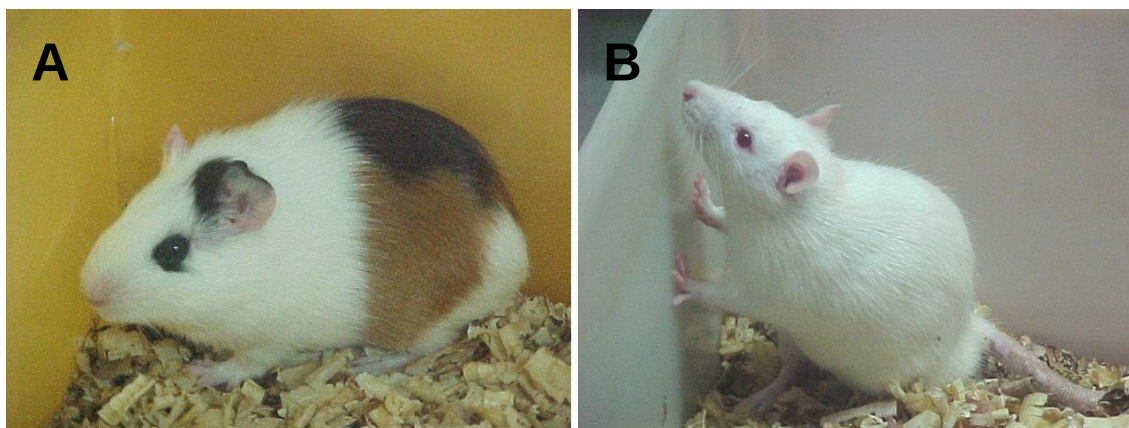
3.1.4 Animais

Eram usadas cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos pesando entre 300 e 500 g e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 250 e 320 g provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia (CBiotec)/UFPB (Figuras 4A e B).

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Labina®) com livre acesso à água, com climatização e temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 06h00 às 18h00. Todos os experimentos eram realizados no período de 08h00 às 20h00.

Todos os procedimentos experimentais eram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do CBiotec da UFPB (CEPA nº 0111/09). “Guidelines for the ethical use animals in applied etiology studies” publicado por Sherwin et al. (2003) no periódico Appl. Anim. Behavr. Sci. vol. 8, p. 291-305.

Figura 4 - Fotos de *Cavia porcellus* (A) e *Rattus norvegicus* (B)



3.1.5 Substâncias

O cloridrato de acetilcolina (ACh) e o cloridrato de carbamilcolina (CCh) foram obtidos da Merck (Brasil).

O fosfato monossódico anidro (NaH_2PO_4), a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) e o fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) foram obtidos da Nuclear (Brasil).

A 4-aminopiridina (4-AP), o cloreto de bário (BaCl_2), o cloridrato de histamina, o calmidazolium, o sulfato de atropina, o tetraetilamônio (TEA^+), a apamina, o cloridrato de glibenclamida, o Rp-8-bromo- β -fenil-1, N^2 -etenoguanosina-3', 5', monofosforotioato cíclico (Rp-8-Br-PET-cGMPS), o $N\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), a cafeína, a L-arginina, o cloreto de cézio (CsCl), o ácido [etilenodinitrilo]tetracético (EDTA), o ácido (N-[2-hidroxietilpiperazina-N'-[2-etanosulfônico]) (HEPES), o dimetilsufóxido (DMSO), a penicilina-estreptomicina, guanetidina e o 1H-[1,2,4]oxadiazol-[4,3-a]quinoxalina-1-ona (ODQ) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA).

O Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), soro fetal bovino, glutamina e a solução de tripsina/ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (1:250) foram obtidos da Cultilab (Brasil).

O cloreto de sódio (NaCl), o sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), o cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e o cloreto de potássio (KCl) foram obtidos da Vetec (Brasil).

O cloridrato de L(-)-fenilefrina (FEN) obtido da Pfizer (EUA).

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

Todas as substâncias foram mantidas em um "freezer" à temperatura de -20 °C, dissolvidas e diluídas em água destilada (exceto o ODQ que foi dissolvido em DMSO e a glibenclamida que era dissolvida em etanol absoluto e diluída em água destilada).

3.1.6 Soluções Nutritivas

Para o íleo isolado de cobaia era utilizada a solução nutritiva de Krebs modificado (Tabela 1), PSS sem Ca^{2+} ("calcium-free physiological salt solution") (Tabela 2), meio para cultura de miócitos DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%), glutamina (0,02 M) e penicilina-estreptomicina (100 U/mL - 10 µg/mL), ajustado ao pH 7,2 (Tabela 3), PBS ("Physiological Buffer Solution") (Tabela 4) e HBSS ("Hank's Balanced Salt Solution") (Tabela 5). Para os experimentos realizados com aorta isolada de rato eram utilizadas as solução de Krebs normal (Tabela 2), solução de Krebs despolarizante com 30 mM de KCl e solução de Krebs despolarizante com 80 mM de KCl (Tabelas 3 e 4, respectivamente) e solução de Krebs despolarizante e livre de Ca^{2+} (Tabela 5).

Para se tornarem estéreis, algumas soluções eram filtradas em membranas de filtro 0,22 µm (Milipore), seguida da adição de penicilina e estreptomicina (1%). As soluções finais eram acondicionadas em garrafas estéreis de 100 mL e mantidas à 0°C e descongeladas em banho-maria a 37 °C. Todo este procedimento era realizado em ambiente estéril.

Tabela 1 – Composição da solução de Krebs modificado por Sun e Benishin (1994)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	117,0
KCl	4,7
NaH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,3
CaCl ₂	2,5
NaHCO ₃	25,0
Glicose	11,0

Tabela 2 – PSS sem Ca²⁺ (“calcium-free physiological salt solution”)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	132,4
KCl	5,9
MgCl ₂	1,2
Glicose	11,5

Tabela 3 – Meio de Cultura DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle Médium”)

Substância	Concentração (mM)
NaHCO ₃	25,0
HEPES	11,0

Tabela 4 – PBS (“Physiological Buffer Solution”)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	140,0
Na ₂ HPO ₄	3,9
NaHPO ₄	1,7
NaHCO ₃	4,2
EDTA	0,2

Tabela 5 – HBSS (“Hank’s Balanced Salt Solution”)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	137,9
KCl	5,33
MgCl ₂	0,49
KH ₂ PO ₄	0,44
MgSO ₄	0,41
Na ₂ HPO ₄	0,34
CaCl ₂	1,3
NaHCO ₃	4,2
Glicose	5,6
HEPES	10,0

Tabela 6 – Composição da solução de Krebs normal

Substância	Concentração (mM)
NaCl	118,0
KCl	4,6
KH ₂ PO ₄	1,1
MgSO ₄	5,7
CaCl ₂	2,5
NaHCO ₃	25,0
Glicose	11,0

Tabela 7 – Solução de Krebs despolarizante com 30 mM de KCl

Substância	Concentração (mM)
NaCl	92,6
KCl	30,0
KH ₂ PO ₄	1,1
MgSO ₄	5,7
CaCl ₂	2,5
NaHCO ₃	25,0
Glicose	11,0

Tabela 8 – Solução de Krebs despolarizante com 80 mM de KCl

Substância	Concentração (mM)
NaCl	42,6
KCl	80,0
KH ₂ PO ₄	1,1
MgSO ₄	5,7
CaCl ₂	2,5
NaHCO ₃	25,0
Glicose	11,0

Tabela 9 – Solução de Krebs despolarizante e livre de Ca²⁺

Substância	Concentração (mM)
NaCl	42,5
KCl	80,0
KH ₂ PO ₄	1,1
MgSO ₄	5,7
Glicose	11,0
NaHCO ₃	25,0
EDTA	1,0

3.1.7 Aparelhos

As contrações isométricas foram registradas por meio de transdutores de força isométricos (Figura 5B) modelo TIM-05 AVS (São Carlos, SP, Brasil) (50 gramas), conectados a um amplificador (Figura 6A) modelo AECAD04F AVS (São Carlos, SP, Brasil), os quais estavam conectados a um computador (Figura 6B) utilizando o programa AQCAD para aquisição dos dados e ANCAD para análise, ambos da AVS (São Carlos, SP, Brasil). Os órgãos eram suspensos em cubas de 6 mL em um banho para órgãos isolados modelo BOI-04 AVS (São Carlos, SP, Brasil), o qual contém uma bomba termostática modelo BT-60 AVS (São Carlos, SP, Brasil) para o controle da temperatura das cubas (Figuras 5A e C).

As células em cultura eram observadas em microscópio óptico comum (Nikon, Japão). Já as imagens das células eram captadas por microscópio óptico invertido (Nikon, Japão) que estava acoplado à câmera de vídeo (Nikon – DS Camera Head DSFil/DS-5M, Japão).

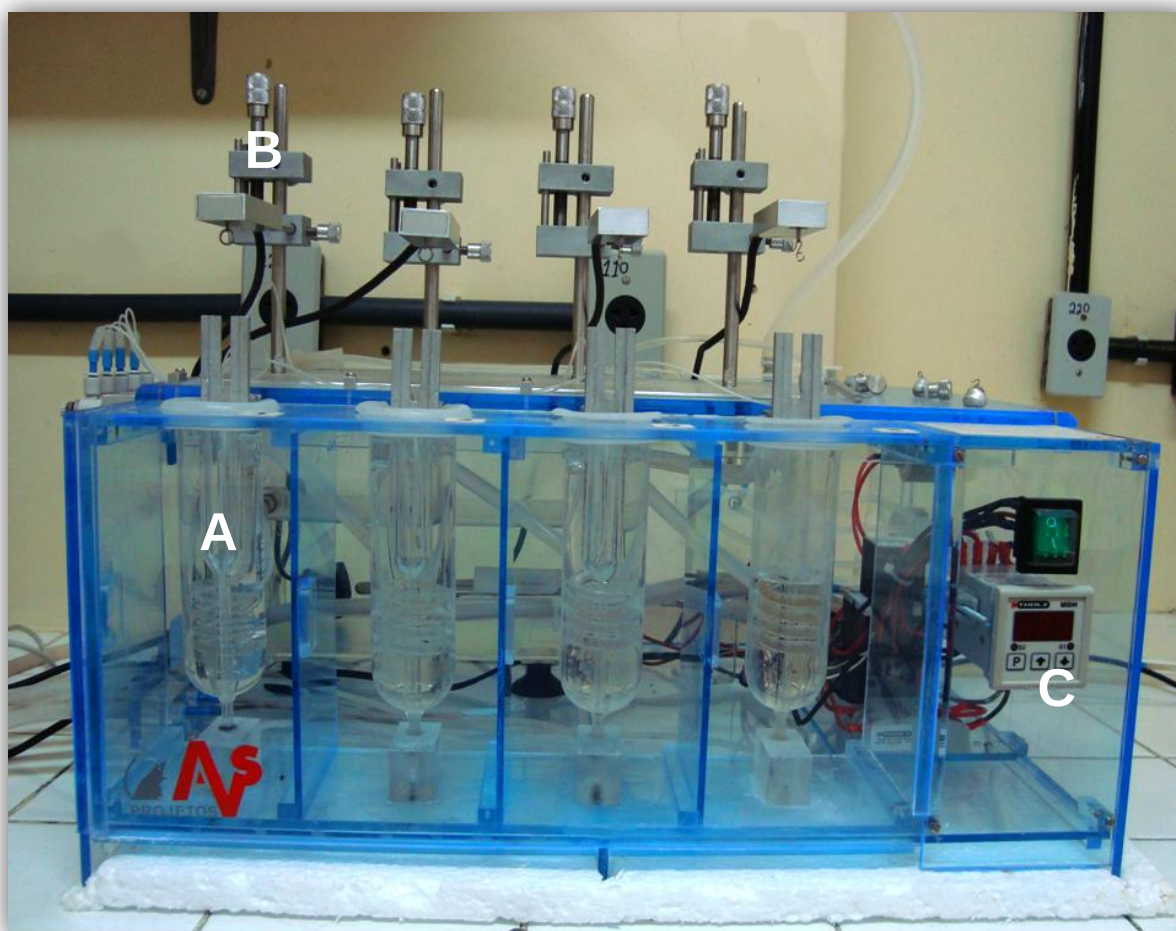
Para a análise da viabilidade celular foi utilizado o Flex Station 3, Molecular Devices e analisadas no programa Soft Max Pro.

A manipulação de células em cultura era realizada em uma capela de fluxo laminar (GermFree Laboratories, EUA).

As culturas de células eram mantidas em estufa úmida de CO₂ à 37 °C (Forma Scientific, EUA).

Os valores de pH eram verificados através de um pHmetro digital PG2000 GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil) e todas as substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG 200 GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil) (Figuras 6C e D). Os animais eram pesados em balança semianalítica GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil).

Figura 5 – Foto do sistema de banhos para órgãos isolados formado por cubas (A), transdutores isométricos (B) e bomba termostática (C)



MONTEIRO, 2011

Figura 6 – Fotos do amplificador (A), microcomputador (B), pHmetro digital (C) e da balança analítica (D)



MONTEIRO, 2011; RIBEIRO, 2007

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Avaliação da citotoxicidade da FAT-SP em miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia

3.2.1.1 Cultura de miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia

Os cobaias eram mantidos em jejum por 18 horas (dando-lhe somente água nesse período) e eutanasiados por deslocamento cervical. O abdômen era aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento era retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs modificado a 37 °C sob aeração com carbogênio, em seguida era seccionado em fragmentos de 2-3 cm e a camada longitudinal do íleo era retirada com o auxílio de um bastão de vidro (8 mm), lâmina e algodão embebido com a solução nutritiva. Após a retirada da camada longitudinal, estas eram lavadas sucessivas vezes em solução estéril de PSS sem Ca^{2+} . Em seguida, essas amostras eram fragmentadas em pedaços menores com o auxílio de tesoura e pinça. Posteriormente, com uma pipeta *Pasteur* esses fragmentos menores da camada longitudinal eram transferidos e distribuídos uniformemente em garrafas estéreis de cultura primária (25 cm²). Após a observação de que os tecidos se encontravam aderidos à parede das garrafas, adicionava-se 5 mL do meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,02 M de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina e as garrafas eram levadas à estufa de CO₂ (5%) (adaptado de SHIMUTA et al., 1990). A cada 48-72h o meio de cultura das garrafas eram trocados e após a confluência das células em monocamada eram feitos os subcultivos em garrafas de cultura (75 cm²).

Para a realização do subcultivo, o meio de cultura era aspirado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* estéril conectada a uma bomba a vácuo, em seguida as garrafas eram lavadas com 2 mL de PBS enriquecido com penicilina-estreptomicina, posteriormente com 2 mL de PBS enriquecido com EDTA. Após essas lavagens, adicionava-se 2 mL de tripsina por aproximadamente 2 minutos, seguida da adição do meio de cultura DMEM, para neutralizar a ação da tripsina. Essa suspensão de células era transferida para garrafas de cultura (75 cm²) com a correção do volume

do meio de cultura para aproximadamente 12 mL e levadas à estufa de CO₂ e após a confluência das células em monocamada eram preparados os *pellets* (contendo as células).

Para a preparação dos *pellets*, repetia-se todo o procedimento da preparação do subcultivo, agora utilizando o dobro do volume de PBS enriquecido com penicilina-estreptomicina, PBS enriquecido com EDTA e tripsina, devido ao maior volume das garrafas para cultura. Em seguida, transferia-se toda a suspensão de células para tubos Falcons, seguido de centrifugação (1500 rpm) por 5 minutos. Posteriormente os sobrenadantes eram aspirados, os *pellets* eram ressuspensos em 5 mL de solução HBSS e novamente eram centrifugados por 5 minutos. Os sobrenadantes eram desprezados e os *pellets* eram utilizados para os protocolos experimentais descritos posteriormente.

Todos esses procedimentos eram realizados em ambiente asséptico com a utilização de uma capela de fluxo laminar.

3.2.1.1.1 Efeito da FAT-SP sobre a viabilidade celular de miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia

Os *pellets* eram homogeneizados em 5 mL do meio de cultura DMEM e uma alíquota de 10 µL da suspensão de células era levada a uma câmara de *Neubauer* para a contagem das células. Essa suspensão de células era diluída para que 100 µL dessa suspensão tivesse aproximadamente 5×10^3 células/mL. Em seguida, a suspensão de células era semeada (100 µL) em microplacas estéreis de 96 poços (Corning® Flask, NY, USA) e estas eram levadas em estufa de CO₂ por 24 h para adesão das células.

Após o período de aderência das células o meio de cultura de cada poço era desprezado, em seguida eram adicionados 100 µL de solução da FAT-SP na concentração de 750 µg/mL, diluídos em meio de cultura DMEM. Após a incubação por 2 ou 24 h, a 37 °C em estufa de CO₂, adicionava-se 10 µL de MTT (5 mg/mL) ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)] em cada poço e esperava-se 6 horas, a 37 °C em estufa de CO₂.

O MTT é um corante amarelo, que é reduzido por células que mantêm a integridade mitocondrial para um composto azul (formazan), insolúvel em solução

aquosa. Apenas as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) para o formazan (azul), portanto a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986). Após o período de incubação de 6 horas, a microplaca de 96 poços era centrifugada, o sobrenadante era desprezado e res-suspenso em 100 µL de dimetilsufóxido (DMSO), e deixado por um período de 30 minutos, a 37 °C em estufa de CO₂, para solubilizar o formazan produzido. Em seguida, a microplaca era levada ao FlexStation 3 e lida no comprimento de onda de 540 nm. O número de células viáveis correlaciona-se com a intensidade de absorbância dos poços da microplaca. O controle foi determinado apenas com o meio de cultura DMEM, sem a incubação da FAT-SP. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

3.2.2 Mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em íleo de cobaia

3.2.2.2 Avaliação da participação da via NANC na ação relaxante da FAT-SP

3.2.2.2.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de guanetidina e atropina

Os cobaias eram mantidos em jejum por 18 horas (dando-lhe somente água nesse período) e eutanasiados por deslocamento cervical. O abdômen era aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento era retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs modificado 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 para banhos de órgãos isolados de 6 mL e deixados em repouso por 30 minutos sob tensão de repouso de 1 g, tempo necessário para perfeita estabilização da preparação. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 10^{-6} M de histamina para obtenção do controle. Durante o período de 30 minutos, as preparações eram lavadas duas vezes. Em seguida, a preparação era incubada com guanetidina (3 μ M), um bloqueador da via adrenérgica, e simultaneamente com atropina (1 μ M) um antagonista muscarínico não seletivo (BENNETT, 1997) por 15 minutos, e ainda na presença dos mesmos, uma nova contração com histamina era obtida. Em seguida a FAT-SP era adicionada, em preparações diferentes, cumulativamente sobre a fase tônica da contração.

O relaxamento produzido pela FAT-SP foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pela histamina. Os valores de CE_{50} (concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo) da FAT-SP foram calculados por regressão não linear a partir das curvas de relaxamento na presença de guanetidina e atropina simultaneamente e comparadas com as curvas de relaxamento na ausência (controle).

3.2.2.2.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de L-NAME ou L-NAME + L-arginina

O íleo era obtido e montado conforme o item 3.2.2.2.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 10^{-6} M de CCh para obtenção do controle. Em seguida, a preparação era incubada por 30 minutos com L-NAME (10^{-4} M), um bloqueador da sintase do NO (MARTIN; BOLOFO; GILES, 1992), e ainda na presença do mesmo, uma nova contração com CCh era obtida. Posteriormente, a FAT-SP era adicionada cumulativamente sobre a fase tônica da contração.

A reversibilidade do efeito relaxante da FAT-SP era demonstrada pela adição simultânea de 10^{-4} M de L-NAME e 10^{-3} M de L-arginina (substrato para a sintase do NO) à cuba. Ambas as substâncias permaneceram por 30 minutos em contato com a preparação. Sob o componente tônico da contração induzida por CCh, na presença simultânea de L-NAME e L-arginina, era adicionada a FAT-SP cumulativamente à cuba em diferentes preparações (HOLZER, et al., 1997).

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida por CCh. Os valores de CE_{50} da FAT-SP foram obtidos como descrito no item 3.2.2.2.1 e comparados na ausência e na presença de L-NAME ou L-NAME mais L-arginina.

3.2.2.3 Avaliação da participação da ciclase de guanilil (GC) na ação relaxante da FAT-SP. Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de ODQ

O íleo era obtido e montado conforme o item 3.2.2.2.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 10^{-6} M de CCh para obtenção do controle. Em seguida, a preparação era incubada por 30 minutos com ODQ (10^{-5} M), um inibidor seletivo da GC (MATSUYAMA; THAPALIYA; TAKEWAKI, 1999), e ainda na presença do mesmo, uma nova contração com CCh era obtida. Posteriormente, a FAT-SP era adicionada cumulativamente sobre a fase tônica da contração.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida por CCh. Os valores de CE_{50} da FAT-SP foram obtidos como descrito no item 3.2.2.2.1 e comparados na ausência e na presença de ODQ.

3.2.2.4 Investigação da participação dos canais de potássio na ação relaxante da FAT-SP

3.2.2.4.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl)

O íleo era obtido e montado conforme o item 3.2.2.2.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 10^{-6} M de CCh para obtenção do controle. Em seguida, a preparação era lavada e após 15 minutos era adicionada a cuba 5 mM de CsCl, que nessa concentração é um bloqueador não seletivo dos canais de potássio (CECCHI et al., 1987), após 20 minutos na presença do bloqueador era induzida uma contração com 10^{-6} M de CCh e sob o componente tônico dessa contração era adicionado a FAT-SP de forma cumulativa.

O relaxamento produzido pela FAT-SP foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo CCh. Os valores de CE_{50} da FAT-SP foram calculados por regressão não linear a partir das curvas de relaxamento na presença do bloqueador e comparadas com as curvas de relaxamento na ausência (controle).

3.2.2.4.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio

O íleo era obtido e montado conforme o item 3.2.2.2.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 10^{-6} M de CCh para obtenção do controle. Em seguida, eram adicionados os bloqueadores em diferentes preparações, tais como 1 mM de TEA^{+} , que nesta concentração é um bloqueador seletivo dos BK_{Ca} (KNOT, BRAYDEN, NELSON, 1996); 100 nM de apamina, um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} (ISHII; MAYLIE; ADELMAN, 1997; VAN DER STAAY et al., 1999); 10^{-5} M de glibenclamida, um bloqueador seletivo dos K_{ATP} (SUN; BENISHN, 1994) e 0,3 mM de 4-AP, um bloqueador seletivo dos canais de potássio sensíveis a voltagem (K_V) (ROBERTSON; NELSON, 1994), por um período de 20 minutos. Em seguida uma nova contração com 10^{-6} M de CCh era induzida ainda na

presença desses bloqueadores. Durante a fase tônica sustentada dessa segunda contração a FAT-SP era adicionada à cuba de maneira cumulativa.

O relaxamento produzido pela FAT-SP foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo CCh. Os valores de CE_{50} da FAT-SP foram calculados como descrito anteriormente e comparados na ausência e na presença de cada bloqueador.

3.2.3 Mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em aorta de rato

3.2.3.1 Avaliação da via de sinalização do NO na ação relaxante da FAT-SP

3.2.3.1.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de L-NAME ou L-NAME + L-arginina

Os ratos eram eutanasiados por deslocamento cervical. Os anéis aórticos de 3-5 mm eram obtidos livres de tecido conjuntivo a partir da aorta torácica. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis eram suspensos individualmente por uma haste de aço inoxidável em cubas para banhos de órgãos isolados (6 mL) contendo solução de Krebs normal a 37 °C. As preparações eram estabilizadas por um período de uma hora, durante o qual eram mantidas sob uma tensão de repouso de 1 g. Durante esse período, a solução nutritiva era renovada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

A integridade do endotélio vascular era verificada pela adição de 10^{-6} M de ACh à cuba durante a fase tônica da primeira resposta induzida por FEN (3×10^{-7} M) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). O endotélio vascular era considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentassem relaxamento induzido por ACh superior a 50% (AJAY; GILANI; MUSTAFA, 2003). A retirada do endotélio era confirmada pela ausência de relaxamento em resposta à adição de ACh à cuba ou quando este relaxamento era inferior a 10%. Apenas os anéis com endotélio funcional foram utilizados para a realização dos protocolos, exceto para os protocolos experimentais dos subitens 3.2.3.2.1 e 3.2.3.2.2 que foram utilizados os anéis com e sem endotélio.

Após a lavagem das preparações, esperava-se 30 minutos e durante o componente tônico de uma segunda resposta ao agonista, a FAT-SP era adicionada, de maneira cumulativa à cuba para obtenção da curva controle. Antes da obtenção da segunda contração induzida por FEN, em anéis com endotélio funcional, eram adicionados 10^{-4} ou 3×10^{-4} M de L-NAME, inibidor competitivo da sintase do NO, em preparações distintas (REES et al., 1990). Sob o componente

tônico da segunda contração induzida por FEN, na presença do L-NAME, era adicionada a FAT-SP cumulativamente à cuba em preparações diferentes.

A reversibilidade do efeito relaxante da FAT-SP era demonstrada pela adição simultânea de 10^{-4} M de L-NAME e 10^{-3} M de L-arginina (substrato para a sintase do NO) à cuba. Ambas as substâncias permaneceram por 30 minutos em contato com a preparação. Sob o componente tônico da contração induzida por FEN, na presença simultânea de L-NAME e L-arginina, era adicionada a FAT-SP cumulativamente à cuba em diferentes preparações (SANTOS, 2005).

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pela FEN. Os valores de CE_{50} foram obtidos como no item 3.2.1.1.1 e comparados na ausência e na presença do L-NAME e simultaneamente de L-NAME e L-arginina em concentrações diferentes.

3.2.3.1.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de calmidazolium

Os anéis aórticos eram obtidos conforme o item 3.2.3.1.1. Antes da obtenção da segunda contração induzida por FEN, em anéis com endotélio funcional, era adicionado o calmidazolium (10^{-5} M, por 30 min), inibidor da calmodulina endotelial (SCHINI; VANHOUTTE., 1992; ILLIANO; NAGAO; VANHOUTTE, 1992). Sob o componente tônico da segunda contração induzida por FEN, na presença do calmidazolium, era adicionada a FAT-SP cumulativamente à cuba em diferentes preparações.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pela FEN. Os valores de CE_{50} foram obtidos como descrito no item 3.2.3.1.1 e comparados na ausência e na presença do inibidor.

3.2.3.1.3 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS

Os anéis de aorta com endotélio funcional eram obtidos e montados de acordo com o item 3.2.3.1.1, e após o período de estabilização, antes da segunda contração com FEN, a preparação era incubada com Rp-8-Br-PET-cGMPS (3×10^{-5} M por 30

minutos), inibidor seletivo da PKG (IBARRA-ALVORADO et al., 2002). Ainda na presença do inibidor, uma nova contração com FEN era obtida. Em seguida, a FAT-SP era adicionada cumulativamente à cuba, sobre o componente sustentado da contração.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pela FEN. Os valores de CE_{50} foram obtidos como descrito no item 3.2.3.1.1 e comparados na ausência e na presença do Rp-8-Br-PET-cGMPS.

3.2.3.2 Investigação da participação dos canais de potássio na ação relaxante da FAT-SP

3.2.3.2.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou 80 mM de KCl

Os anéis de aorta com e sem endotélio funcional eram obtidos e montados de acordo com o item 3.2.3.1.1. Após 30 minutos decorridos da primeira contração, uma segunda resposta contrátil era induzida por soluções de 30 ou 80 mM de KCl (GURNEY, 1994). Durante a fase tônica sustentada dessa segunda contração, a FAT-SP era adicionada de maneira cumulativa à cuba.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por 30 ou 80 mM de KCl e o valor de efeito máximo de relaxamento ($E_{\max}$) da FAT-SP foi obtido para contrações induzidas por solução de 30 e 80 mM de KCl em anéis de aorta com e sem endotélio funcional. Os valores de CE_{50} foram calculados como descrito no item 3.2.3.1.1 e comparados na ausência e na presença de endotélio funcional a partir das curvas concentrações-resposta obtidas para a FAT-SP com a solução de 30 mM de KCl.

3.2.3.2.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de TEA⁺

Os anéis de aorta com e sem endotélio funcional eram obtidos e montados de acordo com o item 3.2.3.1.1. Após 30 minutos decorridos da primeira contração, era adicionada a cuba TEA⁺ (10 mM por 10 minutos) em preparações com e sem endotélio funcional, que nessa concentração é um bloqueador não seletivo dos canais de potássio (NIU et al., 2008). Após o tempo necessário para o bloqueio de todos os tipos de canais de potássio era induzida uma contração com 3×10^{-7} M de FEN e sob o componente tônico dessa contração era adicionado a FAT-SP de forma cumulativa.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pela FEN. Os valores de CE_{50} foram obtidos como descrito no item 3.2.3.1.1 e comparados na ausência e na presença bloqueador.

3.2.3.2.3 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio

A aorta era retirada e montada segundo o descrito no item 3.2.3.1.1. Após a verificação da presença do endotélio, em diferentes experimentos, era adicionado a cuba TEA^+ (1 mM por 30 minutos) que nessa concentração é um bloqueador seletivo dos BK_{Ca} (HAN et al., 2009), $BaCl_2$ (3×10^{-5} M por 30 minutos), um bloqueador seletivo dos K_{IR} (ANDERSSON et al., 2000; TEP-AREENAN; KENDALL; RANDALL, 2003), 4-AP (1 mM por 15 minutos), um bloqueador seletivo dos K_V (NEVALA et al., 2001; RATTMANN et al., 2009), apamina (5×10^{-8} M por 20 minutos), um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} (ISHIDA et al., 1999) e glibenclamida (10^{-5} M por 30 minutos), um bloqueador seletivo dos canais K_{ATP} (ERSOY et al., 2008). Após os tempos necessários para o bloqueio de cada tipo de canal de potássio era induzida uma contração com 3×10^{-7} M de FEN e sob o componente tônico dessa contração era adicionado a FAT-SP de forma cumulativa.

O relaxamento produzido pela FAT-SP foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de CE_{50} da FAT-SP foram calculados como descrito no item 3.2.3.1.1 e comparados na ausência e na presença de cada bloqueador em preparações diferentes.

3.2.3.3 Avaliação da participação da mobilização de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. Efeito da FAT-SP sobre a mobilização de cálcio do retículo sarcoplasmático sensíveis à cafeína ou à fenilefrina

Os anéis de aorta com endotélio funcional eram obtidos e montados de acordo com o item 3.2.3.1.1. Após um período de estabilização de 60 minutos em Krebs normal, a FEN (10^{-6} M) produzia uma resposta típica, composta de uma fase fásica e outra tônica. Para obtenção das respostas fásicas à FEN, dependentes de cálcio intracelular, foi realizado o seguinte protocolo experimental: 1) lavagem dos tecidos com Krebs normal por 15 minutos; 2) lavagem dos tecidos com Krebs modificado livre de Ca^{2+} ($0 \text{ Ca}^{2+} + 1,0 \text{ mM}$ de EDTA) por 10 minutos e após este tempo era adicionada cafeína (20 mM) ao banho na temperatura que era de 20 °C com a obtenção de contrações fásicas até o esvaziamento dos estoques intracelulares, este mesmo procedimento foi realizado com a FEN (10^{-6} M) apenas com uma modificação da temperatura do banho que era de 37 °C. Em seguida, a solução do banho era trocada por Krebs normal (15 minutos) para promover a reestocagem do Ca^{2+} intracelular e em seguida o líquido era substituído por Krebs livre de Ca^{2+} (10 minutos) e após este tempo cafeína (20 mM) ou FEN (10^{-6} M) era adicionada ao banho para obtenção de contrações fásicas (CHEN et al., 2009). Este procedimento era repetido até a obtenção de duas curvas de magnitude similar à cafeína ou à FEN. Em seguida, a FAT-SP era incubada por 15 minutos, em diferentes concentrações e em preparações distintas, e depois uma terceira curva em resposta à cafeína ou à FEN, ainda na presença da FAT-SP era promovida. Cada preparação era submetida a uma única concentração da substância teste. A inibição da contração fásica foi calculada comparando-se as curvas controles (100%) e depois da adição da FAT-SP às cubas.

3.2.4 Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média e erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste t (não pareado) ou análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni, e os valores entre as médias foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Os valores de CE_{50} (NEUBIG et al., 2003) foram calculados por regressão não linear para os experimentos realizados. Os valores de efeito máximo (E_{max}) foram obtidos pela média das percentagens máximas de relaxamento ou inibição para os experimentos realizados. Todos os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism[®] versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA).

4 Resultados

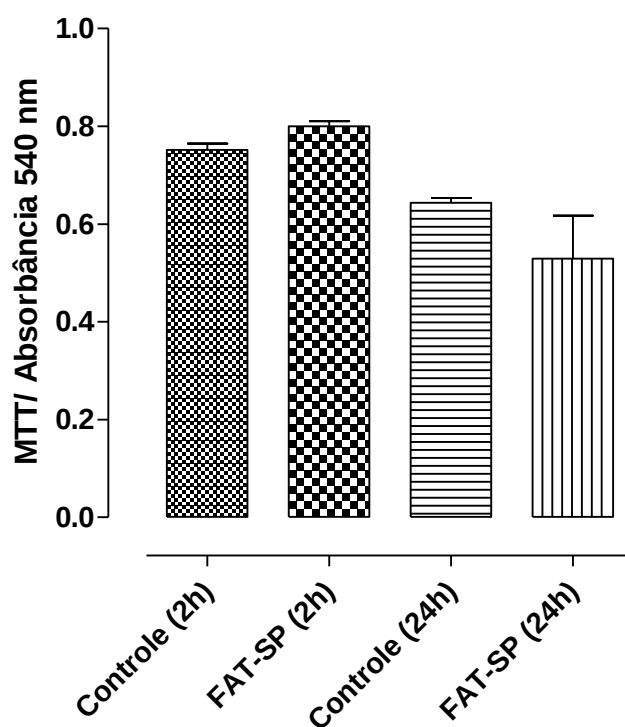
4.1 Avaliação da citotoxicidade da FAT-SP em miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia

4.1.1 Cultura de miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia

4.1.1.1 Efeito da FAT-SP sobre a viabilidade celular de miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia

A exposição da FAT SP (750 µg/mL), no período de 2 h, tempo aproximado de contato entre o órgão e o FAT-SP nos experimentos funcionais, e no período de 24 h não induziu morte celular dos miócitos da camada longitudinal de íleo isolado de cobaia (Gráfico 1, n = 3).

Gráfico 1 – Efeito citotóxico da FAT-SP em miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia. Meio de cultura DMEM (grupo controle) e DMEM mais FAT-SP (grupo teste)



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 3). ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni, (controle 2h vs. FAT-SP 2h) e (controle 24h vs. FAT-SP 24h) (MONTEIRO, 2013).

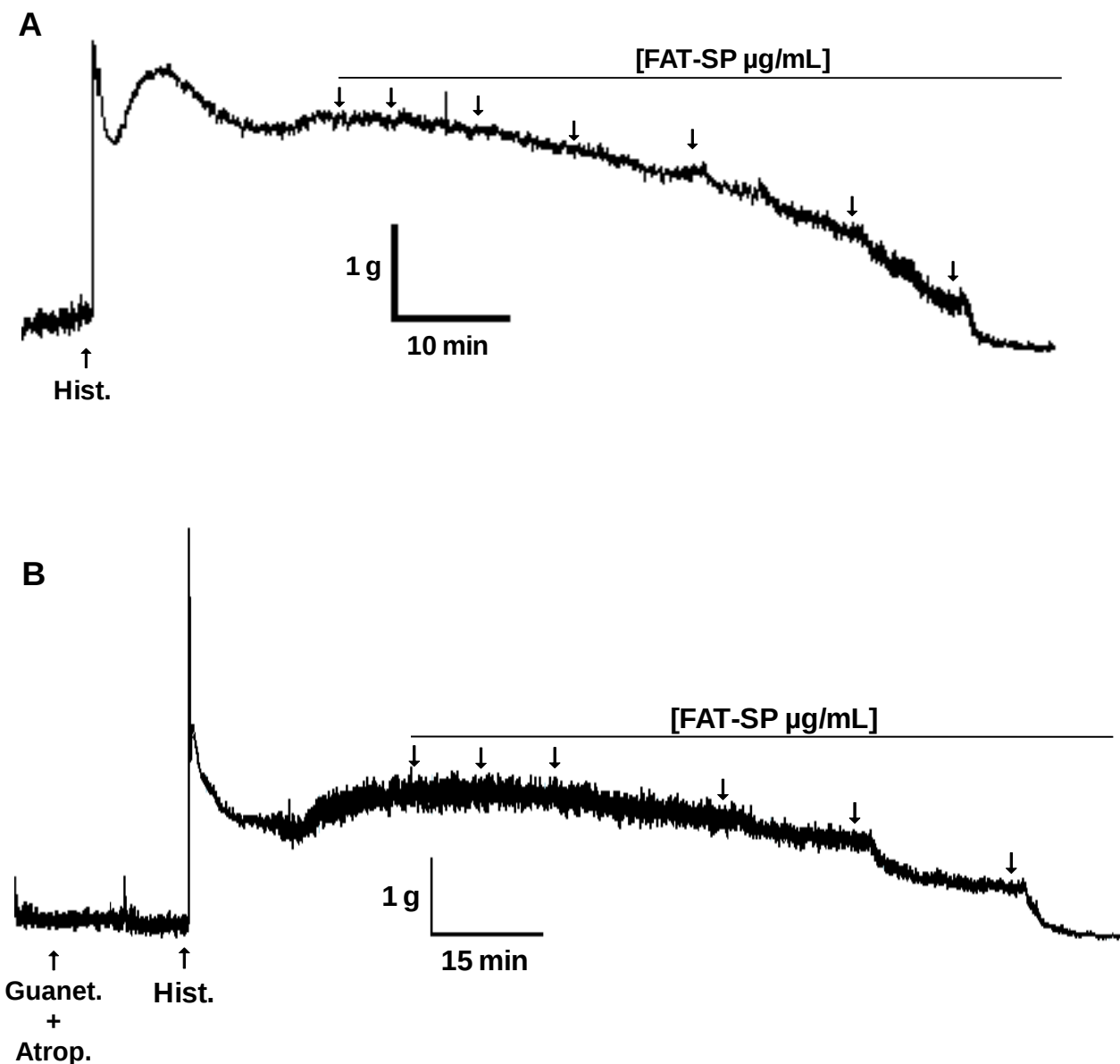
4.2 Mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em íleo de cobaia

4.2.1 Avaliação da participação da via NANC na ação relaxante da FAT-SP

4.2.1.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de guanetidina e atropina

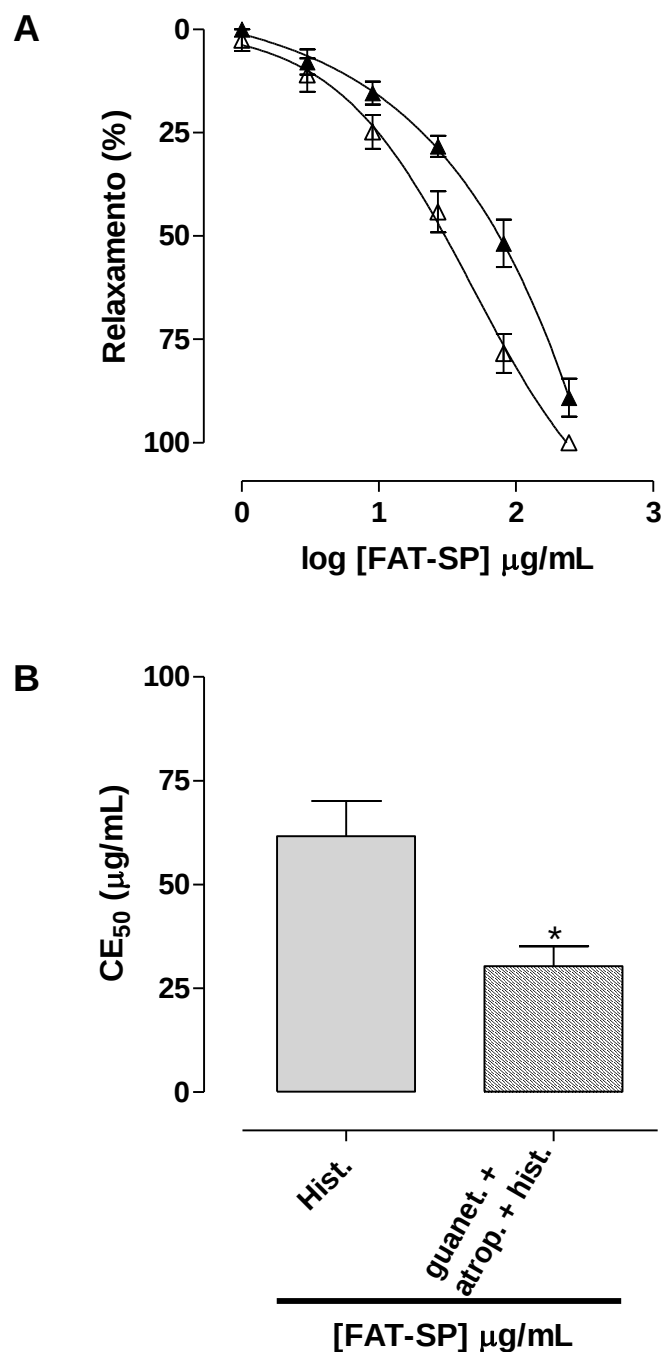
A curva de relaxamento da FAT-SP ($CE_{50} = 61,6 \pm 8,6 \mu\text{g/mL}$) foi desviada para a esquerda de maneira significativa com aumento de sua potência relaxante em cerca de 2 vezes na presença simultânea de $3 \mu\text{M}$ de guanetidina (bloqueador da via adrenérgica) e $1 \mu\text{M}$ de atropina (antagonista muscarínico não seletivo) ($CE_{50} = 30,4 \pm 4,7 \mu\text{g/mL}$) (Figuras 7A, B e gráficos 2A e B). O tempo médio para que a FAT-SP alcançasse o seu E_{max} na presença dos bloqueadores foi de $85,8 \pm 11,5 \text{ min}$.

Figura 7 – Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de histamina na ausência (A) e na presença de $3 \mu\text{M}$ de guanetidina e $1 \mu\text{M}$ de atropina (B) em íleo isolado de cobaia



As setas para baixo representam a adição cumulativa da FAT-SP nas concentrações de 1, 3, 9, 27, 81, 243 e 500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Hist. = histamina, guanet. = guanetidina e atrop. = atropina (MONTEIRO, 2013).

Gráfico 2 – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de histamina na ausência ($\blacktriangle$) e na presença de $3 \mu\text{M}$ de guanetidina e $1 \mu\text{M}$ de atropina ($\triangle$) em fêco isolado de cobaia.

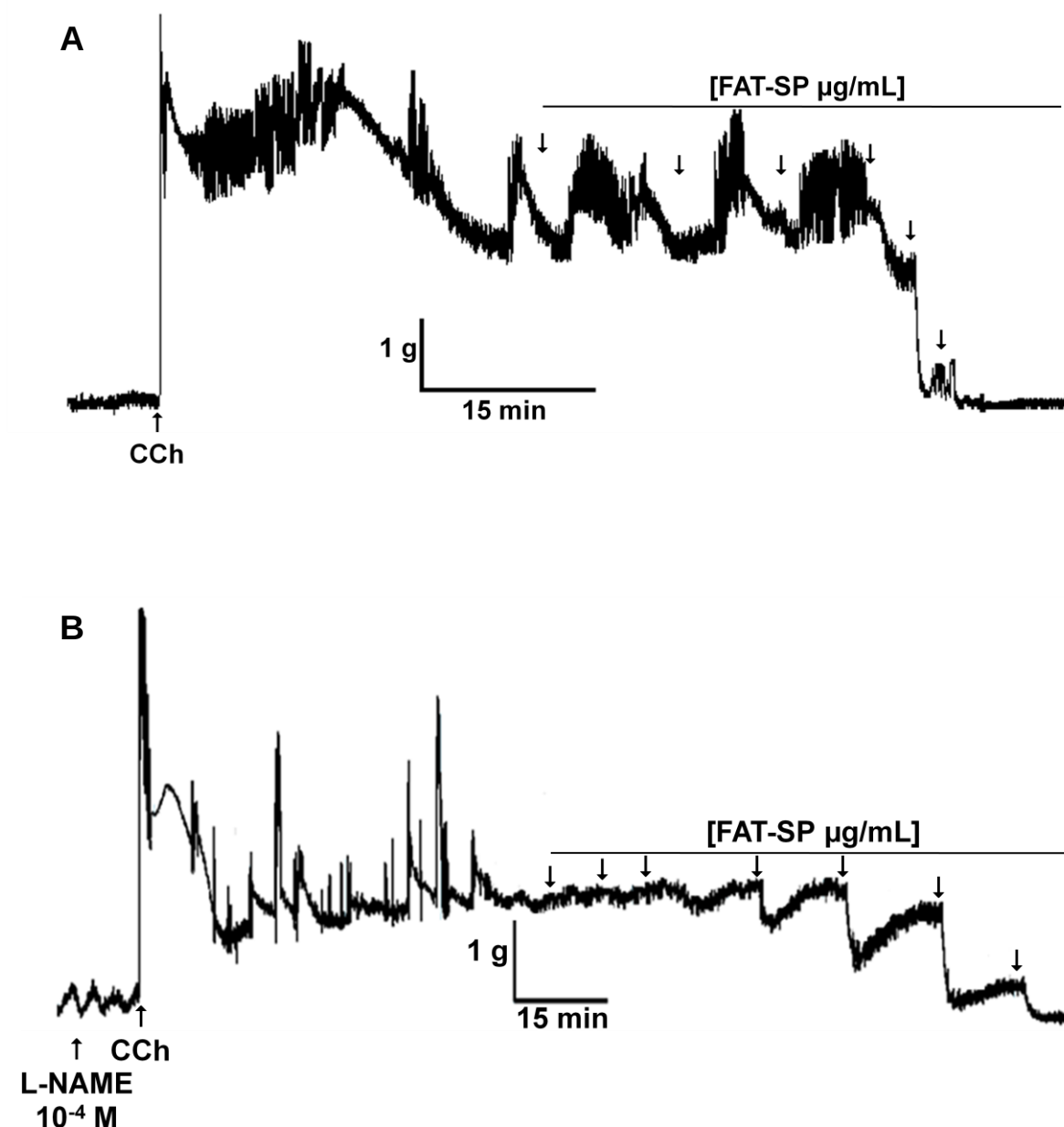


Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). Teste t , não pareado, $*p < 0,05$ (histamina vs. guanetidina + atropina + histamina) (MONTEIRO, 2013).

4.2.1.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de L-NAME ou L-NAME + L-arginina

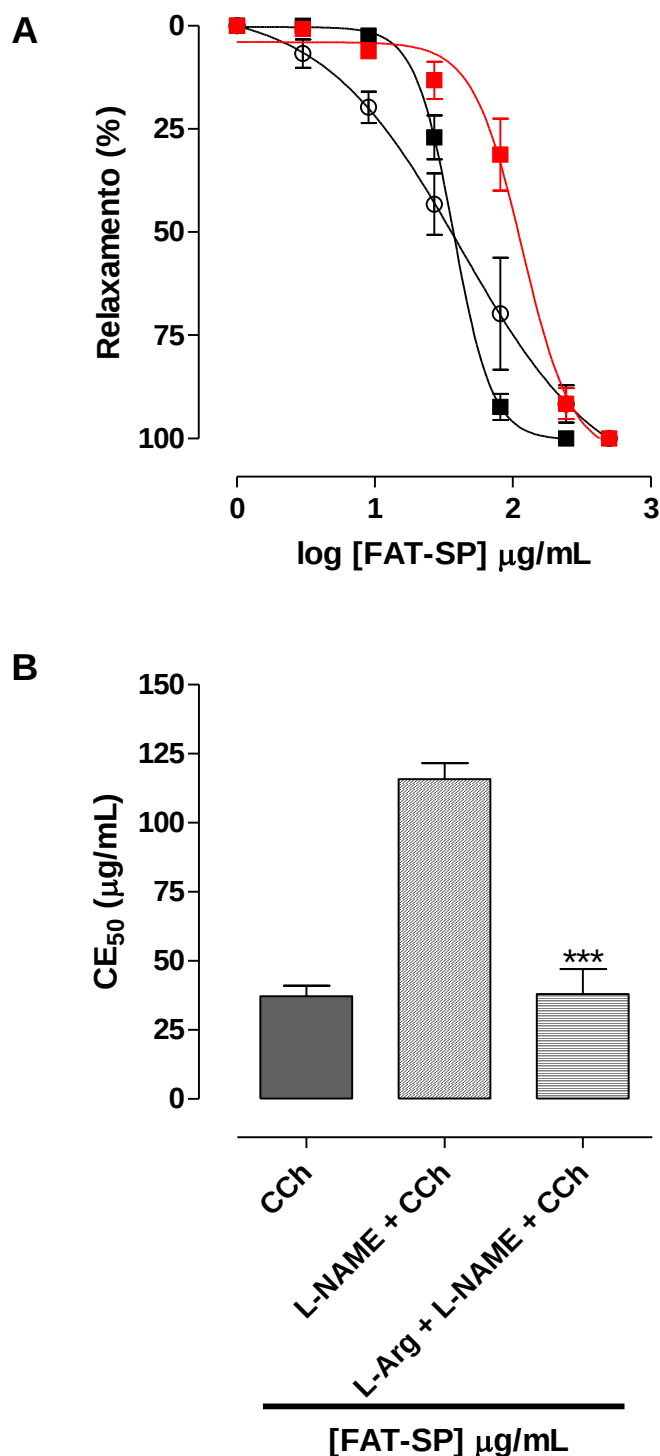
A curva de relaxamento da FAT-SP ($CE_{50} = 37,2 \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$) foi desviada para a direita de maneira significativa e com redução da sua potência relaxante em aproximadamente 3 vezes na presença do L-NAME, análogo da L-arginina não hidrolizável pela eNOS ($CE_{50} = 102,3 \pm 14,1 \mu\text{g/mL}$). Este efeito inibitório do L-NAME foi revertido na presença de uma elevada concentração de L-arginina (10^{-3} M), substrato da eNOS ($CE_{50} = 38,0 \pm 8,9 \mu\text{g/mL}$) (Figuras 8A, B e gráficos 3A e B). O tempo médio para que a FAT-SP alcançasse o seu E_{max} na presença do L-NAME ou L-NAME + L-arginina foi de $90,4 \pm 10,5$ e $88,2 \pm 1,5 \text{ min}$, respectivamente.

Figura 8 – Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10^{-4} M de L-NAME (B) em íleo isolado de cobaia



As setas para baixo representam a adição cumulativa da FAT-SP nas concentrações de 1, 3, 9, 27, 81, 243, e 500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. CCh = carbacol e L-NAME = *N* ω -nitro-L-arginina metil éster (MONTEIRO, 2013).

Gráfico 3 – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (■) e na presença de 10^{-4} M de L-NAME (■, $n = 5$) ou L-NAME mais L-arginina (○, $n = 3$) em íleo isolado de cobaia.

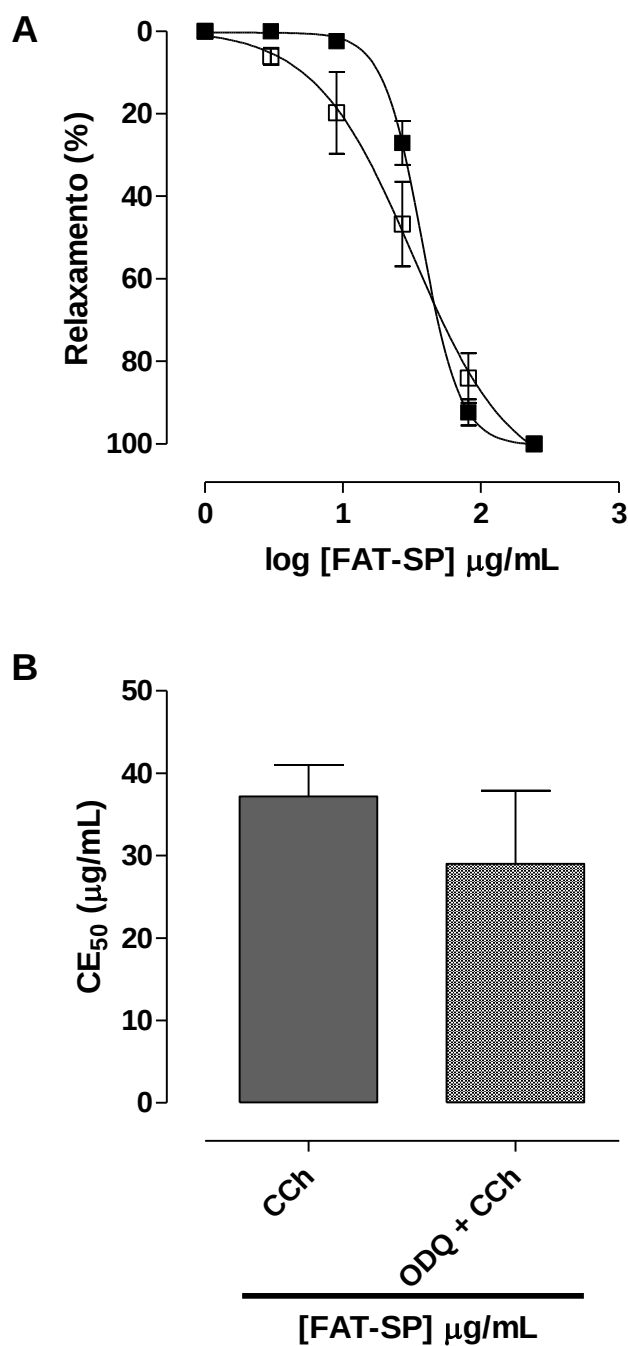


Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t*, não pareado, *** $p < 0,001$ (L-NAME vs L-NAME + L-arginina). L-Arg = L-arginina, CCh = carbacol (MONTEIRO, 2013).

4.2.2 Avaliação da participação da ciclase de guanilil (GC) na ação relaxante da FAT-SP. Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de ODQ

A curva de relaxamento da FAT-SP ($CE_{50} = 37,2 \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$) não foi desviada para a direita de maneira significativa na presença do ODQ (inibidor seletivo da GC), não havendo, portanto, diferença significativa entre as potências ($CE_{50} = 29,0 \pm 8,9 \mu\text{g/mL}$) (Gráficos 4A e B).

Gráfico 4 – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (■) e na presença de 10^{-5} M de ODQ (□) em íleo isolado de cobaia.



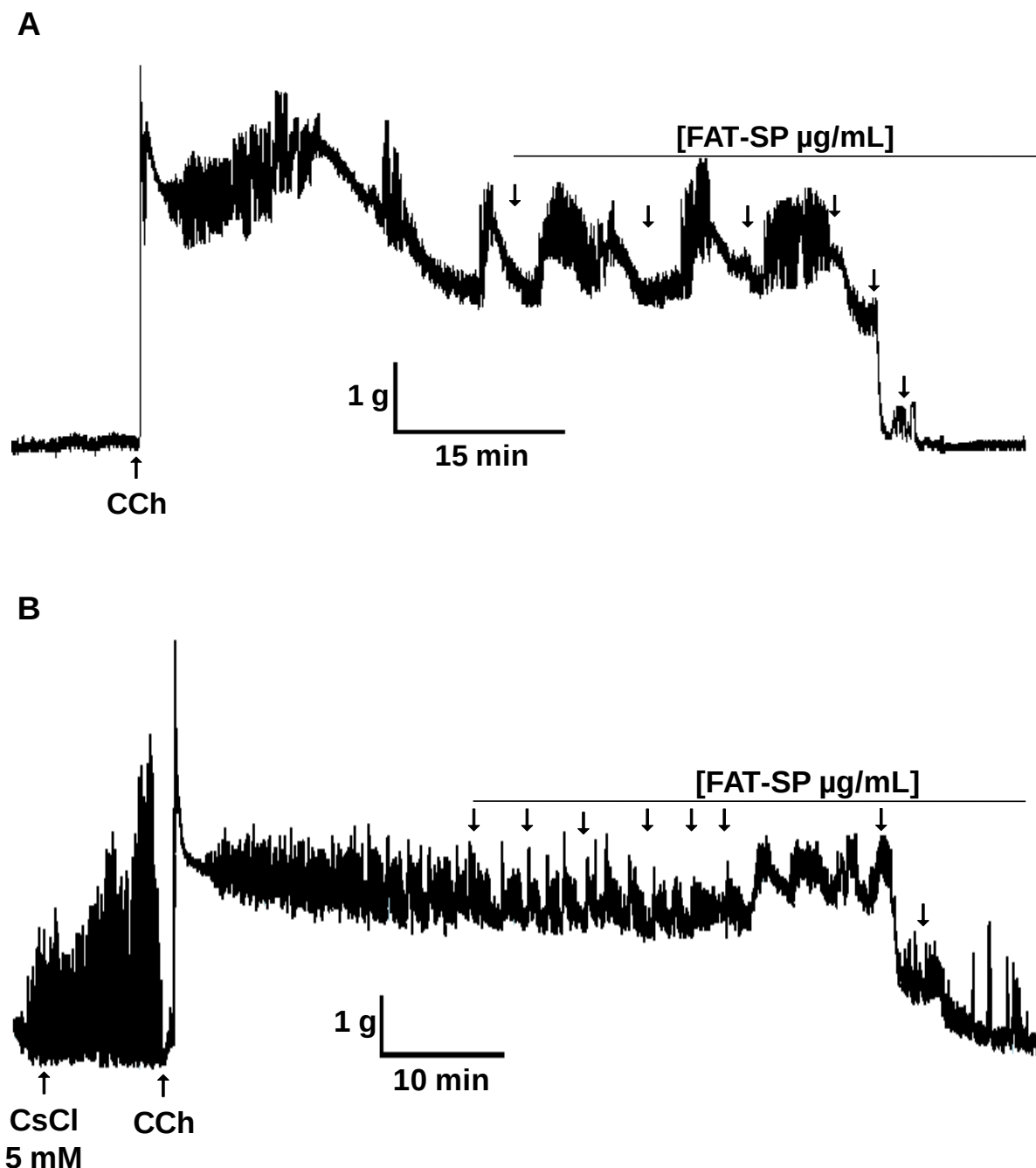
Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 3$). CCh = carbacol (MONTEIRO, 2013).

4.2.3 Investigação da participação dos canais de potássio na ação relaxante da FAT-SP

4.2.3.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl)

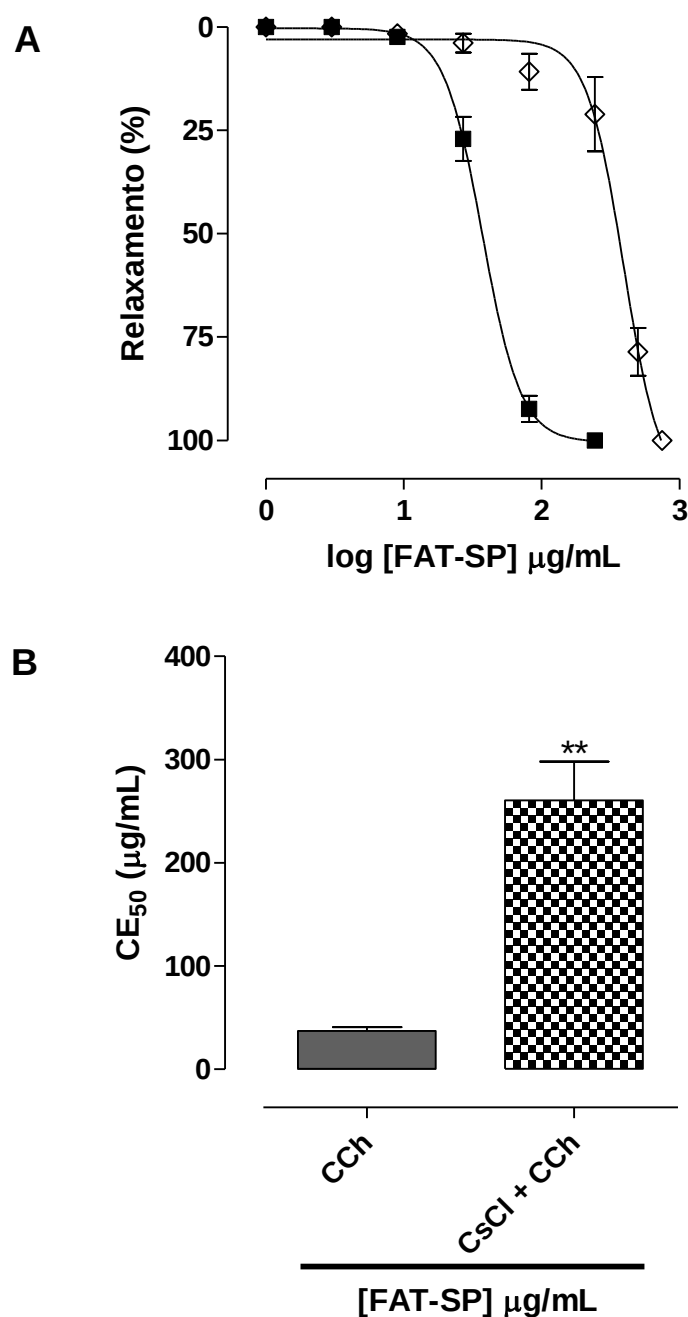
A curva de relaxamento da FAT-SP ($CE_{50} = 37,2 \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$) foi desviada para a direita de maneira significativa com redução de sua potência relaxante em cerca de 8 vezes na presença de 5 mM de CsCl ($CE_{50} = 307,6 \pm 55,5 \mu\text{g/mL}$), um bloqueador não seletivo dos canais de potássio (Figura 9A, B e Gráfico 5A e B). O tempo médio para que a FAT-SP alcançasse o seu E_{max} na presença do bloqueador foi de $104,7 \pm 14,1 \text{ min}$.

Figura 9 – Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 5 mM de CsCl (B) em íleo isolado de cobaia



As setas para baixo representam a adição cumulativa da FAT-SP nas concentrações de 1, 3, 9, 27, 81, 243, 500 e 750 µg/mL, respectivamente. CCh = carbacol e CsCl = cloreto de cézio (MONTEIRO, 2013).

Gráfico 5 – Efeito relaxante (A) e os valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (■) e na presença de 5 mM de CsCl (◇) em íleo isolado de cobaia.

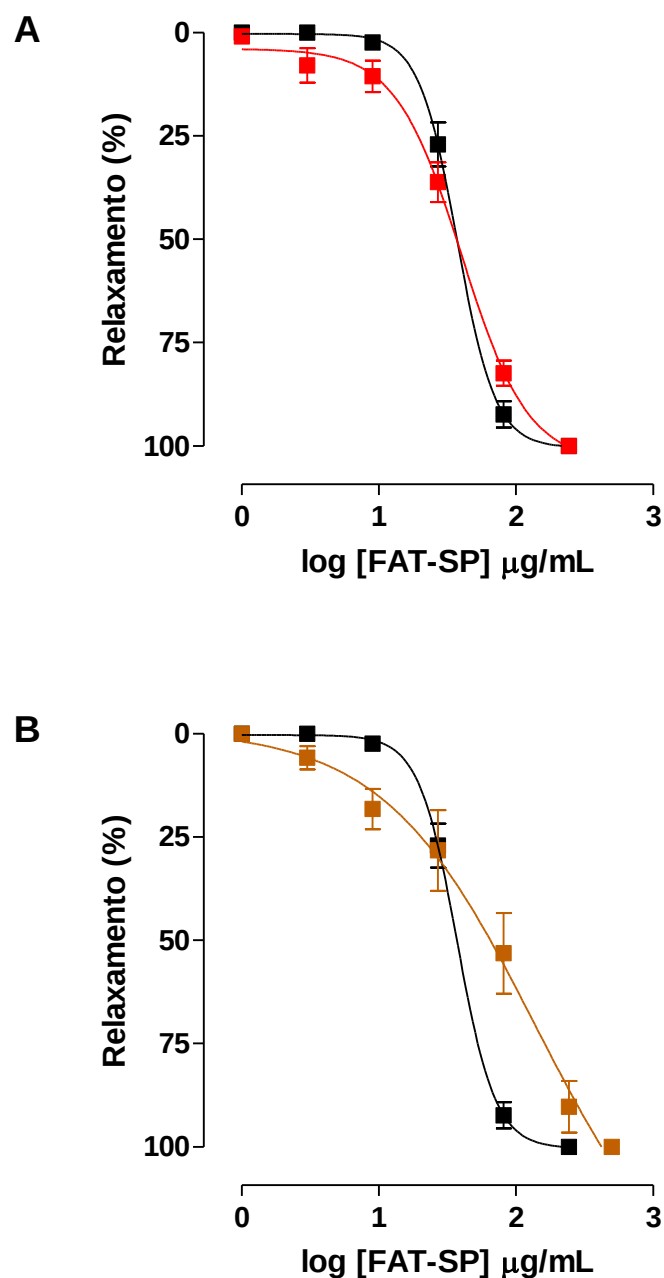


Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). Teste t , não pareado, $**p < 0,01$ (CCh vs. CsCl + CCh) (MONTEIRO, 2013).

4.2.3.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio

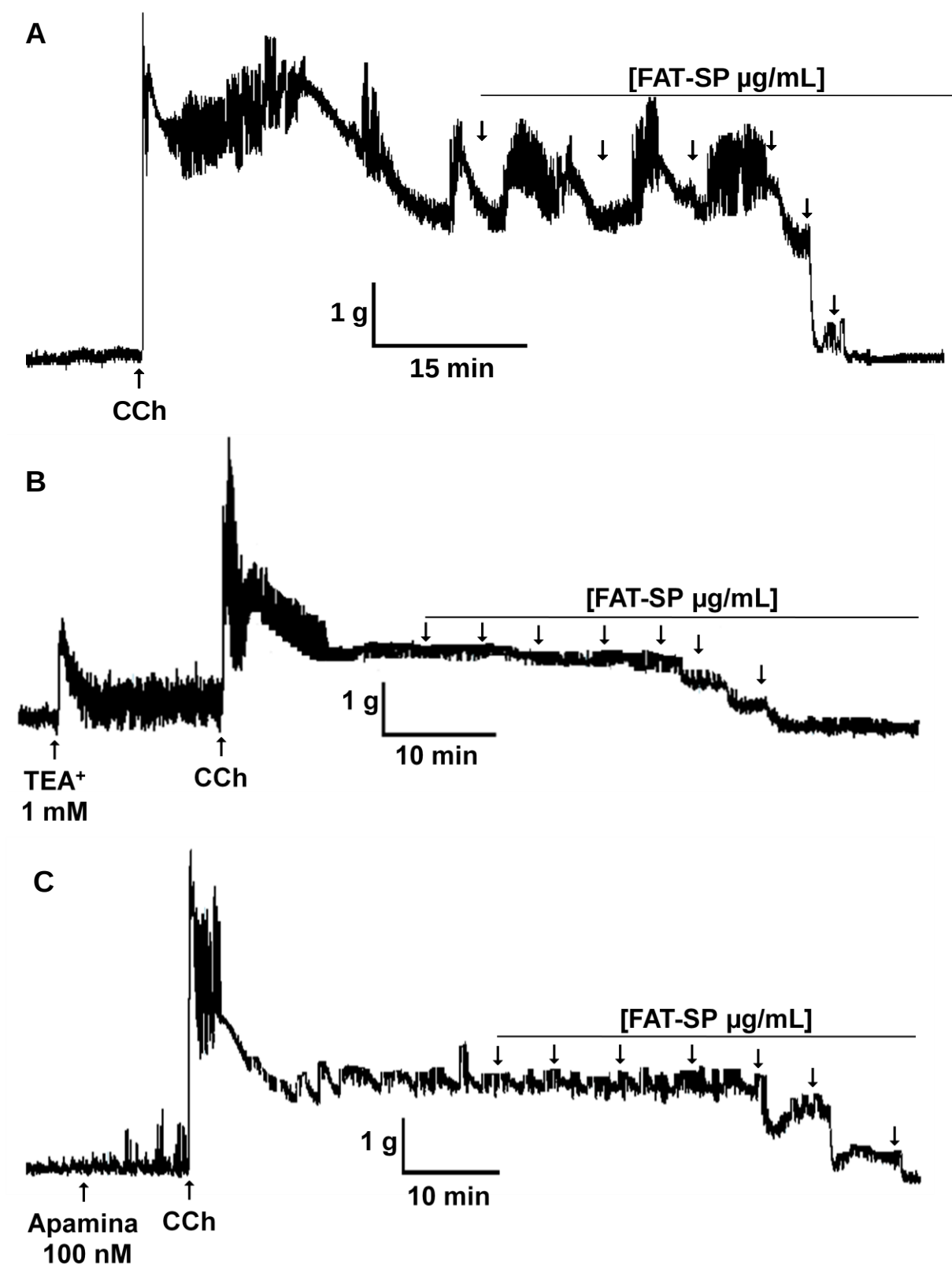
A curva de relaxamento da FAT-SP ($CE_{50} = 37,2 \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$) não foi desviada para a direita de maneira significativa na presença de glibenclamida, um bloqueador seletivo dos K_{ATP} ou 4-AP, um bloqueador seletivo dos K_V , não havendo, portanto, diferença significativa entre as potências relaxantes ($CE_{50} = 35,1 \pm 1,9$ e $51,6 \pm 17,7 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) (Gráficos 6A e B). De outra forma, a curva de relaxamento da FAT-SP foi desviada para direita de maneira significativa e com redução da potência relaxante em cerca de 2 vezes na presença de 1 mM de TEA^+ , um bloqueador seletivo dos BK_{Ca} e apamina, um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} ($CE_{50} = 79,3 \pm 11,4$ e $78,8 \pm 10,9 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) (Figura 10A, B, C e gráficos 7A e B). O tempo médio para que a FAT-SP alcançasse o seu E_{max} na presença de TEA^+ e apamina foi de $85,1 \pm 13,2$ e $66,8 \pm 12,1 \text{ min}$, respectivamente.

Gráfico 6 – Efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (■) e na presença de 10^{-5} M de glibenclamida (■, A) ou 0,3 mM de 4-AP (■, B) em íleo isolado de cobaia.



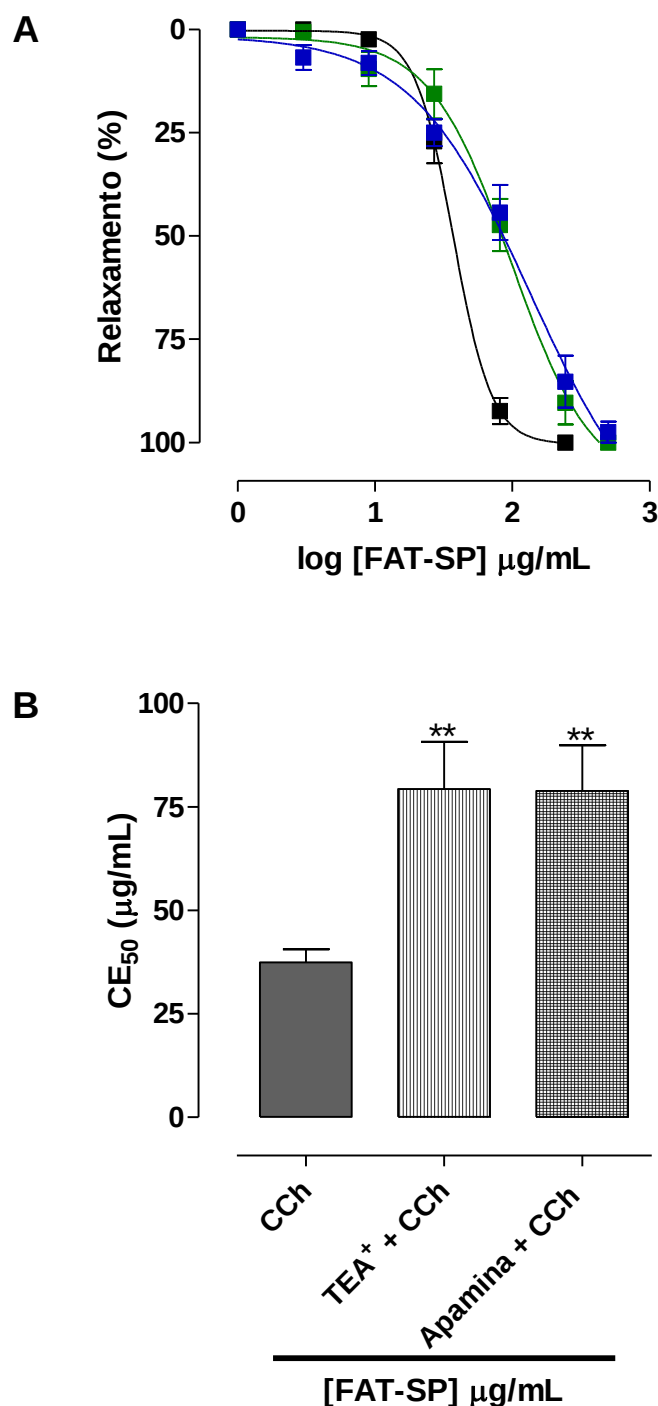
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 3$) (MONTEIRO, 2013).

Figura 10 – Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 1 mM de TEA⁺ (B) ou 100 nM de apamina (C) em íleo isolado de cobaia



As setas para baixo representam a adição cumulativa da FAT-SP nas concentrações de 1, 3, 9, 27, 81, 243 e 500 µg/mL, respectivamente. CCh = carbacol e TEA⁺ = tetraetilamônio (MONTEIRO, 2013).

Gráfico 7 – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na ausência (■) e na presença de 1 mM de TEA^+ (■) ou 100 nM de apamina (■) em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). Teste t , não pareado, $**p < 0,01$ (CCh vs. TEA^+ 1 mM + CCh ou apamina + CCh) (MONTEIRO, 2013).

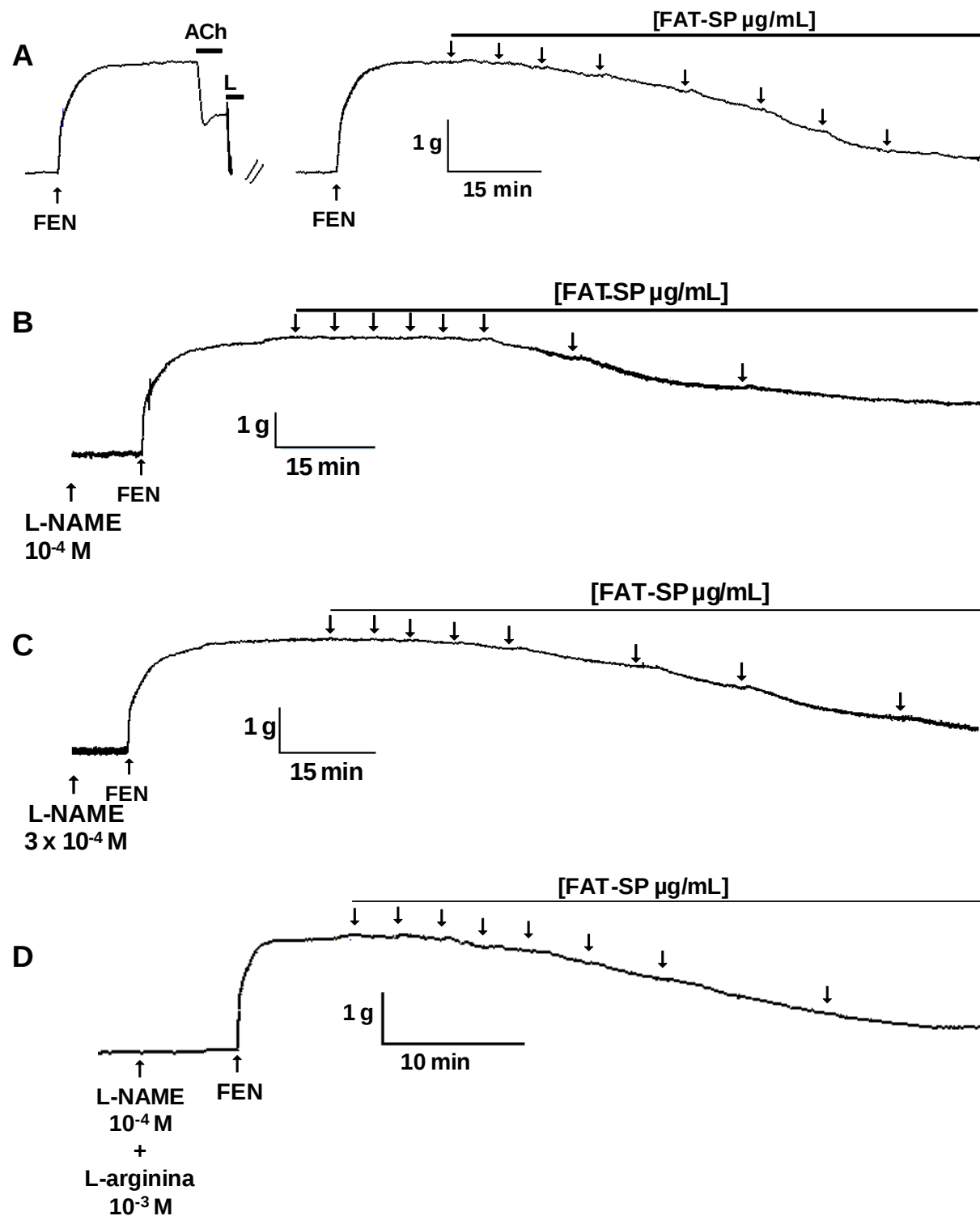
4.3 Mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em aorta de rato

4.3.1 Avaliação da via de sinalização do NO na ação relaxante da FAT-SP

4.3.1.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de L-NAME ou L-NAME + L-arginina

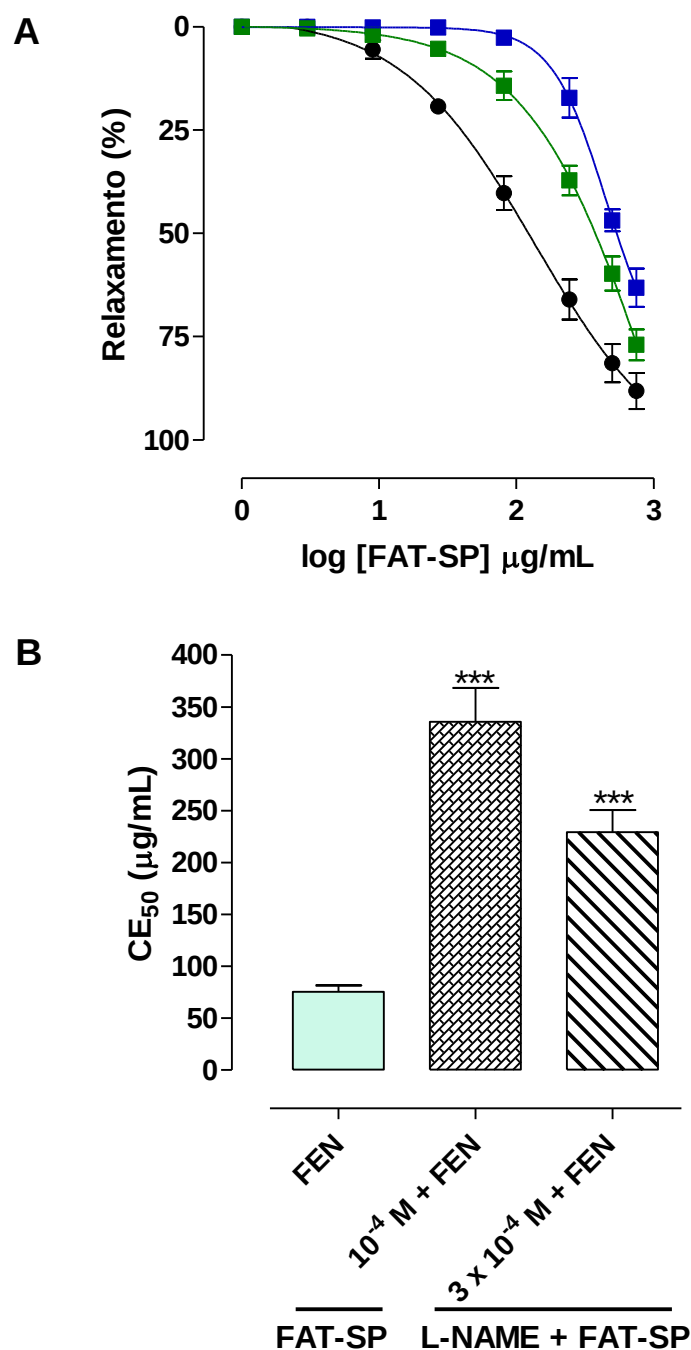
A curva de relaxamento da FAT-SP ($CE_{50} = 75,4 \pm 6,2 \mu\text{g/mL}$) foi desviada para a direita de maneira significativa com redução de sua potência relaxante em cerca de 4 ou 3 vezes na presença de 10^{-4} M ou 3×10^{-4} M de L-NAME, respectivamente ($CE_{50} = 335,8 \pm 32,5$ e $229,3 \pm 21,2 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) (Figuras 11A, B, C e gráficos 8A e B). Além disso, o E_{max} ($88,2 \pm 4,3\%$) de relaxamento do controle na presença de 10^{-4} M de L-NAME foi atenuado ($E_{\text{max}} = 63,2 \pm 4,6\%$) de maneira significativa (Gráfico 8A). A redução da potência e do E_{max} na presença de 10^{-4} M de L-NAME ($CE_{50} = 335,8 \pm 32,5 \mu\text{g/mL}$) foi revertido quando se ofertou 10^{-3} M de L-arginina, substrato natural da eNOS, ($CE_{50} = 107,2 \pm 17,7 \mu\text{g/mL}$ e $E_{\text{max}} = 81,9 \pm 5,0$) (Figura 11 D e gráficos 9A e B). O tempo médio para que a FAT-SP alcançasse o seu E_{max} na presença de 10^{-4} M de L-NAME ou L-NAME + L-arginina foi de $120,66 \pm 8,5$ e $61,7 \pm 20,0$ min, respectivamente.

Figura 11 – Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 10^{-4} M (B), 3×10^{-4} M (C) de L-NAME ou 10^{-4} M de L-NAME mais 10^{-3} M de L-arginina (D) em aorta de rato com endotélio funcional



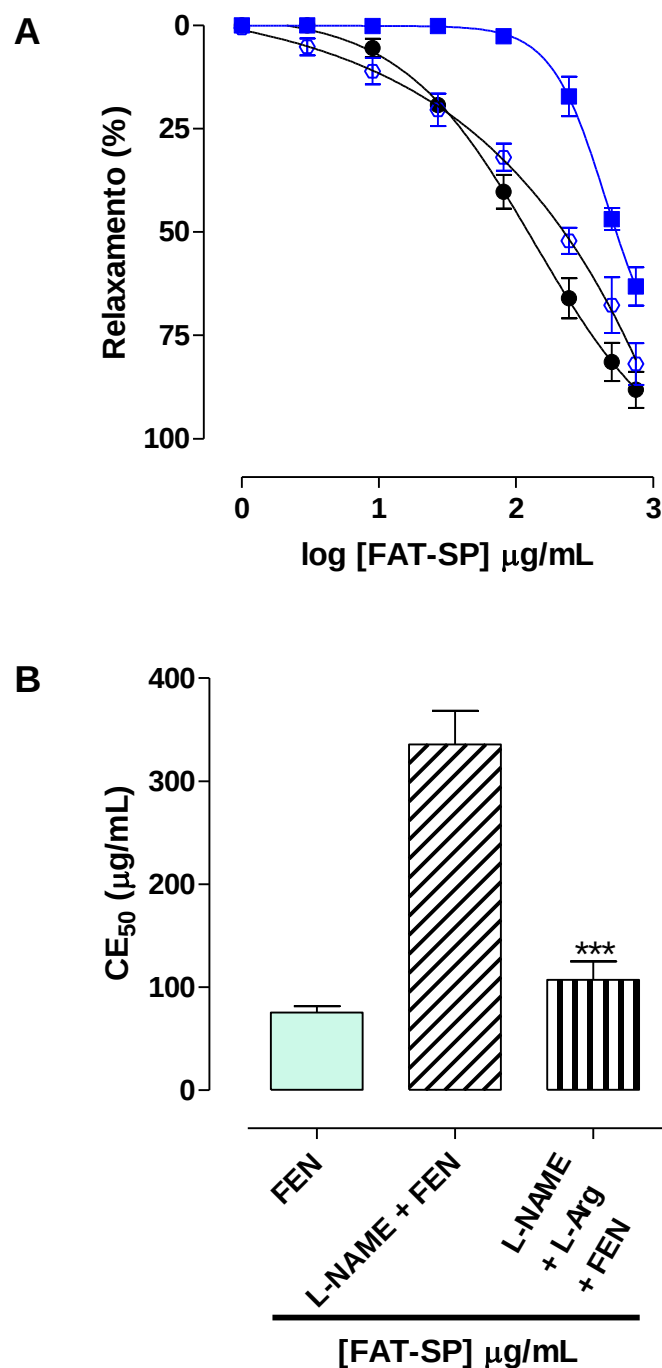
As setas para baixo representam a adição cumulativa da FAT-SP nas concentrações de 1, 3, 9, 27, 81, 243, 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem e L-NAME = *N* ω -nitro-L-arginina metil éster (MONTEIRO, 2013).

Gráfico 8 – Efeito relaxante (A) e Valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (●) e na presença de 10^{-4} (■) ou 3×10^{-4} M (■) de L-NAME em aorta de rato com endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). Teste t , não pareado, *** $p < 0,001$ (FAT-SP vs. L-NAME 10^{-4} e 3×10^{-4} M) (MONTEIRO, 2013).

Gráfico 9 – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (●) e na presença de 10^{-4} M de L-NAME (■) ou 10^{-4} M de L-NAME mais 10^{-3} M de L-arginina (○) em aorta de rato com endotélio funcional.

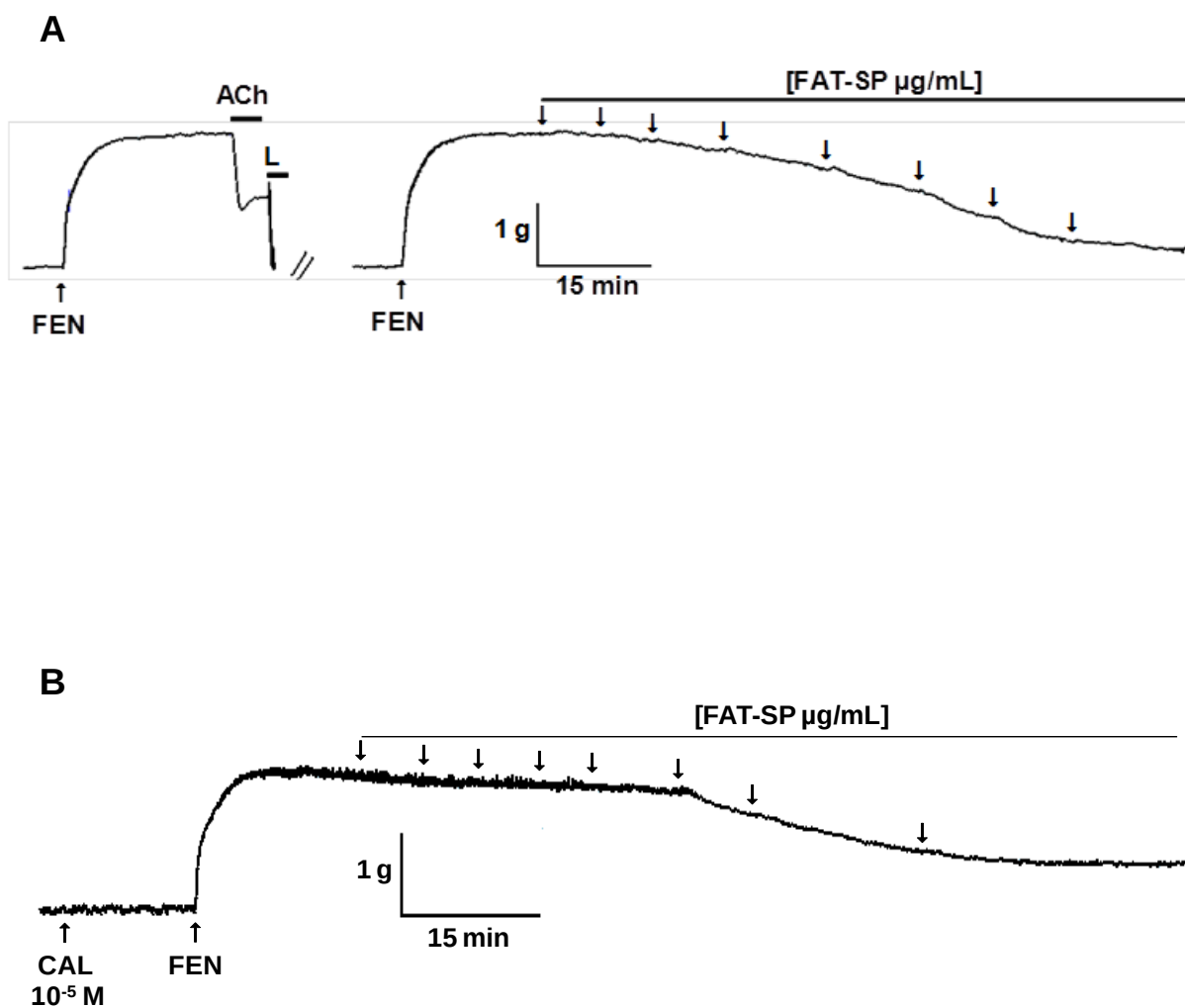


Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). Teste t , não pareado, *** $p < 0,001$ (L-NAME vs. L-NAME + L-arginina). L-Arg = L-arginina, FEN = fenilefrina (MONTEIRO, 2013).

4.3.1.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de calmidazolium

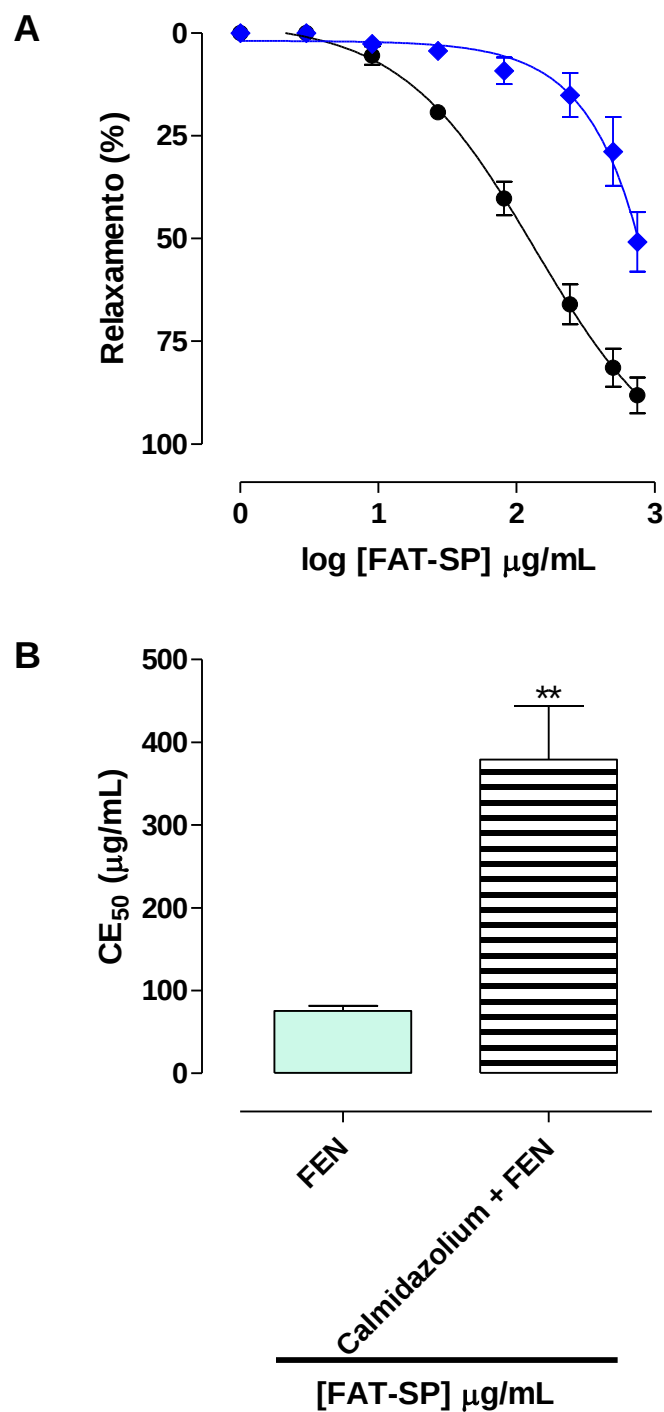
A curva de relaxamento da FAT-SP ($CE_{50} = 75,4 \pm 6,2 \mu\text{g/mL}$) foi desviada para a direita de maneira significativa com redução de sua potência relaxante em cerca de 5 vezes na presença de 10^{-5} M de calmidazolium ($CE_{50} = 379,0 \pm 64,7 \mu\text{g/mL}$), um inibidor da calmodulina endotelial. Além disso, o E_{max} ($88,2 \pm 4,3\%$) de relaxamento do controle na presença de 10^{-5} M de calmidazolium foi atenuado ($E_{\text{max}} = 50,8 \pm 7,3\%$) de maneira significativa (Figuras 12A, B e gráficos 10A e B). O tempo médio para que a FAT-SP alcançasse o seu E_{max} na presença do bloqueador foi de $146,7 \pm 11,8$ min.

Figura 12 - Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 10^{-5} M do calmidazolium (B) em aorta de rato com endotélio funcional



As setas para baixo representam a adição cumulativa da FAT-SP nas concentrações de 1, 3, 9, 27, 81, 243, 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina e L = lavagem (MONTEIRO, 2013).

Gráfico 10 – Efeito relaxante (A) e Valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (●) e na presença de 10^{-5} M (◆) de calmidazolium em aorta de rato com endotélio funcional.

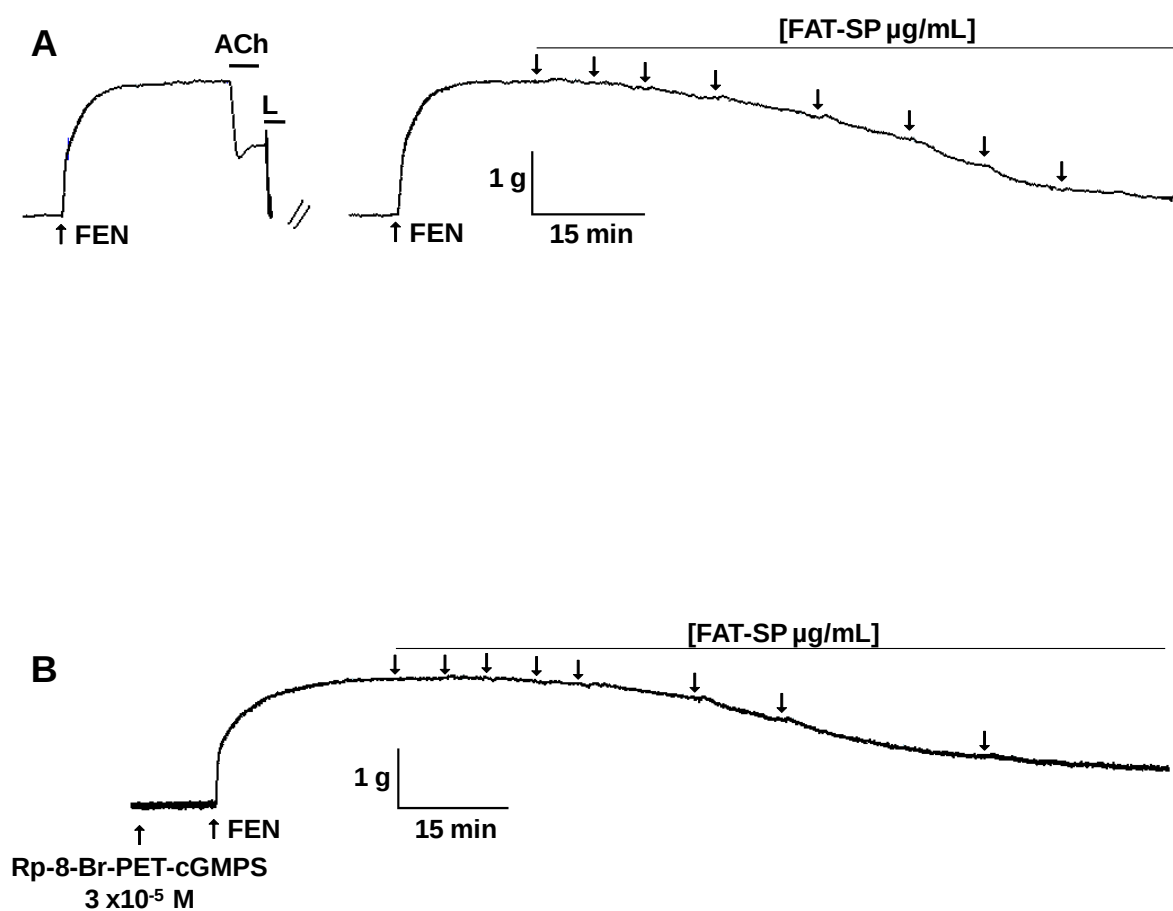


Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). Teste t , não pareado, $**p < 0,01$ (FEN vs. calmidazolium + FEN) (MONTEIRO, 2013).

4.3.1.3 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS

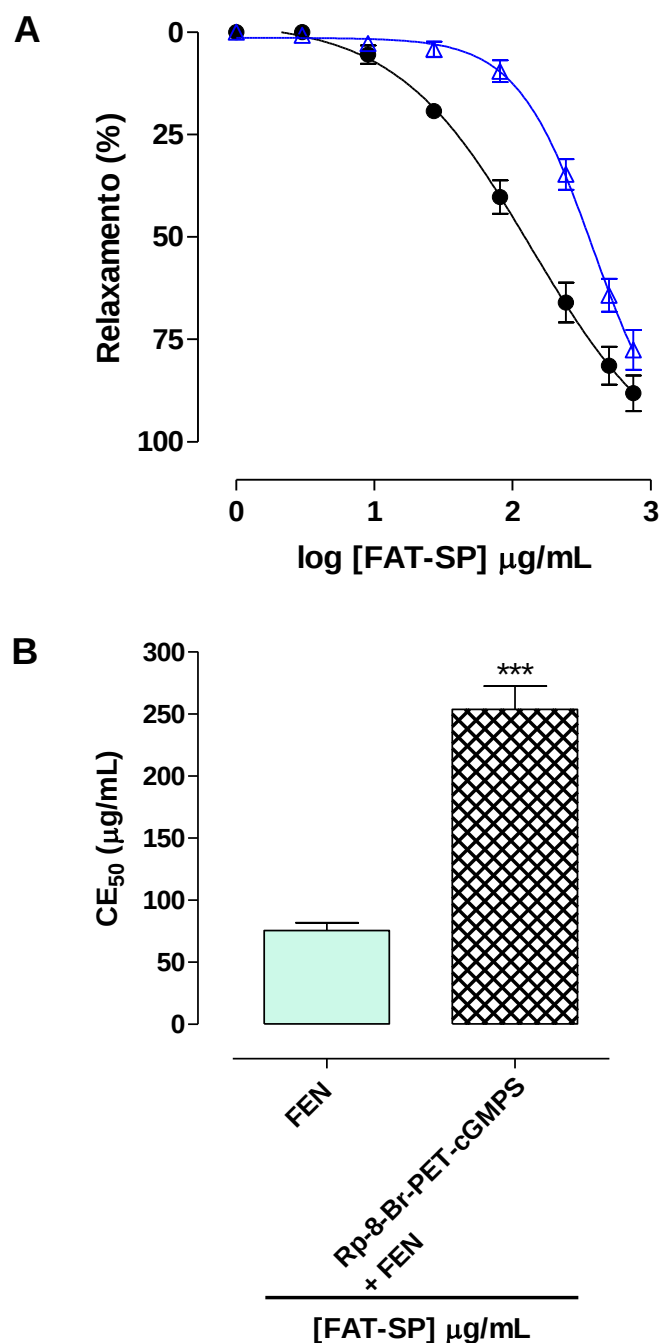
A curva de relaxamento da FAT-SP ($CE_{50} = 75,4 \pm 6,2 \mu\text{g/mL}$) foi desviada para a direita de maneira significativa e com redução da sua potência relaxante em cerca de 3 vezes na presença de $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ de Rp-8-Br-PET-cGMPS ($CE_{50} = 253,7 \pm 18,7 \mu\text{g/mL}$), inibidor seletivo da PKG (Figura 13A, B e gráficos 11A e B). O tempo médio para que a FAT-SP alcançasse o seu E_{max} na presença do bloqueador foi de $129,8 \pm 16,4 \text{ min}$.

Figura 13 – Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (**A**) e na presença de 3×10^{-5} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS (**B**) em aorta de rato com endotélio funcional



As setas para baixo representam a adição cumulativa da FAT-SP nas concentrações de 1, 3, 9, 27, 81, 243, 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L= lavagem (MONTEIRO, 2013).

Gráfico 11 – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (●) e na presença (Δ) de 3×10^{-5} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS em aorta de rato com endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). Teste t , não pareado, $***p < 0,001$ (FEN vs. Rp-8-Br-PET-cGMPS) (MONTEIRO, 2013).

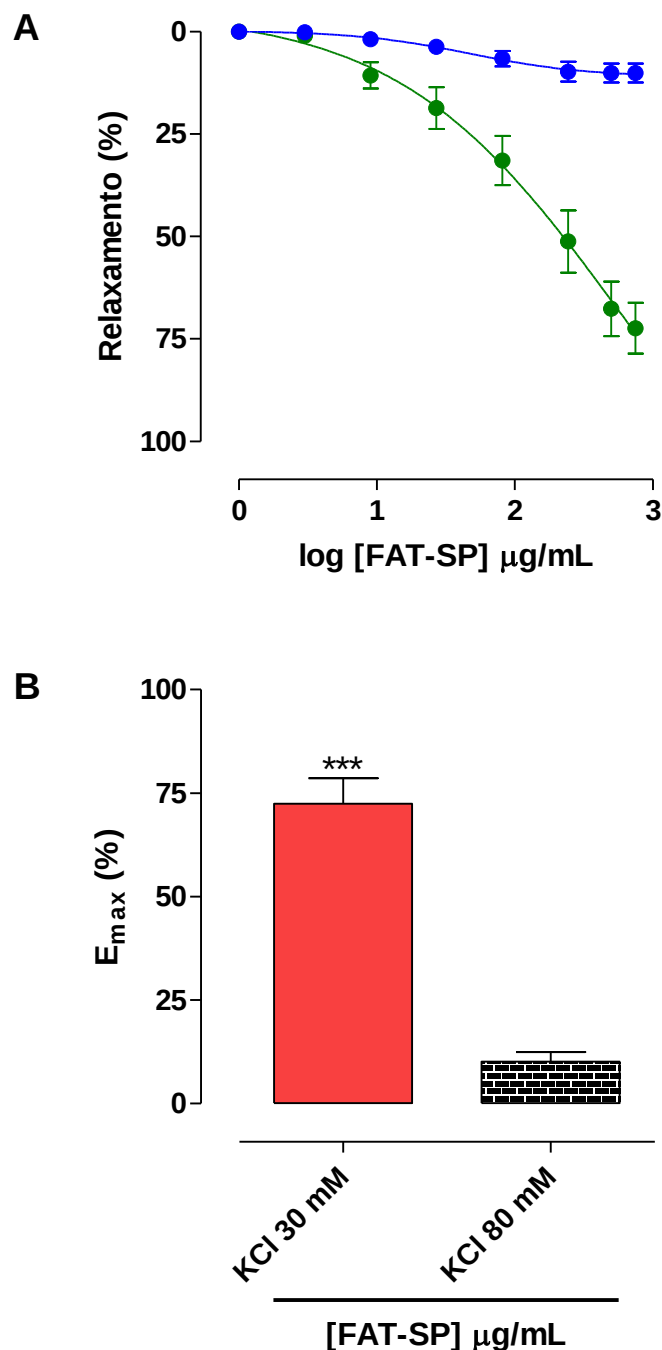
4.3.2 Investigação da participação dos canais de potássio na ação relaxante da FAT-SP

4.3.2.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 30 ou 80 mM de KCl

A FAT-SP (1 - 750 $\mu\text{g/mL}$), adicionada de maneira cumulativa a cuba, relaxou os anéis de aorta de rato com e sem endotélio funcional mais efetivamente quando pré-contraídos com moderadas concentrações de KCl (30 mM) do que com altas concentrações (80 mM) desta solução (Gráficos 12A e 13A).

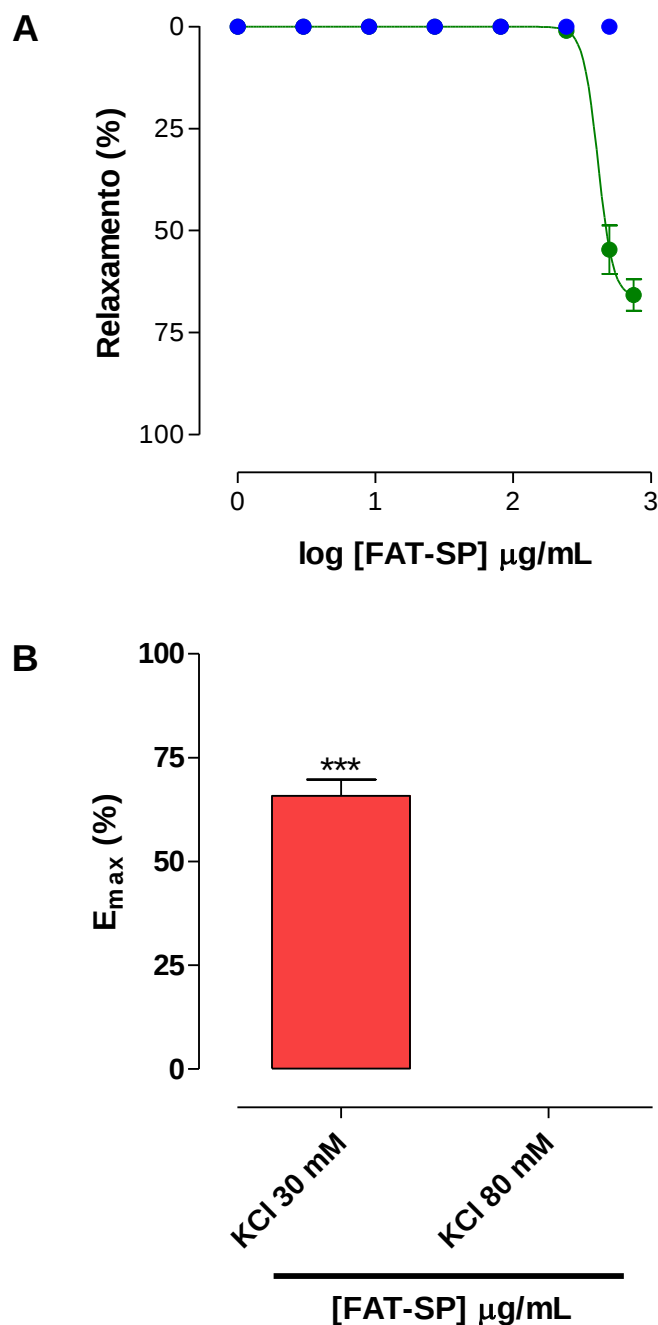
A potência relaxante da FAT-SP foi atenuada em cerca de 4 vezes quando comparou-se as preparações sem endotélio funcional incubadas com 30 mM de KCl ($\text{CE}_{50} = 458,9 \pm 19,1 \mu\text{g/mL}$) com as preparações com endotélio funcional na presença de 30 mM de KCl ($98,8 \pm 26,5 \mu\text{g/mL}$) (Gráficos 13B e 12B). O E_{max} da FAT-SP na presença de 30 mM de KCl foi de $72,4 \pm 6,2$ e $65,8 \pm 3,9\%$, em aorta com e sem endotélio funcional, respectivamente. Na presença de 80 mM de KCl, a FAT-SP apresentou um E_{max} de $10,2 \pm 2,3\%$ em aorta com endotélio funcional e não apresentou efeito relaxante na presença de 80 mM de KCl em aorta sem endotélio funcional (Gráficos 12B e 13B). O tempo médio para que a FAT-SP alcançasse o seu E_{max} quando a preparação era contraída por KCl 30 mM na presença e na ausência de endotélio foi de $82,7 \pm 9,2$ e $104,5 \pm 1,2$ min, respectivamente.

Gráfico 12 – Efeito relaxante (A) e valores de $E_{\max}$ (%) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 30 mM (●) ou 80 mM (●) de KCl em aorta de rato com endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). Teste t , não pareado, $***p < 0,001$ (KCl 30 mM vs. KCl 80 mM) (MONTEIRO, 2013).

Gráfico 13 – Efeito relaxante (A) e valores de $E_{\max}$ (%) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 30 mM (●) ou 80 mM (●) de KCl em aorta de rato sem endotélio funcional.



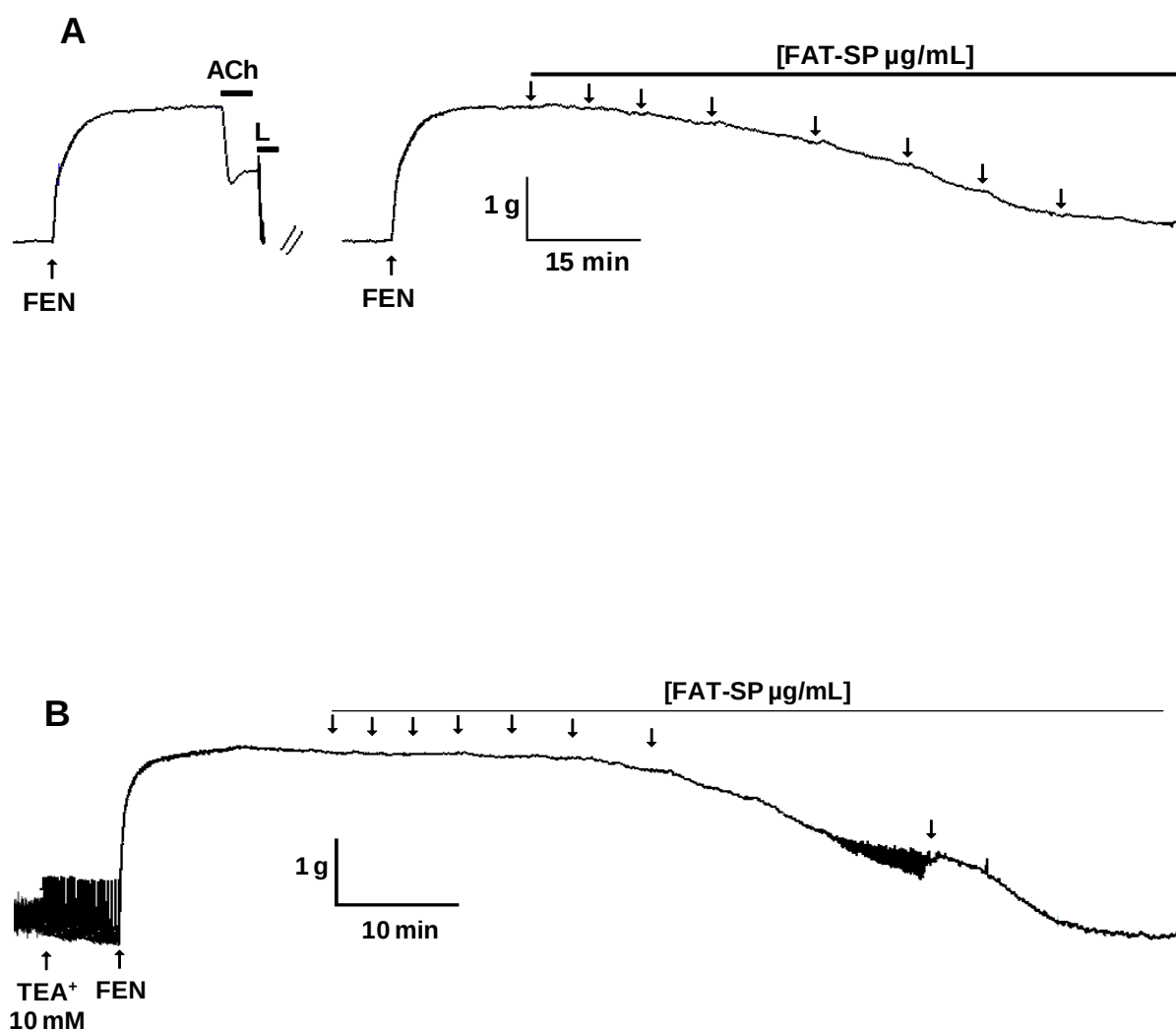
Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). Teste t , não pareado, $***p < 0,001$ (KCl 30 mM vs. KCl 80 mM) (MONTEIRO, 2013).

4.3.2.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de TEA⁺

Em preparações com endotélio funcional a curva de relaxamento da FAT-SP ($CE_{50} = 75,4 \pm 6,2 \mu\text{g/mL}$) foi desviada para a direita de maneira significativa e com redução da sua potência relaxante em cerca de 3 vezes na presença de 10 mM de TEA⁺ ($CE_{50} = 217,3 \pm 39,6 \mu\text{g/mL}$) (Figuras 14A, B e gráficos 14A e B).

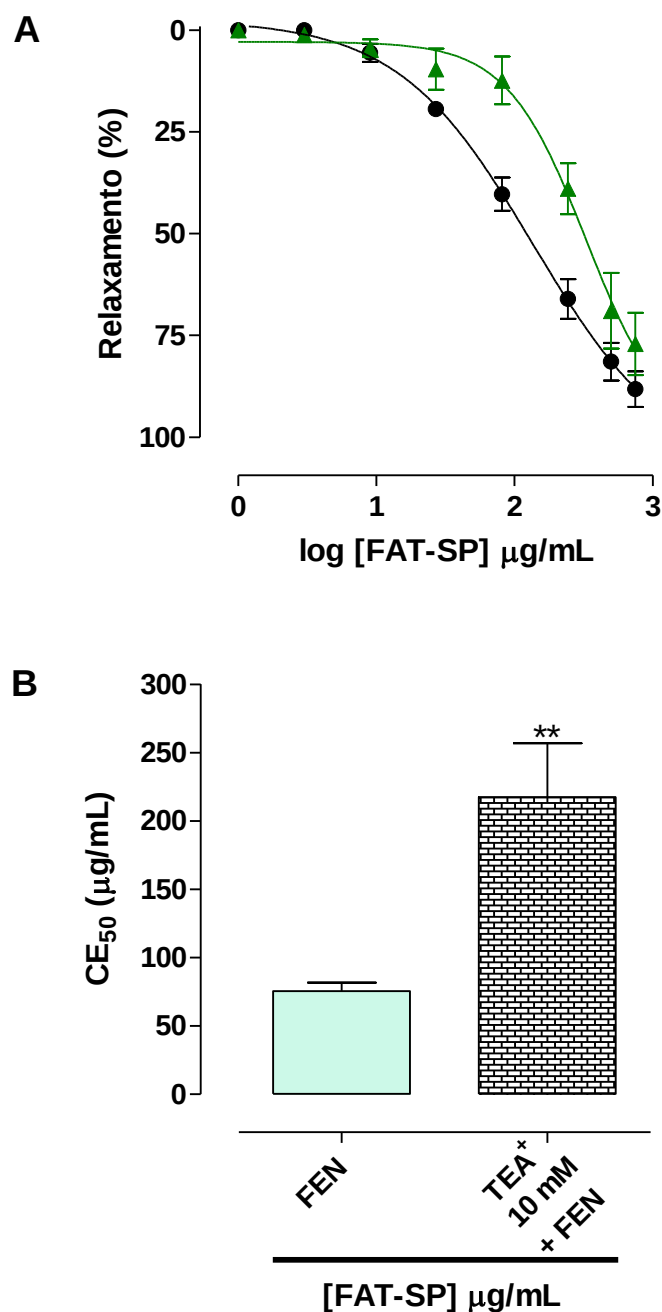
Em preparações sem endotélio funcional a curva de relaxamento da FAT-SP ($CE_{50} = 242,8 \pm 11,7 \mu\text{g/mL}$) foi desviada para a direita de maneira significativa e com redução de sua potência relaxante em torno de 2 vezes na presença de 10 mM de TEA⁺ ($CE_{50} = 390,4 \pm 41,9 \mu\text{g/mL}$) (Figuras 15A, B e gráficos 15A e B). O tempo médio para que a FAT-SP alcançasse o seu E_{max} na presença TEA⁺ em aorta com e sem endotélio foi de $100,5 \pm 4,6$ e $135,7 \pm 19,3$ min, respectivamente.

Figura 14 - Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 10 mM de TEA^+ (B) em aorta de rato com endotélio funcional



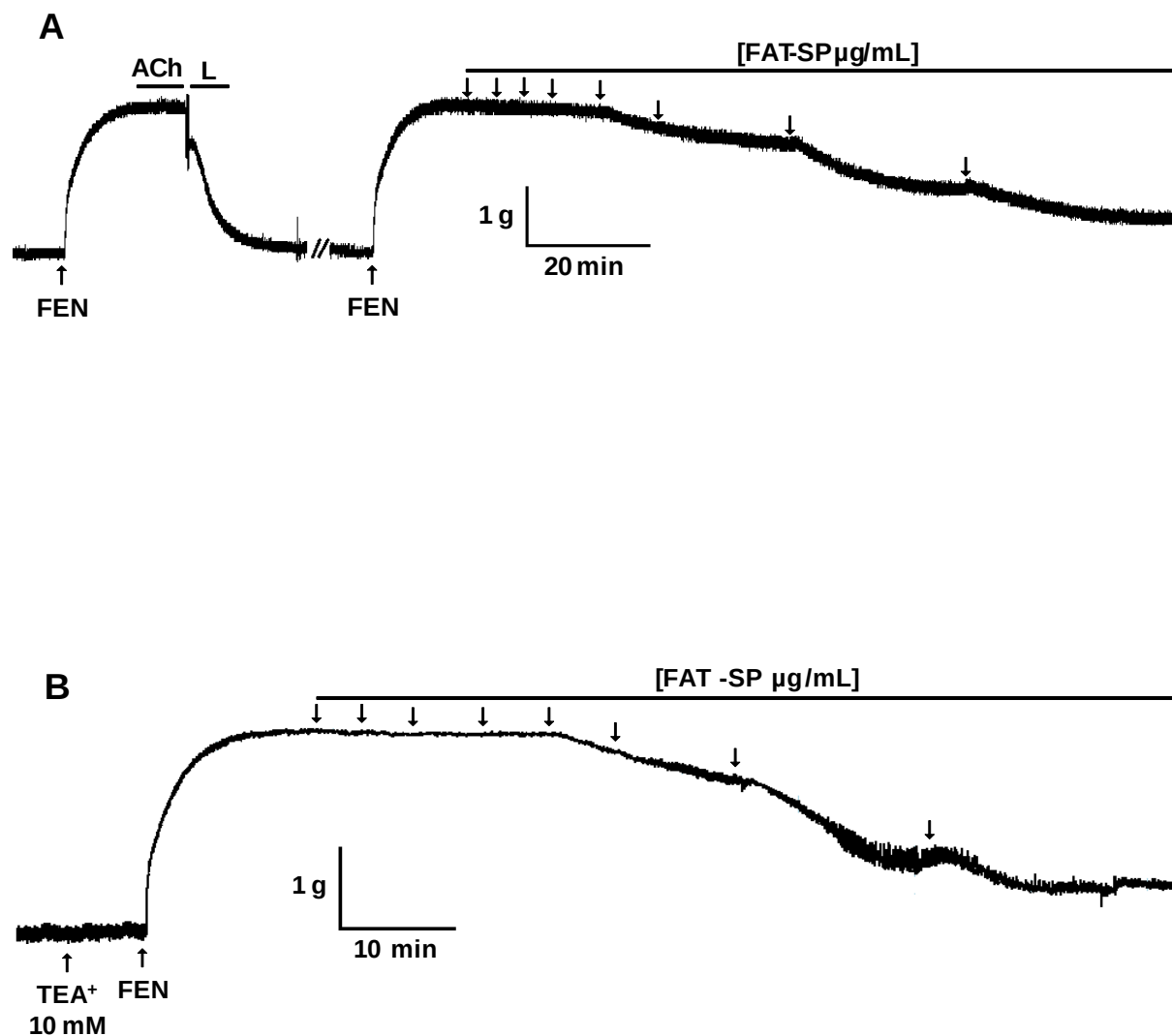
As setas para baixo representam a adição cumulativa da FAT-SP nas concentrações de 1, 3, 9, 27, 81, 243, 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem e TEA^+ = tetraetilamônio (MONTEIRO, 2013).

Gráfico 14 – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (●) e na presença de 10 mM de TEA^+ (▲) em aorta de rato com endotélio funcional.



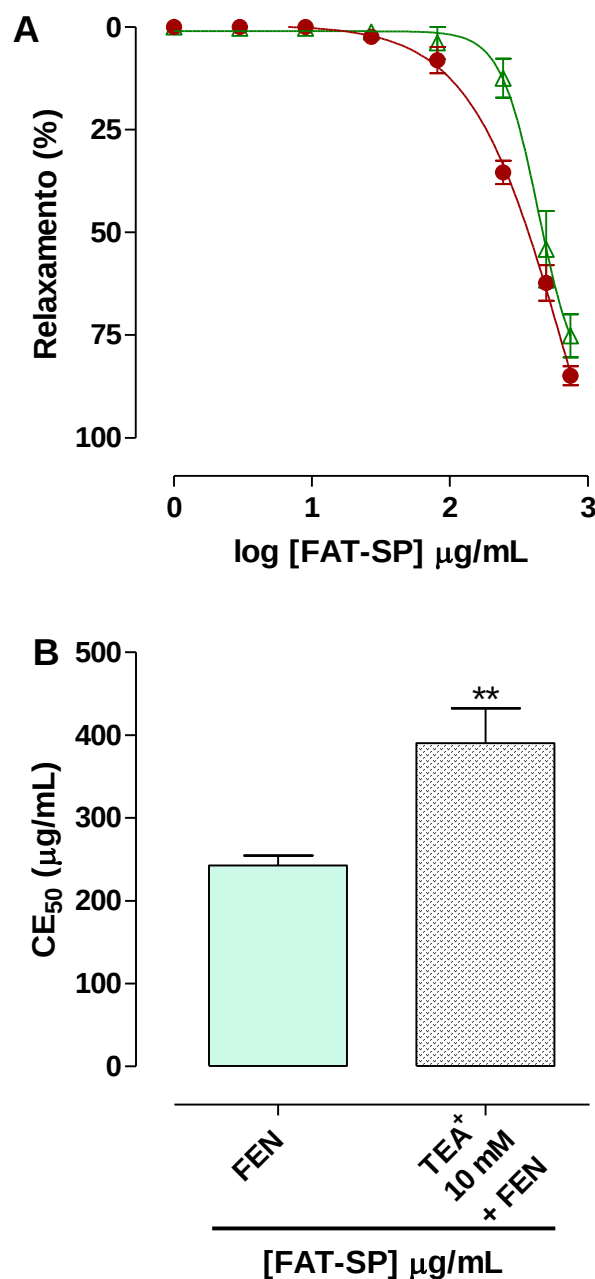
Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). Teste t , não pareado, $**p < 0,01$ (FEN vs. TEA^+ 10 mM + FEN) (MONTEIRO, 2013).

Figura 15 - Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 10 mM de TEA⁺ (B) em aorta de rato sem endotélio funcional



As setas para baixo representam a adição cumulativa da FAT-SP nas concentrações de 1, 3, 9, 27, 81, 243, 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem e TEA⁺ = tetraetilamônio (MONTEIRO, 2013).

Gráfico 15 – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (●) e na presença de 10 mM de TEA^+ (Δ) em aorta de rato sem endotélio funcional.

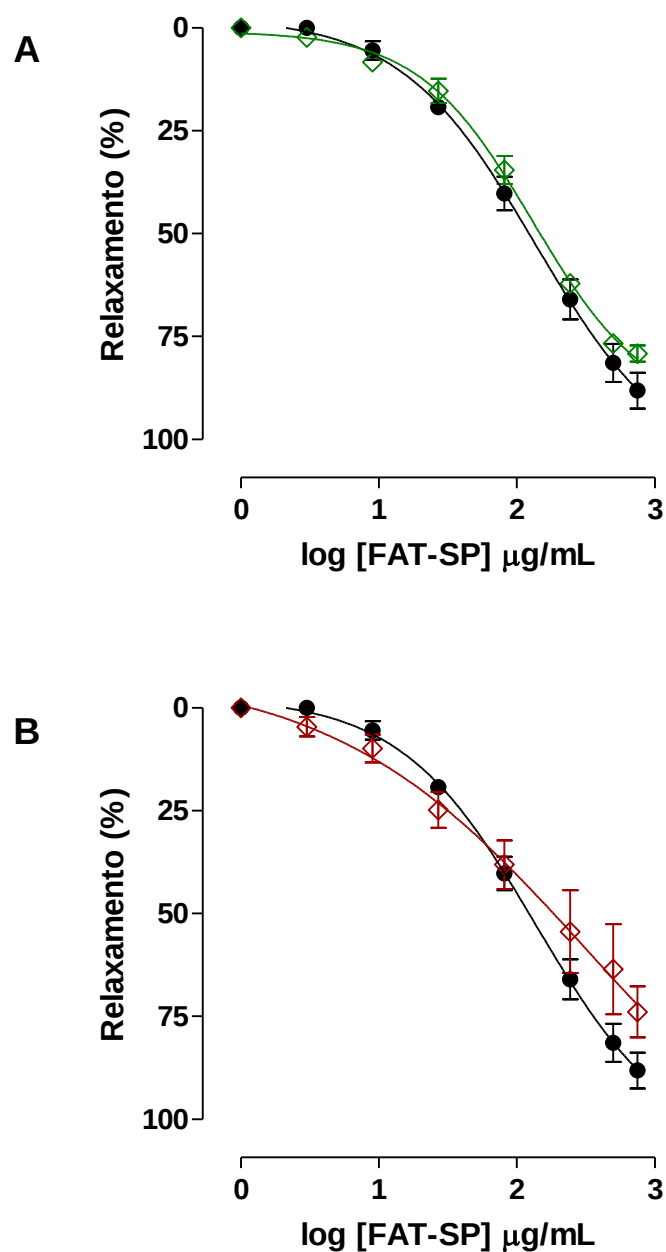


Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). Teste t , não pareado, $**p < 0,01$ (FEN vs. TEA^+ 10 mM + FEN) (MONTEIRO, 2013).

4.3.2.3 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por FEN, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio

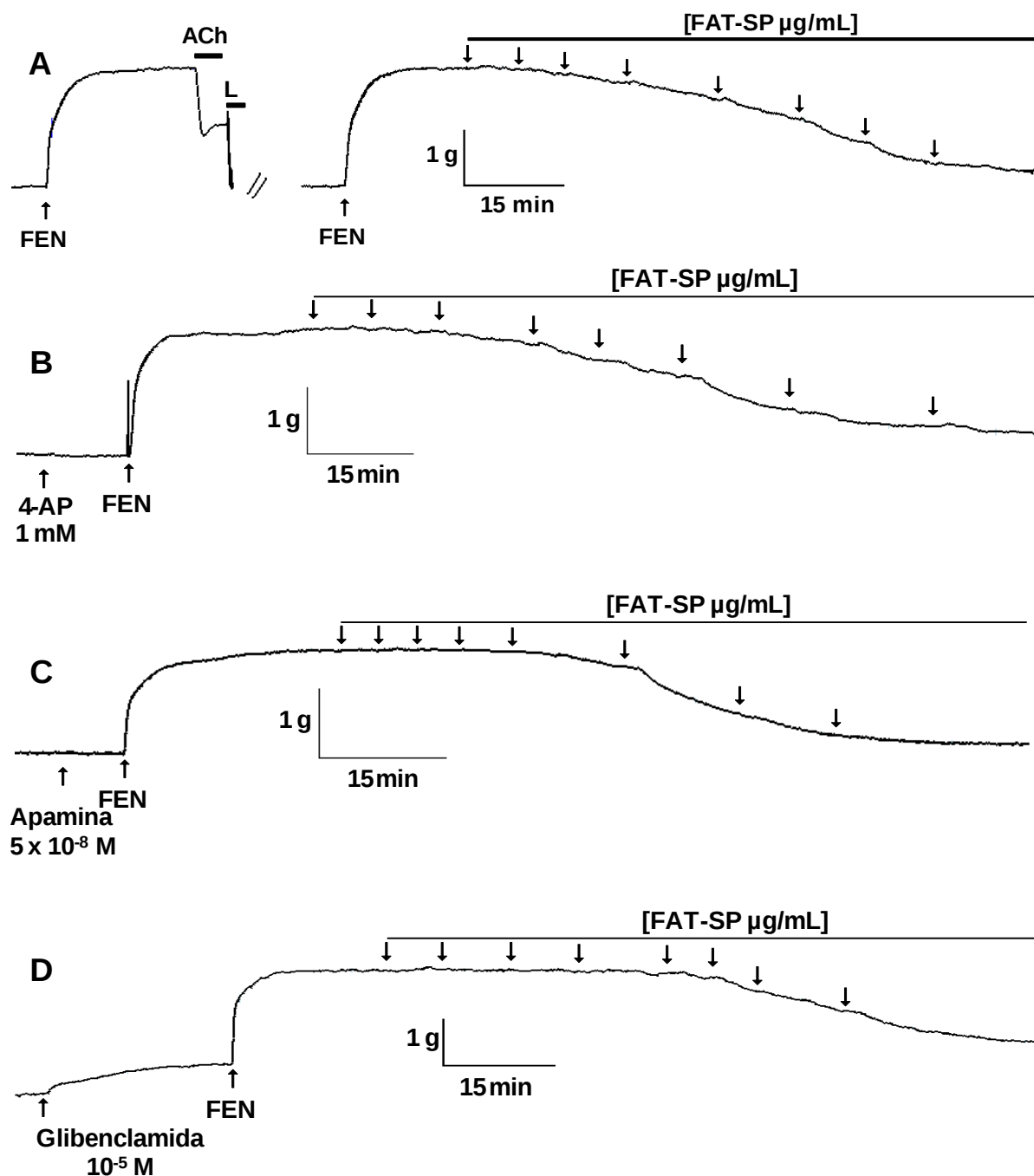
A curva de relaxamento da FAT-SP ($CE_{50} = 75,4 \pm 6,2 \mu\text{g/mL}$) não foi desviada para a direita de maneira significativa na presença de 1 mM de TEA^+ e $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ de BaCl_2 ($CE_{50} = 88,0 \pm 10,8$ e $72,6 \pm 14,6 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) (Gráficos 16A e B) em aorta de rato pré-contraída com $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ de FEN com endotélio funcional, portanto, não havendo diferença significativa entre as potências relaxantes. Por outro lado, na presença de 1 mM de 4-AP, $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ de apamina ($CE_{50} = 156,5 \pm 15,4$ e $135,5 \pm 15,7 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) a curva de relaxamento da FAT-SP foi desviada para a direita de maneira significativa e com redução da potência relaxante em cerca de duas vezes e na presença de 10^{-5} M de glibenclamida ($CE_{50} = 303,5 \pm 21,8 \mu\text{g/mL}$) em torno de 4 vezes (Figura 16A, B, C e D e gráficos 17A e B). O tempo médio para que a FAT-SP alcançasse o seu E_{max} na presença de 4-AP, apamina e glibenclamida foi de $101,1 \pm 7,2$; $105,7 \pm 19,3$ e $131,1 \pm 12,9 \text{ min}$, respectivamente.

Gráfico 16 – Efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (●) e na presença de 1 mM de TEA^+ (◇, A) ou 3×10^{-5} M de BaCl_2 (◇, B) em aorta de rato com endotélio funcional.



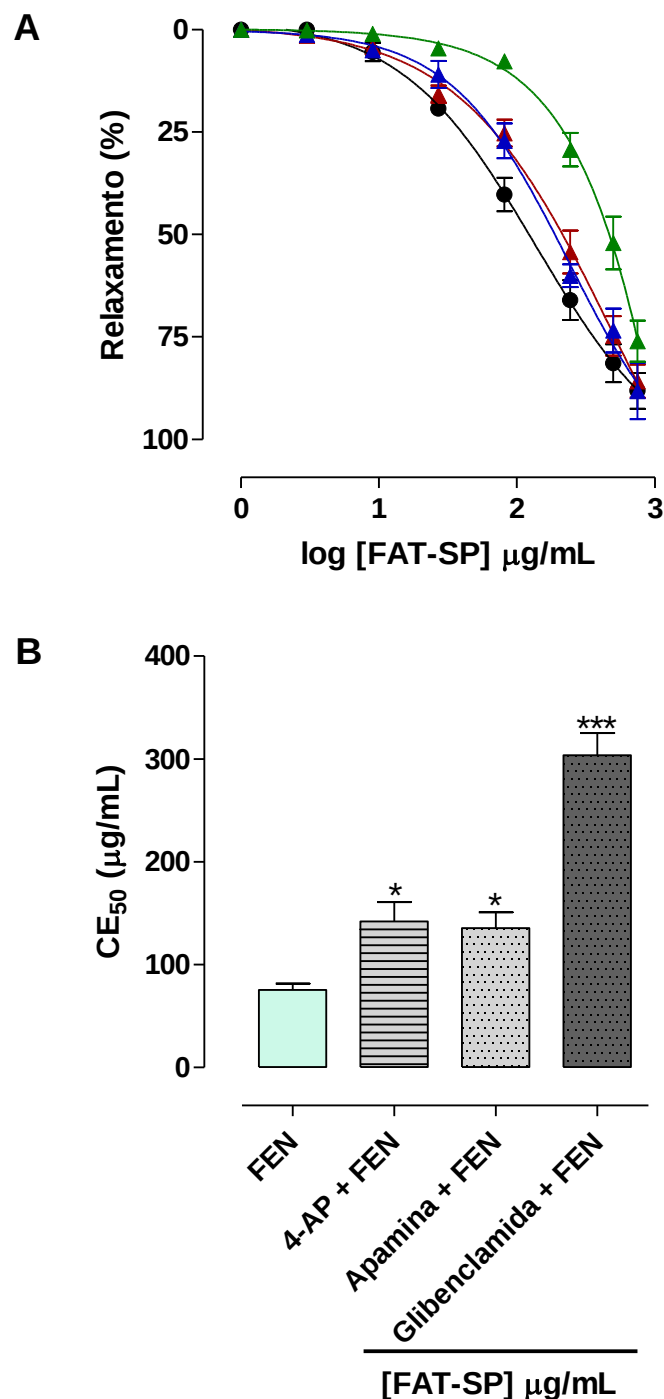
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 3$) (MONTEIRO, 2013).

Figura 16 – Registros típicos representativos do efeito relaxante da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (A) e na presença de 1 mM de 4-AP (B), 5×10^{-8} M de apamina (C) e 10^{-5} M de glibenclamida (D) em aorta de rato com endotélio funcional



As setas para baixo representam a adição cumulativa da FAT-SP nas concentrações de 1, 3, 9, 27, 81, 243, 500 e 750 µg/mL). FEN = fenilefrina, 4-AP = 4-aminopiridina, ACh = acetilcolina e L = lavagem (MONTEIRO, 2013).

Gráfico 17 – Efeito relaxante (A) e valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (B) da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN na ausência (●) e na presença de 1 mM de 4-AP (▲), 5×10^{-8} M de apamina (▲) ou 10^{-5} M de glibenclamida (▲) em aorta de rato com endotélio funcional.

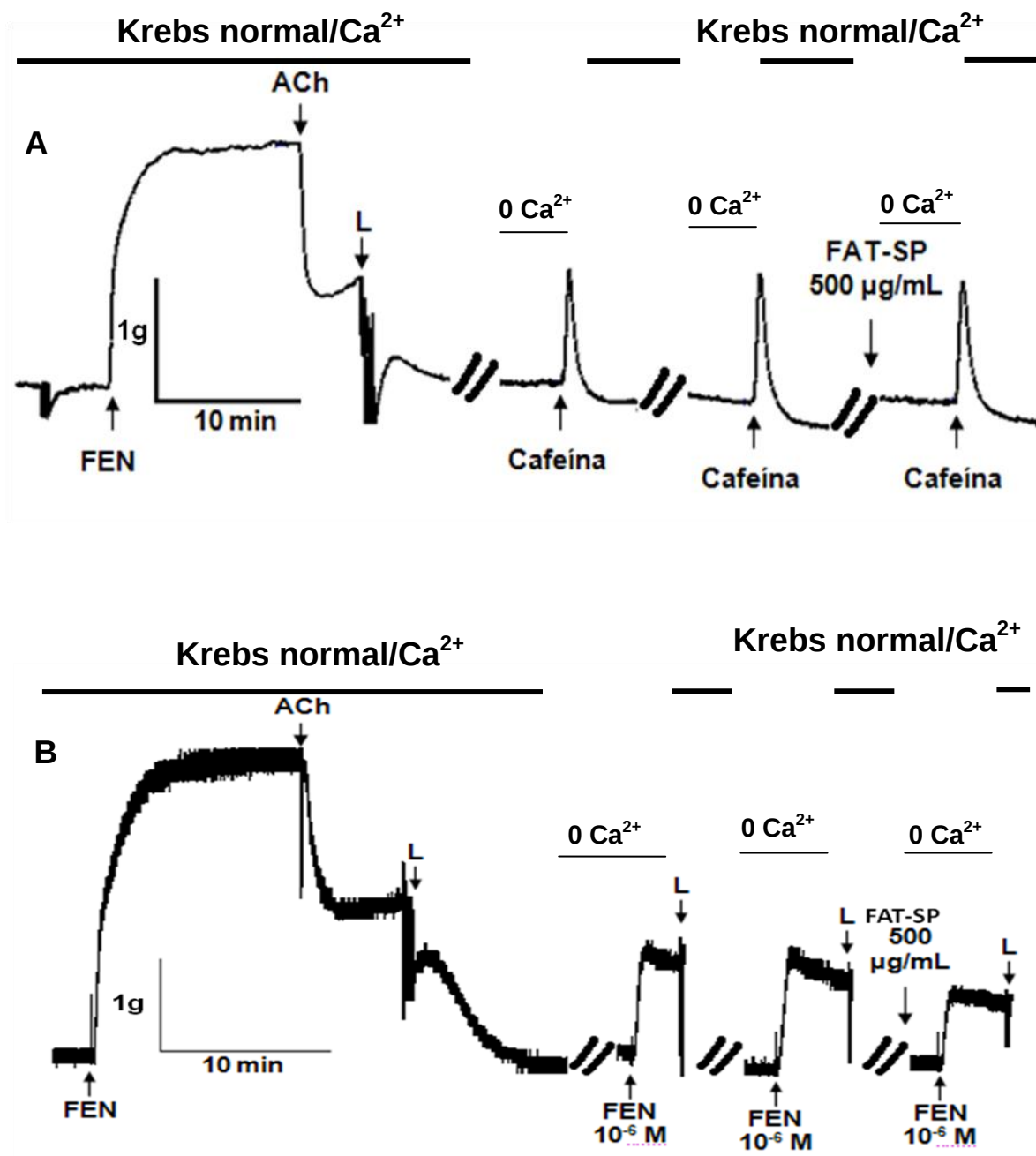


Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). Teste t , não pareado, $*p < 0,05$ (FEN vs. 4-AP + FEN ou apamina + FEN), $***p < 0,001$ (FEN vs glibenclamida + FEN) (MONTEIRO, 2013).

4.3.3 Avaliação da participação da mobilização de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. Efeito da FAT-SP sobre a mobilização de cálcio do retículo sarcoplasmático sensíveis à cafeína à fenilefrina

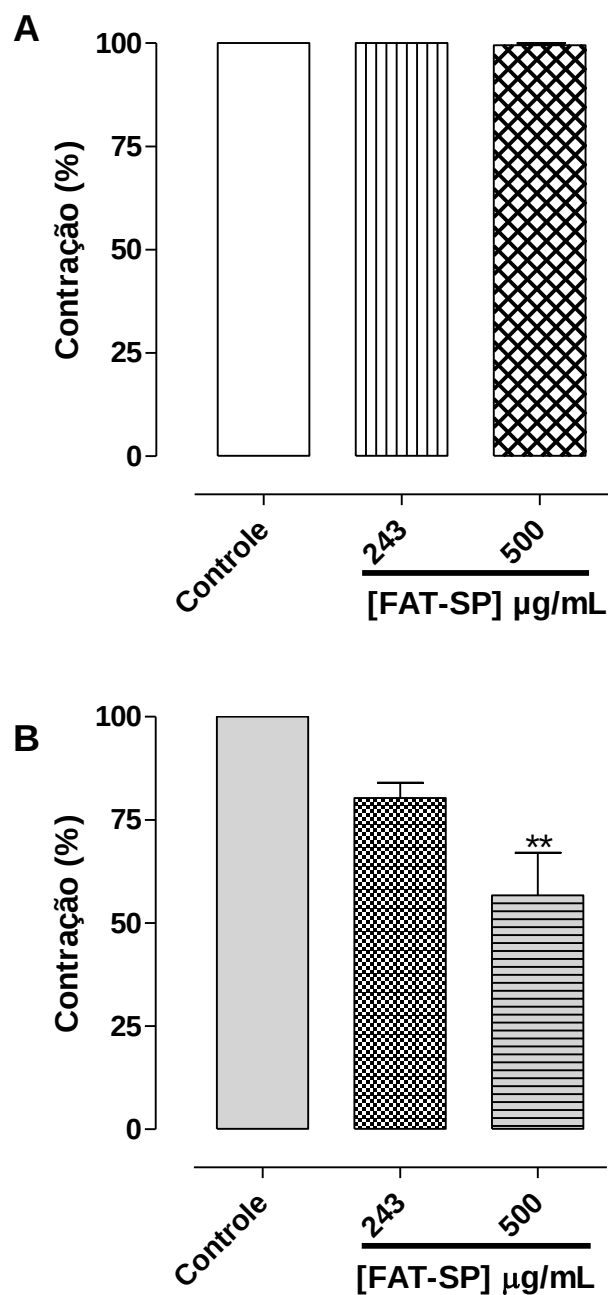
A FAT-SP não apresentou efeito sobre as contrações fásicas induzidas por cafeína (20 mM) (Figura 17A e Gráfico 18A). Entretanto, a FAT-SP na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ inibiu de maneira significativa as contrações fásicas induzidas por FEN (Figura 17B) em meio livre de Ca^{2+} resultante da mobilização de cálcio dos estoques, apresentando efeito inibitório máximo de $38,1 \pm 10,3\%$ (Gráfico 18B).

Figura 17 - Registros típicos representativos do efeito inibitório da FAT-SP frente às contrações fásicas induzidas por cafeína (A) ou por FEN (B) em meio livre de Ca^{2+} em aorta de rato com endotélio funcional



FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem e 0 Ca^{2+} = meio livre de cálcio (MONTEIRO, 2013).

Gráfico 18 - Efeito da FAT-SP frente às contrações fásicas induzidas por 20 mM de cafeína (A) ou 10^{-6} M de FEN (B) em aorta isolada de rato com endotélio funcional.



As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão da média, respectivamente (n = 3). ANOVA "one-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, ** $p < 0,01$ (controle vs. FAT-SP) (MONTEIRO, 2013).

5 Discussão

Dando continuidade ao estudo de investigação do mecanismo de ação pelo qual a fração de alcaloides totais obtida das cascas das raízes de *Solanum paludosum* Moric. (FAT-SP) induz relaxamento em íleo isolado de cobaia e aorta isolada de rato, demonstra-se, pela primeira vez, que a FAT-SP não apresenta atividade citotóxica em miócitos da camada longitudinal do íleo de cobaia, e que, o mecanismo de ação relaxante da FAT-SP envolve modulação positiva da via do NO, bem como dos canais BK_{Ca} e SK_{Ca} naquele órgão. Além disso, em aorta de rato, a ação relaxante da FAT-SP envolve a calmodulina endotelial, a via NO/PKG e os canais K_V , SK_{Ca} e K_{ATP} , sendo mais potente em ativar os K_{ATP} .

Em estudo anterior realizado por Monteiro (2009) foram investigados os efeitos citotóxico em eritrócitos de rato e espasmolítico sobre os músculos lisos isolados (uterino, respiratório, intestinal e vascular) da FAT-SP. Demonstrou-se nesse estudo que a FAT-SP não apresenta atividade hemolítica em eritrócitos de ratos e apresenta efeito espasmolítico não seletivo, sendo mais potente em íleo de cobaia e aorta de rato dependente de endotélio funcional. Ademais, pode-se evidenciar que o efeito espasmolítico da FAT-SP em íleo de cobaia envolvia uma possível ação antimuscarínica e que em aorta de rato tal efeito envolvia a participação da via NO/GC.

Baseado no fato de que a FAT-SP possui em sua composição glicoalcaloides e que vários estudos apontam alguns glicoalcaloides como compostos que podem causar toxicidade em humanos (MORRIS; LEE, 1984), bem como muitos serem citotóxicos, como por exemplo, solamargina de *Solanum incanum* Chinese que possui atividade citotóxica em hepatócitos humanos (Hep3B) e em fibroblastos de pele normal (HSU et al., 1996; KUO et al., 2000), avaliou-se inicialmente o efeito da FAT-SP (750 $\mu\text{g/mL}$) sobre a viabilidade de miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia pelo método do MTT. Esta concentração foi escolhida por ser a maior concentração de FAT-SP utilizada por Monteiro (2009) nos estudos preliminares de investigação de atividade espasmolítica em íleo de cobaia.

Os miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia mantiveram-se viáveis tanto no tempo de 2 quanto no tempo de 24 h de exposição da FAT-SP. Esse resultado sugere a ausência de atividade citotóxica apresentada pela FAT-SP em miócitos da camada longitudinal do íleo de cobaia e é um indício de que o efeito espasmolítico investigado não é consequência da morte das células do tecido

isolado, sendo, portanto seguro prosseguir com a avaliação do mecanismo de ação relaxante da FAT-SP até essa concentração.

Assim, passou-se a investigação do mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em íleo de cobaia. Uma vez que em aorta de rato com endotélio funcional foi evidenciado a participação do NO na ação relaxante da FAT-SP em estudos anteriores (MONTEIRO, 2009), passou-se inicialmente a investigar se a via do NO teria alguma participação no efeito relaxante da FAT-SP em íleo de cobaia.

O NO é um dos principais neurotransmissores inibitórios dos nervos NANC (não adrenérgico, não colinérgico) do sistema nervoso entérico (BENNETT, 1997; IVANCHEVA et al., 1998). Para verificar se a FAT-SP estaria atuando pela via NANC avaliou-se seu efeito sobre o íleo pré-contraído com histamina, na presença simultânea de guanetidina e atropina, bloqueadores da via adrenérgica e dos receptores muscarínicos, respectivamente. Caso fosse evidenciado um relaxamento resistente a estes dois bloqueadores, isto seria indicativo da participação da via nitrérgica no efeito relaxante promovido pela FAT-SP.

A confirmação desta hipótese veio pela observação de que a FAT-SP relaxou o íleo de cobaia mesmo com a inibição das vias adrenérgicas e dos receptores muscarínicos, uma vez que a curva de relaxamento da FAT-SP foi modificada para a esquerda na presença de guanetidina e de atropina, ou seja, houve um aumento na potência relaxante da FAT-SP (Gráfico 2A e B).

Segundo Hebeiss, Kilbinger (1997), o NO inibe a liberação de ACh e a neurotransmissão motora excitatória em íleo isolado de cobaia, portanto, a inibição dos receptores muscarínicos com atropina mais a ação do NO em inibir a via colinérgica, poderia explicar o resultado de potencialização do efeito relaxante da FAT-SP em íleo isolado de cobaia.

Além do NO, estão presentes também no intestino outros fatores relaxantes, como por exemplo, o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), ATP, monóxido de carbono, dentre outros (BENNETT, 1997). Portanto, para confirmar ou descartar a hipótese de que o NO estaria participando da ação relaxante da FAT-SP em íleo isolado de cobaia, decidiu-se investigar o efeito da FAT-SP sobre o íleo pré-contraído por CCh, na ausência e na presença de L-NAME, análogo da L-arginina não hidrolizável pela sintase do NO (NOS) (REES et al., 1990), enzima esta capaz de catalisar a reação química de formação do NO (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000), que está presente na mucosa gastrintestinal, mais precisamente no plexo mioentérico

(LLEWELLYN-SMITH et al., 1992; CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). Além disso, há evidências de que o NO endógeno modula o peristaltismo, limitando a atividade contrátil do músculo circular em íleo isolado de cobaia (SUZUKI, MIZUNO, GOMI, 1994).

Assim, verificou-se que a curva de relaxamento da FAT-SP na presença do L-NAME foi desviada para a direita (Gráfico 3A), com uma potência cerca de 3 vezes menor do que na ausência deste inibidor (Gráfico 3B). Estes dados demonstram que o relaxamento promovido pela FAT-SP em íleo isolado de cobaia envolve a participação do NO.

Em estudos realizados por Santos (2006) com o flavonóide retusin obtido das partes aéreas de *S. paludosum* no Laboratório de Farmacologia Funcional da UFPB/CCS, em íleo isolado de cobaia, chegou-se a mesma conclusão da participação do NO.

A enzima NOS que é inibida pelo L-NAME tem como substrato o aminoácido L-arginina para produção de NO (MONCADA; HIGGS, 1993). O mecanismo pelo qual o L-NAME inibe a NOS é através da competição pelo sítio de ligação da L-arginina na NOS e, por não ser passível de catálise por esta enzima é considerado um falso substrato. Desse modo, foi utilizado a L-arginina para verificar a reversibilidade do efeito inibidor do L-NAME.

Os resultados obtidos mostraram que o efeito inibidor do L-NAME foi revertido na presença da L-arginina, uma vez que, a curva de relaxamento da FAT-SP na presença do L-NAME foi descolada para esquerda não havendo diferença significativa entre a potência relaxante da FAT-SP na ausência do L-NAME em relação a potência relaxante da FAT-SP na presença simultânea da L-arginina mais o L-NAME (Gráficos 3A e B).

Ambos os experimentos realizados com L-NAME e com L-NAME e L-arginina simultaneamente, reforçam a importância da participação do NO no efeito relaxante da FAT-SP em íleo de cobaia.

O NO formado pode promover efeito relaxante através da ativação da GC solúvel, com consequente aumento na concentração intracelular do GMPc (LOHSE et al., 1998), ou pode atuar ativando diretamente os canais de potássio no músculo liso intestinal (VOGALIS, 2000).

Para testar a hipótese de que a ação relaxante da FAT-SP envolveria a participação da GC solúvel, avaliou-se o efeito relaxante da FAT-SP na ausência e

na presença de ODQ, um inibidor da GC solúvel. De acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir que não há a participação da GC solúvel no efeito relaxante da FAT-SP em íleo isolado de cobaia, uma vez que a curva de relaxamento da FAT-SP não foi deslocada para direita de maneira significativa na presença do inibidor seletivo da GC (ODQ) (Gráficos 4A e B). Diante desse fato, passou-se a investigar a participação dos canais de potássio no mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em íleo isolado de cobaia.

Inicialmente, avaliou-se o efeito relaxante da FAT-SP sobre a fase tônica da contração induzida pelo CCh na ausência e na presença de 5 mM de CsCl, que nesta concentração é um bloqueador não seletivo dos canais de potássio. O fato da curva de relaxamento da FAT-SP ter sido desviada para direita de maneira significativa e a potência relaxante ter sido diminuída em cerca de 8 vezes na presença do CsCl (Gráficos 5A e B), sugere que, em nível funcional, a FAT-SP estaria modulando positivamente os canais de potássio para induzir sua ação relaxante em íleo de cobaia.

São poucas as substâncias utilizadas na terapêutica que modulam positivamente os canais de potássio. Substâncias como nicorandil, minoxidil, dentre outras, são ativadores diretos de canais de potássio, mais precisamente os K_{ATP} , sendo empregados na terapêutica cardiovascular (NIELSEN-KUDSK; BOESGAARD; ALDERSHILE; 1996).

Os canais de potássio participam ativamente na formação da atividade elétrica do músculo liso intestinal aproveitando o gradiente de concentração do íon K^+ para gerar fluxo de corrente positiva para fora da célula, pois a concentração do íon K^+ citosólica (~140 mM) é alta em relação ao meio extracelular (~2-5 mM). A abertura dos canais de potássio está associada com a restauração do potencial de membrana e inibição da atividade contrátil. Os principais canais de potássio presentes no músculo liso intestinal são: K_V , BK_{Ca} , SK_{Ca} e K_{ATP} (VOGALIS, 2000).

Como o bloqueador CsCl não é seletivo, com esta ferramenta farmacológica não é possível identificar qual(is) subtipo(s) de canal(is) de K^+ está(ão) envolvido(s) no efeito relaxante da FAT-SP. Com a finalidade de se identificar este(s) canal(is) de K^+ avaliou-se o efeito relaxante da FAT-SP na ausência e na presença de diferentes bloqueadores seletivos de canais de K^+ incubados separadamente em preparações diferentes. Observou-se que os K_{ATP} e os K_V não participam do mecanismo de relaxamento da FAT-SP em íleo de cobaia, pois a curva controle de relaxamento da

FAT-SP não foi desviada para direita de maneira significativa na presença de glibenclamida (bloqueador dos K_{ATP}) ou 4-AP (bloqueador dos K_V) (Gráficos 6A e B). Por outro lado, pode-se constatar que os canais de potássio envolvidos no efeito relaxante da FAT-SP são os BK_{Ca} e os SK_{Ca} , como pode ser constatado pelo desvio da curva controle de relaxamento da FAT-SP para a direita de maneira significativa (Gráfico 7A) e pela redução da potência relaxante em cerca de 2 vezes (Gráfico 7B).

Alguns autores apresentam evidências da participação de vários canais de potássio na regulação do músculo liso, como por exemplo: BK_{Ca} em íleo de cobaia (SILVA; NOUAILHETAS; ABOULAFIA, 1999; CAVALCANTE, 2001; CAVALCANTE, 2008; LIMA, 2008), músculo longitudinal de íleo de cobaia (UYAMA; IMAIZUMI; WATANABE, 1993), traqueia de cobaia (HIRAMATSU et al., 1994), artéria mesentérica de rato (OLIVEIRA et al., 2004), traqueia de cão (WADE; SIMS, 1993), traqueia de porco (KUME et al., 1994; KANNAN; JOHNSON, 1995; YAMAKAGE; HIRSHMAN; CROXTON, 1996), útero de rata (LIMA, 2008), aorta de coelho (DEMIREL et al., 1994), artérias submucosas e mesentéricas de cobaia (HILL et al., 1997) e no miométrio humano (ANWER et al., 1993; MEERA et al., 1995). SK_{Ca} em íleo de cobaia (CAVALCANTE, 2008), útero de rata (SILVA; OKUYAMA; PAIVA, 1996) e em aorta de rato (SILVA et al., 1994).

Uma vez demonstrado que no mecanismo de ação relaxante da FAT-SP há a participação da via do NO e dos canais de potássio, mais precisamente os BK_{Ca} e SK_{Ca} em íleo isolado de cobaia, prossegui-se à investigação do mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em aorta isolada de rato. Neste órgão, Monteiro (2009), demonstrou que em nível funcional não há a participação da prostaciclina (PGI_2) oriunda da ciclooxygenase no mecanismo de ação espasmolítica da fração e que a fração não está interagindo com os receptores muscarínicos endoteliais para aumentar a $[Ca^{+2}]_c$ e subsequentemente ativar a eNOS e promover o relaxamento. No entanto observou-se que o efeito relaxante da FAT-SP foi atenuado na presença de 10^{-5} M de L-NAME, indicando assim a participação da eNOS no efeito relaxante da FAT-SP.

O fato da potência relaxante da FAT-SP ter sido reduzida em cerca de 2 vezes na presença de um sequestrador de NO (hidroxycobalamina) em relação a potência relaxante da FAT-SP na presença de 10^{-5} M de L-NAME nos estudos realizados por Monteiro (2009), suscitou a ideia de ainda esta havendo produção de NO mesmo na presença do inibidor da eNOS em aorta de rato.

Para resolver essa problemática foram realizados experimentos com a aorta de rato pré-contráida com 3×10^{-7} M de FEN na ausência e na presença de 10^{-4} ou 3×10^{-4} M de L-NAME (SANTOS, 2005). Os resultados mostraram que na concentração de 10^{-4} M de L-NAME (Gráfico 8A e B) ocorreu a maior redução na potência relaxante da FAT-SP. Além disso, a potência relaxante da FAT-SP na presença de 10^{-4} M de L-NAME foi comparada com a potência relaxante da FAT-SP na presença de hidroxicobalamina (MONTEIRO, 2009) e não se verificou diferença significativa, corroborando assim com a hipótese de que estaria havendo produção de NO mesmo na presença de 10^{-5} M de L-NAME em aorta isolada de rato.

A reversibilidade do efeito inibidor do L-NAME pode ser comprovada pela incubação simultânea do L-NAME mais L-arginina. Os resultados obtidos mostraram que a L-arginina reverteu o efeito inibidor do L-NAME em aorta de rato, uma vez que, não houve diferença significativa entre a potência relaxante da FAT-SP na ausência do L-NAME em relação à potência relaxante da FAT-SP na presença simultânea da L-arginina mais o L-NAME (Gráfico 9A e B).

Em estudos realizados por Santos (2005) com o alcaloide vasicina em artéria mesentérica isolada de rato foi possível verificar a reversão com L-arginina do efeito inibidor do L-NAME, sendo um forte indicativo do envolvimento da via L-arginina/NO. Este mesmo autor mostrou que experimentos com L-arginina não produz qualquer efeito sobre as respostas induzidas por vasicina, quando a NOS não está inibida.

A enzima eNOS, importante para a produção de NO, pode ser ativada pelo aumento de Ca^{2+} através da ativação da enzima calmodulina (CaM). A ligação de 4 íons Ca^{2+} a CaM proporciona uma mudança conformacional nesta proteína e o complexo $[(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}]$ liga-se a eNOS ativando-a, favorecendo que esta enzima possa catalisar a reação de conversão da L-arginina a L-citrulina e NO (FENG, 2012).

Pelo que foi exposto, observa-se que a CaM é um dos passos muito importante para que ocorra o relaxamento da aorta de rato. Portanto, realizou-se experimentos utilizando o calmidazolium na concentração de 10^{-5} M, que se liga diretamente a CaM endotelial inibindo-a (SCHINI; VANHOUTTE, 1992; ILLIANO; NAGAO; VANHOUTTE, 1992). Os resultados mostraram que o efeito relaxante da FAT-SP na presença do calmidazolium foi atenuado, com diminuição da potência relaxante (cerca de 5 vezes) e redução do seu E_{max} (Gráficos 10A e B), sugerindo que há participação da CaM endotelial no efeito relaxante da FAT-SP.

Outros estudos realizados por Monteiro (2009) demonstraram que a FAT-SP relaxou a aorta de rato através da ativação da GC solúvel. De acordo com a literatura, o NO formado pode promover efeito relaxante através da ativação da GC solúvel, com consequente aumento na concentração intracelular do GMPc (LOHSE et al., 1998). O GMPc pode ativar a proteína cinase G (PKG) responsável pela fosforilação de vários alvos proteicos para favorecer o relaxamento do músculo liso (SURKS, 2007).

Passou-se, portanto, a avaliar se a via de transdução “downstream” à eNOS estaria participando do efeito relaxante da FAT-SP em aorta de rato. Para tanto, foram realizados experimentos para verificar a participação da PKG no efeito relaxante da FAT-SP. Como o efeito relaxante da FAT-SP foi atenuado e teve sua potência relaxante reduzida em cerca de 3 vezes na presença do Rp-8-Br-PET-cGMPS (Gráficos 11A e B), inibidor seletivo da PKG, pode-se confirmar, em nível funcional, a participação desta cinase no mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em aorta de rato.

As PKGs fazem parte de uma família de serina/treonina cinases, pois fosforilam seus alvos proteicos nestes resíduos de aminoácidos e compartilham características estruturais comuns. Essas cinases são compostas por três domínios funcionais comuns: um domínio N-terminal (**A**), um domínio regulatório (**B**) e um domínio catalítico (**C**). A ligação do GMPc para ambos os sítios no domínio regulatório induz uma alteração conformacional que liberta a inibição do centro catalítico pelo N-terminal e permite a fosforilação de substratos proteicos. O domínio catalítico contém um sítio de ligação para o ATP sendo então possível catalisar a transferência de um grupo fosfato do ATP para os resíduos de serina/treonina para a proteína alvo. A PKGI- α e β são as isoformas que estão presentes em alta concentração ($> 0,1 \mu\text{M}$) em músculo liso (HOFMANN et al., 2006).

Dois dos substratos proteicos que a PKG pode fosforilar que estão presentes no músculo liso vascular são, por exemplo, os canais de potássio e os Ca_v . A fosforilação dos canais de potássio favorece a sua ativação, enquanto que para os Ca_v , leva ao seu bloqueio. Além disso, muitos dados da literatura indicam que o NO pode ativar diretamente canais de potássio no músculo liso (BOLOTINA et al., 1994; PLANE et al., 1996; WALDRON; COLE, 1999; HOMER; WANSTALL, 2000). A ativação de canais de potássio leva a hiperpolarização da membrana plasmática e

consequente bloqueio dos Ca_v , que podem ser bloqueados pela fosforilação dos resíduos de serina/treonina como já mencionado anteriormente.

Um protocolo experimental simples de ser executado e que se baseia nas propriedades eletroquímicas da membrana celular é através do aumento moderado na concentração extracelular de K^+ , que reduz o efluxo desse íon e promove uma pequena despolarização na célula muscular suficiente para promover abertura de Ca_v ; e através do aumento elevado na concentração extracelular de K^+ , que reduz de maneira mais intensa o efluxo desse íon e promove uma grande despolarização, suficiente para abrir uma quantidade maior de Ca_v (GURNEY, 1994).

Dessa forma, substâncias ativadoras de canais de potássio são mais eficientes em promover efeito relaxante 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 seu efeito quando vários canais de Ca^{2+} se encontram abertos, ou seja, no experimento com elevadas concentrações extracelulares de K^+ (RAEBURN; GIEMBYCZ, 1995; GURNEY, 1994).

Com o intuito de verificar se o efeito relaxante da FAT-SP sobre a aorta isolada de rato, poderia envolver o bloqueio direto dos Ca_v ou indireto desses canais através da ativação dos canais de potássio, avaliou-se o efeito da FAT-SP sobre a contração tônica induzida por aumento moderado na concentração extracelular de K^+ com soluções de 30 mM de KCl ou elevado aumento na concentração extracelular de K^+ com soluções de 80 mM de KCl. Analisando os resultados, pode-se observar que o efeito relaxante da FAT-SP foi praticamente abolido na presença de altas concentrações de K^+ (KCl 80 mM), mas não em baixas concentrações de K^+ (KCl 30 mM) (Gráficos 12A e B), configurando-se assim uma substância ativadora de canais de potássio, pois o efeito relaxante da FAT-SP foi mais efetivo em promover efeito quando o aumento na concentração extracelular de K^+ foi moderado.

Quando as preparações sem endotélio funcional foram incubadas com 30 mM de KCl a curva de relaxante da FAT-SP foi significativamente atenuada em cerca de 4 vezes quando comparada com as preparações com endotélio na presença de 30 mM de KCl (Gráficos 13A e 12A). Além disso, as preparações pré-contraídas com 80 mM de KCl sem endotélio funcional não apresentaram efeito relaxante (Gráfico

13A e B). Com isso, pode-se levantar a hipótese de que a presença do endotélio vascular é importante para a abertura dos canais de potássio.

Para comprovar se a FAT-SP estaria modulando positivamente os canais de potássio, utilizou-se como ferramenta farmacológica o bloqueador não seletivo desses canais, o íon tetraetilamônio (TEA^+) na concentração de 10 mM (NIU et al., 2008) em preparações com endotélio funcional. Uma vez que, a curva de relaxamento da FAT-SP (controle) foi deslocada para a direita e sua potência relaxante foi reduzida em cerca de 3 vezes (Gráficos 14A e B), confirmou-se assim a participação dos canais de potássio no efeito relaxante da FAT-SP em aorta isolada de rato. Além disso, nos experimentos com a aorta sem o endotélio, pode-se observar que o efeito relaxante da FAT-SP foi atenuado na presença de 10 mM de TEA^+ (Gráfico 15A) assim como sua potência relaxante que foi reduzida em torno de 2 vezes (Gráfico 15B), sugerindo que a FAT-SP pode estar ativando diretamente canais de potássio, porém, com uma participação maior através da via NO/GMPc/PKG, visto que a potência relaxante da FAT-SP na presença de TEA^+ nos anéis com endotélio foi bastante reduzida quando comparado na presença de TEA^+ nos anéis sem endotélio funcional.

Os canais de potássio estão 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 potássio, 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 de canais de potássio no efeito relaxante da FAT-SP, surgiu a necessidade de investigar qual(is) o(s) tipo(s) de canal(is) de K^+ participa(m) do mecanismo de ação dessa fração de alcaloides, para isso utilizou-se bloqueadores seletivos desses canais.

Como não houve alteração da curva controle nem da potência relaxante da FAT-SP na presença de TEA^+ e BaCl_2 (Gráfico 16A e B) descarta-se assim a participação dos BK_{Ca} e K_{IR} , respectivamente, no efeito relaxante da FAT-SP em nível funcional em aorta de rato. Por outro lado, o fato da curva de relaxamento controle da FAT-SP ter sido desviada para a direita e sua potência ter sido reduzida em torno de 2 vezes na presença dos bloqueadores 4-AP e apamina, e por cerca de 4 vezes na presença de glibenclamida (gráficos 17A e B), confirma, em nível

funcional, a participação dos K_V , SK_{Ca} e K_{ATP} , respectivamente, no efeito relaxante da FAT-SP em aorta de rato. Observou-se um maior desvio da curva controle da FAT-SP e uma maior redução da sua potência relaxante (cerca de 4 vezes) quando os anéis de aorta de rato estavam na presença de glibenclamida, demonstrando que algum(ns) componente(s) da FAT-SP é(são) mais seletivo(s) para ativação dos K_{ATP} . Estes resultados diferem do que foi observado em íleo de cobaia, onde não há a participação dos K_{ATP} , demonstrando aqui uma seletividade para os K_{ATP} dos vasos.

Os canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) são complexos proteicos que existem na forma de octômeros contendo dois tipos distintos de subunidades proteicas. Os canais consistem de quatro subunidades dos canais de potássio retificadores de entrada (K_{ir}), K_{ir} 6.1 ou K_{ir} 6.2, onde cada subunidade está associada com uma porção regulatória que é um receptor para sulfonilureia (SUR) (BABENKO; AGUILAR-BRYAN; BRYAN, 1998). A diversidade molecular dos K_{ATP} através dos diversos tecidos e espécies são decorrentes da presença de múltiplas isoformas do SUR (SUR1, SUR2A, SUR2B). A combinação $K_{IR}6.2/SUR2B$ é a mais prevalente em músculo liso vascular, enquanto que no intestino, prevalece a combinação $K_{IR}6.2/SUR2A$ (BRAYDEN, 2002; VOGALIS, 2000), o que pode explicar porque a FAT-SP agiu sobre os K_{ATP} da aorta de rato e não sobre o K_{ATP} do íleo de cobaia.

De acordo com os estudos de Murphy e Brayden (1995) o NO hiperpolariza as células do músculo liso de artéria mesentérica através da ativação dos K_{ATP} , sendo a acumulação de GMPc como uma etapa intermediária. Com isto, pode-se levantar a hipótese de que a FAT-SP possa estar modulando positivamente os K_{ATP} através da ativação da via de sinalização do NO.

Como já mencionado, os canais de potássio são um dos alvos para a PKG, e no músculo liso existem duas isoformas, a PKG I- α e a β . Além dos canais de potássio, outro alvo para a PKG é a inibição da liberação do Ca^{2+} intracelular do retículo sarcoplasmático (RS). A PKG I- α inibe a liberação de Ca^{2+} dos estoques através da ativação da RGS2 (regulador da PKG I- α da sinalização da proteína G) que por sua vez, inibe a $G_{\alpha q}$, impedindo a formação do IP_3 . Por outro lado, a PKG I- β inibe a liberação do Ca^{2+} do RS através da ativação do IRAG (substrato da PKG I- β associado ao receptor de IP_3), o qual inibe diretamente a liberação de Ca^{2+} pelo receptor de IP_3 (SURKS, 2007).

De acordo com essas informações, investigou-se a possibilidade do efeito relaxante da FAT-SP estar associado à inibição da mobilização de Ca^{2+} do RS mediado pelo receptor de IP_3 (IP_3R) que é ativado por IP_3 e pelo receptor de rianodina (RyR), uma vez que é ativado pelo próprio Ca^{2+} liberado pelo receptor de IP_3 ou por cafeína (SAMMELS et al., 2010).

Sabendo que a fenilefrina (FEN) é um agonista seletivo α_1 adrenérgico que pode ser utilizada como ferramenta farmacológica para se obter a formação de IP_3 no músculo liso vascular e que a cafeína é uma xantina solúvel na membrana plasmática que pode ativar diretamente os RyR, favorecendo a mobilização de Ca^{2+} do RS, resolveu-se avaliar se a FAT-SP estaria inibindo essa mobilização de Ca^{2+} (JI; BENISHIN; PANG, 1998).

Para tanto avaliou-se o efeito da FAT-SP frente as contrações fásicas induzidas pela cafeína ou pela FEN em aorta de rato, em meio livre de cálcio. Os ensaios realizados demonstram que a FAT-SP não apresentou efeito sobre as contrações fásicas induzidas por cafeína (20 mM) (Figura 17A e gráfico 18A), portanto, não inibiu a mobilização de Ca^{2+} dos estoques sensíveis à cafeína. Por outro lado, a FAT-SP inibiu de maneira parcial a mobilização de Ca^{2+} dos estoques sensíveis à FEN (Gráfico 18B).

Em termos de importância terapêutica, o NO tem sido considerado recentemente um importante regulador da função intestinal e vascular por controlar a motilidade gástrica e o tônus dos vasos sanguíneos (POOLE; FURNESS, 2012; LOOFT-WILSON et al., 2012). Além disso, há um grande interesse no potencial terapêutico de substâncias que modulem positivamente os canais de potássio, uma vez que, há poucas substâncias ativadoras desses canais (BADAWI; KIRSCHNER-HERMANN; DING, 2012).

Portanto, foi possível demonstrar pela primeira vez que a FAT-SP não apresenta efeito citotóxico em miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia, e o mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em íleo de cobaia envolve a via do óxido nítrico e a modulação positiva dos canais BK_{Ca} e os SK_{Ca} . Além disso, em aorta de rato, o efeito relaxante da FAT-SP envolve a calmodulina endotelial, a via NO/PKG e os canais K_V , SK_{Ca} e K_{ATP} , sendo mais potente em ativar os K_{ATP} .

Esses dados tomados em conjunto, através dos experimentos em nível funcional, reforçam, portanto, a importância da ativação da via do NO e a modulação positiva de canais de potássio para explicar o mecanismo relaxante da FAT-SP em

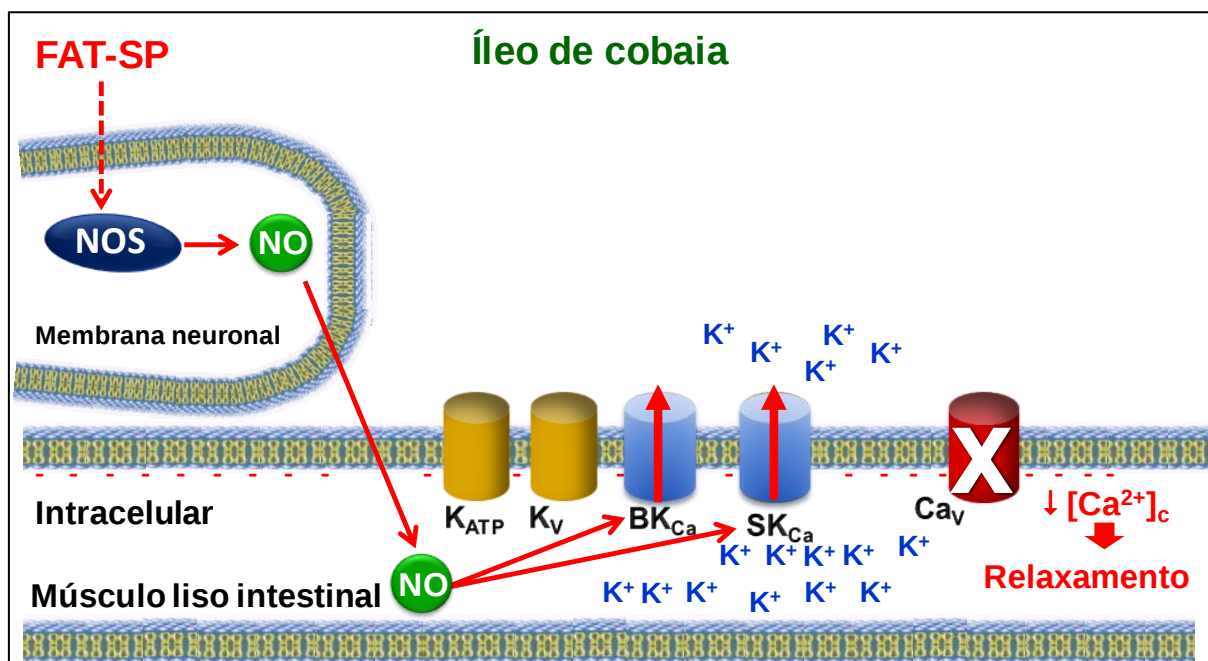
íleo isolado de cobaia e em aorta isolada de rato. Ademais, como as cascas das raízes de *Solanum paludosum* (jurubeba-brava) são utilizadas frequentemente como sucedânea de *Solanum paniculatum* (jurubeba verdadeira), na medicina popular para o tratamento de hipertensão e para desordem gastrintestinal, devido à semelhança entre as espécies (RIBEIRO et al., 1986), este trabalho tem grande importância para respaldar cientificamente seu uso na medicina popular.

6 Conclusões

Neste trabalho de avaliação da atividade citotóxica e relaxante da fração de alcaloides totais obtida da casca da raiz de *Solanum paludosum* Moric (FAT-SP) visando elucidar o mecanismo de ação relaxante desta em íleo isolado de cobaia e aorta isolada de rato, pode-se concluir que:

- A FAT-SP não apresenta atividade citotóxica em miócitos da camada longitudinal do íleo de cobaia na concentração máxima testada
- O mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em íleo de cobaia envolve:
 - ✓ a via NANC, sendo o NO o possível neurotransmissor envolvido, porém sem a participação da GC solúvel
 - ✓ modulação positiva dos canais de K^+ , particularmente dos BK_{Ca} e dos SK_{Ca} , mas não dos K_{ATP} e K_V ;
- O mecanismo de ação relaxante da FAT-SP em aorta de rato envolve:
 - ✓ modulação positiva da via de sinalização NO/GMPc/PKG, porém, sem a participação da mobilização de cálcio do retículo sarcoplasmático
 - ✓ participação da calmodulina endotelial
 - ✓ modulação positiva dos K_V , SK_{Ca} e K_{ATP} , mas não dos BK_{Ca} e K_{IR}
 - ✓ maior seletividade para os K_{ATP}

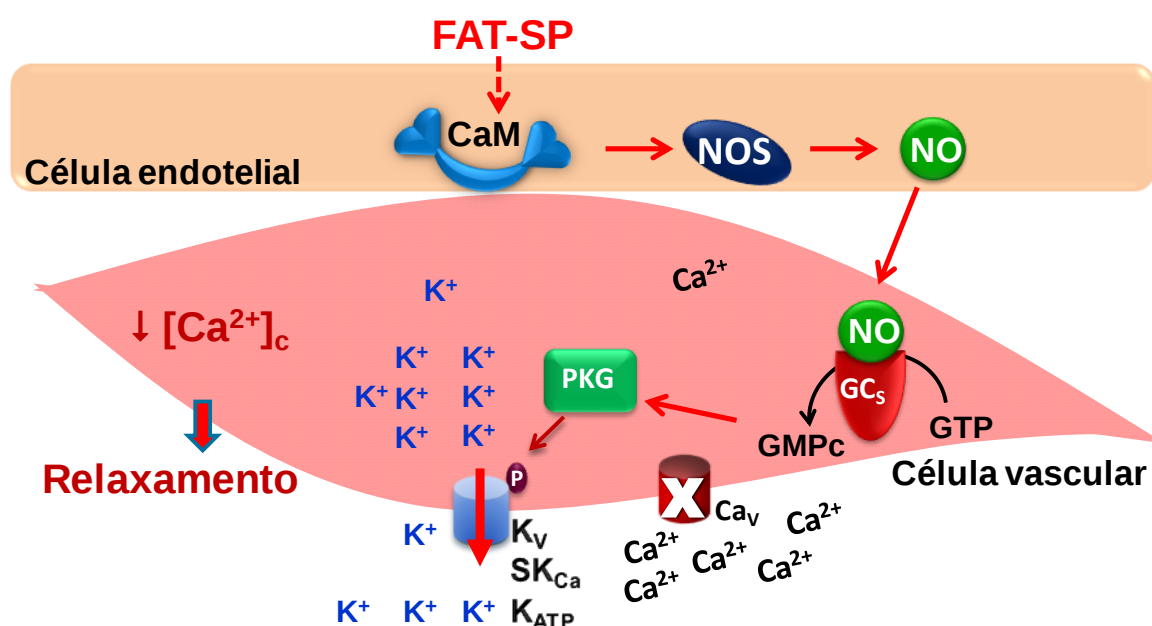
Figura 18 – Proposta de mecanismo de ação relaxante para a FAT-SP em íleo isolado de cobaia



A FAT-SP, de alguma forma, modula positivamente a NOS favorecendo que esta enzima possa catalisar a reação de conversão da L-arginina a L-citrulina e NO. O NO, por sua vez, pode ativar diretamente os canais de potássio (**BK_{Ca}** e **SK_{Ca}**), levando a uma hiperpolarização do músculo liso intestinal que irá fechar os canais **Ca_v**, com consequente relaxamento do músculo liso do íleo de cobaia (MONTEIRO, 2013).

Figura 19 – Proposta de mecanismo de ação relaxante para a FAT-SP em aorta isolada de rato

Aorta de rato



A FAT-SP de alguma forma modula positivamente a CaM endotelial para ativar a eNOS favorecendo que esta enzima possa catalisar a reação de conversão da L-arginina a L-citrulina e NO. O NO, por sua vez, pode ativar a GC solúvel que irá catalisar a reação de conversão do GTP em GMPc, o qual ativa a PKG. Esta cinase pode fosforilar os canais de potássio (K_v, SK_{Ca} e K_{ATP}) levando a uma hiperpolarização do músculo liso vascular que irá fechar os canais Ca_v, com consequente relaxamento do músculo liso da aorta de rato (MONTEIRO, 2013).

Referências

ABEBE, W. A survey of prescriptions used in traditional medicine in gondar region, northwestern ethiopia: general pharmaceutical Practice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 18, p. 147-165, 1986.

ABRAHAM, Z.; BHAKUNI, S. D.; GARG, H. S.; GOEL, A. K.; MEHROTRA, B. N.; PATNAIK, G. K. Screening of Indian plants for biological activity. Part XII. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 24, p. 48 - 68, 1986.

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.

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

AGRA, M. F. Revisão taxonômica de *Solanum* sect. *Erythrotrichum* Child (Solanaceae). 2000. **Tese (Doutorado)**. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo.

AGRA, M.F.; BHATTACHARYYA, J.. Ethnomedicinal and phytochemical investigation on the *Solanum* species in the Northeast of Brazil. In: NEE, M.; SYMON, D.E.; LESTER, R.N.; JESSOP, J.P. (Editors). **Solanaceae IV**, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 341-343, 1999.

AGRA, M. F. Sinopse taxonômica de *Solanum* Sect. *Erythrotrichum* (Solanaceae). In: VIII Congresso Latinoamericano y II Colombiano de Botánica, 2004, Bogotá. **Anais**. p. 192-211, 2004.

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

AGRA, M. F.; NURIT-SILVA, K.; BERGER, L. R. Flora da Paraíba, Brasil: *Solanum* L. (Solanaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23 (3), São Paulo, 2009.

AGRA, M. F.; NURIT-SILVA, K.; BASÍLIO, I. J.L.D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 472-508, 2008.

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

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

ALMEIDA, E. R.; SANTOS, E. R.; BARRETO LINS, C. F.; MELLO, A. C.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. The presence of acetylcholine in fruits of *Solanum melongena* L. **Revista do Instituto da Universidade Federal de Pernambuco, Recife** 22 ½, 1985.

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

ANWER, K.; OBERTI, C.; PEREZ, G.J.; PEREZ-REYES, N.; McDOUGALL, J.K.; MONGA, M.; SANBORN, B.M.; STEFANI, E.; TORO, L. Calcium-activated K⁺ channels as modulators of human myometrial contractile activity. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 4, p. C976-C985, 1993.

ATAÍDE, J. R. **Atividade farmacológica dos extratos da jurubeba roxa, *Solanum paludosum* Moric.** João Pessoa. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1982.

BABENKO, A. P.; AGUILAR-BRYAN, L.; BRYAN, J. A view of sur/K_{IR}6.X, K_{ATP} channels. **Annual Review of Physiology**, v. 60, p. 667-687, 1998.

BADAWI, J. K.; KIRSCHNER-HERMANN, R.; DING, A. Inhibitory effects of the ATP-sensitive potassium channel openers cromakalim, pinacidil and minoxidil on the carbachol-response curve in porcine detrusor muscle. **Arab Journal of Urology**, v. 10, p. 207-215, 2012.

BALICK, M. J.; COX, P. A. Plants, People and Culture: the Science of Ethnobotany. Scientific American Library, New York, **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 428–429, 1997.

BARBOSA-FILHO, J.M. ; AGRA, M. F. ; OLIVEIRA, R. A. G. ; PAULO, M. Q.; TROLING, G. ; CUNHA, E. V. L. ; ATAÍDE, J. R. ; BHATTACHARYYA, J. Chemical and pharmacological investigation of *Solanum* species of Brazil - a search for solasodine and other potentially useful therapeutic agents. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, BRASIL**, v. 86, p. 189-191, 1991.

BASÍLIO, I. J. L. D.; AGRA, M. F.; BHATTACHARYYA, J. Estudo farmacobotânico de folhas de *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 651-653, 2007.

BASÍLIO, I. J. L. D. Estudo farmacobotânico de órgãos vegetativos e fitoquímico dos alcaloides da casca de raízes de *Solanum paludosum* Moric. (SOLANACEAE). **Dissertação (Mestrado)**. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

- BENNETT, M. R. Non-Adrenergic Non-Cholinergic (NANC) Transmission to Smooth Muscle: 35 Years on. **Progress in Neurobiology**, v. 52, p. 159-195, 1997.
- BHAKUNI, O. S.; DHAR, M. L.; DHAR, M. M.; DHAWAN, B. N.; MEHROTRA, B. N. Screening of Indian plants for biological activity. Part II. Indian **Journal of Biology**, v. 7, p. 250 - 262, 1969.
- BHATTACHARYYA, J. Isolation of solasodine from the fruits of *Solanum asperum* and *Solanum paludosum*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 6, p. 1059-1060, 1984.
- BHATTACHARYYA, J., BASILIO, I. J. L. D., MORAIS, L. C. S. L., AGRA, M. F., MAJETICH, G., . Alkaloids of the root-bark of *Solanum paludosum* Moric. **Biochemical Systematics and Ecology** 37, 228–229, 2009.
- BLAUSTEIN, M. P. Sodium/Calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Current Topics in Membranes and Transport**, p. 289 - 330, 1989.
- BOHS, L. Major clades in *Solanum* based on ndhF sequence data. In: A Festschrift for William G. D'Arcy. **Missouri Botanical Garden**. Saint Louis, p. 27-49, 2007.
- BOLOTINA, V., NAJIBI, S., PALACINO, J.J., PAGANO, P.J., COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850–853, 1994.
- BOYD, L. J. Pharmacology of the homeopathic drugs. **Journal American of Institute of Homeopathy**, v. 21, p. 209, 1928.
- BONAVENTURA, D.; LIMA, R. G.; VERCESI, J. A.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 215–222, 2007.
- BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRAA, P.; GRAEL, C. F. F.; SANTOSD, A. C. P.; MONTE-MÓRE, R. L. M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120 p. 141–148, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAYDEN, J. E. Functional Roles Of KATP Channels In Vascular Smooth Muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 4, p. 312-316, 2002.
- BROZOVICH, F. V. Rho Signaling: Agonist Stimulation and Depolarization Come Together. **Journal of the American Heart Association**, v. 93, p. 481-483, 2003.

BROWN, J. H.; TAYLOR, P. Muscarinic receptor agonists and antagonists. In: BRONTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Org.). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11. ed. USA: Mc Graw Hill, cap. 7, p. 183-200, 2006.

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

CARVALHO, L. A. F.; COSTA, L. H. P.; DUARTE, A. C. Diversidade taxonômica e distribuição geográfica das solanáceas que ocorrem no Sudeste Brasileiro (*Acnistus*, *Athenaea*, *Aureliana*, *Brunfelsia* e *Cyphomandra*). **Revista Brasileira de Geografia**, v. 58, p. 95-110, 2001.

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

CAVALCANTE, F. A. Mecanismo de ação espasmolítica de solavetivona, sesquiterpeno isolado das partes aéreas de *Solanum jabrense* Agra & Nee (SOLANACEAE). 2001. **Dissertação (Mestrado)** – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2001.

CAVALCANTE, F. A. Investigação dos efeitos citotóxico e espasmolítico do lapachol e de seus derivados naturais e sintéticos: relação estrutura-atividade e mecanismo de ação. 2008. **Tese (Doutorado)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

CECCHI, X.; WOLFF, D.; ALVAREZ, O.; LATORRE, R. Mechanisms of Cs^+ blockade in a Ca^{2+} -activated K^+ channel from smooth muscle. **Biophysical Journal**, v. 52, p. 707-716, 1987.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B., Óxido Nítrico: revisão. **Acta Cirurgica Brasileira**. v.17, n. 6, p. 417-423, 2002.

CHAH, K. F.; MUKO, K. N.; OBOEGBULEM, S. I. Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit. **Fitoterapia**, v. 71, p. 187-189, 2000.

CHAM, B.E. Solasodine glycosides as anti-cancer agents: preclinical and clinical studies. **Asia Pacific Journal of Pharmacology**, v. 9, p. 113-118, 1994.

CHATAING, B.; CONCEPCION, J.L.; DE CRISTANCHO, N.B.; USUBILLAGA, A.. Estudio clinico de la efectividad de extractos alcaloides obtenidos de los frutos *Solanum americanum* Miller soberel *Herpes simplex*, *Herpes zoster*, and *Herpes genitalis*. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica**, v. 32, p. 18-25, 1999.

CHEN, G. P.; Ye, Y.; Li, L.; Yang, Y.; Qian, A. B.; Shen-Jiang Hu, S. J. Endothelium-independent vasorelaxant effect of sodium ferulate on rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 84, p. 81–88, 2009.

CLAUDINO, F. S. Atividade espasmolítica de extratos obtidos de *Solanum jabrense* Agra e Nee (SOLANACEAE). **Dissertação (Mestrado)** – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2003.

CORREIA, A. C. C. **Efeito comparativo entre os extratos obtidos das partes aéreas e dos frutos de *Solanum asperum* rich. (solanaceae) em músculo liso.** 2007. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

CORREIA, A. C. C.; MONTEIRO, F. S.; MACEDO, C. L.; BASILIO, I. J. L. D.; Pessoa, H. L. F.; AGRA, M. F.; CAVALCANTE, F. A.; SILVA, B. A. Investigation of hemolytic and spasmolytic activities of total alkaloids fraction from root bark of *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae). In: F. Riet-Correa, J. Pfister, A.L. Schild, and T.L. Wierenga (eds.). **Poisoning by Plants, Mycotoxins, and Related Toxins.** © CAB International 2011.

COSTA, V. C. O. **Investigação da Atividade Espasmolítica de *Solanum asperum* Rich. e *Solanum paludosum* Moric.: um estudo comparativo.** 2006. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

DELPORTE, C.; BACKHOUSE, N.; NEGRETE, R.; SALINAS, P.; RIVAS, P.; CASSELS, B.K.; SAN FELICIANO, A. Antipyretic, hypothermic and antiinflammatory activities and metabolites from *Solanum ligustrinum* Lood. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 118-122, 1998.

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.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival – modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DUARTE, M. C.; SILVA, J. L. V.; CAVALCANTE, F. A.; RIBEIRO, L. A. A.; SILVA, T. M. S.; SILVA, B. A. Papel dos canais de Ca^{2+} e K^{+} na ação relaxante da fase acetato de etila de *Solanum paludosum* Moric. (SOLANACEAE). In: Encontro de Iniciação Científica da UFPB, 9., 2003, João Pessoa. **CD-ROM (Resumos)**. João Pessoa: UFPB, 2003.

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

ENGBERSEN, R.; MASEREEUW, R.; GESTEL, M. A.; SIERO, H. L. M.; MOONS, M. M.; SMITS, P.; RUSSEL, F. G. M. Differential effects of sulfonylurea derivatives on vascular ATP-sensitive potassium channels. **European Journal of Pharmacology**, v. 681, p. 75-79, 2012.

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

FENG, C. Mechanism of nitric oxide synthase regulation: Electron transfer and interdomain interactions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, p.393-411, 2012.

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

FERREIRA, F.; SOULÉ, S.; VAZQUES, A.; MOYNA, P.; KENNE, L. Steroid saponins from *Solanum laxum*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1409-1416, 1996.

FLORA-FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira, Brasil**. v. 46, n. 3, p. 265 – 271, 2000.

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

GARCIA, F. M. Monitoração da Atividade Espasmolítica de Produtos obtidos de *Solanum asperum* Rich. (Solanaceae). **Dissertação (Mestrado)** – Laboratório de Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Muscle contraction. In: **Molecular aspects of cell biology**. Phyladelphía, Saunders, p. 1156-1179, 1995.

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

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.

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.

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

HAN, W. Q.; ZHU, D. L.; WU, L. Y.; CHEN, Q. Z.; GUO, S. J.; GAO, P. J. N-acetylcysteine-induced vasodilation involves voltage-gated potassium channels in rat aorta. **Life Sciences**. v. 84, p. 732 – 737, 2009.

HEBEISS, K.; KILBINGER, H. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase inhibits acetylcholine release and excitatory motor transmission in the guinea-pig ileum. **Neuroscience**, v. 82, p. 623-629, 1997.

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.

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.

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

HOMER, K.L., WANSTALL, J.C. Cyclic GMP-independent relaxation of rat pulmonary artery by spermine NONOate, a diazeniumdiolate nitric oxide donor. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, p. 673–682, 2000.

HOLZER, P.; LIPPE, I. T. H.; LOTFI TABRIZI, A.; LÉNÁRD, L.; BARTHÓ, L. Dual Excitatory and Inhibitory Effect of Nitric Oxide on Peristalsis in the Guinea Pig Intestine. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 280, p. 154-161, 1997.

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.

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

HSU, S. H.; TSAI, T. R.; LIN, C.N.; YEN, M. H.; KUO, K. W. Solamargine purified from *Solanum incanum* Chinese herb triggers gene expression of human TNFR I which may lead to cell apoptosis. **Biochemistry Biophysical Research Communications**, v. 299 (1), p. 1-5, 1996.

IBARROLA, D. A.; HELLIÓN-IBARROLA, M. C.; MONTALBETTI, Y.; HEINICHEN, O.; ALVARENGA, N.; FIGUEREDO, A.; FERRO, E. A. Isolation of hypotensive compounds from *Solanum sisymbirifolium* Lam. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 3, p. 301-307, 2000.

IBARRA-ALVORADO, C.; GALLE, J.; MELICHAR, V. O.; MAMEGHANI, A.; SCHMIDT, H. H. H. W. Phosphorylation of Blood Vessel Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein at Serine 239 as a Functional Biochemical Marker of Endothelial

Nitric Oxide/Cyclic GMP Signaling. **Molecular Pharmacology**, v. 61, p. 312–319, 2002.

ILLIANO, S.; NAGAO, T.; VANHOUTTE, P.M. Calmidazolium, a calmodulin inhibitor, inhibits endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the canine coronary artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, p. 387-392, 1992.

ISHII, T. M.; MAYLIE, J.; ADELMAN, J. P. Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 23195–23200, 1997.

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.

IVANCHEVA, C.; ITZEVA, D.; LOLOVA, I.; RADOMIROV R. Contribution of Nitric Oxide and Substance P to Nonadrenergic, Noncholinergic Transmission in the Guinea Pig Ileum. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 31, p. 101-105, 1998.

JADHAV, S.J.; LUTZ, S.E.; MAZZA, G.; SALUNKHE, D.K. Potato Glycoalkaloids: chemical, analytical, and biochemical perspectives. **ACS Symposium Series**, v. 662, p. 94-114, 1997.

JI, J.; BENISHIN, C. G.; PANG, P. K. T. Nitric Oxide Selectively Inhibits Intracellular Ca^{2+} Release Elicited by Inositol Trisphosphate but not Caffeine in Rat Vascular Smooth Muscle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 285, p. 16-21, 1998.

JOACHIMOVITS, R. The Uterotonic Activity of Several Brazilian Plants Including the Brazilian form of *Spartium Junceum*. **Scientia Pharmaceutica**, v. 22, p. 7, 1954.

KANNAN, M. S.; JOHNSON, D. E. Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels. **Life Science**, v. 56, n. 25, p. 2229-2238, 1995.

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.

KHALID, A.; ZAHEER-UL-HAQ; GHAYUR, M. N.; FEROZ, F.; ATTA-UR-RAHMAN; GILANI, A. H.; CHOUDHARY, M. I. Cholinesterase inhibitory and spasmolytic potential of steroidal alkaloids. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 92, p. 477–484, 2004.

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.

- KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.
- KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In BÁRÁNY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. San Diego, Academic Press, 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.
- KOH, S. D.; SANDERS, K. M. Stretch-dependent potassium channels in murine colonic smooth muscle cells. **Journal of Physiology**, v. 533, p.155–163, 2001.
- KOROLKOVAS, A. – **Dicionário Terapêutico Guanabara**, Editora Guanabara Koogan, 17ª edição 2011/2012, 2011.
- KUME, H.; HALL, I.P.; WASHABAU, R.J.; TAKAGI, K.; KOTLIKOFF, M.I. β -Adrenergic agonists regulate K_{Ca} channels in airway muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 1, p. 371-379, 1994.
- KUO, K.; HSU, S.; LI, Y.; LIN, W.; LIU, L.; CHANG, L.; LIN, C. ; SHEU, H. Anticancer activity evaluation of the *Solanum* glycoalkaloid solamargine. **Biochemistry Pharmacology**, v. 60, (12), p. 1865-1873, 2000.
- KUPCHAN, S.M.; BARBOUTIS, S.J.; KNOX, J.R.; LAU, C.A.. β -solamarine: tumor inhibitor isolated from *Solanum dulcamara*. **Science**, v. 150, p. 1827-1828, 1965.
- LIMA, J. T. Ação espasmolítica do 3, 4, 5, 8-tetrametoxi-(6, 7, 2'', 3'')-furanoflavona. Obtida de *Diploptropis ferruginea* Benth. (FABACEAE), envolve ativação de canais de potássio. 2004. **Dissertação (Mestrado)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.
- LIMA, J. T. Caracterização do envolvimento dos BK_{Ca} no mecanismo de ação espasmolítica de diplotropina em íleo de cobaia e útero de rata e estudo comparativo do seu análogo sintético. 2008. **Tese (Doutorado)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.
- LIMA, L. O.; SILVA, P. C. B.; SILVA, A. D. S.; LIMA, K. M.; SILVA, T. M. S.; CAVALCANTE, F. A. . Roots from *Solanum paludosum* Moric. shows antidiarrhoeal and toxic activities in mice. In: **XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2010, João Pessoa-PB. Resumos, 2010.

- LINCOLN, T. M.; KOMALAVILAS, P. Cyclic GMP-mediated signaling mechanisms in smooth muscle. In: Nitric Oxide, edited by Ignarro L. **Journal New York: Academic**, p. 401–4425, 2000.
- LLEWELLYN-SMITH, I. J.; SONG, Z.; COSTA, M.; BREDET, D. S.; SNYDER, S. H. Ultrastructural localization of nitric oxide synthase immunoreactivity in guinea-pig enteric neurons. **Brain Research**, v. 577, p. 337-342, 1992.
- LOHSE, M.J., FORSTERMANN, U., SCHMITT, H.H.H.W. Pharmacology of NO: cGMP signal transduction. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 358, p. 111–112, 1998.
- LOOFT-WILSON, R. C.; Billaud, M.; Johnstone, S. R.; Straub, A. C.; Isakson, B. E. Interaction between nitric oxide signaling and gap junctions: Effects on vascular function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1818, p. 1895-1902, 2012.
- LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 19-27, 2006.
- MARTIN, G. R.; BOLOFO, M. L.; GILES, H. Inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by arginine analogs – A pharmacological analysis of agonist and tissue dependence. **British Journal of Pharmacology**, v. 105, n. 3, p. 643-652, 1992.
- MATSUYAMA, H.; THAPALIYA, S.; TAKEWAKI, T. Cyclic GMP-associated apamin-sensitive nitrergic slow inhibitory junction potential in the hamster ileum. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 830 - 836 1999.
- McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68 p. 2015–2022, 2007.
- 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.
- MENTZ, L.A.; OLIVEIRA, P.L. Solanum (Solanaceae) na Região Sul do Brasil. **Pesquisas (Botânica)**, v. 54, p. 5-327, 2004.
- MESIA-VELA, S; SANTOS, M. T.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LAPA, A. J. Solanum paniculatum L. (Jurubeba): Potent inhibitor of gastric acid secretion in mice. **Phytomedicine**, v. 9, p. 508–514, 2002.
- MISTRY, D.K., GARLAND, C.J. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channel (BK_{Ca}) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**. v. 124, p. 1131–1140, 1998.

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

MONTEIRO, F. S. Participação de receptores muscarínicos e da via do óxido nítrico no efeito espasmolítico da fração de alcaloides totais obtida de *Solanum paludosum* Moric. (SOLANACEAE). **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2009.

MONTEIRO, F. S.; SILVA, A. C. L; MARTINS, I. R .R.; CORREIA, A. C. C.; BASÍLIO, I. J. L. D.; AGRA, M. F.; BHATTACHARYYA, J.; SILVA, B. A. Vasorelaxant action of the total alkaloid fraction obtained from *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae) involves NO/cGMP/PKG pathway and potassium channels. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 141, p. 895-900, 2012.

MORRIS, S. C.; LEE, T. H. The toxicity and teratogenicity of Solanaceae glycoalkaloids, particularly those of the potato (*Solanum tuberosum*): a review. **Food Technology in Australia**, v. 36, p. 118-124, 1984.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MURTHY, M. E.; BRAYDEN, J. E. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channel. **Journal of Physiology**, v. 486, p. 47-58, 1995.

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

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

NIELSEN-KUDSK, J. E.; BOESGAARD, S.; ALDERSHVILE, J. K⁺ channel opening: a new drug principle in cardiovascular medicine. **Heart**, v. 76, p. 109-116, 1996.

NIU, L. G.; ZHANG, M. S.; LIU, Y; XUE, W. X.; LIU, D. B.; ZHANG, J.; LIANG, Y. Q. Vasorelaxant effect of taurine is diminished by tetraethylammonium in rat isolated arteries. **European Journal of Pharmacology**. v. 580, p. 169-174, 2008.

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

NYMAN, U.; JOSHI, P.; MADSEN, L. B.; PEDERSEN, T. B.; PINSTUP, M.; RAJASEKHARAN, S.; GEORGE, V.; PUSHPANGADAN, P. Ethnomedical Information end in Vitro Screening for Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition of Plants Utilized as Traditional Medicines in Gujarat, Rajasthan and Kerala (India). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 247-263, 1998.

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

OLIVEIRA, J. P.; SILVA, B. A.; LIMA, J. T.; RIBEIRO, L. A. A.; SILVA, T. M. S.; CHAVES, M. C. O. Investigação da atividade espasmolítica de *Solanum paraibanum* Agra (SOLANACEAE) e de *Piper caldense* C. DC. (PIPERACEAE). In: Encontro de Iniciação Científica da UFPB, 9., 2001, João Pessoa. **CD-ROM (Resumos)**. João Pessoa: UFPB, 2001. V.13.03.

OLIVEIRA, A. P. ; FURTADO, F. F. ; ALMEIDA, F. R. C. ; MEDEIROS, I. A. Involvement of calcium activated large conductance potassium channel BK_{ca} in vasorelaxant effect of labdane-302. In: XXXVI Congresso brasileiro de farmacologia, 2004, Águas de Lindóia-SP. XXXV **Congresso Brasileiro de Farmacologia**. São Paulo-SP: SBFTE, 2004. v. UNICO. p. 268-269.

OLIVEIRA, R. C. M. ; MONTEIRO, F. S. ; SILVA, J. L. V. ; RIBEIRO, L. A. A. ; SANTOS, R. F. ; DUARTE, J. C. ; AGRA, M. F. ; SILVA, T. M. S. ; ALMEIDA, Fernanda Regina de Castro ; SILVA, B. A. . Extratos metanólico e acetato de etila de *Solanum megalonyx* Sedtn. (Solanaceae) apresentam atividade espasmolítica em íleo isolado de cobaia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 146-151, 2006a.

OLIVEIRA, R. C. M. ; LIMA, J. T. ; RIBEIRO, L. A. A. ; SILVA, J. L. V. ; MONTEIRO, F. S. ; ASSIS, T. S. ; AGRA, M. F. ; SILVA, T. M. S. ; ALMEIDA, F. R. C. ; SILVA, B. A. . Spasmolytic Action of the Methanol Extract and Isojuripidine from *Solanum asterophorum* Mart. (Solanaceae) Leaves in Guinea-Pig Ileum. **Zeitschrift für Naturforschung**. v. 61, p. 799-805, 2006b.

OMENA, M. L. R. A. Ensaio etnofarmacológico de espécies vegetais com ação no sistema nervoso central, originárias do bioma caatinga. **Saúde e Ambiente em Revista**, v.2, p.92-107, 2007.

OLMSTEAD, R. G.; LYNN BOHS, L.; MIGID, H. A.; SANTIAGO-VALENTIN, E.; GARCIA, V. F.; SARAH M. COLLIER, S. M. A molecular phylogeny of the Solanaceae. **Molecular Phylogenetics**, v. 57, p. 1159–1181, 2008.

ORIE, N. N.; FRY, C. H.; CLAPP, L. H. Evidence that inward rectifier K⁺ channels mediate relaxation by the PGI₂ receptor agonist cicaprost via a cyclic AMP-independent mechanism. **Cardiovascular Research**. v. 69, n. 1, p. 107-115, 2006.

PAQUIN, R.; LACHANCE, R. A. Effects of potato glycoalkaloids on the growth of *Corynebacterium sepedonicum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 10, p. 115-122, 1964.

PEREZ G., R. M.; PEREZ L., J. A.; GARCIA, D. L. M.; SOSSA M., H. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 43-48, 1998.

PLANE, F., HURRELL, A., JEREMY, J.Y., GARLAND, C.J. Evidence that potassium channels make a major contribution to SIN-1 evoked relaxation in the rat isolated mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, p. 1557–1562, 1996.

POOLE, D. P.; FURNESS, J. B. Enteric Nervous System Structure and Neurochemistry Related to Function and Neuropathology. **Physiology of the Gastrointestinal Tract**, v. 2, p. 557-581, 2012.

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.

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

RATTMANN, Y. D.; CRESTANI, S.; LAPA, F. R.; MIGUEL, O. G.; MARQUES, M. C. A.; SILVA-SANTOS, J. E.; ADAIR R.S. SANTOS, A. R. S. Activation of muscarinic receptors by a hydroalcoholic extract of *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook (Dicksoniaceae) induces vascular relaxation and hypotension in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 50, p. 27–33, 2009.

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

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

RIBEIRO, R.; FIUZA DE MELO, M. M. R.; BARROS, F.; GOMES, C.; TROLIN, G. Acute antihypertensive effect in conscious rats produced by some medical plants used in the state of São Paulo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 15, n. 3, p. 261-269, 1986.

RIBEIRO, E. A. N., BATITUCCI, M. C. P., LIMA, J. A. T., ARAÚJO, I. G. A., MAUAD, H., MEDEIROS, I. A. Cardiovascular effects induced by the aqueous fraction of the ethanol extract of the stem of *Solanum stipulaceum* in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 34-35, 2002.

ROBERTSON, B. E.; NELSON, M. T. Aminopyridine inhibition and voltage dependence of K⁺ currents in smooth muscle cells from cerebral arteries. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. C1589 – C1597, 1994.

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 Ca²⁺ storage in health and disease: a dynamic equilibrium. **Cell calcium**. v. 47, p. 297-314, 2010.

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

SANTOS, M. R. V. Atividade cardiovascular da vasicina, um alcaloide isolado das folhas de *Sida cordifolia* L. (MALVACEAE), em ratos. **Tese de Doutorado**, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFPB, João Pessoa, 2005.

SANTOS, R. F. ; CAVALCANTE, F. A. ; SILVA, J. L. V. ; OLIVEIRA, R. C. M. ; SILVA, T. M. S. ; SILVA, B. A. . Evaluation of spasmolytic action of hexane phase from *Solanum agrarium* Sendt. in rat uterus. In: **XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, 2004, Águas de Lindóia. programa & Resumos, 2004. v. Único. p. 290.

SANTOS R. F. Ação espasmolítica de retusin, flavonóide isolado de *Solanum paludosum* Moric. e de seu derivado metilado em íleo isolado de cobaia. **Dissertação (Mestrado)** - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa Universidade Federal da Paraíba, 2006.

SCHINI, V. B.; VANHOUTTE, P. M. Inhibitors of Calmodulin Impair the Constitutive but not the Inducible Nitric Oxide Synthase Activity in the Rat Aorta. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 261, p. 553-559, 1992.

SCHREIBER, K. **Steroid alkaloids: The *Solanum* group**. In: The alkaloids; chemistry and physiology, Vol. X, Manske, R. H. F. (ed.). Academic Press, New York. p. 1-192, 1968.

SCHREIBER, M.; WEI, A.; YUAN, A.; GAUT, J.; SAITO, M.; SALKOFF, L. Slo3, a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 3509-16, 1998.

SHERWIN, C. M., CHRISTIANSEN, S. B., DUNCAN, I. J. H., ERHARD, H. W., LAY, D. C., MENCH, J. A., O'CONNOR, C. E., PETHERICK, C. J. Guidelines for the ethical use of animals in applied animal behaviour research. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 81, p. 291-305, 2003

SHIMUTA, S. I., KANASHIRO, C. A., OSHIRO, M. E. M., PAIVA, T. B., PAIVA, A. C. M. Angiotensin II desensitization and Ca²⁺ and Na⁺ fluxes in cultured intestinal smooth muscle cells. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**. v. 253, p. 1215-1221, 1990.

SHMIGOL, A.; EISNER, D. A.; WRAY, S. Properties of voltage-activated [Ca²⁺] transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. **Journal of Physiology**, v. 511, p. 803–811, 1998.

SILVA, E. G.; OKUYAMA, P.; PAIVA, T. B. Role of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in the membrane potential and contractility of uterus from spontaneously hypertensive rats. **Pathophysiology**, v. 3, n. 4, p. 259-265, 1996.

SILVA, J. L. V. ; SILVA, B. A. ; CAVALCANTE, F. A. ; MACÊDO, L. S. ; DUARTE, J. C.; SILVA, T. M. S. . Investigação da atividade espasmolítica de *Solanum paludosum*

Moric. (Solanaceae): estudo comparativo entre os extratos etanólico e metanólico. In: Maria de Fátima Vanderlei de Souza. (Org.). Iniciados. 8 ed. João Pessoa-PB: **Editora da Universidade Federal da Paraíba**, 2002, v. 8, p. 223-237.

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, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A.; MILLER, 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, J. L. V. Monitoração da atividade vasorelaxante de produtos obtidos das partes aéreas de *Solanum paludosum* Moric. (SOLANACEAE), **Dissertação (Mestrado)** - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa Universidade Federal da Paraíba, 2005.

SILVA, K. N. Estudo farmacobotânico de três espécies de *Solanum* L. (Solanaceae). E triagem farmacológica da atividade espasmolítica de *Solanum paniculatum* L. **Dissertação (Mestrado)**. – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

SILVA, P. C. B. **Investigação da atividade espasmolítica de *Solanum paraibanum* Agra: um estudo comparativo**. 2007. Monografia (Universidade Federal de Alagoas, Maceió) 2007.

SILVA, P. C. B. ; CLEMENTINO-NETO, J.; SILVA, A. D. S. ; SILVA, K. M.; SILVA, T. M. S. ; AGRA, M. F. ; CAVALCANTE, F. A. . Antidiarrhoeal activity of *Solanum asterophorum* Mart. (Solanaceae) in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 131-136, 2012.

SIMMONDS, M. S.J. Novel drugs from botanical sources. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 721-722, 2003.

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.

SOUZA, C.D; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, Go, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, p.135-142, 2006.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS GERAIS DAS PLANTAS MEDICINAIS. **Infarma**, v.16, p. 74-77, 2005.

SHUM, O. L.; CHIU, K. W. Hipotensive action of *Solanum melongena* on normotensive rats. **Phytotherapy Research**, v. 5, n. 2, p. 76-81, 1991.

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

SUN, Y. D.; BENISHIN, C. G. K^+ channel openers relaxes longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **European Journal Pharmacology**, v. 271, p. 453-459, 1994.

SURKS, H. K. cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation. **Circulation Research**, v. 101, p. 1078–1080, 2007.

SUZUKI, N.; MIZUNO, K.; GOMI, Y. Role of nitric oxide in the peristalsis in the isolated guinea-pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 251, p. 221-227, 1994.

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

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

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

UYAMA, Y.; IMAIZUMI, Y.; WATANABE, M. Cyclopiazonic acid, an inhibitor of Ca^{2+} -ATPase in sarcoplasmic reticulum, increases excitability in ileal smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 2, p. 565-572, 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 SKCa-channel, in mice and rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 8, p. 1087-1110, 1999.

VAN RIPER, D.A.; MCDANIEL, N.L.; REMBOLD, C.M. Myosin light chain kinase phosphorylation in nitrovasodilator induced swine carotid artery relaxation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1355, p. 323–330, 1997.

VALVERDE, M.; LAVAUD, C.; BOUSTIE, J.; EL BADAQUI, H.; MUGUET, B.; HENRY, M. Solamargine – the main glycoalkaloid from the fruits of *Solanum paludosum*. **Planta Médica**, v. 59, n. 5, p. 483, 1993.

VIEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. OS PRODUTOS NATURAIS E A QUÍMICA MEDICINAL MODERNA. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VOGALIS, F. Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 20, p. 207 – 219, 2000.

ZARGARI, A. **Medicinal Plants**. v. 3, 5TH Ed, TEHRAN UNIVERSITY PUBLICATIONS, nº 1810/3, TEHRAN, IRAN. BOOK, p. 3 - 889, 1992.

WALDRON, G. J.; COLE, W. C. Activation of vascular smooth muscle K^+ channels by endothelium-derived relaxing factors. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 26, n. 2, p. 180-4, 1999

WANYONYI, A. W.; CHHABRA, S. C.; MKOJI, G.; EILERT, U.; NJUE, W. M. Bioactive steroidal alkaloid glycosides from *Solanum aculeastrum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 1, p. 79-84, 2002.

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.

WADE, G. R.; SIMS, S. M. Muscarinic stimulation of tracheal smooth muscle cell activates large-conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channel. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 3, p. C658-C665, 1993.

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

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.

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

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

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

YAMAKAGE, M.; HIRSHMAN, C. A.; CROXTON, T. L. Sodium nitroprusside stimulates Ca^{2+} -activated K^+ channels in porcine tracheal smooth muscle cells. **American Journal of Physiology**, v. 270, p. L338-L345, 1996.

YUAN, A.; SANTI, C. M.; WEI, A.; WANG, Z. W.; POLLAK, K.; NONET, M.; KACZMAREK, L.; CROWDER, C. M.; SALKOFF, L. The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. **Neuron**, v. 37, p. 765-73, 2003.

Apêndice

Apêndice A – Artigo publicado na revista científica Journal of Ethnopharmacology (WebQualis CAPES: **A2**; Fator de impacto: 3,014; doi: **10.1016/j.jep.2012.03.032**).

Apêndice B – Artigo publicado na revista científica Natural Product Research (WebQualis CAPES: **B2**; Fator de impacto: 1,009; doi: **10.1080/14786419.2011.653974**).

Apêndice C – Artigo publicado na revista científica Zeitschrift fur Naturforschung (WebQualis CAPES: **B2**; Fator de impacto: 0,77 **PMID 21138067**

Apêndice D – Dois capítulos de Livro publicado no Livro Poisoning by Plants, Mycotoxins, and Related Toxins editado por Franklin Riet-Correa, Jim Pfister, Ana Lucia Schild e Terrie Wierenga.

Anexo

ANEXO A – Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

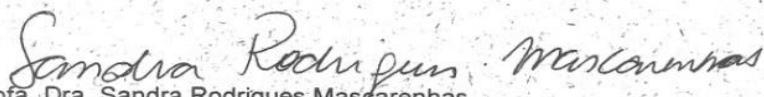
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
CERTIDÃO

João Pessoa, 03 de maio de 2010
CEPA N°. 0111/09

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisadores: Profa. Dra. Bagnólia Araújo
Departamento/Setor: LTF
Ref.: Caracterização do mecanismo de ação espasmolítica da fração de alcalóides de *Solarum paludosum* Moric em aorta de rato e íleo 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: 24 ratos e 42 cobaias
Período: até julho de 2012
Atenciosamente,


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

LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA • UFPB • CAIXA POSTAL 5009 • CEP 58051-970
JOÃO PESSOA • PARAÍBA • BRASIL • FAX: (083) 216-7502 - 216-7511
FONE: (083) 216-7173 - 216-7125 • Home Page: <http://www.ltf.ufpb.br>