

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

**JULIANA DA NÓBREGA CARREIRO**

**AÇÃO TOCOLÍTICA DE 3,6-DIMETIL ÉTER GALETINA, FLAVONOIDE ISOLADO  
DE *Piptadenia stipulacea* (BENTH.) DUCKE, ENVOLVE CANAIS PARA  
POTÁSSIO EM ÚTERO DE RATA**

**João Pessoa - PB**

**2012**

**JULIANA DA NÓBREGA CARREIRO**

**AÇÃO TOCOLÍTICA DE 3,6-DIMETIL ÉTER GALETINA, FLAVONOIDE ISOLADO  
DE *Piptadenia stipulacea* (BENTH.) DUCKE, ENVOLVE CANAIS PARA  
POTÁSSIO EM ÚTERO DE RATA**

Dissertação 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 MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOLOGIA

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva**

**João Pessoa - PB**

**2012**

C314a

Carreiro, Juliana da Nóbrega.

Ação tocolítica de 3,6-dimetil éter galetina, flavonóide isolado de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke, envolve canais para potássio em útero de rata/ Juliana da Nóbrega Carreiro. -- João Pessoa: [s.n.], 2012.

111f. : il.

Orientadora: Bagnólia Araújo da Silva.

Dissertação(Mestrado) - UFPB/CCS/LTF.

1. Produtos naturais. 2. FGAL. 3. Canais de potássio. 4. Ação tocolítica. 5. Útero de rata.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

**JULIANA DA NÓBREGA CARREIRO**

**Ação tocolítica de 3,6-dimetil éter galetina, flavonoide isolado de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke, envolve canais para potássio em útero de rata**

Dissertação 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 MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOLOGIA

**Aprovada em        /        /**

**BANCA DE EXAMINADORA**

---

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

---

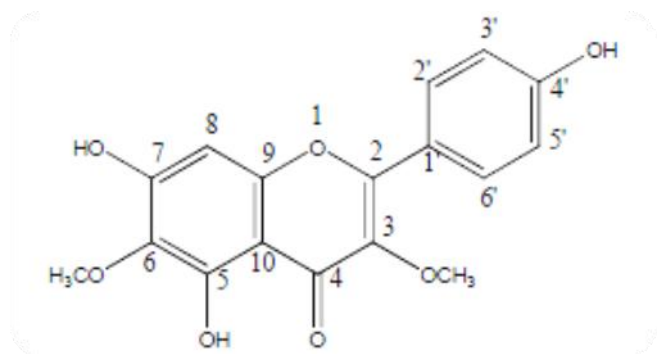
**Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador Interno**

---

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

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

***(Allan Kardec)***



**Dedicatória**

### ***Aos meus pais,***

Joaquim Carreiro Neto e Maria da Conceição da N. Carreiro, que sempre estiveram junto, que fizeram de suas vidas exemplos a serem seguidos. Que fizeram de tudo para me proporcionar uma formação digna, por me ensinarem as mais importante lições ... lições essas mais valiosas que diplomas ou títulos. Pelo amor, lealdade e amizade incondicionais.

### ***Aos meus irmãos,***

Artur e Gabriela da N. Carreiro pelos sorrisos e momentos vividos juntos. Pela cumplicidade e por acreditarem na minha capacidade, sempre.

### ***A minha querida avó,***

Mariza Medeiros, pelos ouvidos incansáveis, abraços sem fim, alegria inexplicável. Por me ensinar que a vida não nos entrega problemas, nós que os inventamos. Saudades! (*In memoriam*)

### ***Ao meu querido avô,***

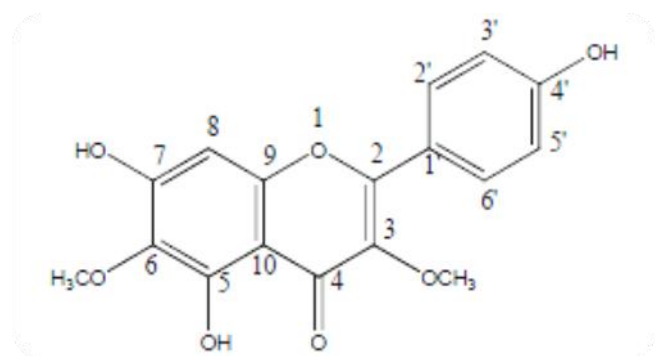
Manoel Gomes, a criatura mais sábia que conheci. Pelas orações, pelos ensinamentos valiosos, pelo orgulho que sinto em ser sua neta mais velha, por acompanhar minha caminhada desde sempre e para sempre.

### ***Ao meu querido tio,***

Paulo Romero, meu maior exemplo, meu maior amor e minha maior saudade. Por nunca ter deixado de me guardar e guiar. (*In memoriam*)

***Ao meu companheiro,***

Alan Pessoa de Queiroz, pela lealdade, companheirismo e amor. Por ter acreditado sempre. Por me levantar nos momentos de fraqueza. Por ser o motivo dos meus sorrisos.



**Agradecimentos**

## **AGRADECIMENTOS**

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

A minha orientadora, Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva. Pelos ensinamentos e orientação. Pelo exemplo de conduta profissional, dedicação e por abraçar de forma tão intensa o propósito de ensinar.

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

Agradeço de maneira especial à Profa. Dra. Rosimeire Ferreira dos Santos. Pelo exemplo de profissional e principalmente de ser humano que sempre foi. Por todos os ensinamentos e conselhos. Pela amizade incondicional, por principalmente sempre ter acreditado na minha capacidade.

Agradeço de maneira especial também à Profa. Dra. Fabiana de A. Cavalcante. Pelas últimas correções feitas, pela disponibilidade e apoio na minha iniciação científica e nesta reta final.

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

Ao meu amigo Fernando Ramos Queiroga. Que foi de imensa importância nessa última etapa. Obrigada pela paciência e disponibilidade em sempre ajudar.

A todos os colegas e amigos que estão ou passaram pelo Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, entre eles, Aline de F. Brito, Ana Carolina de C. Correia, Anne Kaliery de A. Alves, Cibério L. Macêdo, Cybelle de A. N. Silva, Fabiana de A. Cavalcante, Fabio de S. Monteiro, Fabrício de M. Garcia,

Joelmir L. V. da Silva, Maria da Conceição C. Silva, Massilon S. M. Santos Júnior, Núbia M. Sousa, Polyana C. B. Silva, Tamyris F. Ferreira, Vicente Carlos O. Costa, em especial a Iara L. L. Souza, Luiz Henrique C. Vasconcelos, Joedna C. Pereira, Italo R. R. Martins Gislaine A. de Oliveira, Rafael de A. Travassos, Fernando R. Queiroga e Ana Caroline de L. Silva pela força na reta final deste trabalho, pela amizade e bons momentos vividos no laboratório.

A todos os colegas e amigos da turma do Mestrado 2010, do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pelos momentos vividos juntos.

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

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

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

A Luís C. Silva e Adriano S. Cordeiro pela colaboração no Biotério e no laboratório, por serem prestativos e dedicados aos trabalhos do CBiotec.

À Coordenação da Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos em nome dos Professores Dra. Maria de Fátima Agra e Dr. Josean Fechine Tavares por todo empenho e competência.

A Tânia M. A. Araújo, secretária da Pós-Graduação, por toda dedicação, eficiência e amizade.

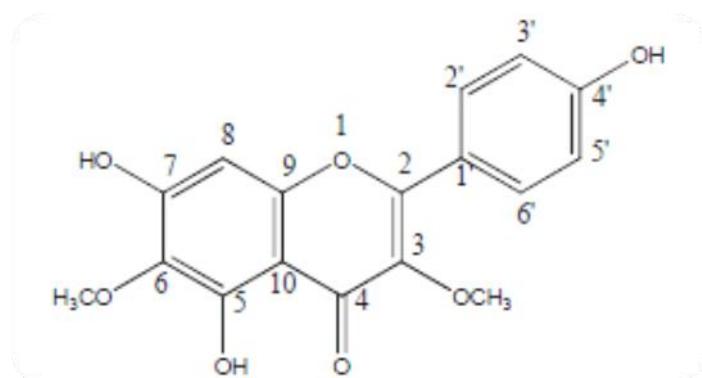
Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro na concessão da minha bolsa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte técnico-científico através do Portal Periódicos.

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

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

Muito Obrigada!

***Juliana da Nóbrega Carreiro***

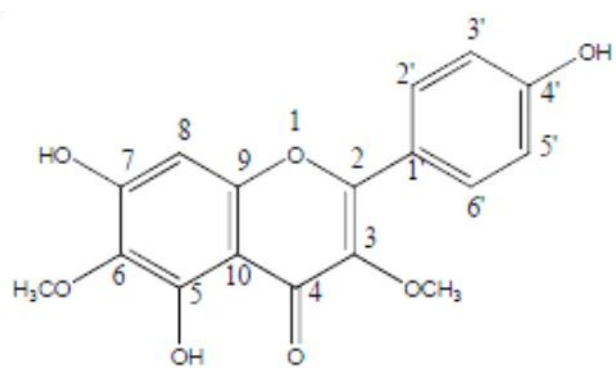


**Resumo**

## RESUMO

O flavonoide 3,6-dimetil éter galetina (FGAL) foi isolado das partes aéreas de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke. Em estudos anteriores, Macêdo et al. (2011a) demonstraram que FGAL inibiu de maneira dependente de concentração as contrações fásicas induzidas por carbacol e ocitocina em útero isolado de rata, sendo mais potente para ocitocina. Desta forma, o objetivo desse estudo foi investigar o mecanismo de ação tocolítica de FGAL em útero de rata. Para tanto segmentos de útero de rata foram suspensos em cuba para órgãos isolados e as contrações isométricas foram monitoradas. FGAL inibiu ( $pD'_2 = 5,68 \pm 0,06$ ) as curvas cumulativas à ocitocina e estas foram desviadas para direita, de forma não paralela ("slope" =  $3,59 \pm 0,04$ ), com redução do  $E_{max}$ , sugerindo um antagonismo não competitivo. Em relação às contrações tônicas, FGAL relaxou de maneira significativa, dependente de concentração e não equipotente o útero pré-contraído tanto por ocitocina ( $pD_2 = 6,9 \pm 0,1$ ) como por KCl ( $pD_2 = 5,6 \pm 0,06$ ). Como a abertura dos canais para cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ) é um dos passos comum às vias de sinalização da ocitocina e do KCl para manutenção da fase tônica da contração, levantou-se a hipótese de que FGAL poderia estar agindo por bloqueio do influxo de  $Ca^{2+}$  através dos  $Ca_v$ . Assim, foram induzidas contrações cumulativas com  $CaCl_2$  em meio despolarizante e nominalmente sem  $Ca^{2+}$  na presença e na ausência de várias concentrações de FGAL. O flavonoide antagonizou as contrações induzidas pelo  $CaCl_2$  evidenciado pelo desvio da curva controle para a direita de maneira não paralela e com diminuição do efeito máximo. Sugerindo assim que FGAL bloqueia de maneira indireta os  $Ca_v$  para promover efeito tocolítico em útero de rata. Os canais para  $K^+$  desempenham um papel chave na regulação do potencial de membrana e modulação dos  $Ca_v$ . Diante dessa premissa, decidiu-se investigar a participação desses canais na ação tocolítica de FGAL. A potência relaxante de FGAL ( $pD_2 = 6,9 \pm 0,1$ ) foi reduzida em aproximadamente 20 vezes na presença de CsCl ( $pD_2 = 5,6 \pm 0,01$ ), bloqueador não seletivo dos canais para  $K^+$ , confirmando a participação de canais para  $K^+$  no efeito relaxante do flavonoide. Para determinar qual(is) canal(is) para  $K^+$  estariam envolvidos usou-se bloqueadores seletivos desses canais. A curva de relaxamento induzida por FGAL foi desviada para direita na presença de 4 -aminopiridina ( $pD_2 = 5,4 \pm 0,01$ ), um bloqueador seletivo dos canais para  $K^+$  ativados por voltagem ( $K_v$ ); de glibenclâmida ( $pD_2 = 5,3 \pm 0,01$ ), um bloqueador seletivo dos canais para  $K^+$  ativados por ATP ( $K_{ATP}$ ); de apamina ( $6,3 \pm 0,02$ ), um bloqueador seletivo dos canais para  $K^+$  de pequena condutância ativados por cálcio ( $SK_{Ca}$ ) e tetraetilamônio 1 mM ( $pD_2 = 5,0 \pm 0,08$ ), que nesta concentração é um bloqueador seletivo dos canais para  $K^+$  de grande condutância ativados por cálcio ( $BK_{Ca}$ ), sugerindo o envolvimento destes canais no mecanismo de ação tocolítica de FGAL em útero isolado de rata. A aminofilina um inibidor não seletivo de fosfodiesterases (PDE) não potencializou ( $pD_2 = 6,7 \pm 0,03$ ) o relaxamento produzido por FGAL em útero de rata, sugerindo que não há participação da via dos nucleotídeos cíclicos no efeito relaxante induzido por FGAL. Conclui-se que o mecanismo de ação tocolítica de FGAL em útero de rata envolve a modulação positiva de canais para  $K^+$ , majoritariamente dos  $BK_{Ca}$ , que modulam indiretamente os  $Ca_v$ , levando ao relaxamento da musculatura lisa uterina.

**Palavras-chave:** FGAL. Ação tocolítica. Canais para potássio. Útero de rata.



**Abstract**

## ABSTRACT

The flavonoid 3,6-dimethyl ether galeitin (FGAL) was isolated from aerial parts of *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke. In previous studies, Macêdo et al. (2011a) demonstrated that FGAL inhibited in a significant and concentration-dependent manner the phasic contractions induced by carbachol and oxytocin on rat uterus, in a higher potency to oxytocin. The aim of this study was to investigate the mechanism of tocolytic action of FGAL on rat uterus. Segments of rat uterus were suspended in organ bath and the isometric contractions were monitored. FGAL inhibited ( $pD'_2 = 5.68 \pm 0.06$ ) oxytocin cumulative curves and these were shifted to the right, in a non parallel manner (slope =  $3.59 \pm 0.04$ ), with  $E_{max}$  the reduction, suggesting a non-competitive antagonism. In relation to the tonic contractions, FGAL relaxed in a concentration-dependent and significant manner but not equipotent rat uterus pre-contracted both oxytocin ( $pD_2 = 6.9 \pm 0.1$ ) and KCl ( $pD_2 = 5.6 \pm 0.06$ ). How the opening channels for calcium-dependent voltage ( $Ca_v$ ) is one of the common step to the signaling pathways of oxytocin and KCl to maintain the tonic phase of contraction, raised the hypothesis that FGAL could be acting by blocking the influx of  $Ca^{2+}$  through the  $Ca_v$ . Therefore, cumulative contractions were induced with  $CaCl_2$  in depolarizing medium nominally without  $Ca^{2+}$  in the presence and absence of several concentrations of FGAL. The flavonoid antagonized the contractions induced by  $CaCl_2$  evidenced by shift to the right of the control curve in a non parallel manner with reduction of  $E_{max}$ , suggesting that FGAL is blocking indirectly the  $Ca_v$  to promote tocolytic effect on rat uterus. The  $K^+$  channels play a key role in membrane potential regulation and  $Ca_v$  modulation. According to this premise, we decided to investigate the involvement of these channels in the tocolytic action of FGAL. The relaxing potency of FGAL ( $pD_2 = 6.9 \pm 0.1$ ) were reduced approximately 20 folds in the presence of CsCl ( $pD_2 = 5.6 \pm 0.01$ ), a non-selective  $K^+$  channels blocker, confirming  $K^+$  channels the participation to the relaxant effect of the flavonoid. To determined which  $K^+$  channel(s) subtype(s) were involved, selective blockers of these channels were used. The relaxation curve induced by FGAL was shifted to right in the presence of 4-aminopyridine ( $pD_2 = 5.4 \pm 0.01$ ), a selective blocker of voltage gated  $K^+$  channels ( $K_v$ ); of glibenclamide ( $pD_2 = 5.3 \pm 0.01$ ), a selective blocker of ATP sensitive  $K^+$  channels ( $K_{ATP}$ ); of apamin ( $6.3 \pm 0.02$ ), a selective blocker of small conductance calcium-activated  $K^+$  channels ( $SK_{Ca}$ ) and tetraethylammonium ( $TEA^+$ ) 1 mM ( $pD_2 = 5.0 \pm 0.08$ ), a big conductance calcium-activated  $K^+$  channels ( $BK_{Ca}$ ), suggesting the involvement of these channels on tocolytic action mechanism of FGAL on rat uterus. The aminophylline, a non selective inhibitor of phosphodiesterases (PDE), did not potentialized ( $pD_2 = 6.7 \pm 0.03$ ) the relaxation produced by FGAL on rat uterus, suggesting that the cyclic nucleotides pathway is not involved on relaxing effect induced by FGAL. Thus, we concluded that the relaxing action mechanism of FGAL in rat uterus involves positive regulation of  $K^+$  channels, that indirectly modulated the  $Ca_v$ , leading to a consequent reduction of  $[Ca^{2+}]_c$  and uterine smooth muscle relaxation.

**Keywords:** FGAL. Tocolytic action. Potassium channels. Rat uterus.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1-</b> Fotografia de <i>Piptadenia stipulaceae</i> (Benth.) Ducke. (Fabaceae).....                                                                                                                                 | 28 |
| <b>Figura 2-</b> Estruturas químicas dos flavonoides isolados de <i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth.)Ducke. (1) 3,6-dimetil éter galeatina, (2) desmetoxicentaureidina e (3) santina.....                                   | 29 |
| <b>Figura 3-</b> Fotografia de <i>Piptadenia stipulaceae</i> (Benth.) Ducke (A) árvore e ramos (B).....                                                                                                                      | 40 |
| <b>Figura 4.</b> Fotografia dos aparelhos utilizados para o registro de contrações.....                                                                                                                                      | 44 |
| <b>Figura 5-</b> Fotos do pHmetro digital e da balança analítica.....                                                                                                                                                        | 45 |
| <b>Figura 6-</b> Registros representativos das contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl, na ausência ( <b>A</b> ) e na presença de FGAL ( <b>B</b> ), em útero isolado de rata.....                                     | 56 |
| <b>Figura 7-</b> Registros representativos das contrações tônicas induzidas por $10^{-2}$ UI de ocitocina, na ausência ( <b>A</b> ) e na presença de FGAL ( <b>B</b> ), em útero isolado de rata.....                        | 57 |
| <b>Figura 8-</b> Registros representativos das contrações tônicas induzidas por $10^{-2}$ UI/mL de ocitocina na ausência ( <b>A</b> ) e na presença de 5 mM de CsCl ( <b>B</b> ), em útero isolado de rata.....              | 62 |
| <b>Figura 9-</b> Registros representativos das contrações tônicas induzidas por $10^{-2}$ UI/mL de ocitocina na ausência ( <b>A</b> ) e na presença de 3 mM de 4-AP ( <b>B</b> ), em útero isolado de rata.....              | 65 |
| <b>Figura 10-</b> Registros representativos das contrações tônicas induzidas por $10^{-2}$ UI/mL de ocitocina na ausência ( <b>A</b> ) e na presença de glibenclamida ( <b>B</b> ), em útero isolado de rata.....            | 68 |
| <b>Figura 11-</b> Registros representativos das contrações tônicas induzidas por $10^{-2}$ UI/mL de ocitocina na ausência ( <b>A</b> ) e na presença de apamina ( <b>B</b> ), em útero isolado de rata.....                  | 71 |
| <b>Figura 12-</b> Registros representativos das contrações tônicas induzidas por $10^{-2}$ UI/mL de ocitocina na ausência ( <b>A</b> ) e na presença de 1 mM de TEA <sup>+</sup> ( <b>B</b> ), em útero isolado de rata..... | 74 |

**Figura 13-** Registros representativos das contrações tônicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença de 100 nM de aminofilina (**B**), em útero isolado de rata.....78

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1A** - Efeito de FGAL frente às curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina. Controle (■), [FGAL] M :  $10^{-6}$  (○),  $3 \times 10^{-6}$  (◆) e  $10^{-5}$  (△).....53

**Gráfico 1B** - O gráfico representativo do log (DR-1) em função do log da concentração molar de FGAL.....53

**Gráfico 2** - Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por KCl (●) ou ocitocina (■) em útero isolado de rata.....58

**Gráfico 3** - Efeito de FGAL frente às curvas concentrações-resposta cumulativas ao  $\text{CaCl}_2$  em meio despolarizante e nominalmente sem cálcio. Controle (■), [FGAL] M :  $10^{-6}$  (○),  $3 \times 10^{-6}$  (◆),  $10^{-5}$  (△) e  $3 \times 10^{-5}$  (▲).....60

**Gráfico 4** - Efeito de FGAL sobre a fase tônica das contrações induzidas por ocitocina na ausência (■) e na presença de 5 mM de CsCl (◇), em útero isolado de rata.....63

**Gráfico 5** - Efeito de FGAL sobre a fase tônica das contrações induzidas por ocitocina na ausência (■) e na presença de 3 mM de 4-AP (□), em útero isolado de rata.....66

**Gráfico 6** - Efeito de FGAL sobre a fase tônica das contrações induzidas por ocitocina na ausência (■) e na presença de  $3 \times 10^{-5}$  M de glibenclamida (▽), em útero isolado de rata.....69

**Gráfico 7** - Efeito de FGAL sobre a fase tônica das contrações induzidas por ocitocina na ausência (■) e na presença de 10 nM de apamina (●), em útero isolado de rata.....72

**Gráfico 8** - Efeito de FGAL sobre a fase tônica das contrações induzidas por ocitocina na ausência (■) e na presença de 1 mM de  $\text{TEA}^+$  (▼), em útero isolado de rata.....75

**Gráfico 9** - Efeito de FGAL sobre a fase tônica das contrações induzidas por ocitocina na ausência (■) e na presença de  $10^{-4}$  M de aminofilina (\*), em útero isolado de rata.....79



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Composição da solução de Locke Ringer por REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO .....42

**Tabela 2-** Solução de Locke Ringer despolarizante e nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  .....42

**Tabela 3-** Valores de  $\text{pD}_2$  e efeito máximo de ocitocina nas concentrações:  $10^{-6}$  M,  $3 \times 10^{-6}$  M e  $10^{-5}$  M de FGAL.....54

**Tabela 4-** Valores de  $\text{pD}_2$  e efeito máximo de  $\text{CaCl}_2$  nas concentrações:  $10^{-6}$  M,  $3 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M e  $3 \times 10^{-5}$  M de FGAL.....60

**Tabela 5-** Valores de  $\text{pD}_2$  de FGAL na ausência (controle) e na presença de diversos bloqueadores de canais para potássio.....76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                          |                                                                                                    |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ACh</b>                               | acetilcolina                                                                                       |
| <b>BaCl<sub>2</sub></b>                  | cloreto de bário                                                                                   |
| <b>BK<sub>Ca</sub></b>                   | canais para potássio ativados por cálcio de grande condutância                                     |
| <b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub></b>     | concentração citosólica do íon cálcio                                                              |
| <b>Ca<sup>2+</sup> - ATPase</b>          | bomba de cálcio                                                                                    |
| <b>CaM</b>                               | calmodulina                                                                                        |
| <b>[Ca<sup>2+</sup><sub>4</sub>-CaM]</b> | complexo cálcio – calmodulina                                                                      |
| <b>AMPc</b>                              | monofosfato cíclico de adenosina                                                                   |
| <b>ANOVA</b>                             | análise de variância                                                                               |
| <b>ATP</b>                               | trifosfato de adenosina                                                                            |
| <b>Ca<sub>v</sub></b>                    | canais para cálcio dependentes de voltagem (De acordo com The IUPHAR Ion Channel Compendium, 2002) |
| <b>CGs</b>                               | ciclase de guanilil solúvel                                                                        |
| <b>COX</b>                               | ciclooxigenase                                                                                     |
| <b>DAG</b>                               | diacilglicerol                                                                                     |
| <b>EEB</b>                               | extrato etanólico bruto                                                                            |
| <b>E<sub>max</sub></b>                   | efeito máximo                                                                                      |
| <b>FGAL</b>                              | galetina 3,6 dimetil éter                                                                          |
| <b>G<sub>αq</sub></b>                    | subunidade alfa da proteína G <sub>q</sub>                                                         |
| <b>GMPc</b>                              | monofosfato cíclico de guanosina                                                                   |
| <b>GPCRs</b>                             | receptores acoplados a proteína G                                                                  |
| <b>GTP</b>                               | trifosfato de guanosina                                                                            |
| <b>IP<sub>3</sub></b>                    | trifosfato de inositol                                                                             |
| <b>[K<sup>+</sup>]<sub>e</sub></b>       | concentração de potássio externa                                                                   |
| <b>K<sub>v</sub></b>                     | canais de potássio sensíveis à voltagem                                                            |
| <b>K<sub>ATP</sub></b>                   | canais de potássio ativados por ATP                                                                |
| <b>LTD4</b>                              | leucotrieno do tipo 4                                                                              |
| <b>MLC</b>                               | cadeia leve da miosina                                                                             |
| <b>MLCK</b>                              | cinase da cadeia leve da miosina                                                                   |
| <b>NADPH</b>                             | nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase                                                 |
| <b>NO</b>                                | óxido nítrico                                                                                      |
| <b>NOS</b>                               | sintase do óxido nítrico                                                                           |

|                        |                                                                 |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>OCI</b>             | ocitocina                                                       |
| <b>PDE</b>             | fosfodiesterase                                                 |
| <b>PGE2</b>            | prostaglandina E2                                               |
| <b>PKA</b>             | proteína cinase dependente de AMP <sub>c</sub>                  |
| <b>PKG</b>             | proteína cinase dependente de GMP <sub>c</sub>                  |
| <b>PLC</b>             | fosfolipase C                                                   |
| <b>R<sup>2</sup></b>   | coeficiente de determinação de correlação não linear            |
| <b>R.S.</b>            | retículo sarcoplasmático                                        |
| <b>SK<sub>Ca</sub></b> | canais para potássio ativados por cálcio de pequena condutância |
| <b>4- AP</b>           | 4 - aminopiridina                                               |

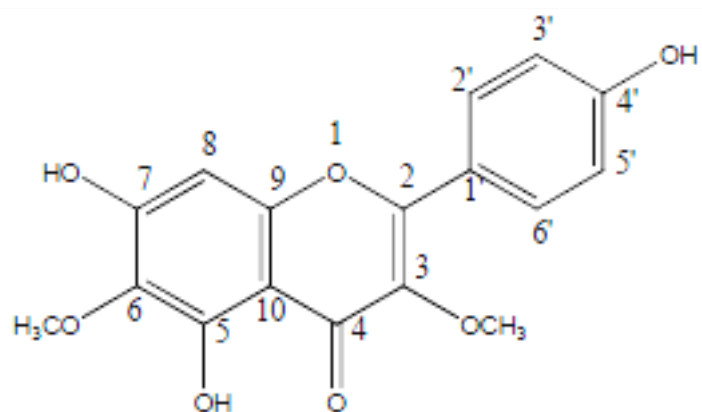
# SUMÁRIO

|                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                            | <b>26</b> |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                                                                              | <b>38</b> |
| 2.1 Geral.....                                                                                       | 38        |
| 2.2 Específicos .....                                                                                | 38        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                    | <b>40</b> |
| <b>3.1 MATERIAL .....</b>                                                                            | <b>40</b> |
| 3.1.1 Material botânico .....                                                                        | 40        |
| 3.1.2 Animais.....                                                                                   | 41        |
| 3.1.3 Drogas e Reagentes.....                                                                        | 41        |
| 3.1.4 Soluções nutritivas .....                                                                      | 42        |
| 3.1.4 Preparação da solução - estoque da substância em estudo .....                                  | 43        |
| 3.1.5 Aparelhos .....                                                                                | 43        |
| <b>3.2 MÉTODOS .....</b>                                                                             | <b>45</b> |
| <b>3.2.1 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO TOCOLÍTICA DE FGAL<br/>EM ÚTERO ISOLADO DE RATA .....</b> | <b>45</b> |
| 3.2.2 Caracterização do antagonismo da contração induzida por ocitocina ...                          | 45        |
| 3.2.2.1 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina ou<br>KCl .....           | 46        |

|                                                                                                                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.2.3 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA CÁLCIO NO MECANISMO DE AÇÃO TOCOLÍTICA DE FGAL .....</b>                                                              | <b>47</b> |
| 3.2.3.1 Efeito de FGAL sobre as contrações cumulativas induzidas por $\text{CaCl}_2$ em meio despolarizante nominalmente sem cálcio .....                                | 47        |
| <b>3.2.3.2 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO NO MECANISMO DE AÇÃO TOCOLÍTICA DE FGAL.....</b>                                                           | <b>47</b> |
| 3.2.3.2.1 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de cloreto de cério .....                                        | 47        |
| 3.2.3.2.2 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de 4-aminopiridina, glibenclamida, apamina, tetraetilamônio..... | 48        |
| <b>3.2.3.3 INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS NUCLEOTÍDIOS CÍCLICOS NO MECANISMO DE AÇÃO TOCOLÍTICA DO FGAL .....</b>                                                      | <b>49</b> |
| 3.2.3.3.1 Efeito do FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de aminofilina. ....                                             | 49        |
| <b>3.2.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>                                                                                                                                 | <b>50</b> |
| <b>4. RESULTADOS.....</b>                                                                                                                                                | <b>52</b> |
| <b>4.1 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO TOCOLÍTICA DE FGAL EM ÚTERO ISOLADO DE RATA.....</b>                                                                            | <b>52</b> |
| 4.1.1 Característica do antagonismo da contração induzida por ocitocina.....                                                                                             | 52        |
| 4.1.2 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina ou KCl .....                                                                                    | 55        |

|                                                                                                                                                                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.2 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA CÁLCIO NO MECANISMO DE AÇÃO TOCOLÍTICA DE FGAL SOBRE AS CONTRAÇÕES CUMULATIVAS INDUZIDAS POR <math>\text{CaCl}_2</math> EM MEIO DESPOLARIZANTE NOMINALMENTE SEM CÁLCIO.....</b> | <b>59</b> |
| <b>4.3 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO NO MECANISMO DE AÇÃO TOCOLÍTICA DE FGAL .....</b>                                                                                                                      | <b>61</b> |
| 4.3.1 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de cloreto de cézio .....                                                                                                     | 61        |
| 4.3.2 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de 4-aminopiridina.....                                                                                                       | 64        |
| 4.3.3 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de glibenclamida .....                                                                                                        | 67        |
| 4.3.4 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de apamina.....                                                                                                               | 70        |
| 4.3.5 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de tetraetilamônio .....                                                                                                      | 73        |
| 4.3.6 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de aminofilina .....                                                                                                          | 77        |
| <b>5 DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                                                                                                         | <b>81</b> |
| <b>6 CONCLUSÕES .....</b>                                                                                                                                                                                                        | <b>83</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                                                                                                         | <b>88</b> |
| <b>ANEXOS ..</b>                                                                                                                                                                                                                 | <b>93</b> |

# Introdução



## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são muito bem sucedidos como fontes de drogas (HARVEY, 2000; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Estes podem ser provenientes de micro-organismos, plantas, organismos marinhos, anfíbios entre outros animais para fins diversos, incluindo barreiras protetoras, coenzimas e cofatores, para defesa do hospedeiro contra infecção bacteriana e predadores (animais), proteção de seu nicho ecológico, comunicação intra e inter espécies, pigmentos, sinalização celular, expressão gênica e homeostase dos organismos (JONH, 2010)

Historicamente, a fonte natural mais importante são as plantas, tendo sido usadas como remédio através dos anos (TULP; BOHLIN, 2004). Estes remédios inicialmente eram usados na forma de drogas brutas, como as tinturas, chás, pós e outras formulações vegetais (SAMUELSSON, 2004) na busca do alívio e/ou cura das doenças pelo homem por milhares de anos (BALICK, 1997; VIEGAS-JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O Brasil possui uma grande diversidade genética de espécies de plantas, fator esse estimulante para a pesquisa e estudo dos produtos naturais. Contudo, somente 10% têm sido avaliadas com respeito às suas características biológicas e apenas 5% com objetivos fitoquímicos (LUNA, 2005).

A pesquisa moderna em produtos naturais no Brasil teve início em meados do século passado e tem sido foco de constantes revisões, indicando uma preocupação com a diversidade a ser pesquisada, a qualidade e objetividade dos trabalhos bem como sua divulgação no meio científico (PUPO; GALLO, 2009). Através de investigações por meio de triagem de extratos obtidos de diversas espécies de plantas ou utilizando substâncias isoladas a partir de métodos de extração, isolamento e identificação pode-se obter substâncias usadas na terapêutica moderna ou ferramentas farmacológicas como: quinina (antimalárico), pilocarpina (colinesterásico), sildenafil (vasodilatador), vincristina (anticancerígeno), penicilinas, cefalosporinas (antibióticos), ácido acetil salicílico (AAS) e morfina (analgésicos), captopril (anti-hipertensivo), estatinas (anticolesterol) e azidovudina (antiviral) (BARREIRO, 2009). Outras substâncias estão sendo investigadas por atuarem em importantes vias de sinalização, como o fumagilim e o TNP-470 (potentes inibidores da angiogênese), FTY720 (imunossupressor) e a diazonamida A (anti -tumoral) (HONG, 2011).

A complexidade na descoberta de novas drogas é um fator que incentiva estudos com espécies vegetais, sendo necessários atualmente de sete a dez anos para o desenvolvimento completo de um novo medicamento (FLISCHER; MONTARI, 1995; CALIXTO, 2000; SIXEL; PECINALLI, 2005).

O uso de plantas e/ou seus constituintes na prática médica cresceu visivelmente. Em uma época em que as exigências de segurança, eficácia e qualidade, estabelecidas pelas agências regulamentadoras tornaram-se cada vez mais rígidas, a entrada de medicamentos no mercado deve estar vinculada aos estudos científicos necessários para que a população tenha acesso a uma terapia alternativa de qualidade, a qual exige um considerável investimento em pesquisas com produtos naturais oriundos de plantas e seus constituintes isolados (PUPO; GALLO, 2007).

Diante disso, houve um ressurgimento dos produtos naturais para a descoberta de novos fármacos provenientes de substâncias isoladas, o que incentivou a pesquisa científica para a comprovação dos efeitos observados empiricamente pela população (SIXEL; PECINALLI, 2005).

Dentre as plantas provedoras de produtos naturais destaca-se a família Fabaceae que é composta de plantas que se apresentam como ervas, arbustos e árvores com grande variedade de habitats, incluindo aquáticas, xerófitas e trepadeiras. Tem distribuição cosmopolita nas zonas tropicais, subtropicais e temperadas (HEYWOOD, 1996) e é constituída por 476 gêneros e 13.855 espécies (STEVENS, 2005).

Produtos naturais de várias classes já foram isolados de espécies da família Fabaceae, incluindo flavonoides, benzofuranoides, óleos essenciais, triterpenoides e alcaloides de *Bowdichia virgilioides* Kunt. (MARINHO, 1991; MARINHO et al., 1994; MELO et al., 2001; BARBOSA-FILHO et al., 2003).

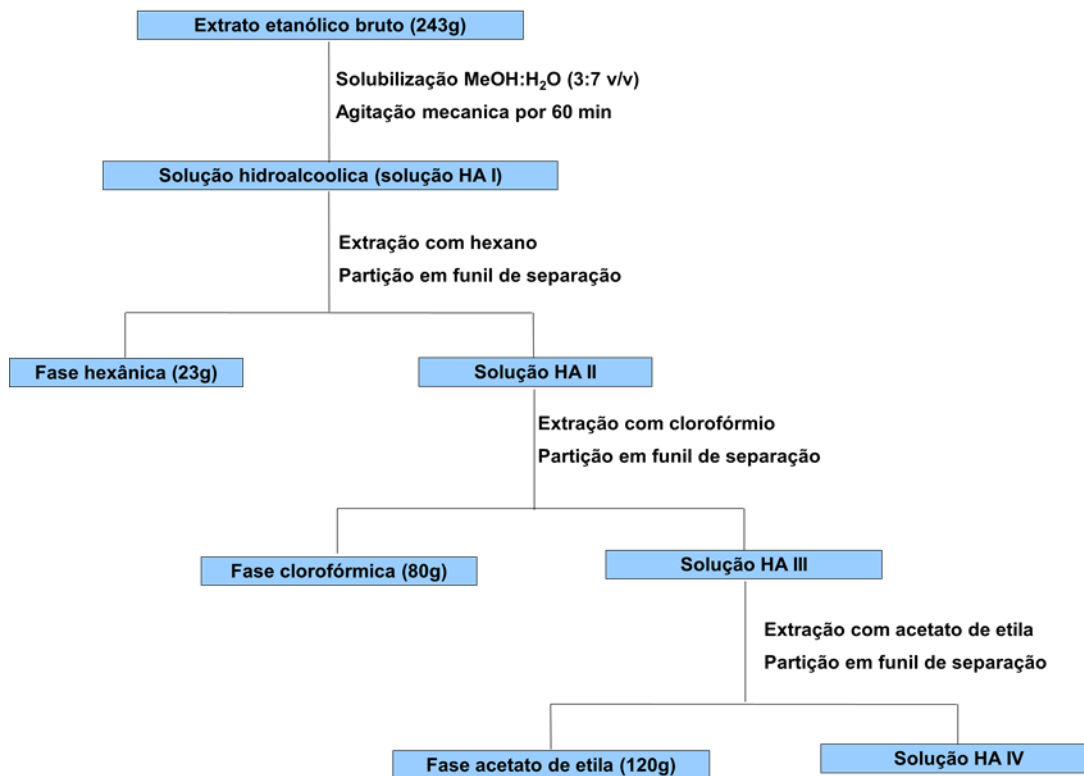
A espécie *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke (Figura 1) é uma árvore da caatinga do nordeste brasileiro, conhecida como “Jurema branca” (FABRICANTE; ANDRADE, 2007), “Carcará”, “Calumbi” e Jurema malícia da serra” (FLORENTINO et al., 2007). Essa espécie é bastante utilizada na medicina popular nos processos inflamatórios na forma de tintura ou decoctos para tratar feridas (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002) e estudos científicos confirmam sua atividade antibacteriana e antifúngica contra cepas de *Candida albicans* (BEZERRA, 2008). Em outro estudo, extratos de *Piptadenia stipulacea* também mostraram ser eficazes contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*,

*Streptococcus faecium* e *Neurospora crassa* (CHIAPPETA; DE MELLO, 1984). Recentemente, foram evidenciadas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória em camundongos das frações acetato de etila e aquosa dessa espécie obtidas a partir do extrato etanólico bruto. (QUIEROZ et al., 2010).



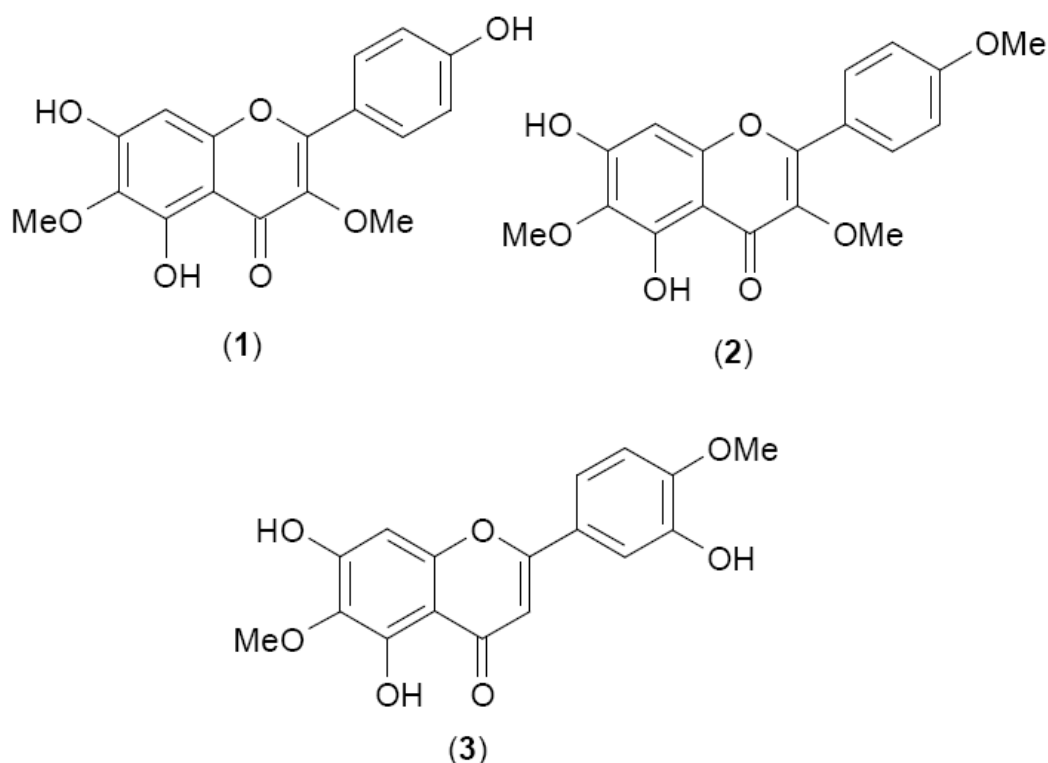
**Figura 1:** *Piptadenia stipulacea* ((Benth)) Ducke

Partes aéreas da espécie coletada em Serra Branca-PB foram secas, moídas e extraídas a frio com etanol, obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB), que após extração líquido/líquido com solventes orgânicos obteve-se as fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica (Fluxograma 1).



**Fluxograma 1:** Fracionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Piptadenia stipulacea* ((Benth)) Ducke

A fase clorofórmica forneceu três flavonoides: **(1)** galetina 3,6-dimetil éter (FGAL), **(2)** desmetoxicentaureidina e **(3)** santina (Figura 2). Onde FGAL possui peso molecular de 294 u.m.a. (LIRA et al., 2009). O flavonoide FGAL foi descrito pela primeira vez na família Fabaceae.



**Figura 2:** Estruturas químicas dos flavonoides isolados de *Piptadenia stipulacea* ((Benth)) Ducke. (1) Galetina 3,6-dimetil éter, (2) desmetoxicentaureidina e (3) santina.

Os flavonoides constituem uma classe ampla de substâncias polifenólicas encontradas em plantas. Este grupo inclui várias subclasses, como os flavonois, flavonas, flavanonas, antrocianidinas, isoflavonas, diidroflavonois e chalconas (PEREZ-VIZCAINO, 2010). A enorme variedade estrutural destes metabólitos e os diversos estudos químicos, genéticos e enzimológicos refletem o crescente e continuado interesse de químicos, farmacólogos e biólogos nesta classe de compostos (WOLLENWEBER, 1994). São amplamente distribuídos no reino vegetal e consumidos em grande quantidade na alimentação diária (DI CARLO et al., 1999). Estruturalmente são compostos fenólicos presentes em grande número de plantas, podendo ocorrer no estado livre ou associados a açúcares, ou alquilados como éteres metílicos, esterificados, dentre outros (WOLLENWEBER, 1994).

Os flavonoides também são encontrados em diversas plantas medicinais e muitos medicamentos são derivados de ervas medicinais, sendo bastante utilizados em todo o mundo. Estes metabólitos são capazes de modular a atividade de enzimas e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares,

sugerindo que estes compostos tem significantes atividades anti-hepatotóxica (SOIKE; LENG-PESCHLOW, 1987), proteção vascular (BERETZ; CAZENAVE, 1988) antialérgica (SAMUELSON, 1993; BERG; DANIEL, 1988), anti-inflamatória (MASCOLO et al., 1988; EMIM et al., 1994), antiosteoporótica (EATON-EVANS, 1994) e antitumoral (MARTIN et al., 1994; DE LA LASTRA et al., 1994; IZZO et al., 1994; IZZO, 1996).

Destacam-se também pela sua atividade antioxidante, sendo os antioxidantes mais abundantes encontrados em dietas comuns. Mais de 4000 flavonoides diferentes foram identificados nos alimentos, sendo suas principais fontes são as maçãs, cebolas, amoras, chocolate, frutas vermelhas, frutas cítricas, nozes e bebidas, como chá, cerveja e vinho (RUSSO et al., 2000)

Alguns flavonoides são conhecidos por “sequestrar” radicais livres oxigenados e recentemente, estudos sugerem que talvez eles também sejam “sequestradores” muito potentes do óxido nítrico (NO) (VAN ACKER et al., 1995). Estudos recentes sugerem que os flavonoides podem inibir *in vitro* a atividade da enzima NADPH diaforase no cérebro, responsável pela síntese do NO. Estes experimentos sugerem que a quercetina e a apigenina inibiram marcadamente a atividade desta enzima de maneira dependente de concentração, sugerindo que estes flavonoides talvez também sejam capazes de inibir a produção de NO no cérebro (TAMURA et al., 1994). Foi relatado que a quercetina e outros flavonoides inibiram as contrações induzidas em íleo de cobaia (FANNING et al., 1983; MACANDER, 1986). Capasso e colaboradores (1991a), testaram 13 flavonoides de várias classes (apigenina, catequina, crisina, flavona, hesperetina, campferol, morina, miceritina, naringenina, naringina, flordizina, quercetina e taxifolina) sobre as contrações induzidas por prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), leucotrieno do tipo D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>), acetilcolina (ACh) e cloreto de bário (BaCl<sub>2</sub>) em íleo isolado de cobaia e observaram que todos eles inibiram estas contrações. Os mesmos pesquisadores também observaram que os flavonoides inibiram as contrações induzidas eletricamente e por uma variedade de agonistas, dentre eles a ACh, 5-hidroxitriptamina, histamina e algumas prostaglandinas, em íleo isolado de cobaia.

Ainda sobre atividade espasmolítica para os flavonoides, encontra-se o 3,7,8,4'-tetra-O-metilgossipetina (SP-EA-01) e 3,7-di-O-metilcanferol (SP-EA-15), obtidos de *Solanum paludosum* Moric, que apresentaram efeito relaxante em aorta de rato e a ação deles envolve bloqueio do influxo de cálcio através dos

canais para cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ) (SILVA, 2005). Retusina e me-retusina, isolados de *Solanum paludosum* Moric, apresentam efeito espasmolítico em íleo de cobaia, onde o efeito espasmolítico de retusina e me-retusina não envolvem o bloqueio do influxo de cálcio, ativação de canais de potássio nem as vias adrenérgicas e colinérgicas, mas o mecanismo de ação de retusina envolve a participação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) e o mecanismo promovido pelo me-retusina envolve a participação da via fosfodiesterase (PDE) -nucleotídeos cíclicos (SANTOS, 2006). Isoliquiritigenina, isolado de *Glycyrrhiza ularensis*, apresenta atividade antiespasmódica em jejuno, íleo e reto de camundongo, através da inibição de PDEs (SATO et al., 2007). Diploptropina (3, 4, 5, 8-tetrametoxi-6, 7 2", 3"-furanoflavana), isolado de *Diploptropis ferruginea* (Benth) exerce efeito relaxante em íleo de cobaia e útero de rata através da participação dos canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância ( $BK_{Ca}$ ). (LIMA, 2008). Liu et. al., (2008) demonstraram que o flavonoide isoliquiritigenina, isolado das raízes de *Glycyrrhiza glabra*, apresenta efeito relaxante em traqueia de cobaia através de vários mecanismos, como ativação da ciclase de guanilil solúvel (CGs), inibição de PDE, ativação da via de sinalização da proteína cinase dependente de monofosfato cíclico de guanossina  $PKG / GMP_c$  e abertura de  $BK_{Ca}$ , genisteína, quenferol e quercetina apresentaram efeito espasmolítico em útero de rata, através da participação de nucleotídeos cíclicos (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).

O 3,6 dimetil éter galetina (FGAL), flavonoide isolado da fase clorofórmica da partes aéreas de *Piptadenia stipulaceae* (Benth) Ducke, nosso objeto de estudo, apresentou atividades farmacológicas como: atividade antiviral (ELSOHLY et al., 1997), tratamento de doenças da pele (ROSENBLOOM, 2003), tratamento de doenças periféricas vasculares e neurais (ROSENBLOOM, 2004), anticancerígeno (ROSENBLOOM, 2006), inibição da síntese de NO (MORIKAWA et al., 2006), inibição da  $\alpha$ -amilase (AL-DABBAS et al., 2006), atividade antioxidante (LEACH et al., 2007), antinociceptiva e anti-inflamatória em camundongos, provavelmente pela ação antioxidante e inibidora de ciclo-oxigenase (COX) (QUIEROZ et al., 2010). Com estudos em nível de triagens farmacológicas realizados pelo nosso laboratório, observou-se efeito relaxante em músculo liso de aorta isolada de rato e traqueia isolada de cobaia e útero isolado de rata (Macêdo et al., 2011).

Há um grande interesse em se investigar drogas obtidas diretamente de plantas, ou seus derivados, que atuem na musculatura lisa, pois esse músculo é o principal responsável pelo controle da maioria dos órgãos ocos dos sistemas do corpo. As células da musculatura lisa estão presentes nas paredes de vários órgãos, incluindo os vasos sanguíneos, estômago, bexiga, vias aéreas, intestinos e útero, logo a regulação da contração do músculo liso tem um papel importante em muitos processos fisiopatológicos, cuja contração anormal do músculo liso é importante em condições como a hipertensão arterial, vasoespasma coronariano e cerebral, asma brônquica, disfunção erétil, complicações durante o parto e desconforto causado por cólicas menstruais (WEBB, 2003).

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

A contração pode ser alcançada quer através da despolarização da membrana (acoplamento eletromecânico), levando ao aumento da  $[Ca^{2+}]_c$ , proveniente do meio extracelular através dos  $Ca_v$ , desencadeando o processo de contração muscular. Ou induzida por um agonista (acoplamento farmacomecânico) que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003). Agonistas como ocitocina, carbacol ou histamina se ligam a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata do fosfatidilinositol, através da proteína  $G_q$  ou  $G_{11}$  mediando a produção de 1,4,5-trisfosfato de inositol ( $IP_3$ ), que estimulam a liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (R.S.) e diacilglicerol (DAG), responsável pela ativação da proteína cinase C (PKC) que por sua vez pode fosforilar canais para potássio bloqueando-os e levando a uma ativação indireta dos  $Ca_v$  (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). O aumento na  $[Ca^{2+}]_c$  favorece a ligação do  $Ca^{2+}$  com a proteína calmodulina, formando o complexo  $4Ca^{2+}$ -calmodulina. Este complexo ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) a qual fosforila a cadeia leve da miosina (CLM), promovendo a interação da CLM com os filamentos de actina, desencadeando o processo de contração do músculo liso (WEBB, 2003).

Na busca por substâncias que interfiram na sinalização do  $Ca^{2+}$ , o músculo liso se tornou uma alternativa para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem essa investigação (KARAKI et al., 1997).

O cálcio é um importante segundo mensageiro que desempenha um papel necessário a uma grande variedade de processos biológicos, incluindo a

regulação enzimática, expressão gênica, tráfego de proteína, proliferação celular, apoptose, e a coordenação do acoplamento excitação-contração do músculo (CARAFOLI, 2002). Em geral, existem duas fontes deste íon sinalizador na célula: uma extracelular que permitir o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citoplasma, através dos canais na membrana plasmática, e outra intracelular representada pelos estoques internos, principalmente o retículo sarcoplasmático (R.S.) que liberam  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol (PAN; MA, 2003).

Os mecanismos que levam a uma resposta contrátil através do acoplamento eletromecânico são devido a uma despolarização de membrana diretamente pelo aumento da concentração externa de  $\text{K}^+$  ( $[\text{K}^+]_e$ ) ou indiretamente pela ligação dos agonistas de acoplamento misto aos seus receptores levando à abertura de  $\text{Ca}_v$ , causando influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma e, conseqüentemente, a contração (REMBOLD, 1996). Já os mecanismos fármaco-mecânicos da contração incluem (1) aumento de 1,4,5-trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) e diacilglicerol (DAG) por ligação do agonista com o receptor ativando a proteína  $\text{G}_{q/11}$ -fosfolipase C (PLC). O  $\text{IP}_3$  liga-se ao seu receptor permitindo a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares presentes no retículo sarcoplasmático (RS) que favorecerá a formação do complexo  $4\text{Ca}^{2+} - \text{CaM}$  disparando o início do mecanismo contrátil (GARRET; GRISHAM, 1995); (2) aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da abertura do canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L por um mecanismo que não envolve mudança no potencial de membrana; (3) liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  através de receptores de rianodina (sensíveis à cafeína) presentes na membrana do R.S. (KOMORI et al., 1995) e (4) aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  por ativação do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  reverso (BLAUSTEIN, 1989).

Os mecanismos de relaxamento podem incluir: (1) hiperpolarização, (2) aumento na atividade da enzima  $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$  (bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ ), tanto do R.S. como da membrana plasmática, através da fosforilação pela PKG, levando a um aumento do sequestro e da extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$ , respectivamente, diminuindo assim a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ; (3) diminuição da formação do  $\text{IP}_3$  e conseqüente diminuição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques como o RS; (3) redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  via AMPc/PKA por diminuir o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  indiretamente, por hiperpolarização, ou por agir diretamente nos  $\text{Ca}_v$  do tipo 1 inativando-os e finalmente (4) diminuição da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  por ativação do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (BLAUSTEIN, 1989).

Os canais de cálcio e potássio estão intimamente relacionados com a regulação do músculo liso (WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005). A principal

porta de entrada para o  $\text{Ca}^{2+}$  que vem do meio extracelular são os  $\text{Ca}_v$  (CATTERALL, 2000), os quais estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). A entrada de cálcio em músculo liso visceral é controlada pelo potencial de membrana, uma vez que este determina a abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (SHMIGOL; EISNER; WRAY, 1998; WRAY et al., 2001).

Pelo menos 10 tipos diferentes de  $\text{Ca}_v$  subdivididos em três grandes famílias já foram descritos: (1) sensíveis a di-hidropiridina e ativados por alta voltagem ( $\text{Ca}_v1$ ); (2) insensíveis a di-hidropiridina e ativados por alta voltagem, ( $\text{Ca}_v2$ ); e (3) ativados por baixa voltagem ( $\text{Ca}_v3$ ), (ERTEL et al., 2000; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). Os  $\text{Ca}_v1.2$  são amplamente expresso no corpo humano (músculo cardíaco, músculo liso, células endócrinas, neurônios) (CATERRALL et al., 2005) e acoplados a despolarização de membrana em muitos processos celulares essenciais, incluindo ativação da transcrição (DOLMETSCH et al., 2001), exocitose (ARTALEJO; ADAMS; FOX, 1994), contração muscular (CLEEMANN; MORAD, 1991; LOPEZ-LOPEZ et al., 1995), entre outros.

Os  $\text{Ca}_v1$  sensíveis à di-hidropiridínicas são os principais e muitas vezes o único tipo de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  expresso em muitos músculos lisos (THORNELOE; NELSON, 2005; WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005). A subunidade  $\alpha1$  dos  $\text{Ca}_v$  é a formadora de poros e fornece o sítio de ligação extracelular para praticamente todos os agonistas e antagonistas, como por exemplo os derivados di-hidropiridínicos (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007).

O fluxo dos íons  $\text{K}^+$  através de canais localizados na membrana regulam o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos  $\text{Ca}_v$  (THORNELOE; NELSON, 2005). Os canais de potássio desempenham um papel chave na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular, sendo a contração no músculo liso dependente do balanço entre o aumento da condutância ao íon  $\text{K}^+$ , levando a uma hiperpolarização, e a diminuição da condutância ao  $\text{K}^+$ , levando a uma despolarização (KNOT et al., 1996).

Os canais de  $\text{K}^+$  são reguladores fundamentais da excitabilidade celular. Eles estão envolvidos em várias funções fisiológicas, tais como, potencial de membrana celular e secreção de hormônios e de neurotransmissores. Sua atividade pode ser regulada por voltagem,  $\text{Ca}^{2+}$  ou por neurotransmissores e

consequentemente as vias de sinalização que eles estimulam (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007).

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

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

O útero é um órgão oco, revestido de musculatura lisa bem diferenciada, possuindo três camadas: endométrio, miométrio (camada muscular lisa espessa) e serosa (camada externa) (AGUILLAR; MITCHELL, 2010).

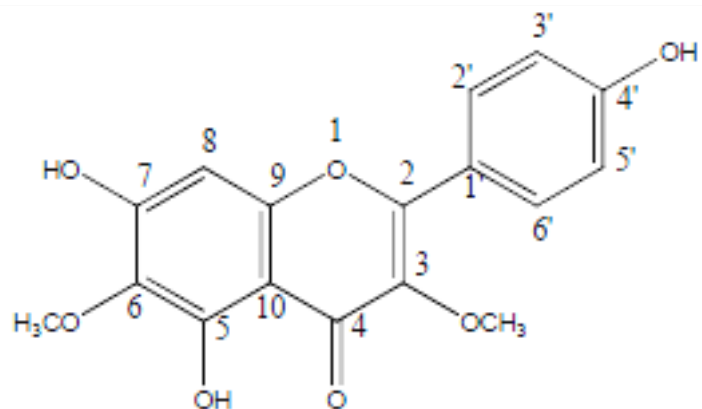
Tem havido um progresso notável para o entendimento da fisiologia e fisiopatologia do útero, o que resultou em muitas intervenções importantes que afetam a concepção e contracepção, bem como a função menstrual. Embora haja crescente conscientização da importância potencial da função anormal da camada muscular do útero (miométrio), há relativamente poucos estudos sobre o papel do miométrio em doenças mais frequentes da reprodução (AGUILLAR; MITCHELL, 2010).

A função do miométrio é de vital importância em processos fisiológicos como implantação do embrião e na manifestação de distúrbios como dismenorreia, a qual ocorre por um descontrole das contrações uterinas (AGUILLAR; MITCHELL, 2010). A dismenorreia é uma síndrome caracterizada por um ou mais sintomas que se manifestam no período pré ou intramenstrual. A dor geralmente é mais intensa no primeiro dia da menstruação e, em mais de 50% dos casos, é acompanhada por outros sintomas como náuseas, vômitos, palidez, cefaleia, diarreia, vertigem e desmaio (FONSECA, 2000). Essa contração exagerada promove a redução do fluxo vascular uterino, causando hipóxia e isquemia, aumentando ainda mais o quadro doloroso (BORTOLETO, 1995). Acredita-se que cerca de 50% a 90% das mulheres apresentem cólica uterina em

algum momento de suas vidas, sendo que 10% das pacientes tornam-se incapazes de desenvolver suas atividades habituais em decorrência da dor (MOTTA, 2000).

Tendo em vista a importância dos flavonoides, no tocante a serem metabólitos secundários produzidos pelas plantas, e uma vez que vários destes metabólitos apresentam atividade espasmolítica através de diferentes mecanismos de ação e sendo ainda descrito na literatura que há poucos estudos relacionados tanto à fisiologia como à fisiopatologia uterina, resolveu-se investigar a potencial atividade espasmolítica de FGAL sobre útero isolado de rata e seu provável mecanismo de ação em nível funcional.

# Objetivos



## **2. OBJETIVOS**

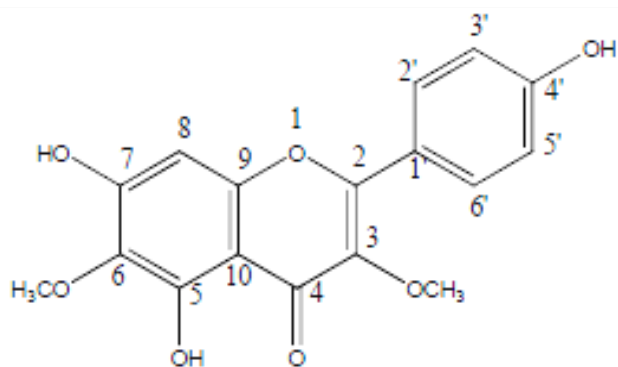
### **2.1 Geral**

Contribuir para o estudo farmacológico de *Piptadenia stipulaceae* (Benth) Ducke (Fabaceae), investigando o mecanismo de ação tocolítico do 3,6-dimetil éter galetina (FGAL), isolado das partes aéreas desta planta em útero isolado de rata.

### **2.2 Específicos**

- a) Avaliar o antagonismo de FGAL frente contrações cumulativas induzidas por ocitocina.
- b) Avaliar o efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina.
- c) Investigar o efeito de FGAL sobre os canais para cálcio dependentes de voltagem.
- d) Investigar o efeito de FGAL sobre os canais para potássio.
- e) Determinar qual(ais) subtipo(s) de canais para potássio está(ão) envolvido(s) no mecanismo de ação tocolítico de FGAL.
- f) Investigar a participação dos nucleotídeos cíclicos como moduladores do efeito tocolítico de FGAL.

# Material e Métodos



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Material Botânico

A espécie *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke foi coletada no município de Serra Branca, estado da Paraíba, em abril de 2005. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do setor de botânica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF). Uma exsicata da planta se encontra depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) sob código de identificação AGRA 3331 (JPB) (Figura 3).



**Figura 3.** *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. **A** árvore; **B** galhos  
(Fonte: [www.cnip.org.br](http://www.cnip.org.br))

##### 3.1.2 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) virgens pesando entre 200 e 250g, todas procedentes do Biotério “Prof. Thomas George” do Centro de Biotecnologia (CBiotec).

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Purina) com livre acesso a água, com ventilação e temperatura ( $21 \pm 1$  °C) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h sendo o período claro das 06h00 às 18h00.

Para os experimentos *in vitro* em nível funcional, todos os animais eram eutanasiados seguindo os princípios de cuidados com animais aprovados pelo Comitê de Ética em Utilização Animal do CBiotec (CEUA/CBiotec), certidão número 0303/11.

### **3.1.3 Drogas e Reagentes**

O bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio bi-hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio hexa-hidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), fosfato monossódico mono-hidrato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e glicose foram obtidos da Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ, EUA), cloreto de cério (CsCl), cloreto de tetraetilamônio ( $\text{TEA}^+$ ), glibenclamida, apaminutosa, 4-aminutosopiridina (4-AP), aminutosofilina, o dietilestilbestrol e óleo de castor (cremophor<sup>®</sup>) foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, MO, EUA). A ocitocina foi obtida da Eurofarma (Brasil)

A mistura carbogênica (95 % de  $\text{O}_2$  e 5 % de  $\text{CO}_2$ ) foi obtida da White Martins.

As partes aéreas de *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. foram secas, moídas e extraídas a frio com etanol, obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB), que após extração líquido/líquido com solventes orgânicos obteve-se as fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica. A fase clorofórmica forneceu três flavonóides: santina, desmetoxicentaureidina e galetina 3,6-dimetil éter (FGAL).

### **3.1.4 Soluções Nutritivas**

Foi utilizada solução nutritiva de Locke Ringer, aerada com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>). O pH era ajustado para valores entre 7,2 e 7,4 com solução de HCl ou NaOH (1N) e mantida a temperatura constante de 32 ± 1 °C. A composição desta solução está descrita a seguir.

**Tabela 1.** Composição da solução de Locke Ringer (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 2000).

| Substância         | Concentração (mM) |
|--------------------|-------------------|
| NaCl               | 154,0             |
| KCl                | 5,63              |
| CaCl <sub>2</sub>  | 2,16              |
| MgCl <sub>2</sub>  | 2,10              |
| Glicose            | 5,55              |
| NaHCO <sub>3</sub> | 5,95              |

**Tabela 2.** Composição da solução de Locke Ringer nominutossalmente sem cálcio.

| Substância         | Concentração (mM) |
|--------------------|-------------------|
| NaCl               | 154,0             |
| KCl                | 5,63              |
| MgCl <sub>2</sub>  | 2,10              |
| Glicose            | 5,60              |
| NaHCO <sub>3</sub> | 6,00              |

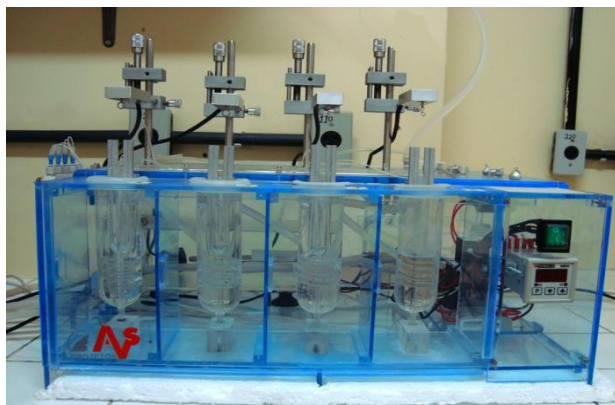
### **3.1.5 Preparação da solução-estoque da substância em estudo**

FGAL era solubilizada em cremophor® e diluída em água destilada para obtenção da solução estoque ( $10^{-2}$  M, 3% cremophor® v/v) a qual era estocada em “freezer” a uma temperatura de 4 a 8 °C, sendo novamente diluída em água destilada de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. A concentração final de cremophor® nas cubas nunca excedera 0,01% (v/v). Nesta concentração o cremophor® é desprovido de efeito contrátil ou relaxante significativo no órgão estudado, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório.

### **3.1.6 Aparelhos**

Para registro das contrações isométricas e isotônicas os órgãos eram suspensos em cubas de vidro (5 mL) aquecidas à temperatura adequada por bombas termostáticas modelo 597 FISATOM (São Paulo, SP, Brasil) e modelo Polystat 12002 Cole-Parmer (Vernon Hills, IL, EUA). As contrações isométricas também foram registradas através de transdutores de força TIM-50 AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil) que estavam acoplados em um amplificador AECAD 04F que por sua vez estava conectado a um computador contendo o programa AQCAD versão 2.03 ambos da AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil) (Figura 4).

As contrações isotônicas eram registradas por meio de uma alavanca isotônica de inscrição frontal em cilindros esfumaçados de um quimógrafo DTF (São Paulo, SP, Brasil). Os valores de pH eram aferidos através de um pHmetro digital modelo PG 2000 GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil). As substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG200 e os animais em balança semi-analítica ambas da GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil) (Figura 5)

**A****B****C****D****E**

**Figura 4.** Aparelhos utilizados para o registro de contrações: aparato para registro das contrações isotônicas com cilindro esfumado de um quimógrafo (**A**), transdutor de força FORT-10 (**B**), cuba de banho para órgão isolado (**C**), sistema de banho para órgão isolado com transdutor de força isométrico TIM-50 (**D**), amplificador AECAD 04F (**E**) acoplado a sistema digital.



**Figura 5.** Fotos do pHmetro digital e da balança analítica.

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Investigação do mecanismo de ação tocolítico de FGAL em útero isolado de rata**

#### **3.2.1.1 Caracterização do antagonismo da contração induzida por ocitocina.**

As ratas eram tratadas 24 h antes do início dos experimentos com dietilestilbestrol (1 mg/kg s.c.) para indução do estro. Decorrido este tempo, eram eutanasiadas. Após abertura da cavidade abdominotômica, era feita a dissecação do útero, colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Locke Ringer a 32 °C. Em seguida, os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de vidro (5 mL). Para estabilização da preparação, esta era mantida em repouso por 40 minutos antes do contato com qualquer agente, sob tensão de repouso de 1 g, efetuando, neste período, a renovação da solução nutritiva a cada 10 minutos. Após o período de estabilização, duas curvas concentração-resposta cumulativas similares à ocitocina ( $10^{-5}$  –  $3 \times 10^{-1}$  M) eram obtidas. Em seguida, na ausência da ocitocina, FGAL era incubada por 15 minutos em diferentes concentrações e em experimentos independentes. Após este período, ainda na presença de FGAL, uma nova curva concentração-resposta cumulativa à ocitocina era obtida. Os resultados foram avaliados comparando-se a porcentagem da resposta contrátil na presença de FGAL com aquela obtida pela amplitude média das curvas controle na ausência do mesmo.

O tipo de antagonismo exercido por FGAL foi analisado com base nos valores da inclinação do gráfico de Schild (ARUNLAKSHANA; SCHILD, 1959)

e sua potência pelo valor do  $pD'_2$ , que é definido como logaritmo negativo (na base 10) da concentração molar de um antagonista que reduz a 50% uma resposta máxima de um agonista (VAN ROSSUM, 1963)

### **3.2.1.2 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina**

O útero era montado como descrito no item 3.2.1.1. Após o período de estabilização, eram obtidas duas curvas concentrações-resposta de amplitude similares induzidas por 60 mM de KCl ou  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina, de amplitudes similares, em preparações diferentes, registrada através de transdutores isométricos acoplados a um sistema de aquisição digital. Durante a fase tônica sustentada da segunda resposta, FGAL era adicionada cumulativamente à cuba.

O relaxamento produzido foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelos agentes contráteis. O  $pD_2$  foi obtido a partir dos valores de  $CE_{50}$  (calculados pelo uso da regressão não linear de cada curva concentração-resposta de relaxamento para FGAL) de cada um dos experimentos.

### **3.2.2 Avaliação do envolvimento dos canais para cálcio no mecanismo de ação tocolítico de FGAL**

#### **3.2.2.1 Efeito de FGAL sobre o influxo de $Ca^{2+}$ em meio despolarizante nominutosalmente sem cálcio**

O útero era montado como descrito no item 3.2.1.1. O tecido permanecia em repouso por 40 minutos em contato com a solução de Locke Ringer que era substituída pela solução Locke Ringer nominutosalmente sem  $Ca^{2+}$  também por 40 minutos e, logo em seguida, era adicionado 60 mM de KCl por 10 minutos. Assim, eram induzidas duas curvas cumulativas ao  $CaCl_2$  de magnitudes similares (curvas controle). As contrações isotônicas eram registradas por uma alavanca de inscrição frontal em cilindros esfumados de um quimógrafo (DTF, Brasil). Após estas respostas, as preparações eram lavadas e FGAL era incubada por 15 minutos em preparações diferentes. Após este período, uma terceira curva cumulativa ao  $CaCl_2$  era obtida ainda na presença de

FGAL em concentrações diferentes e independentes. O tipo de antagonismo exercido pelo flavonoide foi analisado com base na análise de Schild (Arunlakshana & Schild, 1959).

### **3.2.3 Avaliação do envolvimento dos canais para potássio no mecanismo de ação tocolítico de FGAL**

#### **3.2.3.1 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl)**

O útero era montado como descrito no item 3.2.1.1. Após o período de estabilização, eram obtidas duas curvas concentração-resposta de amplitude similar com  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina, em preparações diferentes, antes da segunda curva concentração-resposta o CsCl 5 mM, bloqueador não seletivo dos canais para potássio, era incubado por 20 minutos (LATORRE et al., 1989). Durante a fase tônica sustentada da segunda contração, FGAL era adicionado cumulativamente à cuba. O relaxamento produzido por FGAL foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pela ocitocina. Os valores de pD2 foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença de 5 mM de CsCl.

#### **3.2.3.2 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de 4-aminotosopiridina (4-AP), glibenclamida, apaminutosa, tetraetilamônio (TEA<sup>+</sup>).**

O útero era montado como descrito no item 3.2.1.1. O tecido permanecia em repouso por 40 minutos em contato com a solução de Locke Ringer. Após este período era induzida uma contração pela adição de  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico da contração era adicionando FGAL de forma cumulativa (curva controle). Em outro experimento, era adicionado à cuba 3 mM de 4-AP, um bloqueador dos canais para potássio abertos por voltagem ( $K_V$ ) (AARONSON et al., 2006),  $3 \times 10^{-5}$  M de glibenclamida, um bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) (HUGHEST; HOLLINGSWORTH, 1997), 100 nM de apaminutosa, um bloqueador de canais para potássio de pequena condutância ativados pelo  $Ca^{2+}$  ( $SK_{Ca}$ ) (TSAI et al., 1998), 1 mM de

tetraetilamônio ( $\text{TEA}^+$ ), que nessa concentração é um bloqueador seletivo dos canais para potássio de grande condutância ativados pelo  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) (HUANG, 1998, MURRAY et al., 1991) por 20 minutos. Após esse período uma nova contração era obtida pela adição de  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina era induzida na presença desses bloqueadores. Durante a fase tônica sustentada da segunda contração, FGAL era adicionado cumulativamente à cuba, em preparações diferentes. O relaxamento produzido pelo FGAL foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pela ocitocina. Os valores de  $\text{pD}_2$  foram calculados como descrito anteriormente.

### **3.2.4 Investigação da participação dos nucleotídeos cíclicos no mecanismo de ação tocolítico do FGAL**

#### **3.2.4.1 Efeito do FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de aminutosofilina**

O útero era montado como descrito no item 3.2.1.1. Após o período de estabilização, eram obtidas duas curvas concentração-resposta de amplitude similar com  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina. Em seguida, antes da segunda contração, a preparação era incubada por 20 minutos com  $10^{-4}$  M de aminutosofilina, inibidor inespecífico das enzimas fosfodiesterases (URUNO et al., 1974) e, ainda na sua presença, uma nova contração induzida por ocitocina era obtida. Em seguida, FGAL era adicionado cumulativamente sobre a fase tônica da contração. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo agente contrátil na ausência e na presença da aminofilina. Os valores de  $\text{pD}_2$  foram calculados como descrito anteriormente.

### **3.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os resultados foram expressos como a média  $\pm$  o e.p.m. e analisados estatisticamente empregando-se o teste  $t$  não pareado ou análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do teste de Bonferroni, onde valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

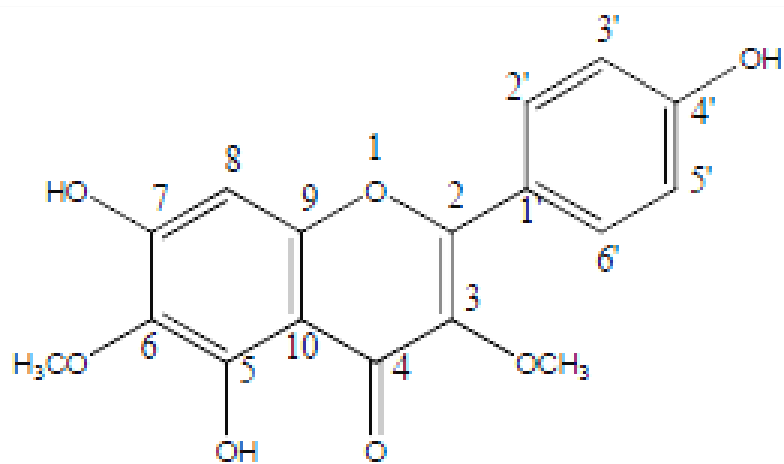
Os valores de  $\text{pD}_2$  logaritmo negativo (na base 10) da concentração em molar de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo foram

calculados por regressão não linear para todos os experimentos realizados (NEUBIG et al., 2003).

A inclinação do gráfico de Schild, que provê informação sobre a natureza do antagonismo, foi calculada por regressão linear baseada nas equações de Schild (ARUNLAKSHANA; SCHILD, 1959), onde foram usados os valores de  $\log(DR-1)$  em função do log das concentrações da substância testada. Também foram calculados os valores de  $r^2$  (coeficiente de regressão linear) que provê informações sobre a correlação concentração-resposta e os valores de  $pD'_2$  (parâmetro de potência do antagonista), obtidos por regressão linear.

Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 5.01 GraphPad Software Inc. (San Diego, CA, USA).

# Resultados

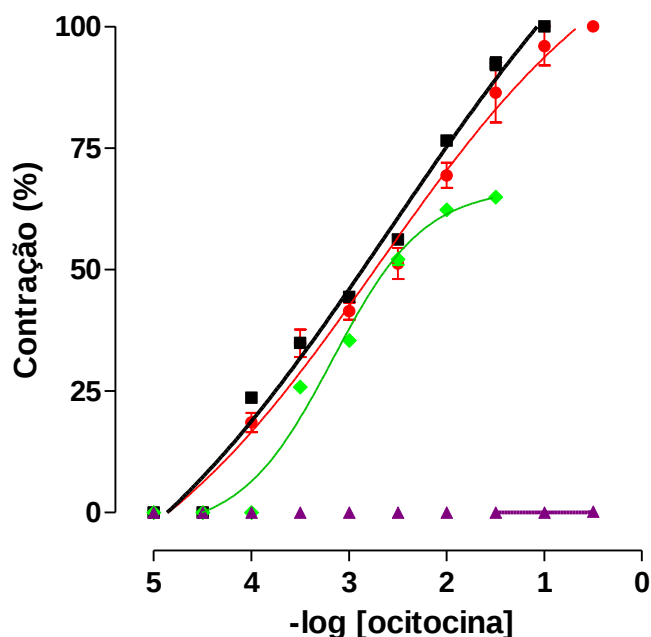


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Investigação do mecanismo de ação tocolítico de FGAL em útero isolado de rata

#### 4.1.1 Característica do antagonismo da contração induzida por ocitocina

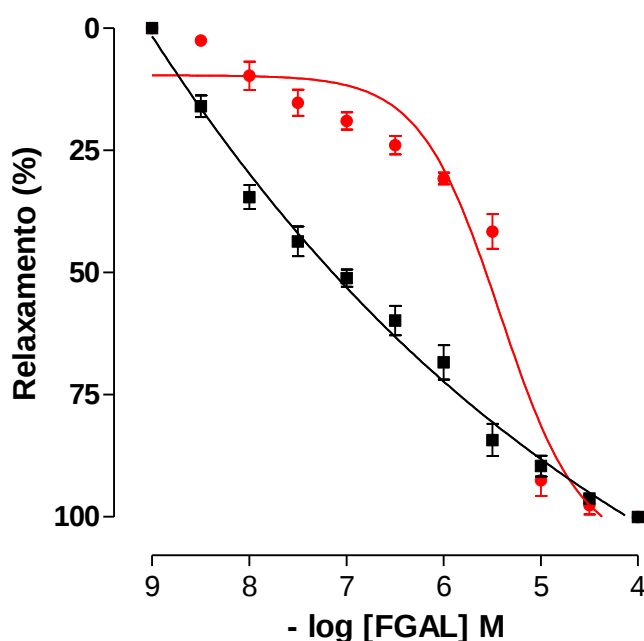
FGAL, nas concentrações de  $10^{-6}$  M,  $3 \times 10^{-6}$  M e  $10^{-5}$  M, inibiu de maneira dependente de concentração ( $r^2 = 0,95 \pm 0,01$ ) as contrações cumulativas induzidas por ocitocina em útero isolado de rata com desvio da curva controle para a direita de maneira não paralela e com redução do  $E_{\max}$  (Gráfico 1). A análise do gráfico de Schild (Gráfico 1B e 2B) indica um antagonismo do tipo não competitivo exercido por FGAL que foi confirmado pelo valor de “slope” =  $0,15 \pm 0,04$  que diferiu significativamente da unidade para ocitocina. A potência de FGAL em antagonizar as contrações cumulativas induzidas por ocitocina foi determinada pelo valor de  $pD'_2 = 3,4 \pm 0,1$ .



**Gráfico 1.** Curvas concentrações-resposta cumulativas a ocitocina na ausência (■) e na presença de FGAL nas concentrações de  $10^{-6}$  (●),  $3 \times 10^{-6}$  (◆) e  $10^{-5}$  M (▲) em útero isolado de rata ( $n = 5$ ). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way” seguido por Bonferroni, \*\*\* $p < 0,001$  (controle vs. FGAL).

#### 4.1.2 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina ou KCl

FGAL ( $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M) induziu relaxamento de maneira significativa ( $pD_2 = 5,6 \pm 0,06$ ) e dependente de concentração ( $r^2 = 0,94$ ) no útero pré-contráído por 60 mM de KCl, ( $n = 5$ ). Da mesma forma, FGAL ( $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M) relaxou de maneira significativa ( $pD_2 = 6,9 \pm 0,1$ ) e dependente de concentração ( $r^2 = 0,97$ ) o útero pré-contráído por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina (Gráfico 2). No entanto, FGAL mostrou-se cerca de 20 vezes mais potente em relaxar o útero pré-contráído com ocitocina quando comparado com KCl. Em até 45 minutos após a retirada de FGAL da cuba, os agentes contráteis produziram contrações com a mesma amplitude em relação a contração inicial, indicando que o efeito do flavonóide é reversível neste órgão.

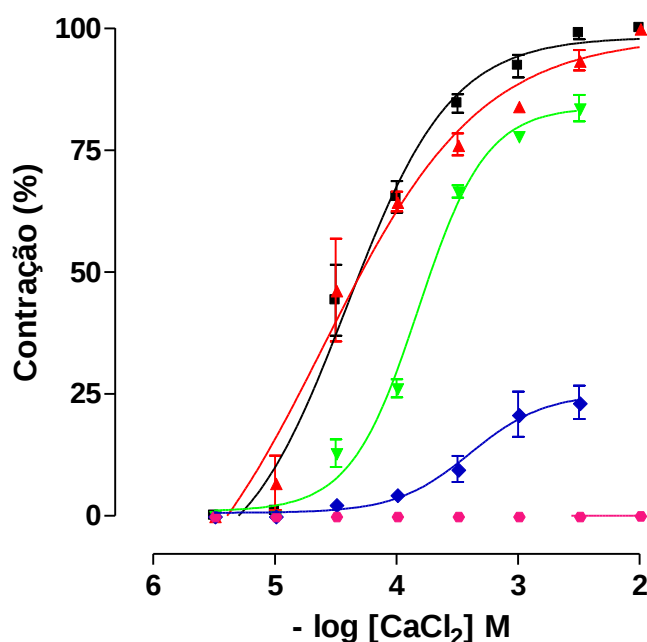


**Gráfico 2.** Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina (■) e 60 mM de KCl (●) em útero isolado de rata ( $n = 5$ ). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

#### 4.2 Avaliação do envolvimento dos canais para cálcio no mecanismo de ação tocolítico de FGAL

#### 4.2.1 Efeito de FGAL sobre as contrações cumulativas induzidas por $\text{Ca}^{2+}$ em meio despolarizante nominalmente sem cálcio

FGAL, nas concentrações de  $10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  M, antagonizou as contrações induzidas cumulativamente ao  $\text{CaCl}_2$  em meio despolarizante (60mM de KCl) e nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  em útero isolado de rata. O que foi evidenciado pelo desvio da curva controle (Gráfico 3) para a direita de maneira não paralela e com diminuição do efeito máximo ( $E_{\text{max}} = 100\%$ ;  $86,6\% \pm 1,2$ ;  $23,3\% \pm 1,5$ ) na presença de diferentes concentrações de FGAL.

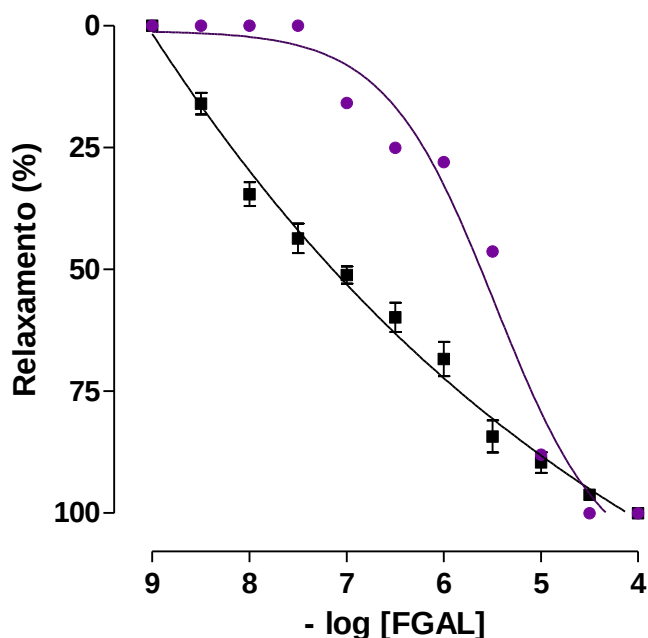


**Gráfico 3.** Curvas concentrações-resposta cumulativas ao  $\text{CaCl}_2$  na ausência (■) e na presença de FGAL nas concentrações de  $10^{-6}$  (▲),  $3 \times 10^{-6}$  (▼),  $10^{-5}$  M (◆) e  $3 \times 10^{-5}$  (●) M em útero isolado de rata ( $n = 5$ ). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way” seguido por Bonferroni, \*\*\* $p < 0,001$  (controle vs. FGAL)

#### 4.3 Avaliação do envolvimento dos canais para potássio no mecanismo de ação tocolítico de FGAL

#### 4.3.1 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl)

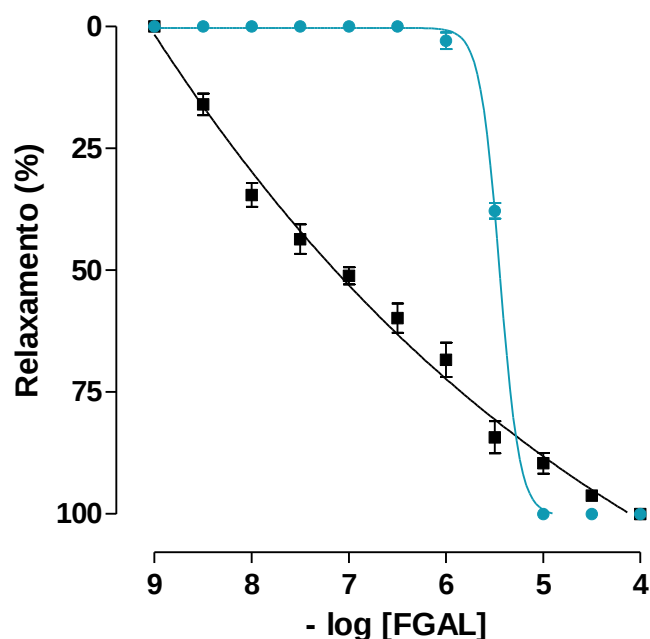
FGAL ( $10^{-9}$  –  $10^{-4}$  M) relaxou o útero isolado de rata pré-contráído com ocitocina na ausência ( $pD_2 = 6,9 \pm 0,1$ ) e na presença ( $pD_2 = 5,6 \pm 0,01$ ) de 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais para potássio. A potência relaxante de FGAL foi reduzida significativamente cerca de vinte vezes ( $p < 0,0001$ ) quando comparada ao relaxamento produzido pelo flavonóide na ausência do CsCl (Gráfico 4). Tanto na presença como na ausência do bloqueador o valor de  $E_{max} = 100\%$  foi alcançado.



**Gráfico 4.** Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 5 mM de CsCl, em útero isolado de rata ( $n = 5$ ). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

#### 4.2.2 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de 4-aminopiridina (4-AP)

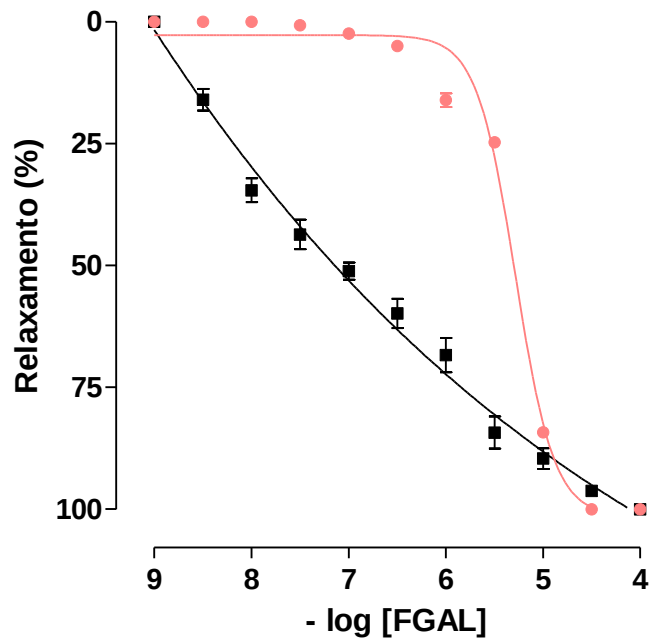
FGAL ( $3 \times 10^{-7} - 10^{-4}$  M) relaxou o útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina na ausência ( $pD_2 = 6,9 \pm 0,1$ ) e na presença ( $pD_2 = 5,4 \pm 0,008$ ) de 3 mM de 4-AP, um bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis a voltagem ( $K_V$ ). A potência relaxante de FGAL foi diminuída cerca de 30 vezes na presença de 4-AP (Gráfico 5). Tanto na presença como na ausência do bloqueador o valor de  $E_{max} = 100\%$  foi atingido.



**Gráfico 5.** Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 3 mM de 4-AP, em útero isolado de rata ( $n = 5$ ). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

#### 4.2.3 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de glibenclamida

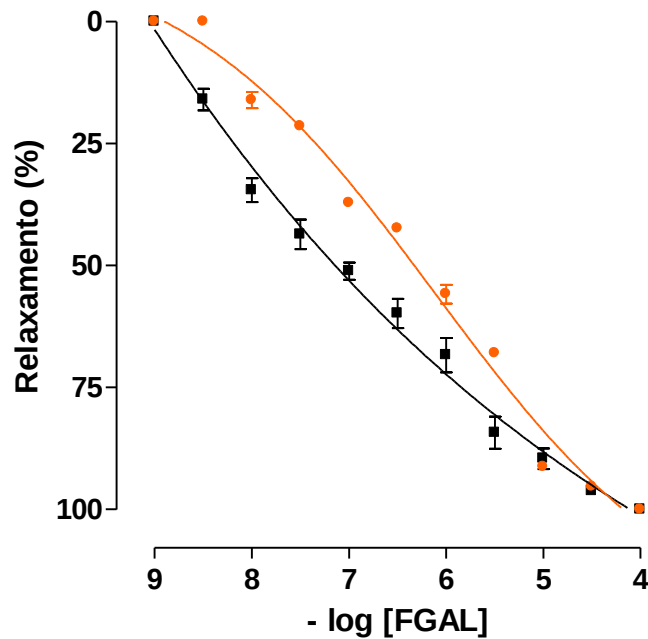
FGAL ( $10^{-8} - 3 \times 10^{-5}$  M) relaxou o útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina na ausência ( $pD_2 = 6,9 \pm 0,1$ ) e na presença ( $pD_2 = 5,3 \pm 0,009$ ) de  $3 \times 10^{-5}$  M de glibenclamida, um bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ). A potência relaxante de FGAL foi diminuída em torno de 30 vezes na presença de glibenclamida (Gráfico 6). Tanto na presença como na ausência do bloqueador o valor de  $E_{max} = 100\%$  foi atingido.



**Gráfico 6.** Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de  $3 \times 10^{-5}$  M de glibenclamida, em útero isolado de rata ( $n = 5$ ). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

#### 4.2.4 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de apamina

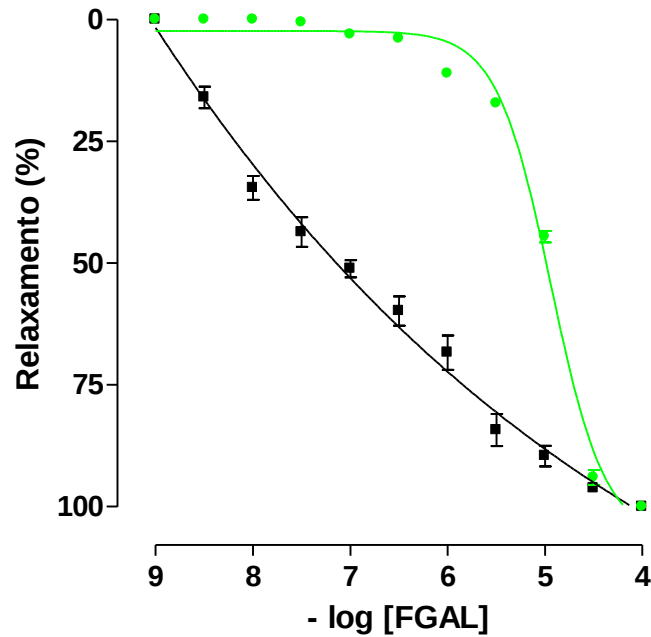
FGAL ( $3 \times 10^{-9} - 10^{-4}$  M) relaxou o útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina na ausência ( $pD_2 = 6,9 \pm 0,1$ ) e na presença ( $pD_2 = 6,3 \pm 0,02$ ) de 100 nM de apamina, um bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de pequena condutância ( $SK_{Ca}$ ). A potência relaxante de FGAL foi reduzida 4 vezes apenas quando comparada ao relaxamento produzido pelo flavonóide na ausência da apamina (Gráfico 7). Tanto na presença como na ausência do bloqueador o valor o  $E_{max} = 100\%$  foi atingido na concentração de  $10^{-4}$  M de FGAL .



**Gráfico 7.** Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 100 mM de apamina, em útero isolado de rata ( $n = 5$ ). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

#### 4.2.5 Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de tetraetilamônio ( $\text{TEA}^+$ )

FGAL ( $10^{-8} - 10^{-4}$  M) relaxou o útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina na ausência ( $\text{pD}_2 = 6,9 \pm 0,1$ ) e na presença ( $\text{pD}_2 = 5,0 \pm 0,08$ ) de 1 mM de  $\text{TEA}^+$ , um bloqueador seletivo dos canais para potássio grande condutância sensíveis ao cálcio ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ). A potência relaxante de FGAL foi reduzida 88 vezes ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao relaxamento produzido pelo flavonóide na ausência do tetraetilamônio (Gráfico 8). Tanto na presença como na ausência do bloqueador o valor do  $E_{\text{max}} = 100\%$  foi alcançado.

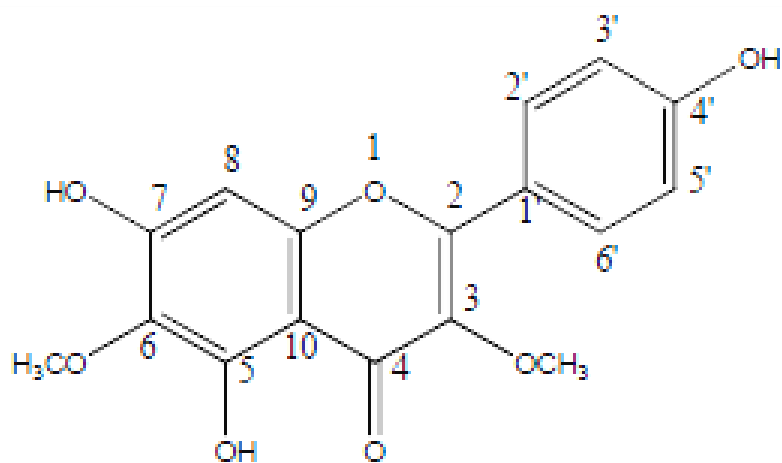


**Gráfico 8.** Efeito de FGAL sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 1 mM de  $\text{TEA}^+$ , em útero isolado de rata ( $n = 5$ ). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

**Tabela 2.** Valores de  $\text{pD}_2$  e  $\text{CE}_{50}$  de FGAL na ausência (controle) e na presença de diversos bloqueadores de canais para potássio.

| Bloqueador      | $\text{pD}_2$   |
|-----------------|-----------------|
| -               | $6,9 \pm 0,1$   |
| CsCl            | $5,6 \pm 0,01$  |
| 4-aminopiridina | $5,4 \pm 0,008$ |
| Glibenclamida   | $5,3 \pm 0,009$ |
| Apamina         | $6,3 \pm 0,02$  |
| $\text{TEA}^+$  | $5,0 \pm 0,008$ |

## Discussão



## 5 DISCUSSÃO

Evidenciou-se farmacologicamente neste trabalho que o flavonoide 3,6 dimetil éter (FGAL) isolado das partes aéreas de *Piptadenia stipulaceae* Benth Ducke, exerce seu efeito tocolítico em útero isolado de rata através da modulação positiva de canais para  $K^+$ , mais especificamente os canais para  $K^+$  de grande condutância ativados pelo cálcio ( $BK_{Ca}$ ), os canais para  $K^+$  de pequena condutância ativados pelo cálcio ( $SK_{Ca}$ ), os canais para  $K^+$  dependentes de voltagem ( $K_v$ ) e os canais para  $K^+$  sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ), além da participação indireta dos canais de cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ).

Em estudos anteriores, Macêdo (2010) demonstrou que FGAL apresentou efeito tocolítico por inibir as contrações fásicas induzidas por ocitocina e carbacol. Apresentando-se mais potente em inibir as contrações fásicas induzidas por ocitocina. Desta forma, decidiu-se investigar o possível mecanismo de ação tocolítica de FGAL em útero isolado de rata.

Para confirmar ou descartar a hipótese de que FGAL estaria agindo em nível de receptor de ocitocina, decidiu-se caracterizar o bloqueio exercido pelo flavonoide frente às curvas concentrações-resposta cumulativas induzidas por ocitocina. Foi observado um desvio das curvas para direita, de forma não-paralela e com redução do  $E_{max}$  (Gráfico 1), sugerindo um antagonismo do tipo não-competitivo, concluindo que FGAL não está agindo em nível de receptores de ocitocina de maneira direta para promover seu efeito tocolítico.

O íon  $Ca^{2+}$  é o principal sinal responsável pela ativação da contração do músculo liso (NEERING; MORGAN, 1980; MORGAN; MORGAN, 1982) sendo responsável também por desencadear uma variedade de processos celulares nos neurônios, músculos e muitas células não-excitáveis tendo como função mais importante a sinalização celular (BERRIDGE; DUPONT, 1995; BERRIDGE, 1997; BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998, BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000; BOOTMAN; LIPP; BERRIDGE, 2001; SCHUSTER; MARHL; HÖFER, 2002).

A contração do músculo liso é disparada principalmente pelo aumento da  $[Ca^{2+}]_c$ , e pode ser alcançada tanto via despolarização de membrana, levando ao aumento da  $[Ca^{2+}]_c$  através dos canais para cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ), como pela ligação do agonista a um receptor, que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003), originalmente designados por acoplamentos eletromecânico e fármaco-mecânico,

respectivamente (SOMLYO; SOMLYO, 1968). Agonistas como a ocitocina ligam-se a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata de fosfoinosítídeos, usualmente através da produção de  $IP_3$  mediada pelas proteínas  $G_q$  e  $G_{11}$ , estimulando, assim a liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS) (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). Os agonistas contráteis podem também elevar a  $[Ca^{2+}]_c$  através de receptores de rianodina e estimular a entrada de  $Ca^{2+}$  através dos múltiplos tipos de canais (SANDERS, 2001; McFADZEAN; GIBSON, 2002).

A principal porta de entrada para o  $Ca^{2+}$  que vem do meio extracelular são os canais de cálcio operados por voltagem ( $Ca_v$ ) (CATTERALL, 2000), os quais estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (ALEXANDER; MATHIE ; PETERS, 2007).

São canais iônicos proteicos formados por 4 ou 5 subunidades distintas: a subunidade  $\alpha_1$ , que é a maior delas e constitui o poro do canal, além de possuir o sensor de voltagem que controla sua abertura; a subunidade  $\alpha_2$  que esta ligada a subunidade  $\gamma$  e a subunidade  $\beta$  que é intracelular (CATTERALL et al., 2005)

Vários agentes contráteis causam uma resposta contrátil bifásica no músculo liso, consistindo em uma contração inicial transiente – componente fásico, seguido por uma contração sustentada – componente tônico, que se desenvolve lentamente e é mantida durante o período de exposição principalmente pelo influxo do  $Ca^{2+}$  pelos  $Ca_v$  (VAN BREEMEN; AARONSON; LOUTZENHISER, 1979; BOLTON, 1979).

Tendo em vista que os mecanismos envolvidos na manutenção da fase tônica da contração serem diferentes em relação aos da fase fásica (ABDELLATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989; HONDA; TAKANO; KAMIYA, 1996), resolveu-se então verificar se FGAL promoveria o relaxamento do útero pré-contraído com ocitocina e KCl.

Como a abertura dos  $Ca_v$  é um dos passos comum às vias de sinalização da ocitocina e do KCl com conseqüente influxo de  $Ca^{2+}$ , resultando na manutenção da fase tônica da contração (WRAY, 1993), levantou-se a hipótese de que FGAL poderia estar agindo por bloqueio do influxo de  $Ca^{2+}$  através dos  $Ca_v$  visto que houve relaxamento do músculo liso uterino na presença de FGAL tanto quando pré- contraído com ocitocina como por KCl (Gráfico 2).

Como mostra o gráfico 2, FGAL relaxou de maneira significativa o útero pré-contraído com KCl ( $pD_2 = 5,6 \pm 0,06$ ), assim como ocitocina ( $pD_2 = 6,9 \pm 0,1$ ) ( $E_{max} = 100\%$ ) e de maneira dependente de concentração sendo mais potente cerca de 20 vezes quando o órgão era pré-contraído com ocitocina. O fato de FGAL relaxar o útero pré-contraído com KCl 60 mM e ocitocina é sugestivo de que o mecanismo de ação espasmolítica do mesmo envolva bloqueio direto dos  $Ca_v$ .

Para confirmar a hipótese de que FGAL estaria bloqueando os  $Ca_v$  diminuindo o influxo  $Ca^{2+}$  e levando o útero ao relaxamento, decidiu-se caracterizar o provável bloqueio exercido pelo flavonoide frente às curvas concentrações-resposta cumulativas induzidas por  $CaCl_2$  em meio despolarizante e nominalmente sem  $Ca^{2+}$ . Foi observado um desvio das curvas para direita, de forma não-paralela e com redução do  $E_{max}$  (Gráfico 3), caracterizando um antagonismo do tipo não-competitivo, sugerindo que o relaxamento induzido por FGAL envolve o bloqueio indireto dos  $Ca_v$  em nível funcional.

Os canais de potássio desempenham um papel chave na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular, sendo a contração no músculo liso dependente do balanço entre 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 abridores de canais de  $K^+$  são substâncias que incluem um grupo de diversas moléculas com um largo potencial terapêutico (QUEST, 1992; EMPFIELD; RUSSELL; TRAINOR, 1995). Estes compostos abrem os canais de  $K^+$ , causando hiperpolarização de membrana através do aumento do efluxo de  $K^+$ , desta forma causando diminuição do  $Ca^{2+}$  intracelular livre e consequente relaxamento do músculo liso (QUEST; COOK, 1989; WESTON; EDWARDS, 1992).

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,  $Ca^{2+}$ , por neurotransmissores e consequentemente as vias de sinalização que eles estimulam, estímulos químicos e físicos, incluindo a tensão de oxigênio, pH, lipídios, estiramento mecânico, GPCRs, entre outros estímulos (LESAGE; LAZDUNSKI, 2000; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). O movimento dos íons  $K^+$  através de canais

localizados na membrana regulam indiretamente o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos  $\text{Ca}_v$  (THORNELOE; NELSON, 2005).

A associação entre o aumento da atividade dos canais para  $\text{K}^+$  e o relaxamento do músculo liso vem sendo estudada em vários tecidos. Alguns autores apresentam evidências da participação de vários canais para  $\text{K}^+$  na regulação do músculo liso, tanto em nível funcional como em nível eletrofisiológico, como por exemplo:  $\text{K}_v$  em íleo de cobaia (LIMA, 2004; CAVALCANTE, 2008) e aorta de rato (RIBEIRO et al., 2007a).  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  em íleo de cobaia (SILVA; NOUAILHETAS; ABOULAFIA, 1999; CAVALCANTE, 2001; CAVALCANTE, 2008; LIMA, 2008), músculo longitudinal de íleo de cobaia (UYAMA; IMAIZUMI; WATANABE, 1993), traquéia de cobaia (HIRAMATSU et al., 1994, RIBEIRO, 2007), artéria mesentérica de rato (OLIVEIRA et al., 2004), traquéia de cão (WADE; SIMS, 1993), traquéia de porco (KUME et al., 1994; KANNAN; JOHNSON, 1995; YAMAKAGE; HIRSHMAN; CROXTON, 1996), útero de rata (LIMA, 2008, TRAVASSOS et al. 2009), 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).  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  em íleo de cobaia (CAVALCANTE, 2008, MACÊDO, 2008), útero de rata (SILVA; OKUYAMA; PAIVA, 1996) e em aorta de rato (SILVA et al., 1994).  $\text{K}_{\text{ATP}}$  em íleo de cobaia (CAVALCANTE, 2008, MACÊDO, 2008), traquéia de cobaia (SHIKADA; TANAKA, 1995), músculo longitudinal de íleo de rato (DAVIES; McCURRIE; WOOD, 1996) e de cobaia (SUN; BENISHIN, 1994), em uretra de cobaia (TERAMOTO; BRADING; ITO, 1999) e em traquéia de gato (TERAMOTO; NAKASHIMA; ITO, 2000).

O efluxo de potássio em células miométriais resulta em repolarização de membrana e este efluxo é a corrente iônica primária responsável pela manutenção do potencial de repouso no útero (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

No músculo liso uterino, os mais abundantes e mais bem estudados canais para  $\text{K}^+$  são:  $\text{K}_v$ ;  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ;  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ;  $\text{K}_{\text{ATP}}$  (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007). Substâncias que abrem os canais de  $\text{K}^+$ , compreendem um grupo diverso de moléculas com um amplo uso terapêutico (EMPFIELD et al., 1995). Esses compostos abrem os canais de  $\text{K}^+$ , causando hiperpolarização através do aumento do efluxo de  $\text{K}^+$  e conseqüente redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  seguido de relaxamento do músculo liso (QUEST; COOK, 1989).

No presente estudo, a participação dos canais para  $K^+$  no efeito tocolítico do flavonoide foi investigada em nível funcional, utilizando-se bloqueadores desses canais como ferramentas farmacológicas. Uma vez que a potência relaxante de FGAL na presença de CsCl, bloqueador não seletivo dos canais para  $K^+$ , foi reduzida significativamente em aproximadamente 20 vezes, ocorrendo um desvio da curva de relaxamento de FGAL para direita no útero pré-contraído com ocitocina é sugestivo de que haja a participação de canais para  $K^+$  no mecanismo de ação tocolítica do flavonoide em útero isolado de rata (Gráfico 4).

Os canais para  $K^+$  sensíveis a voltagem ( $K_V$ ) são amplamente expressos no músculo liso uterino. Cada canal é composto de quatro subunidades, sendo que cada subunidade (S) possui seis regiões hidrofóbicas (S1-S6), que formam o domínio transmembrana. Essas regiões hidrofóbicas são ligadas por seqüências de aminoácidos hidrofílicos, os quais são expostos no espaço intra- ou extracelular. Cada subunidade contém um domínio carboxi- e amino-terminal citoplasmático. A região S4 é carregada, contendo um aminoácido básico (lisina ou arginina) a cada três resíduos, sendo essa região um importante componente do sensor de voltagem. A via de permeação do canal é formada, em parte, pela região de ligação das seqüências transmembrana S5 e S6 e é chamada de H5 ou região do poro (JAN; JAN, 1992)

É fundamentado na literatura que os  $K_V$  contribuem para o potencial de repouso nesta células, uma vez que em resposta a despolarização, o efluxo de  $K^+$  através destes canais induz repolarização das células para restabelecer o potencial de repouso no músculo liso uterino (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007). Dessa forma, levantou-se a hipótese de que FGAL poderia estar induzindo o efeito tocolítico por ativação dos  $K_V$  que ao repolarizar a membrana levaria indiretamente ao bloqueio do influxo de  $Ca^{2+}$  via  $Ca_V$  e por fim ao relaxamento muscular liso. Para confirmar ou descartar essa hipótese, resolveu-se avaliar o efeito relaxante de FGAL na presença e na ausência da 4-AP, um bloqueador seletivo dos  $K_V$ , e o observado foi que há a participação dos  $K_V$  no mecanismo de ação tocolítica de FGAL, uma vez que na presença de 4-AP a potência relaxante do flavonoide foi diminuída cerca de 30 vezes (Gráfico 5).

Os canais para  $K^+$  sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) estão presentes em vários tipos de músculos lisos. Estes canais tem como principal característica a sua abertura ser inibida por concentrações basais de ATP intracelular, por

sulfoniluréias e por baixas concentrações de  $Ba^{2+}$  (STANDEN et al., 1989; SANBORN, 2000). No entanto, sabe-se que existem subtipos de  $K_{ATP}$  que são relativamente insensíveis aos níveis basais de ATP, mas são bloqueados seletivamente pela glibenclamida, utilizada na terapêutica no tratamento de diabetes tipo 2 (MISHRA; AARONSON, 1999).

Os  $K_{ATP}$  são um complexo de pelo menos duas proteínas. A estequiometria destes canais consiste de um tetrâmero de subunidades Kir6.0 (principalmente Kir6.1 e Kir6.2), que forma o poro do canal, rodeada de quatro proteínas SUR. Para formar um canal funcional, ambas as subunidades SUR e Kir6.1 ou Kir6.2 são essenciais, já que nenhum canal é formado quando essas proteínas são expressas sozinhas. São as subunidades SUR que conferem ao canal sensibilidade às sulfoniluréias e aos abridores do canal, como o diazóxido, e uma vez que essas subunidades possuem o domínio de ligação de nucleotídeos, elas também conferem sensibilidade ao ATP (STANDEN, 1997). A isoforma predominante dos  $K_{ATP}$  em células miométriais é a  $K_{ir6.1}/SUR2B$ , apesar da isoforma  $K_{ir6.2}/SUR1$  também já ter sido evidenciada (CHIEN et al., 1999; CURLEY et al., 2002). Os ativadores dos  $K_{ATP}$  diminuem as contrações uterinas, no entanto, eles são mais potentes em miométrio humano não grávido do que em grávido (SANBORN, 2000).

Para avaliar se os  $K_{ATP}$  estariam participando do mecanismo de ação espasmolítica de FGAL em útero isolado de rata, avaliou-se o efeito do flavonoide na presença de glibenclamida, inibidor seletivo destes canais, e observou-se que a curva de relaxamento induzida pelo flavonoide no útero pré-contraído com ocitocina foi alterada na presença de glibenclamida (Gráfico 6), sugerindo que esse tipo de canal para  $K^+$  está participando do efeito tocolítico promovido pelo FGAL, visto que sua potência foi diminuída cerca de 30 vezes na presença do bloqueador.

Os canais para  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ) contribuem para a repolarização do potencial de ação e são divididos em três grandes famílias com base em suas condutâncias, cinética e farmacologia (SAH; FABER, 2002): 1)  $SK_{Ca}$ , são bloqueados por apamina; 2) canais para  $K^+$  de condutância intermediária ativados por  $Ca^{2+}$  ( $IK_{Ca}$ ) bloqueados pelo clotrimazole, e 3)  $BK_{Ca}$  que são bloqueados por toxinas, como caribdotoxina e iberiotoxina, ou por baixas concentrações de  $TEA^+$ . Os canais do tipo  $SK_{Ca}$  e  $IK_{Ca}$  são insensíveis à voltagem e ativados por baixa concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico ( $< 1,0 \mu M$ ), em contraste aos

BK<sub>Ca</sub> que são ativados tanto por voltagem como por Ca<sup>2+</sup> (WEI et al., 2005). Os BK<sub>Ca</sub> são encontrados em cérebro, cóclea, músculo esquelético e músculo liso. Já os SK<sub>Ca</sub> são largamente encontrados em cérebro, coração e alguns tipos de músculo liso. Enquanto que os IK<sub>Ca</sub> estão presentes na placenta, próstata, linfócitos, pâncreas e endotélio vascular (WEI et al., 2005).

Os canais K<sub>Ca</sub> foram subdivididos da seguinte forma: no grupo dos BK<sub>Ca</sub> são chamados de K<sub>Ca</sub>1.1 (WEI et al., 2005), enquanto que no grupo dos SK<sub>Ca</sub> estão incluídos os K<sub>Ca</sub>2.1, 2.2 e 2.3 (KOHLE et al., 1996), e os IK<sub>Ca</sub> passaram a ser chamados de K<sub>Ca</sub>3.1 (ISHII et al., 1997; JOINER et al., 1997). Três outros membros deste grupo, K<sub>Ca</sub>4.1; 4.2 e 5.2 (JOINER et al., 1997; SCHREIBER et al., 1998; YUAN et al., 2003), foram incluídos no grupo dos K<sub>Ca</sub>, uma vez que todos apresentam uma semelhança estrutural (WEI et al., 2005), apesar de não serem ativados por Ca<sup>2+</sup>. Os canais K<sub>Ca</sub>4.2 e K<sub>Ca</sub>4.1 são ativados pelo Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> intracelular (YUAN et al., 2003), enquanto o K<sub>Ca</sub>5.1 é sensível ao pH (SCHREIBER et al., 1998).

Os canais K<sub>Ca</sub>1.1 são encontrados em cérebro, cóclea, músculo esquelético e músculo liso. Já os K<sub>Ca</sub>2.1; 2.2 e 2.3 são largamente encontrados em cérebro, coração e alguns tipos de músculo liso. Enquanto que os K<sub>Ca</sub>3.1 estão presentes na placenta, próstata, linfócitos, pâncreas e endotélio vascular (WEI et al., 2005).

Os canais SK<sub>Ca</sub> geram uma corrente hiperpolarizante em células excitáveis após a geração do potencial de ação, e assim levam ao relaxamento do músculo liso (BRAINARD; KOROVIKINA; ENGLAND, 2007). Os SK<sub>Ca</sub> estão constitutivamente associados a calmodulina, que medeia a abertura do canal através da ligação com o cálcio (XIA et al., 1998).

Para avaliar uma possível participação dos SK<sub>Ca</sub> no efeito tocolítico induzido por FGAL, observamos o relaxamento na presença de apamina (AP), um bloqueador seletivo dos SK<sub>Ca</sub>. Caso essa hipótese fosse verdadeira o relaxamento do útero de rata induzido pelo flavonoide deveria ser atenuado na presença de apamina, um bloqueador seletivo dos SK<sub>Ca</sub>. O fato da curva de relaxamento produzida por FGAL ter sido deslocada para a direita na presença de apamina e ter reduzido sua potência em torno de 4 vezes (Gráfico 7) sugere que FGAL esteja promovendo seu efeito tocolítico através de uma modulação positiva desses canais.

Os canais  $BK_{Ca}$  são um dos canais iônicos mais estudados no músculo liso do útero devido a sua abundância e significativa corrente de repolarização. Poucos canais  $BK_{Ca}$  precisam ser ativados para produzir relaxamento uterino, assim, estes canais podem ter efeitos profundos sobre a atividade miometrial, impedindo assim as contrações uterinas e, conseqüentemente disfunções como dismenorreia e abortos (BRAINARD; KOROVIKINA; ENGLAND, 2007).

Os canais  $BK_{Ca}$  são compostos de quatro subunidades  $\alpha$  e quatro subunidades  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  é a porção formadora do poro do canal e consiste de 11 domínios hidrofóbicos (S0-S10). O domínio transmembrana (S0-S6) constitui o núcleo da subunidade  $\alpha$  com uma cauda  $NH_2$  terminal. Os quatro demais domínios (S7-S10) são localizados no citoplasma e forma a cauda  $COOH$  terminal da proteína. As subunidades  $\alpha$  podem associar-se com diferentes subunidades  $\beta$ , o que explica diferentes propriedades dos  $BK_{Ca}$  em diferentes tecidos. A subunidade  $\beta$  é composta por dois domínios transmembrana com uma grande alça extracelular, e as caudas  $NH_2$  e  $COOH$  terminais localizadas no citoplasma. (PAULSON; NEWMAN, 1987; BOYLE et al., 1992). As propriedades fisiológicas dos  $BK_{Ca}$ , incluindo a sensibilidade ao  $Ca^{2+}$ , são moduladas pelas subunidades  $\beta$  acessórias. As estimativas da sua densidade média, em músculo liso variam entre 1 a 4 canais/ $\mu m^2$  (BENHAM; BOLTON, 1986; SINGER; WALSH JR. 1987; PEREZ et al., 1999).

Diante dos expostos, passou-se a investigar se FGAL estaria agindo sobre os canais  $BK_{Ca}$ , ativando-os, e conseqüentemente levando a uma repolarização de membrana que levaria indiretamente ao fechamento dos  $Ca_v$ . Em presença de 1 mM de  $TEA^+$ , uma concentração essa específica para bloquear apenas os  $BK_{Ca}$  (LATORRE et al., 1989; KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996), a curva de relaxamento promovida por FGAL foi desviada para direita (Gráfico 8) tendo sua potência relaxante diminuída em 88 vezes quando comparada com a curva de relaxamento na ausência deste bloqueador. Estes dados demonstram que o relaxamento produzido pelo flavonoide em útero isolado de rato está associado à abertura dos  $BK_{Ca}$ , os quais contribuem em 30% com a manutenção do potencial de repouso no músculo liso uterino no tocante a repolarização ou hiperpolarização de membrana, levando a um bloqueio indireto dos  $Ca_v$ , conseqüente diminuição de  $[Ca^{2+}]_c$  e relaxamento uterino (Ledoux et al., 2006).

Desta forma podemos sugerir que FGAL pode estar atuando em útero de rata através de uma modulação positiva de canais  $K_{Ca}$ , mais especificamente os  $K_{ATP}$ ,  $K_V$ ,  $SK_{Ca}$  e  $BK_{Ca}$ , o que poderia levar a uma repolarização de membrana das células musculares de útero de rata, consequentemente redução do influxo de  $Ca^{2+}$  via  $Ca_V$ , reduzindo assim a  $[Ca^{2+}]_c$  e produzindo relaxamento deste órgão.

O relaxamento da musculatura lisa pode ocorrer também devido a uma modulação positiva dos canais de  $K^+$  pela proteína cinase dependente de AMPc (PKA) ou proteína cinase dependente de GMPc (PKG). Entre os canais de  $K^+$  modulados positivamente pela PKA destaca-se os  $K_V$ ,  $BK_{Ca}$ ,  $K_{ATP}$  e  $K_{ir}$ . Outros ensaios farmacológicos mostram que a PKG pode modular positivamente os  $BK_{Ca}$  e os  $K_{ATP}$ . Essa modulação promove abertura desses canais, com conseqüente efluxo do íon  $K^+$  e hiperpolarização a qual leva ao bloqueio de  $Ca_V$  e, portanto, relaxamento do músculo liso (KO et al., 2008).

Dessa forma, um aumento nos níveis de AMPc e GMPc promove relaxamento do músculo liso (KOMAS, N.; LUGNIER, C.; STOCLET, J-C, 1991). Na maioria dos tecidos, as concentrações e, portanto, as ações desses nucleotídeos cíclicos são reguladas por enzimas chamadas de fosfodiesterases (PDEs).

As fosfodiesterases (PDEs) estão amplamente distribuídas em vários tecidos de mamíferos, incluindo o músculo liso uterino, sendo distribuídas em 11 famílias distintas (PDE1-11) e tendo como função a hidrólise do AMPc (3',5'-monofosfato cíclico de adenosina) e do GMPc (3',5'-monofosfato cíclico de guanosina) resultando em seus produtos inativos, o 5'-AMP e o 5'-GMP, que não mais são capazes de ativar, respectivamente, a PKA (proteína cinase dependente de AMPc) e a PKG (proteína cinase dependente de GMPc), cessando assim a sinalização celular dependente do aumento destes nucleotídeos cíclicos (LUGNIER, 2006).

Substâncias capazes de aumentar o conteúdo intracelular de AMPc ou GMPc tem seu efeito relaxante potencializado pela inibição das PDEs em vários tecidos, devido a um acúmulo do conteúdo total desses nucleotídeos (BENDER; BEAVO, 2006; LUGNIER, 2006).

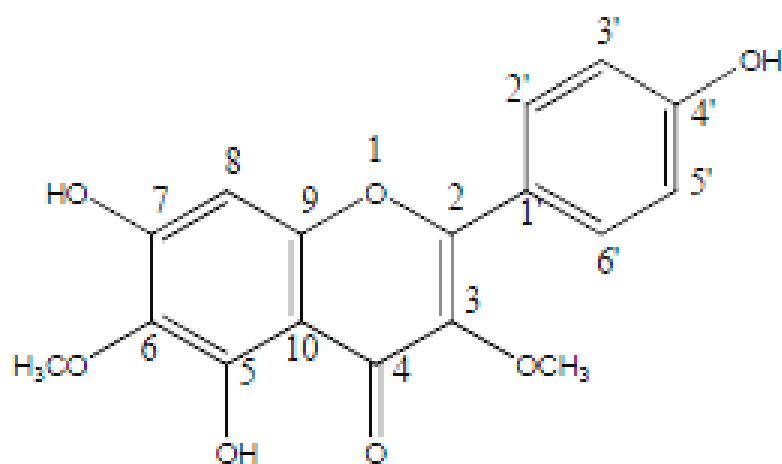
Para confirmar ou descartar esta hipótese de que as PDEs possam estar envolvidas no efeito relaxante induzido por FGAL em útero isolado de rata, lançou-se mão de um conhecido inibidor das PDEs, a aminofilina (HIRSH et al.,

2004), e observou-se que a aminofilina não promoveu potencialização do efeito relaxante de FGAL (Gráfico 9).

Desta forma, o fato do efeito tocolítico de FGAL não ter sido potencializado pela presença de aminofilina pode indicar que os nucleotídeos cíclicos não estão envolvidos no mecanismo de ação tocolítico de FGAL em útero isolado de rata.

Diante dos resultados apresentados aqui podemos concluir que, em nível funcional, o mecanismo de ação para explicar o efeito tocolítico do flavonoide em útero isolada de rata se dá por uma modulação positiva de canais para potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ), canais para potássio sensíveis à voltagem ( $K_V$ ) e canais para potássio sensíveis ao cálcio ( $K_{Ca}$ ), especificamente os  $SK_{Ca}$  e os  $BK_{Ca}$ , que culmina no bloqueio indireto dos canais de cálcio sensíveis à voltagem ( $Ca_V$ ) diminuindo assim o influxo de  $Ca^{2+}$  levando o útero ao relaxamento. Ainda faz-se necessárias futuras investigações para a obtenção de uma visão total do mecanismo de ação pelo qual FGAL exerce seu efeito tocolítico.

## Conclusões



## 6 CONCLUSÕES

No estudo do efeito tocolítico do flavonóide 3,6 dimetil éter (FGAL), isolado das partes aéreas de *Piptadenia stipulaceae* Benth Ducke, visando elucidar o mecanismo de ação em útero isolado de rata, pode-se concluir que:

a) FGAL não está agindo diretamente em nível de receptor de ocitocina para produzir efeito tocolítico;

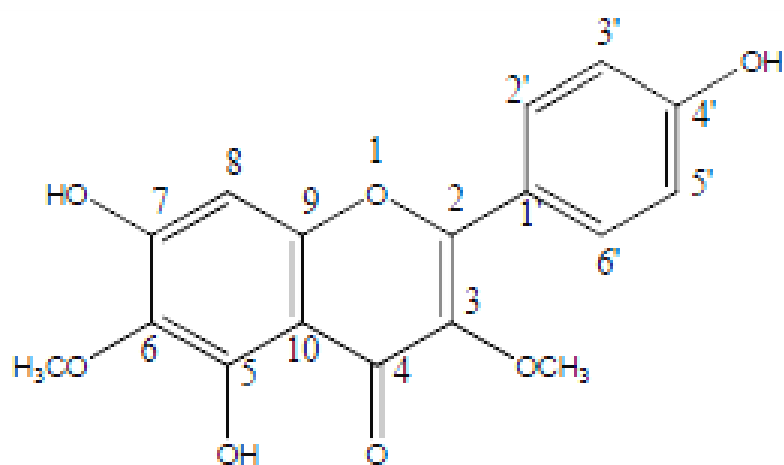
b) FGAL não está bloqueando diretamente sobre os canais de cálcio dependentes de voltagem para produzir efeito tocolítico;

c) Os nucleotídeos cíclicos não estão envolvidos no efeito tocolítico de FGAL;

d) FGAL modula positivamente os canais para potássio do tipo  $K_{ATP}$ ,  $K_V$ ,  $SK_{Ca}$  e  $BK_{Ca}$ , o que indiretamente reduziria o influxo de  $Ca^{2+}$  através dos  $Ca_V$  com consequente relaxamento;

e) Não se podem descartar outras vias de sinalização que ainda não foram investigadas.

# Perspectivas



## 7 PERSPECTIVAS

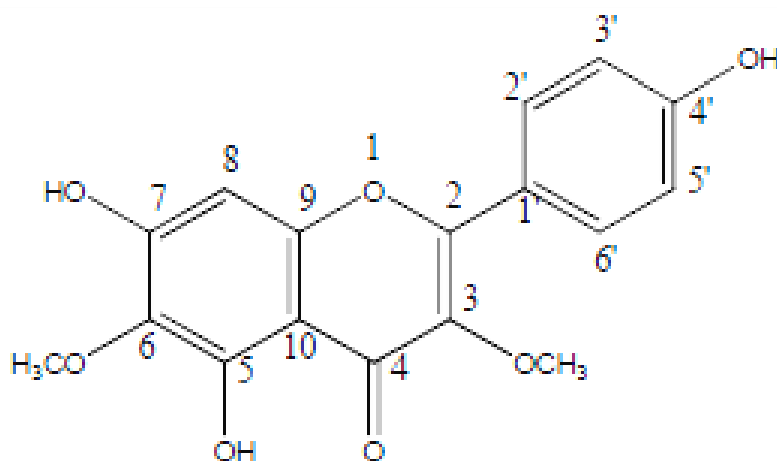
### 7.1 Em estudos funcionais:

1. Avaliar o grau de participação dos canais de potássio no efeito tocolítico produzido por FGAL através da incubação simultânea de vários bloqueadores desses canais;
2. Investigar a participação da PKA e/ou PKC no efeito tocolítico produzido por FGAL por meio de inibidores seletivos dessas enzimas;
3. Investigar um possível efeito tocolítico e elucidar o mecanismo de ação de FGAL em ratas grávidas.

### 7.2 Em estudos celulares e moleculares:

1. Avaliar se FGAL interfere com o ciclo celular em miócitos uterinos de rata, através da técnica de citometria de fluxo;
2. Verificar se FGAL interfere com a  $[Ca^{2+}]_c$  em miócitos uterinos de rata, através de técnicas fluorimétricas;
3. Avaliar o efeito de FGAL nas correntes de  $Ca^{2+}$  utilizando a configuração “whole-cell” da técnica de *patch-clamp* em miócitos de útero de rata;
4. Investigar o efeito de FGAL nas correntes de  $K^+$ , utilizando a configuração “cell-attached” da técnica de *patch-clamp* em miócitos uterinos de rata;
5. Realizar todos os protocolos tanto em ratas grávidas como em ratas não grávidas para posterior comparação de resultados.

## *Referências*



## REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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.

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

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

BALICK, M.J.; COX, P. A. Plants, People and Culture: the Science of Ethnobotany. Scientific American Library, New York, **Journal of Natural Products**, 60 (4), p. 428-429, 1997.

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

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 488-520, 2006.

BENHAM, C. D.; BOLTON, T. B. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit, **The Journal of Physiology**, v. 381, p. 385–406, 1986.

BERETZ, A.; CAZENAVE, J.P. The effects of flavonoids on blood-vessel wall interactions. **Progress in clinical and biological research**, p. 187, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

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

BOOTMAN, H.; LIPP, P.; BERRIDGE, M. J. The organization and functions of local  $\text{Ca}^{2+}$  signals. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 2213 – 2222, 2001.

BOYLE, J.P.; TOMASIC, M.; KOTLIKOFF, M.I. Delayed rectifier potassium channels in canine and porcine airway smooth muscle cells. **Journal of Physiology**, 447:329-50; 1992.

BRAINARD , A. M.;KOROVKINA, V. P.;ENGLAND,S. K. Potassium channels and uterine function. **Seminars inCell&DevelopmentalBiology**, v. 18, n. 3, p. 332–339, 2007.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents).**Brazilian Journal and Biological Research**, 33, p. 179-189, 2000.

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

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

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

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.

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

CHIAPPETA, A. D. A; DE MELLO, J. F. Higher Plants with Biological Activity.Plants of Pernambuco. II. III. **Rev. Inst.Antibiot Univ. Fed.Pernambuco**, 11 (1/2). Recife, p. 99-11, 1984.

CHIEN, E.K.; ZHANG, Y.; FURUTA, H.; HARA, M. Expression of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel subunits in female rat reproductive tissues: overlapping distribution of messenger ribonucleic acid for weak inwardly rectifying potassium channel subunit 6.1 and sulfonylureabinding regulatory subunit 2. **American Journal ofObstetrice and Gynecology**. 180:1121–6, 1999.

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

CURLEY, M.; CAIRNS, M.T.; FRIEL, A.M.; McMEEL, O.M.; MORRISON, J.J.; SMITH, T.J. Expression of mRNA transcripts for ATP-sensitive potassium

channels in human myometrium. **Molecular Human Reproduction**, 8:941–5, 2002.

DAVIES, M.P.; McCURRIE, J.R.; WOOD, D. Comparative effects of K<sup>+</sup> channel modulating agents on contractions of rat intestinal smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 297, n. 3, p. 249-256, 1996.

DE LA LASTRA, C.A.; MARTÍN, M.J.; LA CASA, C.; MOTILVA, V. Antiulcerogenicity of the flavonoid fraction from *Bidens aurea*: Comparison with ranitidine and omeprazole. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 42, n. 3, p. 161-168, 1994.

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

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999

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

EATON-EVANS, J. Osteoporosis and the role of diet. **British Journal of Biomedical Science**, v. 51, p. 358-370. 1994.

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

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

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

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

FLISCHER, F.; MONTARI, C. A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Química Nova**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 56-64, 1995.

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

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

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

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

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 294–300, 2000.

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

HILL, C. E.; KIRTON, A.; WU, D. D.; VANNER, S. J. Role of maxi-K<sup>+</sup> channels in endothelin-induced vasoconstriction of mesenteric and submucosal arterioles. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 36, n. 5, p. G1087-G1093, 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 and Physiology**, v. 21, n. 5, p. 367-375, 1994.

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

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

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

HUANG, Y. Hydroxylamine-induced relaxation inhibited by K<sup>+</sup> channel blockers in rat aortic rings. **European Journal of Pharmacology**, v. 349, n. 1, p. 53-60, 1998.

HUGHEST, S. J.; HOLLINGSWORTH, M. Relaxin as a Relaxant of the Isolated Rat Uterus: Comparison with Its Mechanism of Action In Vivo **General Pharmacology**. v. 29, n. 5, p. 829-833. 1997.

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.

IZZO, A.A. PAF and the digestive tract, a review. **J.Pharm. Pharmacol**, v.48, p. 1103-1111, 1996

JAN L.Y.; JAN Y.N. Structural elements involved in specific K<sup>+</sup> channel functions. **Annual Review of Physiology**, 54:537-55; 1992.

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

JOINER, W. J.; WANG, L. Y.; TANG, M. D.; KACZMAREK, L.K. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p. 11013–11018, 1997.

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

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

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<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. **Journal smooth muscle research**. v. 44, p. 65-81, 2008.

KOBAYASHI, S.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and  $\alpha$ -adrenergic Ca<sup>2+</sup>-release in smooth muscle: physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 17997 - 18004, 1989.

KOHLER, M.; HIRSCHBERG, B.; BOND, C. T.; KINZIE, J. M.; MARRION, N. V.; MAYLIE, J.; ADELMAN, J. P. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. **Science**, v. 273, p. 1709–1714, 1996.

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

KUME, H.; HALL, I.P.; WASHABAU, R.J.; TAKAGI, K.; KOTLIKOFF, M.I.  $\beta$ -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.

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

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

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

LESAGE, F.; LAZDUNSKI, M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, 279 (5).F793-801, 2000.

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, 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.

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

LIRA, D. P.; QUEIROZ, A. C.; SOUZA, E. T. AGRA, M. F.; ARAUJO-JUNIOR, J. X.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MOREIRA, M. S. A., SANTOS, B. V. O. Flavonóides de *Piptadaniastipulaceae* (Fabaceae): isolamento e atividade analgésica preliminar. **Congresso da Sociedade Brasileira de Química**, 2009.

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

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

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

MACÊDO, C. L., VASCONCELOS, L. H. C., CORREIA, A. C. C., MARTINS, I. R. R., LIRA, D. P., SANTOS, B. V. O., SILVA, B. A. Spasmolytic effect of galetin 3,6 dimethyl- ether flavonoid obtained from *Piptadenia stipulacea* (BENTH) Ducke. **J. Smooth muscle**, v. 47, n. 5, p. 123- 134, 2011a.

MACÊDO, C. L., VASCONCELOS, L. H. C., CORREIA, A. C. C., MARTINS, I. R. R., LIRA, D. P., SANTOS, B. V. O., SILVA, B. A. Cyclic nucleotides and PKC participating of effect vasorelaxant of galetin 3,6dimethyl ether. **23rd International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, João Pessoa, PB, 2011b

MACÊDO, C. L., VASCONCELOS, L. H. C., CORREIA, A. C. C., MARTINS, I. R. R., LIRA, D. P., SANTOS, B. V. O., SILVA, B. A. Vasorelaxant effect of galetin on rat aorta involves potassium channels. **International Symposium on CellSignaling**, Florianópolis, Santa Catarina, 2010.

MACÊDO, C. L. Envolvimento dos canais de potássio na ação espasmolítico do ácido labda-8(17),12E,14-trien-18-óico (labdano-302) isolado de *Xylopialangsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. Em óleo isolado de cobaia. 2008. **Dissertação (Mestrado)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

MACANDER, P.J. Flavonoids affect acetylcholine, prostaglandin E2 and antigen-mediated smooth muscle contraction. **Prog. Clin. Biol. Res.** 213, p. 489-492. 1986

MASCOLO, N., PINTO, A., CAPASSO, F. Flavonoids, leukocyte migration and eicosanoids. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 40, p. 293–295. 1988.

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

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-Cell Physiology**, v. 38, n. 2, p. C312-C317, 1995.

MELO, A. C., COTA, B. B., OLIVEIRA, A. B., BRAGA, F. C. HPLC Quantitation of Kaurane Diterpene in Xylopia Species. **Fitoterapia**, 72, p. 40. 2001.

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

MORGAN, J. P.; MORGAN, K. G. Vascular smooth muscle: the first recorded Ca<sup>2+</sup> transients. **PflügersArchiv European Journal of Physiology**, v. 395, p. 75–77, 1982.

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

MOTTA, E. V., 2000. Dismenorréia – Como diagnosticar e tratar. **RevBrasMed**, p.57, n. 5, 2007.

MURRAY M. A.; BERRY J. L.; COOK S. J.; FOSTER R. W.; GREEN K. A.; SMALL R. C. Guinea-pig isolated trachealis: the effects of charybdotoxin on mechanical activity, membrane potential changes and the activity of plasmalemmal K(+)-channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 103, p. 1814-1818, 1991.

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

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.

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

OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F. ; ALMEIDA, F. R. C. ; MEDEIROS, I. A. Involvement of calcium activated large conductance potassium channel BK<sub>ca</sub> 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.

- PAULSON, O.B.; NEWMAN, E.A. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? **Science**. 237(4817):896-8; 1987.
- PAN, Z.; MA, J. Retrograde activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**. v. 33, p. 375 - 384, 2003.
- PEREZ, G. J.; BONEV, A. D.; PATLAK, J. B.; NELSON, M. T. Functional coupling of ryanodine receptors to  $K_{Ca}$  channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries, **The Journal of General Physiology**, v. 113, p. 229–238, 1999.
- PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J. Flavonols and cardiovascular disease. **Molecular aspects of medicine**. v. 31, p. 473-494, 2010.
- PUPPO, M.T.; GALLO, M. B. C. Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.
- QUEIROZ, A. C.; LIRA, D. P.; DIAS, T. L. M. F.; SOUZA, E. T.; M, C. B. B.; AQUINO, A. B.; SILVA, L. H. A C; SILVA, D. J. C.; MELLA, E. A. C.; AGRA, M. F.; FILHO, J. M. B.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; SANTOS, B. V. O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 377-383, 2010.
- QUEST, U.; COOK, N. S. Moving together:  $K^+$ -channel openers and ATP-sensitive  $K^+$ -channels. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 10, p. 431-435, 1989.
- QUEST, U. Potassium channel openers: pharmacological and clinical aspects. **Fundamentals in Clinical Pharmacology**, v. 6, p. 279-293, 1992.
- REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; M. **Biochemistry of Smooth Muscle Contraction**. San Diego, Academic Press, p. 227 –239, 1996.
- REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Despolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by  $CaCl_2$ . **Gen. Pharmac.** v. 29, n. 5, p. 847-857, 1997.
- REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Mechanisms involved in kaempferol-induced relaxation in rat uterine smooth muscle. **Life Sciences**, v. 67, p. 251–259, 2000.
- RIBEIRO, L. A. A. Estudo do efeito relaxante do ácido 8(17),12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano-302): um novo diterpeno ativador da via da ciclase de adenilil? 2007. **Tese (Doutorado)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

RIBEIRO, L. A. A.; TAVARES, J. F.; ANDRADE, N. C. ; SILVA, M. S.; SILVA, Bagnólia Araújo da . O Ácido (8)17,12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano302), diterpeno tipo labdano isolado de *Xylopialangsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 197-203, 2007a.

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

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

ROSENBLOOM, R. A. Compositions and methods for the treatment of leukemia. **Patent Application Publication**, p. 10, 2006.

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

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

SAMUELSSON, G. Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy, 5th **Swedish Pharmaceutical Press**, Stockholm, 2004.

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

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

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

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

SCHREIBER, M.; WEI, A.; YUAN, A.; GAUT, J.; SAITO, M.; SALKOFF, L. Slo3, a novel pH-sensitive  $K^+$  channel from mammalian spermatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p.3509–3516, 1998.

SCHUSTER, S.; MARHL, M.; HÖFER, T. Modelling of simple and complex calcium oscillations. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 1333 – 1355, 2002.

SHIKADA, K.; TANAKA, S.  $K^+$  channel openers produce epithelium-dependent relaxation of the guinea-pig trachea. **European Journal of Pharmacology**, v. 282, n. 1-3, p. 193-197, 1995.

SHMIGOL, A., EISNER, D. A. & WRAY, S. Properties of voltage-activated  $[Ca^{2+}]_i$  transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. **Journal of Physiology**, 511, 803–81. 1998

SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A.; ABOULAFIA, J. Desensitization to ANG II in guinea-pig ileum depends on membrane repolarization: role of maxi- $K^+$  channel. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 277, n. 4, p. C739-C745, 1999.

SILVA, E. G.; OKUYAMA, P.; PAIVA, T. B. Role of  $Ca^{2+}$ -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, 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, n. 3, p. 1022-1028, 1994.

SINGER, J. J.; WALSH Jr., J. V. Characterization of calcium-activated potassium channels in single smooth muscle cells using the patch-clamp technique, **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 408, p. 98-111, 1987.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Infarma**, v.16, nº 13-14, 2005.

SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterization of flavonoids from Baccharis trimera and their anti-hepatotoxic properties. **Planta Med.**, v.53, n.1, p.37-39, 1987.

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

SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 159 p. 129–145, 1968.

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

STANDEN NB. Properties of cloned K<sub>ATP</sub> channels mimic those of  $\beta$ -cells. **Journal of Physiology**.498:1; 1997.

STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website, 2001. Disponível em: [http://www. Mobot.org](http://www.Mobot.org). Acesso em: 25 novembro de 2005.

SUN, Y. -D. & BENISHIN, C. G. – K<sup>+</sup> channel openers relax longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v.271, p. 453-459, 1994.

TERAMOTO, N.; NAKASHIMA, T.; ITO, Y. Properties and pharmacological modification of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cat thachealmyocytes. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 3, p. 625-635, 2000.

TERAMOTO, N.; BRADING, A. F.; ITO, Y. Glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> channels underlying levcromakalim-induced relaxation in pig urethra. **European Journal of Pharmacology**, v. 365, n. 2-3, p. 291-300, 1999.

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.

TRAVASSOS, R. A.; MACEDO, C. L.; CORREIA, A. C. C.; PESSÔA, H. L. F.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S; SILVA, B. A. – Involvement of K<sup>+</sup> channels on tocolytic effect and investigation of hemolytic activity of labdane-302. In: **41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, Ribeirão Preto – SP. 2009.

TSAL, M. L.; CUMMINGS, K. C.; WEBB, R. C.; CARUSO, R. L. Acute Inhibition of Spontaneous Uterine Contractions by an Estrogenic Polychlorinated Biphenyl Is Associated with Disruption of Gap Junctional Communication **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 152, p.18–29. 1998.

TULP, M.; BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug discovery today**, v. 9, n. 10, p. 450-458, 2004.

URUNO, T.; TAKAYANAGI, I.; KUBOTA, K.; TAKAGI, K. Comparison of actions of papaverine, aspaminol and isoprenaline on isolated rat uterus. **Japanese Journal of Phamacology**. 24, 219-226, 1974.

UYAMA, Y.; IMAIZUMI, Y.; WATANABE, M. Cyclopiazonic acid, an inhibitor of Ca<sup>2+</sup>-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.; AARONSON, P.; LOUTZENHISER, R. Sodium-Calcium interaction in mammalian smooth muscle. **Pharmacology Reviews**, v. 30, p.167-208, 1979.

- VAN BREEMEN, C.; SAIDA, K. Cellular mechanisms regulating  $[Ca^{2+}]_i$  smooth muscle. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 315 - 329, 1989.
- VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**. v. 143, p. 299-330, 1963.
- VIEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- VASCONCELOS, L. H. C., MACÊDO, C. L., SILVA, P. C. B., CORREIA, A. C. C., MARTINS, I. R. R., LIRA, D. P., SANTOS, B. V. O., SILVA, B. A. Involvement of potassium channels in spasmolytic effect of galetin 3,6- dimethyl ether on guinea-pig trachea. **26 Reunião Annual de Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, Rio de Janeiro, RJ, 2011.
- 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.
- WATTERSON, K. R.; RATZ, P. H.; SPIEGEL, S. The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. **Cellular Signalling**, v. 17, p. 289-298, 2005.
- WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, p. 201-206, 2003.
- WEI, A. D.; GUTMAN, G. A.; ALDRICH, R.; CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; WULFF, H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. **Pharmacology Reviews**, v. 57, p. 463–472, 2005.
- WESTON, A. H.; EDWARDS, G. Recent progress in potassium channel opener pharmacology. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 1, p. 47-54, 1992.
- WOLLENWEBER, E. "Flavones and flavonols." In: Harborne, J. B. **The Flavonoids Advances in Research Since 1986**, Chapman and Hall Ed., Londres, 1994.
- WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium signalling in smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 38, p. 397-407, 2005.
- 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.

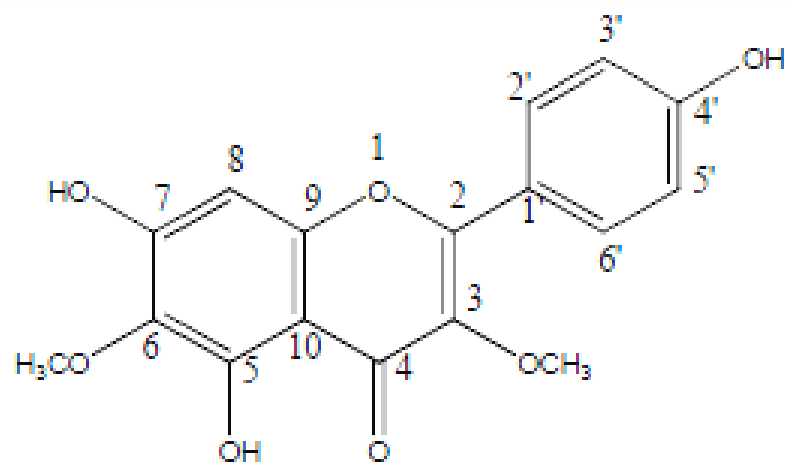
WRAY, S. Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. **American Journal of Physiology**, v. 264, p. C1-C18, 1993.

XIA, X.M.; FAKLER, B.; RIVARD, A.; WAYMAN, G.; JOHNSON-PAIS, T.; KEEN, J.E. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. **Nature**, 395:503–7, 1998.

YAMAKAGE, M.; HIRSHMAN, C.A.; CROXTON, T.L. Sodium nitroprusside stimulates  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels in porcine tracheal smooth muscle cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 14, n. 3, p. L338-L345, 1996.

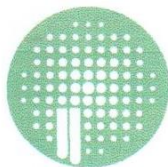
YUAN, A.; SANTI, C. M.; WEI, A.; WANG, Z. W.; POLLAK, K.; NONET, M.; KACZMAREK, L.; CROWDER, C. M.; SALKOFF, L. The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. **Neuron**, v. 37, p. 765–773, 2003.

# Anexos



## 7 ANEXO

### ANEXO A – Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa Animal – CEPA N° 0303/11



**PgPNSB**

Pós Graduação em Produtos Naturais  
e Sintéticos Bioativos

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL**

#### CERTIDÃO

João Pessoa, 20 de maio de 2011

**CEPA N°. 0303/11**

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Bagnólia Araújo da Silva

Orientando(a) : Juliana da Nóbrega Carreiro

Departamento/Setor: LTF

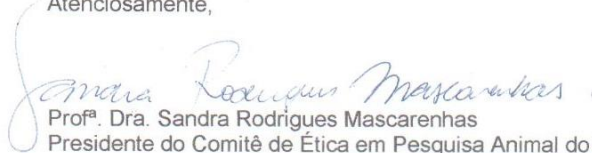
**Ref.:** Investigação do efeito espasmolítico de galetina, isolada de *Piptadenia stipulaceae* Benth (Fabaceae), em íleo de cobaia e útero de rata.

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: 42 ratas e 42 cobaias

Período: Maio 2011 a Dezembro/2011.

Atenciosamente,

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

LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA • UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
Caixa Postal 5009 • Cidade Universitária • 58051-970 - João Pessoa - Paraíba - Brasil  
Fone/Fax: ++55 83 3216-7502 • 3216-7173 • E-mail: pos-graduacao@ltf.ufpb.br

