

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

**Investigação do efeito vasorelaxante e
caracterização eletrofisiológica dos alcalóides
curina e reticulina**

MARCOS ANTONIO ALVES MEDEIROS

JOÃO PESSOA

2009

Marcos Antonio Alves Medeiros

**Investigação do efeito vasorelaxante e
caracterização eletrofisiológica dos alcalóides
curina e reticulina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do grau de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOLOGIA

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo

CO-ORIENTADOR

Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz

JOÃO PESSOA

2009

M488i

Medeiros, Marcos Antonio Alves.

*Investigação do efeito vasorelaxante e caracterização
eletrofisiológica dos alcalóides curina e reticulina/Marcos Antonio
Alves Medeiros. – João Pessoa, 2009.*

153f. :il.

Orientador: Demetrius Antonio Machado de Araújo.

Co-orientador: Jader dos Santos Cruz

Tese (Doutorado) – UFPb – LTF/CCS

*1. Farmacologia . 2. Curina e reticulina - Alcalóides. 3. Cálcio
Intracelular.*

UFPb/BC

CDU: 615 (043)

Responsável pela catalogação: Maria de Fátima dos Santos Alves-CRB -15/149

Marcos Antonio Alves Medeiros

**Investigação do efeito vasorelaxante e
caracterização eletrofisiológica dos alcalóides
curina e reticulina**

APROVADO EM: 24/09/2009

BANCA EXAMINADORA DE TESE

Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo
Orientador (LTF/UFPB)

Prof. Dr. Luís Fernando Marques dos Santos
Examinador Interno (DBM/UFPB)

Prof. Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão
Examinador Externo (DBI/UFMG)

Prof. Dr. Julianeli Tolentino de Lima
Examinador Externo (CFARM/UNIVASF)

Prof. Dr. Luciano Augusto de Araújo Ribeiro
Examinador Externo (CFARM/UNIVASF)

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Examinador Interno (LTF/UFPB, Suplente)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Núcleo básico dos alcalóides bisbenzilisoquinolínicos.....	27
Figura 2. Fotografia de <i>Ocotea duckei</i> VATTIMO.....	28
Figura 3. Estrutura química da reticulina.....	29
Figura 4. Fotografia de <i>Chondodendron platyphyllum</i>	30
Figura 5. Estrutura química da curina.....	31
Figura 6. Esquema geral das subunidades de canais para cálcio na membrana plasmática de uma célula.....	35
Figura 7. Agrupamento de canais para cálcio dependentes de voltagem de acordo com sua similaridade molecular.....	44
Figura 8. Aparato utilizado para os experimentos com anéis da artéria aorta isolada de rato.....	63
Figura 9. Fotos do pHmetro digital e balança analítica	64
Figura 10. Aparato utilizado para os experimentos de eletrofisiologia com miócitos da artéria aorta isolado de rato.....	65
Figura 11. Aparato utilizado para os experimentos UTILIZANDO microscopia confocal com miócitos de aorta de rato (A7r5).....	66
Figura 12. Ilustração esquemática das quatro configurações de patch-clamp: cell-attached, whole cell, outside-out e inside-out (Modificado de HAMILL et al., 1981).....	74
Figura 13. Efeito vasorelaxante da curina sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN, em anéis de aorta isolada de rato.....	83
Figura 14. Curvas concentração-resposta de nicardipina, de papaverina, da curina, e da reticulina, sobre as contrações tônicas induzidas por 80 mM de KCl em aorta isolada de rato.....	85
Figura 15. Efeito da reticulina frente às curvas concentração-resposta, em resposta à adição cumulativa de $[Ca^{2+}]_e$, em anéis de aorta isolada de rato	87
Figura 16. Efeito da curina sobre os anéis de aorta pré-contraídos com Bay k 8644. Curva concentração-resposta para curina (10^{-7} – 3×10^{-4} M) em anéis da artéria aorta de rato, sem o endotélio vascular, pré-contraídos com Bay K 8644 (300 nM).....	88
Figura 17. Caracterização das correntes de Ba^{2+} por canais para Ca^{2+} do tipo-L sensíveis à voltagem nas células A7r5.....	90

Figura 18. Efeito da reticulina nas correntes de Ba ²⁺ em células A7r5 de aorta de ratos.....	92
Figura 19. Efeito da curina nas correntes de Ba ²⁺ em células A7r5 de aorta de ratos.....	94
Figura 20. Constante de ligação e desligamento da curina.....	95
Figura 21. Efeito da curina nas correntes de Ba ²⁺ , em miócidos de aorta de ratos recém-dispersos.....	97
Figura 22. Efeito da reticulina nas correntes de Ba ²⁺ , em miócidos de aorta de ratos recém-dispersos.....	98
Figura 23. Efeito da curina nas correntes de Ba ²⁺ por canais para Ca ²⁺ sensíveis à voltagem do tipo-L.....	100
Figura 24. Efeito da curina sobre as correntes de Ba ²⁺ por canais para Ca ²⁺ sensíveis à voltagem do tipo-L em potenciais de -40 mV.....	102
Figura 25. Efeito da reticulina sobre as correntes de Ba ²⁺ por canais para Ca ²⁺ sensíveis à voltagem do tipo-L em potenciais de -40 mV.....	103
Figura 26. Efeito da curina sobre as correntes de Ba ²⁺ em miócitos aorta (A7r5).....	104
Figura 27. Efeito da reticulina sobre as correntes de Ba ²⁺ em miócitos de aorta (A7r5).....	106
Figura 28. Efeito da curina sobre a curva de ativação estacionária (m_∞) dos canais Ca _v tipo-L em células A7r5.....	108
Figura 29. Efeito da reticulina sobre a curva de ativação estacionária (m_∞) dos canais Ca _v tipo-L em células A7r5.....	109
Figura 30. Efeito da curina (30 μ M) sobre a curva de inativação estacionária (h_∞) dos canais Ca _v tipo-L em células A7r5.....	111
Figura 31. Efeito da reticulina (100 μ M) sobre a curva de inativação estacionária (h_∞) para os canais Ca _v tipo-L em células A7r5.....	112
Figura 32. Comparação entre o efeito da curina (30 μ M) e de IBMX.....	114
Figura 33. Comparação entre o efeito da curina (30 μ M) e de dbAMPc.....	115
Figura 34. Comparação entre o efeito da curina (30 μ M) e de 8-brGMPc.....	116
Figura 35. Comparação entre o efeito da curina (30 μ M) e de forskolina.....	117
Figura 36. Comparação entre o efeito da reticulina (100 μ M), e dos compostos dbAMPc e 8-Br-GMPc.....	118

Figura 37. Comparação do efeito de forskolina (controle) sobre as correntes normalizadas na ausência e presença da reticulina (30 μ M).....	119
Figura 38. Influência do KCl sobre o aumento do Ca^{2+} citosólico, induzido por curina em miócitos de aorta de rato (A7r5).....	121
Figura 39. Efeito da curina sobre Ca^{2+} citosólico induzido por KCl, em miócitos de aorta de rato.....	122
Figura 40. Efeito da curina sobre a viabilidade da cultura de células A7R5 por um período de 24 horas e analisado com o MTT.....	124
Figura 41. Efeito da reticulina sobre a viabilidade da cultura de células A7R5 por um período de 24 horas e analisado com o MTT.....	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades de canais para cálcio regulados por voltagem.....	45
Tabela 2. Composição da solução Krebs.....	59
Tabela 3. Composição da solução Tyrode modificado.....	59
Tabela 4. Composição da solução Hanks.....	60
Tabela 5. Composição da solução interna usada para medir as correntes de cálcio.....	60
Tabela 6. Composição da solução externa usada para medir as correntes de cálcio.....	61
Tabela 7. Composição da solução salina fisiológica (SSF) para dissociação das células de artéria aorta.....	61
Tabela 8. Composição da SSF com baixa concentração de cálcio para dissociação das células de artéria aorta.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Ocorrência de alcalóides bisbenzilisoquinolínicos em espécies de chondodendron.....	30
Quadro 2. Substâncias, sais e seus fabricantes.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- [Ca²⁺]_i** concentração de Ca²⁺ livre intracelular
- 8-Br-AMPc** 8-bromo-3',5'-mono fosfato de adenosina cíclico
- AA** ácido araquidônico
- AC** adenilil ciclase
- ACh** acetilcolina
- AMPc** 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
- ATP** 5'-trifosfato de adenosina
- BAY K8644** S-(-)-1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-3-ácido piridinocarboxilíco éster metílico
- BBA** alcalóides bisbenzilisoquinolínicos
- BK_{Ca}** canais para potássio de grande condutância ativados pelo Ca²⁺ e voltagem
- Ca_v** canais para cálcio abertos por voltagem
- Ca_v-L** canais para cálcio abertos por voltagem do tipo L
- Ca_v-T** canais para cálcio abertos por voltagem do tipo T
- CE₅₀** concentração de uma substância capaz de produzir 50% de seu efeito máximo
- dbAMPc** dibutiriladenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- DMEM** meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's
- DMSO** dimetilsulfóxido
- e.p.m.** erro padrão da média
- EDTA** ácido etileno-diamino-tetraacético
- EGTA** ácido etilenoglicol-bis-(β-aminoetiléter) N,N,N',N'-tetraacético
- E_{max}** efeito máximo
- FEN** L(-)-fenilefrina
- FSK** forskolina
- GMPc** 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina
- GTP** 5'-trifosfato de guanosina
- HVA** Ativação por alta voltagem
- LVA** Ativação por baixa voltagem
- I_{Ba}** corrente de bário
- IBMX** Isobutilmetilxantina

- IP₃** 1,4,5-trifosfato de inositol
- K_V** canais para potássio abertos por voltagem
- L-NMMA** N^G-monometil-L-arginina
- LTF** laboratório de tecnologia farmacêutico
- MT** tônus miogênico
- n** número de experimentos realizados
- NO** óxido nítrico
- p** probabilidade
- pA** pico ampere
- PA** potencial de ação
- PDEs** fosfodiesterases
- pF** pico farad
- PKA** proteína cinase dependente de AMPc
- PKG** proteína cinase dependente de GMPc
- ROC** canal operado por receptor
- R.S.** retículo sarcopasmático
- SK_{Ca}** canais para potássio de pequena condutância ativados pelo Ca²⁺
- TEA** tetraetilamônia
- T_{max}** tempo necessário para se atingir o efeito máximo
- VSMC** células musculares lisas vasculares
- VGCC** canais para Ca²⁺ dependentes de voltagem
- V_m** potencial de membrana
- vs** *versus*

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

Dedicatórias

*Aos meus pais, José Alves de Medeiros e
Maria do Socorro Medeiros, que me
ensinaram a gostar dos estudos e sempre
estiveram ao meu lado, incentivando,
dando força e todo o apoio que até hoje
precisei para chegar até aqui.*

*Aos meus irmãos Ângela, Ana, Cleide,
Lúcia, Fernando e Fátima e a minha
esposa Naiara Ferraz pelo apoio e estímulo
para que eu pudesse concretizar meus
objetivos, além do companheirismo e
presença sempre marcantes.*

Agradecimentos

Aos Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo e Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz, pelo aceite, para orientação da minha Tese, bem como pelos inúmeros ensinamentos e conselhos, que ficarão para sempre guardados na memória e sempre farei o possível para passá-los adiante, e pela grande amizade que cultivamos nesse período.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Mestrado e Doutorado), que de uma forma ou de outra, contribuíram para a minha formação e me proporcionaram novos conhecimentos científicos.

A José Crispim Duarte, Luís Cordeiro da Silva e Adriano Soares Cordeiro toda a equipe do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, pela convivência e apoio no desenvolvimento das atividades.

Aos colegas de Pós-Graduação: Raline, Francinalva, Marianna, Karina, Jana Luíza, Henrique, Roberto e Marcílio, pela convivência, companheirismo e estímulo.

Aos Professores e amigos, Julianeli Tolentino de Lima, Luciano Augusto de Araújo Ribeiro e Fladmir de Sousa Claudino pelo incentivo que me deram e me dão até hoje.

Aos amigos do Laboratório de eletrofisiologia e biologia molecular: Juan, Aron, Ana Érika, Micheline, Andréa, Aletheia e Gláucia pela oportunidade de aprendizagem e ensinamento e ainda pela troca de ideias sobre os nossos projetos.

Ao amigo Maurício de Alvarenga Mudado, pelos ensinamentos das técnicas e protocolos utilizado neste trabalho.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF/UFPB), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. Eliane Ferraz Alves, pela revisão final do texto.

À minha esposa Naiara Ferraz Bandeira Alves, pelo apoio constante, companheirismo, aconchego, apoio moral e emocional.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram da produção desta dissertação.

A DEUS, responsável maior por mais esta conquista, por ter proporcionado à minha vida a oportunidade de conhecer todas essas pessoas que,

direta ou indiretamente, muito contribuíram para minha formação e para o meu amadurecimento intelectual.

Resumo

RESUMO

Curina e reticulina são alcalóides isolados das cascas do caule e raízes de *Chondrondendron platyphyllum* e de *Ocotea duckei* Vattimo, respectivamente. Estudos anteriores demonstraram que esses alcalóides são capazes de induzir efeito vasodilatador em artéria mesentérica e aorta de rato, respectivamente, devido possível inibição dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (VGCC). O objetivo deste trabalho foi investigar o mecanismo vasodilatador de curina e reticulina realizando experimentações funcionais e moleculares. Foram utilizadas medidas de tensão em anéis de aorta de rato, e empregadas técnicas de “patch-clamp” e de microscopia confocal para estudos da ação desses alcalóides. Também foram utilizadas células A7r5, uma linhagem de células musculares lisas embrionária derivada de aorta torácica de rato, que foram usadas para medir as correntes de Ca^{2+} macroscópicas e a concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), que foram avaliadas usando a técnicas de “patch-clamp” e microscopia confocal, respectivamente. Os principais resultados são: em anéis de aorta, curina (3 - 300 μM) antagonizou as contrações induzidas por KCl (60 mM) e Bay K8644 (3×10^{-7} M). Na configuração “whole-cell patch clamp”, curina reduziu a amplitude da corrente de cálcio do tipo L ($I_{\text{Ca,L}}$) de maneira dependente de concentração. Porém, curina não alterou as características das correntes na relação corrente-voltagem. A voltagem de ativação máxima para $I_{\text{Ca,L}}$ não foi diferente em relação ao controle. Além disso, curina também não afetou a ativação no estado estacionário das $I_{\text{Ca,L}}$, mas deslocou a curva da inativação estacionária para potenciais mais negativos. No entanto, esse efeito promovido por curina não foi alterado na presença de IBMX, dbcAMP e 8-brcGMP, sugerindo que os mononucleotídeos cíclicos, como APMc e GMPC, não estão envolvidos no efeito da curina. Em experimentos com microscopia confocal curina inibiu os transientes de cálcio intracelulares, e reduziu o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzidos por KCl (60 mM) em células de músculo liso vascular. Em relação à reticulina (3 – 300 μM), foi verificado que esse alcalóide antagonizou as contrações induzidas por CaCl_2 e KCl, provocando vasorelaxamento em anéis de aorta. Na configuração “whole-cell patch clamp”, reticulina também reduziu a amplitude das $I_{\text{Ca,L}}$ de maneira dependente de concentração, mas não mudou as características da corrente na relação corrente-voltagem. A reticulina deslocou para potenciais mais negativos a curva de inativação estacionária para as $I_{\text{Ca,L}}$. Porém, esse efeito não foi alterado após a aplicação de dbcAMP e 8-brcGMP. Em células pré-tradadas com forskolina, um ativador da adenilil ciclase, a adição da reticulina causou uma inibição adicional das correntes de Ca^{2+} que sugere um efeito aditivo da reticulina, indicando que os mononucleotídeos cíclicos não estão envolvidos. Dessa forma, curina e reticulina provocaram vasorelaxamento, devido ao bloqueio das correntes de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo-L em células de músculo liso, em cultura e recém-dispersas, de aorta de rato, revelando que esses alcalóides têm um importante potencial como modelo químico para a concepção e posterior desenvolvimento de novos fármacos com propriedade protetora cardiovascular.

Palavras chaves: curina, reticulina, células A7r5, aorta de rato, whole cell patch-clamp, correntes de cálcio, cálcio intracelular.

Abstract

ABSTRACT

It was been demonstrated that curine and reticuline, induced a vasodilator effect in the rat small mesenteric arteries through inhibition of voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCC). These compounds, curine and reticuline were isolated from the root barks of *Chondrondendron platyphyllum* and *Ocotea duckei Vattimo*, respectively, therefore the aim of this work was to evaluate the vasodilator mechanism of curine and reticuline, bisbenzylisoquinoline alkaloids (BBA), isolated from the root barks of *Chondrondendron platyphyllum* and *Ocotea duckei Vattimo*, respectively, using functional and molecular approaches.

Tension measurements in aorta rings, whole-cell patch-clamp and confocal techniques were employed to study the action of these alkaloids. The A7r5 smooth muscle derived cell line was used for Ca^{2+} currents measuring and the intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were evaluated using confocal microscopy. The main results are as follows: in aortic rings, curine (3 - 300 μM) antagonized KCl (60 mM) and Bay K8644 (3×10^{-7} M) induced contractions. In whole-cell configuration, curine reduced the voltage-activated peak amplitude of $I_{\text{Ca,L}}$ in a concentration-dependent manner. However, the Ca^{2+} current density versus voltage relationship and maximal activation voltage of $I_{\text{Ca,L}}$ were not changed. Moreover curine did not also affect the steady-state activation of $I_{\text{Ca,L}}$, but shifted the steady-state inactivation curve of $I_{\text{Ca,L}}$ for more negative potentials, however this effect was not changed in the presence of IBMX, dbcAMP and 8-brcGMP, suggesting that cyclic mononucleotides, such as cAMP and cGMP, are not involved in curine effect. In confocal experiments, curine inhibited the rise on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by KCl (60 mM) in dispersed vascular smooth muscle cells. In reference to reticuline (3 – 300 μM) was verified that alkaloid agonized CaCl_2 and KCl-induced contractions and elicited vasorelaxation in aortic rings. In whole-cell configuration, reticuline reduced the voltage-activated peak amplitude of $I_{\text{Ca,L}}$ in a concentration-dependent manner, but did not change the characteristics of current density versus. voltage relationship. Reticuline shifted leftwards the steady-state inactivation curve of $I_{\text{Ca,L}}$, however this effect was not changed after application of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate to the cell. In cells pretreated with forskolin, an adenylate cyclase activator, the addition of reticuline caused further inhibition of the Ca^{2+} currents suggesting an additive effect, indicating that cyclic mononucleotides were not involved.

Taken together the results have shown that curine and reticuline elicits vasorelaxation due to the blockade of the L-type voltage-dependent Ca^{2+} current in rat aorta smooth muscle cells. The reported effect may contribute to the potential cardioprotective efficacy of curine and reticuline.

Keywords: curine, reticuline, A7r5 cells, rat aorta, patch-clamp, calcium currents, intracellular calcium.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Aspectos botânicos de <i>Ocotea duckei</i>	27
1.2 Aspectos químicos da reticulina.....	28
1.3 Aspectos botânicos do gênero <i>Chondodendron</i>	29
1.4 Aspectos químicos da curina.....	31
1.5 O papel do íon cálcio e de canais para cálcio na fisiologia celular.....	31
1.6 Os canais para cálcio dependentes de voltagem.....	33
1.6.1 Estrutura e funcionamentos dos canais para cálcio.....	34
1.6.2 A Subunidade α -1.....	36
1.6.3 A Subunidade $\alpha_2\delta$	37
1.6.4 A Subunidade β	38
1.6.5 A Subunidade γ	38
1.7 Famílias de canais para cálcio dependentes de voltagem.....	38
1.7.1 Classificação por potenciais de ativação e patch-clamp.....	38
1.7.2 Classificação com base farmacológica.....	39
1.7.3 Canais para cálcio sensíveis às dihidropiridinas.....	40
1.7.4 Canais para cálcio sensíveis às toxinas peptídicas.....	40
1.7.5 Bloqueadores inorgânicos e a permeabilidade a outros íons.....	41
1.8 Classificação molecular e nomenclatura.....	42
1.9 Contração muscular lisa.....	46
2 OBJETIVOS.....	52
2.1 Geral.....	52
2.2 Específicos.....	52
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.1 MATERIAL.....	54
3.1.1 Material vegetal.....	54
3.1.2 Animais.....	54
3.1.3 Cultivo da linhagem A7r5.....	55
3.1.4 Substâncias e sais.....	56
3.1.5 Soluções nutritivas.....	59
3.1.6 Preparação da solução-estoque das substâncias em estudo.....	62
3.1.7 Aparelhos.....	63

3.2 MÉTODOS.....	67
3.2.1 Estudos em nível funcional.....	67
3.2.1.1 Preparação dos anéis de aorta isolada de rato.....	67
3.2.1.2 Avaliação do efeito vasorelaxante da curina em aorta isolada de rato.....	68
3.2.1.3 Efeito da curina e da reticulina sobre a dinâmica do Ca^{2+} em aorta isolada de rato.....	68
3.2.1.3.1 Efeito vasorelaxante da curina e da reticulina sobre as contrações tônicas induzidas por 80 mM de KCl.....	68
3.2.1.3.2 Comparação do efeito vasorelaxante da curina e da reticulina frente à papaverina e nicardipina sobre as contrações tônicas induzidas por 80 mM de KCl.....	69
3.2.1.3.3 Efeito da reticulina frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante.....	69
3.2.1.3.4 Efeito do curina sobre os anéis de aorta de rato pré-contraídos com BAY K8644.....	70
3.2.2 Estudos em nível eletrofisiológico.....	70
3.2.2.1 Isolamento de células de aorta de rato.....	70
3.2.2.2 Eletrofisiologia.....	71
3.2.2.3 Caracterização das correntes de cálcio, nas células A7r5, na configuração “whole-cell”.....	74
3.2.2.4 Avaliação do efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de cálcio do tipo L, nas células A7r5, na configuração “whole-cell”.....	74
3.2.2.5 Avaliação do efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de cálcio do tipo L, em miócitos de aorta de rato, na configuração “whole-cell”.....	74
3.2.2.6 Avaliação do efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de cálcio do tipo L e investigação da dependência de concentração, em células A7r5.....	75
3.2.2.7 Avaliação do efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de cálcio do tipo L e investigação da dependência de voltagem, em células A7r5.....	75
3.2.2.8 Avaliação do efeito da reticulina na condutância dos canais para Ca^{+2} do tipo L, em células A7r5.....	76

3.2.2.9 Avaliação do efeito da curina e da reticulina, na inativação estacionária dos canais para Ca^{2+} do tipo L, em células A7r5.....	76
3.2.2.10 Avaliação da participação da via de sinalização PDE-AMPc-GMPc, no efeito da curina e da reticulina sobre as corrente de cálcio do tipo L.....	77
3.2.3 Protocolos realizados nos estudos com microscopia confocal.....	77
3.2.3.1 Incorporação do fluo-4 nas células da linhagem A7R5.....	77
3.2.3.2 Avaliação dos efeitos da curina sobre as concentrações de cálcio intracelulares em miócitos de aorta de rato (A7r5), estimuladas com KCl.....	78
3.2.4 Viabilidade celular.....	78
3.2.4.1 Efeito da Reticulina sobre a linhagem de células de músculo liso A7r5....	78
3.2.4.1.1 Método MTT.....	78
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	79
4. RESULTADOS.....	82
4.1 Estudo da atividade vasorelaxante da curina e da reticulina em aorta isolada de rato.....	82
4.1.1 Efeito vasorelaxante da curina em aorta isolada de rato.....	82
4.2 Efeito da curina e da reticulina sobre a dinâmica do Ca^{2+} em aorta isolada de rato.....	84
4.2.1 Efeito comparativo da curina e da reticulina frente à papaverina e nicardipina sobre as contrações tônicas induzidas por KCl.....	84
4.2.2 Efeito da reticulina frente às contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante.....	86
4.2.3 Efeito da curina sobre os anéis de aorta de rato pré-contraídos com BAY K8644.....	88
4.3 Caracterização eletrofisiológica da curina e da reticulina.....	89
4.3.1 Caracterização das correntes de Ca^{2+} em células da linhagem A7r5	89
4.3.2 Efeito da curina e da reticulina sobre os canais para cálcio sensíveis à voltagem em miócitos da aorta de rato (A7r5).....	91
4.3.3 Constante de tempo para ligamento e desligamento da curina.....	95
4.3.4 Efeito da curina e da reticulina sobre os canais para cálcio sensíveis à voltagem em miócitos da aorta de rato recém dispersos.....	96

4.3.5 Curva concentração-resposta da curina, da reticulina e da nicardipina para as correntes através dos canais para cálcio sensíveis à voltagem em miócitos da aorta de rato (A7r5).....	99
4.3.6 Identificação e caracterização do efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de cálcio em miócitos de aorta de ratos (A7r5).....	101
4.3.7 Efeito da curina e da reticulina sobre a curva I/V para os Cav em miócitos de aorta de ratos (A7r5).....	104
4.3.8 Efeito da curina e da reticulina sobre a cinética de ativação dos canais para cálcio sensíveis à voltagem.....	107
4.3.9 Efeito da curina e da reticulina sobre a curva de inativação estacionária para os canais Cav tipo-L.....	110
4.3.10 Participação dos nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc) no efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de cálcio através dos Cav.....	113
4.4 Estudo da curina sobre as concentrações de cálcio intracelulares em miócitos de aorta de rato (A7r5).....	120
4.4.1 Efeito da curina no transiente de Ca^{2+} intracelular em miócitos de aorta de ratos (A7r5) estimulados com o KCl.....	120
4.5 Estudo da atividade citóxica da curina e da reticulina sobre a linhagem A7r5.....	123
4.5.1 Efeito da Reticulina sobre a linhagem A7r5.....	123
5. DISCUSSÃO.....	127
6 CONCLUSÕES.....	139
REFERÊNCIAS.....	141
APÊNDICE.....	153

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 50% das drogas introduzidas no mercado durante os últimos 20 anos são derivadas, direta ou indiretamente, de pequenas moléculas biogênicas (VUORELA et al, 2004). A perspectiva é de que, no futuro, os produtos naturais desempenhem um grande papel como substâncias ativas, moléculas modelo para a descoberta e validação de drogas alvo.

A pesquisa farmacológica de plantas medicinais tem propiciado não só avanços importantes para a terapêutica de várias doenças como também tem fornecido ferramentas extremamente úteis para o estudo teórico da fisiologia e da farmacologia (DOHADWALLA, 1985).

Existe um grande número de espécies em todo o mundo, usadas desde tempos pré-históricos na medicina popular dos diversos povos. As plantas medicinais são utilizadas pela medicina atual (fitoterapia) e suas propriedades são vastamente estudadas, a fim de isolar as substâncias que lhes conferem propriedades medicinais (princípio ativo) e assim, produzir novos fármacos.

A escolha de uma planta para estudo químico e farmacológico baseada em seu uso na medicina popular é um dos meios que podem conduzir à descoberta de novos medicamentos ou de substâncias que possam servir como ferramentas farmacológicas ou como modelos para a síntese de novos fármacos.

A espécie *Ocotea duckei* Vattimo, pertencente à família *Lauraceae* é conhecida popularmente como “louro-de-cheiro”, “louro-pimenta” ou “louro-canela”. Informações etnofarmacológicas sobre outras espécies do mesmo gênero nos indicam seu uso na medicina popular, para o tratamento de doenças severas que se manifestam pelos sintomas de dor, neuralgia, dispepsia e anorexia (VAN DEN BERG, 1982).

Do ponto de vista químico, este gênero caracteriza-se, entre outros, pela presença de alcalóides benzilisoquinolínicos, dos quais um dos componentes majoritário é a reticulina, lignanas furofurânicas e óleo essencial. A reticulina foi isolada da casca do caule da *Ocotea duckei* VATTIMO, sendo conhecida por ser um precursor comum na rota biosintética da morfina e papaverina, e estruturalmente relacionado à papaverina, um agente espasmolítico não-específico (MARTIN et al., 1993).

É reportado na literatura que a reticulina possui atividade antiespasmódica (MARTIN et al., 1993), efeito depressor central em ratos e camundongos (MORAIS et al., 1998), efeitos no sistema dopaminérgico central (WATANABE et al., 1981), efeito inibitório das contrções uterina (MARTIN et al., 1988) e ação bloqueadora neuromuscular (KIMURA et al., 1983).

Ao longo do tempo, tem-se verificado que os alcalóides que ocorrem na gênero *Chondodendron* são bisbenzilisoquinolínicos. Uma variedade destes alcalóides bis, mono e bisterciários tem sido encontrada naturalmente, nas quais, as duas metades são juntas, cabeça-calda, por meio das ligações éter. No esqueleto da curina as ligações são entre os carbonos 8-12' e 11-7', Figura 5 (BISSET, 1988). Os principais alcalóides bisbenzilisoquinolínicos das espécies de *Chondodendron* podem ser vistos na Tabela 1. Esta planta, popularmente conhecida como “abutua grande”, é usada na medicina popular brasileira, para alívio de sintomas de numerosas doenças, tais como anemia, diarréia e febre, (PIO CORREA, 1984).

Os curares são conhecidos por promover uma atividade relaxante na musculatura esquelética, competindo com a acetilcolina pelo receptor nicotínico. Em 1856, Claude Bernard demonstrou que a paralisia gerada pelos curares era devido a um bloqueio na transmissão neuromuscular. Em 1905, Langley sugeriu que essas substâncias se ligavam ao receptor não despolarizante, atuando como antagonistas competitivos nos receptores nicotínicos, na placa motora terminal. Alguns bloqueadores neuromusculares, além de bloquearem os receptores, bloqueiam igualmente os canais para cálcio de forma semelhante às drogas bloqueadoras ganglionares.

Os alcalóides bisbenzilisoquinolínicos (BBA) são obtidos biogeneticamente a partir da dimerização oxidativa do núcleo básico benzilisoquinolínicas (Figura 1). Algumas bases possuem uma ligação difenil éter, embora existam algumas com duas ou três, devido a diferentes sítios, onde pode ocorrer a dimerização. Esse grupo BBA representa um excelente exemplo de diversidade que foi descoberto através de produtos naturais relacionados (BARBOSA-FILHO et al., 1997). Na Figura 1, pode ser visto o núcleo benzilisoquinolínico e alguns tipos de alcalóides BBA.

A estrutura BBA é caracterizada por possuir o núcleo benzilisoquinolínico, dimerizado por meio de ligação éter (BARBOSA-FILHO et al., 1997); e formada por três anéis: A, B e C onde a numeração do anel C é determinada pelas posições dos

substituintes, de modo que sejam atribuídas numerações menores aos carbonos substituídos (GUHA; MUKHERJEE, 1979).

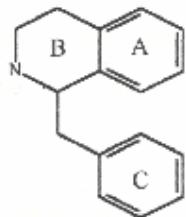


Figura 1. Núcleo básico dos alcalóides benzilisoquinolínicos

Alcalóides bisbenzilisoquinolínicos têm sido descritos como inibidores do influxo de Ca^{2+} , através do bloqueio dos canais para Ca^{2+} -dependentes de voltagem (VGCC) (FREITAS et al., 1995; LIU et al., 1995). BBA parece ter uma interação direta nos sítios alquilamina e benzotiazepina dos VGCC (KING et al., 1988, FELIX et al., 1992) sendo possível, também, interações alostéricas com diversos sítios do VGCC (FELIX et al., 1992).

1.1 Aspectos botânicos do gênero *Ocotea duckei*:

A literatura botânica relata que cerca de 200 espécies do gênero *Ocotea* ocorrem, em geral, em florestas úmidas tropicais e subtropicais. A planta *Ocotea duckei* Vattimo (Figura 2) encontra-se abundantemente distribuída no Nordeste do Brasil, nos estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Sergipe e Ceará (BARREIRO, 1990). É um vegetal de porte arbóreo pertencente à família *Lauraceae*, popularmente conhecida como "louro-de-cheiro", "louro-pimenta" e "louro-canela". Uma exsicata encontra-se presente no herbário Lauro Pires Xavier, com identificação AGRA 4309.



Figura 2. Fotografia das folhas e frutos da espécie *Ocotea duckei* VATTIMO (DIAS, 2002)

1.2 Aspectos químicos da reticulina:

Quimicamente o gênero *Ocotea duckei* apresenta uma grande diversidade de classes de substâncias cujos principais metabólitos são monoterpenos, alcalóides, lignanas e neolignanas (GOTTLIEB, 1994).

A reticulina, um alcalóide do tipo benzilisoquinolínico (Figura 3), isolado da casca do caule de *Ocotea duckei* VATTIMO, apresenta-se como um sólido amorfo, amarelo-escuro, com fórmula molecular $C_{19}H_{23}NO_4$ e massa molecular 329.

A reticulina apresentou efeito vasorelaxante dependente e independente do endotélio funcional. O efeito independente de endotélio é, provavelmente, devido a uma inibição do influxo de Ca^{2+} através dos canais para cálcio abertos por voltagem (CaV) e inibição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, sensíveis à noradrenalina, mas não dos sensíveis à cafeína (DIAS, 2002).

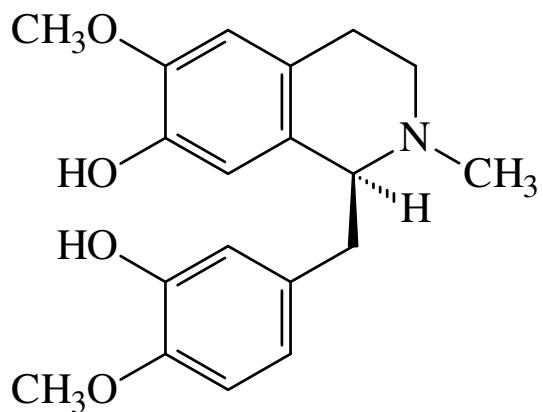


Figura 3. Estrutura química da reticulina

1.3 Aspectos botânicos do gênero *Chondodendron*:

A família *Menispermaceae* foi estabelecida por AL de Jussieu em 1789. Este nome é uma alusão à morfologia da semente, que tem semelhança ao formato de lua no quarto minguante. A família pertence à ordem das *Ranunculales*, que é subdividida em 78 gêneros e, aproximadamente, 520 espécies (WIKIPÉDIA, 2009). Estas espécies são encontradas por todo o continente, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, a família *Menispermaceae* representa uma variedade de 12 gêneros com 106 espécies, e o principal centro de dispersão está na Floresta Amazônica (BARROSO, 1978). A família *Menispermaceae* é quimicamente e farmacologicamente conhecida pela presença de alcalóides naturais usados na preparação dos “curares”, um termo genérico que descreve a expressão “veneno de flecha”, usado especialmente pelos índios do sul da Amazônia e é populamente conhecido como: “curare”, “pareira-brava”, “pareira”, “uva-da-serra”, “uva-do-mato”. Na América do Sul, os curares são preparados por meio da infusão da planta e o extrato concentrado resulta da lenta evaporação do solvente. De acordo com o recipiente em que são guardados, bem como, de acordo com a sua composição química, os curares são classificados em: “curare de tubo”, “curare de pote”, “curare de cabeça”. Os dois primeiros são preparados especialmente no Brasil e Peru, sendo obtidos a partir de *Menispermaceae* dos gêneros *Chondodendron*, *Curarea*, *Abutua*, *Amnospermum*, *Cissampelos*, *Sciadotenia* e *Telitoxicum*. O curare

de cabeça é produzido nas Guianas, Venezuela e Colômbia, sendo extraído a partir das *Loganiaceae* do gênero *Strychnos* (BISSET, 1988).



Figura 4. Fotografia das folhas e frutos da espécie *Chondodendron platyphyllum* (LACERDA, 1999)

Quadro 1. Ocorrência de alcalóides bisbenzilisoquinolínicos em espécies de *chondodendron* (LACERDA, 1999)

Espécie	Parte Utilizada	Alcalóides Presentes	Referência Bibliográfica
<i>Ch. platyphyllum</i>	r	Isocurina, Curina	KING, 1940
	c.c.	12-O-Metilcurina, Curina	GUEDES, 2002
		Isocurina	BISSET, 1988
	f	Curina	KING, 1940
	f	Chondrofolina	BALDAS et al, 1971
<i>Ch. microphyllum</i>	r	Isocurina, Curina	KING 1940
<i>Ch. Tomentosum</i>	c.c	Tubocurarina	BICK; CLEZY, 1960
	c.c	Chondrocurarina	DUTCHER, 1952
	c.c	Chondrocurarina, Curina	KING, 1947, 1948
	c.c	Tomentocurina, Cicleanina	WINTERSTEINER
Raiz (r), casca do caule (c.c), folhas (f)			

1.4 Aspectos químicos da curina

A curina (Figura 5) é a principal estrutura BBA, isolada a partir da raiz e cascas de *Chondrondendron platyphyllum* (BARBOSA-FILHO et al., 2000). Estudos anteriores mostram que curina induziu um efeito vasorelaxante em artéria mesentérica de rato, sugerindo uma possível inibição dos VGCC (DIAS et al., 2002). Assim, alguns estudos têm mostrado que a curina poderia ter uma associação com sítio alquilamina dos VGCC (KING et al., 1988), assim como poderia interagir com os sítios allostéricos sensíveis ao diltiazem (FELIX et al., 1992).

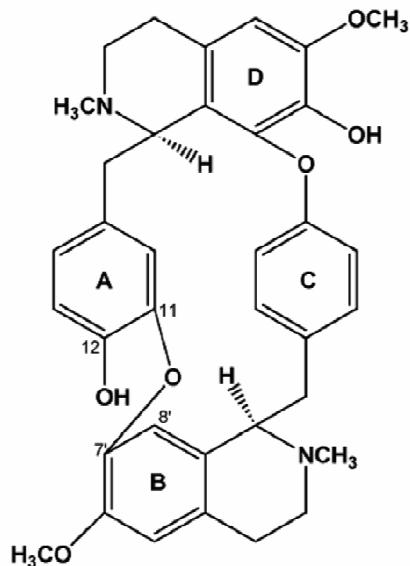


Figura 5. Estrutura química da curina

1.5 O papel do íon cálcio e de canais para cálcio na fisiologia celular

Os Ca^{2+} agem nas células como segundo-mensageiros, capazes de ativar diversas funções celulares. Sua concentração citossólica é extremamente baixa na célula em repouso ($\sim 100 \text{ nM}$), comparada com sua concentração externa (1 a 2 mM) e com a concentração interna de outros íons, como o sódio, por exemplo ($\sim 10 \text{ mM}$).

Um pequeno influxo de Ca^{2+} em uma célula excitável faz com que a concentração desse íon aumente muito em relação ao repouso, permitindo que funções fisiológicas dependentes de cálcio sejam ativadas. Entre elas, a contração muscular, a secreção, a abertura de canais iônicos, a ativação de enzimas metabólicas e de sinalização, e a expressão gênica (YAMAKAGE; NAMIKI, 2002).

Quando a atividade de canais para cálcio abertos por voltagem aumenta em células excitáveis, a concentração desse íon em regiões bem próximas à membrana plasmática pode subir para até 100 μM . Enzimas específicas são ativadas pelo Ca^{2+} nas vizinhanças da membrana, engatilhando processos em cascatas bioquímicas, importantes na célula (DE WAARD et al., 1996).

O aumento de cargas positivas, nas proximidades da membrana, tem a propriedade de modificar seu potencial de repouso, diminuindo o limiar de excitação da célula e facilitando, portanto, o disparo de potenciais de ação. O aumento crônico da concentração de cálcio interno pode deixar a membrana celular despolarizada por vários milissegundos, modulando, dessa maneira, a propagação desses potenciais de ação.

A contração muscular é uma das funções ativadas pelo Ca^{2+} mais estudadas. A ligação desse íon em receptores do retículo endoplasmático (chamados receptores de rianodina) desencadeia a abertura de canais para cálcio nessa organela, fazendo com que a concentração de cálcio citossólica aumente drasticamente (o retículo endoplasmático é conhecido por ser um repositório de cálcio intracelular). Por meio desse processo, a enzima MLCK é ativada, o que resulta em contração muscular. Existe, dessa forma, um papel importante do cálcio no acoplamento entre excitação e contração (ZHANG et al., 2007).

O cálcio também tem importante papel no acoplamento entre excitação-secreção (MANSVELDER et al., 2000). Em células secretoras e neurosecretoras, a entrada de cálcio desencadeia a fusão de vesículas citoplasmáticas (de conteúdos diversos como hormônios, neurotransmissores, dentre outros) com a membrana citoplasmática, permitindo a saída de seu conteúdo para o meio extracelular (HILLE, 2001).

No coração, canais para cálcio são importantes, para a modulação do ritmo cardíaco via nodo-sinoatrial (TRIGGLE, 1998). Os canais para Ca^{2+} do tipo T abrem em potenciais mais negativos, levam a membrana para o limiar de ativação de canais para Ca^{2+} do tipo L. Juntos, os canais para cálcio remanescentes do tipo L e

T, são os responsáveis por disparar o potencial de ação no nodo sino-atrial (YAMAKAGE; NAMIKI, 2002). Além disso, canais para cálcio são responsáveis por manter a condução pelo nodo atrioventricular e manter o *plateau* do potencial de ação cardíaco. (SHOROFSKY et al., 2001)

Os vários papéis da entrada do Ca^{2+} nas células, e suas complexas funções mostram a grande importância dos canais para cálcio abertos por voltagem para a fisiologia celular nos vários tecidos, onde são encontrados (cérebro, músculo, etc.). Para que haja uma modulação dessas funções bioquímicas e elétricas, evidencia-se cada vez mais a existência de uma grande variedade desses canais, com diversas funções e propriedades. Torna-se, então, de grande importância o estudo desses canais, bem como suas propriedades estruturais e funcionais, para o bom entendimento dos processos que eles desencadeiam.

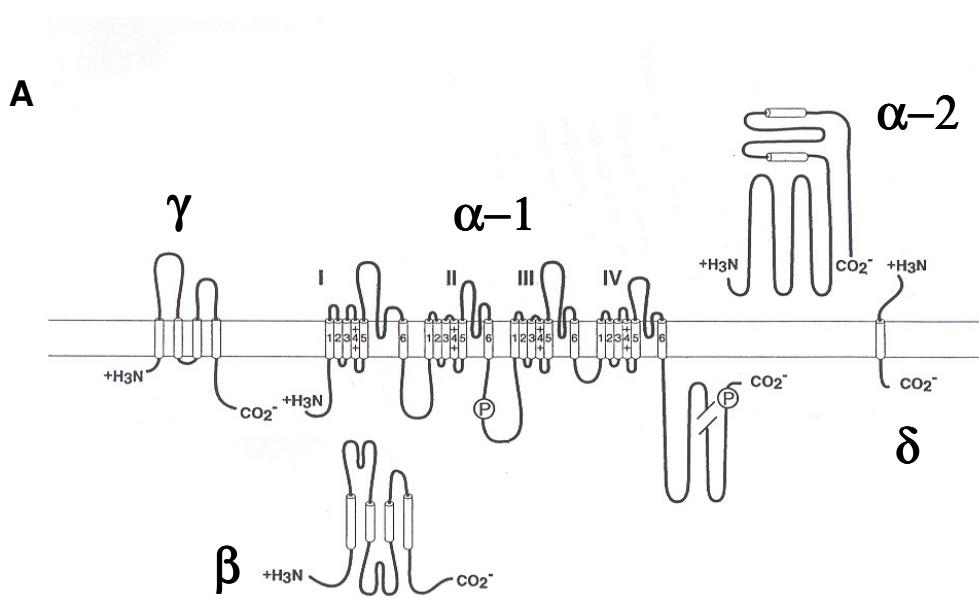
1.6 Os canais para cálcio dependentes de voltagem

Em 1953, com o estudo da transmissão neuromuscular em patas de caranguejo, descobriu-se que os potenciais de ação muscular desses animais não necessitavam da presença do íon sódio para disparar. Pelo contrário, a ausência desses íons tornava esses potenciais mais fortes. Descobriu-se que poderiam existir potenciais de ação que não usassem canais para sódio para dispará-los. Estudos com substituição de íons das soluções externas mostraram, porém, que o íon cálcio era necessário para a ativação desses potenciais de ação. Era o primeiro indício da existência de canais para cálcio (FATT et al., 1953)

Canais para cálcio são necessários para o funcionamento de uma célula excitável. De fato, são estruturas ubíquas, presentes em vários seres vivos, desde protozoários até mamíferos. “São responsáveis pela regeneração da excitabilidade elétrica em músculos de artrópodes, moluscos, nematódeos, e tunicatos adultos, assim como em músculos lisos de vertebrados” (HILLE, 2001). Estão presentes, também em todos os terminais nervosos que são responsáveis pela modulação da exocitose de neurotransmissores. Canais para cálcio também estão envolvidos em diversas patologias e desordens humanas como arritmias, enxaquecas congênitas, ataxia cerebelar, angina, epilepsia, hipertensão e isquemia (SHOROFSKY et al., 2001).

1.6.1 Estrutura e Funcionamento dos canais para cálcio

Todos os canais para cálcio dependentes de voltagem são compostos pela subunidade α -1, que possui todos os requisitos para o funcionamento de um canal, como um poro, um filtro de seletividade, “sensores de voltagem”, um mecanismo de inativação e também como sítios para ligações de toxinas e drogas (HOFFMAN et al., 1999; CATTERALL, 2000). Existe, também, a co-expresão da subunidade alfa-1 com outras subunidades auxiliares, como β , γ e $\alpha_2\delta$. Estas subunidades possuem caráter puramente modulatório, por apenas modificar a forma de funcionamento do canal e produzir alterações em suas propriedades biofísicas (HOFFMAN et al., 1999). Segundo De Waard et al. (1996), a configuração estrutural mínima de um canal de cálcio ativado em voltagens mais despolarizantes (HVA) é $\alpha_1\alpha_2\delta\beta$ e possivelmente mais uma subunidade α de acordo com o tecido.



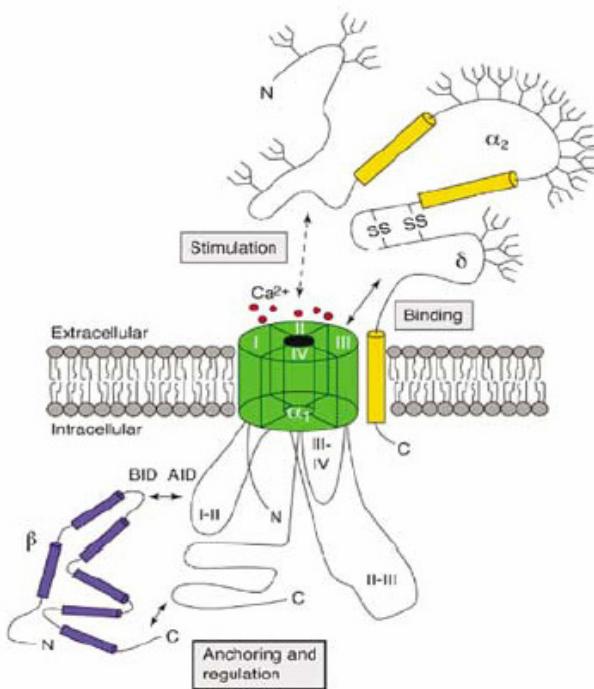
B

Figura 6: Esquema geral das subunidades de canais para cálcio na membrana plasmática de uma célula. **A)** a subunidade transmembrana α -1, esta com seus domínios de I a IV representados; o segmento S4 carregadas positivamente (símbolos +) segmento entre S5 e S6, que forma o poro e motivos de fosforilação (P). Vê-se, também, as subunidades β , intracelular, e α 2, extracelular. Adaptado de Catteral W. A. (2000). **B)** complexo heterotrimérico do canal de cálcio (WALKER; DE WAARD, 1998; DOLPHIN, 2006).

Os canais para cálcio bem como outros canais iônicos dependentes de voltagem (Na^+ , K^+) possuem estrutura e funcionamento similares (HILLE, 2001). Há uma mudança estrutural no momento da abertura do canal (chamada de *gating*), causada pela mudança de conformação dos “sensores de voltagem”, após uma despolarização da membrana. Essa mudança estrutural leva à desocclusão do poro, permitindo a passagem de íons, o que permite dizer que os canais são dependentes de voltagem para se ativarem. A passagem de íons depende de uma força tanto química quanto elétrica exercida pelas soluções internas e externas à célula, chamada força eletroquímica. Essa passagem de íons, ou corrente iônica, cessa quando o poro é ocluído novamente pelo fechamento do canal, ou por obstrução por alguma partícula. Se a força eletroquímica for nula, a corrente iônica também pode deixar de ocorrer, mesmo se o canal estiver aberto. Os canais para cálcio possuem

estruturas de inativação intrínsecas, que obstruem o poro e o inativam, reduzindo, dessa forma, o tempo de abertura do canal (HOFFMAN et al., 1999). Existe, então, apenas um estado onde pode haver passagem de corrente iônica pelo canal, o estado aberto, e pelo menos dois estados por onde não há passagem de corrente, o estado fechado e o inativado.

1.6.2 A Subunidade α -1

A subunidade α -1 de canais para cálcio dependentes de voltagem é uma proteína transmembrana relativamente grande, com uma massa que varia entre 190 e 250 kDa (CATTERAL, 2000). É composta por 4 domínios homólogos, os domínios I, II III e IV, onde cada uma é dividida em 6 segmentos transmembranar, denominadas “S”. Sua topologia é sugerida pela análise da hidrofobicidade de sua sequência de aminoácidos (CATTERALL et al., 2005).

Uma das características dos canais iônicos dependentes de voltagem é a presença de aminoácidos carregados positivamente (arginina e lisina), na segmento S4 de cada domínio da subunidade α -1. Presume-se que essas cargas positivas são as responsáveis pela resposta à mudança na polarização da membrana e, dessa forma, pela abertura, ou *gating*, do canal. Especula-se que uma translocação espacial dessas subunidades acarretaria em uma mudança conformacional em toda a estrutura, desocluindo o poro e permitindo a passagem de íons. Assim, as segmento S4 são definidas como sensores de voltagem dos canais para cálcio dependentes de voltagem (revisto em HOFFMAN et al., 1999, CATTERAL, 2000).

As quatro segmentos da subunidade α -1, quando agrupadas na membrana plasmática, dispõem-se, dessa forma, a agrupar as alças (“loops”) entre os segmentos transmembranares S5 e S6 (chamadas de “loops” P), formando, então, um filtro seletivo apenas para a entrada de alguns íons (Figura 6). Determinou-se também, por análises mutacionais desses “loops” P, que quatro resíduos de glutamato são necessários para determinar a seletividade do canal. (KIM et al., 1993, CATTERAL, 2000). Além disso, é relatado que não só o cálcio como outros íons divalentes como o Ba^{2+} , Mg^{2+} e o Sr^{2+} têm uma facilidade muito maior de passar por esse filtro, inclusive competindo entre si por ligações na parede do poro

(CATTERALL et al., 2005). Admite-se que o poro seja uma passagem entre o meio externo e o interno da célula, e que conteria somente moléculas de água, até se abrir e permitir a passagem de íons (DOLPHIN, 2006). É sugerido que o poro é formado pela união dos quatro domínios da subunidade α -1, se unindo entre si. O poro teria a forma de um cone com o vértice no centro da membrana plasmática e os segmento S6 formariam o perímetro externo do cone (GUY et al., 1990). Os “loops” P também teriam um papel na formação desse poro, estabilizando o vértice interno formado pelos segmento S6, e controlando a permeabilidade do canal (KIM et al., 1993).

Partes da própria estrutura da subunidade α -1 são responsáveis pela inativação do canal. Análises mutacionais mostram que o segmento S6 do domínio I tem papel crítico para as propriedades de inativação dos canais para cálcio (ZHANG et al., 1994) bem como a cauda carboxy-terminal (WEI et al., 1994).

Uma gama de proteínas e subunidades acessórias se ligam à subunidade α -1. Os sítios de ligações principais se encontram em todos os 4 domínios e na cauda carboxy terminal. Os “loops” entre os domínios 2 e 3 funcionam, em sua maioria, para ligações de proteínas que irão transduzir sinais intracelulares, enquanto nos outros domínios e na cauda carboxy terminal, servem como moduladores da cinética do canal (HOFFMAN et al., 1999).

1.6.3 A Subunidade $\alpha_2\delta$

A Subunidade $\alpha_2\delta$ é constituída por uma parte transmembrana que ancora a proteína α_2 , chamada δ . A proteína α_2 é totalmente extracelular e ligada à subunidade δ por pontes de dissulfeto (CATTERAL, 2000). Possui, em músculo esquelético, 175 kDa (DE WAARD, et al., 1996) e é bastante glicosilada. Do gene dessa subunidade derivam pelo menos cinco outros subtipos por “*splicing*”, em tecidos diferentes (DE WAARD, et al., 1996, HOFFMAN et al., 1999). A expressão dessa subunidade em conjunto com a α -1, resulta em um deslocamento da dependência de voltagem do canal para potenciais mais hiperpolarizados, aumentando a amplitude da corrente e acelerando a cinética de ativação e inativação (HOFFMAN et al., 1999).

1.6.4 A Subunidade β

A subunidade beta é uma proteína totalmente intracelular de tamanho variado entre 50 a 72 kDa. Foram identificados 4 genes, entre os anos de 1989 e 1993 (HOFFMAN et al., 1999), que a traduzem e mais vários “*splicings*” variantes. Sua expressão em conjunto com a subunidade α -1 produz os mesmos efeitos que a subunidade $\alpha_2\delta$, além de facilitar a abertura do canal.

1.6.5 A Subunidade γ

A subunidade gama é uma proteína transmembrana de massa molecular média de 25 kDa. É expressa em músculo esquelético e cérebro. Sua topologia revela 4 segmentos transmembrana previsto por análise de hidrofobicidade da estrutura primária. A coexpressão dessa subunidade com a α -1, $\alpha_2\delta$ e β produz um deslocamento nas curvas de inativação do estado estacionário, para potenciais mais hiperpolarizados (HOFFMAN et al., 1999).

1.7 Famílias de canais para cálcio dependentes de voltagem

Segundo HILLE (2001), os canais para cálcio dependentes de voltagem foram sendo divididos, com o passar dos anos, por dados obtidos por três diferentes maneiras, desde seu descobrimento na década de 1950. Inicialmente foram feitas diferenciações apenas comparando o potencial de ativação desses canais. Depois foram usadas ferramentas farmacológicas e eletrofisiológicas, pela técnica de “*patch-clamp*”, para se obter um maior detalhamento funcional. Mais recentemente, foi possível a clonagem e subsequente comparação das sequências de DNA dos canais, de modo a agrupá-los em famílias de acordo com sua similaridade.

1.7.1 Classificação por potenciais de ativação e patch-clamp

Duas classes de canais para cálcio puderam ser classificadas, tomando-se por referência seu potencial de ativação. Uma classe ativada em potenciais mais

negativos (menores que -50 mV), chamada “*low-voltage activated*” ou LVA, ou ainda, canais do tipo T, e outra, ativada em potenciais mais despolarizantes (maiores que -40 mV), chamada “*high-voltage activated*” ou HVA (DE WAARD, et al., 1996).

Atualmente, essa classificação começa a se tornar controversa pelo aparecimento de achados na literatura (AVERY e COLS, 1996; GLASSMEIER et al., 2001; XU et al., 2001), onde canais do tipo HVA apresentam ativação em potenciais mais negativos.

Com o advento da técnica de *patch-clamp* (ver material e métodos) foi possível obter dados biofísicos mais detalhados sobre o funcionamento dos canais para cálcio. O estudo de canais unitários usando esse método levou a uma nova nomenclatura, suplementando as duas classificações feitas anteriormente. Os canais HVA passaram a ser, também, designados do tipo L, por possuírem uma grande condutância unitária (L pela palavra inglesa “Large”) e pela corrente que se mantinha por muito tempo (“Long-lasting”). Os canais LVA foram designados do tipo T, por apresentarem uma pequena condutância (“Tiny”) e por se inativarem rapidamente, apresentando uma corrente de curta duração (“Transient”) (YAMAKAGE; NAMIKI, 2002). Os canais do tipo T serão melhor discutidos no tópico 5.

A inativação dos canais do tipo L parece ser dependente de cálcio externo. Alguns estudos mostraram que a subunidade $\alpha 1$ desses canais possui motivos para ligação de calmodulina, que levaria à inativação dos mesmos (PETERSON et al., 1999). Em contraparte, canais do tipo T parecem não possuir esses motivos, e não apresentam a necessidade desse íon para se inativarem.

Outras características como potenciais para inativação, taxas de inativação e desativação, estado estacionário da inativação, condutância, tempo no estado aberto e modos de “*gating*” também foram levados em conta na classificação desses canais (Tabela 1).

1.7.2 Classificação com base farmacológica

O uso de fármacos com o intuito de discriminar os canais para cálcio por seus diferentes efeitos, foi, e ainda é, muito útil para classificá-los. Apesar do número de classes de drogas testadas em canais para cálcio com respostas diferenciadas crescer a cada dia (DE WAARD, et al., 1996), inicialmente apenas três classes de

drogas discriminaram canais para cálcio com eficiência (SNUTCH et al., 2001): bloqueadores orgânicos, como as dihidropiridinas (DHPs) e mibepradil, toxinas peptídicas, como as ω -conotoxina GVIA (ω -CgTx GVIA) e ω -agatoxina IVA(ω -Aga IVA) e por fim, bloqueadores inorgânicos como íons Cd^{2+} e Ni^{2+} .

A permeabilidade de canais para cálcio por outros íons foi outra propriedade estudada que tornou possível detalhar ainda mais as características e singularidades desses canais (Tabela 1).

1.7.3 Canais para cálcio sensíveis às dihidropiridinas (DHP)

As 1,4-dihidropiridinas são compostos orgânicos sintéticos, lipossolúveis, que, em concentrações entre $20\mu M$ a $50\mu M$, agem somente em canais para cálcio do tipo L. Mas em concentrações elevadas também afetam outros tipos de canais para cálcio, além de canais para sódio e potássio (HILLE, 2001). É uma vasta classe de drogas, entre as quais podemos citar nifedipina, D-600, nitrendipina, nicardipina e BAY K 8644 como representantes. A droga BAY K 8644 é a única que possui o efeito de aumentar as correntes de cálcio do tipo L (agonista), enquanto todas as outras têm efeito bloqueador (antagonista) (HILLE, 2001). Apesar das dihidropiridinas serem mais específicas para canais HVA, existem casos na literatura que demonstram concentrações baixas de dihidropiridinas (na faixa de nanomolar), inibindo correntes nativas do tipo T (HERRINGTON et al., 1992).

Atualmente, o bloqueio de canais para cálcio do tipo L por compostos orgânicos, como as dihidropiridinas, já está bem definido e é a base de um mercado farmacêutico multibilionário para o tratamento de doenças cardíacas e de enxaqueca (SNUTCH et al., 2001), Tabela 1.

1.7.4 Canais para cálcio sensíveis às toxinas peptídicas

As toxinas peptídicas ω -conotoxina, GVIA e ω -agatoxina, IVA, redefiniram a classificação dos canais para cálcio, resultando em uma inclusão de mais 3 classes de canais: N, P/Q e R.

Estudos em neurônios de galinhas levaram à descoberta de canais para cálcio insensíveis às DHPs e com condutância unitária intermediária à dos canais do tipo T e L. Foram designados tipo N, pelo fato de terem sido descobertos em neurônios (YAMAKAGE; NAMIKI, 2002; DOLPHIN, 2006). A ω -conotoxina GVIA é um peptídeo derivado do veneno do molusco marinho *Conus geographus* e bloqueia, especificamente, canais para cálcio do tipo N. Essa toxina possui alta afinidade por esses canais em neurônios simpáticos e não afeta canais sensíveis às DHPs, tornando-se, portanto, uma característica destes canais (DE WAARD et al., 1996).

Outros canais foram descobertos por serem insensíveis tanto às DHPs quanto à ω -CgTx, GVIA. Estes canais foram designados P/Q e são sensíveis à ω -agatoxina IVA, um peptídeo constituído por 48 aminoácidos, derivados do veneno da aranha *Aglenopsis aperta* (HILLE, 2001, DE WAARD et al., 1996).

Os canais do tipo R (Resistentes) foram chamados dessa maneira por não responderem a essas toxinas e às DHPs.

Assim como os canais do tipo R, os canais do tipo T também são insensíveis às ω -CgTx GVIA e ω -Aga, IVA. Os canais do tipo R são, também, insensíveis a baixas concentrações de DHPs (DE WAARD et al., 1996).

1.7.5 Bloqueadores inorgânicos e a permeabilidade a outros íons

Os bloqueadores inorgânicos de canais para cálcio dependentes de voltagem incluem íons divalentes e trivalentes como Cd^{2+} , Ni^{2+} e La^{3+} . Todos os canais para cálcio descritos até agora são bloqueados por esses íons, parecendo ser essa uma característica comum entre eles. Seu bloqueio é reversível e a concentração necessária para o bloqueio total da corrente varia de família para família, numa faixa de 10 μM a 20 mM (HILLE, 2001).

Outros íons divalentes como o Ba^{2+} e o Sr^{2+} são muito permeáveis em canais HVA. O íon Ba^{2+} é um bloqueador de canais para potássio. Além disso, correntes de Ba^{2+} chegam a apresentar um pico duas ou mais vezes maiores do que o Ca^{2+} . Por esse motivo, o Ba^{2+} muitas vezes é usado em substituição ao cálcio em muitos

experimentos eletrofisiológicos. Há, entretanto, algumas controvérsias em relação à permeabilidade do íon Ba^{2+} em canais do tipo T (HILLE, 2001).

Também é descrito que íons monovalentes podem passar por canais para cálcio dependentes de voltagem, na completa ausência de Ca^{2+} . Já foram observadas correntes de saída de Cs^+ , quando não havia nenhum íon divalente na solução interna (VINET; COLS, 1999).

1.8 Classificação molecular e nomenclatura

Pelo menos dez genes diferentes codificam subunidades α -1 de canais para cálcio dependentes de voltagem. Os primeiros genes para canais para cálcio do tipo L foram clonados de túbulos transversos de músculo esquelético (TANABE et al., 1987). Todos os demais genes de canais para cálcio foram encontrados por *screening* de bibliotecas de cDNA e homologias entre sequências. Com a clonagem dos vários genes de subunidades α -1, comprovou-se, a partir de similaridades moleculares, as classificações feitas anteriormente. Foi possível, então, agrupá-los em 3 famílias distintas, os canais do tipo L em um grupo, os canais do tipo P/Q, N e R em outro grupo e os canais do tipo T em um outro grupo. Existe, ainda, a possibilidade de haver “*splicing*” alternativo de vários transcritos desses genes, gerando, então, uma diversidade ainda maior de canais. Possivelmente, esses canais evoluíram de um único gene ancestral, e depois por duplicação gênica e divergência genômica, chegaram na sua diversidade atual (DE WAARD et al., 1996).

Os canais para cálcio do tipo L, isolados e clonados do músculo esquelético, foram incluídos na classe S (de “skeletal”). Outros genes, C, D e F foram também incluídos nessa família, que foram encontrados em tecidos do coração e sistema nervoso central (ERTEL et al., 2000). A família de genes para os canais do tipo P/Q, N e R foram enquadrados nas classes A, B e E respectivamente. Esses genes foram encontrados em tecidos do sistema nervoso central. A última família de genes, a dos canais do tipo T, foi classificada como 3 grupos distintos de genes: G, H e I, encontrados no cérebro, coração, rim e fígado.

A classificação por letras do alfabeto não revela uma relação estrutural entre esses canais, de forma que, no ano de 2000, Ertel et al. adotaram uma nova nomenclatura onde se usa o símbolo do íon permeante Ca_v , a letra correspondente a seu regulador fisiológico (v de voltagem) e o número de sua família, variando de 1 a 3. Dessa forma, surgiu uma nova classificação que coloca os canais para cálcio dependentes de voltagem distribuídos entre $Ca_v1.1$ até $Ca_v1.4$ (tipo L), $Ca_v2.1$ até $Ca_v2.3$ (tipos N, P/Q, R) e $Ca_v3.1$ a $Ca_v3.3$ (tipo T) (Figura 7).

Uma das maiores diferenças estruturais entre as famílias de canais são os modos como eles são regulados. A família Ca_v1 é regulada, basicamente, por fosforilação de proteínas cinases ativadas por segundo-mensageiro, enquanto a família Ca_v2 é regulada pela ligação de proteínas SNARE e proteínas G. Pouco ainda se sabe sobre a regulação da família Ca_v3 (CATTERAL, 2000).

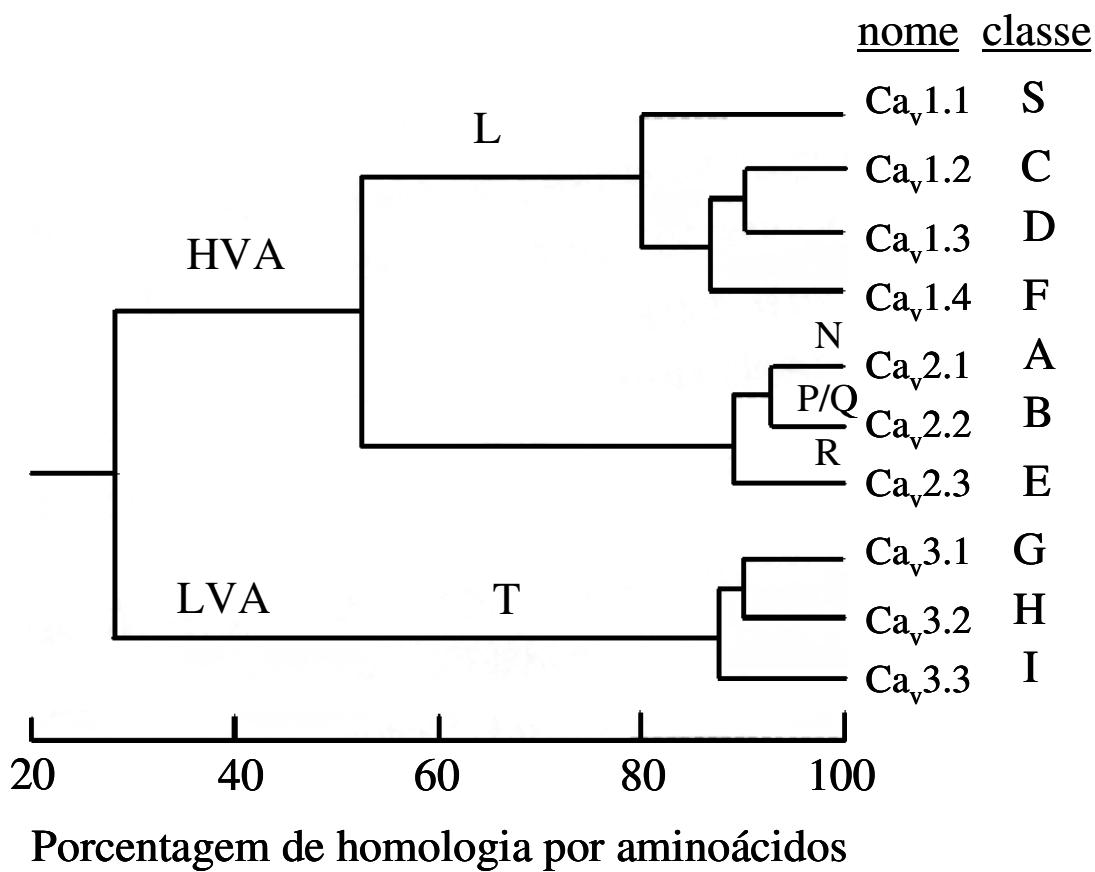


Figura 7. Agrupamento de canais para cálcio dependentes de voltagem de acordo com sua similaridade molecular. Existem dois entroncamentos que levam a duas grandes famílias de canais para cálcio, as HVA e LVA ou do tipo T. Adaptado de Hille (2001) e Ertel et al. (2000).

Tabela 1. Propriedades de canais para cálcio regulados por voltagem (CATTERALL et al., 2005)

Classificação pela ativação	Tipo da corrente	Nomes	Classe dos genes	Localização tecidual	Ativação (mV)	Inativação (mV)	Taxa de Inativação (ms)	Condutância relativa	Bloqueador específico	Desativação	Condutância de canal unitário (pS)
HVA	L	Ca _v 1.1	S (α_{1S})	Músculo esquelético, Coração, músculo liso, cérebro, pituitária, adrenal	8-14	-8	>500	Ca ²⁺ > Sr ²⁺ > Mg ²⁺ > Ba ²⁺	DHPs	Rápida	13-17
		Ca _v 1.2	C (α_{1C})		-4/-18	-50/-60		Ba ²⁺ > Ca ²⁺ = Sr ²⁺ > Mg ²⁺			25 (Ba ²⁺) 9 (Ca ²⁺)
		Ca _v 1.3	D (α_{1D})		-15/-20	-36/-43		não estabelecido			não estabelecido
		Ca _v 1.4	F (α_{1F})		-2,5/-12	-9/-27		Ba ²⁺ > Ca ²⁺			não estabelecido
	N	Ca _v 2.1	A (α_{1A})	sistema nervoso, cérebro, coração, retina	>-20	-120 a -30	50-80	Ba ²⁺ > Ca ²⁺	ω-CgTx GVIA	Rápida	13
	P/Q	Ca _v 2.2	B (α_{1B})						ω-Aga IVA		
	R	Ca _v 2.3	E (α_{1E})						SNX-482		
LVA	T	Ca _v 3.1	G (α_{1G})	Cérebro, coração, rins, fígado, sistema nervoso	>-50	-100 a -60	20-50	Ba ²⁺ <= Ca ²⁺	nenhum	Lenta	8
Ca _v 3.2	H (α_{1H})										
Ca _v 3.3	I (α_{1I})										

1.9 Papel do Ca^{2+} no músculo liso

O cálcio é um importante segundo mensageiro que desempenha um papel necessário a uma grande variedade de processos biológicos, incluindo a transdução de sinais, regulação enzimática, expressão gênica, tráfego de proteínas, 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 permite o influxo de 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 Ca^{2+} para o citosol (PAN; MA, 2003).

A concentração de Ca^{2+} intracelular livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) é um fator chave para muitas respostas celulares dependentes da ligação dos íons Ca^{2+} e para um vasto número de moléculas efetoras. Estas moléculas efetoras incluem várias enzimas, proteínas contráteis de ligação ao Ca^{2+} além de canais iônicos presentes na membrana. Dentre os últimos, os canais iônicos sensíveis ao Ca^{2+} têm especial interesse, visto que estão associados a mudanças na $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Tais mudanças resultam em variações no potencial de membrana (V_m) e, dessa forma, afetam os canais iônicos dependentes de voltagem, resultando na excitabilidade da célula. Muitos desses canais sensíveis ao Ca^{2+} são também sensíveis à voltagem, desse modo, dependentes do V_m ; diferentes tipos são responsáveis por variações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (GORDIENKO et al., 1999), sendo que, nas células do músculo liso, estão mais comumente expressos os canais para potássio de grande condutância ativado pelo Ca^{2+} (BK_{Ca}), canais para Cl^- e canais catiônicos, ativados pelo receptor muscarínico que, além de sensíveis ao Ca^{2+} intracelular, são regulados por proteínas-G (INOUE; ISENBERG, 1990). A atividade de todos esses canais se reflete em variações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ da vizinhança imediata do lado intracelular da membrana plasmática (BENHAM; BOLTON, 1986).

No músculo liso, um aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é a causa primária para a deflagração da contração e está igualmente envolvida na proliferação celular desse tipo de músculo (VAN BREEMEN; SAIDA, 1989). A regulação funcional da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, para dar início a uma resposta contrátil no músculo liso, depende de dois estímulos que levam a dois tipos de acoplamentos: o acoplamento eletromecânico, que está envolvido com a mudança do V_m e o acoplamento fármaco-mecânico, que acontece

quando a contração promovida por um agonista é maior que a observada só com a mudança de V_m (REMBOLD, 1996).

Os mecanismos que levam a uma resposta contrátil por meio do acoplamento eletromecânico são devidos a uma despolarização de membrana diretamente pelo aumento da concentração externa de K^+ ($[K^+]_e$) ou indiretamente pela ligação dos agonistas aos seus receptores, levando à abertura de Ca_V , causando influxo de Ca^{2+} no citoplasma e, consequentemente, à contração (REMBOLD, 1996).

Já é sabido que a contração induzida por agonistas é devida a um aumento na $[Ca^{2+}]_i$ e isto ocorre por meio da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, majoritariamente do R.S. e também pelo influxo de Ca^{2+} do meio extracelular (WRAY et al., 2005; VAN BREEMEN; SAIDA, 1989). Além disso, o influxo de Ca^{2+} é mediado por diferentes tipos de canais, incluindo os canais para cálcio abertos por voltagem (Ca_V); Schild e seus colaboradores, em 1964, demonstraram que agonistas são capazes de produzir contração no músculo liso em preparações despolarizadas com auto $[K^+]$ dependentes da presença de íons Ca^{2+} do meio externo (LARGE, 2002). Isto levou à introdução do termo “canal opened por receptor” (ROC) por Bolton (1979) e Van Breemen et al. (1979). No músculo liso, os ROCs compreendem tanto os canais abertos por ligante, como os canais que são abertos como resultado do acoplamento a um receptor ligado a uma proteína-G (acoplamento fármaco-mecânico). Quando há ativação desses últimos, há, também, ativação da fosfolipase C (PLC) (BERRIDGE, 1997). A PLC ativada promove a hidrólise de fosfolipídios presentes na membrana, produzindo de 1,4,5-trifosfato de inositol ($InsP_3$) que, por sua vez, promove o aumento do $[Ca^{2+}]_i$, por ligar-se aos receptores $InsP_3$ presentes no R.S. ativando canais para Ca^{2+} . A abertura desses canais para Ca^{2+} intracelulares podem serem regulados tanto por $InsP_3$, como pelo próprio Ca^{2+} (WRAY et al., 2005; BERRIDGE, 1993; TAYLOR, 1998), promovendo, dessa forma, o processo regenerativo de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CICR), por meio de receptores de rianodina (sensíveis à cafeína). Tais receptores estão presentes na membrana do R.S. (KOMORI et al., 1995), favorecendo a formação do complexo $Ca^{2+}_4\text{-CaM}$, responsável pelo início da ativação mecanismo contrátil (GARRET; GRISHAM, 1995); a contração, também, pode ocorrer, devido a um aumento do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V -L, por um mecanismo que não envolve mudança no V_m ; outro fator que pode promover um

aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e, consequentemente, a contração, é a ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} (BLAUSTEIN, 1989).

O mecanismo eletromecânico para o relaxamento muscular se dá pela hiperpolarização da membrana, que pode ocorrer em função da liberação do fator relaxante derivado do endotélio (óxido nítrico – NO), que ativa diretamente uma ciclase de guanilil solúvel ou, no caso dos agonistas que induzem relaxamento, a ligação aos seus receptores ativa diretamente uma ciclase de guanilil ou de adenilil, resultando na formação do monofosfato de guanosina cíclico (GMP_c) e do monofosfato de adenosina cíclico (AMP_c), respectivamente. O aumento na [GMP_c] ativa a proteína cinase G (PKG), enquanto que o aumento na [AMP_c] ativa tanto uma proteína cinase dependente de AMP_c (PKA) como a PKG, que resultam na ativação de canais para K⁺ (REMBOLD, 1996). Além disso, a hiperpolarização da membrana das células musculares lisas pode ser produzida por drogas que abrem canais para K⁺ (por exemplo, cromacalina, levocromacalina e nicorandil) e, consequentemente, aumentam o efluxo de K⁺ da célula (EDWARDS; WESTON, 1990; GURNEY, 1994). Dessa maneira, a hiperpolarização reduz o influxo de Ca²⁺ através dos canais Cav-L, diminuindo, portanto, a [Ca²⁺]_i, a fosforilação da miosina e a contração (REMBOLD, 1996).

Os mecanismos de relaxamento envolvidos no acoplamento fármaco-mecânico incluem: (1) aumento na atividade da Ca²⁺-ATPase tanto do R.S. como da membrana plasmática por meio da fosforilação via PKG, levando a um aumento do sequestro e da saída de Ca²⁺, respectivamente, diminuindo, assim, a [Ca²⁺]_i; (2) diminuição da formação do InsP₃, levando a uma diminuição da liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares; (3) redução da [Ca²⁺]_i pelo AMP_c-PKA, por diminuir o influxo de Ca²⁺ indiretamente por hiperpolarização ou por ação direta nos Cav-L; e, finalmente, (4) diminuição da [Ca²⁺]_i, por estimulação do trocador Na^{+/Ca²⁺ (NIE; MENG, 2006).}

Os canais para potássio desempenham um papel chave na regulação do V_m e na excitabilidade celular. O V_m tem um papel importante na resposta contrátil. O V_m do músculo liso depende do balanço entre o aumento da condutância ao K⁺, levando a uma hiperpolarização e à diminuição da condutância ao K⁺, levando a uma despolarização. A abertura do canal de K⁺ hiperpolariza a membrana das células musculares lisas, levando à redução na probabilidade de abertura dos Cav e, portanto, a um relaxamento (KNOT et al., 1996).

O desenvolvimento e manutenção da contração tônica das células do músculo liso arterial são controlados pela concentração de cálcio livre no citoplasma. Os canais para cálcio voltagem-dependente constituem uma via principal para influxo do cálcio. Por conseguinte, eles são fundamentais como alvos para drogas antihipertensivas e vasodilatadoras que controlam o tônus vascular. Como foi dito, dois tipos de canais para cálcio são distinguidos pelas propriedades eletrofisiológicas e farmacológicas nas células do músculo liso arterial: os canais para Ca^{2+} do tipo L que são expressos em todos os tipos de células do músculo liso arterial, incluindo células coronárias humanas e envolvida na excitação-contração juncional (CATTERAL et al., 2005).

Quatro subtipos de VGCCs do tipo L (Cav1.1-1.4) têm sido identificados (CATTERALL et al., 2005), no entanto, $\text{Ca}_v1.2$ é a isoforma dominante em músculo liso arterial (WELLING et al., 1997). Além dos canais Ca_v1 (tipo L), os canais voltagem-dependente $\text{Ca}_v2.1$ (tipo P/Q) e Ca_v3 (tipo T) também estão expressos em algumas células do músculo liso arterial e parecem desempenhar funções na regulação do tônus vascular e na contração arterial (ANDREASEN et al., 2006; FENG et al., 2004; TAKIMOTO et al., 1997; VANBAVEL et al., 2002). Assim, vale a pena determinar se canais para $\text{Ca}_v1.2$ desempenham um papel dominante na regulação MT e PA na musculatura lisa (ZHANG et al., 2007).

Os bloqueadores de canal de Ca^{2+} foram introduzidos na prática clínica, por volta de 1980, como vasodilatadores úteis na hipertensão. Esses compostos diminuem os níveis de Ca^{2+} no músculos lisos, resultando em relaxamento do tônus vascular e redução da pressão sanguínea (KOCHEGAROV, 2003). Esses bloqueadores estão dentre os medicamentos mais frequentemente prescritos para o tratamento da hipertensão (MUNTWYLER; FOLLATH, 2001). Além de que, o uso de bloqueadores de canal de cálcio em combinação com antioxidantes, por exemplo, como a vitamina E, tem efeito neuroprotetor e pode ser uma medicação útil para o tratamento de desordens neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (KOCHEGAROV, 2003). Assim, é de grande importância estudar, de forma cada vez mais específicas, drogas que atuem nestes canais.

Bloqueadores dos canais para cálcio estão distribuídos em 5 classes de acordo com a sua estrutura química. A maior classe é a das diidropiridinas, representada por: nifedipina, nicarpina, isradipina, anlodipina, nisoldipina e

nimodipina. A classe das fenilalquilamidas tem como representante o verapamil. As benzodiazepinas representadas principalmente pelo diltiazem. As diarilaminopropilaminas representadas por bepridil e, por fim, as difenilpiperazinas. Todos esses bloqueadores são antagonistas dos canais para cálcio aprovados para uso clínico nos EUA (GILMAN, 2003).

O interesse em investigar produtos de plantas com atividade sobre a musculatura lisa reside no fato de que substâncias espasmolíticas têm uma vasta aplicação em vários processos fisiopatológicos como a asma, a hipertensão, diarréias, e espasmos, tanto intestinais como uterinos. Além disso, como os mecanismos de contração e relaxamento muscular envolvem mobilização de íons cálcio e, como este íon participa de grande parte dos eventos que levam ao acionamento da maquinaria celular de contração e/ou relaxamento, não seria surpresa que um fármaco que pudesse modular qualquer etapa desses processos de contração e/ou relaxamento, manifestasse interesse, considerando-se que os efeitos farmacológicos específicos e benéficos que uma substância apresenta poderiam trazer para a sociedade. Sendo assim, torna-se necessário a elucidação dos mecanismos pelos quais os produtos derivados de plantas possam apresentar influência na mobilização de Ca^{2+} em músculo liso, o que certamente contribuirá sobremaneira para o melhor entendimento do modo de ação de drogas que modulam atividades no músculo liso vascular, como é o caso da curina (DIAS et al., 2002) e da reticulina (DIAS, 2002).

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar o efeito vasorelaxante e caracterizar eletrofisiológicamente os efeitos dos alcalóides, curina e reticulina, sobre os canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo-L, utilizando como parâmetro as medidas das correntes iônicas através dos canais para Ca^{2+} , com a finalidade ulterior de contribuir para a descoberta de drogas potencialmente terapêuticas ou que sirvam de ferramentas farmacológicas para estudos posteriores.

2.2 Específicos

- 1) Avaliar a atividade citotóxica da curina e da reticulina frente às células A7r5;
- 2) Avaliar se há envolvimento dos canais para cálcio no efeito vosorelaxante da curina e da reticulina;
- 3) Investigar o efeito bloqueador da curina e da reticulina sobre as correntes de cálcio, em miócitos de aorta de rato (A7r5);
- 4) Avaliar o efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de cálcio do tipo L, e se este é dependente de concentração e voltagem e verificar se a condutância para o cálcio sofrerá alteração;
- 5) Avaliar alteração da dependência de voltagem para a ativação e a inativação estacionária dos canais para Ca^{2+} do tipo L, promovida por curina e por reticulina;
- 6) Investigar o envolvimento das vias de sinalização dos nucleotídeos cíclicos e adenilil ciclase no efeito da curina e da reticulina;
- 7) Investigar as influências da curina e da reticulina nos transientes de Ca^{2+} intracelular, em células A7r5, utilizando microscopia confocal;
- 8) Propor um mecanismo de ação compatível com as alterações produzidas por curina e por reticulina, nas correntes de cálcio do tipo L.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material vegetal

A espécie *Ocotea duckei* VATTIMO foi coletada em 2006, no Município de João Pessoa, Estado da Paraíba. O material botânico foi identificado pela Dra. Maria de Fátima Agra, do Setor de Botânica do LTF/UFPB. Uma exsicata da planta está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da UFPB e duplicatas estão depositadas na Coleção de Referência do LTF.

A espécie *Chondodendron platyphyllum* A. St. Hil (Miers) foi coletada no Município de Santa Rita, no Estado da Paraíba, em março de 1996 sob vegetação herbácea-arbustiva. A exsicata da referida planta encontra-se depositada no Herbário Professor Lauro Pires Xavier sob número 3631-P e foi identificada pela profa. Dra. Maria de Fátima Agra.

3.1.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 250 e 350 g, procedentes do Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB) ou Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Antes dos experimentos, os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar, com uma dieta balanceada à base de ração tipo *pellets* (Purina), com livre acesso à água, com ventilação e temperatura (21 ± 2 °C) controladas e constantes. Todos os experimentos eram realizados no período de 08:00 às 20:00 horas.

Todos os animais eram sacrificados, seguindo os princípios de cuidados com animais aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPB

(CEPA/LTF, 0703/07), e o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG.

3.1.3 Cultivo de célula da Linhagem de células A7r5

Foram usadas células da linhagem A7r5, uma linhagem de células musculares lisas embrionárias derivadas de aorta torácica de rato, provenientes do banco de células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil). As células eram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² mantidas em 5 mL de meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil) e 1% de estreptomicina/penicilina (SIGMA). As células eram incubadas à temperatura de 37°C em atmosfera com 5% de gás carbônico, em 95% de oxigênio.

Para a realização dos testes de citotoxicidade, procedeu-se da seguinte maneira: inicialmente, realizou-se o processo de tripsinização, onde a solução Tripsina/EDTA (0,25%/0,02%), 5mL para um frasco de 75cm², foi adicionada ao recipiente, a fim de remover a aderência das células da parede deste, aguardando-se cerca de 10 minutos, para que a reação ocorresse. As proteínas de adesão destas células necessitam de cálcio e magnésio para exercerem a sua função. Devido a isto, a tripsina e o EDTA são utilizados em conjunto. A perda de adesão celular ocorre, uma vez que a tripsina, sendo uma enzima proteolítica, atua quebrando as moléculas de adesão presentes na superfície celular que são responsáveis pela adesão da célula ao frasco, enquanto que o EDTA atua quelando os cátions divalentes livres. A tripsinização é interrompida, após o tempo estabelecido, acrescentando-se meio de cultura contendo soro bovino fetal (SBF). As proteínas, nele existentes, irão competir com as moléculas de adesão supracitadas, promovendo o fim da reação, e prevenindo-se a degradação excessiva da superfície celular. Em seguida, a suspensão contendo as células foi transferida para um tubo tipo falcon (15 mL), sendo posteriormente centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos e os sedimentos ressuspensos no meio RPMI com 10% SBF. Realizou-se a quantificação do número inicial de células, a partir da retirada de 90 µL da amostra que foi diluída em 10 µL de corante azul de tripan (4%), realizando a contagem das células em câmara de Neubauer. Esta metodologia de exclusão com o corante azul de tripan, juntamente com observações morfológicas, permite avaliar

a integridade estrutural da membrana plasmática celular. Este ensaio mede a capacidade das células viáveis, com membrana plasmática intacta, de excluir o corante, permitindo a quantificação do número de células vivas, para execução do experimento (CORRÊA, 2005).

Para a realização de experimentos eletrofisiológicos, as células eram desprendidas do fundo da garrafa, após descarte do meio, colocando-se 2 mL de solução contendo tripsina/EDTA (0,25%/0,02%). Após 5 minutos, adicionavam-se 10 mL de meio com SBF, para inativar a tripsina. O meio com células soltas era transferido para um tubo estéril de 15 mL de volume que passava por centrifugação a 1000 rpm por 1 minuto, em uma centrífuga de mesa. Descartava-se o meio, mantendo-se o precipitado de células no fundo do tubo. Para realização dos testes eletrofisiológicos, descartava-se mais 10 mL de meio, homogeneizando-se com uma pipetadora automática até o desaparecimento do precipitado. Eram colocados por volta de 1 mL desse meio com células sobre lamínulas esterilizadas, em placas de petri estéreis, esperavam-se 5 minutos para que as células se fixassem sobre as lamínulas e depois adicionavam-se mais 2 mL de meio em cada placa. As placas eram usadas com 1 a 5 dias após o plaqueamento. O manejo da cultura celular era feito sempre em capela de fluxo laminar, em ambiente estéril.

3.1.4 Substâncias e sais

Quadro 2. Substâncias, sais e seus fabricantes.

Substância	Fabricante
Cloreto de sódio (NaCl)	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Cloreto de potássio (KCl)	
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	
Fosfato diácido de potássio monohidratado (KH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	
Cloreto de cálcio bi-hidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O),	
Glicose anidra	
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃),	
Cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O)	
Etanol absoluto	

Cloridrato carbamilcolina (carbacol)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Dimetilsulfóxido (DMSO)	
Ácido (N-[2-hidrohietil]piperazina-N'[2-etanosulfônico]) (HEPES)	
Ácido etilenoglicol-bis-(β-aminoetiléter) N, N, N', N'-tetraacético (EGTA)	
1-[6-amino-2-(5-carboxi-2-oxazolil)-5-benzofuraniloxi]-2-(2'-amino-5'-metilfenoxi)-etano-N,N,N',N'- ácido tetraacético pentacetoximetil éster (fura 2-AM)	
Ácido etilenodiamino-tetraacético (EDTA)	
Albumina sérica bovina (BSA)	
IBMX	
Cloreto de tetraetilamônio (TEA)	
Cremofor	
Digitonina	
Inibidor de tripsina	
Penicilina	
Sulfato de estreptomicina	
8-bromo-3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (8-Br-cAMP)	
Aminofilina	
Vermelho de fenol	
Colagenase tipo XI	
Elastase tipo I	
Cloridrato de prazosin	
Cloridrato de L(-)-fenilefrina (FEN)	
Cloreto de manganês (MgCl ₂)	
Indometacina	
Acetato de N ^G -monometil-L-arginina (L-NMMA)	
Cloridrato de atropina	
Cloridrato de propranolol	
Cloridrato de histamina	
Cloreto de bário (BaCl ₂)	

S-(-)-1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-3-ácido piridinecarboxilíco ester metílico (BAY K8644)	
Cloridrato de acetilcolina (ACh)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Invitrogen Molecular Probes Inc. (Carlsbad, CA, EUA)
Forskolina (FSK)	
Soro fetal bovino	Fluka and Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha)
Meio de cultura RPMI 1640	Cutilab (Campinas, SP, Brasil)

A reticulina e a curina foram gentilmente cedidas pelo grupo do Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho do setor de fitoquímica do LTF/UFPB.

3.1.5 Soluções nutritivas

Para os experimentos realizados com órgão isolado, foram utilizadas soluções nutritivas aeradas com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂), cujas composições estão descritas nas tabelas abaixo:

Tabela 2. Composição da solução Krebs.

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

Tabela 3. Composição da solução Tyrode modificado (XU et al., 1999).

Substâncias	Concentração (mM)
NaCl	135,0
KCl	5,4
MgCl ₂	1,2
CaCl ₂	1,0
HEPES	10
Glicose	5,0
NaHCO ₃	11,9

Tabela 4. Composição da solução Hanks (SGUILLA et al., 2003).

Substâncias	Concentração (mM)
NaCl	145,0
KCl	5,0
MgCl ₂	1,0
NaH ₂ PO ₄	0,5
CaCl ₂	1,6
Dextrose	10,0
HEPES	5,0

Tabela 5. Composição da solução interna usada para medir as correntes de cálcio (CRUZ; MATSUDA, 1994).

Substâncias	Concentração (mM)
CsCl	130,0
EGTA	10,0
HEPES	10,0
MgCl ₂	4,0
TEACl	10,0

Tabela 6. Composição da solução externa usada para medir as correntes de cálcio (CRUZ; MATSUDA, 1994).

Substâncias	Concentração (mM)
BaCl ₂	10,0 ou 20,0
NaCl	126,0
CsCl	5,4
HEPES	10,0
Glicose	10,0

Tabela 7. Composição da solução salina fisiológica (SSF) para dissociação das células de artéria aorta (XU et al., 1999).

Substâncias	Concentração (mM)
NaCl	137,0
KCl	5,6
MgCl ₂	1,0
NaH ₂ PO ₄	0,44
Na ₂ HPO ₄	0,42
NaHCO ₃	4,17
CaCl ₂	2,6
Glicose	5
HEPES	10,0

Tabela 8. Composição da SSF com baixa concentração de cálcio para dissociação das células de artéria aorta (XU et al., 1999).

Substâncias	Concentração (mM)
NaCl	137,0
KCl	5,6
MgCl ₂	3,5
NaH ₂ PO ₄	0,44
Na ₂ HPO ₄	0,42
NaHCO ₃	4,17
CaCl ₂	0,05
Glicose	5
HEPES	10,0

3.1.6 Preparação da solução-estoque das substâncias em estudo

A reticulina e a curina foram dissolvidas em álcool etílico absoluto, formando uma solução de concentração de 10^{-2} M (solução-estoque), que foi estocada a -20 °C, sendo diluída em solução nutritiva de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. A concentração final de álcool etílico nas cubas nunca excedeu 1% (v/v); nessa concentração, o álcool etílico não possui efeito relaxante significante em aorta isolada de rato nem nas correntes de cálcio voltagem-dependentes, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores.

Em alguns experimentos, a reticulina e a curina foram solubilizadas usando 3% de cremofor (v/v). Essa solução foi diluída em água destilada até a concentração de 10^{-2} M e estocada a -20°C, sendo novamente diluída em solução nutritiva, de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. Nesta concentração, o cremofor mostrou-se desprovido de efeito contrátil ou relaxante em aorta de rato.

3.1.7 Aparelhos

As respostas da tensão isométrica foram obtidas por transdutores de tensão isométrica (*World Precision Instruments, EUA*), sendo o sinal processado por meio de um amplificador (*TBM-4; World Precision Instruments, EUA*), integrado a um computador equipado com uma placa conversora análogo-digital (*AD16JR; World Precision Instruments, EUA*), que utilizava um programa de aquisição e análise de dados CVMS (*World Precision Instruments, EUA*), Figura 9.

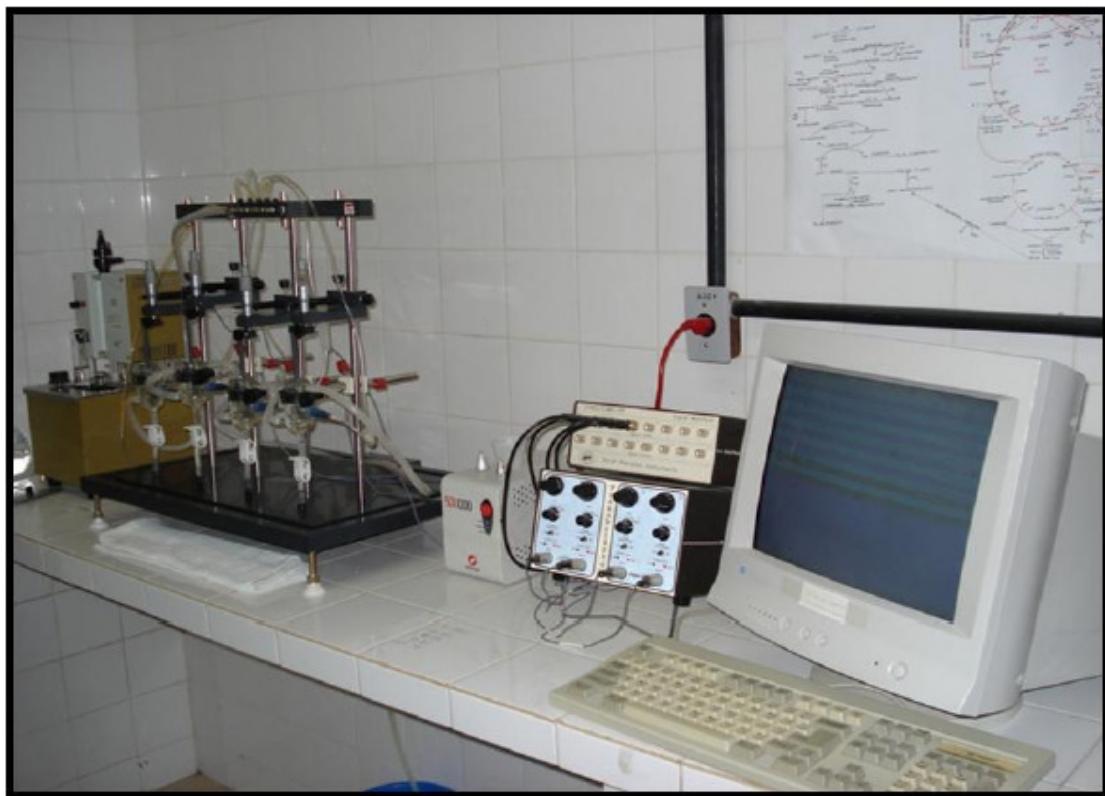


Figura 8: Aparato utilizado para os experimentos com anéis da artéria aorta isolada de rato

Os valores do pH foram aferidos por meio de um pHmetro digital, modelo PHS-3B (LABMETER, Brasil).

A temperatura das cubas foi controlada por uma bomba termostática, modelo Polystat 12002 (COLE-PARMER, EUA).

Todas as substâncias foram pesadas em balança analítica modelo FA-2104N, e os animais em balança semi-analítica (CELTAC e GEHAKA, Brasil, respectivamente), Figura 10.



Figura 9. Fotos do pHmetro digital (A) e balança analítica (B).

Para os estudos eletrofisiológicos em miócitos de aorta de rato foi empregada a técnica de “patch-clamp” (HAMILL et al., 1981), utilizando um amplificador de “Patch-clamp” modelo EPC 9 (HEKA Electronics Inc., Alemanha), um microscópio invertido, modelo Axiovert 200 (Carl-Zeiss, Alemanha) e uma mesa pneumática anti-vibração (TMC, EUA) conforme mostrado na Figura 11.



Figura 10: Aparato (set) utilizado para os experimentos de eletrofisiologia com miócitos de aorta de rato

Para determinar a intensidade de fluorescência ao cálcio, foi utilizada sonda sensível ao Ca^{2+} , Fluo-4, absorção em 488 nm e emissão máxima em 516 nm (www.molecularprobes.com), na forma de acetoximetil éster, sendo permeável à membrana plasmática (Fluo-4/AM - 6 μM). O transiente de Ca^{2+} foi captado por microscópio confocal de fluorescência por varredura a laser Zeiss LSM 510 META (GERMANY). As imagens foram monitoradas por espaço de tempo pré-determinado no aparelho. As células foram observadas usando objetiva 63x (imersão a óleo) e abertura numérica de 1,4. A faixa de 488nm de um laser kriptônio/argônio foi usada para excitar a sonda e os sinais de emissões entre 505 e 550 nm foram coletados, ver esse aparato na Figura 12.



Figura 11: Aparato utilizado para os experimentos de microscopia confocal com miócitos de aorta de rato (A7r5).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Estudos funcionais

3.2.1.1 Preparação dos anéis de aorta isolada de rato

Os ratos eram sacrificados por deslocamento cervical, seguido por secção dos vasos cervicais. O tórax do animal era aberto e dissecado, a aorta torácica era retirada cuidadosamente e anéis aórticos de 3-5 mm eram obtidos livres de tecido conectivo e adiposo. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis eram suspensos individualmente por hastes de aço inoxidável, conectadas a transdutores de força, em cubas de vidro (10 mL), contendo solução de Krebs à 37 °C e aerados com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Os anéis aórticos eram deixados por um período de 60 min. em repouso, durante o qual eram mantidos sob uma tensão inicial de 1 g. Durante esse período, a solução nutritiva era renovada a cada 15 min., para prevenir a interferência devido ao acúmulo de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização, era induzida uma contração com fenilefrina (FEN) na concentração de 3×10^{-7} M. A integridade do endotélio vascular era verificada pela adição de acetilcolina (ACh) (10^{-6} M) à cuba, durante a fase tônica da primeira contração induzida por FEN (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Anéis sem endotélio funcional eram obtidos pela remoção mecânica da camada endotelial, através do atrito provocado pela haste metálica em contato com a parede interna do vaso. O endotélio vascular era considerado íntegro, quando os anéis aórticos apresentavam relaxamento induzido por ACh igual ou superior a 50% (em relação à força máxima da contração inicial) e a retirada do endotélio era confirmada, quando não havia relaxamento, ou esse era inferior a 10%. Os experimentos foram realizados com anéis de aorta na presença e na ausência de endotélio funcional. Após a verificação do endotélio, as soluções de banho eram trocadas, sendo as preparações lavadas a cada 15 min. com solução de Krebs, durante um período total de 30 min.

Todos os relaxamentos foram expressos como a percentagem reversa da tensão máxima obtida pela adição da FEN à cuba, onde o relaxamento máximo era obtido quando a tensão registrada era reduzida aos níveis basais.

3.2.1.2 Avaliação do efeito vasorelaxante da curina em aorta isolada de rato

Realizados os procedimentos citados no item 3.2.2.1 e após a verificação do endotélio funcional, as preparações eram lavadas a cada 15 min. durante um período total de 30 min., e então uma segunda contração era induzida pela adição de 3×10^{-7} M de FEN. Durante a fase tônica dessa segunda contração, a curina era adicionada à cuba de maneira cumulativa (de 10^{-9} a 10^{-6} M), sendo avaliado o seu efeito relaxante na presença e na ausência de endotélio funcional.

Após o efeito máximo (E_{max}) induzido por curina ser atingido, a solução de banho era trocada a cada 15 min., durante um período total de 30 min. Decorrido esse tempo, uma terceira contração era induzida por FEN, onde era observado se a tensão máxima alcançada era de magnitude similar à primeira contração, o que era indicativo da reversibilidade do efeito relaxante da curina.

3.2.1.3 Efeito da curina e da reticulina sobre a dinâmica do Ca^{2+} em aorta isolada de rato

3.2.1.3.1 Efeito vasorelaxante da curina e da reticulina sobre as contrações tónicas induzidas por 80 mM de KCl

A aorta foi montada como descrito no item 3.2.2.1. Após o período de estabilização de 60 min., eram obtidas duas curvas concentração-resposta simples com KCl (80 mM) de amplitudes semelhantes, registradas por meio de transdutores isométricos acoplados a um amplificador, que eram conectados a uma placa conversora analógico-digital conectada a um computador. Durante a fase tônica sustentada da segunda resposta, curina e reticulina eram adicionadas à diferentes cubas de maneira cumulativa, em preparações diferentes. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo KCl. Os valores da concentração da substância capaz de produzir 50% de seu efeito (CE_{50}) foram obtidos por regressão não-linear das curvas concentração-resposta da curina e da reticulina, em cada experimento.

3.2.1.3.2 Comparação do efeito vasorelaxante da curina e da reticulina frente à papaverina e à nicardipina sobre as contrações tônicas induzidas por 80 mM de KCl

A aorta era montada como descrito no item 3.2.2.1. Após o período de estabilização de 60 minutos, eram obtidas duas curvas concentração-resposta simples com KCl (80 mM) de amplitudes semelhantes. Foram avaliados o efeito vasorelaxante da curina e da reticulina versus papaverina e nicardipina em preparações diferentes. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo KCl. Os valores de CE_{50} foram obtidos por regressão não-linear das curvas concentração-resposta da curina e da reticulina, em cada experimento.

3.2.1.3.3 Efeito da reticulina frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante

A aorta era montada de acordo com os procedimentos citados no item 3.2.2.1. Após a verificação da ausência de endotélio funcional, as preparações eram lavadas a cada 15 min. durante um período total de 30 min. Decorrido este tempo, a solução de Krebs era trocada por uma solução de Krebs modificada, acrescida de EDTA (3 mM), com a finalidade de quelar todo o Ca^{2+} livre e residual da solução (RICHARDSON; TAYLOR, 1993). Após 15 min., a solução era trocada novamente por uma solução de Krebs modificada, agora sem o EDTA e, após a estabilização da tensão basal (~1 g) eram induzidas contrações em resposta à adição cumulativa de $CaCl_2$ (de 0,1 μ M a 30 mM), até que a tensão máxima fosse atingida. Subsequentemente, os procedimentos supracitados eram repetidos, à exceção de que reticulina era pré-incubada por 15 min., em diferentes concentrações (10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M, cada qual em uma preparação diferente), antes que uma nova contração em resposta à adição cumulativa de $CaCl_2$ fosse induzida. A resposta contrátil em decorrência da adição do $CaCl_2$ era comparada antes e depois da exposição dos anéis à reticulina, sendo determinados os parâmetros de CE_{50} , E_{max} e o “slope”.

3.2.1.3.4 Efeito da curina sobre os anéis de aorta de rato pré-contraídos com BAY K8644

A aorta era montada de acordo com os procedimentos citados no item 3.2.2.1. Após a verificação da ausência de endotélio funcional, as preparações eram lavadas a cada 15 min., durante um período total de 30 min. Decorrido este tempo, era adicionado KCl à cuba (concentração final de 20 mM) e, decorridos 10 min., uma segunda contração era induzida pela adição de 1 μ M (YUZURIHARA et al., 2002) de BAY K8644, um ativador dos Ca_v do tipo L (Ca_v -L) (FERRANTE et al., 1989). Após a estabilização da contração, durante a sua fase tônica, a curina era adicionada às cubas de maneira cumulativa (de 10^{-7} a 10^{-4} M) e seu efeito relaxante era registrado.

3.2.2 Estudos eletrofisiológicos

3.2.2.1 Isolamento de células de aorta de rato

As células musculares lisas dissociadas enzimaticamente foram provenientes da artéria aorta de ratos. Os segmentos, depois de removidos da aorta, permaneceram numa placa de Petri a 4°C, procedendo-se a dissecação. Todo o processo ocorreu em uma solução fisiológica (SSF baixo- Ca^{2+}), com pH ajustado para 7,4 com NaOH (1 M). O procedimento para dissociação descrito por Xu et al., (1999) teve algumas adaptações detalhadas a seguir. Uma vez dissecado, o tecido foi transferido para um tubo Falcon, contendo papaína (0,7 mg/mL - Sigma), albumina sérica bovina (BSA - 1 mg/mL - Sigma) e ditiotreitol (DTT- 1 mg/mL - Sigma) que foram diluídos em SSF normal ($\text{CaCl}_2 = 2,6\text{mM}$ e $\text{MgCl}_2 = 1\text{mM}$), permanecendo 30 min. na temperatura de 35°C. Em seguida, as amostras foram transferidas para a solução SSF baixo- Ca^{2+} , contendo colagenase (1 mg/mL - Worthington), hialuronidase (0,9 mg/mL - Sigma) e BSA – (1 mg/mL – Sigma) para digerir o tecido entre 15 a 30 min. As enzimas foram removidas lavando-se o tecido 2 vezes com PSS baixo- Ca^{2+} e depois, mais uma vez, com PSS com Ca^{2+} gelado, em seguida foi induzida a Trituração, utilizando-se uma pipeta Pasteur cujo diâmetro da ponta foi aproximadamente 1 mm. Cerca de 3 a 5 gotas do homogenato foram colocadas em placas de Petri específicas para cultura celular contendo PSS com os

miócitos deixados para aderir por, no mínimo, 20 min. antes dos procedimentos de dosagem intracelular de cálcio.

3.2.2.2 Eletrofisiologia

As células foram estudadas sob a platina de um microscópio invertido. O conjunto é montado sobre uma mesa pneumática anti-vibração (TMC, EUA). Um micromanipulador elétrico de alta precisão foi usado para movimentação do eletrodo responsável pelo registro das correntes da membrana celular. Um outro micromanipulador mecânico foi usado para posicionar a pipeta de perfusão da solução controle ou daquela contendo a substância a ser caracterizada.

As correntes foram estudadas com a ajuda de um amplificador (HEKA, EPC9, Alemanha) controlado pelo “software” PULSE. As correntes foram filtradas por um filtro “passa baixa” a 2,9 kHz, convertidas em sinais digitais com freqüência de 10 kHz e armazenadas em computador para posterior análise. Correntes de vazamento (“leakage”) foram removidas, usando-se um protocolo do tipo P/4, no qual quatro pulsos de amplitude igual a $\frac{1}{4}$ do pulso teste foram aplicados e a resposta de corrente foi somada e subtraída da corrente do pulso teste (BEZANILLA; ARMSTRONG, 1977). Os transientes capacitivos foram anulados em todos os experimentos. As resistências em série foram compensadas em pelo menos 50%. As células que apresentaram valores altos para a resistência em série (acima de 10 $M\Omega$) ou que não se mantiveram estáveis não foram utilizadas na análise. As correntes foram adquiridas em um computador MacPC ou PC-compatível, usando-se o “software” PULSE (HEKA, Alemanha). Para o processamento dos dados, foram usados, também, os programas Excel (MICROSOFT, EUA) e SigmaPlot v.5.0 (JANDEL Inc., EUA).

As pipetas (PERFECTA, Brasil) feitas de vidro comum neutro foram confeccionadas por meio de um estirador vertical de 2 estágios (NARISHIGE, PP 83 ou 830, Japão). Foram preenchidas com solução salina, cuja composição iônica está mostrada na Tabela 6. O CsCl substituiu o íon potássio, e, junto com o TEA^+ , teve a função de bloquear as correntes de potássio. As resistências das pipetas tinham valores entre 2-5 $M\Omega$. Um fino fio de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) foi introduzido na pipeta e o conjunto foi acoplado a um pré-amplificador (“headstage”) que, por sua

vez, está conectado à entrada do amplificador EPC9. As células foram banhadas por uma solução externa, cuja composição está mostrada na Tabela 5. Ao invés do Ca^{2+} , o Ba^{2+} foi usado como carreador, porque os canais para Ca^{2+} do tipo L apresentam uma maior condutância para o bário, facilitando, assim, a identificação destas correntes. Apesar do uso do Ba^{2+} como carreador de carga, as correntes deste íon foram referidas como “correntes de cálcio”, como é usual na literatura. Todas as soluções foram passadas por um filtro com porosidade (“mesh”) de 0,22 μm .

Os “gigaselos” foram obtidos por meio de uma suave sucção feita no interior da micropipeta e os miócitos foram montados, na configuração “whole cell” (HAMILL et al., 1981), sendo obtida com a ajuda de uma sucção mais vigorosa. Esta pressão negativa permitiu romper o pequeno fragmento de membrana que separa a solução interna, contida na pipeta, do citoplasma da célula em estudo. O aumento brusco do transiente capacitivo indica a obtenção da configuração de “whole cell” (Figura 13).

Todos os registros foram feitos em células submetidas a um sistema de perfusão que consistiu de uma pipeta de vidro com aproximadamente 100 μm de diâmetro interno e que estava conectada à saída de uma válvula solenóide, alimentada por dois reservatórios de 5 mL. A válvula solenóide serviu para selecionar qual dos compartimentos ficava ligado à pipeta de perfusão, estabelecendo, assim, um fluxo do seu conteúdo. Os fluxos (0,1 mL/min.) foram impulsionados pela força da gravidade.

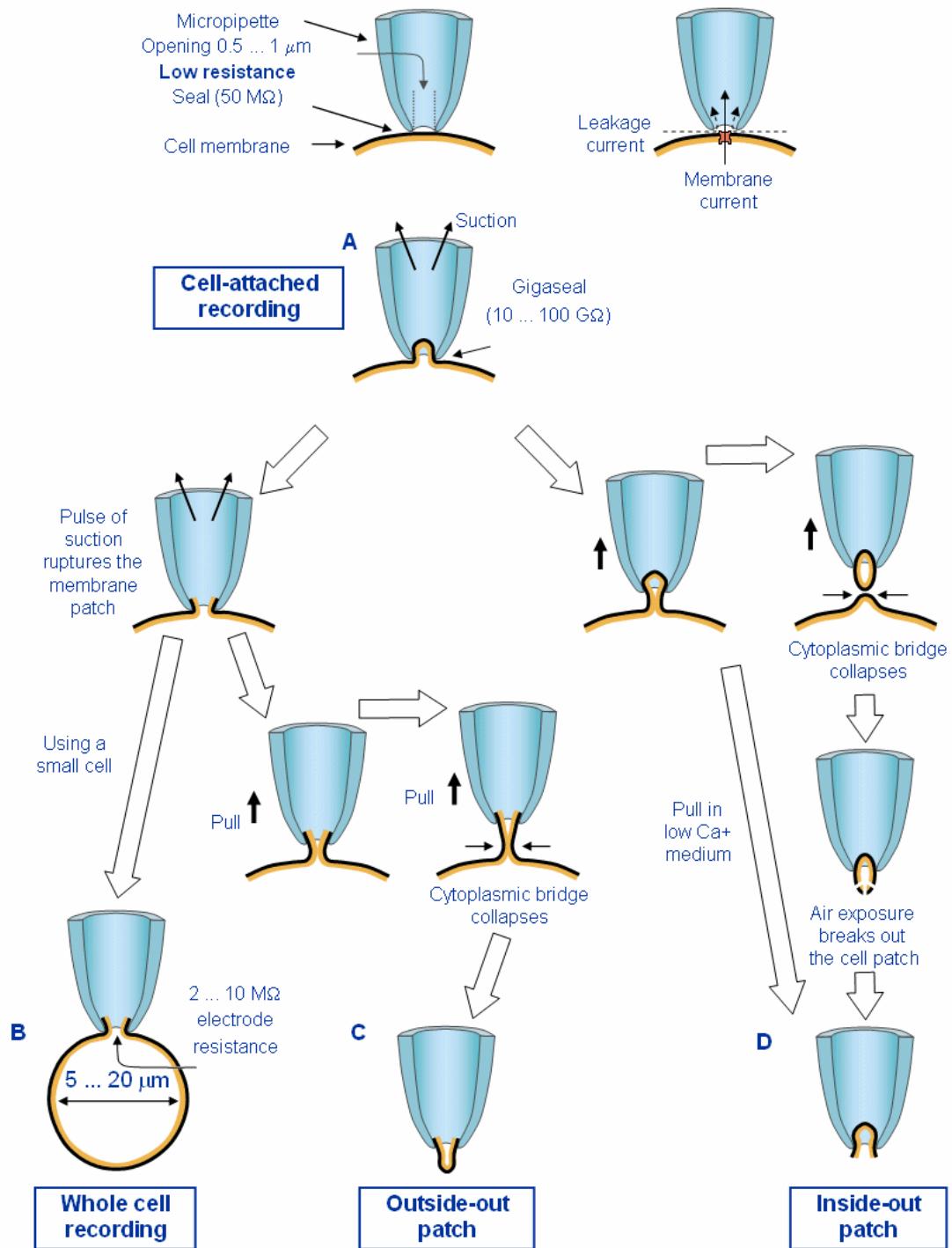


Figura 12. Ilustração esquemática das quatro configurações de patch-clamp: (A) cell-attached, (B) whole cell, (C) outside-out e (D) inside-out (Modificado de HAMILL et al., 1981).

3.2.2.3 Caracterização das correntes de cálcio, nas células A7r5, na configuração “whole-cell”

Foram caracterizadas as correntes de Ca^{2+} , nas células A7r5, utilizando as substâncias, CdCl_2 , um bloqueador inespecífico das correntes de Ca^{2+} , e a nicardipina, um bloqueador das correntes de cálcio tipo L. As células foram mantidas em um potencial de “holding” de -80 mV, por um período de 50 ms. Logo após, foram aplicados pulsos-teste de 100 ms de duração que despolarizaram a célula para +10 mV, em intervalos de 10-15 s. As correntes de cálcio foram medidas na situação controle, com a célula perfundida por solução extracelular (Tabela 7), e situação teste, perfundindo-se a célula com solução extracelular, contendo 300 μM de CdCl_2 e 10 μM de nicardipina.

3.2.2.4 Avaliação do efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de cálcio do tipo L, nas células A7r5, na configuração “whole-cell”

Foi avaliado o efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de Ca^{2+} do tipo L, quando os miócitos de aorta de rato foram mantidos em um potencial de “holding” de -80 mV, por um período de 50 ms, logo após esse período, foram aplicados pulsos-teste de 100 ms de duração que despolarizaram a célula para +10 mV, em intervalos de 10-15 s. As correntes de cálcio foram medidas na situação controle, com a célula perfundida por solução extracelular (Tabela 7), e situação teste, perfundindo-se a célula com solução extracelular, contendo 30 μM da curina e 100 μM da reticulina.

3.2.2.5 Avaliação do efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de cálcio do tipo L, em miócitos de aorta de rato recém-despersos, na configuração “whole-cell”

Foi caracterizado o efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de Ca^{2+} do tipo L. Os miócitos de aorta de rato, foram obtidos como descrito no item 3.2.2.4.1 e mantidos em um potencial de “holding” de -80 mV, por um período de 50 ms. Logo após esse período, foram aplicados pulsos-teste de 100 ms de duração que despolarizaram as células para +10 mV, em intervalos de 10-15 s. As correntes de cálcio foram medidas na situação controle, com a célula perfundida por solução extracelular (Tabela 7), e situação teste, perfundindo-se a célula com solução extracelular, contendo 30 μM da curina e 100 μM da reticulina.

3.2.2.6 Avaliação do efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de cálcio do tipo L e investigação da dependência de concentração, em células A7r5

Foi avaliado se o bloqueio das correntes de Ca^{2+} do tipo L por curina e por reticulina era dependente de concentração. Para a realização do protocolo da curva concentração-resposta, as células A7r5 foram mantidas em um potencial de “holding” de -80 mV, sendo aplicados pulsos-teste de 100 ms de duração que despolarizaram as células para +10 mV, em intervalos de 10-15 s. As correntes iônicas foram medidas na ausência e na presença de várias concentrações diferentes da curina e da reticulina.

3.2.2.7 Avaliação do efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de cálcio do tipo L e investigação da dependência de voltagem, em células A7r5

Estudou-se o efeito da curina e da reticulina sobre a curva corrente-voltagem dos canais para cálcio do tipo L. Para a realização do protocolo da curva corrente-voltagem, as células A7r5 foram mantidas em um potencial de “holding” de -80 mV, e aplicados, numa frequência de 0,1 Hz, pulsos despolarizantes de -80 mV até 50 mV, com incremento de 10 em 10 mV, com duração de 100 ms. As correntes iônicas foram medidas tanto na ausência, quanto na presença de 30 e 100 μM da curina e na presença de 100 μM da reticulina. A partir dos resultados obtidos, construiu-se a relação densidade de corrente em função da voltagem.

3.2.2.8 Avaliação do efeito da curina e da reticulina na condutância dos canais para Ca²⁺ do tipo L, em células A7r5

Para investigação do efeito de curina e de reticulina sobre a condutância dos canais para Ca²⁺ do tipo L, as células A7r5 foram mantidas em um potencial de “holding” de -80 mV. Antes do pulso teste foi aplicado um pré-pulso de -40 mV por 500 ms de duração, com a finalidade de se observar somente as correntes de Ca²⁺ tipo L; após esse período, foi aplicado um pulso-teste de 100 ms de duração que despolarizou a célula para +10 mV, com incremento de 10 mV em intervalos de 10-15 s. As correntes de cálcio foram medidas na situação controle, com a célula perfundida por solução extracelular (tabela 7) e, na situação teste, perfundindo-se a célula com solução extracelular contendo 3, 10, 30, 100 e 300 µM da curina e de 100 µM da reticulina.

3.2.2.9 Avaliação do efeito da curina e da reticulina sobre a inativação estacionária dos canais para Ca²⁺ do tipo L, em células A7r5

Para se investigar o efeito da curina e da reticulina sobre a dependência de voltagem para a inativação estacionária dos canais para Ca²⁺ do tipo L, foi executado o seguinte protocolo experimental: as células A7r5 foram mantidas em um potencial de “holding” de -80 mV. Antes do pulso teste foi aplicado um pré-pulso que variou de -110 para 0 mV, para reticulina, e de -80 mV para +30 mV, para curina por 500 ms de duração, com a finalidade de se favorecer a inativação dos canais para Ca²⁺ tipo L; em seguida, foi aplicado um pulso-teste com duração de 100 ms, que despolarizou a célula para +10 mV, em intervalos de 10 s. As correntes de cálcio foram medidas na situação controle, com a célula perfundida por solução extracelular (Tabela 7), e na situação teste, perfundindo-se a célula com solução extracelular, contendo 30 µM da curina e 100 µM da reticulina. Os dados obtidos foram tratados e mostrados, juntamente com a curva ajustada, seguindo a distribuição tipo Boltzmann. Foram obtidos os valores de $V_{0,5}$ e do “slope”. $V_{0,5}$ representando o valor de potencial onde 50 % da população de canais iônicos estão inativados (HODGKIN; HUXLEY, 1952) e o $V_{0,5}$ permite determinar se há ou não variações na dependência de voltagem associada ao fenômeno estudado.

3.2.2.10 Avaliação da participação dos nucleotídeos cíclicos AMPc-GMPc no efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de cálcio do tipo L

Para avaliar a participação dessas vias de sinalização sobre o efeito da curina e da reticulina nas correntes de Ca^{2+} do tipo L, foi executado o seguinte protocolo experimental: as células A7r5 foram mantidas em um potencial de “holding” de -80 mV, por um período de 50 ms. Logo após esse período, foram aplicados pulsos-teste de 100 ms de duração que despolarizaram a célula para +10 mV, em intervalos de 10-15 s. As correntes de cálcio foram medidas na situação controle, com a célula perfundida por solução extracelular (Tabela 7), e situação teste, perfundindo-se a célula com solução extracelular, contendo IBMX (0,5 mM) ou dbcAMP (1mM) ou 8-Br-cGMP (1 mM) e, por último, perfundindo-se a célula com solução extracelular contendo o mesmo IBMX (0,5 mM) ou dbcAMP (1mM) ou 8-Br-cGMP (1 mM), acrescido de 30 μM da curina ou 100 μM da reticulina.

3.2.3 Protocolos realizados nos estudos com microscopia confocal

3.2.3.1 Incorporação do fluo-4 nas células da linhagem A7R5

A quantificação e visualização em tempo real das alterações intracelulares na $[\text{Ca}^{2+}]$ em miócitos de aorta de rato, em resposta a curina, foram obtidas por microscopia confocal. A intensidade de fluorescência ao cálcio foi determinada com a sonda sensível ao Ca^{2+} , Fluo-4, absorção em 488 nm e emissão máxima em 516 nm (www.molecularprobes.com), na forma de acetoximetil éster que é permeável a membrana plasmática (Fluo-4/AM - 6 μM). Inicialmente, segundo método descrito por Rodrigues et al. (2007) com modificações, as células A7R5 foram carregados com fluo-4/AM por 40 min. e, em seguida, colocadas em câmaras experimentais de perfusão onde foram continuamente perfundidos por uma solução extracelular, Tyrode, à temperatura ambiente. As alterações na concentração de Ca^{2+} intracelular em resposta aos estímulos induzidos por KCl (80 mM) foram captadas por microscópio confocal de fluorescência por varredura a laser modelo Zeiss LSM 510 META (GERMANY). As imagens foram monitoradas por espaço de tempo pré-determinado no aparelho. As células foram observadas usando objetiva

63x (imersão à óleo) e abertura numérica de 1,4. A faixa de 488nm de um laser kriptônio/argônio foi usada para excitar a sonda e os sinais de emissões entre 505 e 550 nm foram coletadas (Figura 12).

3.2.3.2 Avaliação dos efeitos da curina sobre as concentrações de cálcio intracelulares em miócitos de aorta de rato (A7r5) estimuladas com KCl

No intuito de investigar as influências da curina na concentração de Ca^{2+} intracelular em miócitos previamente estimulados com um agente despolarizante, semelhante ao procedimento realizado nos ensaios funcionais com artéria aorta de rato, as células musculares lisas foram estimuladas com um agente despolarizante, o KCl (80 mM). Previamente, as células foram estimuladas com KCl que foi diluído na solução de perfusão (Tabela 2). Em seguida, as células foram incubada com curina (30 μM) na presença de KCl. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. e as intensidades de fluorescência foram normalizadas como descrito anteriormente.

3.2.4 Viabilidade celular

3.2.4.1 Efeito da curina e da reticulina sobre a Linhagem de células de músculo liso A7r5

3.2.4.1.1 Método MTT

A citotoxicidade da curina e da reticulina foi analisada pela técnica de redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)]-2,5-difeniltetrazolium), que é um método colorimétrico que mede a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular (MOSMANN, 1983). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água de cor amarela, o qual é convertido em cristais de formazam de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais e outras enzimas citosólicas (LIU et al., 1997). Os cristais de formazam são dissolvidos com a adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em HCl (0,01N), formando um composto colorido cuja densidade óptica é medida em espectrofotômetro, tipo leitor de ELISA ($\lambda = 570$ nm). A atividade das desidrogenases é diretamente proporcional

à capacidade redutora do sistema sobre o MTT e, portanto, produção de cromógeno (LIU et al., 1997).

As células da linhagem A7r5, quando incubadas com curina ou reticulina, foi analisada utilizando o ensaio com o MTT. Inicialmente, as células foram semeadas em placas de 96 poços em uma concentração de 5×10^5 cél/mL incubadas em meio RPMI com 10% de soro bovino fetal (SBF), durante o período de 24 h, a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após este período, o meio foi retirado e, em seguida, foram colocadas as diferentes concentrações da curina e da reticulina (3, 10, 30, 100 e 300 µM). Esta linhagem foi cultivada sob as mesmas condições de temperatura e CO₂ durante 24 h. Após esse período de incubação com a substância testada, removeu-se o sobrenadante da cultura, adicionou-se a solução de MTT (5 mg/mL em tampão fosfato-salina (PBS)), retornando à placa para a estufa durante 4 h para que ocorresse a reação. Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados com a adição de uma solução de SDS (10%) em HCl (0,01 N). Após 16 h, foi realizada a leitura da placa no espectrofotômetro tipo leitor de ELISA e a absorbância medida a 570 nm. Para o branco da reação, foi utilizada solução de SDS/HCl.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média ($\bar{x} \pm e.p.m.$) e “n” se refere ao número de animais ou número de células utilizadas em cada experimento para um dado protocolo.

Para os dados de citotoxicidade os resultados foram obtidos a partir de três ensaios em triplicata para cada concentração e comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste de Newman Keuls, sendo considerada alguma diferença significativa quando $p < 0,05$.

Para os experimentos *in vitro*, usando órgãos isolados, as curvas mostrando a relação concentração-resposta de uma substância foram ajustadas por uma regressão não-linear descrita pela equação: $Y = \min + (\max - \min) / (1 + 10^{(\log(CE50-X)*S)})$; onde “X” é o logaritmo na base 10 da concentração molar da substância testada, “Y” é a resposta relaxante da substância testada em percentagem, “min” é o menor efeito assumido para “Y”, “max” é o maior efeito assumido para “Y” e “S” é o valor da

constante de Hill (MOTULSKY; CHRISTOPOULOS, 2003). A partir dessa equação, foram calculados os valores de CE_{50} (concentração molar de uma substância em que ela é capaz de causar 50% de seu efeito máximo), servindo como parâmetro de potência relativa de uma substância, e o E_{max} (valor médio, em percentagem, do efeito máximo obtido por uma substância em relação ao maior valor possível num dado tecido), servindo como parâmetro de eficácia relativa entre duas substâncias (NEUBIG et al., 2003).

Para a ativação, a corrente em cada potencial teste foi convertida para condutância (G), utilizando a seguinte fórmula: $G = I / (V - E_{Ca})$, onde E_{Ca} é o potencial de reversão aparente (E_{Ca} foi estimado por extração a partir do comportamento ôhmico da relação I-V). As relações corrente voltagem foram normalizadas dividindo-se o valor da condutância obtida pelo seu máximo valor. Foi utilizada a equação de Boltzmann para ajustar o comportamento dos valores em relação à voltagem, apenas na fase de ativação dos canais até o ponto de condutância máxima (ponto máximo ou o valor 1). A fase de ativação foi montada, por uma equação Boltzmann $G / G_{max} = 1 / (1 + \exp [(V_{1/2} - V) / k])$ em que $V_{1/2}$ é o potencial em que G foi a metade de G_{max} e k é fator de inclinação. Na inativação, o valor de corrente que corresponde ao potencial de pré-pulso foi normalizado por I_{max} e foi montado utilizando-se a equação Boltzmann: $I / I_{max} = 1 / (1 + \exp [(V - V_{1/2}) / k])$ onde $V_{1/2}$ é o potencial em que I foi a metade de I_{max} e k é o fator de inclinação.

Diferenças entre as médias foram comparadas estatisticamente, usando-se o teste “t” de Student não-pareado, onde essas diferenças foram consideradas significantes, quando o valor calculado de “p” foi menor que 0,05. As análises estatísticas eram realizadas usando-se o programa Graph-Pad Prism[®] 4.03 (GRAPHPAD SOFTWARE, EUA).

Foram usados os programas Pulse[®] e Pulse Fit[®] (HEKA Eletronik, Lambrecht, Alemanha) e SigmaPlot (SPSS, EUA), para aquisição e análise dos dados em eletrofisiologia; Imagej (SPEX Industries, EUA) para aquisição dos dados em espectrofluorometria de Ca^{2+} ; CVMS (*World Precision Instruments, EUA*) foi utilizado para a aquisição de dados de tensão isométrica em órgãos isolados.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Estudo da atividade vasorelaxante da curina e da reticulina em aorta isolada de rato

4.1.1 Efeito vasorelaxante da curina em aorta isolada de rato

A curina (10^{-8} a 10^{-4} M) relaxou, de maneira dependente de concentração, os anéis de aorta isolada de rato pré-contraídos com FEN (3×10^{-7} M) na presença e na ausência de endotélio funcional (Figura 13), apresentando um valor de $CE_{50} = 7,6 \pm 1,6 \times 10^{-6}$ M na presença, e de $8,0 \pm 1,5 \times 10^{-6}$ M na ausência do endotélio. A eficácia máxima foi atingida para ambos os casos (presença ou ausência de endotélio) na concentração de 10^{-4} M, sendo o valor de E_{max} de 100 %, não tendo diferença significativa o efeito da curina na presença ou na ausência de endotélio funcional. O tempo médio de relaxamento máximo da curina foi de 120 ± 5 min. Em todos os experimentos, a concentração final de cremofor ou etanol foi de no máximo 0,5 %, quando a concentração da curina foi de 10^{-4} M. Também foi observado que a responsividade da aorta isolada de rato à FEN foi restaurada 70 min. após a retirada da curina da cuba (dado não mostrado).

Comparando os valores de CE_{50} da curina apresentados aqui e os da reticulina demonstrado por Dias et al., (2004), verificou-se que curina foi cerca de 200 vezes mais potente em relaxar os anéis de aorta isolados de rato do que a reticulina.

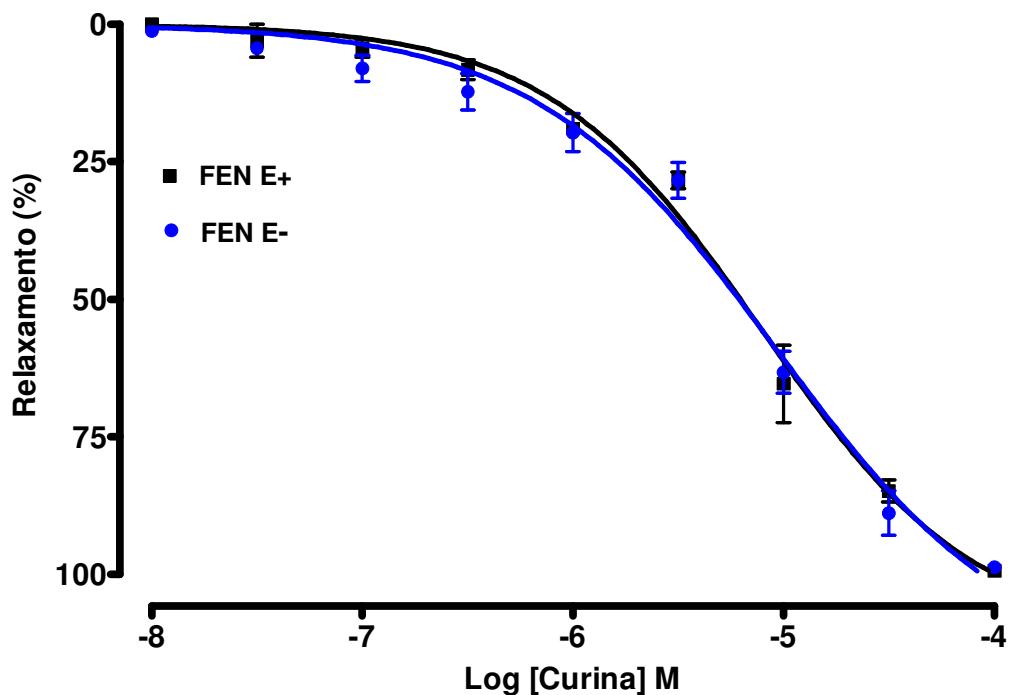


Figura 13. Efeito vasorelaxante da curina sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de FEN, em anéis de aorta isolada de rato, na presença (■) e na ausência (●) de endotélio funcional. Os dados apresentados representam a média \pm e.p.m. ($n = 6$). Os valores não foram considerados significantes, quando $p < 0,05$.

4.2 Efeito da curina e da reticulina sobre a dinâmica do Ca²⁺ em aorta isolada de rato

4.2.1 Efeito comparativo da curina e da reticulina frente à papaverina ou nicardipina sobre as contrações tônicas induzidas por KCl

Para avaliarmos a participação do influxo de Ca²⁺ através dos canais para cálcio dependentes de voltagem, e para compararmos o efeito da curina e da reticulina com alguns bloqueadores já conhecidos, executamos os seguintes experimentos: Quando a resposta contrátil para K⁺ (80 mM) alcançou um platô, nicardipina, um bloqueador específico dos canais para Ca²⁺ do tipo-L que pertence à família das dihidropiridinas, papaverina, um alcalóide de tipo isoquinolinico bloqueia os canais Ca²⁺ tipo-L por inibir as fosfodilesterases, curina e reticulina foram acrescentadas em diversas concentrações. Todas as substâncias provocaram relaxamento de maneira dependente de concentração. A concentração de nicardipina, papaverina, curina e reticulina que produz 50% de relaxamento das contrações induzidas por alto-K⁺ foi $3,2 \pm 0,6 \times 10^{-9}$ M (n = 5), $3,1 \pm 0,1 \times 10^{-5}$ M (n = 5), $9,3 \pm 2,1 \times 10^{-6}$ M (n = 7) e $2,8 \pm 0,3 \times 10^{-4}$ M (n = 4), respectivamente. Como a contração induzida por KCl em aorta de rato é o resultado do influxo de Ca²⁺ pelos VGCC, sugerimos que curina e reticulina previnem o influxo de Ca²⁺ pelos VGCC no músculo liso vascular.

O tempo médio de relaxamento tanto para curina como para reticulina foi de aproximadamente 180 min. As contrações induzidas por KCl foram reversíveis após 60 minutos da retirada da curina da cuba, já com reticulina até duas horas de lavagem não foram suficientes para promover a redução do efeito.

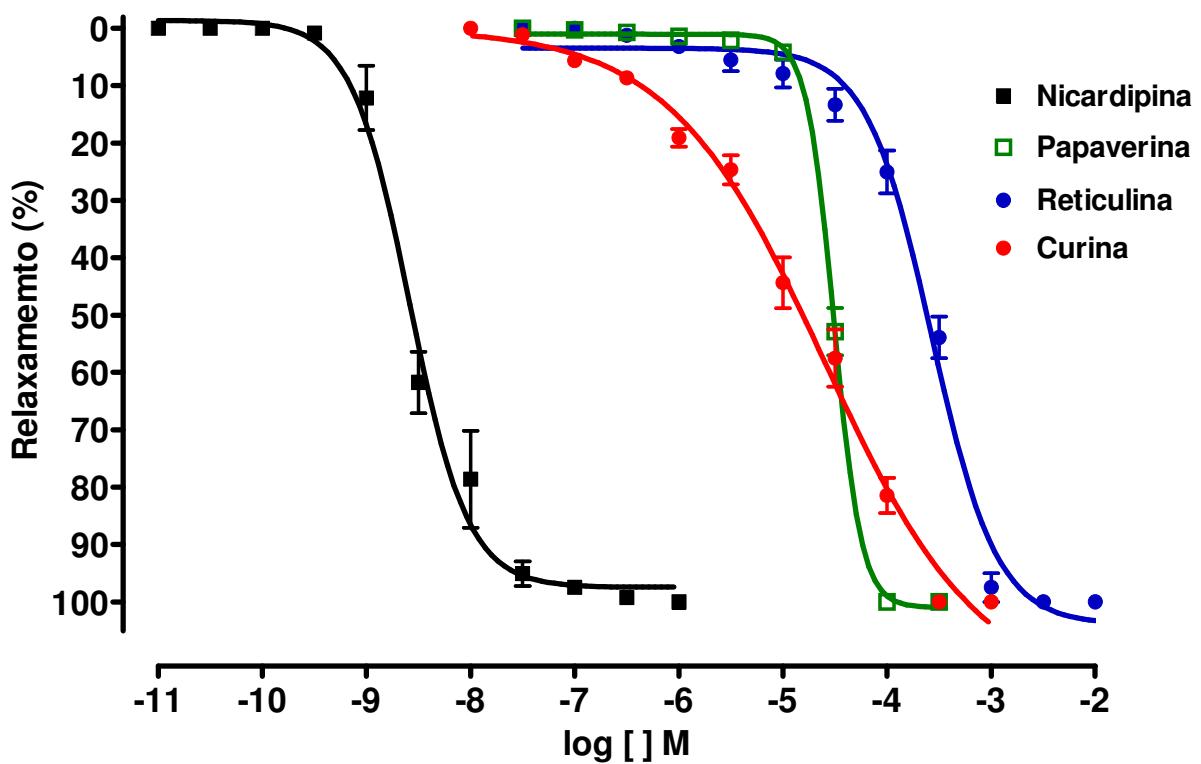


Figura 14. Curvas concentração-resposta (■) nicardipina, n = 5, (□) papaverina, n = 6, (●) curina, n = 6, e (●) reticulina, n = 4, sobre as contrações tónicas induzidas por 80 mM de KCl em aorta isolada de rato. Os dados representam a média \pm e.p.m.

4.2.2 Efeito da reticulina frente às contrações induzidas por CaCl₂ em meio despolarizante

A adição cumulativa de CaCl₂ (10 µM a 30 mM), em meio despolarizante (80 mM de KCl) sem Ca²⁺, produziu contração dependente de concentração em anéis desnudos de aorta de rato (Figura 15). Os valores de CE₅₀ para o CaCl₂ na presença das concentrações de 100 e 300 µM da reticulina foram, respectivamente, de 1,5 ± 0,5 mM (n = 4) e 2,4 ± 0,1 mM (n = 4), apresentando uma diminuição significativa na potência do CaCl₂ em relação ao controle (CE₅₀ = 0,40 ± 0,05 mM (n = 8)) na ordem de 3 e 6 vezes, respectivamente. Também se verificou a redução da resposta máxima em 300 µM da reticulina (18,0 ± 2,5%, n = 4). As curvas cumulativas ao aumento da [Ca²⁺]_o foram desviadas para direita de forma não-paralela, com inibição do E_{max} característico de um antagonismo do tipo não-competitivo.

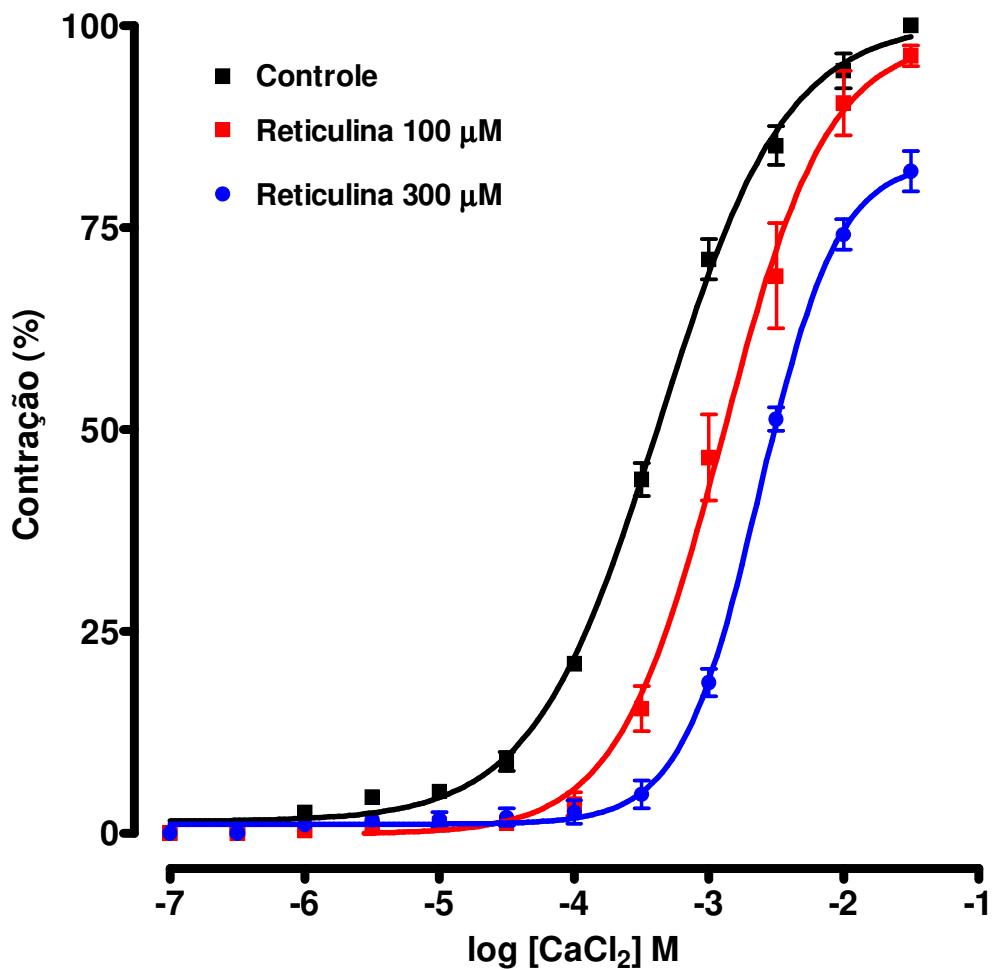


Figura 15. Efeito da reticulina frente às curvas concentração-resposta, em resposta à adição cumulativa de $[Ca^{2+}]_o$, em anéis de aorta isolada de rato, sem endotélio funcional, na ausência (■), $n = 8$, e na presença de 100 (■), e 300 μM (●), $n = 4$, da reticulina. Os dados representam a média \pm e.p.m.

4.2.3 Efeito da curina sobre os anéis de aorta de rato pré-contraídos com BAY K8644

A adição cumulativa da curina (de 10^{-7} a 10^{-4} M) promoveu um relaxamento dependente de concentração dos anéis de aorta isolada de rato pré-contraídos com BAY K8644 (3×10^{-7} M), um ativador dos canais Cav-L, com $CE_{50} = 11,9 \pm 1,9 \times 10^{-6}$ M (Figura 16).

O tempo necessário para que fossem obtidas as respostas máximas para cada concentração da curina variou entre 100 a 110 min. (dados não mostrados).

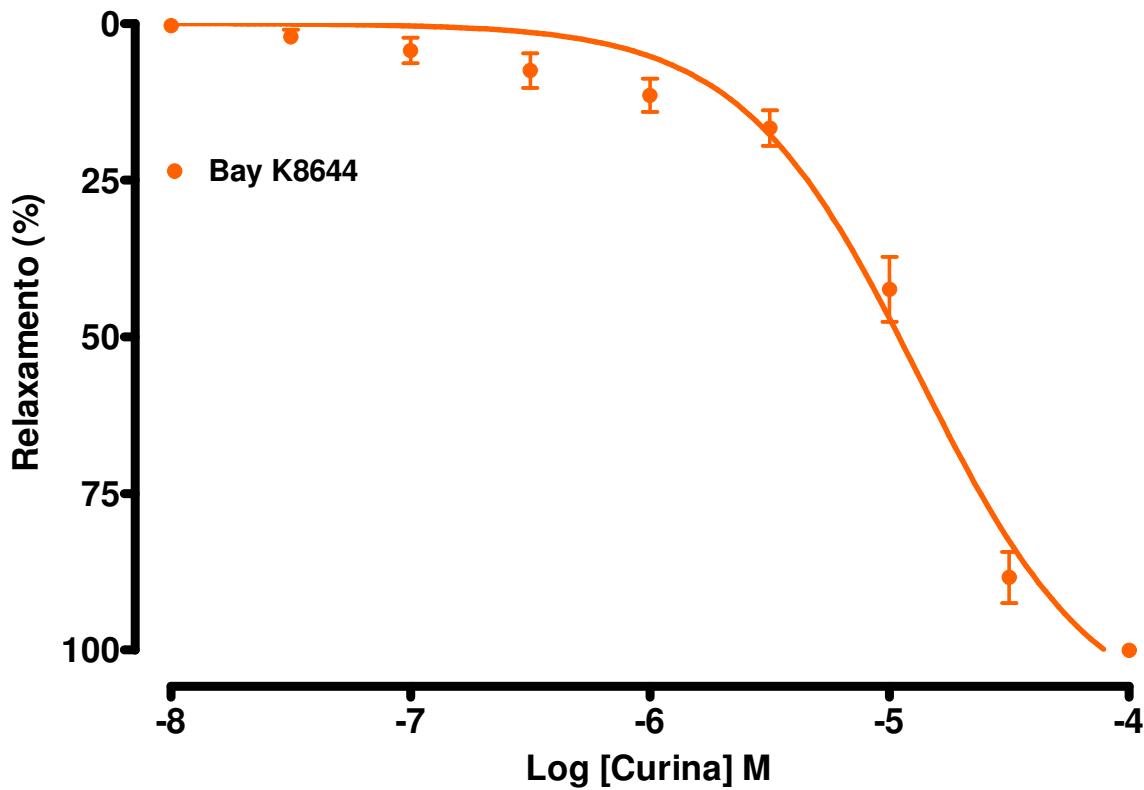


Figura 16. Efeito da curina sobre os anéis de aorta pré-contraídos com Bay K8644. Curva concentração-resposta para curina (10^{-7} – 10^{-4} M) em anéis da artéria aorta de rato, sem o endotélio vascular, pré-contraídos com Bay K8644 (300 nM). Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. ($n = 7$).

4.3 Caracterização eletrofisiológica da curina e da reticulina

4.3.1 Caracterização das correntes de Ca^{2+} em células da linhagem A7r5

Foi demonstrado que as células A7r5 expressam dois tipos distintos de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem, o do tipo-L e o do tipo-T (ZHANG et al., 1994). Em experimentos preliminares, examinamos as correntes carreadas pela ativação dos canais para Ca^{2+} em células A7r5 e constatamos que a maior parte das células exibiram correntes ativadas por valores de voltagem mais despolarizantes (>-50 mV) (HVA), conforme relatado anteriormente (UCHIDA et al., 2001). Quando as células A7r5 foram perfundidas com 300 μM de CdCl_2 , um bloqueador inespecífico dos canais para Ca^{2+} (ULLRICH et al., 2007), verificou-se que as correntes foram completamente inibidas (Figura 17A). Quando as células foram perfundidas com 10 μM de nicardipina, um bloqueador seletivo dos canais para Ca^{2+} do tipo-L (ULLRICH et al., 2007), observou-se que o bloqueio das correntes promovido pela nicardipina foi quase total (Figura 17C). No presente estudo, todas as células testadas apresentaram um montante substancial de correntes sensíveis à dihidropiridina (cerca de 85%) e pode-se concluir que as correntes que foram registradas são, principalmente, devido a ativação dos canais do tipo-L.

As correntes de entrada de Ba^{2+} através dos canais para Ca^{2+} , nas células A7r5, apresentaram característica típica de correntes sensíveis à voltagem do tipo-L. Além disso, estas correntes foram potencializadas com o ativador dos canais para Ca^{2+} , sensível a dihidropiridinas, S(-)-Bay K8644 (1 μM) (dados não mostrados) sendo totalmente abolidas pela exposição a um bloqueador destes canais, a nicardipina (10 μM) (Figura 17C).

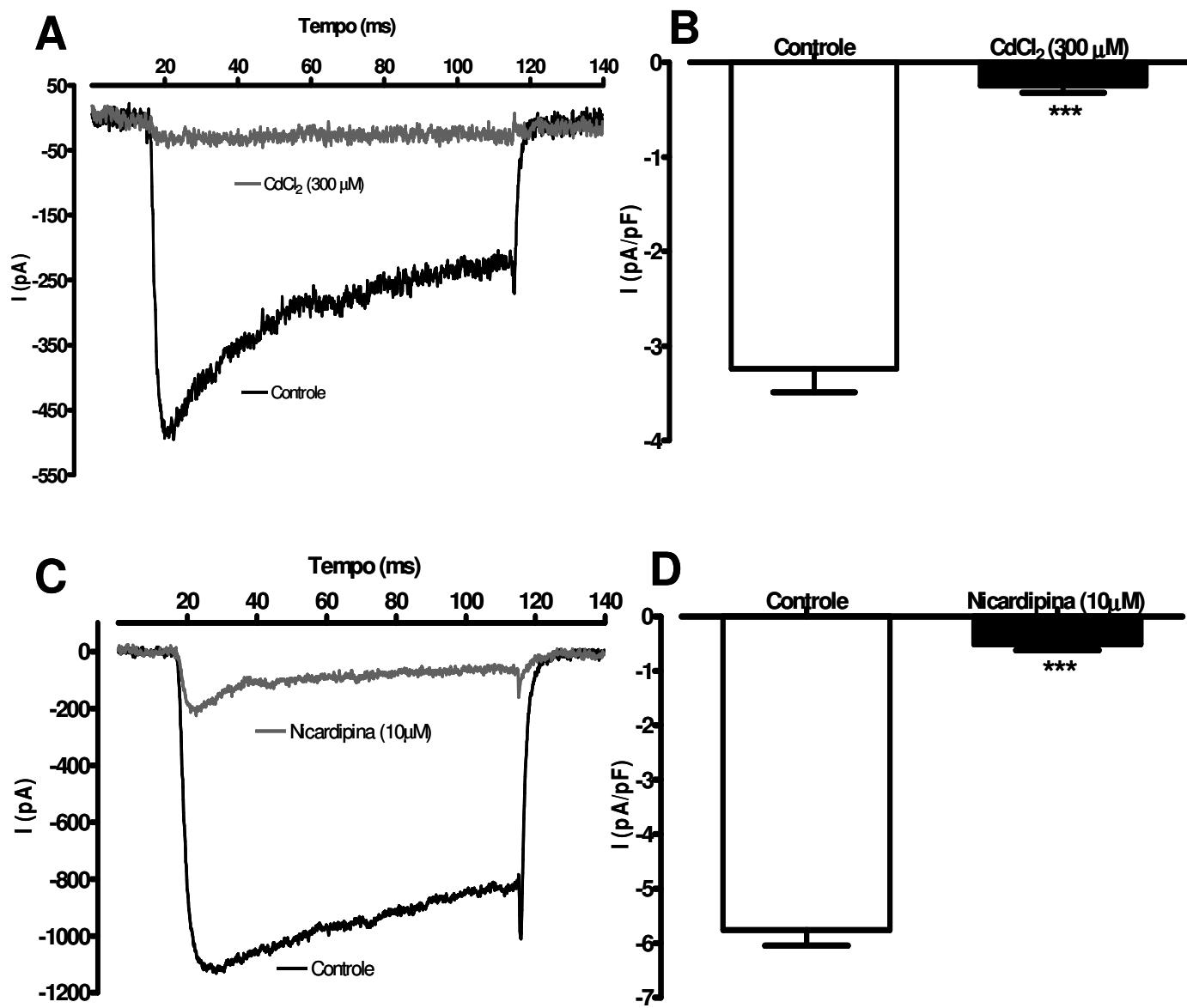


Figura 17. Caracterização das correntes de Ba^{2+} por canais para Ca^{2+} do tipo-L sensíveis à voltagem nas células A7r5. **A**, Traçado representativo antes (controle, em preto) e durante a aplicação de 300 μ M de $CdCl_2$ (em cinza) sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} , obtidas por pulsos despolarizantes de 10 mV, partindo de um potencial de holding de -80 mV. **B**, Resultado mostrando os valores de pico de corrente antes (controle) e durante a aplicação de 300 μ M de $CdCl_2$. **C**, Traçado representativo mostrando o efeito da nicardipina (10 μ M) sobre as correntes de Ba^{2+} . **D**, Média dos valores da inibição promovida por nicardipina. Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. ($n = 5$)

4.3.2 Efeito da curina e da reticulina sobre os canais para cálcio sensíveis à voltagem em células A7r5

As correntes foram inicialmente registradas com 10 mM de Ba²⁺ na solução externa para aumentar a amplitude das correntes do tipo-L através dos canais para cálcio. As correntes de Ba²⁺ nas células A7r5 foram registradas, utilizando o protocolo no qual a célula era despolarizada para 10 mV, partindo de um potencial de “holding” de -80mV com a frequência de estimulação de 0,1 Hz. É importante mencionar que, em nossos experimentos, só foram utilizadas as correntes de Ba²⁺ nas células A7r5 que mantiveram-se estáveis (sem “rundown”) por 10/15 min. A figura 18A mostra que a reticulina (100 µM) teve efeito inibitório sobre as correntes de Ba²⁺ (I_{Ba}). A inibição da I_{Ba} por reticulina se desenvolveu rapidamente, atingindo o máximo em 30 s (ver curso-temporal ilustrado na figura 18B). Nessa concentração, a reticulina inibiu a amplitude do pico das correntes de Ba²⁺ de $-4,6 \pm 0,4$ pA/pF (células controle, barra branca, n = 5) para $-1,98 \pm 0,14$ pA/pF (100 µM da reticulina, barra preta, n = 5), Figura 18C.

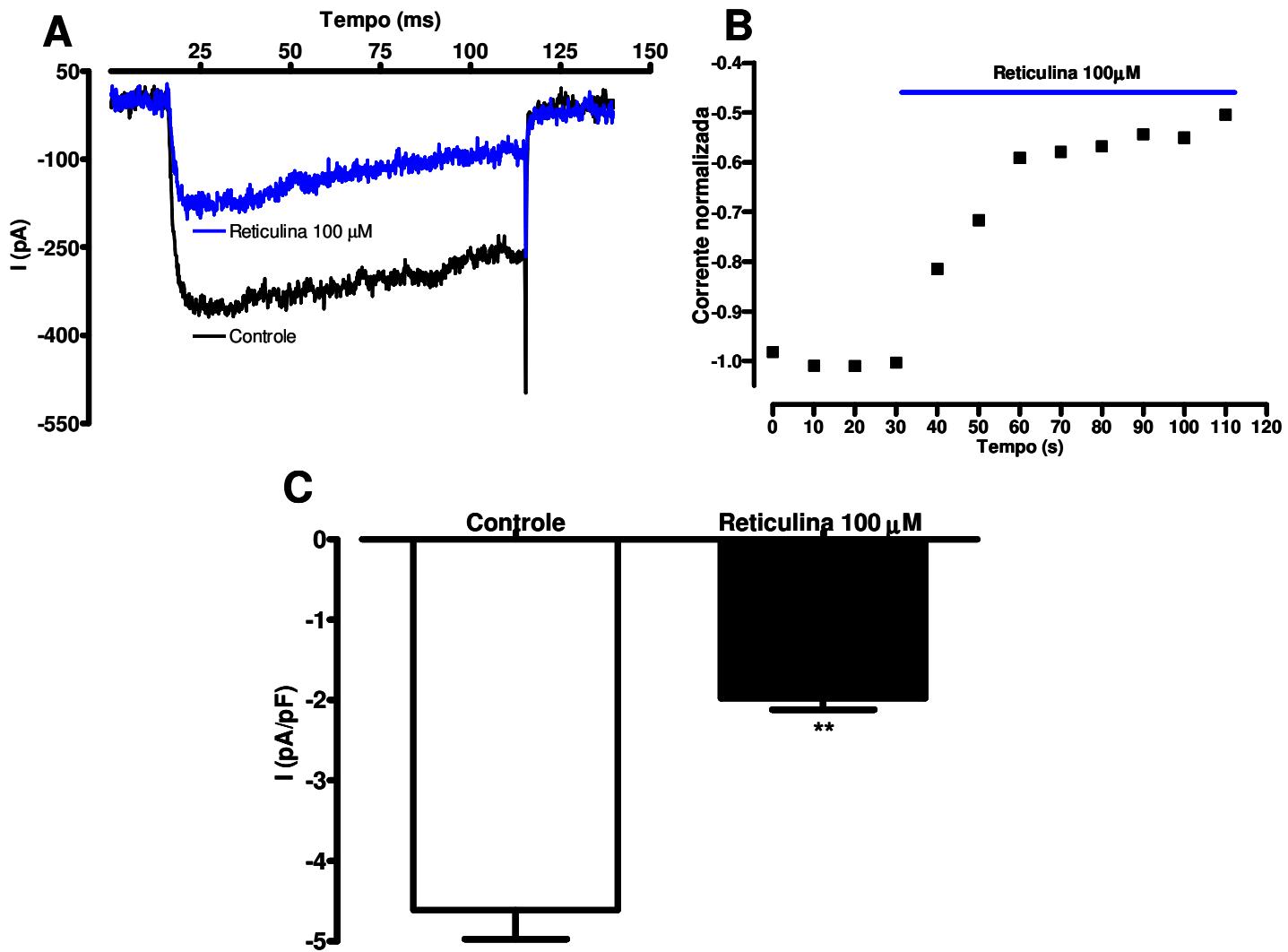


Figura 18. Efeito da reticulina sobre as correntes de Ba^{2+} em células A7r5 de aorta de ratos. **A**, Traçado representativo antes (controle, em preto) e durante a aplicação de 100 μM da reticulina (em azul) sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} . O registro foi obtido por pulsos despolarizantes de 10 mV, partindo de um potencial de “holding” de -80 mV. **B**, Curso temporal do efeito da reticulina. **C**, Resultado mostrando os valores de pico de corrente antes (controle) e durante a aplicação de 100 μM da reticulina. Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. ($n = 5$).

Os experimentos para registro das correntes através dos canais para Ca^{2+} incubados com curina foram executados da mesma forma anterior, exceto por utilizar 20 mM de Ba^{2+} . Verificou-se que curina também teve efeito inibitório sobre as correntes tipo-L, como mostrado pelos registros representativos.

Também se verificou que a inibição da I_{Ba} por curina desenvolveu-se rapidamente, cerca de 20 a 30 s (Figura 19B), sendo esse efeito completamente revertido quando a preparação foi lavada com a solução controle (Figura 19B). Curina (30 μM) inibiu a amplitude da corrente de Ba^{2+} de $-10,4 \pm 0,3 \text{ pA} / \text{pF}$ (controle, $n = 7$) para $-5,1 \pm 0,2 \text{ pA} / \text{pF}$ (curina, $n = 7$), figura 19C.

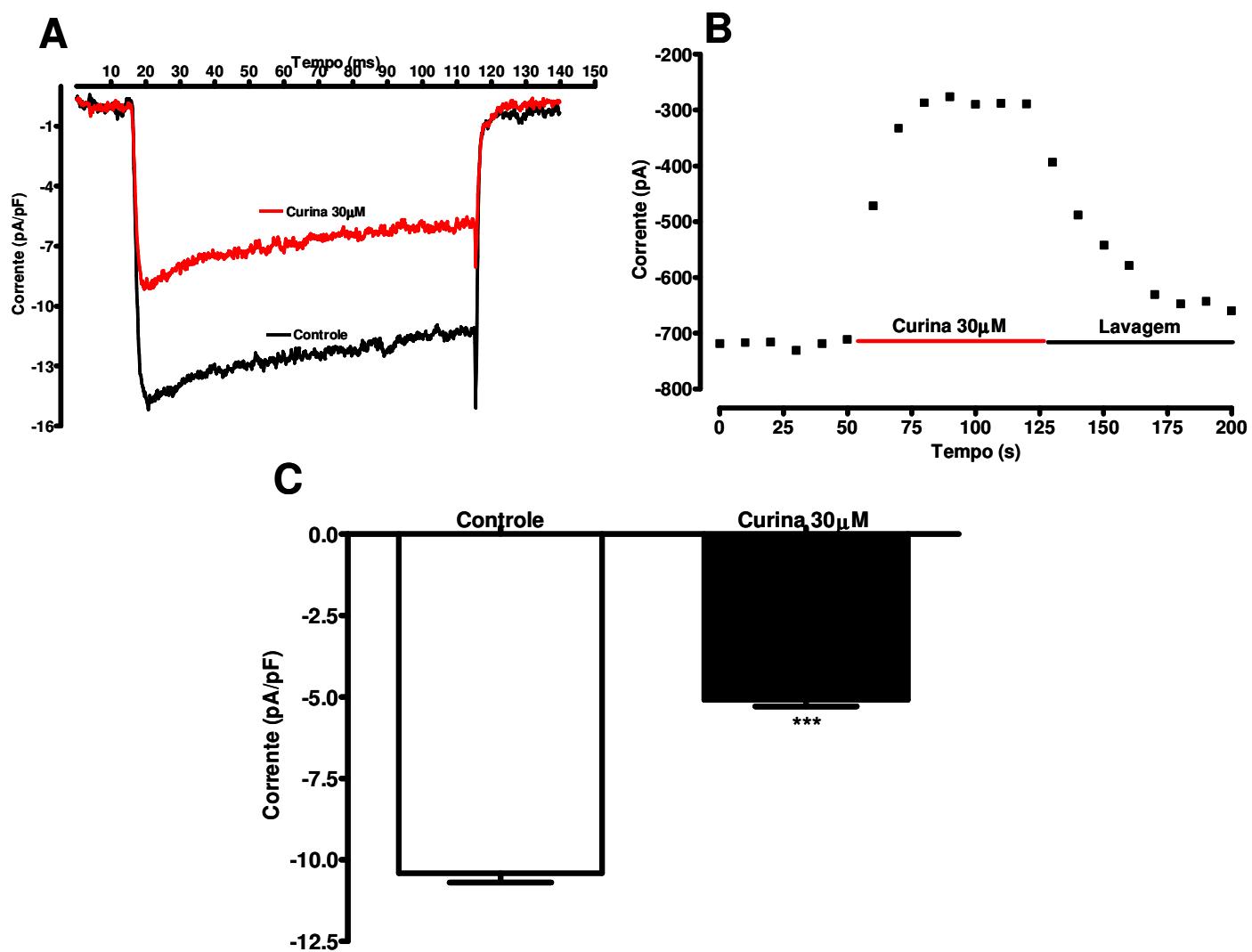


Figura 19. Efeito da curina nas correntes de Ba^{2+} em células A7r5 de aorta de ratos. **A**, Traçado representativo antes (controle, em preto) e durante a aplicação de 30 μM da curina (em vermelho) sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} , obtidas por pulsos despolarizante para +10 mV, partindo de um potencial de “holding” de -80 mV. **B**, Curso temporal do efeito da curina. **C**, Resultado mostrando os valores de pico de corrente antes (controle) e durante a aplicação de 30 μM da curina. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n = 7$).

4.3.3 Constante de tempo para o efeito da curina

A figura 20 mostra as constantes de ligação e a de desligamento da curina com sua estrutura alvo. A figura 20A apresenta o “tau-on” ou a constate de ligação da curina com seu sítio de ligação no canal de Ca^{2+} . O valor dessa constante foi de 38 ± 10 ms, ou seja, curina se liga a seu sítio específico em 38 ms e a constante de desligamento, “tau-off” foi de 42 ± 6 ms, que foi o tempo que curina leva para se desligar da molécula alvo, durante a lavagem.

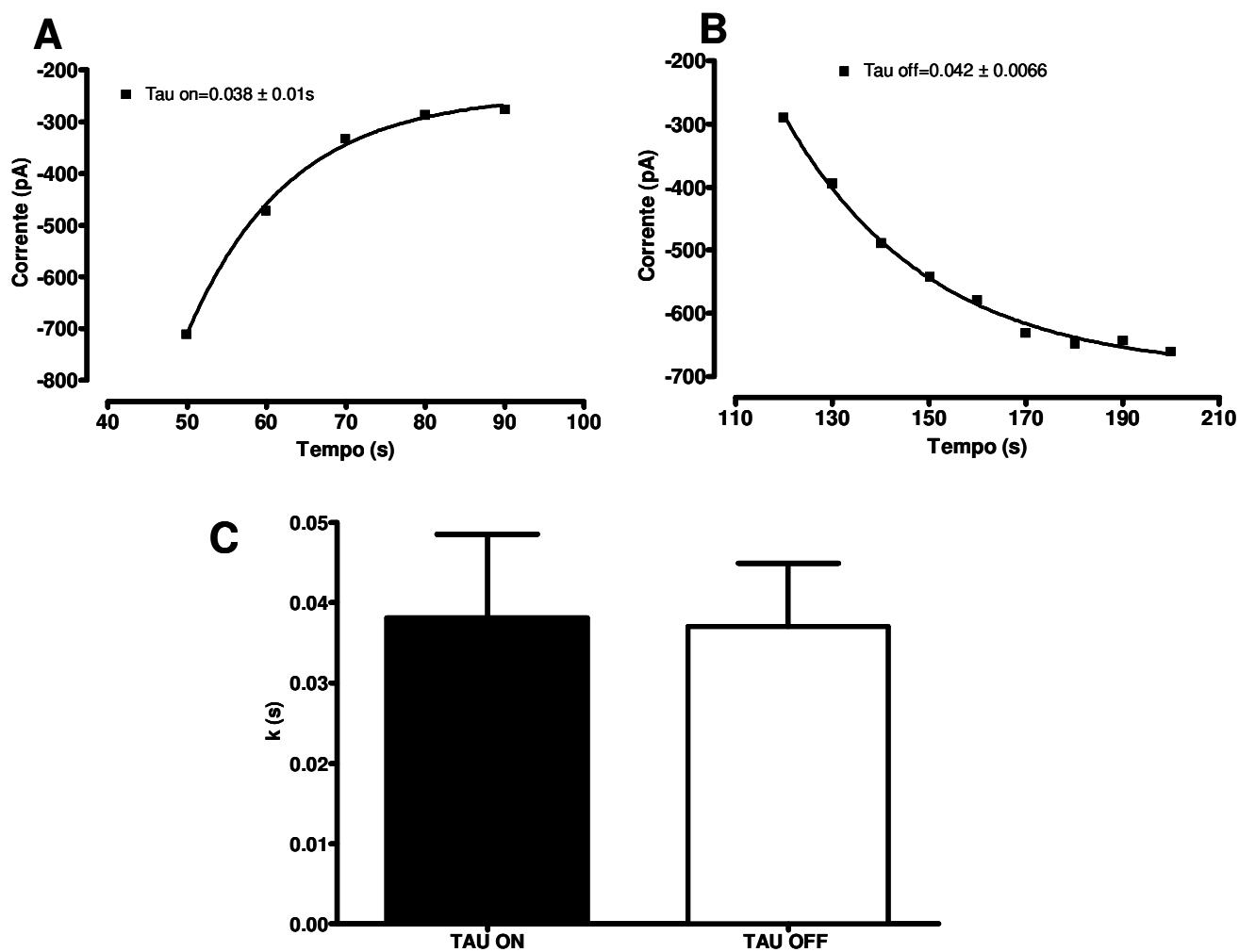


Figura 20. Constante de ligação e desligamento da curina. **A**, dados representativos durante a aplicação de $30 \mu\text{M}$ da curina sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} , correspondendo à constante de ligação da curina com a molécula alvo. A curva foi obtida a partir da equação $Y = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) * (1 - \exp(-k * X))$, onde k é a constante de tempo. **B**, dados representativos durante a lavagem da curina sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} , correspondendo à constante de desligamento da curina com a molécula alvo. **C**, Resultado mostrando os valores, expressos como média \pm e.p.m. de ligação tau-on e desligamento tau-off da curina ($n = 7$), $p > 0,05$.

4.3.4 Efeito da curina e da reticulina sobre os canais para cálcio abertos por voltagem em miócitos da aorta de rato recém dispersos

Para avaliar o efeito da curina e reticulina sobre os Ca_v , foram realizados experimentos de fixação de voltagem usando a técnica de “patch clamp”. Utilizando-se células musculares lisas, recém-dispersas de aorta isolada de ratos normotensos, foram registradas correntes utilizando 20 mM de Ba^{2+} . Na solução externa para aumentar a amplitude das correntes do tipo-L, através dos Ca_v na ausência e na presença da curina (30 μM) ou da reticulina (100 μM), figura 21. Esses dados foram utilizados para comparar com os resultados das células em cultura (A7r5). O valor médio das capacitâncias das células estudadas neste protocolo foram $9,5 \pm 0,10$ pF. A inibição da I_{Ba} por curina desenvolveu rapidamente, em cerca de 50 s (Figura 21B), sendo o efeito completamente revertido, quando a preparação foi lavada com a solução controle (Figura 21B), resultado semelhante alcançado ao com as células A7r5. Curina (30 μM) inibiu a amplitude da corrente de Ba^{2+} de $-6,2 \pm 0,1$ pA/pF (controle, $n = 3$) para $-4,7 \pm 0,08$ pA/pF (curina, $n = 3$, Figura 21C).

A inibição da I_{Ba} por reticulina (100 μM) desenvolveu também rapidamente, cerca de 10 a 20 s (ver curso-temporal como ilustrado na Figura 22). Nessa concentração, a reticulina inibiu a amplitude do pico da corrente de Ba^{2+} de $-7.85 \pm 0,39$ pA/pF (células controle, barra branca, $n = 3$) para -5.50 ± 0.38 pA/pF (100 μM da reticulina, barra preta, $n = 3$; Figura 22C).

Os resultados obtidos aqui foram semelhantes aos obtidos com a linhagem de aorta de rato, A7r5. Dessa forma, devido à manipulação, à disponibilidade e à agilidade de trabalho serem bem mais favoráveis com as células A7r5, passamos a proceder nossos experimentos com essas células.

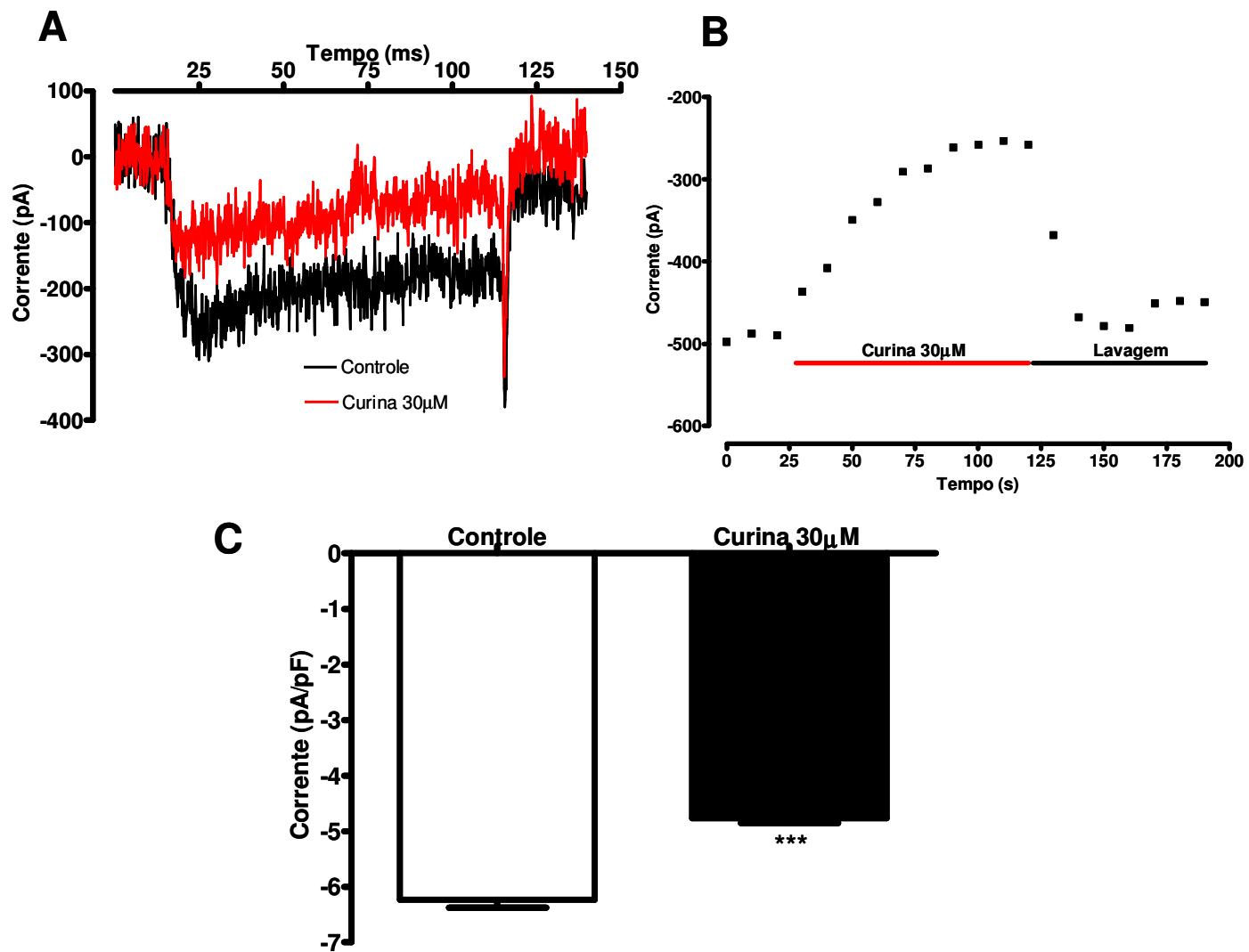


Figura 21. Efeito da curina sobre as correntes de Ba^{2+} , em miócitos de aorta de ratos recém-dispersos. **A**, Traçado representativo antes (controle, em preto) e durante a aplicação de 30 μM da curina (em vermelho) sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} . As correntes foram obtidas por pulsos despolarizantes de +10 mV, partindo de um potencial de “holding” de -80 mV. **B**, Curso temporal do efeito da curina. **C**, Resultado mostrando os valores de pico de corrente antes (controle) e durante a aplicação de 30 μM da curina. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m., $n = 3$, *** $p < 0,001$.

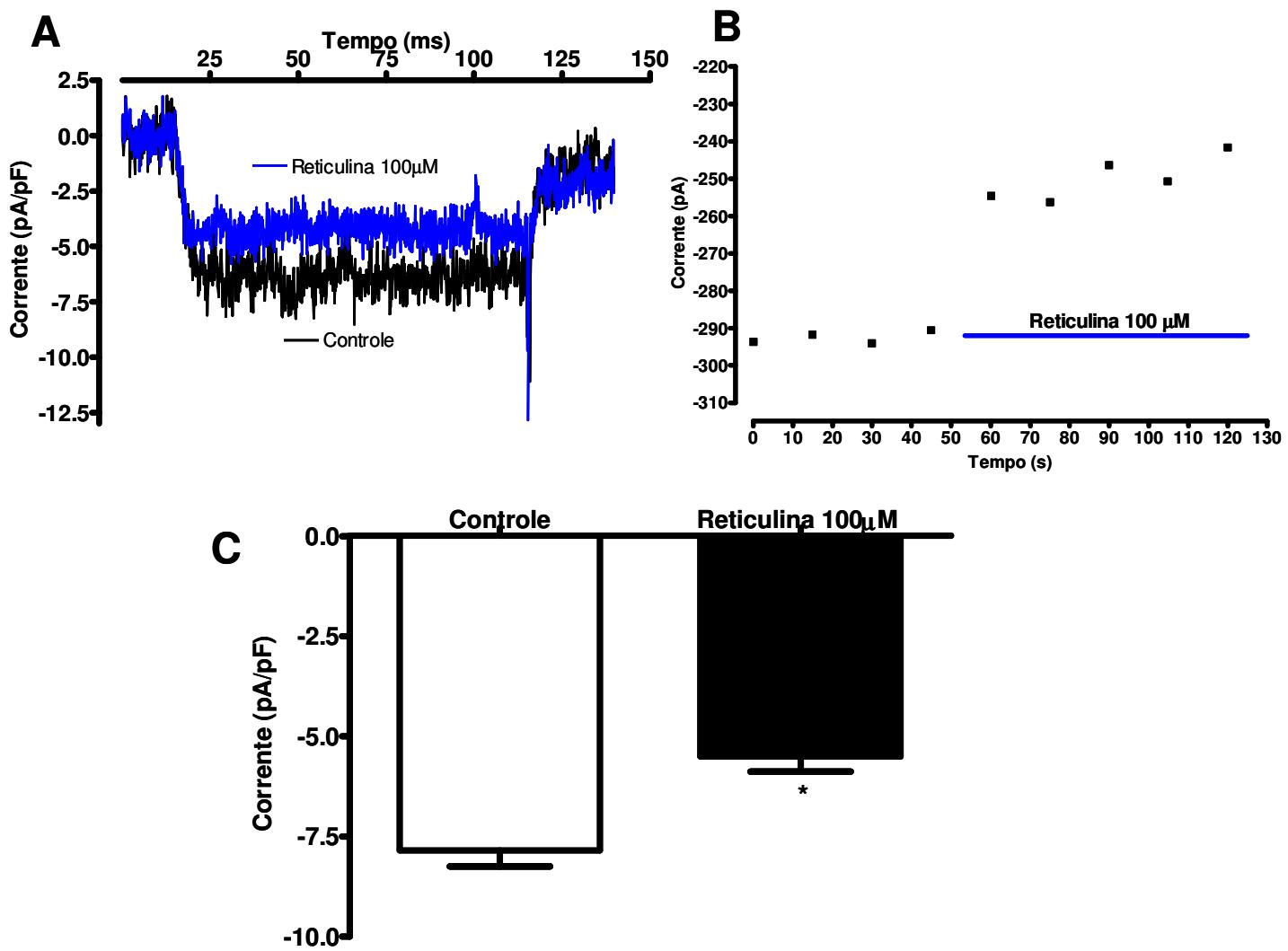


Figura 22. Efeito da reticulina nas correntes de Ba^{2+} , em miócitos de aorta de ratos recém-dispersos. **A**, Traçado representativo antes (controle, em preto) e durante a aplicação de 100 μM da reticulina (em azul) sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} . As correntes foram obtidas por pulsos despolarizantes de +10 mV, partindo de um potencial de holding de -80 mV. **B**, Curso temporal do efeito da reticulina. **C**, Resultado mostrando os valores de pico de corrente antes (controle) e durante a aplicação de 100 μM da reticulina. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m., $n = 3$, $^*p < 0,05$.

4.3.5 Curva concentração-resposta da curina, da reticulina e de nicardipina sobre as correntes através dos canais para cálcio sensíveis a voltagem em células A7r5

A Figura 23 mostra o efeito bloqueador das diferentes concentrações da curina (3, 10, 30, 100 e 300 μ M), reticulina (10, 30, 100 e 300 μ M) e nicardipina (10^{-9} a 10^{-5} M) no pico das correntes de Ba^{2+} , de maneira dependente de concentração. As Figura 23A e B apresentam registros representativos, obtidos na situação controle e durante a exposição das diferentes concentrações da curina e de reticulina. Na figura 23C mostra a curva concentração-resposta da curina, da reticulina e de nicardipina, nas concentrações acima citadas, sobre as correntes de Ba^{2+} . Pode-se observar uma diminuição, dependente de concentração, das correntes de entrada de Ba^{2+} normalizadas. A curva concentração-resposta para curina (círculos fechados, $n = 7$) resultou na Cl_{50} de $30,9 \pm 4,0 \mu\text{M}$, para reticulina (quadrados azuis, $n = 5$) a Cl_{50} foi de $39,6 \pm 15,5 \mu\text{M}$ e para nicardipina (quadrados pretos, $n = 5$) a Cl_{50} foi de $67,4 \pm 30,5 \text{ nM}$, Figura 23C.

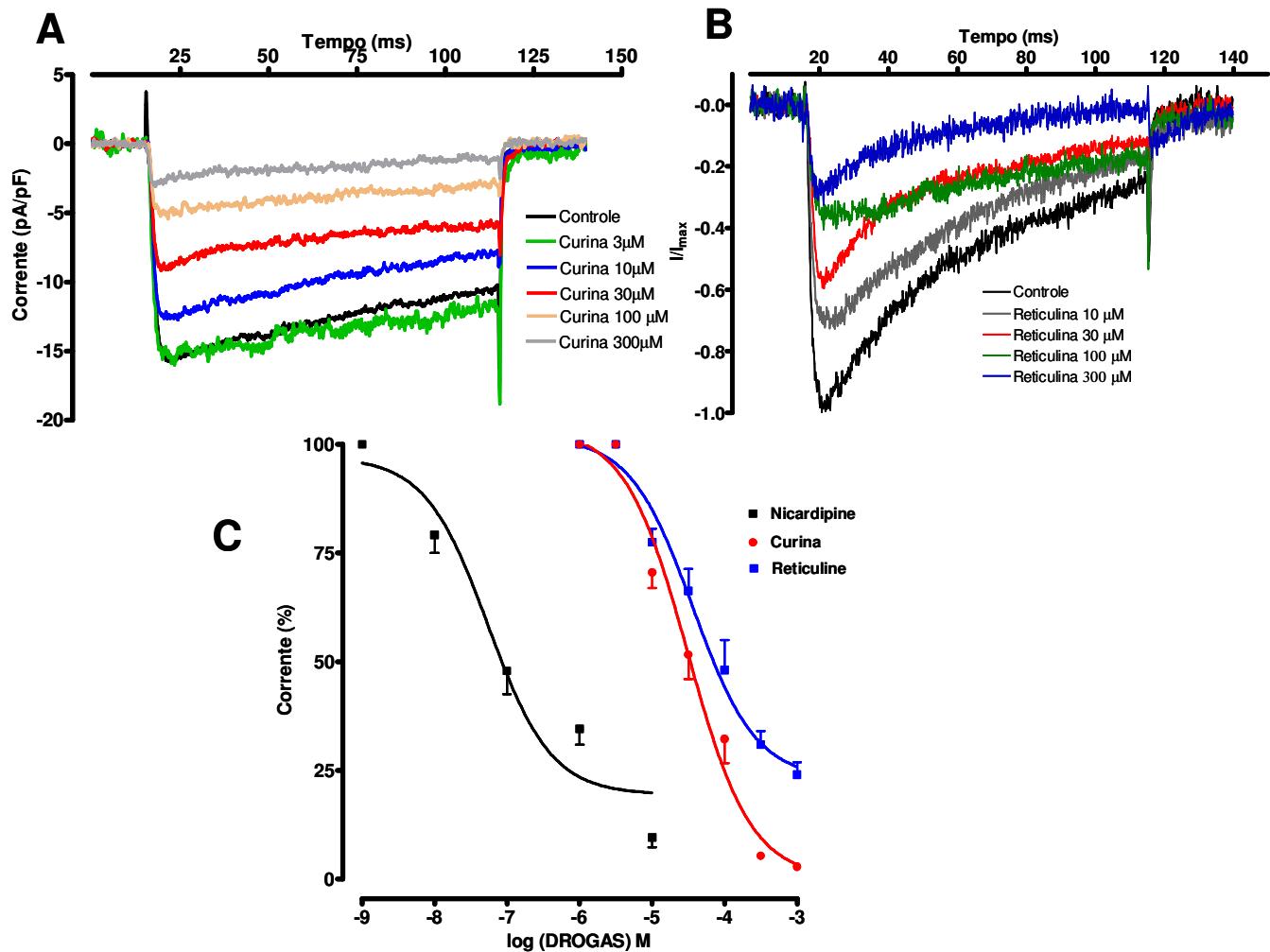


Figura 23: Curva concentração-resposta à curina, reticulina e nicardipina sobre as correntes de Ba^{2+} por canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem do tipo-L. **A**, Traçados representativos mostrando o efeito da curina (3, 10, 30, 100 and 300 μM) sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} , obtidas por pulsos despolarizantes para +10 mV, partindo de um potencial de “holding” de -80 mV, células A7r5. **B**, Traçados representativos mostrando o efeito da reticulina (10, 30, 100 and 300 μM) sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} , obtidas por pulsos despolarizantes para +10 mV, partindo de um potencial de holding de -80 mV, células A7r5. **C**, Curvas concentração-resposta para nicardipina, curina e reticulina, mostrando a inibição dependente de concentração das correntes de Ba^{2+} . Os valores estão expressos como média \pm e.p.m.

4.3.6 Identificação e caracterização do efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de cálcio em células A7r5

Para isolar as correntes ativadas em potenciais mais despolarizantes (HVA), foi usado um potencial de “holding” em -40 mV. A alteração do “holding” foi para investigar se havia diferença no efeito da curina e da reticulina, comparado com os resultados de “holding” de -80 mV.

A figura 24, mostra a curva concentração-resposta para curina sobre as correntes de Ba^{2+} . Pode ser observada uma redução, dependente de concentração, das correntes de Ba^{2+} normalizadas. A curva concentração-resposta para curina (Figura 24B, $n = 5$) gerou uma Cl_{50} de $33,7 \pm 3,8 \mu\text{M}$. Comparando com a curva concentração-resposta com “holding” em -80 mV, $30,9 \pm 4,0 \mu\text{M}$, não se verificou diferença significante entre os valores de Cl_{50} .

Da mesma forma, a reticulina inibiu as I_{Ba} quando o potencial de membrana partiu de -40 mV. Na concentração de $100 \mu\text{M}$, reticulina reduziu a amplitude do pico da corrente de Ba^{2+} de $-9,4 \pm 0,1 \text{ pA/pF}$ (células controle, barra branca, $n = 3$) para $-6,3 \pm 0,1 \text{ pA/pF}$ ($100\mu\text{M}$ da reticulina, barra preta, $n = 3$), figura 25.

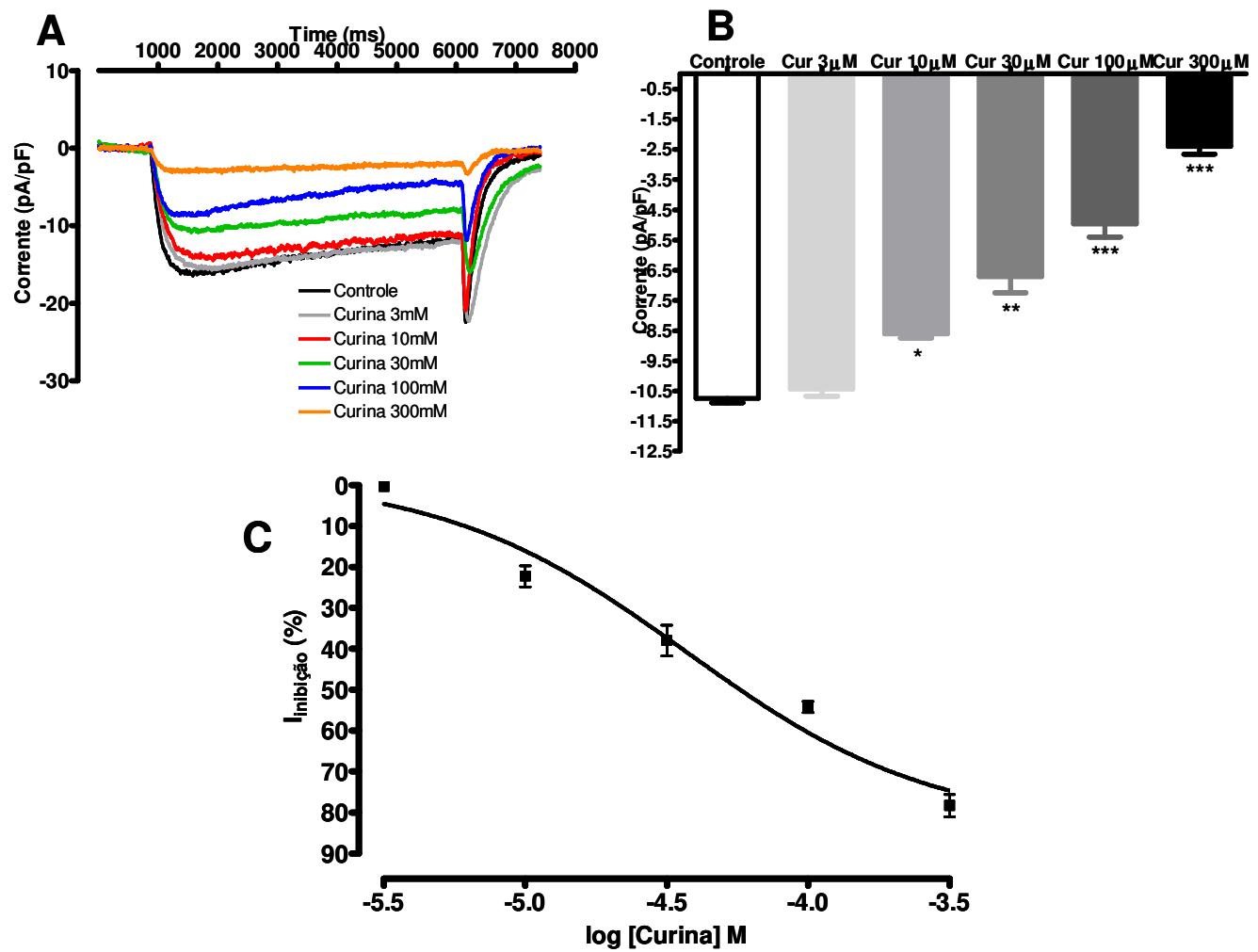


Figura 24: Curva concentração-resposta à curina sobre as correntes de Ba^{2+} , partindo do potencial de “holding” de -40 mV. **A**, Traçado representativo mostrando o efeito da curina (3, 10, 30, 100 and 300 μM) sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} , obtidas por pulsos despolarizante para +10 mV, partindo de um potencial de “holding” de -40 mV, em células A7r5. **B**, Resultado mostrando os valores de pico de corrente antes (controle) e durante a aplicação da curina (3, 10, 30, 100 and 300 μM). **C**, Curva concentração-resposta para curina, mostrando a inibição dependente de concentração das correntes de Ba^{2+} . Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n = 3$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

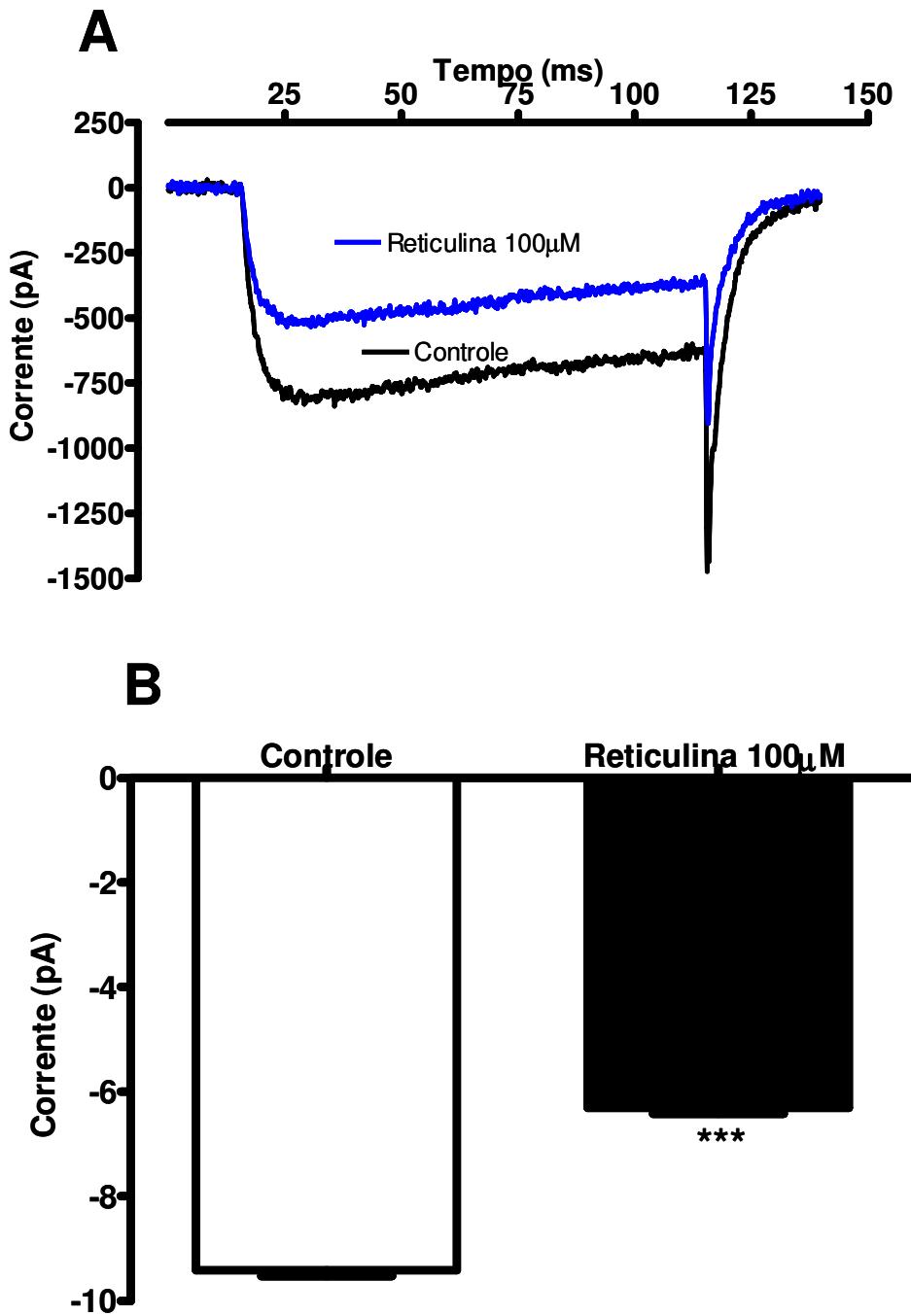


Figura 25: Efeito da reticulina sobre as correntes de Ba^{2+} , partindo do potencial de “holding” de -40 mV. **A**, Traçados representativos mostrando o efeito da reticulina (100 μM) sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} , obtidas por pulsos despolarizantes para +10 mV, partindo de um potencial de holding de -40 mV em células A7r5. **B**, Resultado mostrando os valores de pico de corrente antes (controle) e durante a aplicação da reticulina (100 μM). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m., ($n = 3$), *** $p < 0,001$.

4.3.7 Efeito da curina e reticulina sobre a relação I/V para os Ca_v das células A7r5

A relação corrente-voltagem (I/V) foi obtida por pulsos despolarizantes de 100 ms de duração, a partir da potencial de holding de -80 mV para potenciais testes entre -80 mV e 60 mV com incremento de 10 mV. Na situação controle, solução externa com Ba^{2+} (10 ou 20 mM) ou na situação teste, perfundindo-se a célula com solução extracelular contendo Ba^{2+} e curina (30 ou 100 μM) ou reticulina (100 μM), a I_{Ba} foi ativada em aproximadamente -40 mV e o pico foi atingido em 10 mV do potencial membrana. As medidas de densidade de corrente no pulso de 10 mV foram de $-10,4 \pm 0,8 \text{ pA/pF}$ (quadrados abertos, Controle, $n = 8$), $-5,0 \pm 0,8 \text{ pA/pF}$ (curina em 30 μM , quadrados fechados, $n = 7$, $p < 0,001$) e $-2,9 \pm 0,7 \text{ pA/pF}$ (curina em 100 μM , círculos fechados, $n = 6$, $p < 0,001$). Curina (30 μM) inibiu o pico das correntes de Ba^{2+} em cerca de 51,9%, enquanto 100 μM da curina inibiu cerca de 72%. A curina reduziu o pico da corrente de Ba^{2+} , mas não alterou significativamente o potencial para atingir a densidade máxima da corrente e também sem alterar o potencial de reversão.

A relação corrente voltagem (I/V) também foi reduzida na presença da reticulina (100 μM , quadrados fechados, $n = 8$; Figura 27), mas não houve alteração no potencial, para atingir a densidade máxima da corrente, nem no potencial de reversão aparente. As medidas da densidade de corrente do pico em 0 mV foram de $-5,8 \pm 1,1 \text{ pA / pF}$ (controle, quadrados abertos, $n = 8$) e $-3,8 \pm 0,6 \text{ pA/pF}$ (reticulina em 100 M, quadrados fechados, $n = 8$, $p < 0,01$).

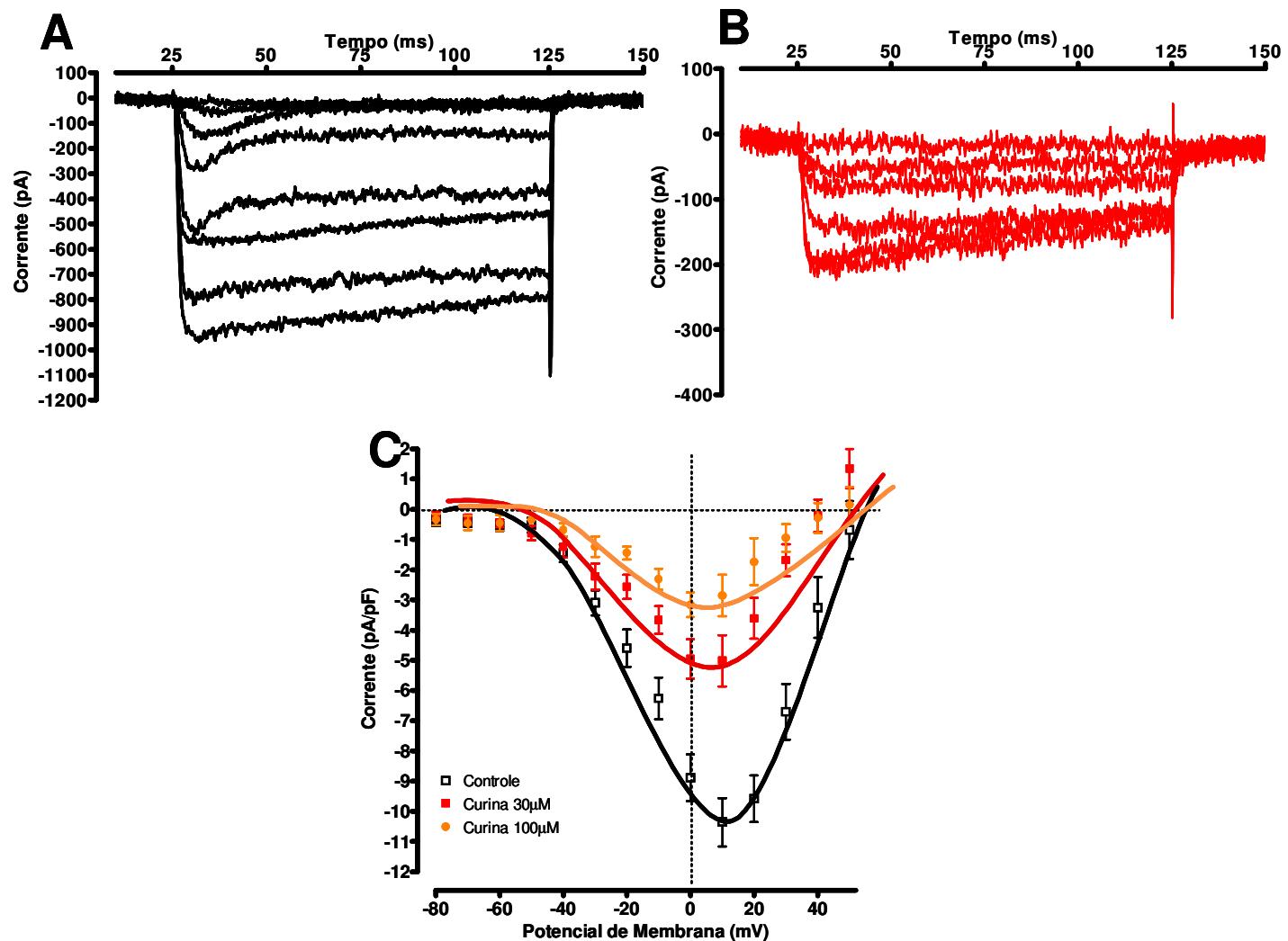


Figura 26: Efeito da curina sobre as correntes de Ba^{2+} em miócitos de aorta (A7r5) na relação corrente-voltagem. **A**, Traçados originais representativos da relação corrente-voltagem das correntes de Ba^{2+} antes (Controle). **B**, traçados originais durante a adição da curina (30 μM). **C**, Inibição dependente de concentração induzida por curina (30 e 100 μM), obtida por pulsos-teste de 100 ms de duração, em incrementos de 10 mV, que despolarizaram a célula de -80 até +60 mV. A curva foi obtida a partir da equação de Boltzmann. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n = 11, 9$ e 5 experimentos, respectivamente).

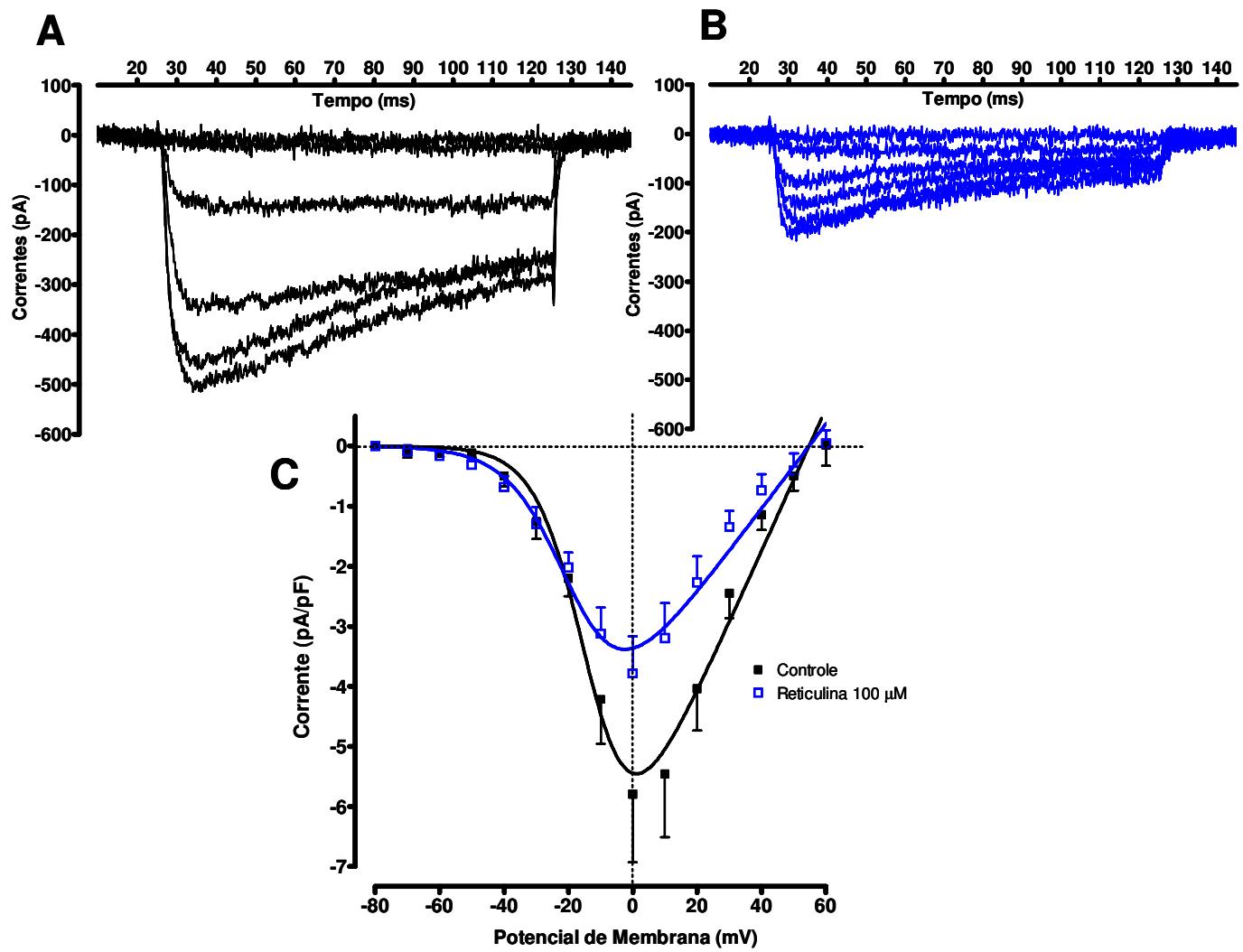


Figura 27: Efeito da reticulina sobre as correntes de Ba^{2+} em miócitos de aorta (A7r5) na relação corrente/voltagem. **A**, Traçados originais representativos da relação corrente-voltagem das correntes de Ba^{2+} antes (Controle). **B**, traçados originais durante a adição da reticulina 100 μM . **C**, Inibição induzida por reticulina (100 μM), obtidas por pulsos-teste de 100 ms de duração, em incrementos de 10 mV, que despolarizaram a célula de -80 até +60 mV. A curva foi obtida a partir da equação de Boltzmann. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ($n = 8$).

4.3.8 Efeito da curina e reticulina sobre a cinética de ativação dos canais para cálcio sensíveis à voltagem em células A7r5

O efeito da curina sobre a cinética de ativação dos canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem, foi analisado a partir dos valores de condutância normalizados, em função dos potenciais testes. O nível máximo de condutância foi assumido como sendo o valor extrapolado a partir da parte linear da curva I/V. A curva de ativação estacionária, ajustada segundo a equação de Boltzmann como descrita em métodos, foi deslocada para esquerda na presença de 30 μM da curina. Sem alteração significativa dos valores de $V_{0,5}$, (ou valor de voltagem onde metade dos canais se encontram fechados e a outra metade abertos), e da inclinação da curva (k) foram, respectivamente, de $-14,0 \pm 3,3$ mV e $11,4 \pm 1,7$ mV no controle (Figura 28, quadrados abertos, $n = 8$), $-24,5 \pm 7,8$ mV e $13,3 \pm 3,5$ mV com curina 30 μM (Figura 28, quadrados fechados, $n = 7$).

Para reticulina, as curvas de ativação estacionária foram também obtidas a partir da relação corrente voltagem (I-V). A máxima ativação foi assumida como sendo o valor extrapolado a partir da parte linear da curva I-V. As curvas de ativação foram obtidas de acordo com a equação de Boltzmann: $G / G_{\text{max}} = 1 / (1 + \exp [-(V_{1/2}-V) / k])$. Os valores de $V_{0,5}$ e da inclinação (k) foram, respectivamente, de $-15,0 \pm 0,8$ e $8,9 \pm 0,7$ mV no controle (Figura 29, quadrados abertos, $n = 8$) e $-21,9 \pm 1,2$ e $9,9 \pm 1,0$ mV (Figura 29, quadrados fechados, $n = 8$), durante a exposição de 1 min. com reticulina a 100 μM concentração. Estes valores não foram significativamente diferentes.

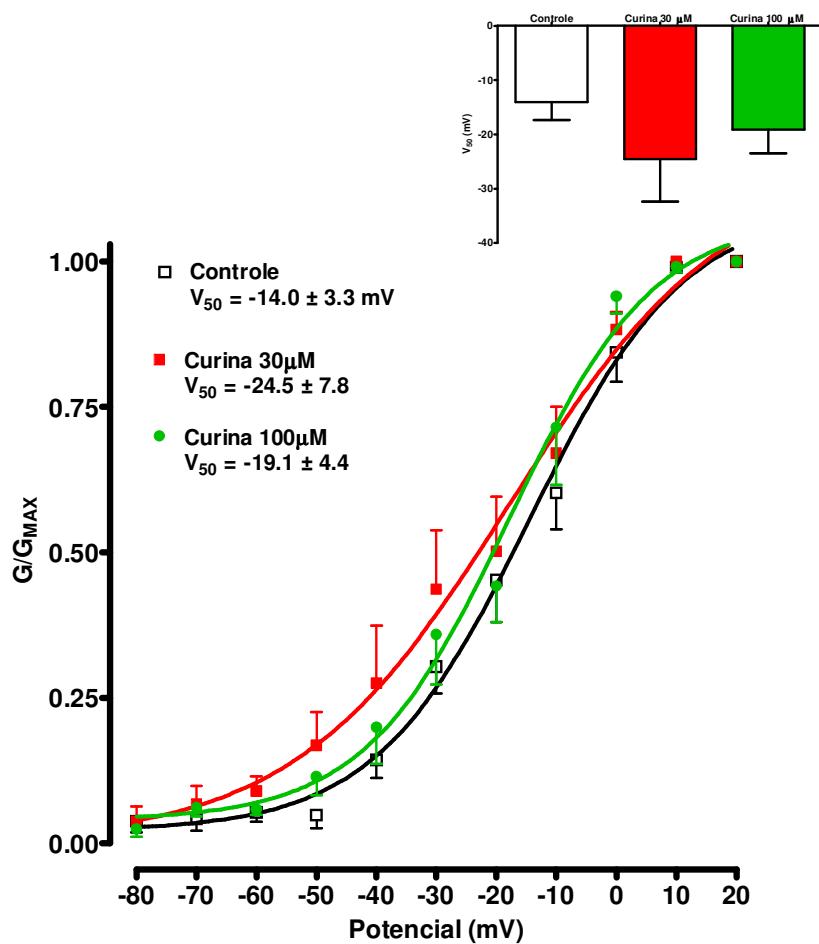


Figura 28: Efeito da curina sobre a curva de ativação estacionária dos canais Ca_V tipo-L em células A7r5. As curvas de ativação estacionária foram obtidas da relação corrente-voltagem (Figura 29) e ajustadas segundo equação de Boltzmann na ausência (Controle) (◻) e na presença da curina 30 (■) e 100 μM (●). O gráfico em barra acima mostra o deslocamento do $V_{0.5}$ induzido por curina (30 e 100 μM). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m., ($n = 7$).

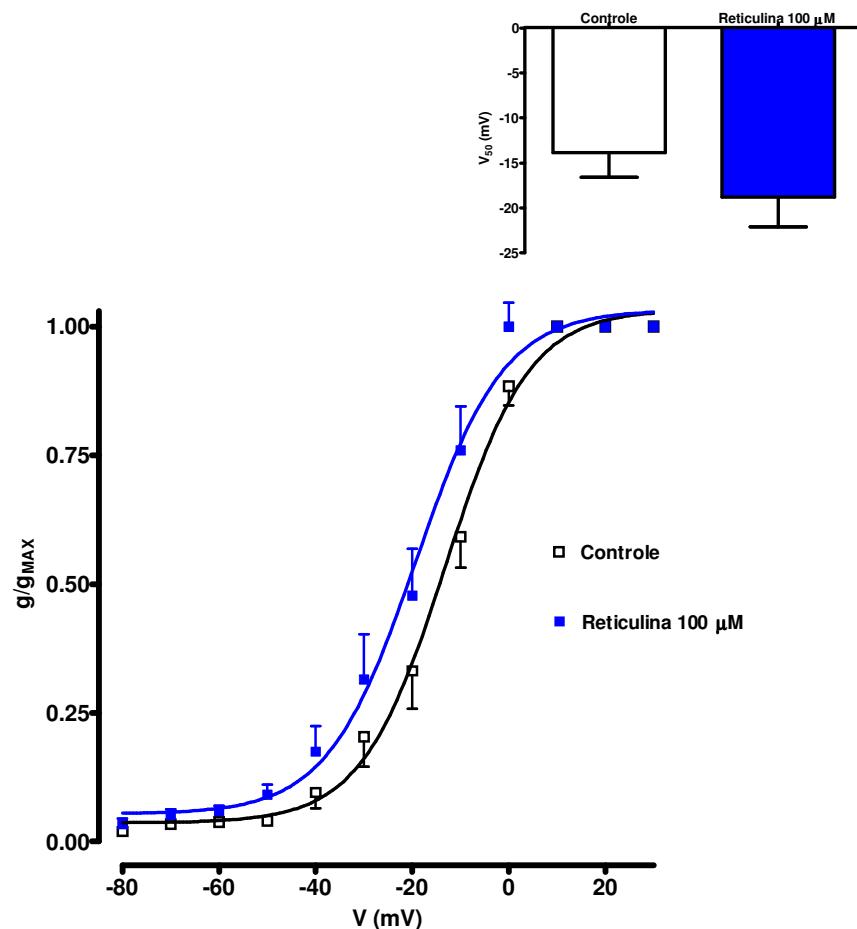


Figura 29: Efeito da reticulina sobre a curva de ativação estacionária dos canais Ca_v tipo-L em células A7r5. As curvas de ativação estacionária foram obtidas da relação corrente-voltagem (Figura 30) e ajustadas segundo equação de Boltzmann na ausência (Controle) (◻) e na presença da reticulina 100 μM (■). O gráfico em barra mostra o deslocamento do $V_{0.5}$ induzido por curina (30 μM). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m., $n = 8$.

4.3.9 Efeito da curina e da reticulina sobre a curva de inativação estacionária para os canais Cav tipo-L em células A7r5

Neste experimento, foi avaliada a disponibilidade de canais Ca_v tipo-L. Foi aplicado um longo pré-pulso condicionante de vários potenciais entre -100 mV a $+30$ mV, com incrementos de 10 mV, durante um período de 500 ms antes do pulso teste para 10 mV, com duração de 100 ms. Observou-se, nesta situação, que a amplitude das correntes de Ba^{2+} obtidas nos pulsos testes diminuíam quando a amplitude do pré-pulso aumentava. Os valores de $V_{0,5}$, para inativação estacionária foram obtidos pela plotagem dos valores de corrente normalizada na equação de Boltzmann, foram $4,3 \pm 2,0$ mV para controle (Figura 30, quadrados abertos, $n = 7$) e $-12,9 \pm 3,6$ mV no presença da curina a 30 μM (Figura 30, quadrados fechados, $n = 7$). Estes resultados foram significativamente diferentes ($p < 0,01$), porém, não foram observadas alterações representativas nos valores de inclinação das curvas, $-21,3 \pm 4,6$ mV para células controle e $-3,5 \pm 7,2$ mV na presença da curina em 30 μM .

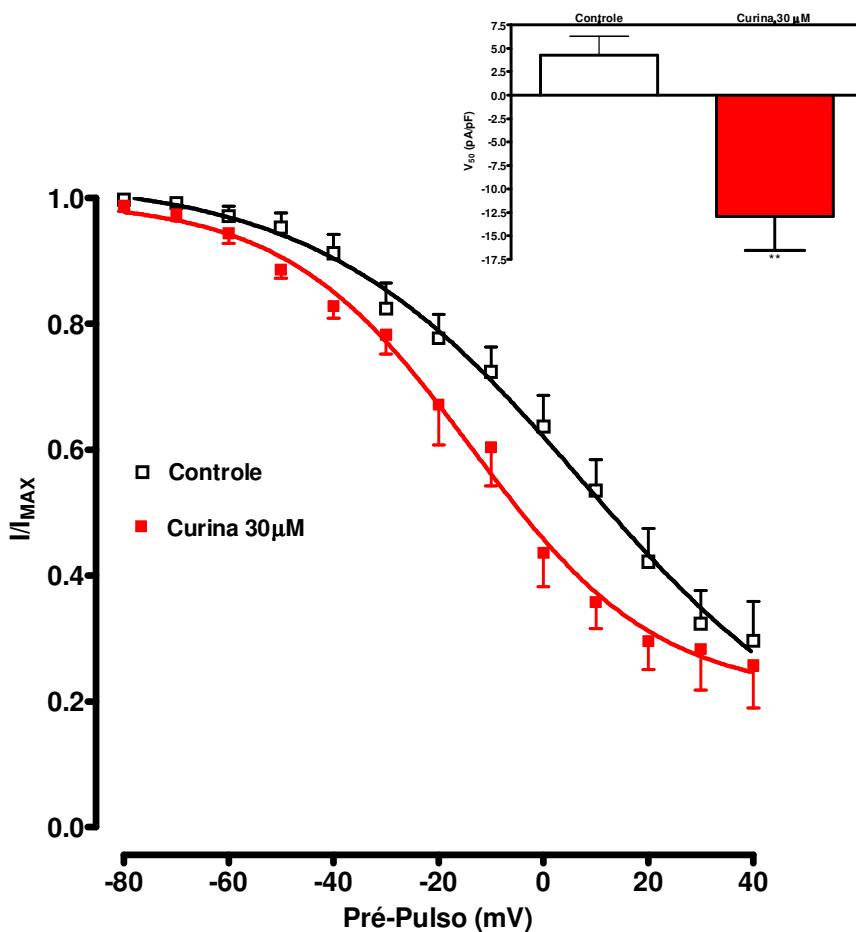


Figura 30: Efeito da curina (30 μM) sobre a curva de inativação estacionária dos canais Ca_v tipo-L em células A7r5. As curvas de inativação estacionária foram obtidas, usando-se o protocolo de duplo-pulso e ajustadas pela equação de Boltzmann na ausência (Controle) (◻) e na presença da curina 30 μM (■). As amplitudes relativas das correntes de Ba^{2+} foram mostradas em função dos potenciais no pré-pulso. O gráfico de barras acima mostra o deslocamento do $V_{0.5}$ induzido por curina. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ** $p < 0.01$ vs Controle, ($n = 7$).

A inativação estacionária da I_{Ba} foi medida durante a aplicação do pulso condicionante de 500 ms de duração. Os valores de $V_{0,5}$ foram obtidos pela equação de Boltzmann $-22,4 \pm 0,9$ mV, para o controle (Figura 31, quadrados abertos, $n = 6$) e $-33,4 \pm 1,0$ mV, na presença da reticulina a 100 μ M (Figura 31, quadrados fechados, $n = 6$). Esses resultados foram significativamente diferentes ($p < 0,01$). A inclinação da curva não foi significativamente diferente, $11,3 \pm 0,9$ mV para células controle e $13,4 \pm 0,9$ mV na presença da reticulina a 100 μ M.

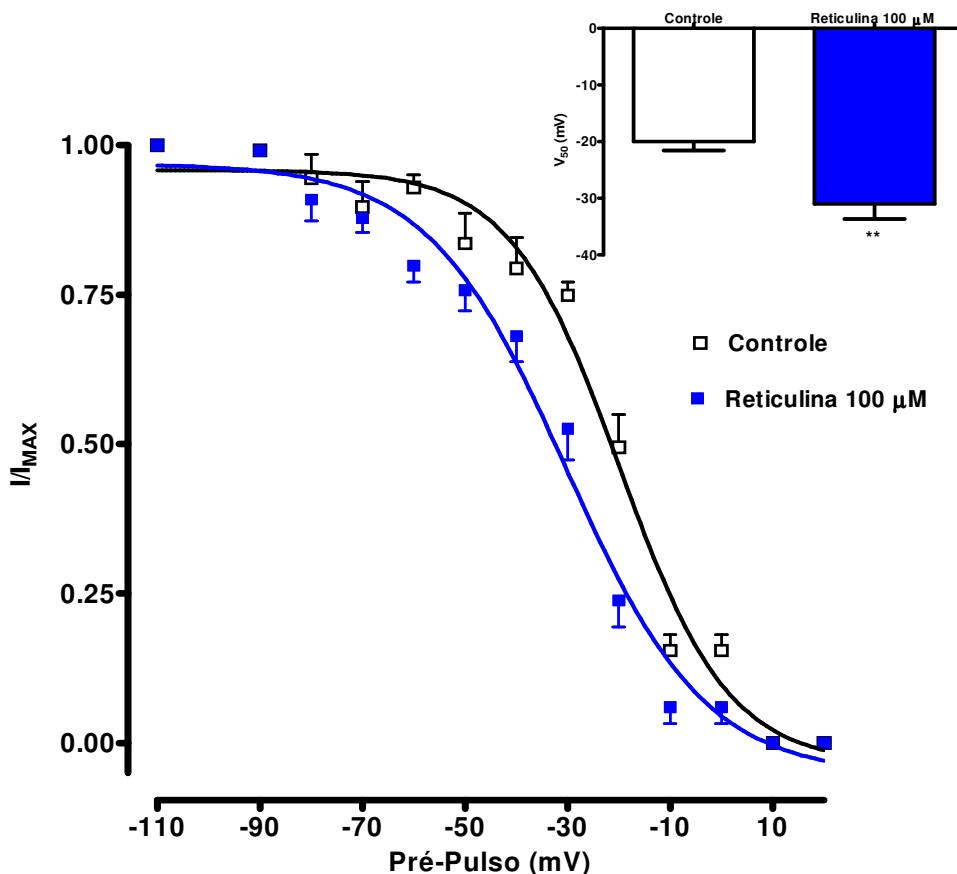


Figura 31: Efeito da reticulina (100 μ M) sobre a curva de inativação estacionária para os canais Ca_v tipo-L em células A7r5. As curvas de inativação estacionária foram obtidas usando-se o protocolo de duplo-pulso e ajustadas pela equação de Boltzmann na ausência (Controle) (◻) e na presença da curina 100 μ M (■). As amplitudes relativas das correntes de Ba^{2+} foram mostradas em função dos potenciais no pré-pulso. O gráfico de barras acima mostra o deslocamento do $V_{0,5}$ induzido por reticulina. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. ** $p < 0,01$ vs Controle, $n = 6$.

4.3.10 Participação dos nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc) no efeito da curina e da reticulina sobre as correntes de cálcio através dos Cav

Até agora, os nossos resultados indicam que curina e reticulina causaram relaxamento vascular, provavelmente por meio da inibição do influxo de Ca^{2+} diretamente pelo bloqueio dos canais para Ca^{2+} do tipo-L. No entanto, não podemos excluir, totalmente, a possibilidade de um mecanismo adicional intracelular que envolva a participação de AMPc e de GMPc que são bem relatados como moduladores dos Cav do tipo-L (SOMLYO; SOMLYO, 1994, 2000, 2003). Como curina, reticulina e papaverina são quimicamente relacionadas, além disso, papaverina induz, na musculatura lisa, vasorelaxamento pelo acúmulo de AMPc e/ou GMPc, devido à inibição de fosfodiesterases (TAYLOR; DOWNES, 1982; BILCIKOVA et al., 1987), surge, assim, a seguinte questão: será que curina e reticulina poderiam apresentar um efeito farmacológico semelhante? Desse modo, um novo conjunto de experimentos foi realizado para analisar o possível mecanismo de ação envolvido na inibição das correntes de Ca^{2+} do tipo-L por curina e reticulina em células A7r5.

Isobutilmetilxantina (IBMX), um inibidor não seletivo das fosfodiesterases, foi usado na concentração de 0,5 mM, inibindo $44,5 \pm 1,1\%$ (Figura 32, $n = 4$) da I_{Ba} . O curso temporal para IBMX incubado isoladamente e durante a co-perfusão da curina (30 μM) também é mostrado na figura 32. Quando foram usadas as concentrações máximas de 1 mM de dibutiriladenosina 3',5'-monofosfato cíclico (dbAMPc), um análogo permeável à membrana do AMPc, a inibição de I_{Ba} foi menor ($13,5 \pm 1,1\%$, figura 33, $n = 4$, $p < 0,05$) comparado com o IBMX. Também se pode verificar na figura 33, o curso temporal para dbAMPc e quando co-perfundido com curina (30 μM). Da mesma forma, quando as células foram incubadas com concentrações máximas de 1 mM de 8-bromoguanosina 3',5'-monofosfato cíclico (8-Br-GMPc), um análogo permeável à membrana do GMPc, a corrente de Ba^{2+} foi inibida por $22,8 \pm 0,3\%$ (Figura 34, $n = 4$, $p < 0,05$). No entanto, a adição da curina juntamente com 8-Br-GMPc, dbAMPc ou IBMX aumentou ainda mais o bloqueio das correntes, sugerindo que o efeito inibitório não depende de aumentos de AMPc ou GMPc.

Da mesma forma, quando foi incubado com 10 μM de forskolina (FSK), um ativador da adenilato ciclase, as correntes foram inibidas em $27,9 \pm 1,5\%$, $n = 4$

(Figura 35) e, quando co-perfundido com curina, esse bloqueio foi de $49,5 \pm 1,3\%$, $n = 4$, sugerindo que a via da adenilato ciclase não está envolvida no efeito da curina.

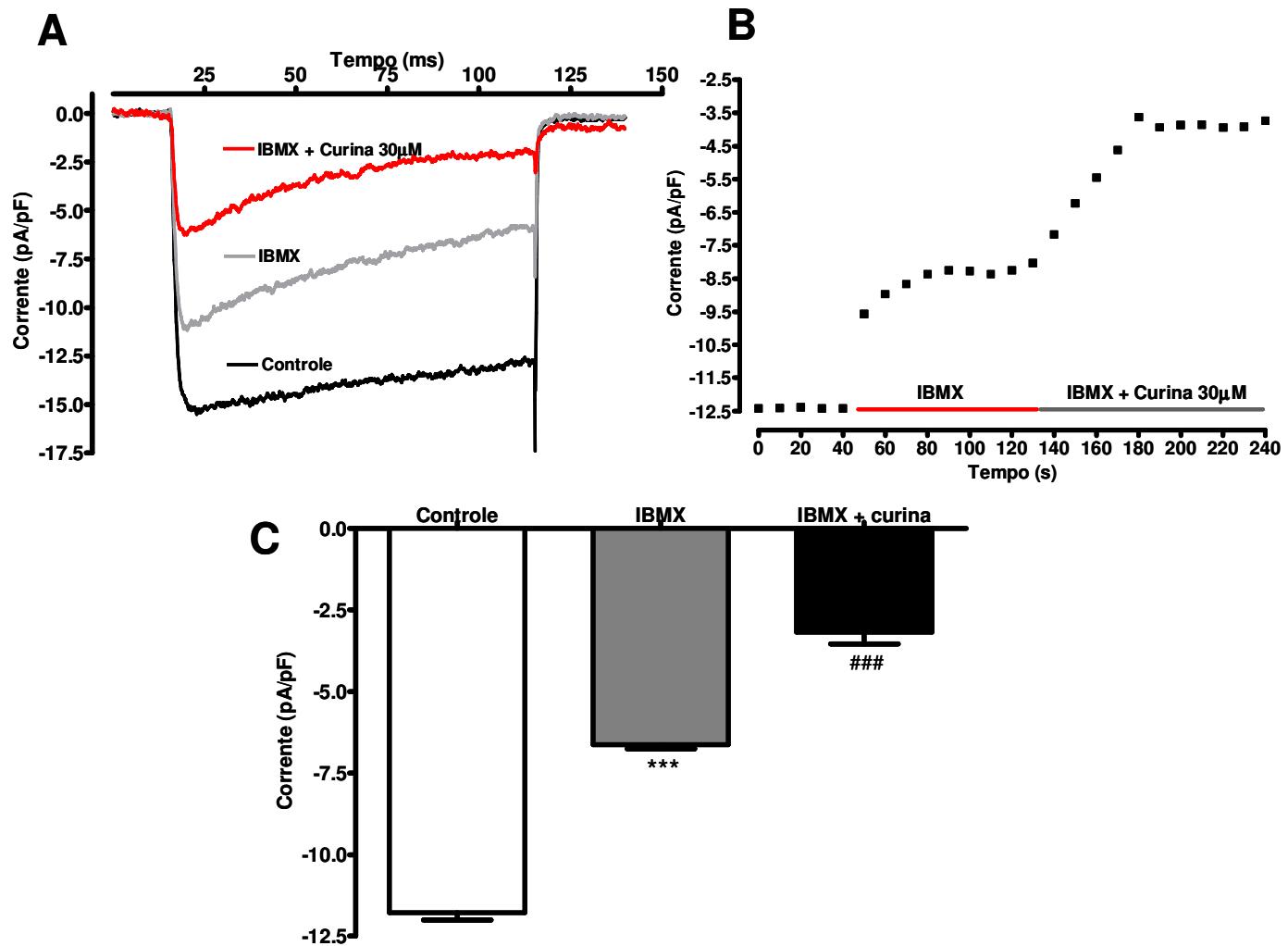


Figura 32: Comparação entre o efeito da curina (30 μ M) e de IBMX. **A**, Traçado representativo, mostrando o efeito da curina sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} , obtidas por pulsos despolarizantes para +10 mV (100 ms de duração), partindo de um potencial de “holding” de -80 mV, em células A7r5. **B**, decurso temporal do efeito da curina. **C**, Resultados mostrando o valor de pico da corrente de Ba^{2+} antes (controle), durante a aplicação de IBMX e durante a incubação de 30 μ M curina juntamente com IBMX. Os dados são expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$.

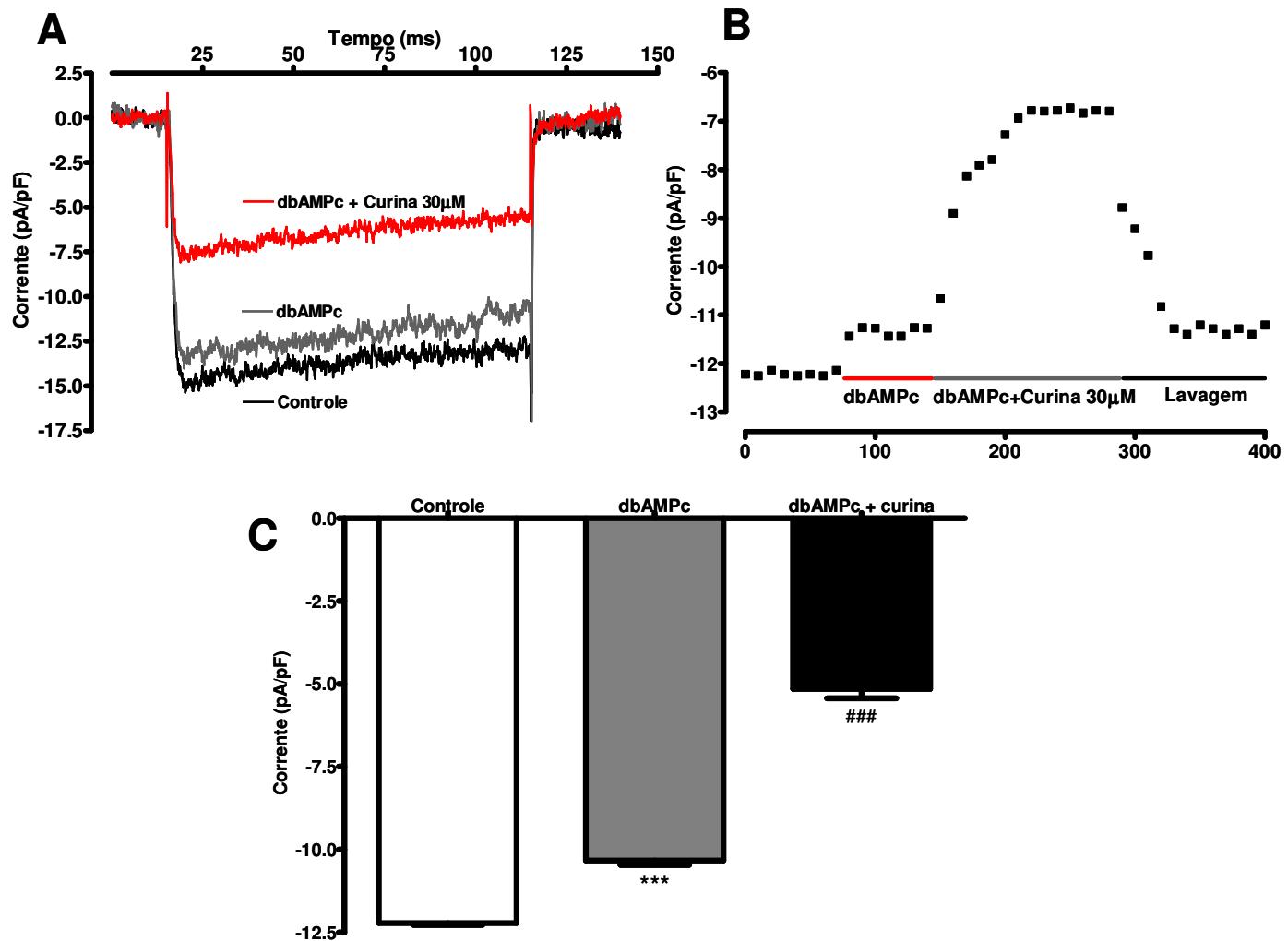


Figura 33: Comparação entre o efeito da curina (30 μ M) e de dbAMPc. **A**, Traçado representativo, mostrando o efeito da curina (30 μ M) sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} , obtidas por pulsos despolarizantes para +10 mV (100 ms de duração), partindo de um potencial de “holding” de -80 mV, em células A7r5. **B**, Decurso temporal do efeito da curina. **C**, Resultados mostrando o valor de pico da corrente de Ba^{2+} antes (controle) e durante a aplicação de dbAMPc e durante a incubação da curina juntamente com dbAMPc. Os dados são expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$.

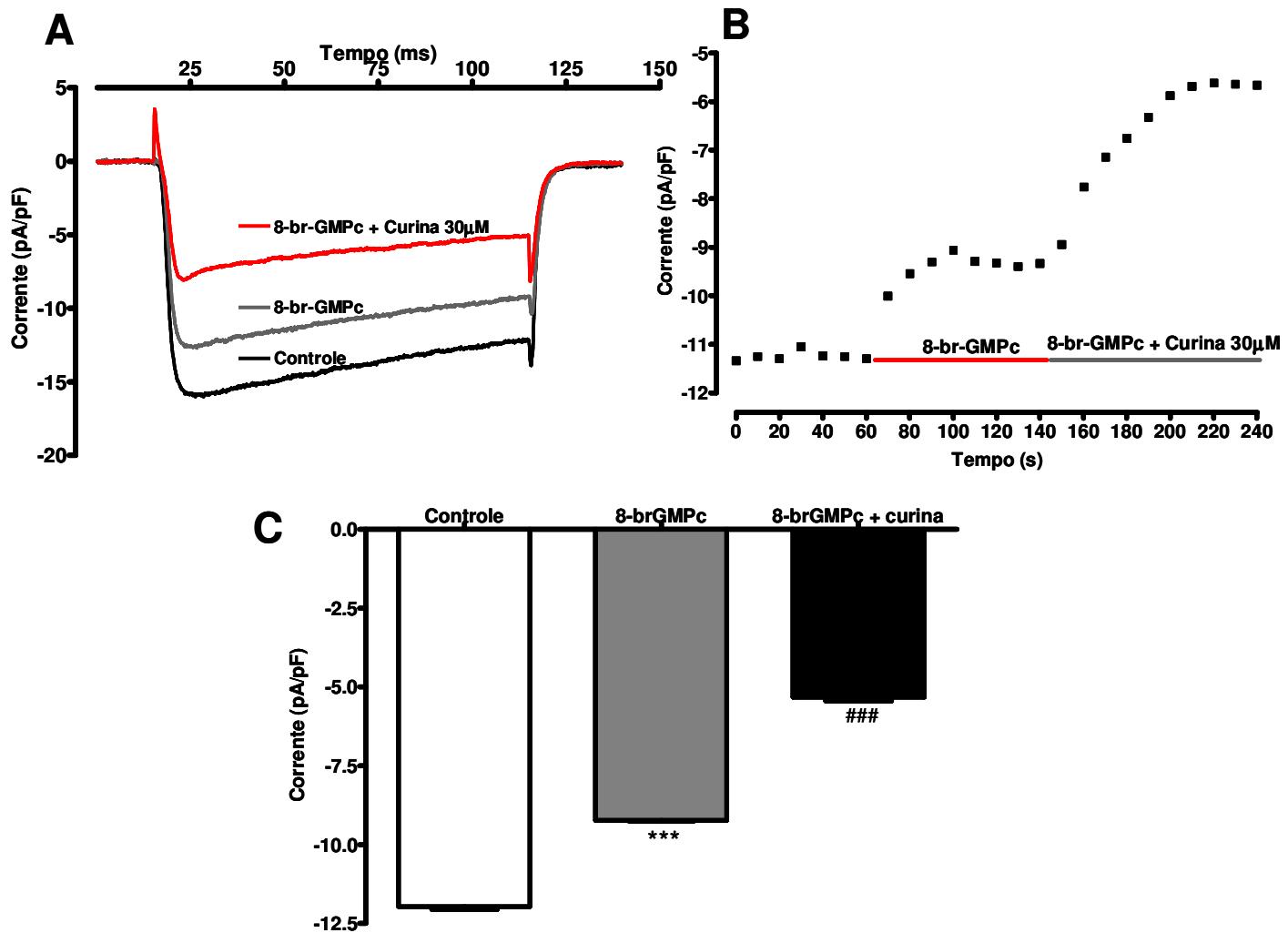


Figura 34: Comparação entre o efeito da curina (30 μ M) e de 8-brGMPc. **A**, Traçado representativo, mostrando o efeito da curina (30 μ M) sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} , obtidas por pulsos despolarizantes para +10 mV (100 ms de duração), partindo de um potencial de “holding” de -80 mV, em células A7r5. **B**, Decurso temporal do efeito da curina. **C**, Resultados mostrando o valor de pico da corrente de Ba^{2+} antes (controle) e durante a aplicação de dbAMPc e durante a incubação da curina juntamente com dbAMPc. Os dados são expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$.

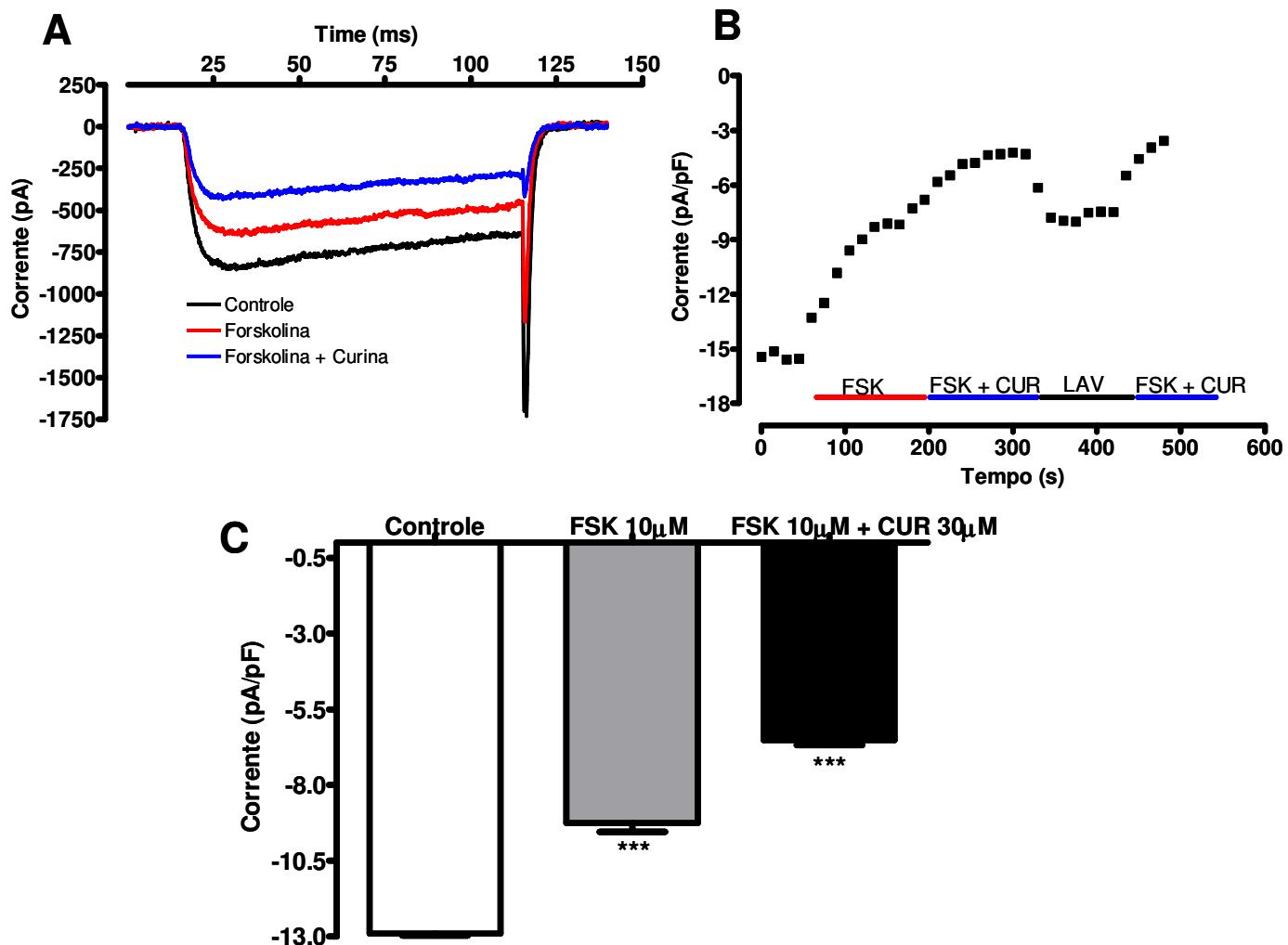


Figura 35: Comparação entre o efeito da curcuma ($30 \mu\text{M}$) e de forskolina. **A**, Traçados representativos, mostrando o efeito da curcuma sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} , obtidas por pulsos despolarizantes para $+10 \text{ mV}$ (100 ms de duração), partindo de um potencial de “holding” de -80 mV , em células A7r5. **B**, Decurso temporal do efeito da curcuma. **C**, Resultados mostrando o valor de pico da corrente de Ba^{2+} antes (controle) e durante a aplicação de forskolina e durante a incubação da curcuma juntamente com FSK. Os dados são expressos como média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$.

Resultados semelhantes foram obtidos com reticulina, quando adicionado juntamente com 8-Br-GMPc, dbAMPc ou IBMX sobre as correntes de Ca^{2+} (Figura 36). O efeito da reticulina na presença desses moduladores não foi modificado, comparado com o efeito da reticulina sozinho, sugerindo que o efeito inibitório da reticulina não depende de aumentos de AMPc ou GMPc.

Para ter uma melhor compreensão do efeito inibitório da reticulina nas correntes de Ca^{2+} do tipo-L, sobre o efeito de AMPc, foi aplicado na solução de banho um ativador de adenilato ciclase, a forskolina. Quando forskolina (na ausência da reticulina) foi aplicada em vários concentrações (1, 10, e 100 μM), o bloqueio das correntes de Ca^{2+} do tipo-L foi dependente da concentração de forskolina (Figura 37, barras pretas). A exposição da reticulina (barras cinzas, 30 μM), juntamente com forskolina causou um aumento adicional no efeito inibitório, exibido por forskolina sozinho, sugerindo que o efeito da reticulina é independente da adenilato ciclase.

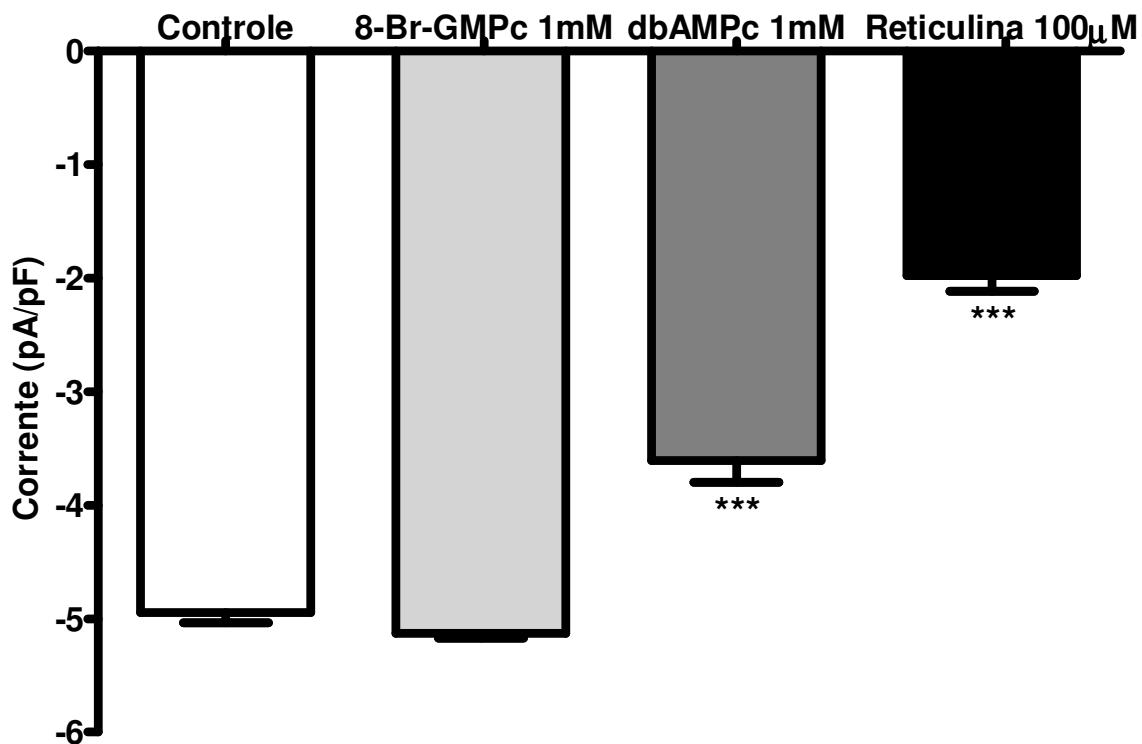


Figura 36: Comparação entre o efeito da reticulina (100 μM), e dos compostos dbAMPc e 8-Br-GMPc. As células A7r5 foram mantidas em potencial de holding -80 mV, e estimuladas por pulsos despolarizantes para 10 mV (100 ms de duração), aplicados a 0,1 Hz. Cada célula foi exposta a diferentes substâncias (dbAMPc, 8-Br-GMPc, e reticulina). Os dados são expressos como a média \pm e.p.m. *** $p < 0,001$.

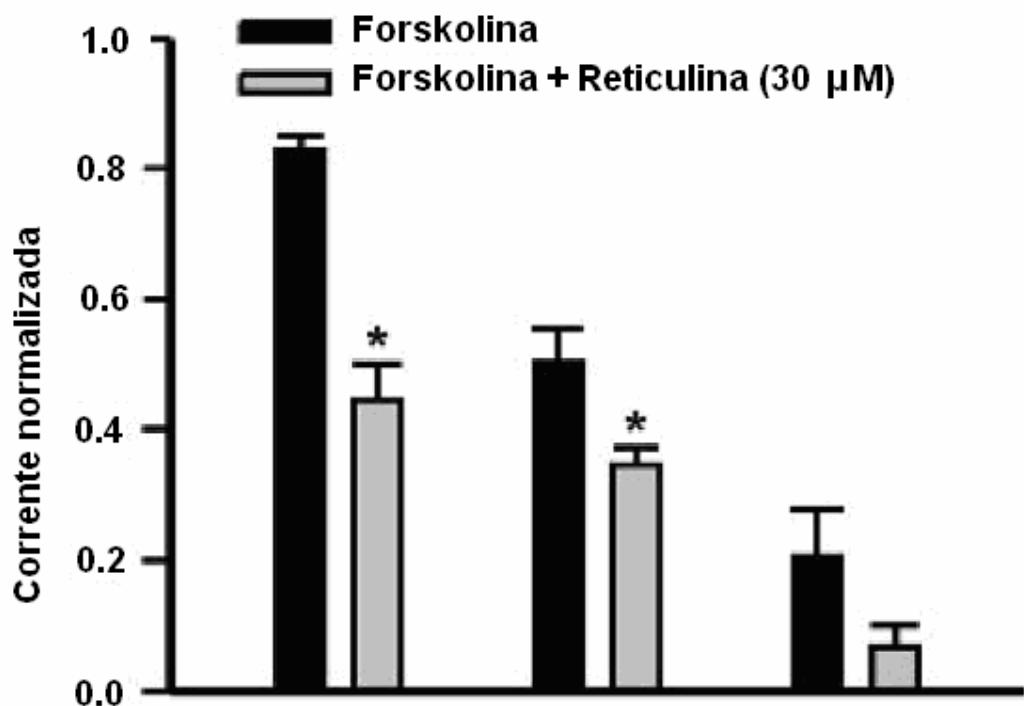


Figura 37: Comparação do efeito de forskolina (controle) sobre as correntes normalizadas na ausência e presença da reticulina (30 μ M). Barras pretas representam forskolina aplicada isoladamente nas concentrações de 1, 10, e 100 μ M. As barras cinzas representam o efeito de forskolina nas mesmas concentrações, incubada juntamente com reticulina. Os dados são expressos como a média \pm e.p.m.
* $p < 0,05$.

4.4 Estudo da curina sobre a concentração de cálcio intracelular em células A7r5

4.4.1 Efeito da curina no transiente de Ca²⁺ intracelular em células A7r5 estimuladas pelo KCl

Foi avaliada a influência da curina no transiente de Ca²⁺, em células A7r5, no qual foi utilizada a técnica da microscopia confocal. As células foram previamente estimuladas com 60 mM de KCl, adicionado a solução de perfusão antes da exposição à curina. O KCl aumentou, significativamente, os níveis intracelulares de Ca²⁺, Figura 38, aumentando, assim, a razão de fluorescências nas células A7r5 para ($4,236 \pm 0,011$; n = 27), quando comparados aos valores de fluorescência basais. A adição da curina (30 μ M), juntamente com KCl (60 mM) à solução de perfusão celular, foi capaz de reduzir, significativamente, a razão de fluorescência para ($2,531 \pm 0,025$; n = 27, $p<0,001$), confirmando nossa hipótese de que curina esteja diminuindo o influxo de Ca²⁺ através dos Ca_v tipo-L, figura 39.

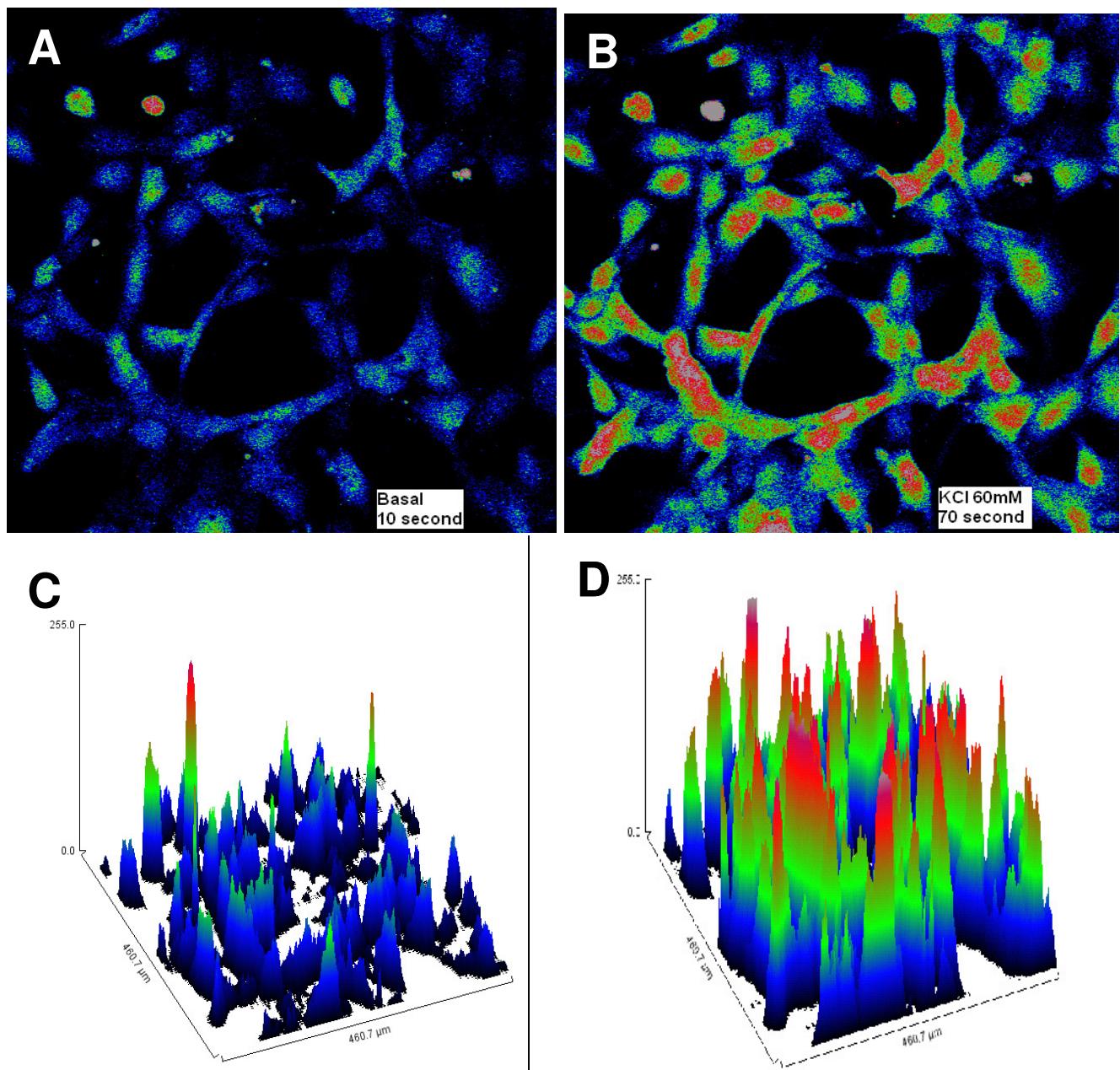


Figura 38: Influência do KCl sobre o aumento do Ca^{2+} citosólico em miócitos de aorta de rato (A7r5). **A**, Imagem dos miócitos de aorta de rato carregados com Fluo-4/AM, antes (Controle). **B**, durante a estimulação com KCl (60 mM). **C**, histograma mostrando as alterações nas intensidades de fluorescência, que foram normalizadas pela fluorescência mínima, segundo a equação $DF(\%) = (F-F_0/F_0) * 100$, onde F é a fluorescência teste e F_0 fluorescência mínima na situação basal. **D**, e induzidas por KCl (60 mM).

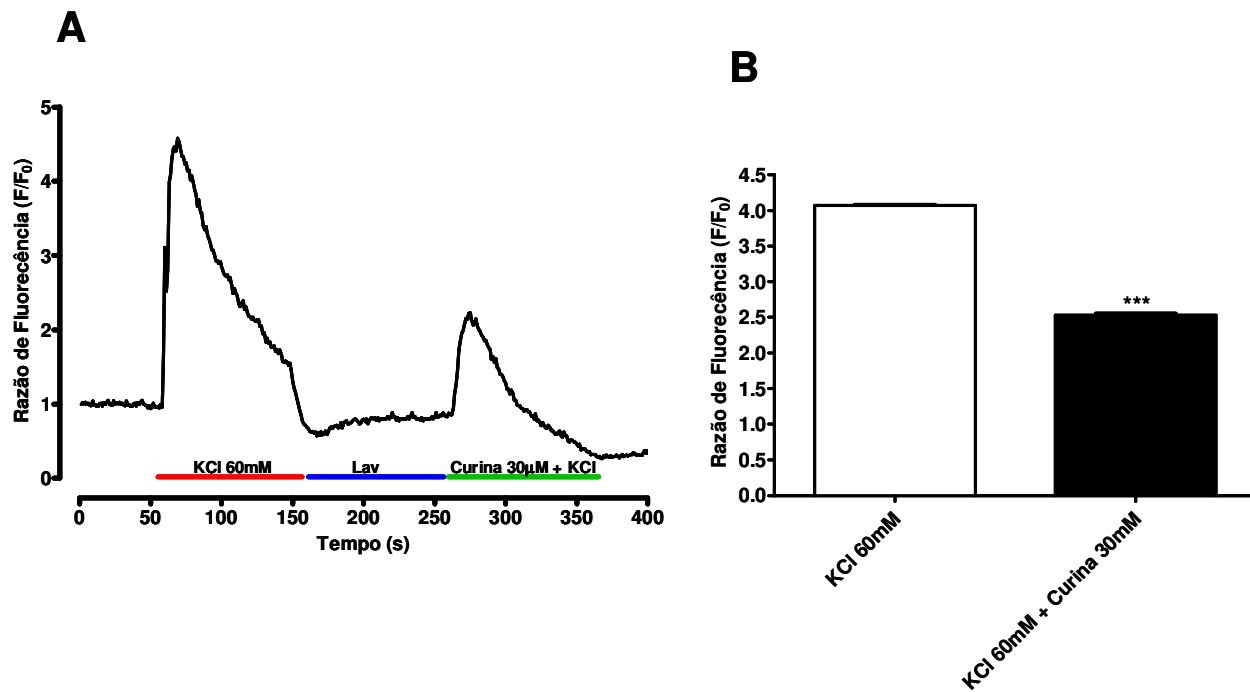


Figura 39: Efeito da curcuma sobre o aumento de Ca^{2+} citosólico induzido por KCl, em células A7r5. **A**, registro original representativo, mostrando o efeito da curcuma (30 μ M) sobre o aumento de intensidade de fluorescência ao Ca^{2+} , induzida por KCl (60 mM), em células A7r5, carregado com Fluo-4/AM. **B**, gráfico de barras mostrando o aumento na intensidade de fluorescência ao Ca^{2+} , que foram normalizadas pela fluorescência mínima, segundo a equação $DF(\%) = (F - F_0)/F_0 * 100$ onde F é a fluorescência teste e F_0 fluorescência mínima, induzido por KCl na ausência e presença da curcuma. Os dados são expressos como a média \pm e.p.m. ***p<0,001.

4.5 Estudo da atividade citóxica da curina e da reticulina sobre células da linhagem A7r5

4.5.1 Efeito da curina e da reticulina sobre a linhagem A7r5

As Figuras 40 e 41 mostram o efeito sobre a viabilidade celular da curina e da reticulina, respectivamente, em células A7r5, avaliadas pelo método de MTT, no período de 24 horas. Neste ensaio foi possível observar que a curina (Figura 40) diminuiu a viabilidade desta cultura a partir da concentração de 30 μ M, apresentando IC_{50} de $39 \pm 12 \mu$ M. Já a reticulina diminuiu o número de células viáveis somente a partir da concentração de 100 μ M (Figura 41).

O efeito inibitório sobre a viabilidade da cultura de células A7r5 na concentração de 300 μ M no ensaio de MTT foi cerca de 70% para curina e de 20% para reticulina.

Esse resultado tem como objetivo tentar estender uma faixa de concentração, não tóxica, que possamos utilizá-las com segurança, sem causar danos à membrana biológica das células A7r5, para que não possa mascarar nossos resultados.

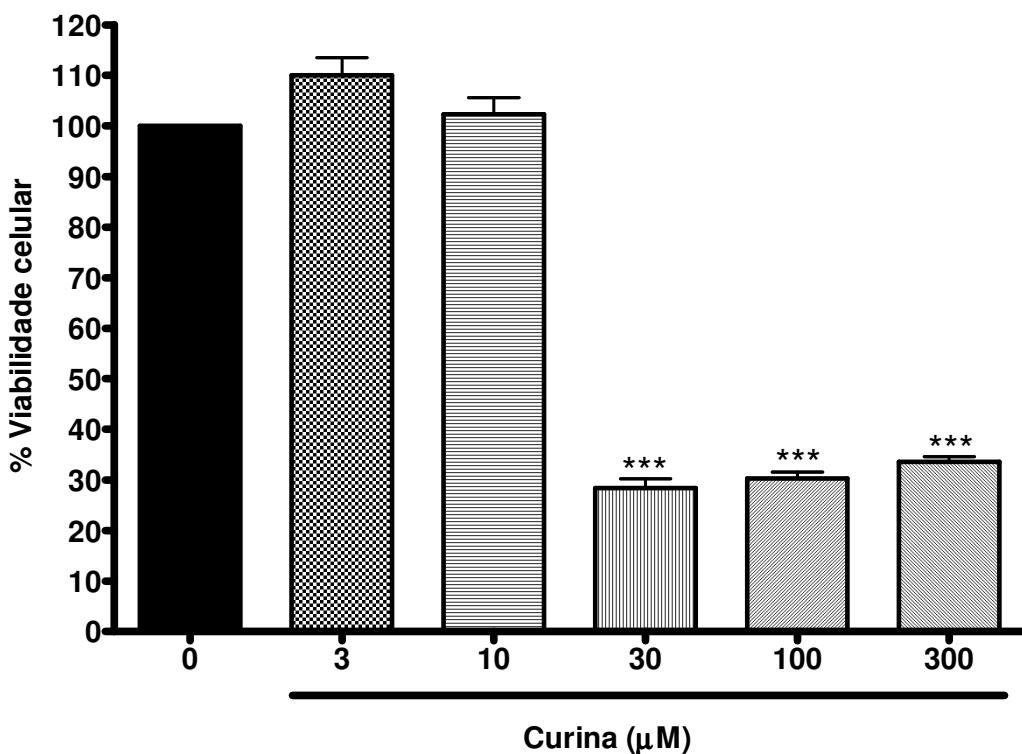


Figura 40: Efeito da curcuma sobre a viabilidade de células A7r5 em cultura por um período de 24 horas, analisado com o MTT. Os dados mostram valores médios de três experimentos em triplicata e são expressos como média ± e.p.m. ***p< 0,0001.

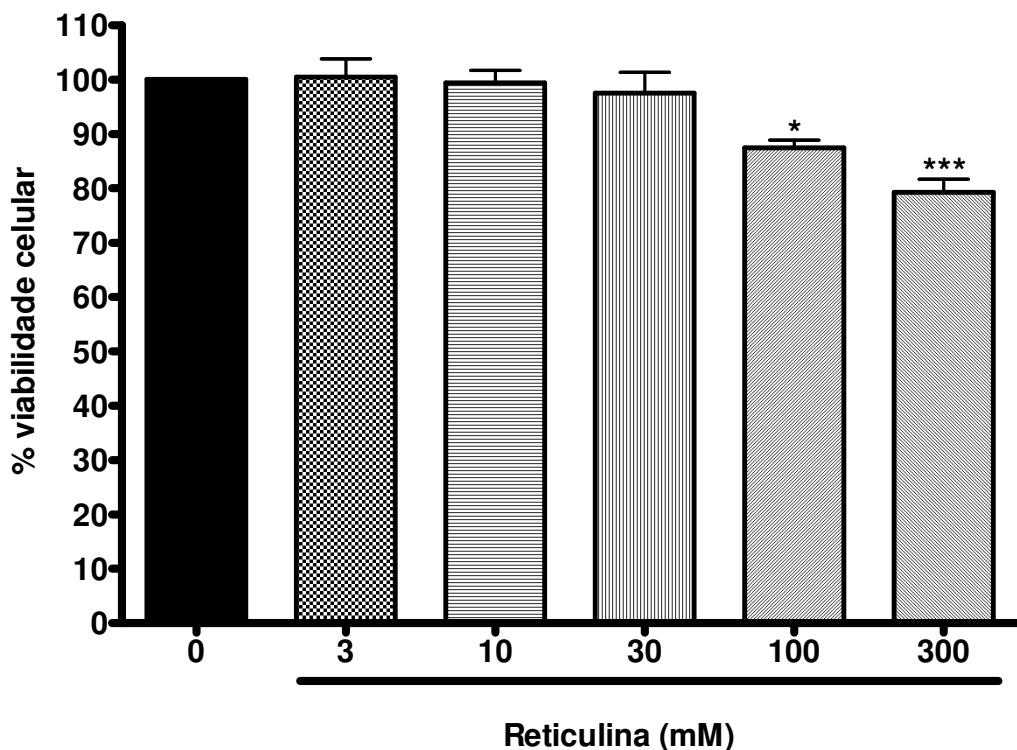


Figura 41: Efeito da reticulina sobre a viabilidade de células A7r5 em cultura por um período de 24 horas, analisado com o MTT. Os dados mostram valores médios de três experimentos em triplicata e são expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Vários produtos naturais foram incluídos com sucesso na clínica para o tratamento de várias doenças. Nos estudos com câncer e doenças infecciosas, cerca de 60 a 75% das novas drogas descobertas, são de origem natural. Além disso, nos estudos imunológicos, a descoberta da ciclosporina, também de origem natural, levou ao desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras como rapamicina e FK-506, que são importantes na terapêutica de transplante de órgãos (GULLO; HUGHES, 2005).

Bloqueadores de canais para cálcio estão entre as drogas cardiovasculares mais frequentemente prescritas (MIRKHANI et al., 2005). Uma vez que, em nível funcional, os alcalóides, curina e reticulina, apresentaram efeito vasorelaxante, sugerindo um possível bloqueio sobre os Ca_v do tipo L em aorta de rato (DIAS, 2002; DIAS et al., 2002). É de fundamental importância a elucidação dos mecanismos pelos quais esses alcalóides estão atuando, para uma posterior abordagem terapêutica dessas substâncias.

A classe dos alcalóides bisbenzilisoquinolínicos constitui uma das mais numerosas do sub-grupo dos alcalóides derivados do núcleo benzilisoquinolínico. Mais de 400 substâncias diferentes já foram descritas na literatura. Esses alcalóides são formados por dois resíduos benzilisoquinolínicos conectados um ao outro, por uma, duas ou três pontes, ou diretamente interligados por carbono-carbono. Estes compostos se diferenciam pela natureza dos seus substituintes oxigenados (OH, OCH_3 , OCH_2O), natureza de substituição nos átomos de nitrogênio (NH, NCH_3 , $^+NCH_3$ (2), NO), graus de insaturação dos anéis, e estereoquímica de seus centros assimétricos, que conferem inúmeras variações quanto às suas atividades farmacológicas (GUNHA et al., 1979; PACHALY, 1990). Uma das principais atividades farmacológicas dos alcalóides desse grupo é a capacidade de alguns deles bloquear a atividade neuromuscular, por meio de bloqueio da ação da acetilcolina, causando paralisia muscular. Além de alguns alcalóides bisbenzilisoquinolínicos terem demonstrado ação espasmolítica, devido ao antagonismo exercido principalmente sobre os VGCC (IVORRA et al., 1993). Por isso nosso interesse em investigar os mecanismos eletrofisiológicos em nível celular

envolvidos nesse efeito promovido por estes metabólitos secundários, curina e reticulina.

Antes da aprovação de qualquer novo composto para testes em seres humanos, são efetuados ensaios de toxicidade extensos em sistemas *in vitro* e *in vivo* em diversas espécies animais. Essas técnicas de bioensaio vão avaliar e definir a concentração de uma substância que seja capaz de produzir uma resposta biológica. Um dos tipos de medida de toxicidade é a DL_{50} (dose letal para 50% do grupo de animais), outro tipo de avaliação de toxicidade é a CI_{50} (concentração inibitória média capaz de inibir 50% do efeito máximo), cuja substância é adicionada *in vitro*, num amplo espectro de concentrações, para que forneça uma faixa de inibição da viabilidade de 0 a 100%. Assim, a ligação das substâncias aos seus receptores em células e tecidos pode ser medida diretamente e plotada como uma curva concentração-resposta (RANG et al., 2004).

Citotoxicidade é considerada, primariamente, como o potencial de um composto induzir morte celular. Testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, isto é, a habilidade intrínseca de um composto causar morte celular como consequência de danos às funções básicas celulares (EISENBRAND et al., 2002).

A técnica de MTT foi escolhida por ser bastante utilizada em ensaios de viabilidade celular, sendo capaz de detectar diferentes tipos de danos na célula. O MTT é endocitado, sendo convertido por células metabolicamente ativas em formazan, um composto azul insolúvel (LIU et al., 1997). Esse sal tem sido usado com sucesso, para verificar a capacidade de redução de enzimas celulares e a viabilidade (MOSMANN, 1983; FAHEINA, 2006; KIM et al., 2009). Apesar desse teste não identificar o mecanismo de ação dos compostos testados, ele revela substâncias que tenham potencial citotóxico.

Os resultados de citotoxicidade basal com a linhagem A7r5 demonstraram que a reticulina causou baixo efeito citotóxico, detectado pela técnica de MTT, causando uma redução da viabilidade celular só nas maiores concentrações testadas (100 e 300 μ M). Já a atividade citotóxica promovida pela curina foi bem mais pronunciada, sendo observada a partir da concentração de 30 μ M.

O balanço entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de uma substância é um parâmetro importante, quando se quer verificar a aplicabilidade farmacológica

desta (ANAZETTI et al., 2003). Nossos dados ainda são um tanto preliminares, sendo necessários outros ensaios de citotoxicidade para determinar o mecanismo da diminuição da viabilidade celular, sem contar, também, que o tempo de incubação foi bem maior que nos testes em níveis funcionais.

A literatura descreve três diferentes formas de alterações nas concentrações de Ca^{2+} intracelular em músculo liso: Primeiro, o aumento nos níveis de Ca^{2+} por todo o citoplasma, chamado de aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ global; segundo, o mecanismo de aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em forma de ondas propagáveis, chamadas de ondas de Ca^{2+} , resultantes da liberação de Ca^{2+} dos estoques sensíveis a IP_3 e/ou rianodina (LEDOUX, et al., 2006; BOITTIN et al., 1999), e terceiro, aumento transiente de Ca^{2+} , altamente localizado espacialmente e temporalmente, chamado de “sparks” de Ca^{2+} (JAGGAR et al., 2000).

O cálcio é um segundo mensageiro fundamental em todas as células eucarióticas. A dinâmica da concentração intracelular de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), é a principal causa para o início e término da contração em todos os tipos de células musculares. Nas células musculares lisas, o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e a sua ligação à calmodulina levam à ativação da quinase da cadeia leve de miosina, fosforilando essas cadeias, causando a ativação da contração (SOMLYO; SOMLYO 1994, 2000; WRAY 1993; WRAY et al. 2001). Para ativar a contração vascular, o $[\text{Ca}^{2+}]_i$ deve aumentar globalmente em todo o citoplasma acima do nível basal (SZAL et al. 1994; PHILLIPPE; CHIEN 1998). A principal fonte de cálcio do músculo liso é o meio extracelular (SHMIGOL et al. 1998; WRAY et al. 2001). O cálcio entra nos compartimentos citoplasmáticos durante a despolarização da membrana ou devido à estimulação por agonistas que interajam em receptores específicos. Neste último caso, a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático pode ser o mecanismo predominante da elevação $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que, muitas vezes, precede a entrada de cálcio por meio da ativação dos canais para cálcio na superfície da membrana celular.

Conforme mostrado na Figura 13, a curina relaxou de forma dependente de concentração e independente do endotélio funcional a aorta de rato pré-contraída com fenilefrina e, da mesma forma, também relaxou a aorta pré-contraída com KCl (Figura 14). Independentemente do mecanismo de contração a ser executada por agentes farmacológicos ou eletromecânicos, a manutenção do componente tônico envolve ativação de canais Ca_V (REMBOLD, 1996). Portanto, podemos sugerir que curina possa estar agindo por inibir o influxo Ca^{2+} através desses canais,

para produção de um efeito espasmolítico não-seletivo. Essa hipótese foi corroborada com a inibição do influxo de Ca^{2+} através de canais Ca_V , uma vez que curina antagonizou, de maneira dependente de concentração, as contrações tônicas induzidas por S (-) BAY-K-8644, um bem caracterizado ativador dos canais para Ca^{2+} tipo-L (Figura 16).

A reticulina tem demonstrado reduzir a frequência cardíaca e a pressão arterial em ratos normotensos, relaxou o orgão pré-contraído com fenilefrina e KCl, em anéis aórticos de rato, e por antagonizar as contrações induzidas Ca^{2+} (DIAS et al., 2004). Esses resultados nos levaram a sugerir que os efeitos cardiovasculares da reticulina foram devidos, principalmente, ao bloqueio do influxo de Ca^{2+} , provavelmente através dos canais para Ca_V do tipo-L, embora esses dados não forneçam qualquer prova direta para essa conclusão. Além disso, Dias et al. (2004) também observaram que a reticulina relaxa o músculo liso, provavelmente por um mecanismo envolvendo a inibição da liberação de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, induzida por norepinefrina. Em conjunto, estes resultados indicaram que reticulina modulava o influxo de Ca^{2+} direta ou indiretamente.

A fim de verificar se existe um efeito direto da reticulina sobre as correntes de Ca^{2+} do tipo-L, estudamos este possível mecanismo, usando a técnica de “patch-clamp” em células de aorta de rato (A7r5), para tentar compreender o efeito vasorelaxante promovido por reticulina. Como é bem conhecido que existe variação de um lote para outro, quando se tenta isolar quimicamente os compostos naturais bioativos, decidimos, como primeiro objetivo, reproduzir os resultados publicados anteriormente por Dias et al. (2004).

Neste estudo foram utilizadas preparações de anéis de aorta de rato sem endotélio, em meio livre de Ca^{2+} e com alto K^+ . Assim, a membrana celular do músculo liso da aorta foi despolarizada e os canais para Ca^{2+} , dependentes de voltagem, foram supostamente ativados, mas sem promover contração, devido à ausência de Ca^{2+} extracelular. A adição de Ca^{2+} produziu contração sustentada, proveniente do influxo de Ca^{2+} . A pré-incubação com reticulina provocou, de maneira dependente de concentração, a antagonização da contração induzida por Ca^{2+} , o que implica que a reticulina, provavelmente, bloqueou o influxo de Ca^{2+} . É interessante notar que o antagonismo foi, de algum modo, misto, porque houve um deslocamento paralelo para a direita e diminuição da resposta máxima (pelo menos

para 300 μM da reticulina, ver Figura 15). Para tentar esclarecer melhor esse resultado, novos experimentos foram executados. Adicionalmente, confirmou-se que reticulina causa vasorelaxamento, provavelmente devido à inibição de VGCC de forma dependente de concentração, como relatado anteriormente por Dias et al. (2004), mas mostrou-se muito menos potente (~ 5 ordens de grandeza) que nicardipina, um bloqueador específico dos canais para Ca^{2+} do tipo-L, nas mesmas condições (Figura 14). Os nossos resultados, desse modo, apoiam os estudos anteriores (DIAS et al., 2004). Assim, parece que o vasorelaxamento provocado por reticulina foi, pelo menos em parte, mediado por bloqueio dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem.

Em músculo liso vascular, a contração requer um substancial aumento do $[\text{Ca}^{2+}]_i$, um processo que está relacionado com várias vias de sinalização diferentes. Neste cenário, os canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem são a principal via de entrada de Ca^{2+} nas células musculares lisas vasculares (BOLTON, 1979; NEILD; KOTE-CHA, 1987; NELSON et al., 1988) e desempenham um papel essencial na contração sustentada (BOLTON, 1979). Em consonância com este raciocínio, as drogas que bloqueiam os canais para Ca^{2+} têm sido utilizadas clinicamente para o tratamento de uma série de disfunções cardiovasculares, por exemplo, verapamil (JIM et al., 1981) e nifedipina (KOCHEGAROV, 2003), que envolve uma alteração na dinâmica do controle da $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Em células da linhagem A7r5, derivadas da aorta torácica de rato, as correntes de entrada de Ca^{2+} ocorrem principalmente por causa do influxo através dos canais para Ca^{2+} , dependentes de voltagem, como evidenciado pelo completo bloqueio induzido por Cd^{2+} (Figura 17B e ULLRICH et al., 2007). Tem sido relatado que células A7r5 expressam canais para Ca^{2+} do tipo-L e do tipo-T (HALL et al., 2006). Nas nossas condições experimentais, nicardipina (10 μM), um bloqueador seletivo dos canais para Ca^{2+} , dependentes de voltagem do tipo-L, aboliu quase que totalmente as correntes de entrada de Ba^{2+} (Figura 17D), sugerindo que as correntes nas células A7r5 são geradas, principalmente, pelos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo-L como descrito por Medeiros et al. (2009).

Para descartar as eventuais inadequações em termos de trabalhado com células em cultura e não com células recém-dispersas (alguns autores sugerem que as células em cultura modificam sua expressão de proteínas e, consequentemente,

a expressão dos canais iônicos), nós também testamos em modelos eletrofisiológicos a curina e a reticulina utilizando células recém-dispersas de aorta de rato. Tanto a curina como a reticulina, inibiram as correntes de Ba^{2+} através dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo-L em células recém-dispersas (Figura 21 e 22), com isso, passaremos a utilizar as células A7r5 para os demais experimentos, já que os alcalóides apresentaram efeito inibitório tanto nas células recém-dispersas com nas células em cultura.

Com o intuito de verificar se curina e reticulina realmente estavam atuando nos Ca_V do tipo-L, foram feitos registros na configuração de “whole-cell”, onde se verificou, que a inibição das I_{Ba} promovida por reticulina, em células A7r5, era de forma dependente de concentração (Figura 23). Na remoção da reticulina, a corrente não foi recuperada para os níveis de correntes observados no controle, sugerindo que reticulina tem um desligamento mais lento do seu sítio de ligação, não podemos excluir a possibilidade da reticulina, devido à sua alta hidrofobicidade, visto que esta pode não ter sido efetivamente removida na lavagem. Verificamos que o decaimento parcial da corrente durante a despolarização foi, provavelmente, devido à inativação dos canais para Ca^{2+} do tipo-L, mas não houve alteração na fração de inativação na presença da reticulina, indicando que o bloqueio das correntes pode ser considerado como correntes de Ca^{2+} do tipo-L. A subtração digital ponto a ponto do registro de corrente da reticulina mostrou-se sugestiva de que o curso-temporal do componente corrente sensível à reticulina é semelhante ao componente da corrente sensível à nicardipina das correntes de Ca^{2+} tipo-L (dados não mostrados, ver Figura 2D, MEDEIROS et al., 2009).

Da mesma forma, curina inibiu as I_{Ba} em células A7r5, mostrando uma dependência de concentração característica do seu efeito (Figura 23). Mas, ao contrário da reticulina, a inibição das correntes promovida por curina foi capaz de recuperar as correntes para os níveis do controle.

O presente estudo mostra que a potência da reticulina para relaxar anéis aórticos pré-contraídos com KCl é estatisticamente diferente daquela para a redução das correntes Ca^{2+} , nas células musculares lisas vasculares (280 μM versos 40 μM ; ver Figuras 13 e 23 para a comparação). À primeira vista, este resultado indica que os valores Cl_{50} da reticulina obtidos nas preparações multicelulares não correspondem diretamente à sua potência, para a interação com os canais para

Ca^{2+} . Uma razão para esta diferença pode estar relacionada com a difusão da molécula através do tecido intacto.

No entanto, os valores de Cl_{50} para nicardipina foram ~ 17 vezes maiores na célula A7r5 (~ 55 nM) em comparação com o observado nos experimentos multicelulares ($\sim 3,2$ nM). Esta observação não é surpreendente, uma vez que a capacidade das dihidropiridinas para bloquear os canais para Ca^{2+} do tipo-L é dependente de voltagem e que a ligação tem forte preferência para o estado inativado do canal (SNUTCH et al., 2005). Como o tecido intacto foi despolarizado com KCl (80 mM), que despolariza o potencial de membrana próximo de -17 mV (estimada pela equação Nernst, assumindo como 150 mM a concentração intracelular de K^+), isto poderia facilitar a ligação da nicardipina. No entanto, reticulina parece ter um mecanismo de bloqueio diferente da nicardipina, já que ela se liga à preparação multicelular (~ 280 μM) de forma menos rígido, em comparação com as células isoladas (~ 40 μM).

Para investigarmos o mecanismo pelo qual curina e reticulina atenuam as correntes de Ba^{2+} em miócitos vasculares, resolvemos analisar se os alcalóides alterariam a cinética de ativação e inativação, dependente de voltagem dos canais Ca_v tipo-L.

A cinética de ativação desses canais foi avaliada pela curva de ativação estacionária, obtida a partir dos valores de condutância em função dos potenciais testes e ajustada segundo a equação de Boltzmann, como descrito anteriormente. Nestes experimentos, observamos para ambos os alcalóides, curina e reticulina, que a curva de ativação estacionária não foi significativamente deslocada, sugerindo que curina e reticulina não alteram o estado de ativação dos canais Ca_v tipo-L.

Também avaliamos a cinética de inativação dos canais Ca_v tipo-L, a partir do protocolo de duplo-pulso, descrito inicialmente por Hodgkin; Huxley (1952), para medir a dependência de voltagem da inativação, no estado estacionário dos canais sensíveis à voltagem. Esse protocolo caracteriza-se por estimular os canais com pré-pulsos condicionantes, com voltagens variáveis, por um período de tempo suficientemente longo para permitir o processo de inativação, ao alcançar seu nível de estado estacionário. O segundo pulso de voltagem, chamado pulso teste, é dado para um valor fixo de voltagem, na qual se observa transiente de correntes de Ba^{2+} . Os valores de amplitude de corrente relativa, obtidos nos pulsos testes, foram

usados para determinar a fração de canais que não foram inativados pelo pré-pulso condicionante.

A curva de inativação estacionária para curina e reticulina foi deslocada para potenciais de membrana mais negativos (Figura 30 e 31). Esses resultados mostraram que curina e reticulina podem manter os canais para Ca^{2+} mais tempo no estado inativo. Conclusões semelhantes foram apresentadas por outros estudos (BEAN, 1984; FUSI et al., 2001; SANGUINETTI; KASS, 1984; UEHARA; HUME, 1985). De fato, a inibição das I_{Ba} pelos antagonistas dos canais para cálcio (por exemplo, dihidropiridinas) é conhecida por ser acompanhada por uma mudança do estado de inativação estacionária para potenciais mais negativos (SANGUINETTI E KASS, 1984; UEHARA E HUME, 1985). Esta característica foi observada para curina e para reticulina, sugerindo uma possível interação com um sítio receptor no lado externo do canal de Ca^{2+} do tipo-L.

Como foi abordado acima, o deslocamento do $V_{0,5}$ para a esquerda no estado de inativação estacionária, durante a perfusão com curina e reticulina, poderia reduzir, significativamente, as correntes, comparando-se com I_{Ba} na situação controle. As implicações fisiológicas para essas observações, em que curina e reticulina medeiam a redução dessas correntes, tornariam as células menos excitáveis.

Sabe-se que elevações nas concentrações de moduladores, tais como, monofostato de adenosina cíclico (AMPc) e monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), são capazes de causar vasodilatação no músculo liso, devido à diminuição dos níveis de Ca^{2+} intracelular. Além disso, a ativação da proteína cinase A (PKA) é capaz de fosforilar a cinase da cadeia leve de miosina, diminuindo sua afinidade pelo Ca^{2+} e contribuindo, também, para o relaxamento (REMBOLD, 1996). Adicionalmente, tem sido relatado na literatura, que o estado contrátil do músculo liso é largamente regido pela fosforilação da subunidade reguladora da cadeia leve da miosina (LC20), e que, esta, por sua vez, é regulada pela oponente atividade da cadeia leve da miosina quinase (MLCK) e miosina fosfatase, SMPP1M (SOMLYO et al., 2004). No músculo liso, tanto MLCK e SMPP1M são moduladas, permitindo, assim, controle homeostático da atividade contrátil (LINCOLN, 2007). Esse requintado controle é necessário, por causa dos papéis essenciais do músculo liso em importantes processos fisiológicos, tais como a manutenção do tônus vascular e

da pressão arterial. Na maioria dos músculos lisos, a liberação de nucleotídeos cíclicos (GMPc / AMPc), em resposta a estímulos hormonais ou neuronais, promove relaxamento, quer devido à redução da $[Ca^{2+}]_i$ ou à dessensibilização do músculo para Ca^{2+} por meio da inibição da MLCK e/ou ativando SMPP1M (LINCOLN, 2007). Assim, os efeitos inibitórios da curina e reticulina poderiam ser devido à produção de AMPc e/ou GMPc. Esse argumento está baseado no fato de que tanto a curina quanto a reticulina pertencem à mesma classe química e têm uma certa semelhança com a papaverina (principalmente a reticulina) que tem demonstrado ter uma ação inibitória sobre as fosfodiesterases, aumentando, assim, a meia-vida dos nucleotídeos cíclicos. Dessa forma, tem sido demonstrado que existe uma correlação entre o relaxamento e o aumento do conteúdo de AMPc ou GMPc, induzido pela papaverina no músculo liso vascular (KANEDA et al., 1998). A utilização de dbAMPc, que é uma forma de AMPc permeável à membrana, provoca acúmulo desse nucleotídeo no interior da célula, produzindo uma inibição das correntes de Ca^{2+} do tipo-L, como tem sido relatado (LORENZ et al., 1994). Da mesma forma, em células A7r5, o mesmo tipo de células utilizadas no presente trabalho, o mecanismo dependente de AMPc também aumentou a amplitude de I_{Ca} (KIMURA et al., 2000). Um ponto que deve ser discutido é o fato de que tanto curina como reticulina provocaram, em média, 60% de bloqueio das correntes de Ba^{2+} , a concentração supra-máxima de dbAMPc, apesar do efeito inibitório ter ocorrido em menor escala (~ 25%). O que levanta a seguinte questão: será que curina e reticulina inibem os canais para Ca^{2+} do tipo-L, exclusivamente por um mecanismo que depende do AMPc intracelular? Lorenz et al. (1994) relataram que o grau de inibição das I_{Ba} por 8-BrAMPc foi de, aproximadamente, 50%, com 15 min., resultado maior que o nosso que inibiu cerca de 25%. A razão para essa discrepância não é aparente, mas pode estar relacionada com o produto/forma química, e com a concentração e/ou permeabilidade da membrana aos derivativos de AMPc utilizados em nossos experimentos. Corroborando com estes resultados, percebemos que a curina e a reticulina apresentavam um efeito inibitório adicional sobre correntes Ba^{2+} em células pré-expostas a diferentes concentrações de forskolina, sugerindo que curina e reticulina estão agindo através de um mecanismo diferente da via do AMPc.

Iguchi et al. (1992) forneceram evidências de que papaverina, um composto químico relacionado, inibiu a I_{Ba} , de uma forma independente do AMPc intracelular. Neste ponto, é razoável pensar que curina e reticulina podem ter um efeito direto

sobre os canais para Ca^{2+} nas células musculares lisas vasculares, mas nós não podemos descartar completamente a possibilidade de que a curina e a reticulina, pelo menos em parte, bloqueiam os canais para Ca^{2+} do tipo-L por meio de um mecanismo que depende de AMPc intracelular (Figura 33 e 36).

A geração de GMPc é aceita como um importante segundo mensageiro no controle da atividade do músculo liso vascular, e também tem sido demonstrada a participação nos efeitos vasorelaxantes mediados por NO (MONCADA et al., 1991). É sabido que os níveis de GMPc influenciam a homeostase do cálcio no músculo liso vascular. Assim, para elucidar se o efeito vasorelaxante produzido por curina e reticulina poderia, também, ser resultado de um processo dependente de GMPc, nós fizemos, igualmente, experimentos com 8-BrcGMP, um análogo solúvel do GMPc. Blatter; Wier (1994) forneceram provas diretas em células A7r5, que, quando expostas a GMPc, diminuiam a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e bloqueavam as correntes através dos VGCC, usando indicadores de Ca^{2+} fluorescentes e registros de corrente em "whole-cell". Do mesmo modo, Ishikawa et al. (1993) e Lorenz et al. (1994) mostraram que 8-BrcGMP inibiram VGCC em células A7r5. Nossos resultados estão de acordo com os estudos precedentes que sugerem um efeito inibitório da proteína quinase, dependente de GMPc, sobre I_{Ba} , em células A7r5. Da mesma forma, como nos resultados anteriores para o AMPc, o efeito da curina e reticulina sobre as correntes de Ba^{2+} parece não depender dos níveis de GMPc intracelular (Figura 34 e 36).

Para melhor evidenciar o mecanismo molecular apresentado por curina em miócitos vasculares, realizamos experimentos com microscopia confocal, analisando em tempo real as alterações nos transientes de Ca^{2+} intracelulares, na presença dos alcalóides. Nestes experimentos, os miócitos foram carregados com a sonda sensível ao Ca^{2+} , fluo-4 na forma acetoximetil éster, que apresenta capacidade de atravessar a membrana plasmática. É importante salientar que a microscopia confocal deu suporte à comunidade científica para localizar moléculas, bem como para analisar eventos nas células com alta resolução espacial e temporal (WIER et al., 2000). Corroborando com os experimentos de eletrofisiologia, curina induziu uma diminuição nos transientes de Ca^{2+} em células A7r5 de aorta de rato. Esse resultado reafirma a hipótese de que curina bloqueia os canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo-L, pois foi usado um agente despolarizante KCl (Figura 39).

Tomados em conjunto, este estudo fornece a caracterização dos efeitos da curina e da reticulina sobre os canais para Ca^{2+} do tipo-L vasculares. Tais efeitos

apresentam uma série de fatos que apoiam a hipótese de que curina e reticulina inibem as $I_{Ca,L}$, principalmente, devido à interação com os canais para Ca^{2+} do tipo-L, não sendo possível, porém, descartar completamente uma pequena participação do mecanismo dependente AMPc. Estes achados são relevantes para a compreensão de como curina e reticulina provocam o vasorelaxamento *in vitro*. Baseado nesses resultados, podemos concluir que curina e reticulina têm um importante potencial como um produto químico modelo, para a concepção e posterior desenvolvimento de novos fármacos com propriedade protetora cardiovascular.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

O presente estudo, fazendo uso de abordagens farmacológicas *in vitro* da curina e da reticulina, demonstrou que:

- 1) Curina e reticulina promovem vasorelaxamento, em anéis de aorta isolada de rato, de maneira independente do endotélio funcional;
- 2) O vasorelaxamento induzido pela curina e pela reticulina envolve inibição dos canais Ca_V tanto em miócitos de aorta de rato recém-dispersos como em células em cultura de aorta de rato, A7r5;
- 3) O mecanismo pelo qual curina e reticulina bloqueiam as correntes de Ca^{2+} através dos canais para cálcio dependentes de voltagem, é exercido pelo deslocamento do estado de inativação estacionária, para potenciais mais negativos, implicando, assim, em células menos excitáveis.
- 4) O efeito inibitório das correntes de Ca^{2+} apresentado pela curina e pela reticulina não envolve a ativação da via de sinalização AMPc-PKA e GMPc-PKG;
- 5) A diminuição do transiente de Ca^{2+} intracelular induzido por curina envolve a entrada de Ca^{2+} por canais para Ca^{2+} , dependentes de voltagem na membrana celular.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALGARA-SUAREZ P.; ESPINOSA-TANGUMA R. 8-Br-cGMP mediates relaxation of tracheal smooth muscle through PKA. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 314 (2), p. 597-601, 2004.
- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **Am. J. Physiol.** v. 219, p. 1698-1705, 1970.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology.** v. 188, p.261-274, 2003.
- ANDREASEN D.; FRIIS U. G.; UHRENHOLT T. R.; JENSEN B. L.; SKOTT O.; HANSEN P. B. Coexpression of voltage-dependent calcium channels Cav1.2, 21a, and 21b in vascular myocytes. **Hypertension** v. 47, p. 735-741, 2006.
- AVERY R. B.; JOHNSTON D. Multiple Channel Types Contribute To The Low-Voltage - Activated Calcium Current In Hippocampal CA3 Pyramidal Neurons. **Journal of Neuroscience.** v. 16, p. 5567-5582, 1996.
- BALDAS, J.; BICK, I. R. C.; PORTER, Q. N.; VERNENGO, M. J. Structure and stereochemistry of the alkaloid Chondrofoline. **Soc. Chem. Commun.** v. 132, 1971.
- BARBOSA FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; GEORGE, T. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil) – **Nat. Product. Res. In Brazil.** v. 49, p. 51, 1997.
- BARBOSA-FILHO J. M.; DA-CUNHA E. V. L.; GRAY A.I. Alkaloids of the menispermaceae. **Alkaloids.** v. 54, p. 1-190, 2000.
- BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova.** v. 13 (1), p. 29- 39, 1990.
- BARROSO, G. M., Sistemática de Angiospermas do Brazil, editora da Universidade de São Paulo, **EPUSP-SP**, p. 56, 1978.
- BEAN B. P. Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 81, p. 6388-6392, 1984.
- BENHAM, C. D.; BOLTON, T. B. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. **J. Physiol.** v. 381, p. 385 - 406, 1986.
- BERRIDGE, M. J., Elementary and global aspects of calcium signaling. **J. Physiol.** v. 499, p. 290 - 306, 1997.

BERRIDGE, M. J., Inositol trisphosphate and calcium signalling. **Nature**. v. 361(6410): p. 315 - 325, 1993.

BEZANILLA, F.; ARMOSTRONG, C. M. Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. **J. Physiol.**, v. 70, p. 549-566, 1977.

BICK, I. R. C.; CLEZY, P. S., Tertiary bases from Chondodendron Tomentosum. **J. Chem. Soc.** v. 1960, p. 2402, 1960.

BILCIKOVA I.; BAUER V.; COLENA J. The effect of methylxanthines, etymozol, ephredrine and papaverine on guinea pig and dog trachea. **Gen Physiol Biophys** v. 6, p. 137-148, 1987.

BISSET, N. G., Curare, botany, chemistry, and pharmacology. **Supl. Acta Amazonica**, v.18, p. 255, 1988.

BOITTIN, F. X.; MACREZ, N.; HALET, G.; et al. J. Norepinephrine-induced Ca^{2+} waves depend on $InsP_3$ and ryanodine receptor activation in vascular myocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 277, p.139 - 151, 1999.

BLAUSTEIN, M. P. Sodium/Calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Curr. Top. Membr. Trans.**, p. 289 - 330, 1989.

BLATTER L. A.; WIER W. G. Nitric oxide decreases $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. **Cell Calcium**. v. 15(2), p. 122–131, 1994.

BOLTON, T. B., Mechanisms of action of neurotransmitters and other substances on smooth muscle. **Physiol. Rev.** v. 59, p. 606 - 718, 1979.

CALLERA G. E., YEH E., TOSTES R. C., CAPERUTO L. C., CARVALHO C. R., BENDHACK L. M. Changes in the vascular beta-adrenoceptor-activated signalling pathway in 2Kidney-1Clip hypertensive rats. **Br J Pharmacol**. v. 141 (7), p. 1151-1158, 2004.

CARAFOLI, E. Calcium signaling: a tale for all seasons. **Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.** v. 99, p. 1115 – 1122, 2002.

CATTERAL W. A. Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca^{2+} Channels. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 521-555, 2000.

CATTERALL W. A.; PEREZ-REYES E.; SNUTCH T. P.; STRIESSNIG J.; International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structurefunction relationships of voltage-gated calcium channels. **Pharmacol Rev.** v. 57, p. 411–425, 2005.

CINGI, M.R.; DE ANGELIS, I.; FORTUNATI, E.; REGGIANI, D.; BIANCHI, V.; TIOZZO, R.; ZUCCO, F. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: A multicentre approach. **Toxicology *in vitro***. v. 5: p.119-125, 1991.

CRUZ J.S.; MATSUDA H., Depressive effects of arenobufagin on the delayed rectifier K⁺ current of guinea-pig cardiac myocytes. **Eur J Pharmacol.** v. 266(3), p. 317-25, 1994.

DAGUANO, J.K.M.F.; SANTOS, C.; ROGERO, S.O. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. **Revista Materia.** v. 12, p.134-139, 2007.

DE WAARD M., GURNETT C. A., CAMPBELL K. P. – Ion Channels. **Plenum Press, New York.** v. 41, p. 95, 1996.

DIAS, K. L. G. Avaliação da atividade cardiovascular de reticulina, um alcalóide obtido da *Ocotea duckei* vattimo em ratos (Lauraceae) - estudos *in vivo* e *in vitro*. **Dissertação (Mestrado)**. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2002.

DIAS, C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LEMOS, V. S.; CÔRTES, S. F. Mechanisms involved in the vasodilator effect of curine in rat resistance arteri. **Planta Med.** v. 68, p. 1049-51, 2002.

DIAS K. L. G.; DA SILVA DIAS C., BARBOSA-FILHO J.M., ALEMIRA R. N., DE AZEVEDO CORREIA N., MEDEIROS I. A. Cardiovascular effects induced by reticuline in normotensive rats. **Planta Med.** v. 70, p. 328–333, 2004.

DOLPHIN, A. C. A short history of voltage-gated calcium channels. **British Journal of Pharmacology.** v. 147, p. S56–S62, 2006.

DUTCHERM J. D., Curare alkaloids II – the purification of Tubocurarine chloride and isolation of d-chondocurarine – **J. Amer. Chem. Soc.** v. 74, p. 2221, 1952.

EDWARDS, G.; WESTON, A. H. Potassium channel openers and vascular smooth muscle relaxation. **Pharmacol. Ther.** v. 48, p. 237 - 258, 1990.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BLAAUBOER, M.B.; BOOBIS, A.; CARERE, S.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.-C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology.** v. 40, p. 193-236, 2002.

ERTEL, E. A.; CAMPBELL, K. P.; HAPOLD, M. M.; HOFMANN, F.; MORI, Y.; PEREZREYES, E.; SCHWARTZ, A.; SNUTCH, T.P.; TANABE, T.; BIRNBAUMER, L.; TSIEN, R. W.; CATTERAL, W. A. - **Nomenclature Of Voltage-Gated Calcium Channels Neuron.** v. 25, p. 533-535, 2000.

FAHEINA, G.V. Avaliação do efeito citotóxico das lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Erythrina velutina* sobre culturas

macrofágicas. Monografia (Graduação em Biologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, p. 62, 2006.

FATT P.; B. KATZ. The Effect of inhibitory nerve Impulses on a crustacean muscle fibre. **Journal of Physiology** . v. 121, p. 374-389, 1953.

FELIX, J.P.; KING, V.F.; SHEVELL, J. L.; GARCIA, M. L.; KACZOROWSKI, G. J.; BICK, I.R.; SLAUGHTER, R.S. Bis(benzylisoquinoline) analogs of tetandrine block L-type calcium channels: evidence for interaction at the diltiazem-binding site. **Biochemistry**. v. 31, p. 11793-11800, 1992.

FENG M. G.; LI M.; NAVAR L. G. T-type calcium channels in the regulation of afferent and efferent arterioles in rats. **Am J Physiol Renal Physiol**. v. 286, p. F331–F337, 2004.

FERRANTE, J.; LUCHOWSKI, E.; RUTLEDGE, A.; TRIGGLE, D. J. Binding of A 1,4-dihydropyridine calcium channel activator, S(-) Bay K 8644, to cardiac preparations. **Biochemical and Biophysics Research Communications**, v. 158, n. 1, p. 149-154, 1989.

FREITAS, M. R.; CORTES, S. F.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J. M. Modification of Ca^{2+} metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of waritine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialys* Eichl. (Menispermaceae). **J Pharm Pharmacol**. v. 48, p. 332-336, 1995.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelium cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. v. 286, p. 373-376, 1980.

FUSI, F.; SAPONARA, S.; GAGOV, H.; SGARAGLI, G. 2,5-Di-*t*-butyl-1,4-benzohydroquinone (BHQ) inhibits vascular L-type Ca^{2+} channel *via* superoxide anion generation. **Br J Pharmacol**. v. 133, p. 988-996, 2001.

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

GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-hill, 2003. p. 642-648

GLASSMEIER, G.; HAUBER, M.; WULFSEN, I.; WEINSBERG, F.; BAUER, C.K.; SCHWARZ J.R. Ca^{2+} Channels In Clonal Rat Pituitary Cells (GH3/B6). **Pflügers Archiv. European Journal of Physiology**. v. 442, p. 577-587, 2001.

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

GUHA, K. P.; MUKHERJEE, B., Bisbenzylisoquinoline alkaloids, A review – **J. Nat. Prod.** v. 42, p. 1, 1979.

GULLO, V. P.; HUGHES, D. E. Exploiting new approaches for natural product drug discovery in the biotechnology industry. **Drug Discovery Today: Technologies**. v. 2 (3), p. 281-286, 2005.

GURNEY A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 46, p. 242 - 251, 1994.

GUY H.R.; CONTI F. Pursuing The Structure And Function Of The Voltage-Gated Channels. **Trends in Neuroscience**. v. 13, p. 201-206, 1990.

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

HALL, J.; JONES, R. D.; JONES, T. H.; CHANNER, K. S.; PEERS, C. Selective Inhibition of L-Type Ca^{2+} Channels in A7r5 Cells by Physiological Levels of Testosterone. **Endocrinology**. v. 147(6), p. 2675–2680, 2006.

HERRINGTON J.; LINGLE C. J. Kinetic and Pharmacological Properties of Low Voltage- Activated Ca^{2+} Current in Rat Clonal (GH3) Pituitary Cells. **Journal of Neurophysiology**. v. 68, p. 213-233, 1992.

HILLE B. **Ionic channels of excitable membranes**. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, 2001.

HODGKIN, B. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative dscription of membrane current and its application to conduction excitation in nerve. **J PhysiolN**. v 117, p. 500-544, 1952.

HOFFMAN, F.; LACINOVÁ, L.; KLUGBAUER, N. Voltage-Dependent Calcium Channels: From Structure to Function. **Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology**. v. 139, p. 33- 87, 1999.

IGUCHI, M.; NAKAJIMA, T.; HISADA, T.; SUGIMOTO, T.; KURACHI, Y. On the mechanism of papaverine inhibition of the voltage-dependent Ca^{2+} current in isolated smooth muscle cells from the guinea pig trachea. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 263, p. 194–200, 1992.

INOUE, R.; ISENBERG, G. Intracellular calcium ions modulate acetylcholine-induced inward current in guinea-pig ileum. **J. Physiol.** v. 424, p. 73 - 92, 1990.

ISHIKAWA, T.; HUME, J. R.; KEEF K. D. Regulation of Ca^{2+} channels by cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells. **Circ Res.** v. 73(6), p. 1128–1137, 1993.

JAGGAR, J. H.; PORTER, V. A.; LEDERER, W. J.; et al. Calcium sparks in smooth muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 278, p. 235 - 256, 2000.

JIM, K.; HARRIS, A.; ROSENBERGER, L. B.; TRIGGLE, D. J. Stereoselective and non-stereoselective effects of D-600 (methoxyverapamil) in smooth-muscle preparations. **Eur J Pharmacol.** v. 76, p. 67–72, 1981.

KIM, M. S.; MORII, T.; SUN, L. X.; IMOTO, K.; MORI Y. Structural determinants of ion selectivity in brain calcium channel. **FEBS Letters.** v. 318, p. 145-148, 1993.

KIM, H.; YONN, S. C.; LEE, T. Y.; JEONG, D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. **Toxicology Letters.** v. 184, p.13-17, 2009.

KIMURA, I.; KIMURA, M.; YOSHIZADI, M.; YANADA, K.; KADOTA, S.; KIKUCHI, T. Neuromuscular blocking action of alkaloids from a Japanese crude drug "SHIN-I" (FLOSMAGNOLIAE) in frog skeletal muscle. **Planta Médica.** v. 48 (1), p. 43-47, 1983.

KIMURA, M.; OSANAI, T.; OKUMARA, K.; SUGA, S.; KANNO, T.; KAMIMURA, N.; HORIBA, N.; WAKUI, M. Involvement of phosphorylation of β -subunit in cAMP-dependent activation of L-type Ca^{2+} channel in aortic smooth muscle-derived A7r5 cells. **Cell Signal.** v. 12, p. 63-70, 2000.

KING, H. Curare alkaloids, part V – Alkaloids of some chondodendron tomentosum R and S anomospermum grandifolium. **J. Chem. Soc.** v. 40, p. 737, 1940.

KING, H. Curare alkaloids, part VI – Alkaloids from chondodendron tomentosim R and S. **J. Chem. Soc.** v. 47, p. 936, 1947.

KING, H. Curare alkaloids, part VIII – Examination of commercial curare, Chondodendron tomentosum R and S Anomospermum grandifolium. **J. Chem. Soc.** v. 48, p. 1945, 1948.

KING, V. F.; GARCIA, M. L.; HIMMEL, D.; REUBEN, J.P.; LAM, Y. K.; PAN, J. X.; HAN, G. Q.; KARZOROWSKI, G. J. Interaction of tetrandrine with slowly inactivating calcium channels. Characterization of calcium channel modulation by an alkaloid of Chinese medicinal herb origin. **J Biol Chem.** v. 263, p. 2238-2244, 1988.

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

KOCHEGAROV, A. A. Pharmacological modulators of voltage-gated calcium channels and their therapeutical application. **Cell Calcium.** v. 33, n. 3, p. 145-162, 2003.

KOMORI, S.; ITAKAKI, M.; UNNO, T.; OHASHI, H. Caffeine and carbachol action common Ca^{2+} stores to release Ca^{2+} in guinea-pig ileal smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.** v. 277, p. 173 - 180, 1995.

LACERDA, C. D. G. Isolamento e identificação de alcalóides bisbenzilisoquinolínicos de *chondodendron platyphyllum* A. ST. HILL (MIERS), e avaliação da atividade vasorelaxante em artérias de resistência. **Dissertação (Mestrado)**. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 1999.

LARGE, W. A. Receptor operated Ca^{2+} -permeable non-selective cation channels in vascular smooth muscle. **J. Cardiovasc. Electrophysiol.** v. 13, p. 493 - 501, 2002.

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

LINCOLN T. M. Myosin Phosphatase Regulatory Pathways: Different Functions or Redundant Functions?. **Circ. Res.** v. 100, p. 10–12, 2007.

LIU, Q. Y.; Li, B.; GANG, J. M.; KARPINSKI, E.; PANG, P. K. T. Tetrandrine a calcium antagonist: Effects and mechanisms of action in smooth muscle cells. **J Pharmacol Exper Ther.** v. 273, p. 32-39, 1995.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUVERT, D. Mechanism of celular 3-(4,5-Dimethyazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**. v. 69, p. 581-592, 1997.

LORENZ, J. N.; BIELEFELD, D. R.; SPERELAKIS, N. Regulation of calcium channel current in A7r5 vascular smooth muscle cells by cyclic nucleotides. **Am J Physiol.** v. 266(35), p. 1656–1663, 1994.

MANSVELDER, H. D.; KITS K. S. All Classes Of Calcium Channel Couple With Equal Efficiency To Exocitosis In Rat Melanotropes, Inducing Linear Stimulus-Secretion Coupling. **Journal of Physiology**. v. 526, p. 327-339, 2000.

MARTIN, M. L.; DIAZ, M. T.; MONTERO, M. J.; PRIETO, P.; ROMAN, L.S.; CORTES, D. Antispasmodic activite of beszylisoquinoline alkaloids analogous to papaverine. **Planta Médica** v. 59 (1), p. 63-67, 1993.

MARTIN, M. L.; SAGREDO, J. A.; MORAIS, J. M. MONTERO, J.; SANCHEZ, M. T.; SAN ROMAN, L. Uterine inhibitory effect of reticuline. **J. Pharmacol.** v. 40 (11), p. 801-802, 1988.

MIRKHAN,I H.; DIRIN, M.; YOUSSEF-ZAYEH, I. Mechanism of vasoselective action of mebudipine, a new calcium channel blocker. **Vascul Pharmacol.** v. 42, p. 23-29, 2005.

MEDEIROS, M. A. A.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LEMOS, V. S.; PINHO, J. F.; ROMAN-CAMPOS, D.; MEDEIROS, I. A.; ARAÚJO, D. A .M.; CRUZ, J. S. (S)-reticuline induces vasorelaxation through the blockade of Ltype Ca^{2+} channels. **Naunyn-Schmiedeberg**. v. 379, p. 115-125, 2009.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HINGGS, E. A. Nitric oxide; physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev.** v. 43, p. 109–142, 1991.

MORAIS, L. C. S. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. **J. Ethnopharmacol.** v. 62 (1), p. 57-61, 1998.

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

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

MUNTWYLER, JORG; FOLLATH, FERENC. Calcium channel blockers in treatment of hypertension. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 44, n. 3, p. 207-216, 2001.

NELSON, M. T.; STANDEN, N. B.; WORLEY, J. F. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. **Nature.** v. 336, p. 3382–3385, 1988.

NEILD, T. O.; KOTECHA, N. Relation between membrane potential and contractile force in smooth muscle of the rat tail artery during stimulation by norepinephrine, 5-hydroxytryptamine, and potassium. **Circ Res.** v. 60, p. 791–795, 1987.

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**, v. 55, p. 597–606, 2003.

NIE, A.; MENG Z. Modulation of L-type calcium current in rat cardiac myocytes by sulfur dioxide derivatives. **Food and Chemical Toxicology.** v. 44, p. 355–363, 2006.

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

PHILLIPPE, M.; CHIEN E. K. Intracellular signalling and phasic myometrial contractions, **Journal of the Society for Gynecologic Investigation.** v. 5, p. 169–177, 1998.

PETERSON, B. Z.; DEMARIA, C. D.; ADELMAN, J. P.; YUE, D. T. Calmodulin is the Ca^{2+} sensor for Ca^{2+} -dependent inactivation of L-Type calcium channels. **Neuron.** v. 22, p. 549– 558, 1999.

PIO CORREA, M, **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, V. 5, p. 320, 1984.

QUIGNARD, J. F.; HARRICANE, M.C.; MENARD, C.; LORY, P.; NARGEOT, J., CAPRON L.; MORNET, D.; RICHARD, S. Transient down-regulation of L-type Ca(2+) channel and dystrophin expression after balloon injury in rat aortic cells. **Cardiovasc Res.** v. 49, p. 177-88, 2001.

RANG, H. P. DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RANG, H. P., DALE M. M., & RITTER. J. M. **Pharmacology**. 3^a ed. London: Copyright, 1987.

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

RICHARDSON, A.; TAYLOR, C. W. Effects of Ca2+ chelators on purified inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptors and InsP3-stimulated Ca2+ mobilization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 16, p. 11528-11533 1993.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Testes *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**. v. 6. p. 317-320, 2003.

SANGUINETTI, M. C.; KASS, R. S. Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. **Circ Res.** v. 55, p. 336– 348, 1984.

SHAH, D. I.; SINGH, M. Activation of protein kinase A improves vascular endothelial dysfunction. **Endothelium**. v. 134, p. 267-277, 2006.

SHOROFSKY, S. R.; BALKE, C. W. Calcium Currents and Arrhythmias: Insights from Molecular Biology. **American Journal of Medicine**. v. 110, p. 127-140, 2001.

SNUTCH, T. P.; SUTTON, K. G.; ZAMPONI, G. W. Voltage-Dependent Calcium Channels – Beyond Dihydropyridine Antagonists. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 1, p.11-16, 2001.

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

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **Journal of Physiology**. v. 522, p. 177-185, 2000.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO A. V. Ca²⁺ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. **Physiol Rev.** v. 83, p. 1325–1358, 2003.

SOMLYO, A. V.; KHROMOV, A. S.; WEBB, M. R.; FERENCZI, M. A.; TRENTHAM, D.R.; HE, Z. H.; SHENG, S.; SHAO, Z.; SOMLYO, A. P. Smooth muscle myosin:

regulation and properties. **Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.** v. 359, p. 1921–1930, 2004.

SZAL, S. E.; REPKE, J. T.; SEELY, E. W.; GRAVES, S. W.; PARKER, C. A.; MORGAN K. G. M. $[Ca^{2+}]_i$ signalling in pregnant human myometrium. **American Journal of Physiology.** v. 267, p. E77–E87, 1994.

TAKIMOTO K.; LI D.; NERBONNE J. M.; LEVITAN E. S. Distribution, splicing and glucocorticoid-induced expression of cardiac $\alpha 1C$ and $\alpha 1D$ voltage-gated Ca^{2+} channel mRNAs. **J Mol Cell Cardiol.** v. 29, p. 3035–3042, 1997.

TANABE, T.; TAKESHIMA, H.; MIKAMI, A.; FLOCKERZI, V.; TAKAHASHI, H.; KANGAWA, K.; KOJIMA, M.; MATSOU, H.; HIROSE, T.; NUMA, S. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. **Nature.** v. 328, p. 313–318, 1987.

TAYLOR, S. M.; Downes, H. Bronchodilator mechanisms in bullfrog lung: differences in response to isoproterenol, theophylline and papaverine. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 223, p. 359–367, 1982.

TAYLOR, C. W. Inositol trisphosphate receptors: Ca^{2+} -modulated intracellular Ca^{2+} channels. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1436, p. 19 - 33, 1998.

TRIGGLE, D. J. The Physiological and Pharmacological Significance of Cardiovascular T-Type, Voltage-gated Calcium Channels. **American Journal of Hypertension.** v. 11, p. 80S-87S, 1998.

UCHIDA, R.; YAMAZAKI, J.; OZEKI, S.; KITAMURA, K., State-dependent Inhibition of L-type Ca^{2+} channels in A7r5 cells by cilnidipine and its derivatives. **Jpn J Pharmacol.** v. 85, p. 260 - 270, 2001.

UEHARA, A.; HUME, J. R. Interactions of organic calcium channel antagonists with calcium channels in single frog atrial cells. **J Gen Physiol.** v. 85, p. 621–647, 1985.

ULLRICH, N. D.; KOSCHAK, A, MACLEOD KT. Oestrogen directly inhibits the cardiovascular L-type Ca^{2+} channel Cav1.2. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 361, p. 522–527, 2007.

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

VAN BREEMEN, C.; AARONSON, P.; LOUTZENHISER, R. Ca^{2+} interactions in mammalian smooth muscle. **Pharmacol. Rev.** v. 30, p. 167 - 208, 1979.

VAN DEN BERG, M. E.. Plantas medicinais na Amazônia - contribuição ao seu conhecimento sistemático. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico - **Programa de trópicos unidos.** p. 223, 1982.

VANBAVEL E.; SOROP O.; ANDREASEN D.; PFAFFENDORF M.; JENSEN B. L. Role of T-type calcium channels in myogenic tone of skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v. 283, p. H2239–H2243, 2002.

VINET, R.; VARGAS, F. F. L- And T-Type Voltage-Gated Ca^{2+} currents in adrenal medulla endothelial cells. **American Journal of Physiology (Heart Circulation of Physiology)**. v. 276 45, p. H1313-H1322, 1999.

VUORELA, P.; LEINONEN, M.; SAIKKU, P.; TAMMELA, P.; RAUHA, J. P.; WENNBERG, T.; VUORELA, H. Natural products in the process of finding new drug candidates. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1375-1389, 2004.

WALKER, D.; DE WAARD, M. Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca^{2+} channels. **TiNS**. v ; 21, p. 148–154, 1998.

WATANABE, H; IKEDA, M; QATANABE, K; KIKUCHI, T. Effects on central dopaminergic systems of D-coclaurine and D-reticuline, extracted from magnolia salicifolia. **Planta Médica**. v. 42, p. 213-222, 1981.

WEI, X.; NEELY, A.; LACERDA, A.E.; OLCESE, R.; STEFANI, E.; PEREZ-REYES, E.; BIRNBAUMER, L. Modification of Ca^{2+} channel activity by deletions at the carboxy terminus of the cardiac $\alpha 1\text{A}$ subunit. **Journal of Biological Chemistry**. v. 273, p. 1635-1640, 1994.

WELLING A.; LUDWIG A.; ZIMMER S.; KLUGBAUER N.; FLOCKERZI V.; HOFMANN F. Alternatively spliced IS6 segments of the alpha 1C gene determine the tissue-specific dihydropyridine sensitivity of cardiac and vascular smooth muscle L-type Ca^{2+} channels. **Circ Res**. v. 81, p. 526–532, 1997.

WIER, W.G; BALKE, C.W.; MICHAEL,J.A., et al. A custom confocal and two-photon digital laser scanning microscope. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 278: p. H2150–H2156, 2000.

WINTERSTEINER, O.; DUTCHER, C. M., Curare alkaloides from Chondodendrom tomentosum. **Science**. v. 97, p. 467, 1943.

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

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

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

XU, W.; LIPSCOMBE, D. Neuronal Cav1.3a1 L-type Channels Activate at Relatively Hyperpolarized Membrane Potentials and Are Incompletely Inhibited by Dihydropyridines. **Journal of Neuroscience**. v. 21(16), p. 5944-5951, 2001.

YAMAKAGE, M; NAMIKI A. Calcium channels - basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels - a review. **CAN J ANESTH.** v. 49: 2, p. 151-164, 2002.

ZHANG, J. F.; ELLINOR, P. T.; ALDRICH, R. W.; TSIEN, R. W. Molecular Determinants Of Voltage-Dependent Inactivation In Calcium Channels. **Nature.** v. 372, p. 97-100, 1994.

Apêndice