

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

BRUNA PRISCILLA VASCONCELOS DANTAS

Participação dos Canais TRP nos efeitos cardiovasculares induzidos por carvacrol em ratos

**JOÃO PESSOA – PB
2010**

BRUNA PRISCILLA VASCONCELOS DANTAS

Participação dos Canais TRP nos efeitos cardiovasculares induzidos por carvacrol em ratos

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

Orientadores:

Prof. Dr. Jacicarlos Lima de Alencar

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

**JOÃO PESSOA – PB
2010**

D192p Dantas, Bruna Priscilla Vasconcelos.

Participação dos canaisTRP nos efeitos cardiovasculares induzidos por carvacrol em ratos / Bruna Priscilla Vasconcelos Dantas. - - João Pessoa : [s.n.], 2010.

146 f.

Orientador: Jacicarlos Lima de Alencar e Isac Almeida de Medeiros.

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN.

BRUNA PRISCILLA VASCONCELOS DANTAS

Participação dos Canais TRP nos efeitos cardiovasculares induzidos por carvacrol em ratos

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Jacicarlos Lima de Alencar

Orientador

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

Co-Orientador

Prof. Dr. Julianeli Tolentino de Lima

Examinador Externo

Prof. Dra. Temilce Simões de Assis

Examinador Interno

Dedicatória

Dedico esta conquista:

A minha querida, amada e amiga mãe Valdecira Vasconcelos pelo amor, carinho e dedicação em todos os momentos procurando sempre o melhor, abdicando da sua própria vida em função dos seus filhos, admiro por ser essa mulher de fibra que sabe o que quer e corre atrás dos seus ideais.

Ao meu querido e amado pai Geraldo César pelo amor, carinho, compreensão, por ser um exemplo de homem leal, honesto, onde seus princípios estão acima de tudo, por me ensinar que devemos fazer tudo na vida com amor.

Ao meu querido irmão Gustavo César, pela amizade sempre, pelo carinho, pela paciência, por ser um irmão tão bom e especial, me dando conselhos e me ajudando nas horas que mais preciso e por ser um bom filho com aqueles que tanto amo.

A minha querida irmã Natácia de Vasconcelos pelo amor, pela paciência, pela amizade, pelos conselhos, por ser uma irmã sempre presente apesar da distância, pela cumplicidade sempre partilhada.

Ao meu companheiro, marido e amigo Thiago Leite Ferreira pelo amor, pelo incentivo, pelo carinho, pelo apoio, por fazer cada dia da minha vida especial ao seu lado e por saber que posso contar com ele em todos os momentos da minha vida, meu amor te amo.

A minha família que sempre acreditou na minha capacidade de conquistar meus ideais.

A vocês obrigada por existirem na minha vida, AMO muito vocês!!!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar o dom da vida, por me fazer perseverar nessa longa caminhada e ser responsável por tudo que sou e conquistei, agradeço principalmente e rogo pela minha saúde, bem tão precioso.

Agradeço todos os dias a felicidade de ter junto a mim, pessoas que me amam e que querem o meu bem, me fazendo feliz.

Ao Prof. Dr. Jacicarlos Lima de Alencar, meu Orientador, pelos ensinamentos e amizade desde a iniciação científica, pela confiança depositada na construção desse trabalho, sou grata pelo incentivo e oportunidade de poder realizar e conquistar esse sonho.

Ao Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros, meu Co-Orientador, por ter sido a primeira pessoa a me dar a oportunidade de conhecer a pesquisa, pelos seus ensinamentos e amizade, sempre procurando integrar o laboratório como uma verdadeira família.

A Prof^a. Dra. Darizy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos, pela amizade, pelos ensinamentos partilhados sendo estes muito valiosos para a elaboração e construção desse trabalho, por demonstrar amor pelo que faz, sou grata pela atenção e carinho depositados e por acreditar que eu seria capaz.

Ao Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga, pelos seus ensinamentos, atenção, amizade e pronta ajuda na elaboração e construção desse trabalho.

Aos professores Dr. Julianeli Tolentino de Lima e Dra. Temilce Simões de Assis, por toda ajuda prestada a este trabalho, pela colaboração e atenção, como integrantes da banca examinadora, pelos ensinamentos valiosos e por tornar esse trabalho melhor.

A Prof^a. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira, pelos ensinamentos, pela amizade, por ter sido uma das primeiras pessoas a me ensinar o que era a pesquisa e a aprender a amar tudo isso.

A Thais Porto Ribeiro, que se mostrou uma grande amiga, ajudando no que estava ao seu alcance, com ensinamentos valiosos para construção desse trabalho, inclusive trabalhando como conselheira amorosa, sendo uma pessoa essencial nesses passos finais de conclusão do trabalho.

A Kívia Sales, minha querida aluna de iniciação científica, quero além de agradecer, dedicar esse trabalho, pois foi um esforço em conjunto, obrigada pela amizade, o incentivo, as madrugadas de experimento, a paciência de escutar meus desabafos e minhas tristezas.

A Emerson, pelo cuidado, dedicação e atenção, sempre preocupado em não me deixar só, procurando fazer o seu melhor para me ajudar.

A Fabíola Fiafho Furtado, minha querida amiga, amiga de infância, que brincava de Barbie, foi quem me apresentou ao laboratório de farmacologia cardiovascular, quem me ensinou os primeiros passos da pesquisa, me mostrando a dedicação e o amor por esse mundo científico.

A Maria do Carmo Alustau (Carminha), pela amizade e incentivo, me ajudando nos momentos que mais precisei, sendo companheira de luta e labuta todos os dias. Pelos momentos de choros e risos, pelos desabafos e estresses, por ser amiga sempre apesar dos desentendimentos.

A Maria do Socorro (Corrinha), Aurylene e Melissa, pela amizade, pelas trocas de ensinamentos, ajudas científicas e do coração e por se mostrarem sempre dispostas a me ajudar.

A Mônica Moura, pela amizade, pelas trocas de ensinamentos, pelas ajudas e contribuições na elaboração e construção desse trabalho.

A Max Vinicius, pela amizade e carinho, desde a graduação, me incentivando nos momentos difíceis, se alegrando com as minhas vitórias e conquistas, sendo muito especial em minha vida.

A Fábio Tenório, por ser amigo e companheiro, desde a graduação, sempre ajudando a todos sem distinção, tendo uma amizade verdadeira, que está em meu coração.

A Nayara Magalhães, pelos ensinamentos passados, pela amizade, por ter contribuído de alguma forma para o meu crescimento na área da pesquisa.

Aos amigos do laboratório de Farmacologia Cardiovascular: Abraão Filho, Ana Letícia, Angélica Sátiro, Aurylene Carlos, Camila, Cinthia, Dayane, Islânia Albuquerque, Juliane, José George, Leônidas, Maria do Carmo, Melissa Luciano, Mônica, Karoline Rodrigues, Kivia Sales, Natália Tabosa, Valéria Lopes, Raline Mendonça, Robson Veras, Thaís Josy, Thais Porto e Thyago Queiroz, pelo apoio, sorrisos, amizade e força.

Aos meus amigos do Mestrado: Antonia, Camila, Carminha, Carlos, Charlane, Carol, Daysiane, Geraldo, João Carlos, John, Renata, Rubens, Thaís, Karina, Fábio, Vivianne, Vitor, Wemerson, Thiago, Vinicius Trajano (Doutorado), pelos bons momentos de aprendizado e troca mutua de conhecimentos, sempre em busca do novo e do cientificamente correto, como também pelas boas amizades construídas, sempre torcendo pela vitória do outro.

Aos Meus amigos da graduação: Antonio, Andréia e Bruno, Azuir, Ana Paula, Ana Silvia, Andressa, Cleanto, Diogo, Daysiane, Eulália, Franklin, Franciele, Fábio, Fernanda, Gisiarde, George, Gilberto, Hans, Hariad, Iris, Isis, Igor, Juliane, Max, Miria, Mayrieli, Nelson (in memoriam), Nathália, Rita, Rubênia (Ruby), Raoni, Shiomara, Tayra, Thaise, Vitor, pelos anos de amizade e companheirismo, onde tivemos muitos momentos de alegrias e felicidades.

Às minhas eternas amigas: Thais Celi e Thaíse Patrício. Eu não poderia deixar de agradecer a todo o carinho e amizade dedicada durante os anos e que me acompanham até hoje. Apesar das atividades do dia-a-dia estão sempre na torcida para que sempre dê tudo certo.

Aos professores da pós-graduação: Dr. Demétrius Araújo, Dr.^a Bagnólia Araújo, Dr. Josean Fechine, Dr.^a Sandra Rodrigues, Dr.^a Liana Clébia, Dr. Luís Fernando, Dr. Reinaldo Nóbrega, Dr. Isac Almeida, Dr. José Maria Barbosa, Dr. Rui Macedo, Dr. Bruno Freitas, Dr.^a Margarethe de Fátima e Dr.^a Celidárque da Silva, pela ajuda na construção do conhecimento e enriquecimento durante as disciplinas ofertadas para o nosso aprendizado.

A José Crispim Duarte, sempre com um sorriso no rosto disposto a ajudar no que for preciso, grande colaborador da realização desse trabalho, procurando sempre o melhor para nos todos.

*Aos funcionários: **Luiz Cordeiro**, **Adriano Cordeiro** por estarem sempre dispostos a ajudar e resolver nossos problemas e a **Mônica Rodrigues** por passar a alegria todos os dias com um sorriso com um incentivo, sempre disposta a ajudar.*

*A **Tânia Maria Alves de Araújo**, pela paciência, apoio, atenção e carinho sempre.*

A Coordenação, funcionários e a todos os professores do programa de pós-graduação pela dedicação e empenho com que conduzem este programa.

*Ao **CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** pelo apoio financeiro;*

*A **Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior**, pelo suporte técnico através do portal periódicos.*

*Ao **Laboratório de Tecnologia Farmacêutica "Professor Delsby Fernandes de Medeiros** "e a Universidade Federal da Paraíba por possibilitar e apoiar essa pesquisa.*

A todos o meu muito obrigada!

Resumo

RESUMO

Os efeitos farmacológicos de carvacrol, um fenol monoterpenóide, sobre o sistema cardiovascular, foi estudado em ratos normotensos, usando técnicas *in vivo* e *in vitro*. Carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) induziu vasorelaxamento dos anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com 10 μM FEN ($pD_2 = 4,59 \pm 0,02$, $E_{\text{máx}} = 103,03 \pm 1,5\%$) na presença do endotélio funcional e esse efeito não foi alterado após a remoção do endotélio ($pD_2 = 4,36 \pm 0,02$, $E_{\text{máx}} = 111,03 \pm 4,8\%$), sugerindo, portanto, que a resposta vasorelaxante induzida por carvacrol parece ser independente do endotélio vascular. Interessantemente em anéis pré-contraídos com KCl 80 mM ($pD_2 = 4,12 \pm 0,01$, $E_{\text{máx}} = 94,38 \pm 3,97\%$), observou-se uma diminuição na sua potência e na sua eficácia farmacológica, sugerindo um passo comum na via que seria um aumento citosólico dos níveis de cálcio. Adicionalmente, carvacrol antagonizou, de maneira dependente de concentração, as contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} e induziu relaxamento das contrações induzidas pelo S(-)-Bay K 8644 ($pD_2 = 4,537 \pm 0,023$, $E_{\text{máx}} = 91,8 \pm 3,58\%$) com uma diminuição na sua eficácia farmacológica, sugerindo uma inibição do influxo de cálcio por canais de Ca^{2+} tipo-L. Além disso, antagonizou as contrações induzidas por CaCl_2 em meio nominalmente sem cálcio, na presença de FEN e nifedipina, sugerindo uma provável inibição do influxo de cálcio por SOC, ROC e/ou canais TRP. Como também, em um meio despolarizante e nominalmente sem cálcio na presença de nifedipina esse mesmo antagonismo foi observado, ressaltando a provável inibição dos SOC e/ou canais TRP. Para avaliar a participação dos canais TRP, as preparações foram incubadas com La^{3+} ($pD_2 = 5,231 \pm 0,04$), Gd^{3+} ($pD_2 = 4,97 \pm 0,02$) e Ni^{2+} ($pD_2 = 5,079 \pm 0,02$) onde seu efeito foi potencializado sugerindo sua ação sobre os canais TRPC e ao utilizar magnésio ($pD_2 = 4,168 \pm 0,021$ e $E_{\text{máx}} = 81,12 \pm 4,03\%$) tanto sua potência quanto sua eficácia farmacológica foi atenuada, sugerindo inibição do canal TRPM7. Nos estudos *in vivo*, em ratos normotensos não anestesiados, carvacrol produziu hipotensão e bradicardia. Em conclusão, esses resultados sugerem que carvacrol induz efeito vasorelaxante em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato por inibir provavelmente TRPM7, como também inibir o influxo de cálcio por Ca_v , SOC, ROC e ou TRPC1 e 6. Além disso, os efeitos induzidos por carvacrol em ratos normotensos não anestesiados mostrou uma atividade hipotensora e bradicárdica.

Palavras-chave: Carvacrol, Artéria mesentérica superior de rato, Vasorrelaxamento, Canais de Ca^{2+} operados por voltagem tipo-L (Cav), Canais potencial receptor transiente (TRP).

Abstract

ABSTRACT

The pharmacological effects of carvacrol, a monoterpenoid phenol, on the cardiovascular system were studied in normotensive rats, using *in vivo* and *in vitro* techniques. In superior mesenteric artery rings isolated from rats with functional endothelium carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) concentration-dependently relaxed phenylephrine-induced contractions ($pD_2 = 4.59 \pm 0.02$, MR = $103.03 \pm 1.5\%$, N=8) and this effect was not altered after removal of the endothelium ($pD_2 = 4.36 \pm 0.02$, MR = $111.03 \pm 4.8\%$, N=8), suggesting that the vasorelaxant response induced by carvacrol appears to be independent of vascular endothelium. Furthermore, carvacrol antagonized the vasoconstriction induced by high K⁺ solution (Tyrode with 80 mM of KCl) ($pD_2 = 4.12 \pm 0.01$, MR = $94.38 \pm 3.97\%$, N=6), inhibited contraction elicited by CaCl₂ in depolarizing (KCl 60 mM) nominally without Ca²⁺ medium out carvacrol also antagonized the contractions induced by the L-type Ca²⁺ channel agonist, S(-)-Bay K 8644 ($pD_2 = 4.537 \pm 0.023$, MR = $9.8 \pm 3.58\%$, N=6), indicating that the vasodilatation involve probably the inhibition of Ca²⁺ influx through L-type voltage-dependent calcium channels (Ca_v type-L). Additionally, carvacrol antagonized the contractions induced by CaCl₂ in nominally without Ca²⁺ medium in the presence of PHE and nifedipine, suggesting a possible inhibition of calcium influx by store operated channels (SOC), receptor operated channels (ROC) and/or TRP channels. Interestingly, in a depolarizing (KCl 60 mM) nominally without Ca²⁺ medium and in the presence of nifedipine, carvacrol also inhibited the contraction induced by CaCl₂, suggesting a probable inhibition of SOC and/or TRP channels. To evaluate the involvement of TRP channels in the vasorelaxant effect induced by carvacrol, non-selective inhibitors were used. No change in the relaxation response was observed in the presence of ruthenium red ($pD_2 = 4.31 \pm 0.029$, N=6), however, the effect induced by carvacrol was potentiated by La³⁺ ($pD_2 = 5.231 \pm 0.04$, N=6), Gd³⁺ ($pD_2 = 4.97 \pm 0.02$, N=6) or Ni²⁺ ($pD_2 = 5.079 \pm 0.02$, N=6), furthermore, Mg²⁺ ($pD_2 = 4.168 \pm 0.021$; MR = $81.12 \pm 4.03\%$, N=6) attenuated the relaxation elicited by carvacrol, suggesting that monoterpenoid may to action on TRPC1, TRPC3, TRPC6 and TRPM7 channels. Carvacrol also induced hypotension and bradycardia in non-anesthetized normotensive rats. In conclusion, these results suggest that carvacrol induced vasorelaxant effect in superior mesenteric artery rats isolated probably inhibiting Ca²⁺ influx by Ca_v, SOC (TRPC1), ROC (TRPC1 or TRPC6) and TRPM7 channels. Moreover, the effects induced by carvacrol in normotensive non-anesthetized rats showed a hypotensive and bradycardic activity.

Key words: carvacrol, vasorelaxament, rat superior mesenteric arterial rings, L-type voltage-operated Ca²⁺ channels (VOCs), transient receptor potential channel (TRP).

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
bpm	Batimento por minuto
BK _{Ca}	Canais de K ⁺ sensíveis ao Ca ²⁺ de grande condutância
Ca ²⁺	Cálcio
Ca _v	Canais de cálcio sensíveis a voltagem
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
[Ca ²⁺]	Concentração de cálcio
[Ca ²⁺] _c	Concentração de cálcio citoplasmática
[Ca ²⁺] _i	Concentração de cálcio intracelular
°C	Graus Celsius
CGRP	Peptídio relacionado ao gene da calcitonina
CE ₅₀	Concentração da droga que produz 50 % do efeito máximo
CO ₂	Dióxido de carbono
DC	Débito cardíaco
E _{máx}	Efeito máximo
e.p.m.	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
IP ₃	Trifosfato de inositol
i.p.	Intraperitoneal
K ⁺	Potássio
Kg	Quilograma
M	Molar
Mg ²⁺	Magnésio
[Mg ²⁺]	Concentração de Magnésio
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar

ms	Milisegundos
MSCC	Canais de cálcio mecanosensíveis
μL	Microlitro
μM	Micromolar
n	Número de experimentos
Na^+	Íon sódio
O_2	Oxigênio
p	Significância Estatística
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PE	Polietileno
PLC	Fosfolipase C
ROC	Canal operado por receptor
rpm	Rotação por minuto
S5	Quinto Segmento
S6	Sexto Segmento
SAC	Canal ativado por estiramento
SOCs	Canais de cálcio operados por estoques
TRPs	Canais potenciais receptores transientes
TRPA1	Receptor TRP proteínas transmembranas ancrinas 1
TRPC	Receptor TRP clássico
TRPM	Receptor TRP melastatinas
TRPML	Receptor TRP muculipinas
TRPN	Receptores TRP mecanorreceptores potencial C
TRPP	Receptor TRP policistinas
TRPV	Receptor TRP vanilóide
5-HT	5-hidroxitriptamina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular do complexo de canais de cálcio (Ca_V).

Figura 2: Representação esquemática da estrutura das subunidades α e β do canal BK_{Ca} .

Figura 3: Representação esquemática da estrutura de um monômero mostrando os seis segmentos transmembranares e a formação de um canal TRP, como também as possíveis formações de tetrâmeros.

Figura 4: Estrutura esquemática simplificada das seis subfamílias de canais TRPs em mamíferos.

Figura 5: Estrutura esquemática da entrada de Ca^{2+} pelos canais TRPCs.

Figura 6: Estrutura química do carvacrol (5-Isopropil-2-metilfenol).

Figura 7: Rato Wistar (*Rattus novergicus*).

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

Figura 9: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de Carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com endotélio vascular e na ausência do mesmo, pré-contraídos com FEN (10 μM) e o teste de contratilidade do órgão.

Figura 10: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de Carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, no tônus muscular espontâneo e posteriormente recuperação do órgão.

Figura 11: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da reprodutibilidade do efeito de Carvacrol (3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN.

Figura 12: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de Carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com diferentes agentes contracturantes.

Figura 13: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de canais para K^+ na resposta vasorelaxante induzida pelo Carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional.

Figura 14: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do Carvacrol sobre as contrações induzidas em artéria mesentérica por concentrações cumulativas de $CaCl_2$ (10^{-6} – 10^{-2} M) em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+} .

Figura 15: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do Carvacrol em anéis de artéria mesentérica, sem o endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (200 nM).

Figura 16: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do Carvacrol sobre a entrada de Ca^{2+} por SOC e ROC em anéis de artéria mesentérica.

Figura 17: Representação esquemática do protocolo experimental adicional, para avaliação do efeito do Carvacrol sobre a entrada de Ca^{2+} por SOC e ROC em anéis de artéria mesentérica.

Figura 18: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do Carvacrol sobre a entrada capacitiva de Ca^{2+} em anéis de artéria mesentérica.

Figura 19: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do Carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com vermelho de rutênio, íon gadolínio, íon lantânio, íon magnésio.

Figura 20: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do Carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com o íon Níquel.

Figura 21: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do Carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com capsaicina ($10 \mu\text{M}$).

Figura 22: Aparato utilizado para aquisição de dados de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não-anestesiados.

Figura 23: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de Carvacrol (1; 5; 10; 15 e 20 mg/Kg, aleatoriamente, i.v.) sobre a PAM e FC em ratos normotensos não-anestesiados.

Figura 24: Registro original da ação do carvacrol ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4} \text{ M}$) em anel de artéria mesentérica superior isolada de rato, com o endotélio removido e pré-contraído com FEN ($10 \mu\text{M}$).

Figura 25: Efeito do carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraído com FEN ($10 \mu\text{M}$).

Figura 26: Registro original da ação do carvacrol ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4} \text{ M}$) em anel de artéria mesentérica superior isolada de rato, com o endotélio removido, no tônus basal.

Figura 27: Efeito do carvacrol sobre o tônus basal de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

Figura 28: Gráfico em barra mostrando a porcentagem de contração da fenilefrina, na ausência do carvacrol, na presença e após lavagem e recuperação do órgão em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com o endotélio removido e endotélio intacto.

Figura 29: Registro original da ação do carvacrol em anel de artéria mesentérica superior isolada de rato.

Figura 30: Gráfico em barra mostrando os valores da % de relaxamento, promovidos por adições de carvacrol (3×10^{-4} M).

Figura 31: Efeito Vasorrelaxante induzido por carvacrol curva concentração-resposta (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio e pré-contraído com Fenilefrina 10 μ M (■), U46619 1 μ M (▲) e KCl 80 mM (●).

Figura 32: Gráfico em barra mostrando valores de pD₂ e Efeito Máximo para os resultados obtidos pela % de relaxamento frente os diferentes agentes contracturantes.

Figura 33: Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional na presença de $[K^+]_e = 4$ mM (■) ou $[K^+]_e = 20$ mM (▲).

Figura 34: Influência do TEA (3 mM), um bloqueador não-específico dos canais para K⁺ no efeito vasorelaxante induzido por carvacrol. Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (10 μ M) (■) e na presença de TEA (3 mM) (▲).

Figura 35: Curva concentração-resposta para CaCl₂ na ausência de carvacrol (■) e na presença de concentrações isoladas de carvacrol (M).

Figura 36: Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio vascular, pré-contraído com FEN 10 μ M (■) ou S(-)-Bay K 8644 200 nM (▲).

Figura 37: Registro original da ação do carvacrol [10^{-4} M] em anel de artéria mesentérica superior isolada de rato, mostrando seu efeito sobre a entrada de cálcio por ROC e SOC.

Figura 38: Registro original da ação do carvacrol [3×10^{-4} M] em anel de artéria mesentérica superior isolada de rato, mostrando seu efeito sobre a entrada de cálcio por ROC e SOC.

Figura 39: Gráfico em barra mostrando os valores de % de Contração em resposta ao CaCl_2 (10^{-2} M), na ausência e presença da nifedipina e do carvacrol, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, com o endotélio removido.

Figura 40: Gráfico em barra mostrando os valores de % de contração em resposta ao CaCl_2 (10^{-2} M), na ausência e presença da nifedipina e do carvacrol, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, com o endotélio removido.

Figura 41: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença de vermelho rutênio ($10 \mu\text{M}$) (▲).

Figura 42: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença de lantânio ($100 \mu\text{M}$) (▲).

Figura 43: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença de gadolíneo ($100 \mu\text{M}$) (▲).

Figura 44: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença de níquel ($100 \mu\text{M}$) (▲).

Figura 45: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença de magnésio ($1,2 \text{ mM}$) (▲).

Figura 46: Registro original representativo ilustrando o efeito de doses crescentes do carvacrol (1; 5; 10; 15 e 20 mg/Kg, i.v.) e cremofor (i.v.) sobre PAS, PAM, PAD e FC, em rato normotenso não anestesiado.

Figura 47: Efeitos do carvacrol sobre Pressão Arterial Média (PAM, mmHg) e Frequência Cardíaca (FC, bpm) em ratos normotensos não anestesiados.

Figura 48: Representação esquemática da provável via de sinalização do efeito vasorelaxante induzido por carvacrol.

LISTA DE TABELAS

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

Tabela 2: Composição da solução Tyrode nominalmente sem cálcio (pH=7,4).

Tabela 3: Composição da solução despolarizante Tyrode com KCl à 20 mM (pH=7,4).

Tabela 4: Composição da solução despolarizante Tyrode com KCl à 60 mM (pH=7,4).

Tabela 5: Composição da solução despolarizante Tyrode com KCl à 80 mM (pH=7,4).

Tabela 6: Composição da solução despolarizante Tyrode com KCl à 60 mM, nominalmente sem cálcio (pH=7,4).

Tabela 7: Valores de % de contração da fenilefrina, na ausência do carvacrol (controle), na presença e após lavagem e recuperação do órgão em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com o endotélio removido e endotélio intacto.

Tabela 8: Valores de pD2 e E_{máx} do efeito do carvacrol, comparando a situação controle *versus* situação em estudo.

Tabela 9: Valores de pD2 e E_{máx} obtida para contrações induzidas por CaCl₂, na presença de concentrações isoladas de carvacrol.

Tabela 10: Valores de pD2 e E_{máx} do efeito do carvacrol, comparando a situação controle *versus* situação em estudo.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	27
2. OBJETIVOS.....	43
2.1 Geral.....	44
2.2 Específicos.....	44
3. MATERIAL.....	45
3.1. Animais.....	46
3.2. Drogas utilizadas.....	46
3.3. Preparações das soluções do carvacrol.....	47
3.4. Soluções fisiológicas.....	47
4. MÉTODOS.....	50
4.1 Estudos <i>in vitro</i>	51
4.1.1. Preparações com artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio funcional	51
4.1.2 Protocolos experimentais utilizando artéria mesentérica superior isolada de rato.....	53
4.1.2.1 Avaliação do efeito do carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>), pré-contraídos com FEN 10 µM.....	53
4.1.2.2 Investigação do efeito do carvacrol em anéis mesentéricos sob tônus intrínseco vascular.....	55
4.1.2.3 Avaliação da reproduzibilidade do efeito vascular induzido por carvacrol e do possível desenvolvimento de taquifilia.....	56
4.1.2.4 Avaliação do efeito de carvacrol em anéis mesentéricos pré-contraídos com diferentes agentes contracturantes.....	57
4.1.2.5 Avaliação da participação de canais para K ⁺ na resposta vasorelaxante induzida pelo carvacrol em artéria mesentérica de rato.....	58
4.1.2.6 Avaliação do efeito de carvacrol sobre o influxo de Ca ²⁺	59
4.1.2.7 Avaliação do efeito de carvacrol sobre as contrações induzidas por	

S(-)- Bay K 8644, um ativador dos canais para cálcio sensíveis a voltagem do tipo L (Ca _v -tipo L).....	60
4.1.2.8 Avaliação do efeito de carvacrol sobre a entrada de Ca ²⁺ por ROC e SOC.....	61
4.1.2.9 Avaliação do efeito de carvacrol sobre a entrada capacitiva de Ca ²⁺ .	63
4.1.2.10 Investigação da participação dos TRPV, TRPA1 e TRPM6 na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol.....	65
4.1.2.11 Investigação da participação dos TRPV2, TRPV4, TRPC3,TRPC6, TRPM3 e TRPM4 na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol.....	66
4.1.2.12 Investigação da participação dos TRPC1, TRPC3, TRPC6, TRPM3, TRPM4 e TRPV4 na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol.....	67
4.1.2.13 Investigação da participação do trocador Na+-Ca2+ na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol.....	68
4.1.2.14 Investigação da participação dos TRPM3, TRPM6 e TRPM7 na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol.....	69
4.2. Estudos <i>in vivo</i>	70
4.2.1 Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados.....	70
4.2.2 Protocolo experimental empregado nos estudos <i>in vivo</i>	71
4.2.2.1 Avaliação do efeito da administração intravenosa do carvacrol sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos Wistar não anestesiados.....	71
4.3 Análise estatística.....	73
5. RESULTADOS.....	74
5.1 Efeito do carvacrol sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos.....	74
5.2 Efeito do carvacrol sobre o tônus intrínseco vascular de anéis mesentéricos.....	76
5.3 Carvacrol parece não induzir dano ao tecido vascular.....	78
5.4 Carvacrol apresenta reproduibilidade de efeito vasorrelaxante.....	80
5.5 Efeito vasorelaxante induzido por carvacrol em anéis mesentéricos estimulados com outros agentes contracturantes.....	82

5.6 Influência dos canais para K ⁺ na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol em artéria mesentérica de ratos Wistar.....	84
5.7 Influência do carvacrol sobre o influxo de cálcio em artéria mesentérica de ratos.....	87
5.8 Efeito do carvacrol sobre o influxo de Ca ²⁺ por canais para Ca ²⁺ sensíveis a voltagem do tipo L.....	89
5.9 Efeito do carvacrol sobre a entrada de Ca ²⁺ por ROC e SOC.....	91
5.10 Efeito do carvacrol sobre a entrada capacitiva de Ca ²⁺ por SOC.....	94
5.11 Efeito do carvacrol sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN na ausência e na presença de vermelho rutênio....	96
5.12 Efeito do carvacrol sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN na ausência e na presença de lantânio.....	97
5.13 Efeito do carvacrol sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN na ausência e na presença de gadolínio.....	98
5.14 Efeito do carvacrol sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN na ausência e na presença de níquel.....	99
5.15 Efeito do carvacrol sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN na ausência e na presença de magnésio.....	100
5.16 Efeitos do carvacrol sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos não anestesiados.....	102
6. DISCUSSÃO.....	105
7. CONCLUSÕES.....	120
8. PERSPECTIVAS.....	122
9. REFERÊNCIAS.....	124

Introdução

1. Introdução

O sistema cardiovascular humano é composto por uma bomba (coração), uma série de tubos de distribuição e coleta (vasos sanguíneos) e um extenso sistema de vasos finos (os capilares) (BERNE et al., 2009) devido a esta extensiva rede de conexões entre artérias, capilares e veias, que as funções celulares, como: regulação da temperatura corporal, manutenção do balanço de fluidos, fornecimento de O₂, desenvolvimento, crescimento, absorção de nutrientes essenciais, remoção celular e de metabólitos, promovem a manutenção da homeostase celular (BERNE et al., 2009, PUSGLEY; TABRIZCHI, 2000).

A pressão arterial (PA) é representada matematicamente, através de um valor de PA não pulsátil, a pressão arterial média (PAM). Esta pressão é a média das pressões sobre o tempo. A PAM pode ser determinada pelo produto do débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica (RVT). A interação dessas variáveis é fornecida pela seguinte equação: PAM = DC x RVP. O DC é definido como a quantidade de sangue bombeado pelo coração a cada minuto, sendo determinado como o produto do volume de ejeção sistólica (VES) pela frequência cardíaca (FC), expresso na equação DC = VES x FC. A PA pode ser influenciada pela ação de drogas sobre uma ou ambas as variáveis (OASTES, 1996; HARDMAN et al., 1996).

Os níveis de PA são controlados através da ação integrada dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino (CAMPAGNOLE; HAIBARA, 2001).

O tônus vascular tem um importante papel na regulação da pressão arterial e distribuição do fluxo sanguíneo entre os tecidos e órgãos do corpo (SONKUSARE et al., 2006). A regulação do tônus da célula muscular lisa vascular (CMLV) é dependente de uma interação entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores (JACKSON, 2000; CRIBBS, 2006). É bem descrito que o estado de contratilidade vascular das células musculares lisas, dentro da parede dos vasos sanguíneos, é regulado pela concentração de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i). Os vasoconstritores agem elevando a [Ca²⁺]_i, bem como, aumentando a aparente sensibilidade ao Ca²⁺ dos processos contráteis na célula muscular lisa. Por outro lado, os vasodilatadores exercem efeitos opostos na [Ca²⁺]_i (LEDOUX et al., 2006).

Os canais iônicos são importantes reguladores da contratilidade do músculo liso, pois funcionam como moduladores do potencial de membrana plasmática e das concentrações de Ca^{2+} no meio intracelular (KEVIN; NELSON, 2005).

As principais vias que levam ao aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em miócitos são canais para cálcio sensíveis a voltagem (Ca_v) e canais catiônicos não-seletivos (ex: TRP), localizados na membrana plasmática, além de canais que levam a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, tais como receptores de rianodina (RyR) ou receptores de trifosfato de inositol (IP_3R), encontrados na membrana do retículo sarcoplasmático (LEDOUX et al., 2006).

É importante salientar que a mobilização de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático através de IP_3Rs e RYRs , em células de músculo liso, pode gerar ondas de Ca^{2+} , o qual é sugestivo de mediar vasoconstrição (JAGGAR et al., 2000; THORNELOE; NELSON, 2005). Paradoxalmente, os transientes de Ca^{2+} gerados pela liberação de Ca^{2+} através de IP_3Rs e RYRs , na forma de “puffs” e “sparks” de Ca^{2+} , respectivamente, em células de músculo liso, podem ativar os canais para K^+ ativados pelo Ca^{2+} (K_{Ca}) promovendo hiperpolarização de membrana limitando a contratilidade do músculo liso (JAGGAR et al., 2000; THORNELOE; NELSON, 2005).

Os Ca_v são considerados a principal via de entrada de Ca^{2+} do meio extracelular para as CMLV (CRIBBS, 2006). Eles consistem em um grande complexo multimérico composto por uma subunidade $\alpha 1$ formadora do poro e outras subunidades menores (β , $\alpha 2\delta$ e γ). A subunidade $\alpha 1$ apresenta quatro domínios (I-IV) homólogos, contendo cada um seis segmentos em α -hélice transmembranares (S1 a S6). Cada domínio contém um sensor de voltagem localizado no segmento S4 que contém resíduos de aminoácidos carregados positivamente. Alças que entram para região transmembranar entre o segmento S5 e S6, contêm quatro resíduos de aminoácidos Glu-Glu-Glu-Glu (EEEE), formando o filtro de seletividade iônica, na parte extracelular do poro (YU; CATTERALL, 2004; SONKUSARE et al., 2006) (Figura 1).

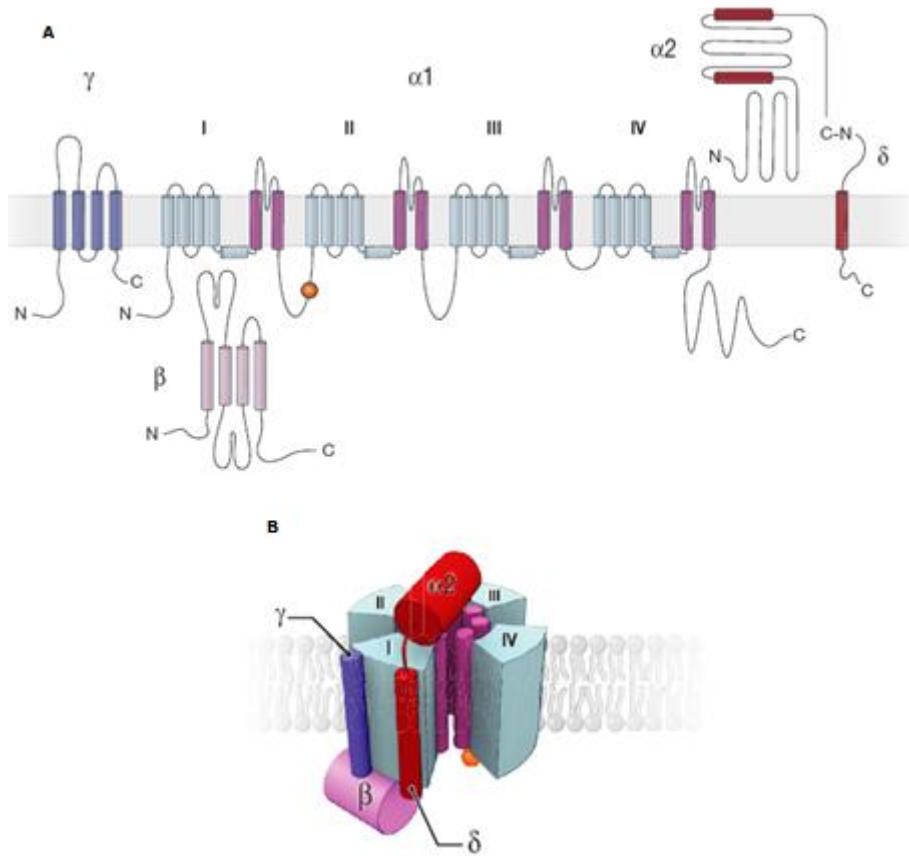


Figura 1: Estrutura molecular do complexo de canais de cálcio (Ca_v). A) Diagrama da topologia da membrana com as subunidades do canal de cálcio $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ , δ . B) Diagrama mostrando a subunidade $\alpha 1$ formando o poro do canal.
 (Adaptado de YU; CATTERALL, 2005; SONKUSARE et al., 2006).

Dez genes humanos codificam a subunidade $\alpha 1$ do Ca_v (subunidade formadora do poro) que se agrupam em três subfamílias distintas, são elas: canais Ca_v1 (1.1 – 1.4), que conduzem correntes tipo-L; canais Ca_v2 (2.1 – 2.3), que conduzem correntes tipo-N, P/Q e R; Canais Ca_v3 (3.1 – 3.3), que conduzem corrente tipo-T (LIPSCOMBE; HELTOM; XU, 2004; YU; CATTERALL, 2004; CRIBBS, 2006).

As células musculares lisas vasculares expressam dois tipos de Ca_v , os Ca_v1 (tipo-L) e os Ca_v3 (tipo-T). Os canais para Ca^{2+} tipo-L são caracterizados por gerar correntes de Ca^{2+} ativadas por altos valores de voltagens, além de apresentarem sensibilidade às diidropiridinas. Quando as CMLV despolarizam, ocorre abertura dos canais para Ca^{2+} tipo-L levando ao aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular,

contração celular e vasoconstrição (CRIBBS, 2006). Entretanto, a hiperpolarização induz fechamento destes canais levando à vasodilatação (JACKSON, 2000).

Os canais para Ca^{2+} tipo-T são ativados em baixos valores de voltagem caracterizados pela sua rápida ativação, correntes transientes de inativação rápida e relativa insensibilidade a agentes que bloqueiam os canais para Ca^{2+} tipo-L (PEREZ-REYES, 2003). Apesar de existirem dados na literatura reportando a presença destes canais nos miócitos vasculares, são os Ca_v tipo-L que parecem ser dominantes na maioria dos leitos vasculares (JACKSON, 2000).

Nelson e colaboradores (1990) relataram que a composição das subunidades formadoras dos Ca_v vasculares são determinantes do tônus vascular e dos níveis de pressão sanguínea. Além disso, estes canais inativam lentamente durante despolarizações sustentadas, de maneira que o influxo de Ca^{2+} através de uma fração de Ca_v é suficiente para mediar a contração induzida por pressão em pequenas artérias, contribuindo desta maneira para auto-regulação dinâmica dos vários leitos vasculares (NELSON et al., 1990, SONKUSARE et al., 2006). Então, o sustentado influxo de Ca^{2+} , por canais Ca_v , induz um nível tônico de vasoconstrição e também cria um modelo excitatório que auxilia na ação de substâncias vasoativas endógenas para melhor modular o diâmetro arterial (SONKUSARE et al., 2006).

Além da importância dos canais permeáveis ao Ca^{2+} , como os Ca_v , para manutenção de várias funções celulares, incluindo as cardiovasculares, outros canais, tais como os canais para K^+ , também são essenciais no controle cardiovascular.

Os canais de K^+ são reguladores importantes do tônus arterial e com isso, do diâmetro dos vasos sanguíneos. A abertura dos canais de K^+ nas células musculares lisas levam ao aumento no efluxo de K^+ , causando repolarização ou hiperpolarização do potencial de membrana. Estes eventos culminam com o fechamento dos canais para Ca^{2+} , podendo levar à vasodilatação (NELSON; QUAYLE, 1995; THORNELOE; NELSON, 2005). Os canais de K^+ são classificados em quatro subgrupos segundo as normas de nomenclatura da União Internacional de Farmacologia: Canais sensíveis a voltagem (K_v), canais ativados por Ca^{2+} (K_{ca}), canais retificadores de entrada (K_{ir}) e canais de dois poros ($\text{K}_{2\text{p}}$). Os K_{ca} são divididos em K_{ca} de pequena condutância (SK_{ca}), K_{ca} de condutância intermediária (IK_{ca}) e K_{ca} de grande condutância (BK_{ca}) (Figura 2). Estes canais estão distribuídos em vários tecidos, incluindo o músculo liso vascular (WEI et al., 2005; GUTMAN et al., 2005; KUBO et al., 2005; GOLDSTEIN et al., 2005).

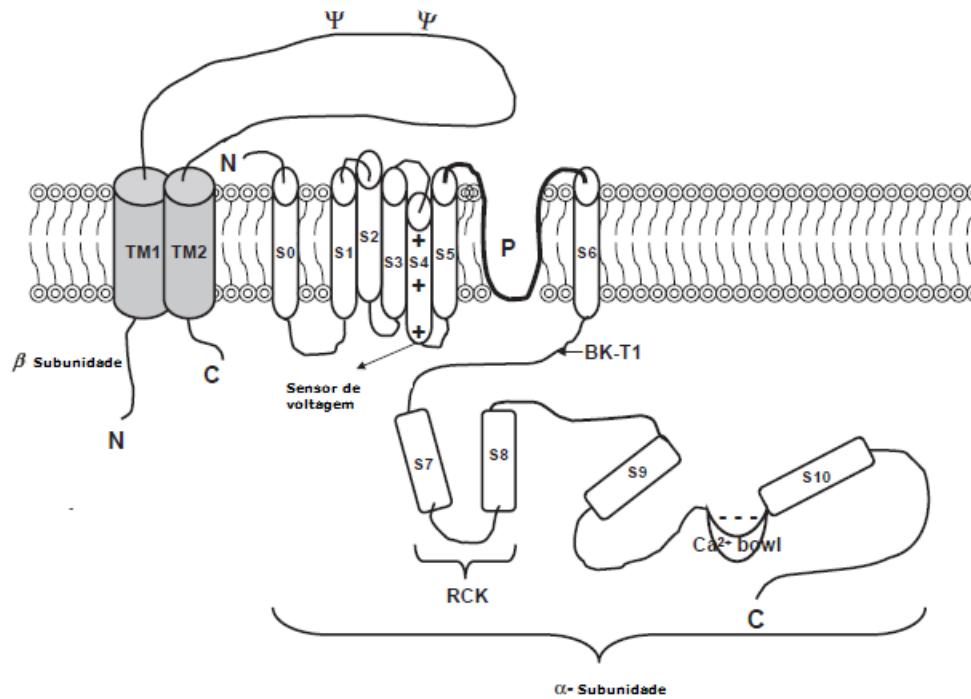


Figura 2: Representação esquemática da estrutura da α e β subunidades do BK_{Ca} , mostrando a região N-terminal, domínios S0-S6, região do poro, domínios S7-S10, sítio de ligação do cálcio, a longa região C-terminal da subunidade α e domínios TM1 e TM2 da subunidade β (Adaptado de GHATTA et al, 2006).

Além dos Ca_V , com funções bem estabelecidas, existe atualmente uma nova família de canais permeáveis ao Ca^{2+} conhecida por Canais Potencial Receptor Transiente (TRP). Desde sua descoberta, inicialmente no sistema visual de *Drosophila* (COSENS; MANNING, 1969 Apud MINKE, 2006), os Canais potencial receptor transiente (TRP) tem atraído uma crescente atenção por serem os únicos canais de entrada de Ca^{2+} ativados por estímulos variados e associados a diversas funções fisiológicas (CLAPHAM, 2003). Os canais TRP receberam esse nome, devido, ao serem ativados, permitirem o influxo majoritário de cargas positivas, para a célula, gerando uma despolarização transitória, chamada de potencial receptor, podendo ou não vir a gerar um potencial de ação (CLAPHAM, 2003).

Os canais TRP são canais catiônicos formados por quatro subunidades ou tetrâmeros e cada subunidade ou monômero apresenta em sua estrutura seis domínios transmembranar com uma alça de poro entre o quinto segmento (S5) e sexto segmento

(S6). Além de apresentarem grupamentos N e C terminais localizados intracelularmente (CLAPHAM et al., 2005; VANNIER; et al., 1998). A formação do poro se dá pela junção das alças de poro, formando o poro central. Podendo este vir a formar homotetrâmeros ou heterotetrâmeros (HOFMANN et al., 2002). Esta arquitetura assemelha-se com a superfamília dos canais catiônicos dependentes de voltagem, no entanto os resíduos de aminoácidos carregados positivamente, característica dos canais sensíveis a voltagem, não estão preservados na maioria dos membros desta família (INOUE et al., 2006) (Figura 3).

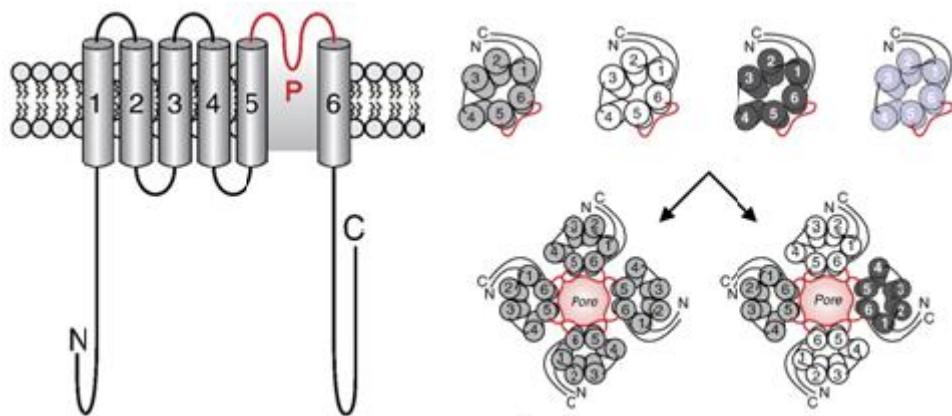


Figura 3: Representação esquemática da estrutura de um monômero mostrando os seus seis segmentos transmembranares e a formação de um canal TRP, como também as possíveis formações de tetrâmeros (Homo- ou Hetero-) (Adaptado de FIRTH; REMILLARD; YUAN 2007).

A superfamília de canais TRP é dividida em dois grupos (MONTELL, 2005; PHELPS; GAUDET, 2007), sendo o grupo 1 dividido em cinco subfamílias (TRPC, TRPV, TRPM, TRPN, TRPA) e o grupo 2 em duas subfamílias (TRPP, TRPML) (VENKATACHALAM; MONTELL, 2007) (Figura 4). Esta divisão é baseada segundo suas sequências e diferenças topológicas (MONTELL; RUBIN, 1989). O grupo 1 carrega uma forte sequência homológica e a maior região abrange os seis segmentos transmembranares incluindo o poro que é formado entre o quinto e sexto segmento (MONTELL; BIRNBAUMER; FLOCKERZI, 2002). Já o grupo 2 se diferencia por suas proteínas compartilhar em uma diferença na sequência homológica dos segmentos

transmembranares e também conter uma longa alça de aminoácidos entre o primeiro e o segundo domínio transmembranares (PALMER; AYDAR; DJAMGOZ, 2005).

Nos mamíferos foram encontrados 28 membros de TRPs pertencentes às subfamílias A, C, M, ML, P e V (MONTELL, 2005; PHELPS; GAUDET, 2007). Seis subfamílias de proteínas compreendem a superfamília de TRPs em mamíferos: Os TRP clássicos (TRPC), os TRP receptores de vanilóide (TRPV), os TRP melastatinas (TRPM), os TRP muculipinas (TRPML), os TRP ancrinas (TRPA1) e os TRP policistinas (TRPP) (MONTELL, 2005).

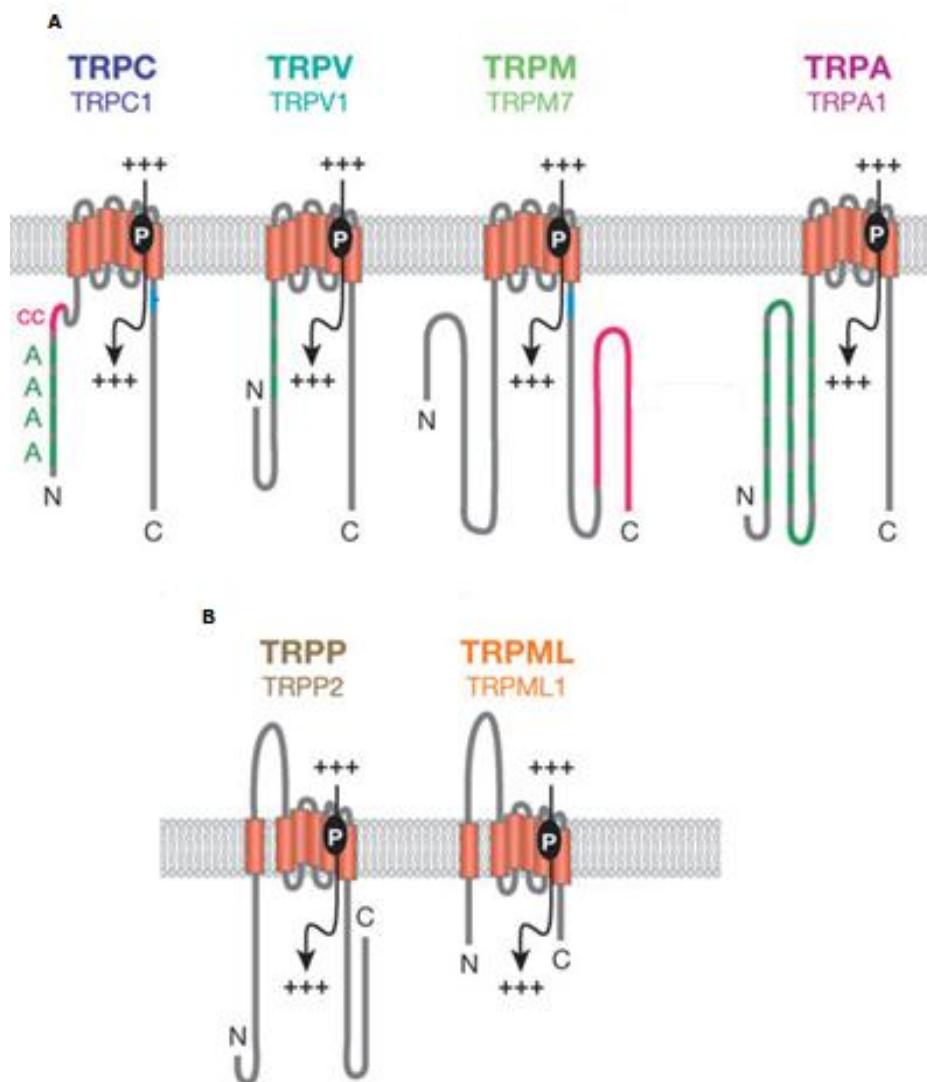


Figura 4: Estrutura esquemática simplificada das seis subfamílias de canais TRPs em mamíferos. a) Grupo 1, b) Grupo 2 (Adaptado de VENKATACHALAM; MONTELL, 2007).

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

Além disso, é relatado na literatura que os canais TRP desempenham diversas funções no sistema cardiovascular, tais como vasoconstrição, vasodilatação via liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, produção de óxido nítrico na célula endotelial, proliferação de células musculares lisas, respostas miogênicas, sendo ainda os possíveis candidatos a canais operados por estoques (SOCs), canais de Ca^{2+} mecanosensíveis (MSCC) e canais operados por receptor (ROCs) (INOUE et al., 2006).

Dentre os fatores que podem ativar os canais TRP podemos citar: receptores acoplados à proteína G, agentes picantes (capsaicina), lipídeos, ácidos, calor, estresse de cisalhamento, hipoosmolaridade, estresse oxidativo, elevação de Ca^{2+} intracelular, exposição à temperaturas baixas ou agentes resfriantes, tais como mentol e icilin (INOUE et al., 2006; CLAPHAM et al., 2005).

Vale salientar que até então, foram detectados mais de 10 membros distintos da superfamília dos canais TRP, onde sua presença foi observada nos neurônios sensitivos que inervam a musculatura lisa vascular, nas células endoteliais e nas células muscular lisa vascular, como por exemplo, os TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPM3, TRPM4, TRPM6, TRPM7, TRPM8, TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6 e o TRPA1 (INOUE et al., 2006; YANG et al., 2006, EARLEY; GONZALES; CRNICH, 2009, WATANABE et al., 2008).

Dentre os TRP presentes no músculo liso vascular, o TRPC1 é postulado como um canal de cálcio operado por estoque (SOC). Estes canais estão envolvidos na reestocagem de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (DIETRICH et al., 2005a) (Figura 4). Adicionalmente, TRPC1 pode ser importante para contração e proliferação da célula muscular lisa vascular (BERGDAHL et al., 2003), bem como um canal catiônico mecanosensível (MAROTO et al., 2005) e um canal ativado por estiramento (SAC) que induz despolarização de membrana para ativar Ca_v nas células musculares lisas (THORNELOE et al., 2005).

Os TRPC3 também são importantes no sistema cardiovascular, pois tem sido descrito que estes canais estão acoplados ao trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1), ativo em células musculares cardíacas, neuronais e células endócrinas. Este trocador é capaz de modular os sinais de Ca^{2+} celulares de uma maneira bidirecional, tais que aumentando a entrada de Na^+ por canais TRPC3 eventualmente leva-se a operação em modo reverso do NCX, resultando em um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular, uma diminuição de Na^+ e subsequente inibição do Ca_v e reestocagem de Ca^{2+} nos estoques intracelulares (ROSKER et al., 2004; EDER et al., 2005). Estes aspectos podem ser importantes nas células musculares lisas onde ambas as proteínas estão expressas.

O TRPC4 é vastamente expresso no endotélio vascular (FREICHEL et al., 2001; TIRUPPATHI et al., 2002) e músculo liso (BEECH; MURAKI; FLEMMING, 2004). Pesquisas com camundongos nocautes (- / -) para TRPC4 demonstraram o papel dos TRPC4 como um essencial componente do vasorelaxamento dependente de endotélio de células musculares lisas (FREICHEL et al., 2001; TIRUPPATHI et al., 2002).

Já o TRPC6 foi descrito como um canal operado por receptor (ROC) ativado por diacilglicerol (DAG) (HOFMANN et al., 1999). Os ROCs são abertos em resposta a ativação de receptores membranares acoplados a PLC (Figura 4). Existem vários estudos evidenciando um papel importante dos TRPC6 nas células musculares lisas vasculares e pulmonares. Por caracterização biofísica comparativa e supressão de genes, TRPC6 foi sugerido por ser molecularmente correlacionado ao canal catiônico não seletivo ativado por $\alpha 1$ -adrenoceptores em células musculares lisas vasculares (INOUE et al., 2001) e canais catiônicos ativados por 5-HT e vasopressina em células musculares lisas de aorta da linhagem A7r5 (JUNG et al., 2002). Adicionalmente, TRPC6 tem sido proposto por desempenhar um papel crítico na despolarização induzida por pressão intravascular e contração de pequenas artérias e arteríolas (WELSH et al., 2002) conhecido como efeito *Bayliss*. Recentemente, foi observado que a perda de função de TRPC6 levaria a diminuição do tônus vascular e das vias aéreas, concomitantemente reduzindo a contratilidade das vias aéreas e causando hipotensão (DIETRICH et al., 2003, 2005b), efeitos importantes para o tratamento de enfermidades tais como a hipertensão arterial e pulmonar.

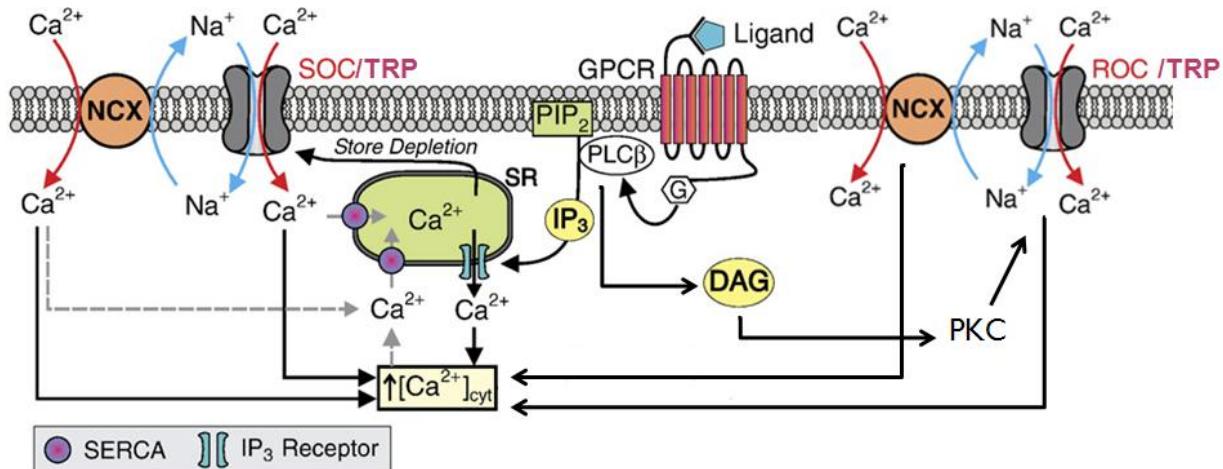


Figura 5: Estrutura esquemática da entrada de Ca^{2+} pelos canais TRPCs (SOC e ROC)
 (Adaptado de FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007).

No que se refere a familia dos TRPV e sua importância no sistema cardiovascular, foi observado que existe um complexo de sinalização de Ca^{2+} envolvendo TRPV4, receptores de rianodina e canais BK_{ca} em músculo liso de arteria cerebral que quando ativado pode levar ao vasorelaxamento (EARLEY et al., 2005). Alem disso, os TRPV1 presentes em neuronios sensitivos de artéria mesentérica, quando ativados levam a liberação do peptideo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) que induz relaxamento vascular (ZYGMUNT et al., 1999). Também foi descrito em artéria mesentérica de rato a presença dos TRPV2 e TRPV4 (INOUE, et al., 2006).

A família de TRPM consiste de 8 genes (TRPM1 – 8). O canal TRPM3 sua expressão foi observada no RNAm de artéria mesentérica (INOUE 2006), já o TRPM4 é principalmente permeável a cátions monovalentes e ativados por aumento de Ca^{2+} intracelular, além de exibir uma pronunciada modulação por voltagem (LAUNAY et al., 2002; HOFMANN et al., 2003; LIU; LIMAN, 2003; NILIUS et al., 2003; PRAWITT et al., 2003; LAUNAY et al., 2004; NILIUS et al., 2005a), porém TRPM4 é um canal catiônico não permeável ao Ca^{2+} (CLAPHAM et al., 2005) sendo expresso no tecido mesentérico de rato (INOUE et al., 2006). O TRPM7 é um canal catiônico constitutivamente ativado e pode ser inibido por Mg^{2+} livre intracelular (NADLER et al., 2001; RUNNELS; YUE; CLAPHAM, 2001), esse canal permeia Mg^{2+} e Ca^{2+} (RUNNELS; YUE; CLAPHAM, 2001), a literatura mostra também que uma diminuição na sua expressão ajuda a manter um estado hipertensivo (FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007). Tanto os RNAm

como as proteínas de TRPM6 e de TRPM7 foram isoladas de brônquios, artéria mesentérica e aorta (CHUBANOV et al., 2004; HE et al., 2005). O TRPM8, ativado pelo mentol, foi recentemente descrito em vários vasos sanguíneos tais como: artérias mesentérica, femoral, caudal e aorta. Foi evidenciado que em vasos pré-contraídos, agonistas de TRPM8 causaram uma pronunciada vasodilatação por ativarem diretamente estes canais na célula muscular lisa, podendo contribuir, desta forma, para manutenção do tônus vasomotor quando ativado (JOHNSON et al., 2009).

A identificação desses canais só foi possível a partir de estudos com produtos naturais, onde foi estudado suas funções sobre os sistemas biológicos e um dos produtos naturais mais promissores nesses estudos foram os monoterpenoides (CALIXTO et al., 2005).

O interesse pela natureza como fonte de agentes quimioterápicos potenciais é muito grande. Os produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todos os fármacos em uso clínico no mundo. Nos últimos quarenta anos, pelo menos alguns fármacos potentes foram extraídos de plantas (GURIB-FAKIM, 2006).

A literatura vem nos mostrando que os monoterpenos são substâncias classicamente conhecidas por atuarem como Agonistas e Antagonistas de canais TRP (PEIER et al., 2002). Onde os monoterpenos são hidrocarbonetos extraídos de óleos essenciais, sendo formado a partir de uma unidade básica, o isopreno [$\text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2$]. E são constituídos de duas unidades isoprênicas (10 átomos de carbono).

Vários monoterpenos apresentam ações sobre o sistema cardiovascular como a exemplo a Rotundifolona (GUEDES; SILVA; BARBOSA-FILHO 2002-2004), o α -terpineol (RIBEIRO, 2008), o citronelol (BASTOS et al., 2009), o timol (PEIXOTO-NEVES et al., 2009) e o carvacrol (AYDIN et al., 2007; PEIXOTO-NEVES et al., 2009). E como exemplo de Monoterpenos atuando sobre canais TRP temos o mentol que é classicamente conhecido por ativar canais TRPM8 (CALIXTO et al., 2005), a cânfora que ativa TRPV3 (MACPHERSON et al., 2006) e inibe o TRPL (PARNAS, et al., 2009), o eucaliptol que ativa o TRPM8 (CALIXTO et al., 2005), o borneol que inibe o TRPL (PARNAS, et al., 2009) o timol que ativa o TRPV3 e inibe o TRPL (MACPHERSON et al., 2006; PARNAS, et al., 2009).

O isômero de posição do timol é o carvacrol, que é um fenol monoterpenóide biosintetizado em plantas a partir do γ -terpineno e p-cimeno. Por isso, estes últimos

estão sempre presentes em óleos essenciais que contém carvacrol. Além disso, intermediários biosintéticos também podem estar presentes, como: terpinen-4-ol, álcool cumino e p-cimen-8-ol (BASER; DEMIRCI, 2007).

O carvacrol é encontrado no óleo essencial de *Oreganum vulgare* (TIAN; LAI, 2006) bem como de outras espécies do mesmo gênero como *O. minutiflorum* (SARER, et al., 1996) e *O. onites* (VOKOU; KOKKIMI; BESSIÈRE, 1988), compondo valores acima de 92% do seus óleos essenciais.

O carvacrol é quimicamente denominado 5-isopropil-2-metilfenol e possui fórmula molecular C₁₀H₁₄O e peso de 150,217g/mol (Figura 5). Apresenta-se em forma líquida de coloração amarelo claro, cuja densidade é de 0,98g/mL(20°C). O carvacrol possui característica pungente e odor aromático, semelhante ao orégano, bem como, pouca solubilidade em água. Seu ponto de fusão é de 2°C e seu ponto de ebulição é de 234 – 236°C.

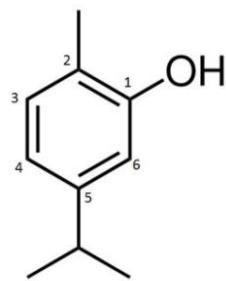


Figura 6: Estrutura química do carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol)

O carvacrol é conhecido por sua atividade antimicrobiana de amplo espectro a qual foi alvo de algumas investigações *in vitro* (DORMAN; DEANS, 2000; LAMBERT et al., 2001) e *in vivo* (ADAM et al., 1998; MANOHAR et al., 2001). Botelho e colaboradores (2007) relataram que carvacrol inibe efetivamente o crescimento de patógenos orais como *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, apresentando atividade antibacteriana e antifúngica e, desta forma, tornando-se útil para a manutenção da higiene oral pela redução do crescimento microbiano.

Ainda em 2007, Nostro e colaboradores demonstraram que o óleo essencial do orégano e seus constituintes (carvacrol) inibiram o crescimento de biofilmes pré-formados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e interferiram com a formação desses biofilmes durante o crescimento planctônico. O óleo essencial de *O. onites* e seus principais constituintes (carvacrol), demonstraram uma potente atividade

contra os protozoários *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzii*, *Leishmania donovani* e *Plasmodium falciparum* (TASDEMIR et al., 2006).

Estudos recentes também relataram atividade larvicida e ovicida do óleo essencial de *L. sidoides* (OELs) (carvacrol) contra larvas de *Aedes aegypti* e contra larvas e ovos do nematódeo *Haemonchus contortus* (CARVALHO et al., 2003; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007).

O efeito anticarcinogênico do carvacrol foi relatado (HE et al., 1997) onde esse estudo demonstrou que o monoterpeno suprimiu a proliferação e promoveu o início da apoptose das células do melanoma B16 (F10) em camundongos. Além disso, mais tarde foi descrito que o carvacrol possui atividade antiproliferativa *in vitro* e *in vivo*, bem como atividade antiplaquetária *ex vivo* através da inibição da produção do tromboxano A2 (TXA2) e expressão do receptor GP IIb/IIIa. Essa propriedade parece estar relacionada à sua atividade antioxidante, haja vista a capacidade de inibição da cicloxigenase plaquetária pelos agentes antioxidantes (KARKABOUNAS et al., 2006).

Muitos óleos essenciais exibem atividade antioxidante e antiinflamatória (BARATTA et al., 1998; BURT, 2004). O carvacrol pertence a classe dos antioxidantes naturais mais ativos encontrados nos óleos essenciais (YANISHLIEVA, 1999; RUBERTO; BARATTA, 2000). Com o uso do ensaio do ácido aldeído/carboxílico, o monoterpeno mostrou uma forte atividade antioxidante inibindo a oxidação do hexanal em quase 100% por 30 dias na concentração de 5 µg/mL (LEE et al., 2005). Sua atividade antioxidante foi comparável aos antioxidantes conhecidos, α-tocoferol e hidroxitolueno butilado (BHT).

Em experimentos com células de hepatoma e de colo uterino, células Caco-2 e V79 de fígado de hamster, carvacrol não foi capaz de danificar o DNA. Ao contrário, este composto forneceu proteção contra danos induzidos por peróxido de hidrogênio (SLAMENOVA et al., 2007). Isto sugere que carvacrol possui um efeito protetor benéfico para o ácido nucléico das células.

Ainda com uma possível ligação à atividade antioxidante, foi descoberto que carvacrol é capaz de inibir a atividade da acetilcolinesterase (JUKIC et al., 2007).

Carvacrol também foi capaz de ativar hTRPA1, o que se torna relevante na explicação da sua propriedade pungente (LEE et al., 2008).

Sárközi e colaboradores (2007) demonstraram que o carvacrol foi capaz de inibir a atividade da Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático, bem como de liberar Ca²⁺ através da ativação do receptor de rianodina (RyR1) de músculo esquelético.

Carvacrol mostrou suprimir correntes de cálcio do tipo L em cardiomiócitos de caninos e humanos. Esse efeito bloqueador pode envolver interações com a maquinaria de inativação do canal (MAGYAR et al., 2004).

O óleo essencial de *Carum copticom* relaxa eficazmente a traquéia de cobaia e este efeito foi principalmente atribuído ao carvacrol. Além disso, o efeito relaxante não é promovido pela estimulação de receptores β₂-adrenérgicos, pela inibição de receptores H1 histaminérgicos ou bloqueio muscarínico (BOSKABADY; RAMAZANI; TABEI, 2003; BOSKABADY; JANDAGHI, 2003).

O Carvacrol também apresenta baixa toxicidade, com uma DL₅₀ de 910 mg/kg do peso corporal, quando administrado por via oral a ratos (JENNER et al., 1964).

Outro estudo recente realizado por Aydin e colaboradores em 2007 demonstrou que o carvacrol apresenta efeito hipotensor e bradicárdico em ratos normotensos anestesiados e esse mesmo estudo demonstra que carvacrol não foi capaz de promover um efeito vasorrelaxante em preparações de aorta, porém Peixoto-Neves e colaboradores (2009) demonstraram que o carvacrol promove efeito vasorrelaxante em aorta provavelmente por envolvimento da via de cálcio, liberado pelo retículo sarcoplasmático e/ou sensibilidade do Ca²⁺ ao sistema contrátil e também surgerem efeito inibitório sobre o influxo de cálcio através da membrana.

A literatura também nos mostra que o carvacrol é um conhecido ativador dos canais TRP como, por exemplo, os TRPV3 (MACPHERSON et al., 2006) e TRPA1 (VOGT-EISELE et al., 2007) e em um estudo de relevante importância publicado em 2009 por Parnas e colaboradores mostrou que o carvacrol é um novo inibidor dos canais de *Drosophila* TRPL, como também inibe, em mamíferos, os TRPM7 expressos em células HEK e ectopicamente expressos em uma cultura primária de CA3-CA1 em neurônios do hipocampo do cérebro.

Mais recentemente (EARLEY; GONZALES; GARCIA, 2010) foi visto que o carvacrol em artéria cerebral e cerebelar de rato promove um efeito vasorrelaxante por ativar TRPV3 na camada endotelial e com isso aumentar as correntes de cálcio.

Desse modo, fundamentamos a nossa proposta de trabalho, com base nos estudos até o momento realizados onde o carvacrol apresenta efeitos

farmacologicamente interessantes (BASER, 2008), principalmente sobre o sistema cardiovascular em especial atuando sobre canais TRP.

Entretanto, raros são os relatos na literatura (AYDIN et al., 2007; PEIXOTO-NEVES et al., 2009) que comprovem os efeitos do carvacrol em músculo liso vascular. Sendo o músculo liso vascular uma estrutura importante na fisiopatologia das doenças cardiovasculares, entre elas a hipertensão, torna-se, portanto, de grande necessidade a descoberta de novas substâncias ativas neste músculo para a possível utilização como fármacos.

Como também é relatado que o carvacrol atua como ativador e inibidor de canais TRPs (MACPHERSON et al., 2006; VOGT-EISELE et al., 2007; PARNAS et al., 2009; EARLEY; GONZALES; GARCIA, 2010), onde esses canais tem uma correlação funcional entre sua expressão com as alterações na pressão sanguínea na hipertensão, tornando-os potenciais alvos terapêuticos para o controle da vasoconstrição e proliferação das células musculares lisas vasculares que caracterizam o estado hipertensivo (FIRTH; REMILARD, 2007). Esses fatos em conjunto mostram a importância do estudo das ações do carvacrol sobre o músculo liso vascular em especial sobre canais TRP.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente estudo teve por objetivo avaliar o mecanismo de ação molecular envolvido nos efeitos cardiovasculares induzidos por carvacrol, em animais normotensos, utilizando para este fim uma abordagem *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Específicos

Estudos *in vitro*

- Caracterizar o efeito vasodilatador de carvacrol em artéria mesentérica superior isolada de rato através de medidas de tensão isométrica;
- Avaliar a participação dos canais para Ca^{2+} nos efeitos induzidos por carvacrol;
- Avaliar a ação do carvacrol sobre os canais potencial receptor transiente.

Estudos *in vivo*

- Investigar os efeitos induzidos por carvacrol sobre a pressão arterial (PA) e freqüência cardíaca (FC) de ratos normotensos não anestesiados.

Material

3. Material

3.1 Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, pesando em torno de 250-300 gramas, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes Medeiros da Universidade Federal da Paraíba. Estes animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 horas tendo estes, livre acesso à água e a alimentação. Onde teve um parecer do comitê de ética em pesquisa animal de número 0112/09.



Figura 7: Rato Wistar (*Rattus norvegicus*)

3.2 Drogas Utilizadas

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas: Cloridrato de L-fenilefrina (Sigma), Cloridrato de Acetylcolina (Sigma), 9,11-dideoxi-11 α ,9 α -epoximetano prostaglandina F_{2 α} (U46619) (Sigma), S(-)-Bay K 8644 (RBI/Sigma), Nifedipina (Sigma), Cetamina (Sigma), Xilasina (Sigma), Cloreto de Tetraetilamônio (TEA), Níquel (Fluka), Vermelho de Rutênio (Sigma).

Para a preparação das soluções estoques o S(-)-Bay K 8644 e a Nifedipina foram dissolvidos em etanol absoluto e diluídos em água destilada, de modo a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental. As demais drogas foram dissolvidas em água destilada e as soluções foram mantidas entre 0 e 4 °C e somente retiradas no momento do experimento.

3.3 Preparação das Soluções do Carvacrol

Este trabalho foi desenvolvido, utilizando-se o Carvacrol (5-Isopropil-2-metilfenol) a 98% obtido da Sigma com referência: 282197-106, lote:540656-487, com fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$, massa molecular 150,217g/mol, densidade 0,98g/ml.

Para a preparação das soluções estoques de Carvacrol, a mesma foi solubilizada em cremofor (0,03g por mL de solução) e diluída em água destilada de modo a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental. As concentrações de cremofor em solução nunca excederam 0,01% e foram previamente testadas, apresentando ausência de efeito farmacológico.

3.4 Soluções Fisiológicas

Para a preparação das soluções fisiológicas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio ($NaCl$) (MERCK), cloreto de potássio (KCl) (MERCK), cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (MERCK), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) (MERCK), glicose ($C_6H_{12}O_6$) (MERCK), bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) (VETEC), fosfato de sódio mono-hidratado ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) (VETEC), Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), Cloreto de Gadolínio Hexahidratado ($GdCl_3 \cdot 6H_2O$), Cloreto de Lantânia ($LaCl_3 \cdot 6H_2O$).

As tabelas a seguir mostram as composições das várias soluções utilizadas:

Soluções fisiológicas para anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Tabela 1: Composição da solução Tyrode (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
$NaCl$	158,3
KCl	4,0
$CaCl_2$	2,0
$MgCl_2$	1,05
$NaHCO_3$	10,0
NaH_2PO_4	0,42
Glicose	5,6

Fonte: TANAKA et al., 1999.

Tabela 2: Composição da solução Tyrode nominalmente sem cálcio (pH=7,4)

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

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

Tabela 3: Composição da solução Tyrode despolarizante com KCl à 20 mM (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	142,3
KCl	20,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

Tabela 4: Composição da solução Tyrode despolarizante com KCl à 60 mM (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

Tabela 5: Composição da solução Tyrode despolarizante com KCl à 80 mM (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	82,3
KCl	80,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

Tabela 6: Composição da solução Tyrode despolarizante com KCl à 60 Mm, nominalmente sem cálcio (pH=7,4)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

Métodos

4 . MÉTODOS

Ensaio Farmacológicos

Foram utilizadas duas diferentes formas de abordagem, uma com ensaios farmacológicos *in vivo*, utilizando animais normotensos, e outra *in vitro*, utilizando a artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso. Todos os animais eram sacrificados, seguindo as normas de cuidados com animais, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB, parecer nº 0112/09.

4.1 Estudos *in vitro*

4.1.1 Preparações de artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio funcional

Os Ratos Wistar machos foram eutanasiados por concussão cerebral seguida de secção dos vasos cervicais. Através de uma incisão no abdome do animal a artéria mesentérica superior foi identificada, removida e esta foi colocada em uma placa de Petri contendo solução nutritiva Tyrode, aerada com uma mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) a uma temperatura de 37 ± 1°C sendo livre de tecido conectivo e adiposo, após essa dissecação do vaso este foi seccionado em anéis (1 – 2 mm). Os anéis de artéria mesentérica foram suspensos por fios de algodão, colocados em cubas para órgãos isolados com capacidade para 10 mL e submetidos a uma tensão constante de 0,75 g por um período de estabilização de 1 hora, sendo a solução nutritiva substituída a cada 15 minutos para prevenir contra a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970). A tensão do músculo foi registrada isometricamente através de um transdutor de força (AVS), acoplado a um sistema de aquisição (AVS) (Figura 8).

Duas contrações tônicas submáximas à fenilefrina (FEN) 10 µM, as quais se estabilizaram em torno de 15 minutos, foram obtidas. Uma terceira curva foi obtida e o carvacrol foi adicionado cumulativamente à cuba. Os resultados foram expressos levando em consideração que a contração induzida por FEN corresponde a 100 % e

que a tensão de repouso é igual a 0%. Os anéis sem endotélio foram obtidos mecanicamente através do atrito com haste de metal entre as paredes internas do vaso.

A presença de endotélio funcional foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de 10 μM de acetilcolina (ACh). Foram considerados anéis com endotélio (E+), os anéis com relaxamento superior a 90% sobre a pré-contração com FEN. Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10%, foram considerados sem endotélio (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Anéis com relaxamentos entre 10 e 90% foram descartados dos protocolos experimentais.

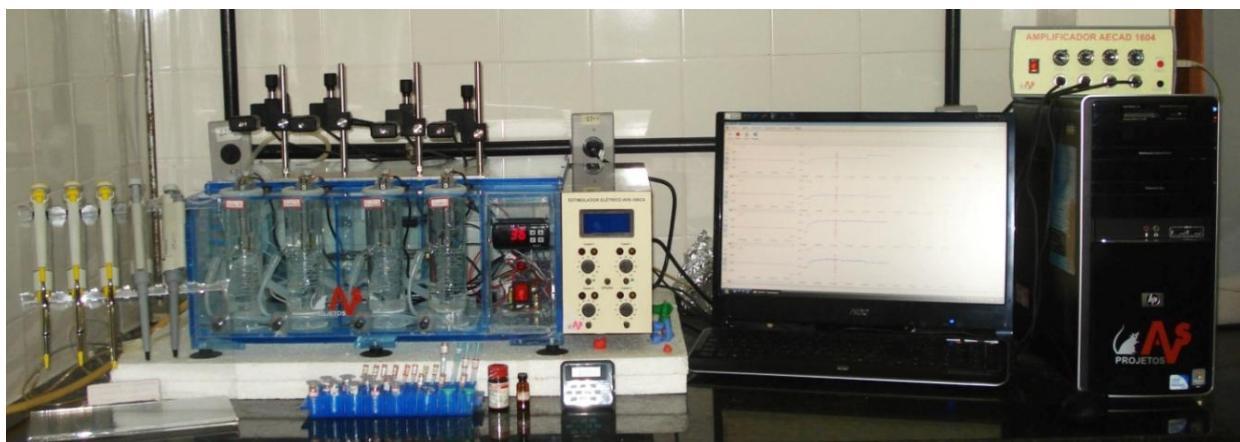


Figura 8: Aparato utilizado para os experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

4.1.2 Protocolos experimentais utilizando artéria mesentérica superior isolada de rato

4.1.2.1 Avaliação do efeito do carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN 10 µM

Nestes experimentos, após um período de estabilização de 60 minutos, concentrações crescentes de carvacrol (10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} M), foram adicionadas nas preparações de anéis com endotélio funcional intacto ou em anéis desprovidos do endotélio funcional, ambos, pré-contraídos com fenilefrina (FEN) na concentração de 10 µM (Figura 9). Anéis sem endotélio funcional foram obtidos como descrito anteriormente no protocolo 4.1.1. As respostas obtidas na ausência do endotélio foram comparadas com àquelas obtidas em condições onde o endotélio funcional se fazia presente nas preparações. Após esse tratamento, para avaliar um possível dano tecidual induzido por carvacrol, lavagens sucessivas com solução Tyrode foram feitas e um novo período de estabilização esperado, em seguida adicionou-se ao banho fenilefrina (FEN) na concentração de 10 µM para demonstrar a completa recuperação do órgão. Após a obtenção das curvas concentração-resposta, foram analisados os valores de pD_2 (-log CE_{50}) e $E_{máx}$ (Efeito Máximo) das curvas individuais na presença e na ausência do endotélio funcional (para detalhes, ver tópico referente à análise estatística).

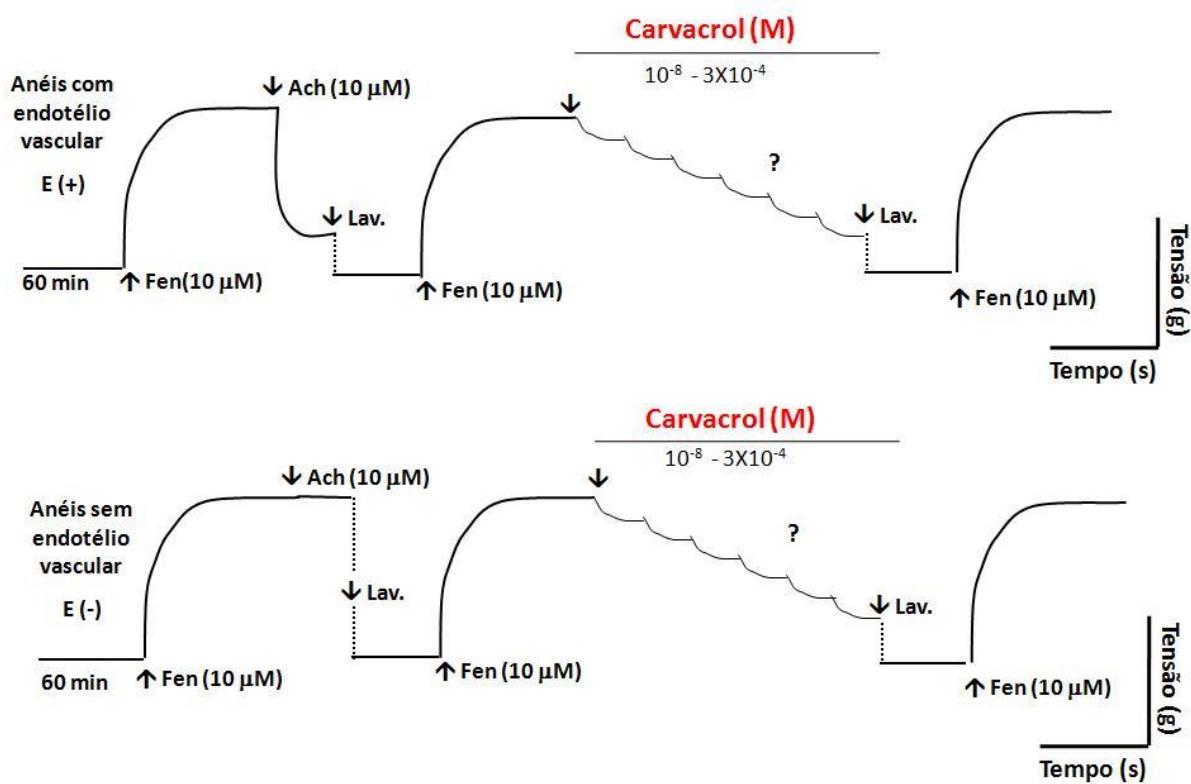


Figura 9: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de carvacrol ($10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com endotélio vascular e na ausência do mesmo, pré-contraídos com FEN (10 μ M) e o teste de contratilidade do órgão.

4.1.2.2 Investigação do efeito do carvacrol em anéis mesentéricos sobre o tônus intrínseco vascular

Após a verificação da presença ou ausência do endotélio vascular como descrito anteriormente, a cuba foi lavada e com a estabilização do tônus, concentrações crescentes de carvacrol (10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} M), foram adicionadas nas preparações de anéis com endotélio funcional intacto ou em anéis desprovidos do endotélio funcional, ambos no tônus basal, com a finalidade de avaliar o efeito do carvacrol sobre o tônus muscular espontâneo (Figura 10). Em seguida após esse tratamento, avaliou-se um possível dano tecidual como descrito anteriormente, para demonstrar a completa recuperação do órgão.

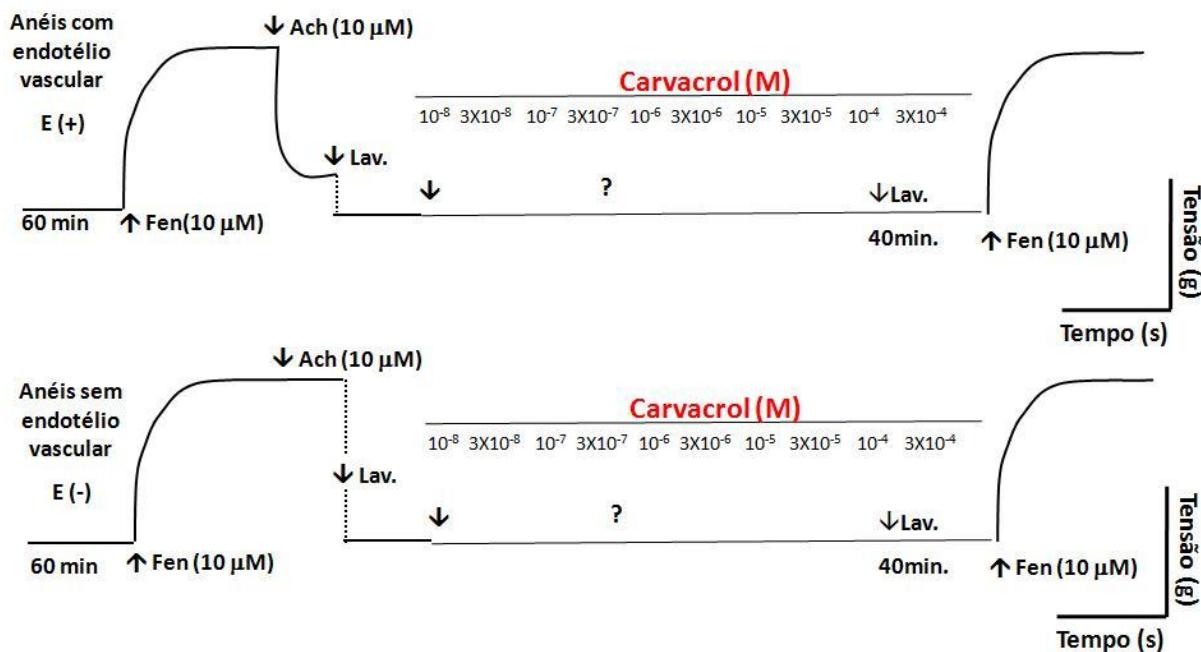


Figura 10: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, no tônus muscular espontâneo e posteriormente recuperação do órgão.

4.1.2.3 Avaliação da reprodutibilidade do efeito vascular induzido por carvacrol e do possível desenvolvimento de taquifilaxia

Este protocolo foi desenvolvido para avaliar se os efeitos vasculares de carvacrol em anéis mesentéricos, pré-contraídos com FEN, desenvolvem taquifilaxia. Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina ($10 \mu\text{M}$) e em seguida carvacrol ($3 \times 10^{-4} \text{ M}$) foi adicionado para induzir relaxamento nos anéis mesentéricos. Esse procedimento foi repetido várias vezes sempre alternando com lavagens sucessivas com a solução Tyrode, avaliando desta forma a reprodutibilidade do efeito relaxante induzido por carvacrol. A percentagem de relaxamento induzida pelo carvacrol foi calculada pela comparação da resposta antes e após a adição do mesmo (Figura 11).

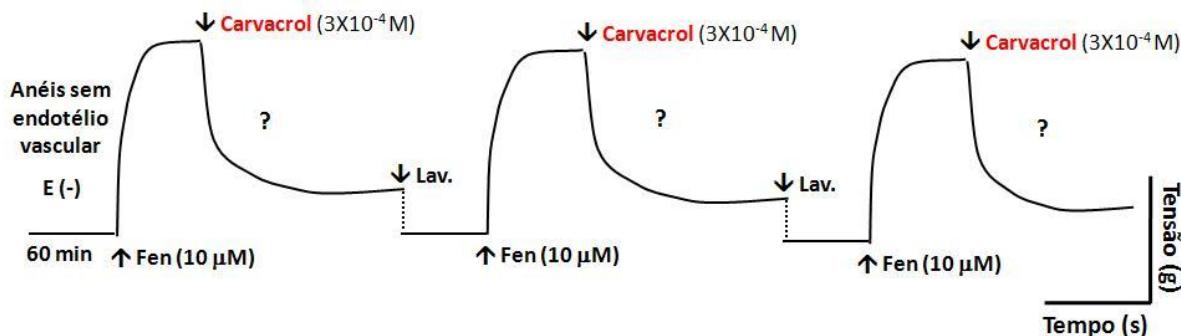


Figura 11: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da reprodutibilidade do efeito de carvacrol ($3 \times 10^{-4} \text{ M}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN.

4.1.2.4 Avaliação do efeito de carvacrol em anéis mesentéricos pré-contraídos com diferentes agentes contracturantes

Este protocolo foi desenvolvido para avaliar o efeito do carvacrol em anéis mesentéricos pré-contraídos com diferentes agentes contracturantes, cujo mecanismo de ação difere da ativação α_1 -adrenérgica induzida por FEN para gerar aumento de tensão. Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, carvacrol foi adicionado cumulativamente (10^{-8} - 3×10^{-4} M) aos anéis pré-contraídos com a solução Tyrode despolarizante em altas concentrações de potássio (KCl 80 mM) que gera uma despolarização que induz uma contração por aumento do influxo de Ca^{2+} extracelular através de canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L e T (GODFRAIND; MILLER; WIBO, 1986; SOMLYO; SOMLYO, 1994; BRIGGS, 1962; NELSON et al., 1988) como também essa contração sustentada é promovida por canais TRP (RATZ; BERG, 2006) (Tabela 5) e U46619 (1 μM), um agonista tromboxânico. A percentagem de relaxamento induzido pelo carvacrol foi calculada pela comparação da resposta antes e após a adição do mesmo. Os valores de pD_2 e $E_{\text{máx}}$ foram obtidos para comparação da resposta com o controle (Figura 12).

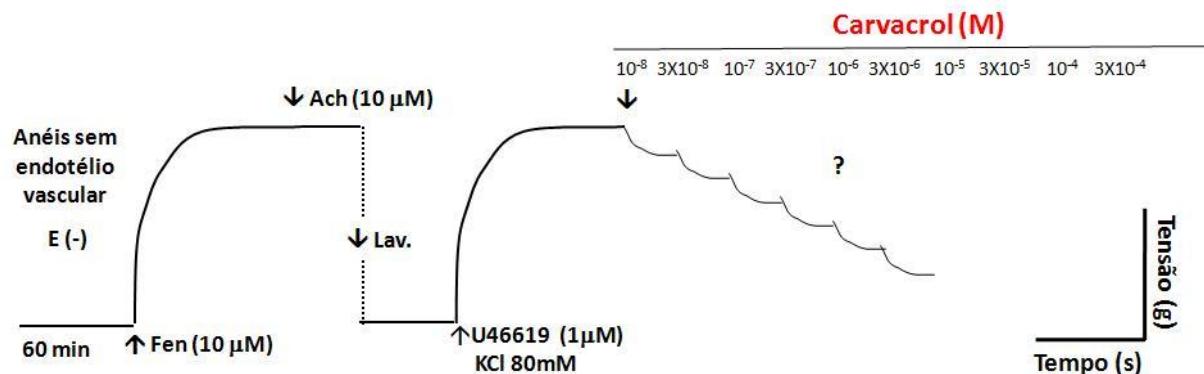


Figura 12: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com diferentes agentes contracturantes.

4.1.2.5 Avaliação da participação de canais para K⁺ na resposta vasorelaxante induzida pelo carvacrol em artéria mesentérica de rato

Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, a solução Tyrode (Tabela 1) das cubas foi trocada pela solução despolarizante Tyrode com KCl (20 mM) (Tabela 3) e as preparações permaneceram nesta solução até o final do experimento. Este procedimento impede parcialmente o efluxo de K⁺ e atenua relaxamentos mediados por abertura de canais para K⁺ (CLARK; FUCHS, 1997; CAMPBELL et al., 1996). Adicionalmente, TEA (3 mM), que nesta concentração é um bloqueador não seletivo dos canais para K⁺ (WANG et al., 2007), foi adicionado em preparações diferentes. Decorridos 30 minutos da incubação com solução de KCl 20 mM ou TEA, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (10 µM) e, em seguida, uma curva concentração-resposta para carvacrol foi obtida. Os valores pD₂ e E_{máx} foram obtidos e comparados na ausência (controle) ou na presença de KCl 20 mM e TEA (3 mM) (Figura 13).

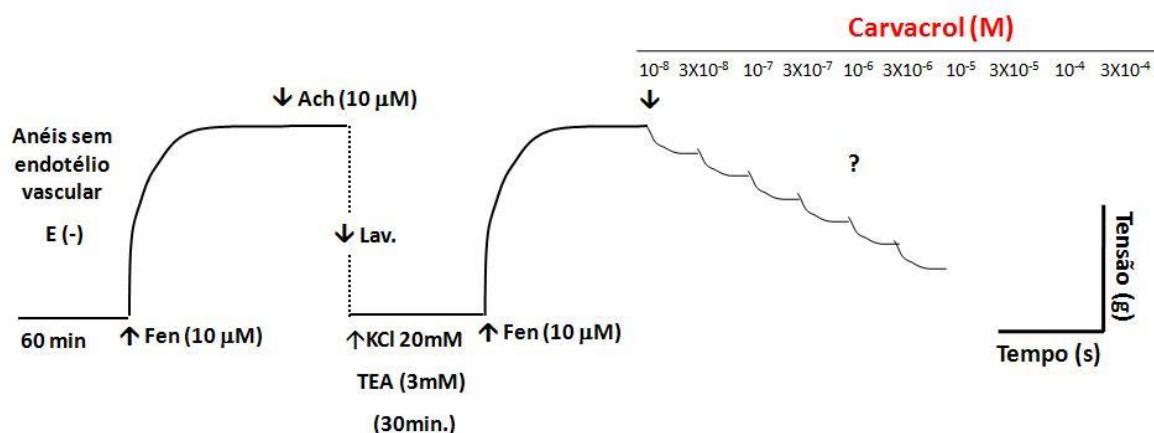


Figura 13: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de canais para K⁺ na resposta vasorelaxante induzida pelo carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional.

4.1.2.6 Avaliação do efeito de carvacrol sobre o influxo de Ca²⁺

Este protocolo foi realizado para avaliar se a diminuição do influxo de cálcio para célula muscular lisa seria um mecanismo utilizado pelo carvacrol para causar efeito vasorelaxante. Para avaliar esta hipótese, anéis mesentéricos de ratos foram expostos a uma solução despolarizante de KCl 60 mM (Tabela 4) e em seguida foram lavados com solução Tyrode nominalmente sem Ca²⁺ (Tabela 2), onde permaneceram nesse meio por 15 minutos. Após esse período, o meio foi trocado por uma solução despolarizante de KCl 60 mM nominalmente sem Ca²⁺ (Tabela 6). A ausência de Ca²⁺ foi inferida pela falha da solução despolarizante nominalmente sem Ca²⁺ em produzir vasoconstricção. Posteriormente, foi obtida uma curva concentração-resposta ao CaCl₂ (10^{-6} – 10^{-2} M) (curva controle).

O processo foi novamente repetido, no entanto, previamente, concentrações isoladas de carvacrol (3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} M) foram incubadas às preparações juntamente com a solução despolarizante de KCl 60 mM, nominalmente sem Ca²⁺ e uma nova curva concentração resposta ao CaCl₂ (10^{-6} – 10^{-2} M) foi obtida. O efeito do carvacrol sobre as contrações induzidas por CaCl₂ foi avaliado comparando-se as curvas de CaCl₂ na ausência (controle) e na presença do carvacrol (Figura 14).

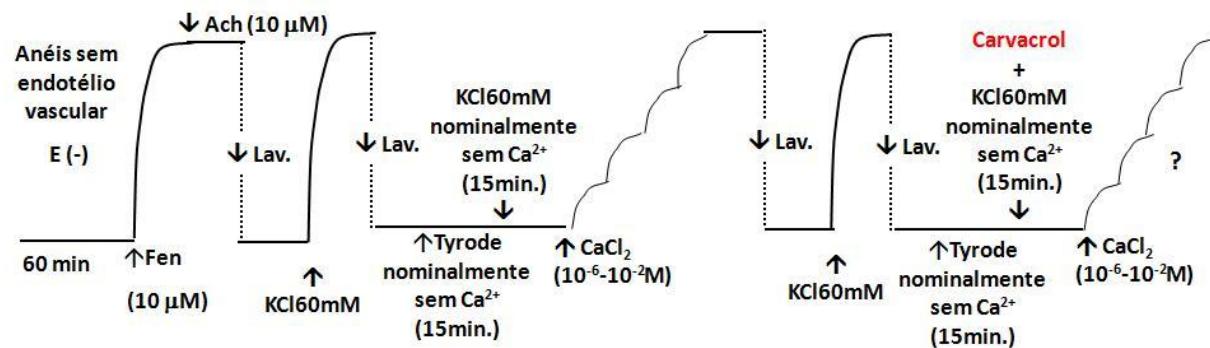


Figura 14: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do carvacrol sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sobre contrações induzidas por concentrações cumulativas de CaCl₂ (10^{-6} – 10^{-2} M) em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca²⁺.

4.1.2.7 Avaliação do efeito de carvacrol sobre as contrações induzidas por S(-)- Bay K 8644, um ativador dos canais para cálcio sensíveis a voltagem do tipo-L (Ca_v-tipo L)

Para avaliar o efeito de carvacrol sobre o influxo de Ca²⁺ através dos canais para Ca²⁺ sensíveis a diidropiridinas (CaV-tipo L), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio funcional, foi utilizado o S(-)-Bay K 8644, um ativador dos canais para Ca²⁺ sensíveis a diidropiridinas (ADACHI-AKAHANES et al., 1999). Devido uma despolarização parcial ser necessária para obtenção da resposta ao S(-)-Bay K 8644, a resposta contrátil a esse agonista foi obtida em meio contendo KCl 20 mM (SCHRAMM et al., 1983; DAVIE et al., 1998).

Após a verificação da ausência de endotélio, as preparações foram expostas a uma solução despolarizante de KCl 20 mM durante 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado o S(-)-Bay K 8644 (200 nM) e após a contração sustentada ter sido alcançada, concentrações crescentes do carvacrol (10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} M) foram adicionadas a cuba de maneira cumulativa (Figura 15).

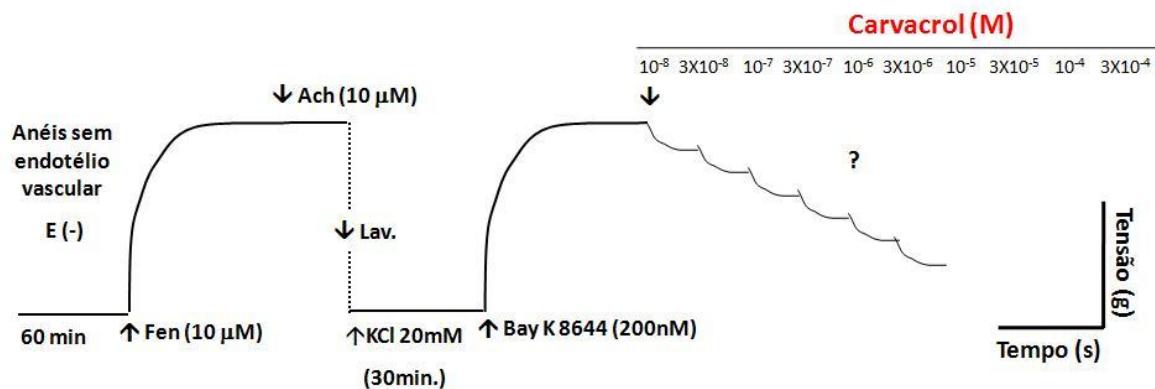


Figura 15: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (200 nM).

4.1.2.8 Avaliação do efeito de carvacrol sobre a entrada de Ca²⁺ por ROC e SOC.

Como bem descrito na literatura, a entrada de Ca²⁺ em vários vasos sanguíneos envolvem canais da família dos TRP, principalmente TRPC1 e TRPC6, sendo estes canais relacionados aos operados por estoques (SOC) e operados por receptor (ROC) (DIETRICH et al., 2005c; HOFMANN et al., 1999). Este protocolo foi realizado para avaliar se o carvacrol influenciou no influxo de Ca²⁺ por via diferente daquela induzida por canais Ca_v, como por exemplo, pela entrada de Ca²⁺ pelos ROCs e SOCs. Inicialmente anéis mesentéricos de ratos foram expostos a uma solução Tyrode nominalmente sem Ca²⁺ (Tabela 2), onde permaneceram nesse meio e contrações repetidas foram induzidas por FEN (10 µM) a fim de depletar os estoques intracelulares e ativar os canais operados por estoques. No meio sem cálcio e na presença de FEN (10 µM) que abre os canais operados por receptor, foi obtida uma contração em resposta ao CaCl₂ (10⁻² M) adicionado na cuba (curva controle) para avaliarmos o efeito da entrada de Ca²⁺. Após a obtenção da contração máxima o meio foi trocado por uma solução Tyrode a fim de restabelecer o meio fisiológico no órgão. Em seguida o procedimento anterior foi repetido e após a depleção dos estoques no meio sem cálcio e na presença de FEN foi incubado nifedipina (1 µM) por 30 minutos, um inibidor dos canais de cálcio sensíveis a voltagem, em seguida uma nova contração induzida em resposta ao CaCl₂ (10⁻² M) foi obtida sem a influência dos Ca_v. Avaliada a entrada de Ca²⁺, o processo foi novamente repetido, sendo que uma concentração isolada do carvacrol (10⁻⁴, 3 x 10⁻⁴ M) foi incubada as preparações juntamente com nifedipina (1 µM) e uma nova contração induzida em resposta ao CaCl₂ (10⁻² M) foi obtida. O efeito do carvacrol sobre a entrada de Ca²⁺ por SOC e ROC foi avaliado comparando-se as curvas de CaCl₂ na ausência da nifedipina (controle) e na presença da nifedipina (Figura 16).

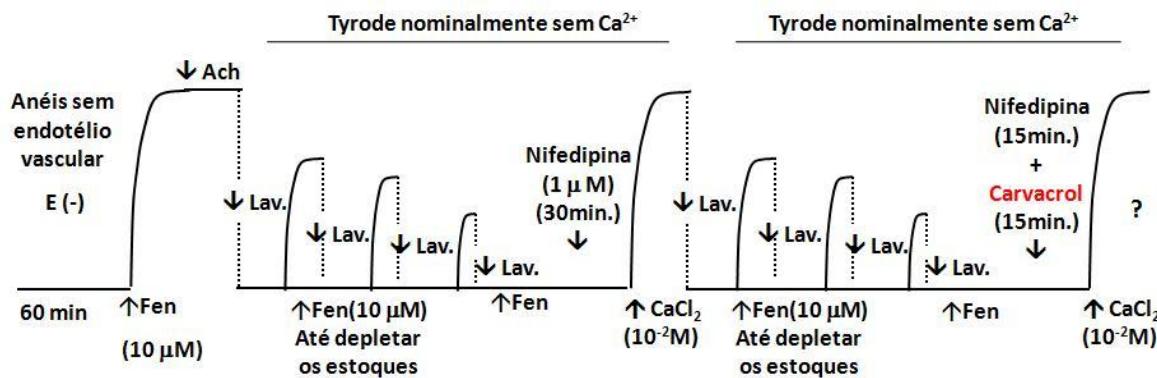


Figura 16: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do carvacrol na entrada de Ca²⁺ por SOC e ROC.

Como um adicional ao protocolo anterior (4.1.2.8) foi realizado esse protocolo para avaliar a influência do carvacrol na entrada de Ca²⁺, por ROC e SOC sem a participação dos CaV, onde o seguinte procedimento foi realizado: Após avaliada a entrada de Ca²⁺, o processo foi novamente repetido, sendo que uma concentração isolada do carvacrol (10^{-4} ou 3×10^{-4} M) foi incubada às preparações sem a nifedipina e uma nova contração induzida em resposta ao CaCl₂ (10⁻² M) foi obtida, em seguida, após estabilizada a contração, a nifedipina (1 μM) foi adicionada à cuba onde pôde-se observar o efeito do carvacrol sobre a entrada de Ca²⁺ por SOC e ROC, sendo comparadas as curvas de CaCl₂ na ausência (controle) e na presença do carvacrol e após adição da nifedipina (Figura 17).

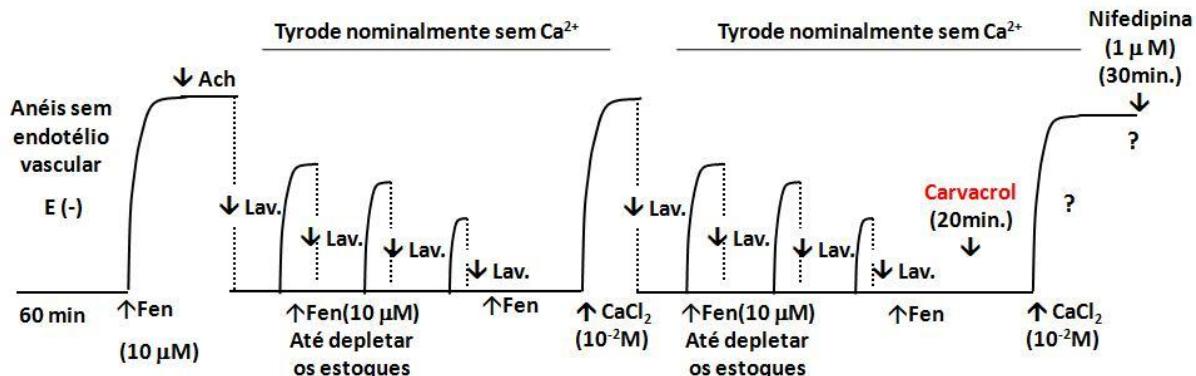


Figura 17: Representação esquemática do protocolo experimental adicional, para avaliação do efeito do carvacrol na entrada de Ca²⁺ por CaV, SOC e ROC.

4.1.2.9 Avaliação do efeito de carvacrol sobre a entrada capacitiva de Ca²⁺.

Como bem descrito na literatura, a entrada capacitiva de Ca²⁺ em vários vasos sanguíneos envolve canais da família dos TRP, principalmente TRPC1, sendo estes canais relacionados aos operados por estoques (SOC) (DIETRICH et al., 2005c). Este protocolo foi realizado para avaliar se o carvacrol influenciou no influxo de Ca²⁺ por via diferente daquela induzida por canais Ca_v, como por exemplo, pela entrada capacitiva de Ca²⁺. Inicialmente anéis mesentéricos de ratos foram expostos a uma solução Tyrode nominalmente sem Ca²⁺ (Tabela 2), onde permaneceram nesse meio e contrações repetidas foram induzidas por FEN (10 µM) a fim de depletar os estoques intracelulares e ativar os canais operados por estoques. O meio foi lavado com solução Tyrode sem cálcio e o líquido foi trocado por uma solução despolarizante de KCl 60 mM nominalmente sem Ca²⁺ (Tabela 6), onde sabe-se que altas concentrações de K⁺, nas células de músculo liso, levam a um aumento do influxo de Ca²⁺ através dos Ca_v (GODFRAIND; MILLER; WIBO, 1986; SOMLYO; SOMLYO, 1994; BRIGGS, 1962; NELSON et al., 1988), como também essa contração sustentada é promovida por canais TRP (RATZ; BERG, 2006), por levar a uma entrada de Ca²⁺ através dos SOC (AY et al., 2004; FELLNER; ARENDSHORST, 2000; USACHEV; THAYER, 1999; WAYMAN et al., 1998), em seguida foi obtida uma contração em resposta ao CaCl₂ (10⁻² M) adicionado na cuba (curva controle) para avaliarmos o efeito da entrada capacitativa de Ca²⁺. Após a obtenção da contração máxima o meio foi trocado por uma solução Tyrode a fim de reestabelecer o meio fisiológico no órgão. O procedimento anterior foi repetido e após a depleção dos estoques no meio despolarizante de KCl 60 mM sem Ca²⁺ foi incubada a nifedipina (1 µM) por 30 minutos, um inibidor dos canais de cálcio sensíveis à voltagem (RATZ; BERG, 2006), em seguida uma nova contração induzida em resposta ao CaCl₂ (10⁻² M) foi obtida, agora sem a influência dos Ca_v. Avaliada a entrada de Ca²⁺ ativada por estoques, o processo foi novamente repetido, sendo que uma concentração isolada do carvacrol (10⁻⁴, 3 x 10⁻⁴ M) foi incubada às preparações juntamente com nifedipina (1 µM) e uma nova contração induzida em resposta ao CaCl₂ (10⁻² M) foi obtida. O efeito do carvacrol sobre a entrada capacitativa de Ca²⁺ foi avaliado comparando-se as curvas de CaCl₂ na ausência da nifedipina (controle) e na presença da nifedipina (Figura 18).

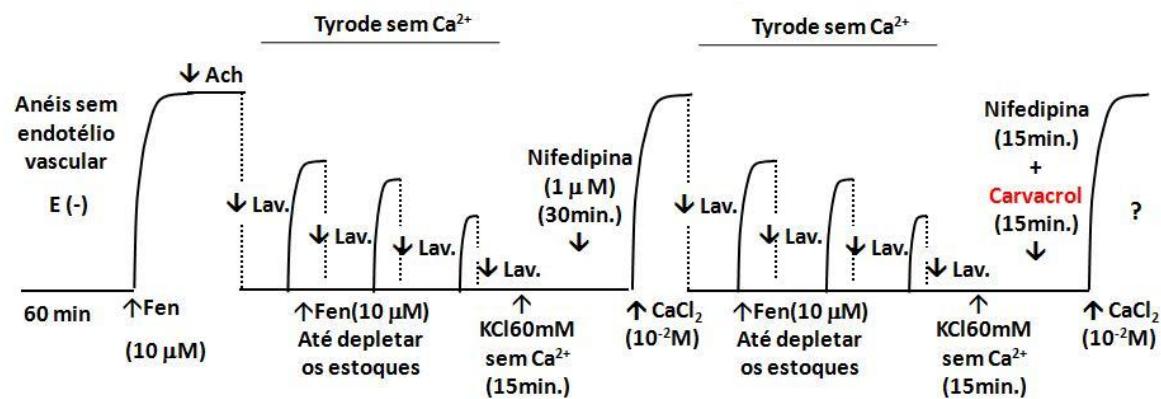


Figura 18: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do carvacrol sobre a entrada capacitativa de Ca^{2+} .

Investigação da participação dos canais potencial receptor transiente (TRP) na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol.

4.1.2.10 Investigação da participação dos TRPV, TRPA1 e TRPM6 na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol.

Para avaliarmos a importância dos canais TRP no efeito vasorelaxante do carvacrol, após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, os anéis mesentéricos de ratos foram pré-tratados, por um período de 30 minutos, com o bloqueador vermelho de rutênio, um bloqueador não-seletivo dos TRPV, TRPA1 e TRPM6 (CLAPHAM; JULIUS; MONTELL; SCHULTZ, 2005). Em seguida, uma nova contração tônica com FEN ($10 \mu\text{M}$) foi obtida. Posteriormente, concentrações crescentes do carvacrol foram adicionadas cumulativamente aos anéis pré-contraídos e obteve-se uma curva concentração-resposta. Os valores pD_2 e $E_{\text{máx}}$ foram obtidos e comparados na situação controle e na presença dos inibidores (Figura 19).

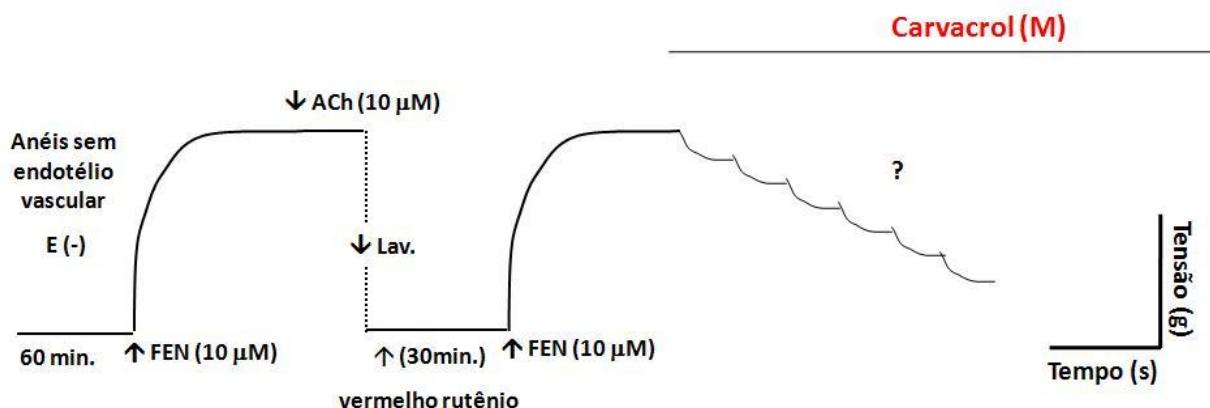


Figura 19: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com vermelho de rutênio.

4.1.2.11 Investigação da participação dos TRPV2, TRPV4, TRPC3,TRPC6, TRPM3 e TRPM4 na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol.

Para avaliarmos a importância dos canais TRP no efeito vasorelaxante do carvacrol, após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, os anéis mesentéricos de ratos foram pré-tratados, por um período de 30 minutos, com o bloqueador íon lantânio (La^{3+}), bloqueador dos TRPV4, 2, dos TRPC6, 3, e dos TRPM3 e 4 (CLAPHAM; JULIUS; MONTELL; SCHULTZ, 2005). Em seguida, uma nova contração tônica com FEN (10 μM) foi obtida. Posteriormente, concentrações crescentes do carvacrol foram adicionadas cumulativamente aos anéis pré-contraídos e obteve-se uma curva concentração-resposta. Os valores pD_2 e $E_{\text{máx}}$ foram obtidos e comparados na situação controle e na presença dos inibidores (Figura 19).

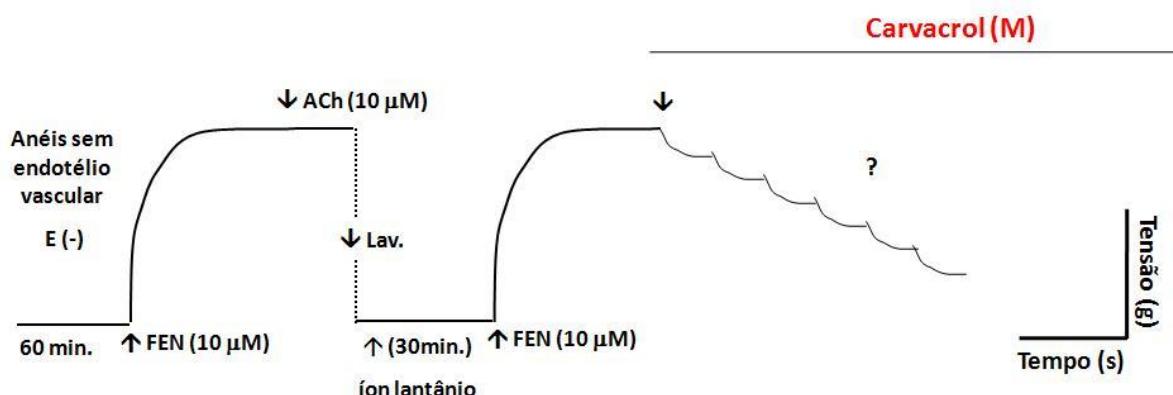


Figura 19: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com íon lantânio.

4.1.2.12 Investigaçāo da participação dos TRPC1, TRPC3, TRPC6, TRPM3, TRPM4 e TRPV4 na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol.

Para avaliarmos a importância dos canais TRP no efeito vasorelaxante do carvacrol, após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, os anéis mesentéricos de ratos foram pré-tratados, por um período de 30 minutos, com o bloqueador íon gadolínio (Gd^{3+}), bloqueador dos TRPC1, 3 e 6, dos TRPM3 e 4 e do TRPV4 (CLAPHAM; JULIUS; MONTELL; SCHULTZ, 2005). Em seguida, uma nova contração tônica com FEN (10 μM) foi obtida. Posteriormente, concentrações crescentes do carvacrol foram adicionadas cumulativamente aos anéis pré-contraídos e obteve-se uma curva concentração-resposta. Os valores pD_2 e $E_{máx}$ foram obtidos e comparados na situação controle e na presença dos inibidores (Figura 19).

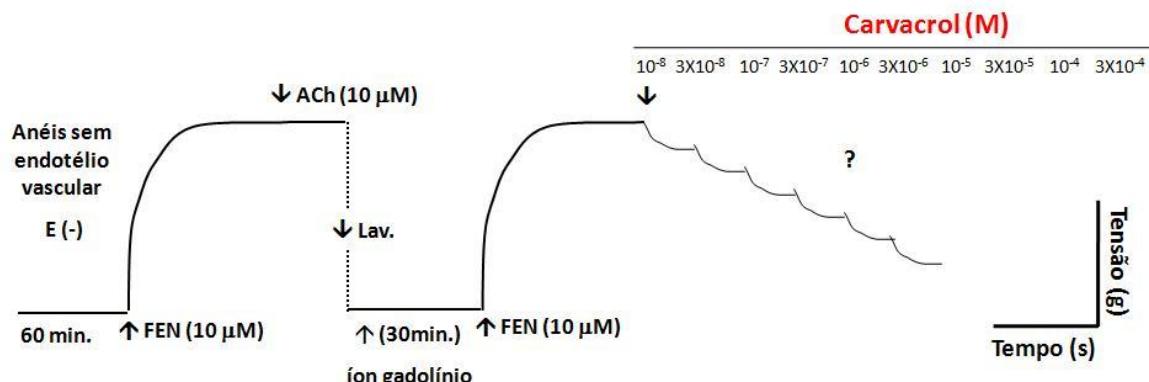


Figura 19: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com íon gadolínio.

4.1.2.13 Investigação da participação do trocador $\text{Na}^+ \text{-Ca}^{2+}$ na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol.

Para avaliarmos a importância do Trocador $\text{Na}^+ \text{-Ca}^{2+}$ (NCX1) no efeito vasorelaxante do Carvacrol, já que tem sido descrito que canais TRPC3 estão acoplados a esse trocador (ROSKER et al., 2004; EDER et al., 2005), após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, os anéis mesentéricos de ratos foram pré-tratados, por um período de 30 minutos, com o íon níquel ($100 \mu\text{M}$), um inibidor dos trocadores $\text{Na}^+ \text{-Ca}^{2+}$ (NCX1). Em seguida, uma nova contração tônica com FEN ($10 \mu\text{M}$) foi obtida. Posteriormente, concentrações crescentes do carvacrol foram adicionadas cumulativamente aos anéis pré-contraídos e obteve-se uma curva concentração-resposta. Os valores de pD_2 e $E_{\text{máx}}$ foram obtidos e comparados na situação controle e na presença dos inibidores (Figura 20).

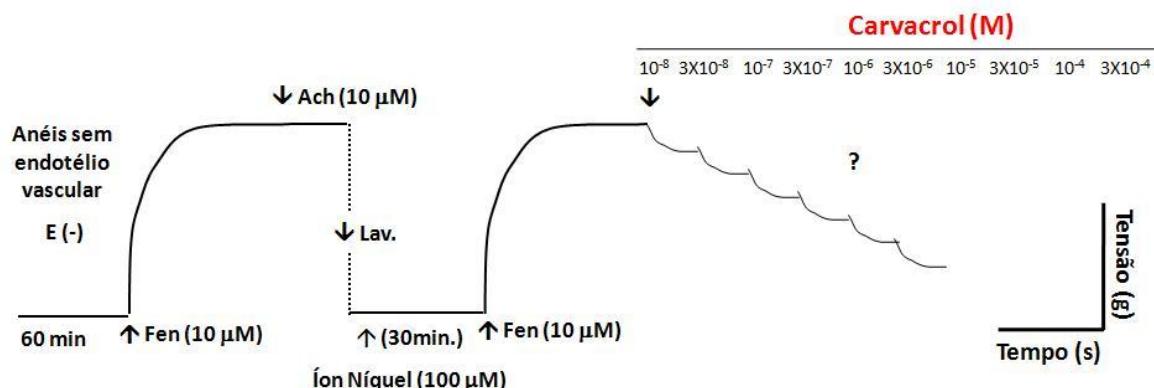


Figura 20: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com o íon níquel.

4.1.2.14 Investigação da participação dos TRPM3, TRPM6 e TRPM7 na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol

Para avaliarmos a importância dos canais TRP no efeito vasorelaxante do carvacrol, após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, os anéis mesentéricos de ratos foram pré-tratados, por um período de 30 minutos, com o bloqueador íon magnésio (Mg^{2+}), bloqueador do TRPM3, 6 e 7 (CLAPHAM; JULIUS; MONTELL; SCHULTZ, 2005). Em seguida, uma nova contração tônica com FEN (10 μM) foi obtida. Posteriormente, concentrações crescentes do carvacrol foram adicionadas cumulativamente aos anéis pré-contraídos e obteve-se uma curva concentração-resposta. Os valores pD_2 e $E_{máx}$ foram obtidos e comparados na situação controle e na presença dos inibidores (Figura 19).

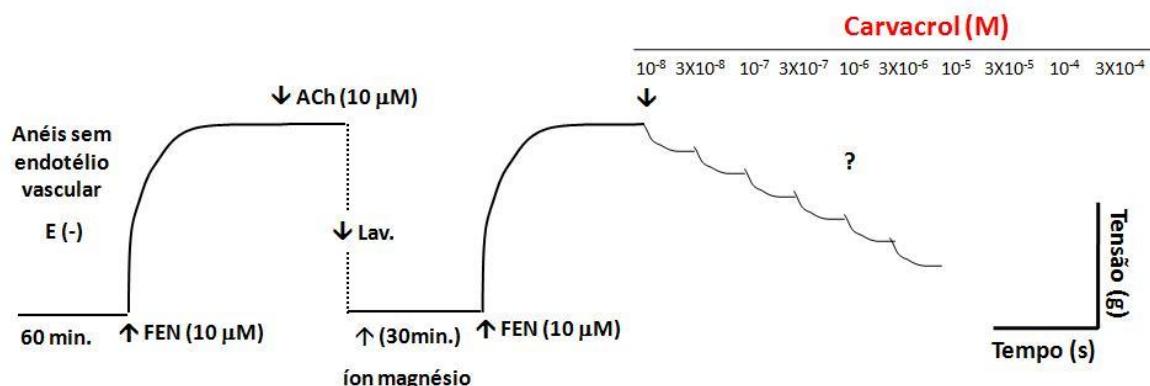


Figura 19: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com íon magnésio.

4.2 Estudos *in vivo*

4.2.1 Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados

Foi utilizada a metodologia de medida direta da pressão arterial (PA) no animal acordado e com livre movimentação descrita por BRAGA (2010), uma vez que está documentado na literatura que a anestesia modifica o funcionamento dos principais sistemas de regulação da pressão arterial, tais como o sistema renina-angiotensina, o sistema nervoso simpático e o baroreflexo (FLUCKIGER et al., 1985; DORWARD et al., 1985), produz depressão de algumas sinapses do sistema nervoso central, alterando as respostas autonômicas (KORNER; LANGSFORD; STARR, 1968; WHITE; MCRITCHIE, 1973; ZIMPFER et al., 1982), além de outros efeitos indesejáveis sobre os sistemas de controle fisiológico da pressão arterial (FLUCKIGER et al., 1985; SMITH; HUTCHINS, 1980).

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (75 mg/kg) + xilazina (20 mg/kg), i.p., e catéteres de polietileno (PE), um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), foram implantados na aorta abdominal e na veia cava inferior, via artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical dorsal do animal.

A PA e a FC foram aferidas 24h após o procedimento cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (BLPR2; WPI, Sarasota, FL, EUA) acoplado a um sistema de aquisição de sinais biológicos (Modelo Lab-Trax 4-24T, WPI, Sarasota, FL, EUA) e conectado a um computador onde foi instalado o programa Data-Trax 2 (WPI, Sarasota, FL, EUA). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 1000 Hz (figura 1). Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou a pressão arterial pulsátil (PAP), média (PAM) e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca). O cateter venoso foi implantado para a administração das drogas (Figura 22).



Figura 22: Aparato utilizado para aquisição de dados de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não anestesiados.

4.2.2 Protocolo experimental empregado nos estudos *in vivo*

4.2.2.1 Avaliação do efeito da administração intravenosa do carvacrol sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos Wistar não anestesiados

Para obtenção de uma curva dose-resposta, os animais foram mantidos em aclimatação por um período de no mínimo 30 minutos, a fim de estabilizar os parâmetros cardiovasculares, seguidos da administração do carvacrol. Foram administradas aleatoriamente diferentes doses de carvacrol (1, 5, 10, 15 e 20 mg/Kg, i.v.) como também a dose máxima com o veículo (Figura 23), onde foi respeitado um intervalo mínimo de 15 minutos entre cada dose afim de permitir o retorno da PA e da FC aos valores basais. Os valores de PAM e FC foram computados antes (valores da linha de base) e após a administração do carvacrol, e seus dados foram expressos em valores absolutos da variação em mmHg e batimentos/min., respectivamente.

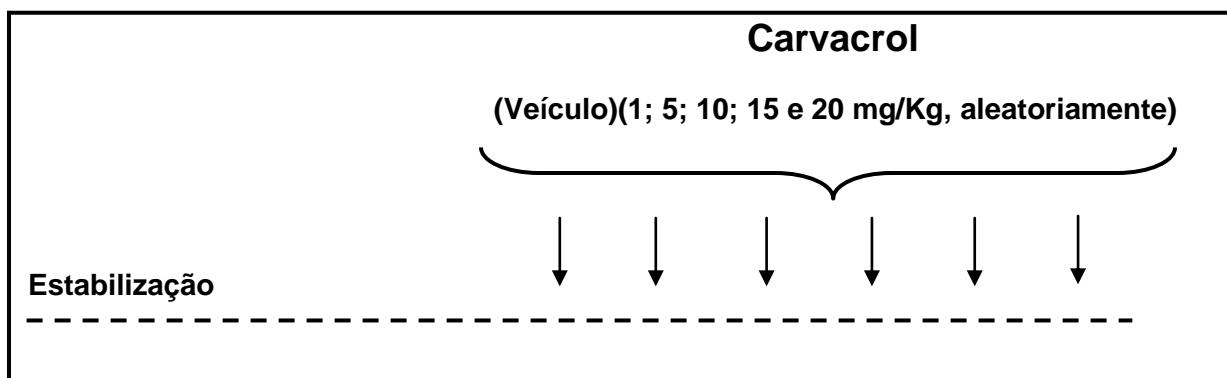


Figura 23: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de carvacrol (1; 5; 10; 15 e 20 mg/Kg, aleatoriamente, i.v.) sobre a PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.

4.3 Análise Estatística

Os valores serão expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). As curvas concentração-resposta serão ajustadas segundo equação logística de quatro parâmetros ou equação de Hill abaixo descrita, onde: Y é a variável dependente, correspondente a percentagem (%) de relaxamento, $Y_{\text{mínimo}}$ é o valor de % de relaxamento mínimo, $Y_{\text{máximo}}$ é o valor de % de relaxamento máximo, $\log CE_{50}$ é o logaritmo da concentração de uma substância que induz 50% do efeito máximo, X é a variável independente, correspondente a concentração de carvacrol e s corresponde a inclinação de Hill:

$$Y = Y_{\text{mínimo}} + \frac{Y_{\text{máximo}} - Y_{\text{mínimo}}}{1 + (10^{\log CE_{50}} / 10^X)^s}$$

Para estudar o efeito vasorelaxante induzido pelo carvacrol, dois parâmetros farmacológicos foram analisados: A eficácia farmacológica ($E_{\text{máx}}$, resposta máxima induzida pela substância) e a potência farmacológica (pD_2 , logaritmo negativo da concentração de uma substância que induz 50% do efeito máximo, $-\log CE_{50}$).

Resultados

5. RESULTADOS

ESTUDOS *in vitro*

5.1 Efeito do carvacrol sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

A administração cumulativa de carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) induziu um vasorelaxamento dependente de concentração em anéis intactos de artéria mesentérica superior isolada de ratos, pré-contraídos com FEN (10 μ M). A remoção do endotélio vascular deslocou a resposta vasorelaxante induzida por carvacrol, com uma diminuição da potência farmacológica, como demonstrado pelos valores de pD_2 obtidos de artérias com endotélio intacto ($pD_2 = 4,59 \pm 0,02$, n = 7) e artérias em que o endotélio foi removido ($pD_2 = 4,36 \pm 0,02$, n = 7 com $p < 0,001$). Também, a percentagem de relaxamento máximo ($E_{máx}$) induzida por carvacrol não foi alterada pela remoção do endotélio, os valores do $E_{máx}$ foram $103,03 \pm 1,5\%$ e $111,03 \pm 4,8\%$ para artérias com ou sem endotélio funcional, respectivamente (Figura 25).

O tempo necessário para que fossem obtidas as respostas máximas para cada concentração de carvacrol variou entre 10 e 15 minutos. No final dos experimentos, a reversão do relaxamento produzido por carvacrol foi conseguida após 30 minutos de sua remoção das cubas, através da troca da solução de Tyrode e verificação da resposta do tecido à FEN (10 μ M). A reversibilidade foi rotineiramente observada para assegurar que o relaxamento do tecido não foi ocasionado por um possível dano tecidual, estando demonstrado no registro original da ação do carvacrol sobre a artéria mesentérica (Figura 24).

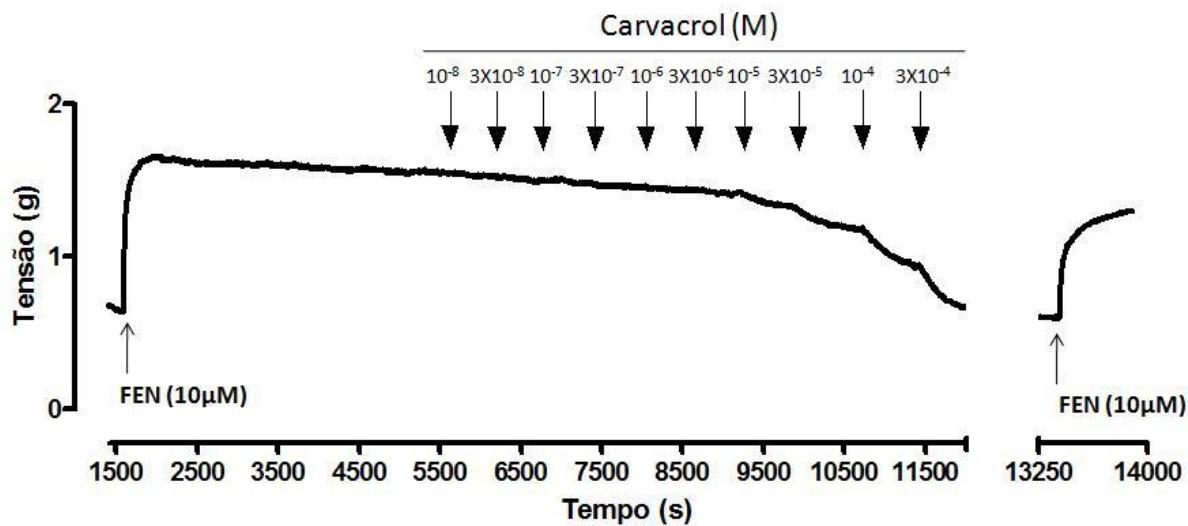


Figura 24: Registro original da ação do carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anel de artéria mesentérica superior isolada de rato, com o endotélio removido e pré-contraído com FEN (10 μ M). As setas indicam o momento da adição das substâncias.

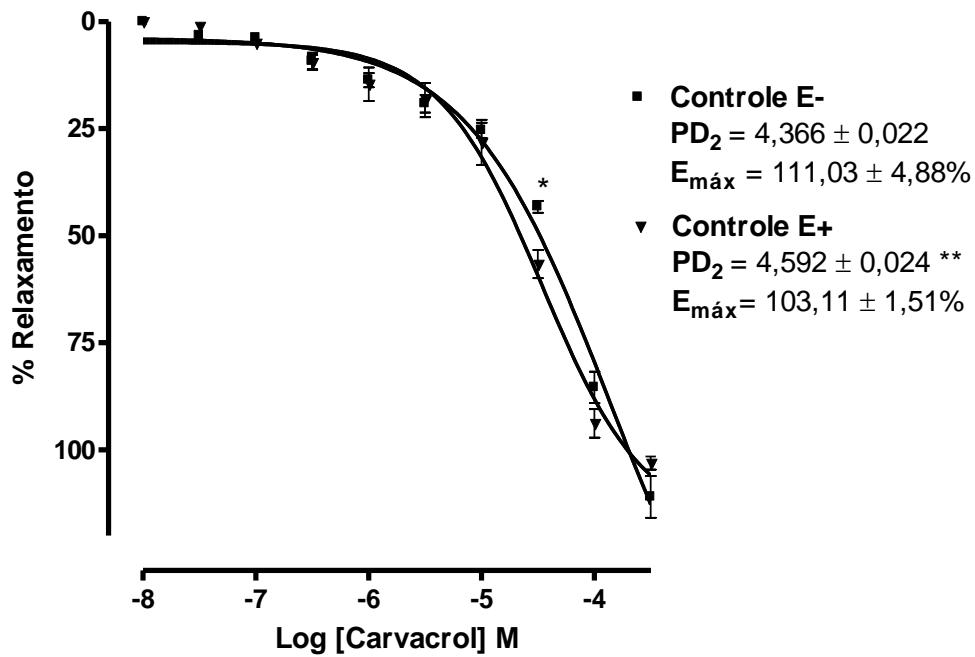


Figura 25: Efeito do carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato. Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com o endotélio intacto (■) ou endotélio removido (▲), pré-contraído com FEN (10 μ M). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. de 10 experimentos. ** $p < 0,001$ vs endotélio intacto.

5.2 Efeito do carvacrol sobre o tônus intrínseco vascular de anéis mesentéricos

A administração cumulativa de carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) nas preparações de anéis com endotélio funcional intacto ou em anéis desprovidos do endotélio funcional, não promoveu efeito sobre o tônus muscular espontâneo (Figura 27).

A reversibilidade foi observada para assegurar que o carvacrol não ocasionou um possível dano tecidual, demonstrado no registro original da ação do carvacrol sobre a artéria mesentérica no tônus vascular (Figura 26).

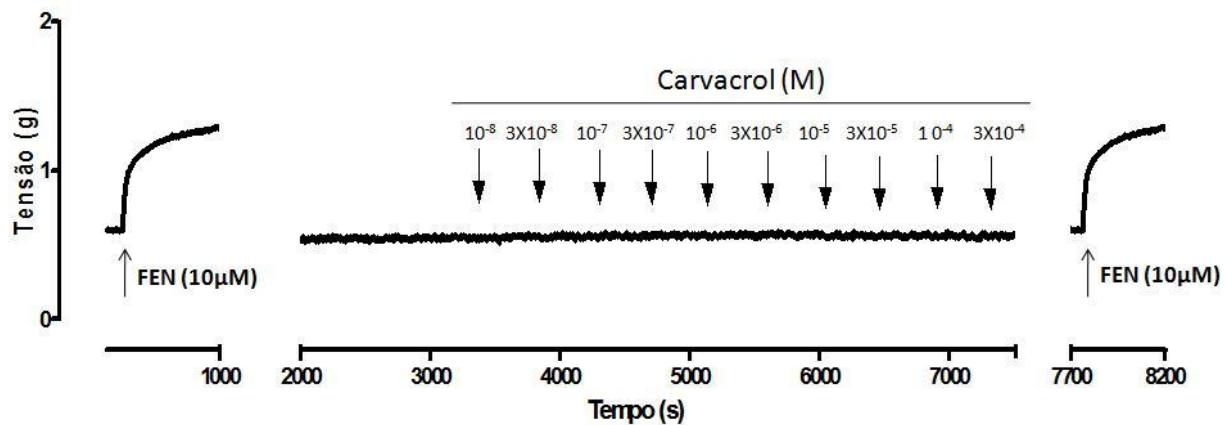


Figura 26: Registro original da ação do carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anel de artéria mesentérica superior isolada de rato, com o endotélio removido, no tônus basal. As setas indicam o momento da adição das substâncias.

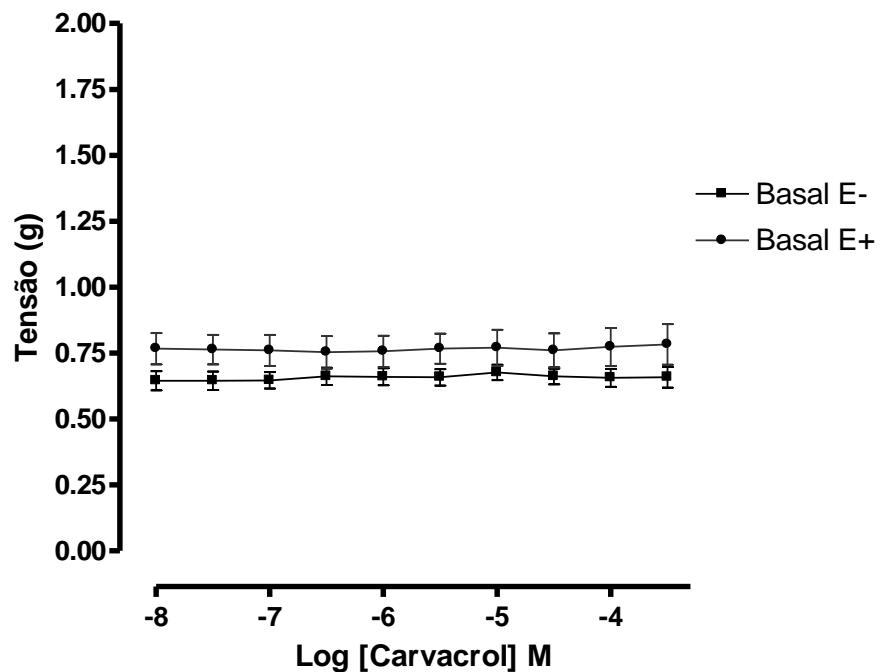


Figura 27: Efeito do carvacrol sobre o tônus basal de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato. Gráfico representativo da ação do carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) com o endotélio intacto (n=6) (■) ou endotélio removido (n=6) (▲), no tônus basal.

5.3 Carvacrol parece não induzir dano ao tecido vascular

Verificou-se o efeito do carvacrol sobre um possível dano tecidual. Para tanto, foi registrada a porcentagem máxima de contração da fenilefrina sobre o tônus basal, em seguida, foi feito um tratamento com carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) onde a amplitude de contração foi registrada e, após esse registro, foi promovida uma reversão da contração e avaliadas as porcentagens de contração. Onde pode-se observar que após o tratamento com carvacrol houve recuperação do órgão (Figura 28 e Tabela 7).

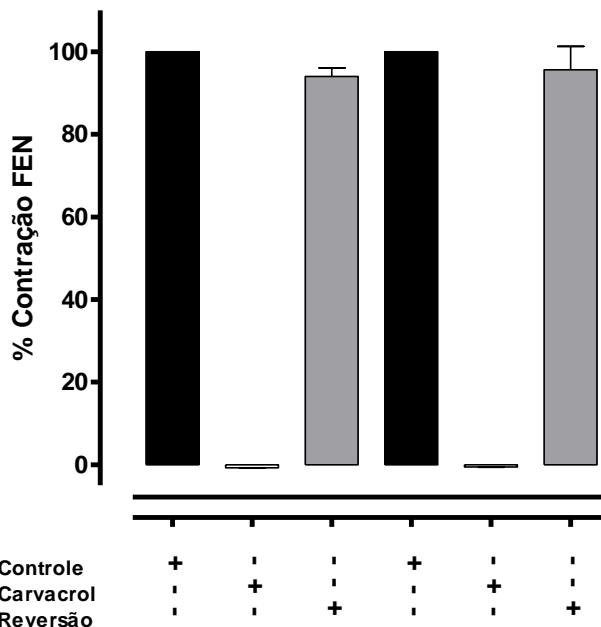


Figura 28: Gráfico em barra mostrando a porcentagem de contração da fenilefrina, na ausência do carvacrol (n=8), na presença (n=8) e após lavagem (n=8) e recuperação do órgão em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com o endotélio removido (E-) e endotélio intacto (E+).

	Controle	Carvacrol	Reversão
E-	100,00 ± 0,0%	-0,71 ± 0,07%	95,00 ± 2,57%
E+	100,00 ± 0,0%	-0,55 ± 0,09%	95,63 ± 5,67%

Tabela 7: Valores de % de contração da fenilefrina, na ausência do carvacrol (controle), na presença e após lavagem e recuperação do órgão em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com o endotélio removido e endotélio intacto.

5.4 Carvacrol apresenta reproduzibilidade de efeito vasorrelaxante

A literatura nos mostra que determinadas substâncias podem desenvolver taquifilia, fenômeno que consiste em menor resposta do tecido após adições sucessivas de uma mesma dose que, geralmente, produz respostas constantes (SWOPE et al., 1999; FERGUSON, 2001). Desta forma foi avaliado o efeito do carvacrol sobre o componente tônico da contração para observar se este efeito foi reproduzível. Onde se observou que o carvacrol não apresentou alterações significativas no efeito relaxante anteriormente observado, sugerindo que o carvacrol não promove taquifilia ($E_{máx}= 91,75 \pm 13,48\%$, $88,12 \pm 6,03\%$, $94,10 \pm 2,99\%$, respectivamente, $n=6$) (Figuras 29 e 30).

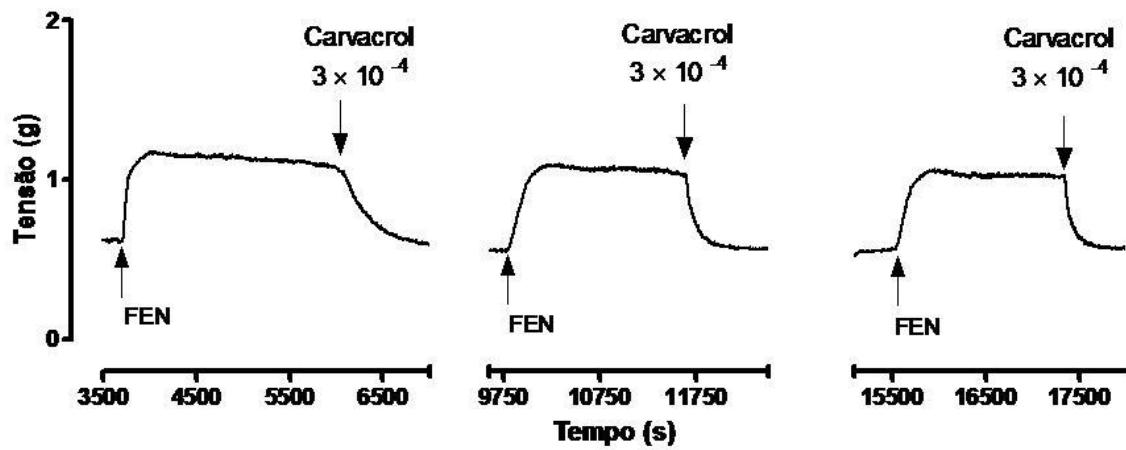


Figura 29: Registro original da ação do carvacrol em anel de artéria mesentérica superior isolada de rato, mostrando que seu efeito é reproduzível e que não desenvolve taquifiliaxia.

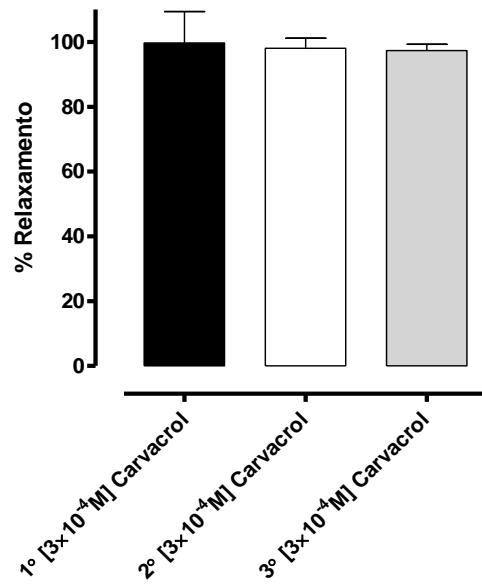


Figura 30: Gráfico em barra mostrando os valores da % de relaxamento, nas três adições de carvacrol ($3 \times 10^{-4} \text{M}$), onde pode-se perceber que o efeito foi reproduzível e que não desenvolveu taquifiliaxia.

5.5 Efeito vasorelaxante induzido por carvacrol em anéis mesentéricos estimulados com outros agentes contraturantes.

Carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) induziu vasorelaxamento dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com solução Tyrode despolarizante (KCl 80 mM). Interessantemente a curva concentração-resposta para carvacrol, em anéis sem endotélio funcional, apresentou alterações significativas nos valores de $pD_2 = 4,12 \pm 0,01$, tendo uma menor potência farmacológica, como também nos valores de $E_{máx} = 94,38 \pm 3,97\%$, $p = 0,017$, $n=10$, sendo uma diminuição significante quando comparados aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN ($pD_2 = 4,372 \pm 0,024$ e $E_{máx} = 111,03 \pm 4,88\%$, $p<0,001$, $n=8$) (Figuras 31 e 32 e Tabela 8).

Já quando os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, foram pré-contraídos com U46619 (1 μ M), agonista tromboxânico, a curva concentração-resposta para carvacrol, em anéis sem endotélio funcional, apresentou alterações significativas nos valores de pD_2 , tendo uma menor potência farmacológica ($pD_2 = 4,22 \pm 0,02$, $E_{máx} = 100,16 \pm 4,57\%$, $n=6$), quando comparados aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN ($pD_2 = 4,372 \pm 0,024$ e $E_{máx} = 111,03 \pm 4,88\%$, $p<0,01$, $n=8$) (Figuras 31 e 32 e Tabela 8).

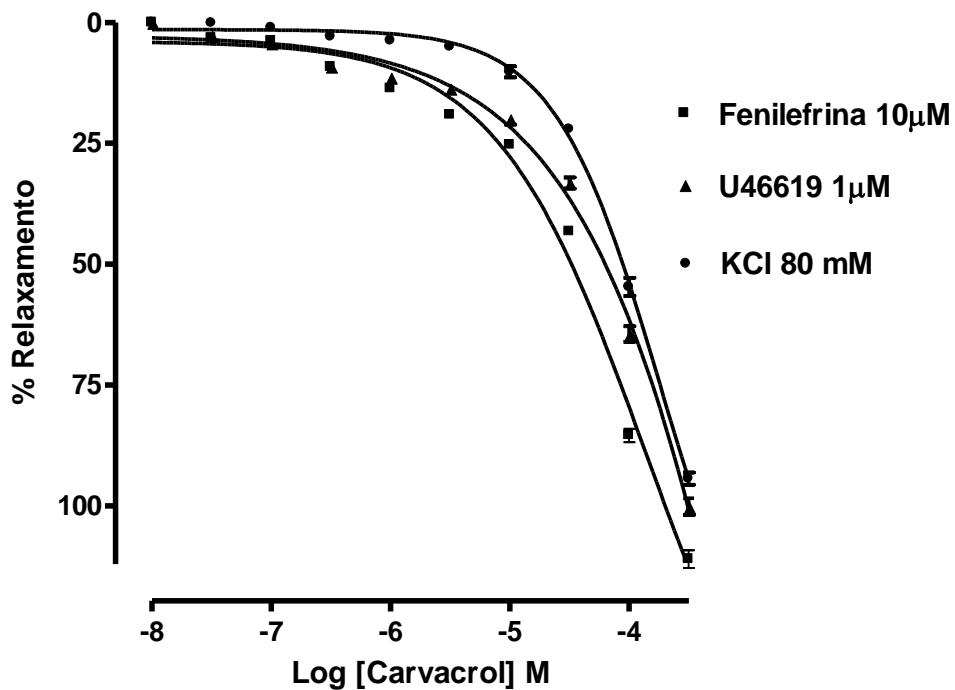


Figura 31: Efeito vasorrelaxante induzido por carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio e pré-contraídos com fenilefrina 10 μ M (■), U46619 1 μ M (▲) e KCl 80 mM (●).

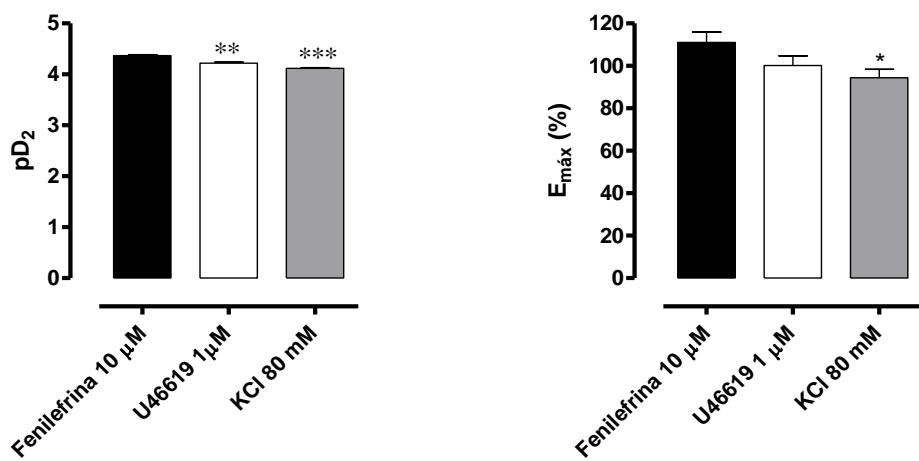


Figura 32: Gráfico em barra mostrando valores de pD_2 e efeito máximo para os resultados obtidos pela % de relaxamento frente os diferentes agentes contracturantes *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$ vs endotélio removido.

5.6 Influência dos canais para K⁺ na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol em artéria mesentérica de ratos.

Para avaliar a participação de canais para K⁺ na resposta vasorrelaxante induzida por carvacrol, foram realizados experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN (10 µM), na presença de uma solução Tyrode com 4mM e com 20 mM de KCl. O bloqueio parcial do efluxo de K⁺ com o aumento da concentração de K⁺ extracelular ([K⁺]_e) para 20 mM ($pD_2 = 4,43 \pm 0,03$ e $E_{máx} = 120,46 \pm 7,85\%$, n=6), não alterou a resposta vasorelaxante induzida pelo carvacrol quando comparados aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN na presença de solução tyrode com 4 mM de KCl ($pD_2 = 4,372 \pm 0,024$ e $E_{máx} = 111,03 \pm 4,88\%$, n=6) (Figura 33 e Tabela 8).

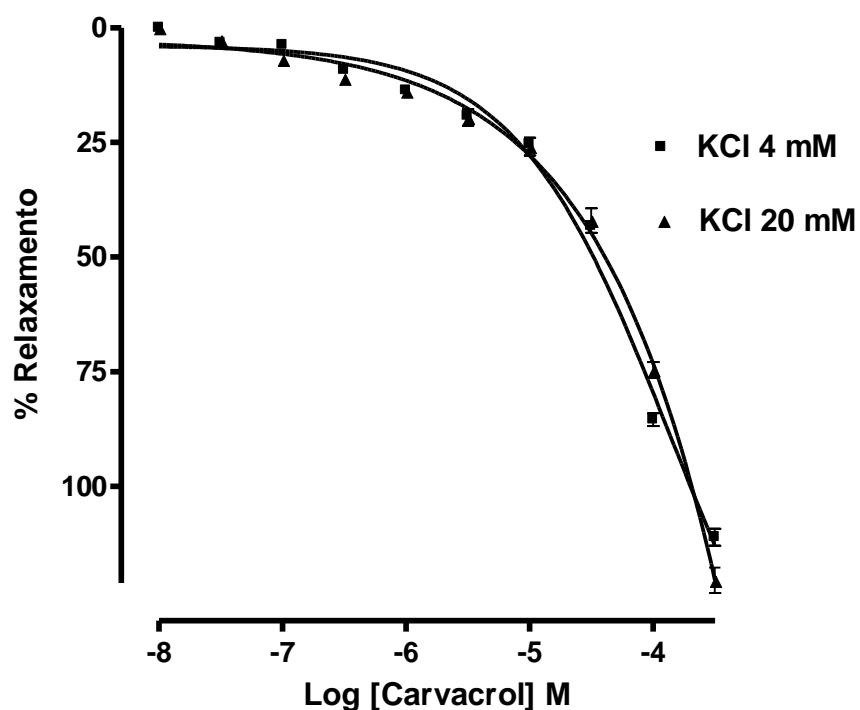


Figura 33: Influência da solução Tyrode com 20 mM de KCl no efeito vasorelaxante induzido por carvacrol. Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, na presença de $[K^+]$ _e = 4 mM (■) ou $[K^+]$ _e = 20 mM (▲).

Para reforçar que os canais para K^+ não estão participando na resposta vasorrelaxante induzida por carvacrol, realizamos experimentos na presença de TEA (3 mM), que nesta concentração é responsável por bloquear de maneira não-específica os canais para K^+ (WANG et al., 2007). Nesta condição, a curva concentração-resposta do efeito vasorelaxante induzido por carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato ($pD_2 = 4,471 \pm 0,02$ e $E_{máx} = 105,44 \pm 4,43\%$, n=6), não alterou a resposta vasorelaxante induzida pelo carvacrol quando comparados aos anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN ($pD_2 = 4,372 \pm 0,024$ e $E_{máx} = 111,03 \pm 4,88\%$, n=6), reforçando que esses canais parecem não participar do efeito vasorelaxante induzido por carvacrol (Figura 34 e Tabela 9).

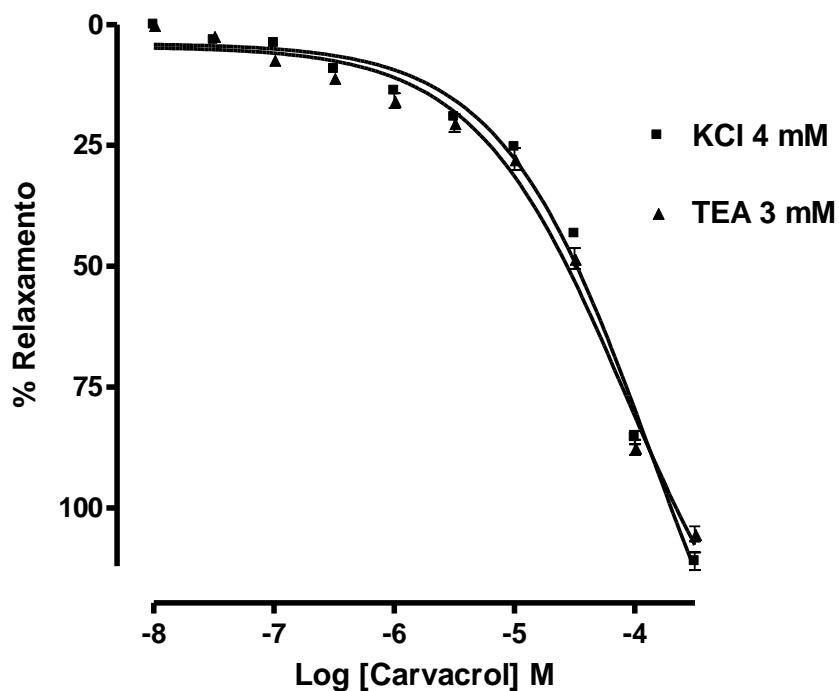


Figura 34: Influência do TEA (3 mM), um bloqueador não-específico dos canais para K^+ nos efeitos vasorelaxante induzido por carvacrol. Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional pré-contraído com FEN (10 μ M) na presença de $[K^+]_e = 4$ mM (■) e na presença de TEA (3mM) (▲).

	pD₂	E_{máx}
Controle FEN (10 µM)	4,36 ± 0,02	111,03 ± 4,88%
U46619 (1 µM)	4,22 ± 0,02 **	100,16 ± 4,57%
KCl 80 mM	4,12 ± 0,01 ***	94,38 ± 3,97% *
KCl 20 mM	4,43 ± 0,03	120,46 ± 7,85%
TEA (3 mM)	4,47 ± 0,02	105,34 ± 4,43%

*p<0,05 ; **p<0,01; ***p<0,001 significativo *versus* controle

Tabela 8: Valores de pD₂ e E_{máx} do efeito do carvacrol, comparando a situação controle *versus* situação em estudo.

5.7 Influência do carvacrol sobre o influxo de cálcio em artéria mesentérica de ratos.

Para avaliar se carvacrol estaria influenciando no influxo de cálcio para promover efeito vasorelaxante em anéis mesentéricos de ratos, foram realizados experimentos induzindo contrações com CaCl_2 em meio despolarizante, sem Ca^{2+} . A administração cumulativa de CaCl_2 (10^{-6} – 10^{-2} M) promoveu contração, dependente de concentração, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, incubados com solução despolarizante KCl 60 mM e nominalmente sem Ca^{2+} . Quando os anéis foram incubados com carvacrol (3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, separadamente) a curva concentração resposta para CaCl_2 foi significativamente atenuada de maneira dependente de concentração e com perfil não-competitivo ($E_{\text{máx}} = 82,86 \pm 2,23$; $49,1 \pm 7,86$; $26,38 \pm 7,63\%$, respectivamente, $n=6$), quando comparada com o controle ($E_{\text{máx}} = 100,0 \pm 0,0$) (Figura 35 e Tabela 9).

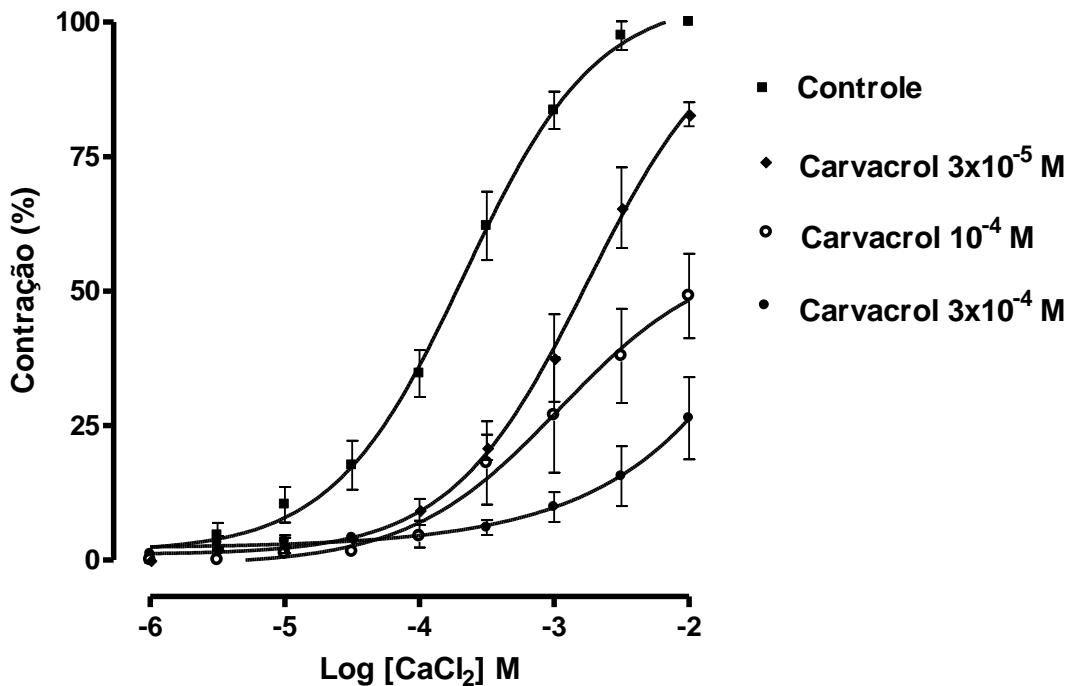


Figura 35: Curva concentração-resposta para CaCl_2 na ausência de carvacrol (■) e na presença de concentrações isoladas de carvacrol (M): (◊) 3×10^{-5} ; (○) 10^{-4} e (●) 3×10^{-4} , em anéis de artéria mesentérica, sem endotélio funcional ($n=6$). ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni, ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ (controle vs [carvacrol]) para $E_{\text{máx}}$.

Carvacrol (M)	pD_2	$E_{\text{máx}}$
Controle	$3,6 \pm 0,01$	$100,0 \pm 0,0\%$
3×10^{-5}	$2,7 \pm 0,03$	$82,8 \pm 2,23\% \text{ **}$
10^{-4}	$2,9 \pm 0,07$	$49,1 \pm 7,86\% \text{ ***}$
3×10^{-4}	$-1,3 \pm 6,68 *$	$26,3 \pm 7,63\% \text{ ***}$

* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ significativo versus controle

Tabela 9: Valores de pD_2 e $E_{\text{máx}}$ obtida para contrações induzidas por CaCl_2 , na presença de concentrações isoladas de carvacrol.

5.8 Efeito do carvacrol sobre o influxo de Ca²⁺ por canais para Ca²⁺ sensíveis à voltagem do Tipo-L

Para avaliar se carvacrol influencia no influxo de Ca²⁺ pelos canais para Ca²⁺ sensíveis à voltagem (Ca_V) do tipo-L, foi utilizado o S(-)-Bay K 8644, um agonista dos canais para Ca²⁺ sensíveis a diidropiridinas (DONG et al., 1997) para induzir desenvolvimento de força nos anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

Ao ser administrado cumulativamente na fase tônica da contração induzida por S(-)-Bay K 8644 (200 nM), carvacrol (10⁻⁸ - 3 x 10⁻⁴ M) induziu um vasorelaxamento dependente de concentração, com uma pequena alteração significativa dos valores de pD₂ = 4,537 ± 0,023 (p< 0,01), e uma pequena diminuição nos valores de E_{máx} = 91,8 ± 3,58% (p= 0,01), que foi significante quando comparado aos anéis mesentéricos, sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN (10 μM) (pD₂ = 4,372 ± 0,024 e E_{máx} = 111,03 ± 4,88%, n=6) (Figura 36).

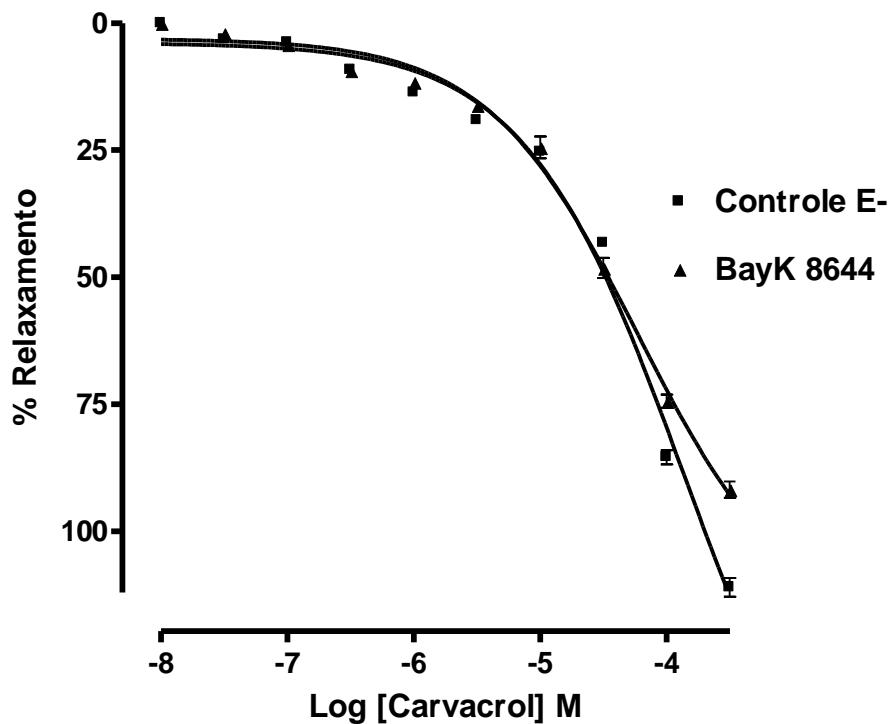


Figura 36: Efeito do carvacrol nas contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644. Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio vascular, pré-contraído com FEN 10 μ M (■) ou S(-)-Bay K 8644 200nM (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m.

5.9 Efeito do carvacrol sobre a entrada de Ca²⁺ por ROC e SOC

Para avaliar se carvacrol estaria influenciando no influxo de cálcio por via diferente da induzida por canais Ca_v , como pelos canais operados por estoques (SOC) e operados por receptor (ROC) que são canais relacionados com os TRPC1 e TRPC6 (DIETRICH et al., 2005c; HOFMANN et al., 1999), foram realizados experimentos em meio sem Ca²⁺ e na presença da FEN. Primeiramente foi obtida uma contração controle em resposta ao CaCl₂ (10⁻² M) ($E_{\text{máx}}=100,0 \pm 0,0$) após depleção dos estoques intracelulares de Ca²⁺ por repetidas administrações de FEN. A contração induzida por CaCl₂ foi significantemente atenuada por nifedipina (1 μM), um inibidor dos canais de cálcio sensíveis à voltagem ($E_{\text{máx}}= 72,08 \pm 10,16$, $p=0,013$ e $n=10$). A incubação conjunta com carvacrol (10⁻⁴ ou 3×10^{-4} M) e nifedipina (1 μM) induziu inibição acentuada da contração induzida por CaCl₂ ($E_{\text{máx}}= 24,45 \pm 4,08$; $4,35 \pm 2,25\%$, $p=0,0036$ e $p=0,0015$, respectivamente, $n=6$) quando comparada ao controle (Figura 33). De maneira adicional, para reforçar que o influxo de cálcio estava sendo independente dos Ca_v foi obtida uma contração em resposta ao CaCl₂ (10⁻² M) na presença somente do carvacrol (10⁻⁴ ou 3×10^{-4} M) ($44,08 \pm 6,44$; $5,28 \pm 3,41\%$, $p<0,0001$ e $p<0,0001$, respectivamente, $n=6$) e em seguida foi adiciona Nifedipina (1 μM) ($25,59 \pm 5,95$; $-3,71 \pm 1,89\%$, $p<0,0001$ e $p<0,0001$, respectivamente, $n=6$) onde observou-se relaxamento da contração dos anéis induzida por CaCl₂ na presença de carvacrol (Figuras 37, 38 e 39). Isto sugere que o carvacrol está impedindo o influxo de cálcio extracelular, por atuar sobre ROC e SOC.

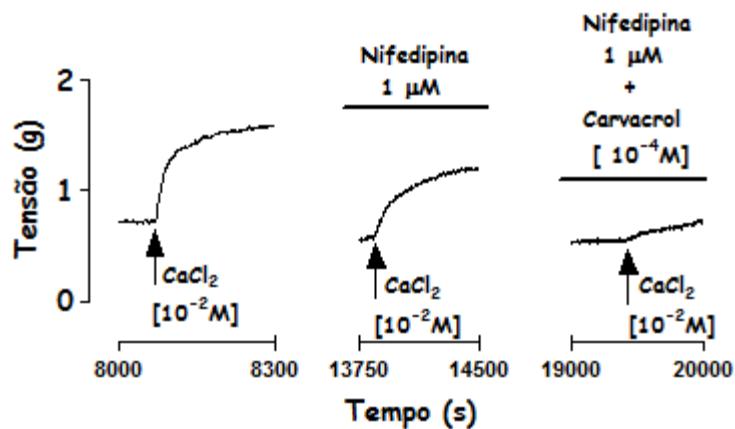


Figura 37: Registro original da ação do carvacrol [10^{-4} M] em anel de artéria mesentérica superior isolada de rato, mostrando seu efeito sobre a entrada de cálcio por ROC e SOC.

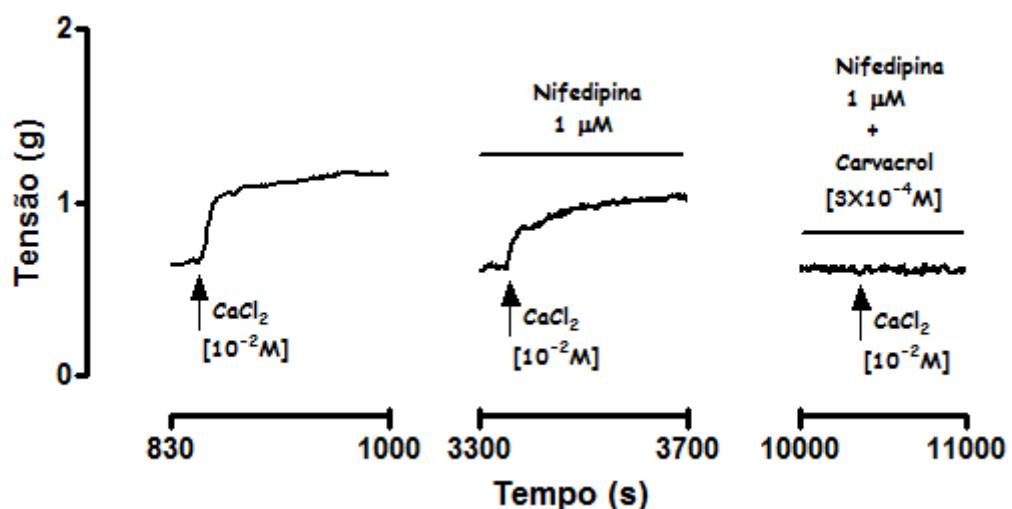


Figura 38: Registro original da ação do carvacrol [3×10^{-4} M] em anel de artéria mesentérica superior isolada de rato, mostrando seu efeito sobre a entrada de cálcio por ROC e SOC.

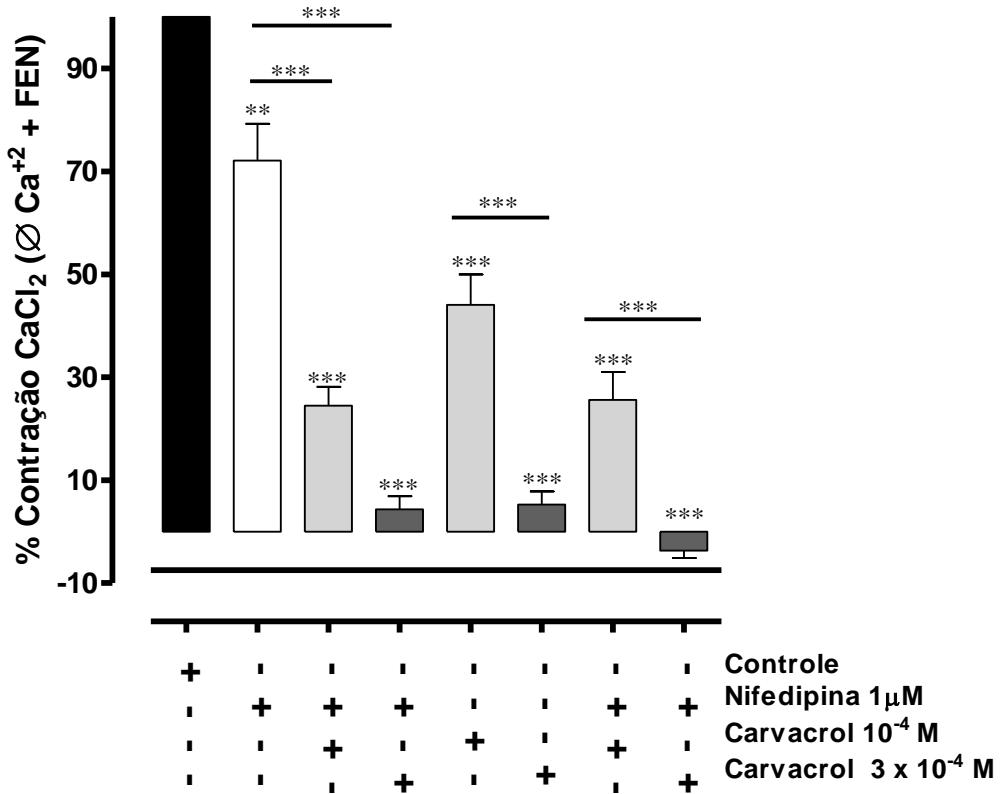


Figura 39: Gráfico em barra mostrando os valores de % de contração em resposta ao CaCl_2 (10^{-2} M), na ausência e presença da nifedipina e do carvacrol, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, com o endotélio removido. ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni, * $p<0,01$; ** $p<0,001$; * $p<0,0001$ para $E_{\text{máx}}$ vs controle, Nif. vs Nif. + 10^{-4} M , Nif. + 10^{-4} M vs Nif. + 3×10^{-4} M; Nif. vs Nif. + 3×10^{-4} M e carvacrol 10^{-4} M vs carvacrol 3×10^{-4} M.**

5.10 Efeito do carvacrol sobre a entrada capacitiva de Ca²⁺ por SOC

Para avaliar se carvacrol estaria influenciando o influxo de cálcio por diminuir a entrada capacitativa de Ca²⁺, por canais da família dos TRP, principalmente TRPC1, (DIETRICH et al., 2005c), onde a literatura nos mostra que altas concentrações de K⁺, nas células de músculo liso, levam a um aumento do influxo de Ca²⁺ através dos Ca_v (GODFRAIND; MILLER; WIBO, 1986; SOMLYO; SOMLYO, 1994; BRIGGS, 1962; NELSON et al., 1988), como também essa contração sustentada é promovida por canais TRP (RATZ; BERG, 2006) levando a uma entrada de Ca²⁺ através dos SOC (AY et al., 2004; FELLNER; ARENDSHORST, 2000; USACHEV; THAYER, 1999; WAYMAN et al., 1998) diante disso foram realizados experimentos em solução tyrode despolarizante nominalmente sem Ca²⁺, levando assim a ativação de SOC, onde foi obtida uma contração em resposta ao CaCl₂ (10⁻² M) (curva controle) ($E_{máx}=100,0 \pm 0,0$). Em seguida foi incubada a nifedipina (1 μM) que é um inibidor dos canais de cálcio sensíveis à voltagem e uma nova contração foi obtida com um decréscimo no seu efeito máximo ($E_{máx}= 45,58 \pm 9,38$, $p<0,0001$ e $n=10$), posteriormente foi incubado carvacrol (10⁻⁴ ou 3 x 10⁻⁴ M) juntamente com a nifedipina e uma nova contração foi observada ($E_{máx}= 25,00 \pm 2,73$; $6,76 \pm 2,11\%$, $p<0,0001$ e $p<0,0001$, respectivamente, $n=6$) diminuindo显著mente o seu efeito máximo (Figura 40). Sugerindo que o carvacrol está atuando na entrada capacitativa de cálcio.

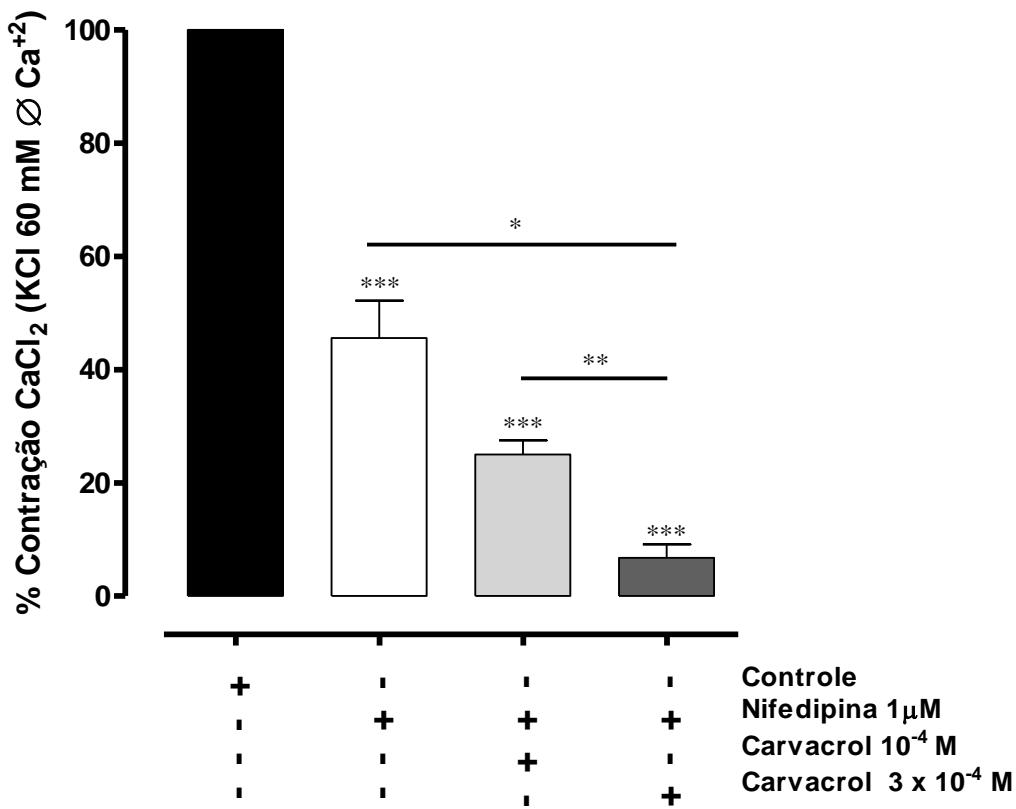


Figura 40: Gráfico em barra mostrando os valores de % de contração em resposta ao $\text{CaCl}_2 (10^{-2} \text{ M})$, na ausência e presença da nifedipina e do carvacrol, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, com o endotélio removido. ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni, **p<0,01; ***p<0,001 para $E_{\text{máx}}$ vs controle e Nif. vs Nif. + 3×10^{-4} M.

Participação dos canais potencial receptor transiente (TRP) na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol

5.11 Efeito do carvacrol sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN na ausência e na presença de vermelho rutênio

O relaxamento promovido pelo carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato ($pD_2 = 4,372 \pm 0,024$ e $E_{máx} = 111,03 \pm 4,88\%$) pré-contraída com fenilefrina, na ausência do endotélio funcional, não foi alterado na presença do vermelho de rutênio ($pD_2 = 4,31 \pm 0,029$ e $E_{máx} = 110,11 \pm 8,9\%$) (CLAPHAM, et al, 2005) (Figura 41) um bloqueador não-seletivo dos TRPV, TRPA1 e TRPM6 (Ver tabela 10).

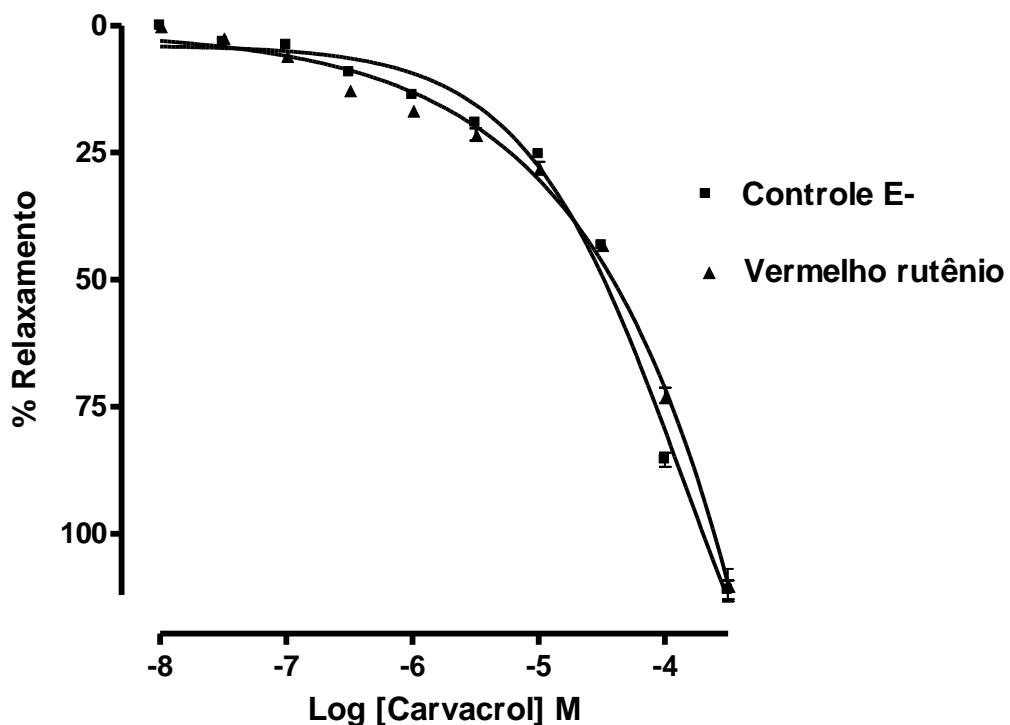


Figura 41: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença de vermelho rutênio (10 μ M) (▲).

Os valores estão expressos com média \pm e.p.m.

5.12 Efeito do carvacrol sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN na ausência e na presença de lantânio

O relaxamento promovido pelo carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato ($pD_2 = 4,372 \pm 0,024$ e $E_{\text{máx}} = 111,03 \pm 4,88\%$) pré-contraído com fenilefrina, na ausência do endotélio funcional, interessantemente, o efeito do carvacrol foi potencializado na presença do íon lantânio (La^{3+}) ($pD_2 = 5,231 \pm 0,04$ e $E_{\text{máx}} = 102,01 \pm 3,43\%$, $p < 0,001$) (Figura 42), bloqueador dos TRPV4, 2, dos TRPC6, 3, e dos TRPM3 e 4 (CLAPHAM, et al, 2005) (Ver tabela 10).

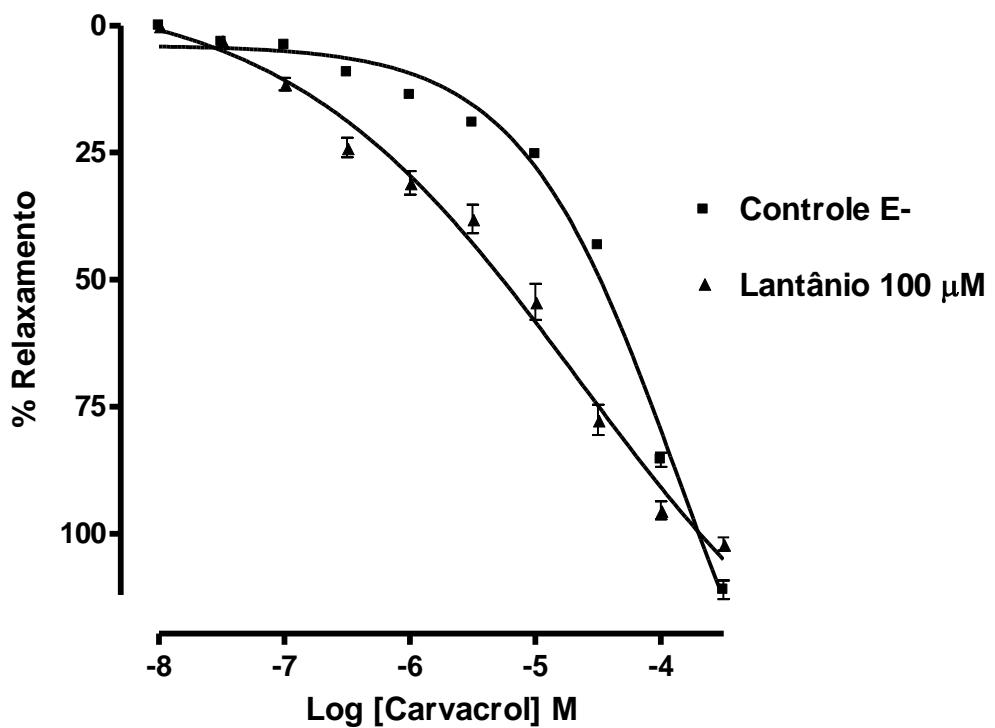


Figura 42: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença de lantânio (100 μM) (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m.

5.13 Efeito do carvacrol sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN na ausência e na presença de gadolínio

O relaxamento promovido pelo carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato ($pD_2 = 4,372 \pm 0,024$ e $E_{máx} = 111,03 \pm 4,88\%$) pré-contraído com fenilefrina, na ausência do endotélio funcional, foi potencializado na presença do íon gadolínio (Gd^{3+}) ($pD_2 = 4,97 \pm 0,029$ e $E_{máx} = 104,98 \pm 3,87\%$, $p<0,001$) (Figura 43), bloqueador dos TRPC1, 3 e 6, dos TRPM3 e 4 e do TRPV4 (CLAPHAM, et al, 2005) (Ver tabela 10).

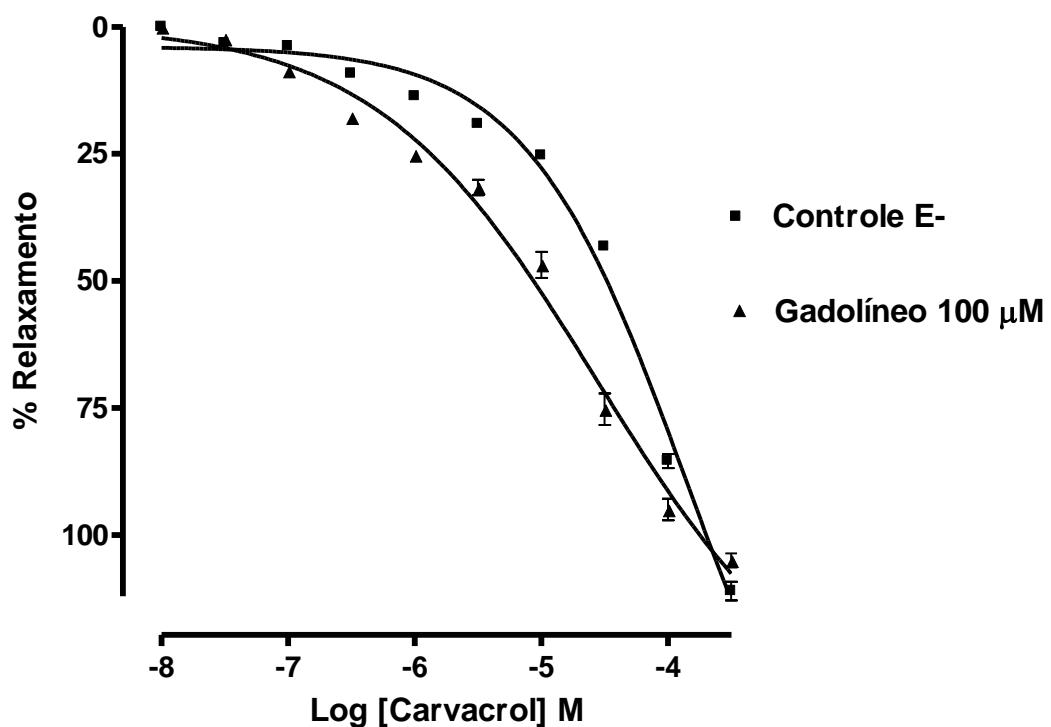


Figura 43: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença de gadolíneo (100 μ M) (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m.

5.14 Efeito do carvacrol sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN na ausência e na presença de níquel

O relaxamento promovido pelo carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato ($pD_2 = 4,372 \pm 0,024$ e $E_{máx} = 111,03 \pm 4,88\%$) pré-contraídos com fenilefrina, na ausência do endotélio funcional, foi potencializado na presença do níquel $pD_2 = 5,079 \pm 0,02$ e $E_{máx} = 108,11 \pm 5,36\%$ um bloqueador do trocador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (NCX1), onde tem sido descrito que canais TRPC3 estão acoplados a esse trocador (ROSKER et al., 2004; EDER et al., 2005) (Figura 45 e Tabela 10).

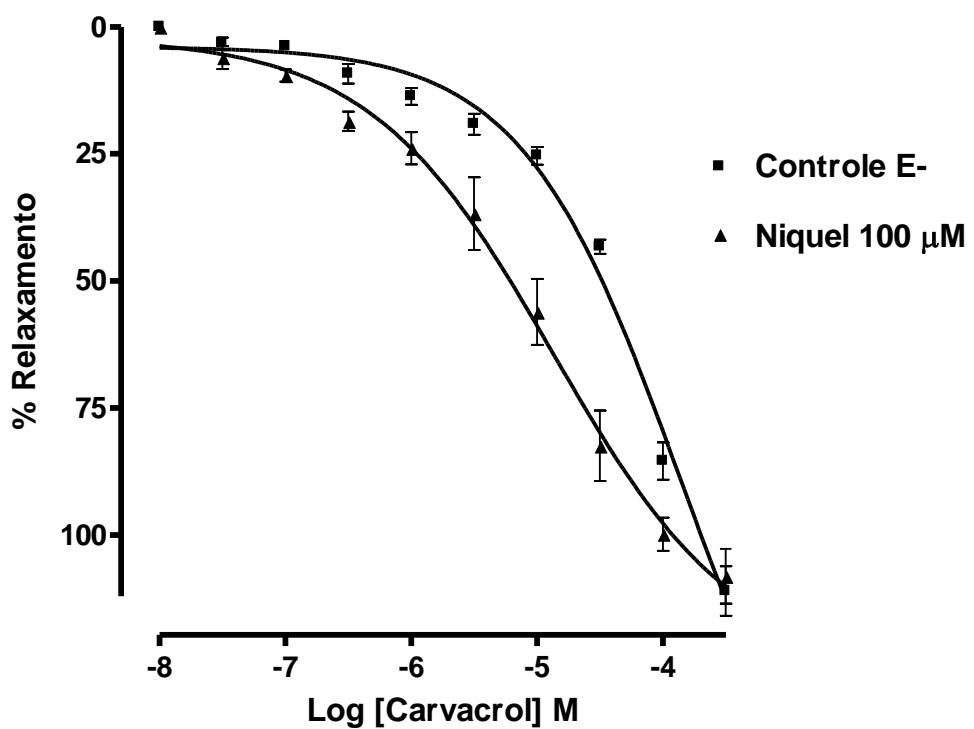


Figura 45: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença de níquel (100 μM) (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m

5.15 Efeito do carvacrol sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN na ausência e na presença de magnésio

O relaxamento promovido pelo carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato ($pD_2 = 4,372 \pm 0,024$ e $E_{máx} = 111,03 \pm 4,88\%$) pré-contraído com fenilefrina, na ausência do endotélio funcional, foi atenuado na presença do íon magnésio (Mg^{2+}) (2,25 mM) ($pD_2 = 4,168 \pm 0,021$ e $E_{máx} = 81,12 \pm 4,03\%$, $p<0,001$ e $p=0,0013$) (Figura 44), bloqueador do TRPM3, 6 e 7 (CLAPHAM, et al, 2005) (Ver tabela 10).

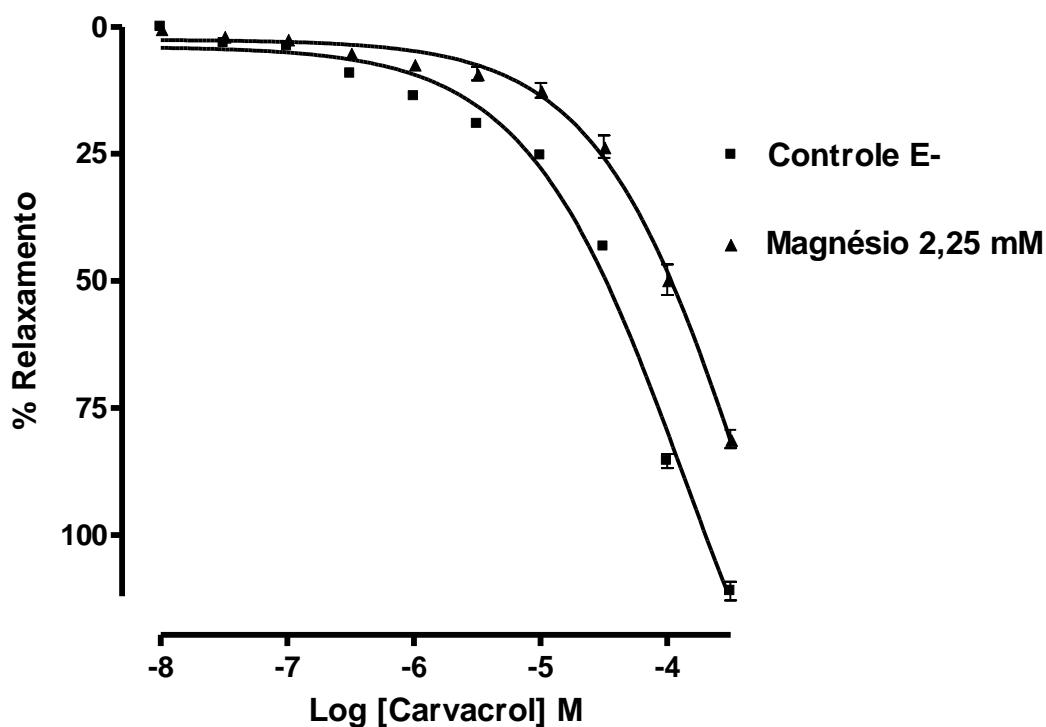


Figura 44: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença de magnésio (2,25 mM) (▲). Os valores estão expressos com média ± e.p.m

	pD_2	$E_{máx}$
Controle	$4,36 \pm 0,02$	$111,03 \pm 4,8\%$
Vermelho Rutênio	$4,31 \pm 0,02$	$110,11 \pm 8,9\%$
Lantânio	$5,23 \pm 0,04$ ***	$102,01 \pm 3,4\%$
Gadolíneo	$4,97 \pm 0,03$ ***	$104,98 \pm 3,9\%$
Níquel	$4,47 \pm 0,02$ ***	$105,34 \pm 4,43\%$
Magnésio	$4,17 \pm 0,02$ ***	$81,12 \pm 4,03\%$ **

*p<0,05 ; **p<0,01; ***p<0,001 significativo *versus* controle

Tabela 10: Valores de pD_2 e $E_{máx}$ do efeito do carvacrol, comparando a situação controle *versus* situação em estudo.

ESTUDOS *in vivo*

5.13 Efeitos do carvacrol sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos não anestesiados

Os valores basais da PAM e FC dos animais antes da administração do carvacrol foram respectivamente de 98 ± 5 mmHg e 344 ± 10 bpm. A administração do carvacrol (1; 5; 10; 15 e 20 mg/Kg, i.v., aleatoriamente) induziu uma resposta transitória caracterizada por hipotensão (Δ PAM (%)) = -6 ± 3 ; -35 ± 5 ; -57 ± 7 ; -73 ± 5 ; -84 ± 4 mmHg, respectivamente) associada a bradicardia (Δ FC = -8 ± 3 ; -87 ± 33 ; -240 ± 35 ; -286 ± 14 ; -303 ± 21 bpm, respectivamente) de maneira independente de dose (n=6) (Figura 46 e 47).

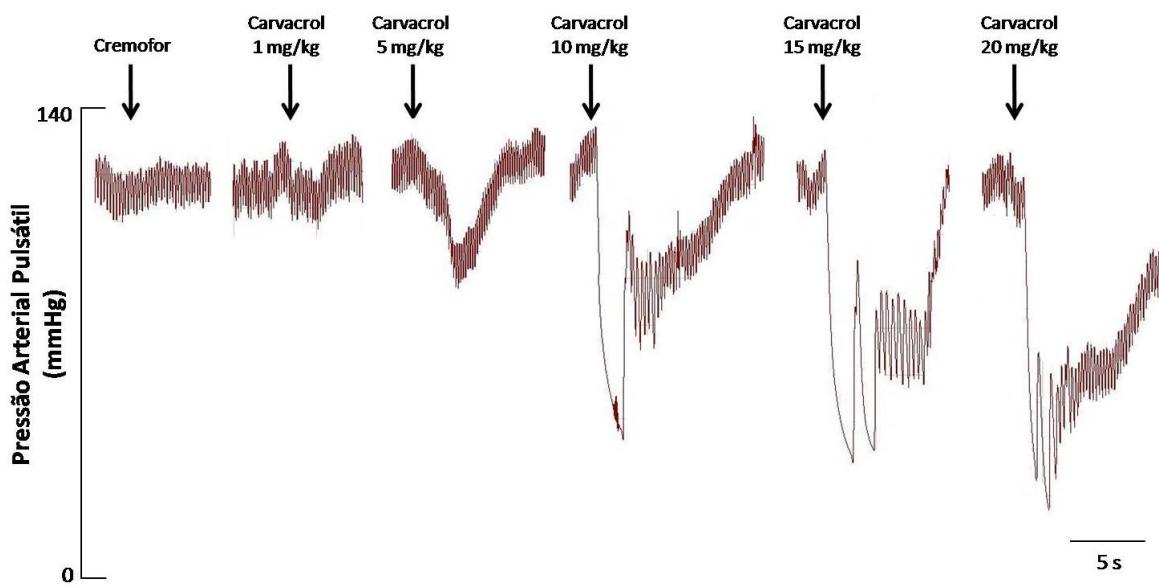


Figura 46: Registro original representativo ilustrando o efeito de doses crescentes do carvacrol (1; 5; 10; 15 e 20 mg/Kg, i.v.) sobre PAS, PAM, PAD e FC em rato normoteno não anestesiado. As setas indicam o momento da administração do carvacrol.

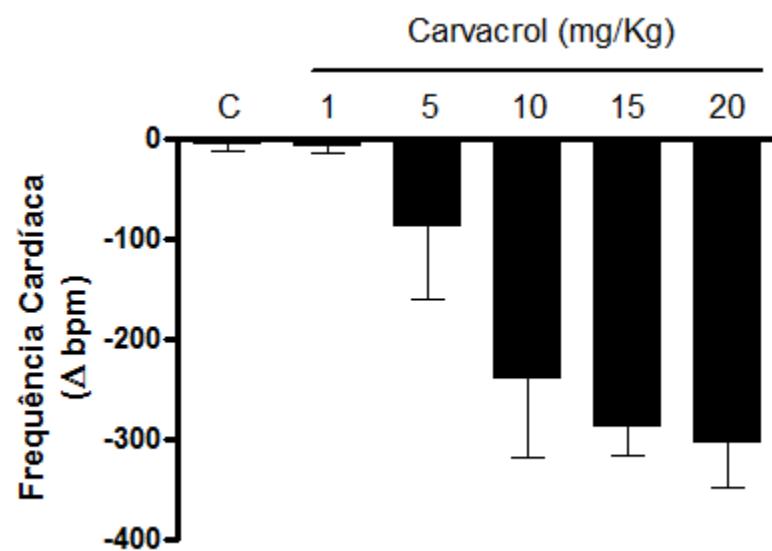
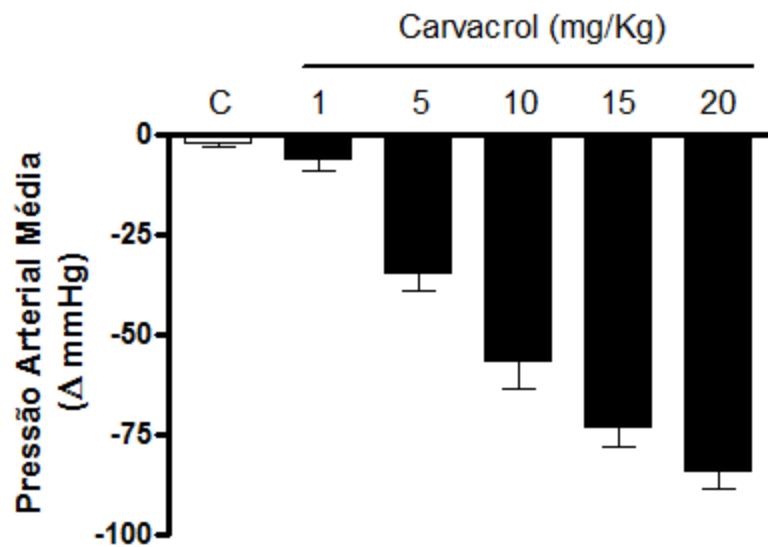


Figura 47: Efeitos do carvacrol sobre a Pressão Arterial Média (PAM, mmHg) e Frequência Cardíaca (FC, bpm) em ratos normotensos não anestesiados. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. de 6 experimentos

Discussão

6. Discussão

6. Discussão

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos do monoterpeno carvacrol sobre o sistema cardiovascular e tentar elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos, utilizando abordagens *in vitro* – com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato e *in vivo* – com medidas diretas de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos normotensos não anestesiados.

As principais constatações foram a atividade vasorelaxante em artéria mesentérica superior isolada de rato, envolvendo inibição do influxo de Ca^{2+} por vias diferentes tais como: por Ca_v tipo-L, por ROC, SOC e ou canais TRP. Além disso, constatou-se a atividade hipotensora e bradicárdica em ratos normotensos não anestesiados, resultados estes interessantes no âmbito dos estudos com monoterpenóides.

Poucos estudos tratam da atividade do carvacrol sobre o sistema cardiovascular e sobre a musculatura lisa vascular e não vascular. Boskabady e colaboradores (2003) foram os primeiros a demonstrar a atividade relaxante do monoterpenóide sobre o músculo liso traqueal de cobaia. Enquanto Aydin e cols. (2007) em estudos *in vivo* demonstraram um efeito hipotensor e bradicárdico sobre ratos normotensos anestesiados. Outro relevante trabalho do grupo de pesquisa de Peixoto-Neves (2009) observou uma atividade vasorelaxante em aorta de rato. E mais recentemente Earley e colaboradores (2010) constataram atividade vasorelaxante por ativar TRPV3 na camada endotelial de artéria cerebral e cerebelar. Diante dessas premissas fomos investigar se o carvacrol tinha especificidade por tecido vascular, para tanto utilizamos ensaios com artéria mesentérica. É importante salientar que as respostas farmacológicas obtidas após administração de determinadas substâncias podem variar devido a vários fatores, como por exemplo, a especificidade desta por determinado sítio de ação, a densidade da molécula-alvo sobre a qual age a substância, como também o tecido em qual a molécula-alvo se encontre. Em relação às diferenças entre tecidos, os leitos vasculares são distintos no que diz respeito à fisiologia, a densidade e tipo de receptores que expressam como também a maneira que respondem às várias substâncias (VANHEEL; VAN; VOORDE, 2000; GURNEY, 1994; COX, 2002; BYLUND,

1994; INSEL, 1996). Há vários dados na literatura que demonstram respostas diferentes para diferentes leitos vasculares, bem como em vasos de calibres diferentes. Sabendo dessas evidências foi que fundamentamos este estudo em outro tecido vascular, utilizando neste caso, artéria mesentérica isolada de rato. Onde observamos que carvacrol promoveu um efeito vasorelaxante de maneira dependente de concentração tanto na presença do endotélio funcional como na ausência, em anéis pré-contraídos com FEN um agonista α -adrenérgico, demonstrando que o monoterpenóide provavelmente não apresenta especificidade por tecido vascular. Além disso, ao compararmos nossos resultados obtidos em artéria mesentérica ($CE_{50} = 43,04 \mu M$) com os resultados observados em aorta de rato ($CE_{50} = 145,4 \mu M$) (PEIXOTO-NEVES et al., 2009) contatamos que carvacrol apresentou maior potência farmacológica para o efeito vasorelaxamente em anéis mesentéricos.

O endotélio vascular é responsável pelo controle de diversas funções celulares e moleculares, incluindo atividade contrátil e proliferativa da musculatura lisa vascular. Portanto, as células endoteliais vasculares têm função vital na regulação e manutenção da homeostase do sistema vascular, exercendo potente efeito regulatório sobre pressão arterial e fluxo sanguíneo local, este processo é mediado via liberação de fatores vasoconstridores e fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDEs) (BUSSE et al., 2002). Devido à importante influência na modulação da vasodilatação induzida pelos FRDEs, foram realizados experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, na ausência do endotélio funcional, com o intuito de verificar a dependência dos FRDEs no efeito vasorelaxante induzido por carvacrol. Após a remoção mecânica do endotélio, o efeito vasorelaxante induzido por carvacrol não apresentou alteração na eficácia farmacológica, porém uma diminuição significante ($p<0,001$) da potência farmacológica foi observada (Figura 25), levando-nos a sugerir que mediadores vasoativos liberados pelo endotélio vascular parecem favorecer o efeito vasorelaxante induzido por carvacrol. No entanto, o mecanismo independente do endotélio apresentou-se majoritário em relação ao dependente de endotélio vascular, provavelmente devido a um efeito direto de carvacrol sobre a musculatura lisa arterial. Além do que, essa diferença se deu unicamente em um ponto, que justamente correspondeu a EC_{50} do efeito do carvacrol, o que provavelmente nos levou a essa diferença significante nos valores de PD_2 . A partir destes resultados resolvemos investigar o mecanismo de ação independente do endotélio vascular utilizado por carvacrol para induzir vasorelaxamento.

Dentro desse contexto, fomos avaliar se o efeito induzido pelo carvacrol era dependente de tônus vascular, para tanto fizemos experimentos onde foi adicionado ao tônus basal concentrações crescentes de carvacrol e, diferentemente do que foi visto em aorta (PEIXOTO-NEVES et al., 2009), o tônus basal não foi alterado (Figura 27).

Para descartar a hipótese de que os efeitos mediados por carvacrol não estão relacionados a um possível efeito tóxico, apesar de a literatura nos mostrar que carvacrol tem uma baixa toxicidade, com uma DL_{50} de 910 mg/kg do peso corporal, quando administrado por via oral em ratos (JENNER et al., 1964), fomos avaliar um possível dano tecidual induzido por carvacrol onde, após o tratamento com o carvacrol, o mesmo foi removido do banho e uma nova contração com fenilefrina foi induzida. Pode-se constatar total reversão da contração induzida por fenilefrina após remoção do carvacrol (Figura 28), mostrando que o monoterpeno provavelmente não promoveu dano a maquinaria contrátil vascular.

A literatura também nos mostra que determinadas substâncias podem desenvolver taquifilia, uma diminuição da atividade biológica de uma substância após aplicação de sucessivas doses desta numa mesma condição experimental (SWOPE, et al., 1999; FERGUSON, 2001). Esse fenômeno pode ser observado, por exemplo, quando doses extremamente elevadas são usadas, o tecido torna-se menos sensível e isso é uma desensibilização não-específica (SWOPE, et al., 1999). Assim, para avaliar se o carvacrol tinha um efeito reproduzível ou poderia desenvolver taquifilia, foi feito um tratamento com adições sucessivas de carvacrol em uma mesma concentração, onde observamos que o carvacrol teve um efeito reproduzível do qual provavelmente não desenvolveu taquifilia (Figura 30).

Para avaliar se o efeito do carvacrol era dependente exclusivamente de um único agonista contracturante, como sobre os receptores α_1 -adrenérgico foi utilizado outro agente contracturante, o U46619, um agonista tromboxânico A2 (TXA2) (CAVARAPE A., et al., 2003) que atua nos receptores TP acoplados à proteína Gq (PLC-IP₃-Ca²⁺) (GOODMAN; GILMAN, 2006; AUDOLY, et al., 2000). Nestas condições experimentais, observou-se que o relaxamento produzido pelo carvacrol em tecido pré-contraído com U46619 foi similar ao obtido no tecido pré-contraído com FEN (Figura 31), porém com uma significativa diminuição na sua potência farmacológica. Demonstrando que o carvacrol promove vasorelaxamento de maneira não seletiva. Possivelmente o efeito

relaxante induzido pelo carvacrol não está necessariamente associado ao bloqueio do receptor α_1 -adrenérgico.

Já é bem descrito na literatura que contrações induzidas por altas concentrações de potássio, nas células de músculo liso, são mediadas por uma despolarização de membrana e um aumento do influxo de Ca^{2+} através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) (GODFRAIND; MILLER; WIBO, 1986; SOMLYO; SOMLYO, 1994; BRIGGS, 1962; NELSON et al., 1988). No entanto, estudos recentes (RATZ; BERG, 2006) demonstraram que essa contração sustentada não é exclusivamente mediada por Ca_v , mas também, baseada no fato de que o KCl pode causar depleção do retículo sarcoplasmático (KOBAYASHI; KANAIDE; NAKAMURA, 1985 e 1986), levando a uma entrada de Ca^{2+} através SOC e ou canais TRP (AY et al., 2004; FELLNER; ARENDSHORST, 2000; USACHEV; THAYER, 1999; WAYMAN; GIBSON; MCFADZEAN, 1998), como também outro relevante aspecto é que o aumento de K^+ extracelular pode levar a uma ativação da PKC, culminando com uma ativação da MYPT1-pT853, levando a uma sensibilização ao cálcio e com isso uma contração sustentada (RATZ; MINER, 2009). Avaliou-se, portanto, o efeito do carvacrol em anéis pré-contraídos com a solução despolarizante de KCl 80 mM e, nestas condições, observou-se que o carvacrol promoveu relaxamento de maneira dependente de concentração, com uma pequena diminuição na eficácia como também da potência farmacológica, diferença essa sendo significante, quando comparada ao relaxamento promovido em preparações contraídas com FEN (Figura 31). Sendo, portanto um forte indício de que a vasodilatação induzida por carvacrol, possa envolver um passo comum na via de sinalização celular, visto que os outros agentes contracturantes empregados também promovem aumento citosólico dos níveis de cálcio (GALICIA et al., 2008). Possivelmente, o mecanismo vasodilatador do carvacrol envolva a inibição do influxo de cálcio.

Como o efeito relaxante induzido por carvacrol foi significantemente diminuído em condições experimentais com alta concentração extracelular de K^+ , evento este que altera sensivelmente o relaxamento induzido por substâncias que ativam canais para K^+ , nos questionamos então se carvacrol poderia ativar canais para K^+ na célula muscular lisa. É bem descrito que estes canais são determinantes importantes da pressão sanguínea, do tônus vascular e do estado contrátil das células musculares lisas presente na parede dos vasos sanguíneos (LEDOUX et al., 2006). Os canais para potássio

ajudam a determinar o potencial de membrana no repouso, bem como regulam o volume celular. Como as células apresentam uma concentração elevada de potássio no meio intracelular, em relação ao meio extracelular, a abertura de canais para potássio na membrana plasmática induz uma mudança no potencial de membrana para valores mais negativos (repolarização ou hiperpolarização) devido ao efluxo desses íons, levando consequentemente a vasodilatação (GURNEY, 1994; NELSON; QUAYLE, 1995; HADDY et al., 2006).

Baseado na importância dos canais para K⁺ na regulação de funções vasculares resolvemos avaliar a participação destes canais na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol. Para tanto, utilizamos preparações incubadas com KCl 20 mM, condição em que promove bloqueio parcial do efluxo de K⁺ por deslocar o potencial de equilíbrio do K⁺ (em torno de -84 mV a -52 mV) para valores mais próximos do potencial de membrana no repouso dos miócitos (em torno de -60 a -40 mV) e atenuando desta forma relaxamentos mediados por abertura de canais para K⁺ (GURNEY, 1994; CLARK; FUCHS, 1997). O aumento do potássio extracelular (de 4 para 20 mM) não alterou o efeito vasorelaxante promovido pelo carvacrol (Figura 33), sugerindo que a resposta relaxante promovida pelo carvacrol não envolve a participação dos canais para K⁺.

No intuito de reforçar que os canais para K⁺ não participam no efeito vasorrelaxante induzido por carvacrol, realizamos experimentos na presença de TEA (3 mM), que nesta concentração é responsável por bloquear de maneira não-específica os canais para K⁺ (WANG et al., 2007). Nestas condições experimentais, observou-se que o relaxamento produzido pelo carvacrol foi similar ao obtido nos tecidos pré-contraídos com FEN (Figura 34). Corroborando com os resultados observados com KCl 20 mM, descartando assim a possível participação dos canais para K⁺ na resposta vasorelaxante promovida pelo carvacrol.

Existem várias evidências de que monoterpenos, inclusive a substância objeto do nosso estudo, em experimentos com tecidos vasculares, alterem a mobilização de Ca²⁺ nas células musculares lisas (PEIXOTO-NEVES et al., 2009; GUEDES et al., 2002; SILVA, 2008; RIBEIRO, 2008; BASTOS et al., 2009). Além disso, como a contração induzida por solução despolarizante com alta concentração de K⁺, é mediada principalmente por influxo de Ca²⁺ por Ca_v (GODFRAIND; MILLER; WIBO, 1986; SOMLYO; SOMLYO, 1994; BRIGGS, 1962; NELSON et al., 1988) e ela foi

significantemente atenuada por carvacrol, nos fez propor uma possível ação deste monoterpeno sobre os canais Ca_v em anéis mesentéricos. Baseado em tais relatos, outro aspecto investigado em nossos estudos foi se o efeito vasorelaxante induzido por carvacrol estava relacionado à inibição do influxo de Ca^{2+} via canais Ca_v .

Dentre os Ca_v , encontram-se os canais para cálcio ativados por alta voltagem, Ca_v 1.1-1.4 (tipo-L), Ca_v 2.1-2.3 (tipo-P/Q, N e R, respectivamente) e os Ca_v ativados por baixa voltagem Ca_v 3.1-3.3 (tipo-T). Entretanto na célula muscular lisa vascular (CMLV), os subtipos encontrados são os Ca_v -L e Ca_v -T, dentre os quais o Ca_v -L, é o subtipo dominante na atividade do sistema cardiovascular, enquanto Ca_v -T pouco contribui (MCDONOUGH, 2004; DOERING et al., 2006; TRIGGLE, 2007). Dentre os subtipos de Ca_v -L, o tipo Ca_v 1.2 é o principal Ca_v encontrado na célula muscular lisa vascular (CATTERALL et al., 2005; SONKUSARE et al., 2006; TRIGGLE, 2007).

Para verificar esta hipótese foi investigado o efeito de carvacrol frente às contrações induzidas por CaCl_2 , em meio despolarizante nominalmente sem cálcio. Este protocolo experimental fundamenta-se no fato de que as contrações induzidas por CaCl_2 são geradas, quase que exclusivamente, pelo influxo de Ca^{2+} , já que a despolarização promovida por concentrações elevadas de K^+ extracelular induz a abertura dos Ca_v e de SOC (RATZ; BERG, 2006). Nestas condições carvacrol atenuou significativamente as contrações induzidas por CaCl_2 , de maneira dependente de concentração ($3 \times 10^{-5}, 10^{-4}, 3 \times 10^{-4}$ M) (Figura 35). Esses resultados sugerem que o efeito vasorelaxante induzido por carvacrol pode ser devido a uma possível influência do monoterpeno sobre os Ca_v , resultando em uma diminuição do influxo de Ca^{2+} em músculo liso de artéria mesentérica superior isolada de rato, levando ao vasorelaxamento.

Com o intuito de avaliar o subtipo de Ca_v envolvido na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol, analisou-se seu efeito sobre as contrações tônicas induzidas pelo derivado diidropiridínico S(-)-Bay K 8644, um agonista seletivo dos Ca_v 1(tipo-L) (SCHRAMM; THOMAS; TOWART, 1983). Nesta situação observamos que o carvacrol inibiu as contrações tônicas induzidas por S(-)-Bay K 8644, de maneira dependente de concentração, sugerindo que os Ca_v 1(tipo-L) podem estar envolvidos na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol (Figura 36).

Os experimentos até então conduzidos convergiam para uma diminuição do influxo de Ca^{2+} por canais Ca_v , induzidas por carvacrol, corroborando com os estudos

de Peixoto-Neves e colaboradores (2009) que evidenciaram a ação de carvacrol em diminuir o influxo de Ca^{2+} por Ca_v em aorta de rato. Porém, é bem descrito que a ativação de receptores α_1 -adrenérgicos ou receptores tromboxanos levam tanto ao influxo de Ca^{2+} por canais Ca_v , como por ROC e SOC na célula muscular lisa (WATANABE et al., 2007; FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007). Adicionalmente, a própria contração induzida por solução despolarizante com alto K^+ , que foi atenuada por carvacrol, também envolve entrada de Ca^{2+} por SOC (RATZ; BERG, 2006). Sendo assim, para avaliar se o efeito vasorelaxante induzido por carvacrol estaria adicionalmente envolvendo inibição do influxo de cálcio por uma via diferente dos canais Ca_v , fomos avaliar a influência de carvacrol na entrada de Ca^{2+} por canais operados por estoques (SOC) e/ou pelos canais operados por receptor (ROC).

É importante ressaltar que tanto os SOC, como ROC são canais que apresentam entidade estrutural relacionada aos canais TRP (BEECH; MURAKI; FLEMMING, 2004; THEBAULT et al., 2005; ZAGRANICHNAYA; WU; VILLEREAL, 2005) principalmente com os TRPC1 e TRPC6, respectivamente (DIETRICH et al., 2005a; HOFMANN et al., 1999). Os Canais TRP são canais formados por quatro subunidades ou tetrâmeros, onde cada subunidade ou monômero é formada por seis segmentos transmembranares, estando ligados por um segmento de poro, localizado entre o quinto e o sexto segmento transmembranar. Esses canais TRP podem formar tanto homotetrâmeros como heterotetrâmeros sendo os únicos canais de cálcio ativados por estímulos variados (FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007).

Então, para investigar a influencia de carvacrol no influxo de Ca^{2+} por ROC e SOC realizamos experimento num meio isento de cálcio, onde foram induzidas contrações transientes com FEN ($10\mu\text{M}$), primeiramente com o objetivo de depletar os estoques intracelulares de Ca^{2+} e com isso ativar os canais operados por estoque (SOC), proteína que apresenta como componente essencial para seu funcionamento os canais TRPC1 (DIETRICH et al., 2005a; GIBSON et al., 1998; ALBERT; LARGE, 2003; BEECH; MCHUG; FLEMMING, 2003), bem como ativar os canais operados por receptor (ROC), descrito por apresentar na sua estrutura os canais TRPC6 como uma subunidade integral (HOFMANN et al., 1999; HILL et al., 2006; SOBOLOFF et al., 2005). Para descartar a participação dos Ca_v foi utilizada a Nifedipina ($1 \mu\text{M}$), que nessa concentração em célula muscular lisa, abole totalmente as correntes de Ca^{2+} por fechamento dos Ca_v (CURTIS; SCHOLFIELD, 2001; KRUTETSKAIA et al., 1997;

WILLMOTT et al., 1996). Nestas condições o carvacrol aboliu significativamente a contração induzidas por CaCl_2 , de maneira dependente de concentração (10^{-4} , 3×10^{-4} M) (Figura 39). Esses resultados sugerem que o efeito vasorelaxante induzido por carvacrol pode envolver também uma possível influência do monoterpeno sobre os SOC e ROC, resultando em um bloqueio do influxo de Ca^{2+} em músculo liso de artéria mesentérica superior isolada de rato, levando ao vasorelaxamento.

Adicionalmente, experimentos foram realizados para avaliar de forma isolada a entrada capacitiva de cálcio (SALIDO; SAGE; ROSADO et al., 2009), através dos SOC. Como descritas anteriormente, altas concentrações de K^+ , nas células de músculo liso, levam a um aumento do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v (SOMLYO; SOMLYO, 1994; BRIGGS, 1962; NELSON et al., 1988), como também envolve canais TRP (RATZ; BERG, 2006) que permitem uma entrada de Ca^{2+} através SOC (AY et al., 2004; FELLNER; ARENDSHORST, 2000; USACHEV; THAYER, 1999; WAYMAN; GIBSON; MCFADZEAN, 1998). Sendo assim, realizamos experimentos na presença de uma solução despolarizante com alto K^+ , nominalmente sem cálcio, responsável por ativar tanto SOC e Ca_v (RATZ; BERG, 2006), porém no meio a participação dos Ca_v foi descartada pelo uso da nifedipina ($1\mu\text{M}$) (CURTIS; SCHOLFIELD, 2001; KRUTETSKAIA et al., 1997; WILLMOTT et al., 1996). Em seguida induzimos contrações com CaCl_2 , provavelmente mediadas pela entrada de Ca^{2+} por SOC, e observamos que o carvacrol aboliu significativamente a entrada capacitiva de cálcio de maneira dependente de concentração (10^{-4} , 3×10^{-4} M) (Figura 40). Estes dados em conjunto sugerem que carvacrol inibe o influxo de Ca^{2+} por SOC, provavelmente por influência sobre os canais TRP.

Sabendo que os canais TRP são canais catiônicos permeáveis a cálcio e que desde a sua descoberta no sistema visual de *Drosophila* (COSENS; MANNING, 1969 Apud MINKE, 2006), tem atraído uma crescente atenção por serem os únicos canais de cálcio que respondem a estímulos variados e que estão associados a diversas funções fisiológicas (LEDOUX et al., 2006; CLAPHAM et al., 2005). Fomos investigar quais os prováveis canais TRP que poderiam estar participando no efeito vasorelaxante induzido pelo carvacrol, para tanto utilizamos diversos bloqueadores não seletivos de canais TRP. Vale salientar que até então, foram detectados mais de 10 membros distintos da superfamília dos TRPs nas células musculares lisas vasculares, por exemplo, os TRPV1, TRPV4, TRPM4, TRPC6, TRPC1, TRPM7, TRPC3 e mais

recentemente o TRPM8 e TRPA1 (INOUE, et al., 2006; YANG et al., 2006, MINKE, 2006; EARLEY; GONZALES; CRNICH, 2009; WATANABE, et al. 2008).

A literatura nos mostra que diversos monoterpenos apresentam ação agonista como também antagonista sobre diferentes membros da família dos canais TRP (PEIER et al., 2002; VOGT-EISELE et al., 2007; PATEL et al., 2007). O carvacrol, por exemplo, é relatado por ativar os canais TRPV3 (MACPHERSON et al., 2006; VOGT-EISELE et al., 2007), ativar o TRPA1 (XU et al., 2006), inibir em *Drosophila* os canais TRPL (TRP-like) (PARNAS et al., 2009) como também inibir em mamíferos os TRPM7 (PARNAS et al., 2009).

Diante dessas premissas realizamos um protocolo no qual utilizamos vermelho de rutênio que é um bloqueador não-seletivo dos canais TRPV1, 2, 3 e 4, TRPA1 e TRPM6 (CLAPHAM et al., 2005). Nestas condições, o efeito vasorelaxante induzido pelo monoterpeno não foi alterado significantemente (Figura 41), sugerindo que esses canais podem não estar participando no efeito vasorelaxante induzido pelo carvacrol.

Em seguida utilizamos o íon lantânio (La^{3+}) que é um bloqueador dos TRPV4, TRPV2, dos TRPC6, TRPC3, e dos TRPM3 e TRPM4 (CLAPHAM et al., 2005). Interessantemente, observamos que o efeito do carvacrol nessas condições foi potencializado (Figura 42), sugerindo que carvacrol possa induzir a ativação de subtipos de canais TRP sensíveis a La^{3+} que levem a entrada de Ca^{2+} na célula muscular e desta forma prejudique o relaxamento induzido por carvacrol em condições controle. Em experimentos utilizando outro bloqueador de canais TRP, o íon gadolínio (Gd^{3+}), um bloqueador dos TRPC1, TRPC3 e TRPC6, dos TRPM3 e TRPM4 e do TRPV4 (CLAPHAM et al., 2005) observamos novamente que o efeito do carvacrol nessas condições foi potencializado de maneira significante (Figura 43), sugerindo assim que o carvacrol parece levar a ativação de canais TRP sensíveis a Gd^{3+} que possam favorecer o estado contrátil do tecido vascular.

Esses dados em conjunto observados com os bloqueadores vermelho de rutênio, Gd^{3+} e La^{3+} revelam que provavelmente alguns subtipos de canais TRP parecem não participar das respostas induzidas por carvacrol como TRPV1, V2, V3 e V4, TRPM6 e TRPA1 ou podem não estar expressos no tecido arterial mesentérico. Restaram então como possíveis alvos do carvacrol os subtipos TRPC1, TRPC3, TRPC6, TRPM3 e TRPM4. Os canais TRPM3 sua expressão foi observada no RNAm de artéria mesentérica (INOUE, 2006), já o TRPC1, C3 e C6 são ubíquitos nos tecidos vasculares

(INOUE et al., 2006) e TRPM4 também é expresso no tecido mesentérico de rato (INOUE et al., 2006), porém é um canal catiônico não permeável ao Ca^{2+} (CLAPHAM et al., 2005). Portanto, os nossos dados até aqui sugerem que carvacrol pode ter ação sobre canais TRP em artéria mesentérica de rato, provavelmente sobre TRPC1, C3, C6, TRPM4 e M3 e a ativação destes canais por carvacrol parece diminuir o efeito vasorelaxante induzido pelo monoterpeno.

A literatura reporta que TRPC3 é um subtipo de canal da superfamília de canais TRP que apresenta seu funcionamento celular acoplado ao trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) e que esta interação demonstra uma nova idéia na sinalização de Ca^{2+} mediada por TRP-NCX (ROSKER et al., 2004; EDER et al., 2005). Este trocador é capaz de modular os sinais de Ca^{2+} celulares em uma maneira bidirecional, tais que aumentando a entrada de Na^+ por canais TRPC3 eventualmente leva a operação em modo reverso do NCX, resultando em um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular, (ROSKER et al., 2004; EDER et al., 2005, para detalhes ver revisão de FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007). Então para investigarmos a participação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e indiretamente relacionar aos resultados com os inibidores de TRPC3, foi realizado um protocolo na presença do íon níquel ($100 \mu\text{M}$), que é descrito como um inibidor dos trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1). Nestas condições, observou-se que o carvacrol promoveu relaxamento de maneira dependente de concentração, porém com aumento da potência farmacológico, com mesmo perfil e sem diferenças nos valores de pD_2 quando comparados aos dados obtidos na presença de Gd^{3+} ou La^{3+} (Figura 44), sugerindo que o efeito vascular induzido por carvacrol parece envolver a participação de NCX1 e provavelmente pode estar relacionado a ativação de TRPC3. Estes resultados sugerem que provavelmente carvacrol, dentre os canais TRP que levam a entrada de Ca^{2+} e vasoconstrição, estaria provavelmente ativando os canais TRPC3 levando a entrada de Na^+ , ativação do modo reverso do NCX1, levando a entrada de Ca^{2+} na célula muscular, favorecendo a contração e por isso a presença de La^{3+} , Gd^{3+} e Ni^{2+} potencializaram o efeito da carvacrol.

A literatura nos mostra que o TRPM7 é um canal catiônico, permeável ao Mg^{2+} e Ca^{2+} , constitutivamente ativado e pode ser inibido por Mg^{2+} livre (NADLER et al., 2001; RUNNELS; YUE; CLAPHAM, 2001). Para avaliar a possível participação desse canal no efeito vasorelaxante promovido por carvacrol, foi adicionado magnésio (MgCl_2 2,25 mM), que nessa concentração pode inibir canais TRPM7 (CLAPHAM et al., 2005).

Nesta condição, o efeito relaxante de carvacrol foi atenuado significantemente ($p<0,01$), com alteração na sua eficácia e potência farmacológica (Figura 45), sugerindo que o monoterpeno pode estar agindo bloqueando canais TRPM7 para induzir o vasorelaxamento. É importante ressaltar que dados relatados na literatura mostram que o aumento da concentração de Mg^{2+} extra ou intracelular pode induzir também bloqueio dos canais Ca_v , diminuindo o influxo de Ca^{2+} (FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007). Em nossos estudos para avaliar se a concentração de Mg^{2+} utilizada para inibir TRPM7 não estaria inibindo também Ca_v realizamos experimentos avaliando o efeito de Mg^{2+} (2,25 mM) em contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644, ativador de Ca_v . Observamos que não houve alteração significativa no efeito contraturante induzido pelo derivado diidropiridínico após adição de Mg^{2+} , sugerindo que a mesma concentração utilizada para inibir TRPM7 não foi capaz de inibir as contrações induzidas pela entrada de Ca^{2+} por Ca_v . Em conjunto estes dados reforçam que carvacrol parece inibir os canais TRPM7 em artéria mesentérica de rato, corroborando com dados na literatura que mostram que o carvacrol atua inibindo TRPM7 em mamíferos (PARNAS et al., 2009).

Analizando o conjunto de dados obtidos em tecido mesentérico, podemos constatar que provavelmente carvacrol induz vasorelaxamento por diminuir o influxo de Ca^{2+} por canais Ca_v , ROC e SOC, estando estes dois últimos relacionados provavelmente aos canais TRPC, em especial TRPC1 e TRPC6, bem como diminuição da entrada de Ca^{2+} por canais TRPM7. Além disso, carvacrol parece ativar canais TRPC3 em anéis mesentéricos isolados de rato, favorecendo o estado contrátil do tecido vascular. No entanto, serão necessários estudos adicionais para confirmar as hipóteses surgidas neste estudo realizado com carvacrol, principalmente os dados relacionados com a participação de canais TRP, já que estes canais não apresentam bloqueadores seletivos que favoreçam o entendimento funcional destes canais no relaxamento induzido por carvacrol. Porém, podemos ressaltar que este trabalho é extremamente interessante, pois a maioria dos trabalhos relacionados aos efeitos de substâncias atuando sobre canais TRP é realizada em células isoladas ou em sistemas com manipulação da expressão destes canais em linhagens de células, o que pode resultar em uma alteração na configuração basal e fisiológica dos homotetrâmeros ou dos heterotetrâmeros que constituem os canais TRP (SOBOLOFF et al., 2005).

Para avaliarmos se os efeitos vasculares induzidos por carvacrol podem refletir numa alteração hemodinâmica, estudos *in vivo* foram realizados com ratos não

anestesiados. Nesta condição experimental, observamos que administração endovenosa do carvacrol promoveu um efeito hipotensor (Figura 47), provavelmente relacionado a vasodilatação que este composto pode induzir e provável diminuição da resistência vascular periférica total. Além disso, a administração endovenosa do carvacrol induziu um efeito bradicárdico (Figura 47), sugerindo uma ação direta ou indireta sobre a atividade cardíaca por parte do monoterpeno. É importante destacar que é bem descrito que os canais TRPM7 são vastamente expressos no tecido cardíaco (FLEIG; PENNER 2004) e, em nossos experimentos, bem como nos resultados de Parnas e colaboradores (2009), carvacrol inibe TRPM7. Esta via de sinalização poderia estar envolvida na resposta bradicárdica induzida por carvacrol, porém estudos adicionais precisam ser realizados para investigar esta hipótese.

Nossos estudos *in vivo* corroboram com os estudos de Aydin e colaboradores (2007), que também evidenciou um efeito hipotensor e bradicárdico induzidos por carvacrol em ratos anestesiados. Porém, a anestesia modifica o funcionamento dos principais sistemas de regulação da pressão arterial, tais como o sistema renina-angiotensina, o sistema nervoso simpático e o baroreflexo (DORWARD et al., 1985), produzindo depressão de algumas sinapses do sistema nervoso central, alterando as respostas autonômicas (ZIMPFER et al., 1982), além de outros efeitos sobre os sistemas básicos de controle fisiológico da pressão arterial (FLUCKIGER et al., 1985), por isso utilizamos como metodologia, medida direta da pressão arterial (PA) em animais não anestesiados. Nesta condição experimental diferente da utilizada no trabalho de Aydin e cols. (2007), o efeito hipotensor foi observado em doses menores que as demonstradas no referido estudo, assim como o efeito bradicárdico foi rapidamente revertido e restabelecido aos parâmetros basais entre 2 e 5 minutos, oposto do observado por eles que variou de 15 minutos a 2 horas, provavelmente por utilizarem ratos anestesiados. É importante ressaltar que a realização de estudos *in vivo* é extremamente interessante para se obter um perfil mais amplo do efeito sistêmico induzido por uma droga, já que todos os sistemas regulatórios estão presentes.

Por fim, esses resultados em conjunto sugerem que carvacrol induz efeito vasorelaxante em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato provavelmente por inibir o influxo de cálcio por Ca_v , como também por ROC e SOC, que parecem estar diretamente correlacionados com os TRPC (C1 e C6), bem como por inibição dos

canais TRPM7 (Figura 48). O efeito vasorelaxante observado pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo efeito hipotensor observado nos experimentos *in vivo*. Além disso, carvacrol apresenta atividade bradicárdica, no entanto, serão necessários mais estudos para avaliar a influência de carvacrol sobre esta atividade cardíaca.

Desta forma esses resultados se mostram promissores e extremamente interessantes no que diz respeito a estudos sobre o sistema cardiovascular envolvendo monoterpenóides, em especial o carvacrol, uma vez que se presta uma grande contribuição à farmacologia, de um modo que espera-se que esses resultados possam trazer acréscimo de informações importantes para os estudos no sistema cardiovascular.

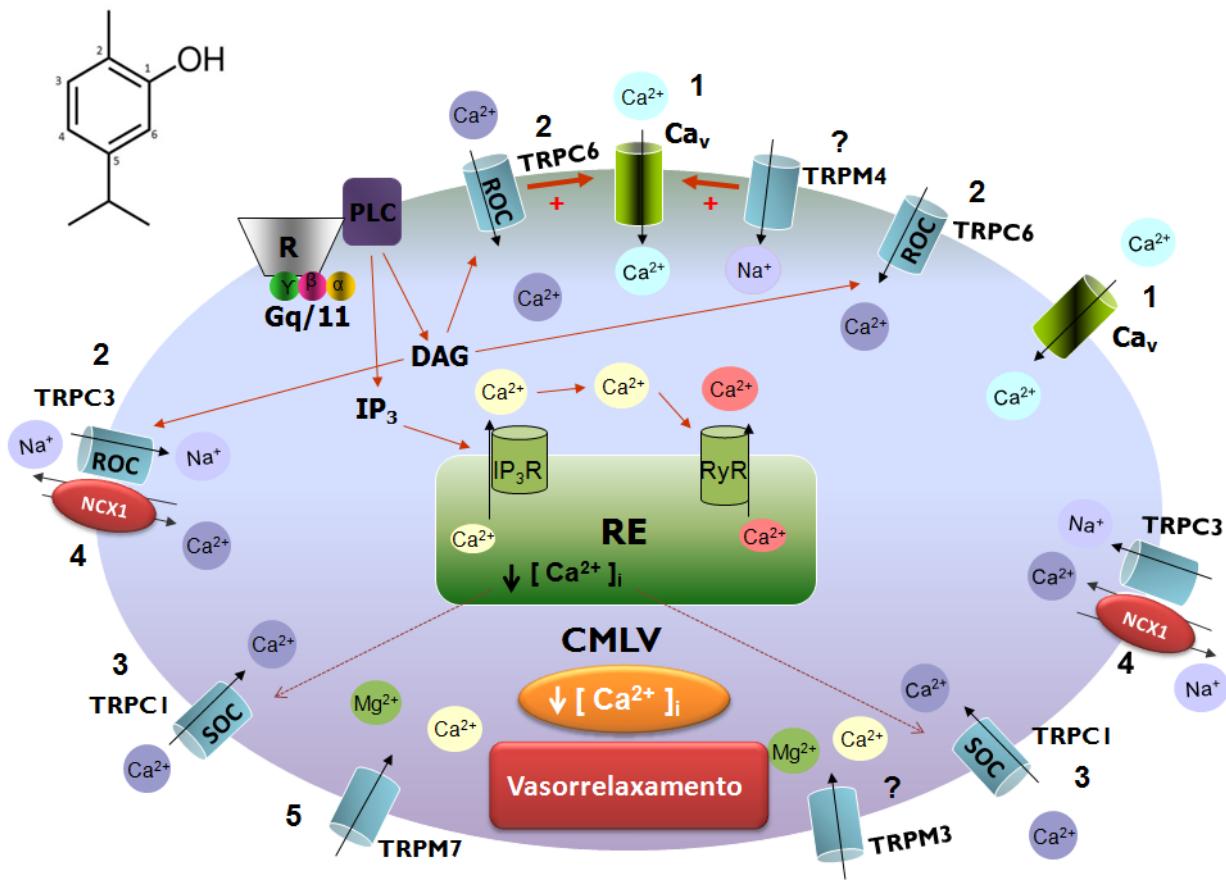


Figura 48: Representação esquemática da provável via de sinalização do efeito vasorelaxante induzido por carvacrol. 1) Bloqueio do influxo de cálcio através dos Ca_v ; 2) Bloqueio do influxo de cálcio através do ROC e/ou TRPC6 ; 3) Bloqueio do influxo de cálcio através do SOC e/ou TRPC1 ; 4) Ação sobre NCX1 por ativação de TRPC3 ; 5) Inibição do TRPM7 .

Conclusões

7. Conclusões

Em conclusão, o presente estudo, fazendo uso de abordagens *in vivo* e *in vitro*, demonstrou que:

- Carvacrol promoveu um efeito vasorelaxante de maneira dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato e esse efeito ocorreu de maneira independente do endotélio vascular;
- Carvacrol inibiu o influxo de cálcio provavelmente por atuar sobre canais de cálcio sensíveis a voltagem;
- Carvacrol inibiu também o influxo de cálcio provavelmente por atuar sobre canais operados por receptor e canais operados por estoques que são canais diretamente correlacionados com os TPPC1, TRPC3 e TRPC6;
- Carvacrol parece atuar sobre o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e provavelmente pode estar relacionado a ativação de TRPC3;
- Carvacrol pode estar provavelmente agindo bloqueando o TRPM7;
- O carvacrol promoveu hipotensão e bradicardia em ratos normotensos não anestesiados.

Perspectivas

8. Perspectivas

- Avaliar a expressão dos canais TRPs em miócitos de artéria mesentérica de SHR e WKY;
- Investigar a atividade vasorelaxante do carvacrol em artéria mesentérica de SHR e WKY e a participação de canais TRPs nestas respostas;
- Investigar as influências do carvacrol sobre os efeitos das alterações da temperatura em vasos de animais hipertensos avaliando a participação dos canais TRPs termossensíveis nas respostas observadas;
- Analisar os efeitos do carvacrol na entrada capacitiva de Ca^{2+} por canais TRPs em artéria mesentérica isolada de rato SHR.
- Avaliar o efeito do carvacrol sobre as correntes iônicas através dos canais TRPs em células musculares lisas isolados de artéria mesentérica de SHR, utilizando técnica de “patch clamp”.
- Avaliar o efeito do carvacrol sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de animais normotensos (WKY) e animais espontaneamente hipertensos (SHR) durante 24 h e investigar a participação dos canais TRP nas respostas observadas.
- Avaliar os efeitos de carvacrol sobre o cronotropismo e o inotropismo em átrio isolado de rato;
- Avaliar a influencia do carvacrol no controle autonômico;

Referências

9. REFERÊNCIAS

ADACHI-AKAHANE, S.; CLEEMANN, L.; MORAD, M. BAY K 8644 modifies Ca²⁺ cross signaling between DHP and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. **Am J Physiol**, v. 276, p.H1178 – H1189, 1999.

ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antifungal activity of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **J Agric Food Chem** 46, 1739–1745, 1998.

ALBERT A.P., LARGE W.A. Store-operated Ca²⁺permeable non-selective cation channels in smooth muscle cells. **Cell Calcium**; 33:345–356-2003.

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

AUDOLY L.P., ROCCA,B., FABRE,J.E., KOLLER B.H.; THOMAS D.; LOEB A.L.; COFFMAN T.M.; FITZGERALD G.A.; Cardiovascular responses to the isoprostanes iPF2α-III and iPE2-III are mediated via the thromboxane A2 receptor in vivo. **Circulation**, 101:2833-2840, 2000.

AY, B., PRAKASH, Y.S., PABELICK, C.M., SIECK, G.C., Store-operated Ca2+ entry in porcine airway smooth muscle. Am. J. Physiol., Lung **Cell. Mol.Physiol.** 286, L909–L917, 2004.

AYDIN, Y.; KUTLAY, O.; ARI, S.; DUMAN, S.; UZUNER, K.; AYDIN, S. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. **Planta Med.** 73: 1365-71, 2007.

BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour Fragrance J.** 13: 235–244, 1998.

BASER, K.H.C.; DEMIRCI, F. Chemistry of Essential Oils. In: Berger RG Ed, Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprospecting and Sustainability. **Heidelberg, Springer.** 43-86, 2007.

BASER, K.H. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. Review. **Curr Pharm Des.** 14(29):3106-19, 2008.

BASTOS J.F.; MOREIRA I.J.; RIBEIRO T.P.; MEDEIROS I.A.; ANTONIOLLI A.R.; DE SOUSA D.P.; SANTOS M.R. Hypotensive and Vasorelaxant Effects of Citronellol, a Monoterpene Alcohol, in Rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** doi:10.1111/j.1742-843.00492.x., 2009.

BEECH, D. J.; MURAKI, K.; FLEMMING, R. Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP. **J. Physiol.**, v. 559, p. 685 - 706, 2004.

BEECH D.J., XU S.Z., MCHUGH D., FLEMMING R. TRPC1 store-operated cationic channel subunit. **Cell Calcium.**; 33:433 – 440, 2003.

BERGDAHL, A.; GOMEZ, M. F.; DREJA, K.; XU, S. Z.; ADNER, M.; BEECH, D. J. BROMAN J., HELLSTRAND P., SWÄRD K.; Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca²⁺ entry dependent on TRPC1. **Circ. Res.**, v. 93, p. 839 - 847, 2003.

BERNE,R,M.; LEVY, M. N.; KOEPHEN, B. M.; STATION, B.A. Fisiologia 6 ed. Rio de janeiro: **Editora Elsevier**. Cap.15,p.289, 2009.

BOTELHO, M.A.; NOGUEIRA, N.A.P.; BASTOS, G.M.; FONSECA, S.G.C.; LEMOS,T.L.G; MATOS, F.J.A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V.S.; BRITO,G.A.C. Antimicrobial activity of the essential oil from Lippia sidoides, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 40: 349-356, 2007.

BOSKABADY, M.H.; RAMAZANI, M.; TABEI, T. Relaxant effects of different fractions of essential oil from *Carum copticum* on guinea pig tracheal chains. **Phytother Res.** 17(10):1145-9, 2003.

BOSKABADY, M.H.; JANDAGHI P. Relaxant effects of carvacrol on guinea pig tracheal chains and its possible mechanisms. **Pharmazie** 58(9):661-663, 2003.

BRAGA V.A. Dietary salt enhances angiotensin-II-induced superoxide formation in the rostral ventrolateral medulla. **Autonomic Neuroscience**, (in press). doi:10.1016/j.autneu.2009.12.007. 2010.

BRIGGS, A.H., Calcium movement during potassium contracture in isolated rabbit aortic strips. **Am. J. Physiol.** 203, 849–852, 1962.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **Int. J. Food Microbiol** 94: 223–253, 2004.

BUSSE R.; EDWARDS, G.; FÉLÉTOU, M.; FLEMING, I.; VANHOUTTE, P. M.; EDHF:bringing the concepts together. **Tr. Pharmacol. Sci.** v. 23, p. 374– 80, 2002.

BYLUND, D. B. Nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacol Rev**, v.46, p.121-136, 1994.

CALIXTO, J. B.; KASSUYA, C. A. L.; ANDRÉ, E.; FERREIRA, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 106, p. 179 - 208, 2005.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M. ; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology** 148: 288–294, 2007.

CARVALHO, A.F., MELO, V.M., CRAVEIRO, A.A., MACHADO, M.I., BANTIM, M.B., RABELO, E.F., Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 94, 569–571, 2003.

CAMPAGNOLE S., M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v.8, p.30 - 40, 2001.

CAMPBELL, W. B.; GEBREMEDHIN, D.; PRAIT, P. F.; HERDER, D. R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circ. Res.**, v. 78, p. 415-423, 1996.

CATTERALL,W.A.; PERES-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. International Union of pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-fuction relationships of voltage-geeted calcium channels. **Pharmacological Reviews**, v.57, n4, p.411-425, 2005.

CAVARAPE A., BAUER J., BARTOLI E., ENDLICH K., PAREKH N., Effects of angiotensin II, arginine vasopressin and tromboxane A₂ in renal vascular bed: role of rho-kinase. **Nephrology Dialysis Transplantation** 18: 1764-1769, 2003.

CHUBANOV, V.; WALDEGGER, S.; MEDEROS, Y. S. M.; VITZTHUM, H.; SASSEN, M. C.; SEYBERTH, H. W. et al. Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 101, p. 2894 - 2899, 2004.

CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. **Nature (Lond)**, v. 426, p. 517 - 524, 2003.

CLAPHAM, D. E.; JULIUS, D.; MONTELL, C.; SCHULTZ, G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, p. 427 - 450, 2005.

CLARK, S. G.; FUCHS, L. C. Role of nitric oxide and Ca²⁺-dependent K+ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **J Pharmacol Exper Ther**, v.282, n.3, p.1473 - 1479, 1997.

COX, R. H.; Changes in the expression and function of arterial potassium channels during hypertension. **Vasc. Pharmacol.**, v 38, p. 13-23, 2002.

CRIBBS, L. L. T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. **Cell Calcium**, v.40, n.20, p.221 - 230, 2006.

CURTIS, T.M., SCHOLFIELD, C.N., NIFEDIPINE blocks Ca²⁺ store refilling through a pathway not involving L-type Ca²⁺ channels in rabbit arteriolar smooth muscle. **J. Physiol.** 532, 609–623, 2001.

DAVIE, C. S.; KUBO, M.; STANDEN, N. B., Potassium channel activation and relaxation by nicorandil in rat small mesenteric arteries. **Br J Pharmacol**, v. 125, n.8, p.1715 – 1725, 1998.

DIETRICH, A.; GOLLASCH, M.; CHUBANOV, V.; MEDEROS, Y. S. M.; DUBROVSKA, G.; HERZ, U., Studies on TRPC6 deficient mice reveal its nonredundant role in the regulation of smooth muscle tone. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 367, p. 238, 2003.

DIETRICH, A.; KALWA, H.; ROST, B. R.; GUDERMANN, T. The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance. **Pflugers Arch.**, v. 451, p. 72 - 80, 2005a.

DIETRICH, A.; MEDEROS, Y. S. M.; GOLLASCH, M.; GROSS, V.; STORCH, U.; DUBROVSKA, G., OBST M., YILDIRIM E., SALANOVA B., KALWA H., ESSIN K., PINKENBURG O., LUFT F.C., GUDERMANN T., BIRNBAUMER L. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. **Mol. Cell Biol.**, v. 25, p. 6980 - 6989, 2005b.

DONG, H.; EARLE, M.L.; JIANG, Y.; LOUTZENHISER, K. A.; TRIGGLE, C. R., Cardiovascular effect of CPU-23, a novel L-type calcium channels blocker with a unique molecular structure. **Br J Pharmacol**, v.122,p.1271-1278,1997.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J Appl Microbiol** 88, 308–316, 2000.

DORWARD, P. K.; RIEDEL, W.; BURKE, S. L., GIPPS J., KORNER P.I.,The renal sympathetic baroreflex in the rabbit. Arterial and cardiac baroreceptor influences, resetting, and effects of anesthesia. **Circ Res**, v.57, p.618 - 633, 1985.

EARLEY S., GONZALES A. L., CRNICH R., Endothelium-Dependent Cerebral Artery Dilation Mediated by TRPA1 and Ca^{2+} - Activated K^+ Channels **Circulation Research**.104:987 - 994 - 2009.

EARLEY, S., GONZALES, A. L., GARCIA, Z. I., A Dietary Agonist of TRPV3 Elicits Endothelium-Dependent Vasodilation. **Molecular Pharmacology**, doi:10.1124/mol.109.060715, 2010.

EARLEY, S., HEPPNER, T. J., NELSON, M. T., BRAYDEN, J. E. TRPV4 forms a novel Ca^{2+} signaling complex with ryanodine receptors and BK_{Ca} channels. **Circ. Res.**, v. 97, p. 1270 - 1279, 2005.

EDER, P.; POTESER, M.; ROMANIN, C.; GROSCHNER, K. Na^+ entry and modulation of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange as a key mechanism of TRPC signaling. **Pflügers Arch.**, v. 451, p. 99 - 104, 2005.

FELLNER, S.K., ARENDSHORST,W.J., Ryanodine receptor and capacitative Ca^{2+} entry in fresh preglomerular vascular smooth muscle cells. **Kidney Int.** 58, 1686–1694. 2000.

FERGUSON S.S.G., Avolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. **Pharmacol Rev** 53: 1-24, 2001.

FLEIG A., PENNER R., The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. **Trend Pharmacol Sci.**; 25:633–639, 2004.

FLUCKIGER, J.P.; SONNAY, M.; BOILLAT, N., ATKINSON, J., Attenuation of baroreceptor reflex by general anesthetic agent in the normotensive rat. **Eur J Pharmacol**, v.109, p.105 - 109, 1985.

FIRTH A. L., REMILLARD C. V., YUAN J. X.-J. TRP channels in hypertension **Biochimica et Biophysica Acta**, 1772 895–906, 2007.

FURCHGOTT, R.F; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 373-6, 1980.

FREICHEL, M.; SUH, S. H.; PFEIFER, A.; SCHWEIG, U.; TROST, C.; WEISSGERBER, P. Lack of an endothelial store-operated Ca^{2+} current impairs agonistdependent vasorelaxation in TRP4 $^{-/-}$ mice. **Nat. Cell Biol.**, v. 3, p. 121 - 127, 2001.

GALICIA,V.J.; ORTIZ-ANDRADE,R.; CASTILLO-ESPAÑA,P.; IBARRA-BARAJAS M.; GALLARDO-ORTIZ I.; VILLALOBOS-MOLINA R., ESTRADA-SOTO S.; Antihypertensive and vasorelaxant activities of Laelia autumnalis are mainly through calcium channel blockade. **Vascular Pharmacology**, v. 49, p. 26-31, 2008.

GHATTA, S., NIMMAGADDA, D., XU, XIAOPING., O'ROUEKE, S.T. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: Structural and functional implications. **Pharmacology and Therapeutics**. 100: 103-116, 2006.

GIBSON A., MCFADZEAN I., WALLACE P., WAYMAN C.P. Capacitative Ca^{2+} entry and the regulation of smooth muscle tone. **Trends Pharmacol Sci.**;19:266 –269, 1998.

GODFRAIND, T., MILLER, R., WIBO, M., Calcium antagonism and calcium entry blockade. **Pharmacol. Rev.** 38, 321–416,1986.

GOLDSTEIN, S.A.N.; BAYLISS, D.A.; KIM, D.; LESAGE F.; PLANT L. D.; RAJAN S.; Nomenclature and Molecular Relationships of Two-P Potassium Channels **Pharmacol Rev.** 57, p. 527-540, 2005.

GOODMAN; GILMAN, As bases farmacológicas da Terapêutica 11^a Edição. McGraw – Hill Interamericana do Brasil, 2006.

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS I.A., Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolona **Braz J Med Biol Res**, v.36, p.549-560, 2004.

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS I.A., Endothelium-dependent hypotensive and vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of mentha x villosa in rats. **Phytomedicine**, v.11, p.490-497, 2004.

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS I.A., Muscarinic agonist properties involved in the hypotensive and vasorelaxant responses of rotundifolona in rats **Plant med**, v.68, p.700-704, 2002.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine** 27: 1-93, 2006.

GURNEY, A. M.; Mechanisms of drugs-induced vasodilatation. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 46, p. 242-251, 1994.

GUTMAN G. A., CHANDY K. G., GRISSMER S., LAZDUNSKI M., MCKINNON D., PARDO L. A., ROBERTSON G. A., RUDY B., SANGUINETTI M. C., STÜHMER W.; WANG X. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels **Pharmacol Rev.** 57, p. 473-508, 2005.

HADDY, F. J.; VANHOUTTE, P. M.; FELETOU, M.; Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 290, p. R546–R552, 2006.

HE, L.; MO, H.; HADISUSILO, H.; QURESHI, A.A.; ELSON, C.E. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. **J Nutr** 127(5):668-74, 1997.

HE, Y.; YAO, G.; SAVOIA, C.; TOUYZ, R. M. Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angiotensin II. **Circ. Res.**, v. 96, p. 207 - 215, 2005.

HILL A.J., HINTON J.M., CHENG H., GAO Z., BATES D.O., HANCOX J.C., LANGTON, P.D., JAMES A.F., A TRPC-like non-selective cation current activated by I-adrenoceptors in rat mesenteric artery smooth muscle cells. **Cell Calcium**, 2006.

HOFMANN, T.; CHUBANOV, V.; GUDERMANN, T.; MONTELL, C. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca^{2+} -activated monovalent selective cation channel. **Curr. Biol.**, v. 13, p. 1153 - 1158, 2003.

HOFMANN T., SCHAEFER M., SCHULTZ G., GUDERMANN T., Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 99 7461–7466, 2002.

HOFMANN, T.; OBUKHOV, A. G.; SCHAEFER, M.; HARTENECK, C.; GUDERMANN, T.; SCHULTZ, G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. **Nature**, v. 397, p. 259 - 263, 1999.

INSEL, P. A. Adrenergic receptors – evolving concepts and clinical implications. **N Engl J Med**, v.334, p.580 - 585, 1996.

INOUE, R.; JENSEN, L. J.; SHI, J.; MORITA, H.; NISHIDA, M.; HONDA, A.; ITO, Y. Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. **Circ. Res.**, v. 99, p.119 - 131, 2006.

INOUE, R.; OKADA, T.; ONOUE, H.; HARA, Y.; SHIMIZU, S.; NAITOH, S.; ITO Y.; MORI Y.; The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential

component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca(2+)-permeable cation channel. **Circ. Res.**, v. 88, p. 325 - 332, 2001.

JACKSON, W. F. Ion channel and vascular tone. **Hypertension**. v.35, p.173 -178, 2000.

JAGGAR, J. H.; PORTER, V. A.; LEDERER, W. J.; M. T. NELSON ;Calcium sparks in smooth muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.278, C235 - C256, 2000.

JENNER, P.M.; HAGAN, E.C.; TAYLOR, J.M.; COOK, E.L.; FITZHUGH, O.G. Food flavourings and compounds of related structure. I. Acute oral toxicity. **Food and Cosmetics Toxicology**. 2: 327- 343, 1964.

JOHNSON, C.D.; MELANAPHY, D.; PURSE, A.; STOKESBERRY, S.A.; DICKSON, P.; ZHOLOS, A. V. Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channel involvement in the regulation of vascular tone. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. doi:10.1152/ajpheart.01112., 2009.

JUNG, S.; STROTMANN, R.; SCHULTZ, G.; PLANT, T. D. TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 282, p. C347 - C359, 2002.

JUKIC, M.; POLITEO, O.; MAKSIMOVIC, M.; MILOS, M.; MILOS, M. *In vitro* acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. **Phytother** 21(3):259-61, 2007.

KARKABOUNAS, S.; KOSTOULA, O.K.; DASKALOU, T.; VELTSISTAS, P.; KARAMOUZIS, M.; ZELOVITIS, I.; METSIOS, A.; LEKKAS, P.; EVANGELOU, A.M.; KOTSIS, N.; SKOUFOS, I. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. **Exp Oncol** 28(2):121-5, 2006.

KEVIN, S. T.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Can J Pharmacol**, v.83, p.215 - 242, 2005.

KOBAYASHI, S., KANAIDE, H., NAKAMURA, M., K^+ -depolarization induces a direct release of Ca^{2+} from intracellular storage sites in cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 129, 877–884, 1985.

KOBAYASHI, S., KANAIDE, H., NAKAMURA, M., Complete overlap of caffeineand K^+ depolarization-sensitive intracellular calcium storage site in cultured rat arterial smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.** 261, 15709–15713, 1986.

KORNER, P. I.; LANGSFORD, G.; STARR, D. The effects of chloralose-urethane and sodium pentobarbitone anesthesia on the local and autonomic components of the circulatory response to arterial hypoxia. **J Physiol**, v.199, p. 283 - 302, 1968.

KRUTETSKAIA, Z.I., LEBEDEV, O.E., KRUTETSKAIA, N.I., PETROVA, T.V., Organic and inorganic blockers of potential-dependent Ca^{2+} channels inhibit storedependent entry of Ca^{2+} into rat peritoneal macrophages. **Tsitologiya** 39, 1131–1141, 1997.

KUBO, Y.; ADELMAN, J.P.; CLAPHAM, D.E.; JAN, L. Y.; KARSCHIN, A.; KURACHI, Y.; LAZDUNSKI, M.; NICHOLS, C. G.; SEINO, S.; VANDENBERG, C. A.; Nomenclature and Molecular Relationships of Inwardly Rectifying Potassium Channels. **Pharmacol Rev.** 57, p. 509-526, 2005.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N. ; COOTE, P.J. ; NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J Appl Microbiol** 91, 453–462, 2001.

LAUNAY, P.; CHENG, H.; SRIVATSAN, S.; PENNER, R.; FLEIG, A.; KINET, J. P. TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. **Science**, v. 306, p. 1374 - 1377, 2004.

LAUNAY, P.; FLEIG, A.; PERRAUD, A. L.; SCHARENBERG, A. M.; PENNER, R.; KINET, J. P. TRPM4 is a Ca^{2+} -activated non-selective cation channel mediating cell membrane depolarization. **Cell**, v. 109, p. 397 - 407, 2002.

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

LEE S.P., BUBER M.T., YANG Q., CERNE R., CORTÉS R.Y., SPROUS D.G., BRYANT R.W. Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel. **Br J Pharmacol** 153(8):1739-49, 2008.

LEE, S.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chem** 91: 131–137, 2005.

LIPSCOMBE, D.; HELTOM, T. D.; XU, W. L-type calcium channels: the low down. **J. Neurophysiol**, v.92, n.5, p. 2633 - 41, 2004.

LIU, D.; LIMAN, E. R. Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 100, p. 15160 - 15165, 2003.

MACPHERSON L. J., GEIERSTANGER B. H., VISWANATH V., BANDELL M., EID S. R., HWANG S., PATAPOUTIAN A.; The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. **Curr. Biol.**, v. 15, p. 929 - 934, 2005.

MACPHERSON L. J., HWANG S. W., MIYAMOTO T., DUBIN A. E, PATAPOUTIAN A., STORY G. M., More than cool: Promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. **Mol. Cell. Neurosci.** v.32 p.335 – 343, 2006.

MAGYAR, J.; SZENTANDRÁSSY, N.; BÁNYÁSZ, T.; FÜLÖP, L.; VARRÓ, A.; NÁNÁSI, P.P. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. **Eur J Pharmacol.** 487(1-3):29-36, 2004

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N.A.; ECHARD, B.W.; BAGCHI, D.; PREUSS, G. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Mol Cell Biochem** 228, 111–117, 2001.

MAROTO, R.; RASO, A.; WOOD, T. G.; KUROSKY, A.; MARTINAC, B.; HAMILL, O. P. TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. **Nat. Cell Biol.**, v. 7, p. 179 - 185, 2005.

MINKE B., PARNAS M., Insights on TRP channels from *in vivo* studies in *Drosophila*, Annu. **Rev. Physiol.** 68 649–684, 2006.

MONTELL C, RUBIN GM. **Neuron** 2:1313–23,1989.

MONTELL C, BIRNBAUMER L, FLOCKERZI V. **Cell Calcium** 108:595–98, 2002.

MONTELL, C. The TRP superfamily of cation channels. **Sci. STKE.**, v. 272, p. re3, 2005.

NADLER, M. J.; HERMOSURA, M. C; INABE, K.; PERRAUD, A. L.; ZHU, Q.; STOKES, A. J.; KUROSAKI T.; KINET, J.P.; PENNER R.; SCHARENBERG A.M.; FLEIG A.; LTRPC7 is a Mg·ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. **Nature**, v. 411, p. 590 - 595, 2001.

NELSON, M.T., STANDEN, N.B., BRAYDEN, J.E., WORLEY, J.F., Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. **Nature** 336, 382–385, 1988.

NELSON, M. T.; PATLAK, J. B.; WORLEY, J. F.; STANDEN N.B.; Calcium channels, potassium channels, and voltage-dependence of arterial smooth muscle tone. **Am J Physiol**, v.259, p.C3 - C18, 1990.

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

NILIU, B.; PRENEN, J.; DROOGMANS, G.; VOETS, T.; VENNEKENS, R.; FREICHEL, M.; WISSENBACH, U.; FLOCKERZI, V.; Voltage dependence of the Ca^{2+} -activated cation channel TRPM4. **J Biol Chem.**, v. 278, p. 30813 - 30820, 2003.

NILIU, B.; PRENEN, J.; TANG, J.; WANG, C.; OWSIANIK, G.; JANSSENS, A.; VOETS, T.; ZHU, M. X.; Regulation of the Ca^{2+} sensitivity of the non-selective cation channel TRPM4. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 6423 - 6433, 2005a.

NILIU, B.; VOETS, T.; TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. **Pflugers Arch.**, v. 451, p. 1 - 10, 2005b.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A.S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, A.; PIZZIMENTI, F.C.; CIONI, P.L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A.R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology** v.56, p. 519–523, 2007.

OATES, J. A. Antihypertensive agents and the drug therapy of hypertension. In: HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. G.; LIMBRIND L. E.; GOODMAN & GILMAN'S. The pharmacological basis of therapeutics. USA: McGraw-Hill, ed. 9. p. 781, 1996.

PALMER C.P., AYDAR E., DJAMGOZ M.B. **Biochem. J.** 387:211–19, 2005.

PARNAS M., PETERS M., DADON D., LEV S., VERTKIN I., SLUTSKY I., MINKE B. Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels. **Cell Calcium** v.45, p. 300–309, 2009.

PATEL, T.; ISHIUJI, Y; YOSIPOVITCH, G. Menthol: a refreshing look at this ancient compound. **J Am Acad Dermatol**, v.57, p. 873 – 881, 2007.

PEIER, A. M. et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**, v. 108, p. 705 - 715, 2002.

PEIXOTO-NEVES D., SILVA-ALVES K.S., GOMES M.D.M., LIMA F.C., LAHLOUA S., MAGALHÃES P.J.C., CECCATTO V.M., COELHO-DE-SOUZA A.N., LEAL-CARDOSO J.H.. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fund. & Clinic Pharmacol.**, p.1-10, 2009

PEREZ-REYES, E. Molecular Physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. **Physiol Rev**, v.83, n.1, p.117 - 161, 2003.

PHELPS, C. B.; GAUDET, R. The Role of the N Terminus and Transmembrane Domain of TRPM8 in Channel Localization and Tetramerization. **J. Biol. Chem.**, n. 50, v. 282, p. 36474 - 36480, 2007.

PRAWITT, D.; MONTEILH-ZOLLER, M. K.; BRIXEL, L.; SPANGENBERG, C.; ZABEL, B.; FLEIG, A.; PENNER R.; TRPM5 is a transient Ca^{2+} -activated cation channel responding to rapid changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 100, p. 15166–15171, 2003.

PUSGLEY, M.K.; TABRIZCHI,R., The vascular system an overview of structure and function. **Jour. of Pharmac. and toxicol. Method.**, v.40,p.333-340, 2000.

RATZ P. H., BERG K. M., 2-Aminoethoxydiphenyl borate inhibits KCl-induced vascular smooth muscle contraction. **Europ. Jour of Pharmacol.** (541) 177–183, 2006.

RATZ P. H.; MINER A. S., Role of Protein Kinase C and Calcium Entry in KCl-Induced Vascular Smooth Muscle Calcium Sensitization and Feedback Control of Cellular Calcium Levels. **The journ. of pharmacol. and experim. Therap.** 328:399–408, 2009

RIBEIRO, T. P., Estudo da atividade cardiovascular do a terpineol em ratos – Abordagens in vivo e in vitro / Thaís Porto Ribeiro. – João Pessoa, 2008. - Curso de

Pós-graduação em Produtos Naturais e sintéticos Bioativos - área: Farmacologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

ROSKER, C.; GRAZIANI, A.; LUKAS, M.; EDER, P.; ZHU, M. X.; ROMANIN, C.; Groschner K.; Ca^{2+} signaling by TRPC3 involves Na^+ entry and local coupling to the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 13696 - 13704, 2004.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chem** 69: 167–174, 2000.

RUNNELS, L. W.; YUE, L.; CLAPHAM, D. E. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. **Science**, v. 291, p. 1043 - 1047, 2001.

SÁRKÖZI, S.; ALMÁSSY, J.; LUKÁCS, B.; DOBROSI, N.; NAGY, G.; JÓNA I. Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and ryanodine receptor. **J Muscle Res Cell Motil** 28:167-74, 2007.

SARER, E.; PANCALI, S.; YILDIZ, S., SHWARZ O., DAVIS P.H.. Chemical composition and antimicrobial composition of essential oil of Origanum minutiflorum **J Fac Pharm Ankara** 25: 29-38, 1996

SALIDO G. M., SAGE S. O. , ROSADO J. A., TRPC channels and store-operated Ca^{2+} entry **Biochimica et Biophysica Acta Review** 1793 223–230, 2009.

SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R. et. al. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca^{2+} channels. **Nature**, v.303, p.535 – 537, 1983b.

SILVA, D. F. Caracterização do Mecanismo de Ação Molecular Envolvido nos Efeitos Cardiovasculares Induzidos por Rotundifolona em Ratos. **Tese (Doutorado em Farmacologia)** – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

SLAMENOVA, D.; HORVATHOVA, E.; SRAMKOVA, M.; MARSALKOVA, L. DNA protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured in vitro. **Neoplasma**. 54: 108-12, 2007.

SMITH T. L.; HUTCHINS P. M. Anesthetic effects on hemodynamics of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 238: H539-H544, 1980.

SOBOLOFF J, SPASSOVA M, XU W, HE LP, CUESTA N, GILL DL. Role of endogenous TRPC6 channels in Ca^{2+} signal generation in A7r5 smooth muscle cells. **J Biol Chem.**; 40:29–40, 2005.

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

SONKUSARE, S.; PALADE, P. T.; MARSH, J. D. ; TELEMAQUEB, S. ; PESICA, A . ; RUSCH N. J. ; Vascular calcium channel and high blood pressure: Pathophysiology and therapeutic implications. **Vascul Pharmacol**, v.44, n.3, p.131 - 142, 2006.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; TANAKA, H. et. al. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric. **Br J Pharmacol**, n.128, p.1602 - 1608, 1999.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; DEMIRCI, F.; BASER, K.H.C. Essential oil of Turkish Origanum onites L. and its main components, carvacrol and thymol show potent antiprotozoal activity without cytotoxicity. **Planta Med**. 72: 1006, 2006.

TIAN, H.; LAI, D.M. Analysis on the volatile oil in *Origanum vulgare*. **Zhongyaocai**. 29(9): 920–921, 2006.

TIRUPPATTI, C.; FREICHEL, M.; VOGEL, S. M.; PARIA, B. C.; MEHTA, D.; FLOCKERZI, V.; MALIK, A.B.; Impairment of store-operated Ca^{2+} entry in TRPC4^(-/-)

mice interferes with increase in lung microvascular permeability. **Circ. Res.**, v. 91, p. 70 - 76, 2002.

THEBAULT, S., ZHOLOS, A., ENFISSI, A., SLOMIANNY, C., DEWAILLY, E., ROUDBARAKI, M., PARYS, J., PREVARSKAYA, N., Receptor-operated Ca^{2+} entry mediated by TRPC3/TRPC6 proteins in rat prostate smooth muscle (PS1) cell line. **J. Cell. Physiol.** 204, 320–328, 2005.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Can J Physiol Pharmacol**, v.83, p. 215 - 242, 2005.

THORNELOE, K. S.; MEREDITH, A. L.; KNORN, A. M.; ALDRICH, R. W.; NELSON, M. T. Urodynamic properties and neurotransmitter dependence of urinary bladder contractility in the BK channel deletion model of overactive bladder. **Am J. Physiol. Renal Physiol.** v. 289, p. F604 - F610, 2005.

USACHEV, Y.M., THAYER, S.A., Ca^{2+} influx in resting rat sensory neurons that regulates and is regulated by ryanodine-sensitive Ca^{2+} stores. **J. Physiol.** 519 (Pt 1), 115–130, 1999.

VANNIER, B.; ZHU, X.; BROWN, D.; BIRNBAUMER, L.; The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. **J Biol Chem**, v.273, p.8675 - 8679, 1998.

VANHEEL, B.; VAN D.E; VOORDE, J.; EDHF and residual NO: different factors. **Cardiovasc. Res.**, v.46, p.370 - 375, 2000.

VENKATACHALAM, K.; MONTELL, C. TRP Channels. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 76, p. 387 - 417, 2007.

VOGT-EISELE A.K., WEBER K., SHERKHELI M.A., VIELHABER G., PANTEN J., GISSELMANN G., HATT H., Monoterpene agonists of TRPV3, **British Journal of Pharmacology** 151 530–540, 2007.

VOKOU, D.; KOKKIMI, S.; BESSIÈRE, J.M. Origanum onites (Lamiaceae) in Greece: distribution, volatile oil yield and composition. **Econ Bot** 42: 402-412, 1988.

WANG, S.P.; ZANG, W.J.; KONG, S.S.; YU, X.J.; SUN, L.; ZHAO, X.F.; WANG, S.X.; ZHENG, X.H.; Vasorelaxant effect of isopropyl 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoate, a novel metabolite from *Salvia miltiorrhiza*, on isolated rat mesenteric artery. **Eur J Pharmacol**, v.579, p.283-288, 2007.

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

WAYMAN, C.P., GIBSON, A., MCFADZEAN, I., Depletion of either ryanodine or IP₃-sensitive calcium stores activates capacitative calcium entry in mouse anococcygeus smooth muscle cells. **Pflugers Arch.** 435, 231–239, 1998.

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

WELSH, D. G.; MORIELLI, A. D.; NELSON, M. T.; BRAYDEN, J. E. Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. **Circ. Res.**, v. 90, p. 248 - 250, 2002.

WHITE, S. W.; MCRITCHIE, R. J. Nasopharyngeal reflexes: Integrative analysis of evoked respiratory and cardiovascular effects. **Aust J Exp Biol Med Sci**, v.51, p.17 - 31, 1973.

WILLMOTT, N.J., CHOUDHURY, Q., FLOWER, R.J., Functional importance of the dihydropyridine-sensitive, yet voltage-insensitive store-operated Ca^{2+} influx of U937 cells. **FEBS Lett.** 394, 159–164, 1996.

XU H., DELLING M., JUN J.C., CLAPHAM D.E., Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. **Nature neuroscience** 9(5) : 628-635, 2006

YANG, X. R.; LIN, M. J.; MCINTOSH, L. S.; SHAM JS., Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloidrelated channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.290, p.L1267 - L1276, 2006.

YANISHLIEVA, N.; MARINOVA, E.M.; GORDON, M.H.; RANEVA, V.G. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. **Food Chem** 64: 59–66, 1999.

YU, F. H.; CATTERALL, W. A. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. **Sci STKE**., v.253, p. 15, 2004.

ZAGRANICHNAYA, T.K., WU, X., VILLEREAL, M.L., Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 **cells**. **J. Biol. Chem.** 280, 29559–29569, 2005.

ZIMPFER, M.; MANDERS, W. T.; BARGER, A. C., VATNER S. F., Pentobarbital alters compensatory neural and humoral mechanisms in response to hemorrhage. **Am J Physiol**, n. 243, p. H713 - H721, 1982.

ZYGMUNT, P. M. PETERSSON J., ANDERSSON D. A., CHUANG H., SØRGÅRD M., MARZO V. D., JULIUS D., HÖGESTÄTT E. D., Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**, v. 400, p. 452 - 457, 1999.