

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

**O carvacrol reduz a pressão arterial via
ativação de canais receptores de potencial
transiente em ratos espontaneamente
hipertensos**

Doutoranda: Bruna Priscilla Vasconcelos Dantas

Orientador: Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

**JOÃO PESSOA – PB
2014**

BRUNA PRISCILLA VASCONCELOS DANTAS

**O carvacrol reduz a pressão arterial via
ativação de canais receptores de potencial
transiente em ratos espontaneamente
hipertensos**

*Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos da Universidade Federal da
Paraíba, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de **Doutor
em Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos**. Área de concentração:
Farmacologia.*

JOÃO PESSOA – PB

2014

Dantas, Bruna Priscilla Vasconcelos.

O carvacrol reduz a pressão arterial via ativação de canais receptores de potencial transiente em ratos espontaneamente hipertensos / Bruna Priscilla Vasconcelos Dantas. - - João Pessoa : [144], 2014.

1 f.144

*Orientador: Valdir de Andrade Braga
Tese (Doutorado) – UFPB/CCS.*

1.carvacrol 2.canais de cálcio operados por voltagem tipo L 3.canais receptor de potencial transiente 4.vasorelaxamento 5.SHR

BRUNA PRISCILLA VASCONCELOS DANTAS

O carvacrol reduz a pressão arterial via ativação de canais receptores de potencial transiente em ratos espontaneamente hipertensos

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

Orientador

Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Junior

Examinador Externo

Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva

Examinador Externo

Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes

Examinador Interno

Prof. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

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 distancia, pela cumplicidade sempre.

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.

Aos meus filhos, Sofia e Thiago Filho por me darem a alegria de viver todos os dias e tentar ser melhor a cada dia. Pelos sorrisos, pelos abraços, pelo amor incondicional, por me completarem. Amo meus pequenos!

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

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

Agradecimientos

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. Valdir de Andrade Braga, meu Orientador, pelos ensinamentos partilhados e amizade, pela confiança depositada na construção desse trabalho, sou grata pelo incentivo e oportunidade de poder realizar e conquistar esse sonho.

Ao Prof. Dr. Demetrius A. Machado de Araújo, pelos seus ensinamentos e amizade, pela receptividade e por me abrir as portas do seu laboratório.

Aos professores Dr. Deoclécio Alves Chianca Juniores, Dr. João Henrique da Costa Silva, Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes, Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas 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 Banca da qualificação Dr.ª Sandra Rodrigues, Dr.ª Marcia Pouvernan, Dr. Eduardo de Jesus, por toda ajuda prestada a este trabalho, pela colaboração e atenção, pelos ensinamentos valiosos e por tornar esse trabalho melhor.

A Thais Porto Ribeiro, pela amizade, pelos ensinamentos 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.

A Glaucia Veríssimo Faheina Martins, pela amizade, pelas trocas de ensinamentos, ajudas científicas e por se mostrar sempre dispostas a me ajudar, pelos ensinamentos muito valiosos para a elaboração e construção desse trabalho.

Aos amigos do laboratório: Matheus, Suênia, Nayanne, Juliana, Leônidas, Thyago, Alyne, Drieli, Rayssa, Danilo, Katiana, Juan, Ervê, Glaucia, Alynne, Lais, George, Valeria, Kivia pelo apoio, sorrisos, amizade e força.

Aminhas queridas técnicas do laboratório: Sara e Clênia pela ajuda essencial na elaboração desse trabalho.

Aos meus amigos do Mestrado e Doutorado: Antonia, Camila, Carminha, Carlos, Charlane, Carol, Daysiane, Geraldo, João Carlos, John, Renata, Rubens, Thaísa, Karina, Filipe, Fábio, Vivianne, Vitor, Wemerson, Thiago, Vinicius Trajano, Michelini, Eraldo, pelos bons momentos de aprendizado e troca mútua 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, Franklín, Franciele, Fábio, Fernanda, Giliarde, George, Gilberto, Hans, Hariad, Iris, Isis, Igor, Juliane, Max, Miria, Mayrieli, Nelson (in memoriam), Nathalia, Rita, Rubênia (Ruby), Raoni, Shyomara, Tayra, Thaise, Vitor, pelos anos de amizade e companheirismo, onde tivemos muitos momentos de alegrias e felicidades.

*Às minhas eternas amigas: **Thais Celi e Thaise 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. Valdir de Andrade Braga, 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 Celidarque 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 e Caroline Medeiros Mangueira**, 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 suporte técnico através do portal periódicos e apoio financeiro.*

À Universidade Federal da Paraíba por possibilitar e apoiar essa pesquisa.

A todos o meu muito obrigada!

Resumo

O carvacrol reduz a pressão arterial via ativação de canais receptores de potencial transiente em ratos espontaneamente hipertensos

DANTAS, B. P. V.

**Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Tese de Doutorado, CCS/UFPB (2014)**

RESUMO

Os canais TRP têm sido amplamente estudados, em diversos processos de regulação fisiológico e patológico no sistema cardiovascular. Carvacrol (5-isopropil-2metilfenol) é conhecido por agir na vasculatura ativando ou bloqueando canais TRP, entretanto não há relatos dos seus efeitos em ratos hipertensos. Nosso objetivo foi avaliar o envolvimento dos canais TRP na hipertensão e o papel do carvacrol nos efeitos cardiovasculares em ratos espontaneamente hipertensos. Em ensaios eletrofisiológicos carvacrol (300 μ M) promoveu inibição das correntes de bário, sugerindo uma inibição do influxo de cálcio por canais de Ca^{2+} tipo-L. Ao avaliar a expressão do RNAm dos canais TRP em SHR, observamos pela primeira vez que a expressão de TRPV1 ($p=0,0007$), TRPV4 ($p=0,0002$), TRPM7 ($p=0,0091$), TRPM8 ($p=0,0008$) foram diminuídas e TRPC1 ($p=0,02$) aumentada. Em anéis de aorta pré-contraindidos com 1 μ M de FEN, o carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) induziu vasorelaxamento em ratos wistar kyoto (WKY) ($pD_2 = 4,88 \pm 0,09$, $E_{m\acute{a}x} = 100,73 \pm 2,24\%$, $n = 6$; $pD_2 = 5,09 \pm 0,08$, $E_{m\acute{a}x} = 99,60 \pm 0,88\%$, $n = 6$) e em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) ($pD_2 = 4,93 \pm 0,08$, $E_{m\acute{a}x} = 110,06 \pm 2,07\%$, $n = 6$) na presença e na ausência do endotélio funcional, respectivamente. Para avaliar a participação dos canais TRP, na ausência do endotélio funcional as preparações foram incubadas com vermelho de rutênio, em WKY não houve alteração da resposta, mas em animais SHR tanto sua potência ($p<0,001$) como sua eficácia ($p<0,001$) foram diminuídas, sugerindo que carvacrol pode estar agindo em TRPV nos SHR. Ao utilizar magnésio, em WKY e SHR tanto sua potência ($p<0,01$) quanto sua eficácia ($p<0,001$) farmacológica foram atenuadas, sugerindo ação sobre o canal TRPM7. Nas preparações com 2-APB, CPZ e BCTC os seus efeitos foram potencializados ($p<0,01$), sugerindo ação sobre os canais TRPV1, TRPC1, TRPM7 e TRPM8. Já com capsaicina, um ativador de TRPV1, esse efeito foi atenuado ($p<0,001$) confirmando uma possível ação do carvacrol sobre TRPV1. Nos estudos *in vivo*, com WKY e SHR não anestesiados, carvacrol produziu hipotensão e bradicardia, onde ao avaliar a ação dos canais TRP em ensaios com vermelho de rutênio e capsaicina pode-se sugerir uma possível ação de carvacrol sobre TRPV1 e TRPV4, diminuindo a pressão arterial, corroborando com os ensaios *in vitro*. Em conclusão, esses resultados sugerem que os canais TRPV1, TRPV4, TRPM8 e TRPM7 têm sua expressão diminuída e TRPC1 a expressão aumentada em animais SHR e carvacrol induz efeito vasorelaxante provavelmente agindo em TRPV1, TRPV4, TRPC1, TRPM7 e TRPM8 em SHR. Além disso, os efeitos induzidos por carvacrol *in vivo* mostraram uma atividade hipotensora e bradicárdica e uma possível influencia dos canais TRPV1 e TRPV4 nessas respostas.

Palavras-chave: Carvacrol, aorta, Canais de Ca^{2+} operados por voltagem tipo-L, Canais potencial receptor transiente, vasorelaxamento, SHR.

Abstract

The carvacrol reduces blood pressure by activation of transient receptor potential channels in spontaneously hypertensive rats

DANTAS, B. P. V.

**Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Tese de Doutorado, CCS/UFPB (2014)**

ABSTRACT

TRP channels have been extensively studied in many physiological and pathological processes involved in blood pressure regulation. Carvacrol is well known to act on TRP channels in the vasculature, however there are no studies of its effects in hypertensive rats. Our aim was to evaluate the contribution of TRP channels in hypertension and evaluate the effects of carvacrol on TRP channels of SHR. In an electrophysiological approach, carvacrol (300 μ M) inhibited the barium current, suggesting a reduction of calcium influx through L-type voltage-operated Ca^{2+} channels. We found that the mRNA expression of the following TRP channels: TRPV1 ($p=0.0007$), TRPV4 ($p=0.0002$), TRPM7 ($p=0.0091$) and TRPM8 ($p=0.0008$) are decreased and TRPC1 ($p=0.02$) are increased in SHR compared to control. In aortic rings preparations precontracted with 1 μ M of phenylephrine, carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) induced vasorelaxation in WKY ($pD_2 = 4.88 \pm 0.09$, $E_{\max} = 100.73 \pm 2.24\%$, $n = 6$) and SHR ($pD_2 = 4.93 \pm 0.08$, $E_{\max} = 110.06 \pm 2.07\%$, $n = 6$) in the presence of functional endothelium and that effect was not altered after endothelium removal in WKY ($pD_2 = 5.09 \pm 0.08$, $E_{\max} = 99.60 \pm 0.88\%$, $n = 6$) and SHR ($pD_2 = 5.00 \pm 0.08$, $E_{\max} = 101.23 \pm 1.96\%$, $n = 6$), proposing an endothelium-independent mechanism. To assess the role of TRP channels, aortic rings were incubated with ruthenium red. In this assay, the vasorelaxant response was not changed in the WKY. On the other hand both potency ($p<0.001$) and efficacy ($p<0.001$) were reduced in SHR, suggesting that carvacrol could activate the subtypes TRPV in hypertensive animals. When using magnesium, equally potency ($p<0.001$) and pharmacological efficacy ($p<0.01$) were attenuated in both WKY and SHR, suggesting the involvement of TRPM7. In preparations with 2-APB, CPZ and BCTC, the vasorelaxant effect was potentiated ($p<0.01$) in both WKY and SHR, suggesting the participation of TRPV1, TRPM8 and TRPM7 channels in the vasorelaxant effect induced by carvacrol. Nevertheless, in the presence of capsaicin, the vasodilator effect was attenuated ($p<0.001$) in both WKY and SHR endorsing a possible action of carvacrol on TRPV1 and TRPV4 channel. In addition, *in vivo* studies showed that carvacrol produced hypotension and bradycardia in unanesthetized WKY and SHR. In order to address the cardiovascular responses *in vivo*, we performed experiments using ruthenium red and capsaicin to evaluate the contribution of TRP channels in this effect. Our results suggested an action of carvacrol on TRPV1 and TRPV4, confirming the *in vitro* assays. In conclusion, these results suggest that the expression of TRPV1, TRPV4, TRPM7 and TRPM8 was reduced and TRPC1 increased in SHR and carvacrol induced a vasorelaxant effect probably by acting on TRPV1, TRPV4, TRPC1, TRPM7 and TRPM8 in SHR. Furthermore, the *in vivo* effects induced by carvacrol exhibited a hypotensive and bradycardic activity and this effect, at least in part, is due to an activation of TRPV1 and TRPV4 channels in these responses.

Key words: aorta, carvacrol, L-type voltage-operated Ca^{2+} channels, SHR, transient receptor potential channel, vasorelaxation

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
bpm	Batimento por minuto
Ca _v	Canais de cálcio sensíveis a voltagem
[Ca ²⁺]	Concentração de cálcio
[Ca ²⁺] _c	Concentração de cálcio citoplasmática
[Ca ²⁺] _i	Concentração de cálcio intracelular
CGRP	Peptídio relacionado ao gene da calcitonina
CE ₅₀	Concentração da droga que produz 50 % do efeito máximo
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
[Mg ²⁺]	Concentração de Magnésio
MSCC	Canais de cálcio mecanosensíveis
n	Número de experimentos
p	Significância Estatística
PA	Pressão arterial

PAD	Pressão arterial diastólica
pA	Picoampere
pF	Picofarad
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
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
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 mecanoreceptores potencial C
TRPP	Receptor TRP policistinas
TRPV	Receptor TRP vanilóide
WKY	Ratos wistar kyoto

íon magnésio.....	61
Figura 11: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de aorta de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratados com 2-APB.....	62
Figura 12: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de aorta de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratados com capsazepina.....	63
Figura 13: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de aorta de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratados com BCTC.....	64
Figura 14: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de aorta de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com capsaicina.....	65
Figura 15: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de carvacrol (0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 mg/Kg, aleatoriamente, i.v.) sobre a PAM e FC em ratos WKY e SHR não anestesiados.....	67
Figura 16: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influência dos canais TRP nos efeitos cardiovasculares promovidos pelo carvacrol em ratos WKY e SHR não anestesiados (vermelho de rutênio) e anestesiados (capsaicina).....	69
Figura 17: Gel de corrida do processo final do PCR do TRPV1, mostrando o tamanho do fragmento em pares de base.....	75
Figura 18: Gel de corrida do processo final do PCR do TRPV3, mostrando o tamanho do fragmento em pares de base.....	76
Figura 19: Gel de corrida do processo final do PCR do TRPV4, mostrando o tamanho do fragmento em pares de base.....	77
Figura 20: Gel de corrida do processo final do PCR do TRPM8, mostrando o tamanho do fragmento em pares de base.....	78
Figura 21: Gel de corrida do processo final do PCR do TRPM7, mostrando o tamanho do fragmento em pares de base.....	79
Figura 22: Gel de corrida do processo final do PCR do TRPV1, mostrando o	

tamanho do fragmento em pares de base.....	80
Figura 23: Registro original da ação do carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anel de aorta de rato WKY, com o endotélio removido e pré-contraído com FEN (1 μ M).	82
Figura 24: Registro original da ação do carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anel de aorta de rato WKY, com o endotélio removido, no tônus basal. As setas indicam o momento da adição das substâncias.....	84
Figura 25: Registro original representativo ilustrando o efeito de doses crescentes do carvacrol (0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 mg/Kg, i.v.) sobre PAS, PAM, PAD e FC em ratos normotensos e hipertensos não anestesiado.....	100

.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Caracterização das correntes de Ba^{2+} por canais para Ca^{2+} do tipo-L sensíveis à voltagem nos miócitos vasculares recém dispersos de aorta.....	74
Gráfico 2: Expressão do RNAm para a síntese do TRPV1 em miócitos vasculares de aorta de ratos WKY e SHR.....	75
Gráfico 3: Expressão do RNAm para a síntese do TRPV3 em miócitos vasculares de aorta de ratos WKY e SHR.....	76
Gráfico 4: Expressão do RNAm para a síntese do TRPV4 em miócitos vasculares de aorta de ratos WKY e SHR	77
Gráfico 5: Expressão do RNAm para a síntese do TRPM8 em miócitos vasculares de aorta de ratos WKY e SHR.....	78
Gráfico 6: Expressão do RNAm para a síntese do TRPM7 em miócitos vasculares de aorta de ratos WKY e SHR.....	79
Gráfico 7: Expressão do RNAm para a síntese do TRPC1 em miócitos vasculares de aorta de ratos WKY e SHR	80
Gráfico 8: Efeito do carvacrol em anéis de Aorta de rato WKY e SHR. Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de Aorta de rato com o endotélio intacto (■) ou endotélio removido (▲), pré-contraído com FEN (1 μ M).....	82
Gráfico 9: Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de Aorta de rato endotélio intacto WKY x endotélio intacto SHR e endotélio removido WKY x endotélio removido SHR, pré-contraído com FEN (1 μ M).....	83
Gráfico 10: Efeito do carvacrol sobre o tônus basal de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	85
Gráfico 11: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de rato WKY e SHR, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença de vermelho de rutênio (10 μ M) (▲).....	86
Gráfico 12: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de rato, sem endotélio vascular na presença de vermelho rutênio (10 μ M), WKY (■) e SHR (▲).....	87

Gráfico 13: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de rato WKY e SHR, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença do íon magnésio (Mg^{2+}) (▲).....	88
Gráfico 14: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de rato, sem endotélio vascular na presença do íon magnésio (Mg^{2+}), WKY (■) e SHR (▲)...	89
Gráfico 15: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de rato WKY e SHR, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença do 2-APB 30 μ M (▲).....	90
Gráfico 16: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de rato, sem endotélio vascular na presença do 2-APB, WKY (■) e SHR (▲).....	91
Gráfico 17: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de rato WKY e SHR, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença da capsazepina (▲).....	92
Gráfico 18: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de rato, sem endotélio vascular na presença da capsazepina, WKY (■) e SHR (▲).....	93
Gráfico 19: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de rato WKY e SHR, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença do BCTC (▲)....	94
Gráfico 20: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de rato, sem endotélio vascular na presença do BCTC, WKY (■) e SHR (▲).....	95
Gráfico 21: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de rato WKY e SHR, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença da capsaicina (▲).....	96
Gráfico 22: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de rato, sem endotélio vascular na presença da capsaicina, WKY (■) e SHR (▲).....	97
Gráfico 23: Valores médios basais da PAM e FC de ratos normotensos e hipertensos.....	99
Gráfico 24: Efeitos do carvacrol sobre a pressão arterial média (PAM, mmHg) (* $p < 0,05$ vs. 0,1 mg/kg; # $p < 0,05$ SHR vs. WKY) e frequência cardíaca (FC, bpm) (* $p < 0,05$ vs. 0,1 mg/kg) em ratos normotensos e hipertensos não anestesiados.....	101
Gráfico 25: Efeitos do carvacrol sobre a pressão arterial média (PAM) e	

frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos e hipertensos não anestesiados. Os pontos na figura representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. Os valores de DE50 estão expressos como média (95% de intervalo de confiança).....	102
Gráfico 26: Inibição da hipotensão ocasionada pelo carvacrol na pressão arterial média, na presença do vermelho de rutênio, um bloqueador inespecífico dos canais TRP.....	104
Gráfico 27: Inibição da bradicardia promovida pelo carvacrol na presença do vermelho de rutênio, um bloqueador inespecífico dos canais TRP.....	104
Gráfico 28: Valores médios basais da PAM e FC de ratos normotensos e hipertensos.....	106
Gráfico 29: Inibição da hipotensão ocasionada pelo carvacrol na presença da capsaicina, um ativador dos canais TRPV1.....	106
Gráfico 30: Inibição da bradicardia ocasionada pelo carvacrol na presença da capsaicina, um ativador dos canais TRPV1.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Especificações dos Primers.....	45
Tabela 2: Solução fisiológica para anéis de Aorta Torácica de rato - Composição da solução Krebs (pH=7,4).....	47
Tabela 3: Composição da solução interna usada para medir as correntes de cálcio.....	47
Tabela 4: Composição da solução externa usada para medir as correntes de cálcio.....	47
Tabela 5: Composição da solução salina fisiológica (SSF) para dissociação dos miócitos da Aorta.....	48
Tabela 6: Composição da solução salina fisiológica (SSF) com baixa concentração de cálcio para dissociação dos miócitos da Aorta.....	48
Tabela 7: Valores de pD_2 e $E_{máx}$ do efeito do carvacrol em WKY, comparando a situação controle <i>versus</i> situação em estudo.....	98
Tabela 8: Valores de pD_2 e $E_{máx}$ do efeito do carvacrol em SHR, comparando a situação controle <i>versus</i> situação em estudo.....	98

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	28
1.1 Considerações gerais sobre o sistema cardiovascular.....	28
1.2 Considerações sobre a hipertensão.....	35
1.3 Considerações sobre os monoterpenos e o carvacrol.....	37
2. OBJETIVOS.....	42
2.1 Geral.....	42
2.2 Específicos.....	42
3. MATERIAL.....	44
3.1. Animais.....	44
3.2. Drogas utilizadas.....	44
3.3. Preparações das soluções do carvacrol.....	44
3.4. Desenho dos Primers para o RT-PCR, sequências utilizadas para a amplificação dos genes.....	45
3.5 Protocolo Maxima® SYBR® Green/Fluorescein qPCR master Mix	46
3.4. Soluções fisiológicas.....	46
4. MÉTODOS.....	50
4.1. Ensaio Farmacológicos.....	50
4.2. Ensaio in vitro.....	50
4.2.1 Preparação dos miócitos vasculares de Aorta de Rato.....	50
4.2.2 Registros Eletrofisiológicos.....	51
4.2.3 Protocolo experimental de eletrofisiologia utilizando os miócitos vasculares.....	53
4.2.3.1 Avaliação do efeito do carvacrol sobre as correntes de cálcio tipo L, em miócitos recém-dispersos, na configuração whole-cell.....	53
4.3 Ensaio Moleculares.....	53
4.3.1 Avaliação da expressão dos canais TRP nos Miócitos de Aorta de Ratos Wistar Kyoto (WKY) e Espontaneamente hipertensos (SHR).....	53
4.3.1.1. Extração de RNA.....	53
4.3.1.2 Obtenção do DNA complementar (cDNA).....	54

4.3.1.3 Expressão gênica pelo método de quantificação relativa por q-PCR em tempo real.....	54
4.4 Ensaaios in vitro.....	56
4.4.1 Preparações dos anéis de Aorta isolada de ratos WKY e SHR com ou sem endotélio funcional.....	56
4.4.2 Protocolos experimentais utilizando Aorta de rato WKY e SHR.....	57
4.4.3 Avaliação do efeito do carvacrol em anéis de Aorta de ratos WKY e SHR, pré-contráídos com FEN 1 μ M.....	57
4.4.4 Investigação do efeito do carvacrol em anéis aórticos sobre o tônus intrínseco vascular de rato WKY e SHR.....	59
4.4.5 Investigação da participação dos canais potencial receptor transiente (TRP) na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol em ratos WKY e SHR.....	60
4.4.5.1 Investigação da participação dos TRPV, TRPA1 e TRPM6 na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol em anéis de aorta de rato WKY e SHR.....	60
4.4.5.2 Investigação da participação dos TRPM6 e TRPM7 na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol em anéis de aorta de rato WKY e SHR.....	61
4.4.5.3 Investigação da participação dos TRPV1, TRPV3, TRPM3, TRPM6, TRPM7, TRPM8 na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol em anéis de aorta de rato WKY e SHR.....	62
4.4.5.4 Investigação da participação dos TRPV1 e TRPM8 na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol em anéis de aorta de rato WKY e SHR.....	63
4.4.5.5 Investigação da participação dos TRPV1 na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol em anéis de aorta de rato WKY e SHR.....	64
4.4.5.6 Investigação da participação dos TRPV1 na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol em anéis de aorta de rato WKY e SHR.....	65
4.5 Estudos in vivo.....	66
4.5.1. Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados WKY e SHR.....	66
4.5.2 Protocolo experimental empregado nos estudos <i>in vivo</i>	67
4.5.2.1 Avaliação do efeito da administração intravenosa do carvacrol sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados	

WKY e SHR.....	67
4.5.2.2 Investigação da participação dos canais potencial receptor transiente (TRP) nas respostas cardiovasculares induzidas por carvacrol em ratos não anestesiados WKY e SHR.....	68
4.5.2.3 Investigação da participação dos canais potencial receptor transiente (TRPV1) nas respostas cardiovasculares induzidas por carvacrol em ratos não anestesiados WKY e SHR.....	68
4.6 Análise estatística.....	70
5. RESULTADOS.....	73
5.1 Estudos in vitro.....	73
5.1.2 Caracterização Eletrofisiológica do carvacrol.....	73
5.1.2.1 Efeito do carvacrol sobre os canais de cálcio sensíveis a voltagem em miócitos vasculares de aorta de rato WKY.....	73
5.2 Estudos moleculares.....	75
5.2.1 Expressão do RNAm do TRPV1 em miócitos vasculares de aorta de ratos WKY e SHR.....	75
5.2.2 Expressão do RNAm do TRPV3 em miócitos vasculares de aorta de ratos WKY e SHR.....	76
5.2.3 Expressão do RNAm do TRPV4 em miócitos vasculares de aorta de ratos WKY e SHR.....	77
5.2.4 Expressão do RNAm do TRPM8 em miócitos vasculares de aorta de ratos WKY e SHR.....	78
5.2.5 Expressão do RNAm do TRPM7 em miócitos vasculares de aorta de ratos WKY e SHR.....	79
5.2.6 Expressão do RNAm do TRPC1 em miócitos vasculares de aorta de ratos WKY e SHR.....	80
5.3 Estudos in vitro.....	81
5.3.1 Efeito do carvacrol sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de Aorta de ratos WKY e SHR.....	81
5.3.2 Efeito do carvacrol sobre o tônus intrínseco vascular de anéis aórticos.....	84

5.3.3 Participação dos canais potencial receptor transiente (TRP) na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol.....	86
5.3.3.1 Efeito do carvacrol sobre anéis de aorta de rato WKY e SHR pré-contráídos com FEN na ausência e na presença de vermelho de rutênio.....	86
5.3.3.2 Efeito do carvacrol sobre anéis de aorta de rato WKY e SHR pré-contráídos com FEN na ausência e na presença de magnésio.....	88
5.3.3.3 Efeito do carvacrol sobre anéis de aorta de rato WKY e SHR pré-contráídos com FEN na ausência e na presença de 2-APB.....	90
5.3.3.4 Efeito do carvacrol sobre anéis de aorta de rato WKY e SHR pré-contráídos com FEN na ausência e na presença do BCTC.....	92
5.3.3.5 Efeito do carvacrol sobre anéis de aorta de rato WKY e SHR pré-contráídos com FEN na ausência e na presença do Capsazepina.....	94
5.3.3.6 Efeito do carvacrol sobre anéis de aorta de rato WKY e SHR pré-contráídos com FEN na ausência e na presença da Capsaicina.....	96
5.4 Estudos in vivo.....	99
5.4.1 Efeitos do carvacrol sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) não-anestesiados....	99
5.4.2 Influência dos canais potencial receptor transientes (TRPV4) sobre a resposta do carvacrol frente a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) não-anestesiados.....	103
5.4.3 Influência dos canais potencial receptor transientes vanilóides tipo 1 (TRPV1) sobre a resposta do carvacrol frente a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) anestesiados.....	105
6. DISCUSSÃO.....	109
7. CONCLUSÕES.....	125
8. PERSPECTIVAS.....	127
9. REFERÊNCIAS.....	129

Introdução

1. Introdução

1.1 Considerações gerais sobre o sistema cardiovascular

O sistema cardiovascular é composto pelo coração, vasos sanguíneos e sangue (PUSGLEY; TABRIZCHI, 2000). Uma das funções deste sistema é fornecer e manter fluxo sanguíneo suficiente aos diversos tecidos do organismo, segundo suas necessidades metabólicas. O sangue serve para transportar e distribuir substâncias essenciais para os tecidos, assim como para remover os produtos provenientes do metabolismo, favorecendo as funções celulares, como: regulação da temperatura corporal, manutenção do balanço de fluidos, fornecimento de O_2 , desenvolvimento, crescimento, absorção de nutrientes essenciais, remoção celular e de metabólitos e defesa, promovendo a manutenção da homeostase celular (AIRES et al. 2013; BERNE et al., 2009, PUSGLEY; TABRIZCHI, 2000).

A PA é conceituada como a pressão exercida pelo sangue sobre os vasos arteriais e é determinada pelo produto de duas variáveis: o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica total (RVPT). O DC, por sua vez, é influenciado pelo volume diastólico final, pela contratilidade miocárdica e pela frequência cardíaca. O volume diastólico final é o volume que chega à câmara ventricular antes da contração e é determinado pela pressão venosa, que está relacionada ao volume sanguíneo e ao tônus muscular venoso. Já a resistência vascular periférica total, por sua vez, é o resultado de modificações tensionais no músculo liso vascular (GUYNET, 2006). Todos esses parâmetros são variáveis que são influenciados por diversos mecanismos regulatórios.

O sistema cardiovascular contribui para a manutenção da homeostasia do organismo, dispondo de mecanismos refinados de ajuste da PA, os quais necessitam da ação integrada de outros sistemas como o neural, o renal e o endócrino (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; LANFRACHI; SOMERS, 2002).

Esses ajustes podem ser de ação imediata, dito de regulação a curto e médio prazo, que englobam os mecanismos de ação local, bem como mecanismos neurais e

hormonais comandados pelos barorreceptores, quimiorreceptores, receptores cardiopulmonares e outros cuja ativação determina alterações reflexas imediatas na capacitância venosa, retorno venoso, débito cardíaco e resistência periférica. Já os de ação prolongada e duradoura, dito de regulação a longo prazo, envolve mecanismos de regulação da volemia e do leito vascular (AIRES et al. 2013, GROSS; AIRD, 2000; LI et al, 2008).

Além desses mecanismos refinados de ajustes da PA, outros fatores podem influenciar o estado contrátil da célula muscular lisa vascular, como os canais iônicos que exercem uma importante função no acoplamento excitação-contração do músculo liso, funcionando como moduladores do potencial de membrana plasmática e das concentrações de Ca^{2+} no meio intracelular (KEVIN, NELSON, 2005).

O Ca^{2+} é essencial no processo de sinalização celular em muitos sistemas biológicos. É descrito que o estado de contratilidade vascular das células musculares lisas, dentro da parede dos vasos sanguíneos, é regulado pela concentração de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Os vasoconstrictores agem elevando a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e aumentando a sensibilidade dos processos contráteis ao Ca^{2+} , por outro lado, os vasodilatadores exercem efeitos opostos (LEDOUX et al., 2006).

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: canais 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+} (BK_{Ca}), promovendo hiperpolarização da membrana, limitando a contratilidade do músculo liso por fechamento dos canais de cálcio sensíveis a voltagem (Ca_v) (JAGGAR et al., 2000; THORNELOE; NELSON, 2005).

Os canais para cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) são considerados a maior via de influxo de Ca^{2+} em uma variedade de tipos celulares, incluindo músculo liso e músculo cardíaco, controlando diversos processos como o acoplamento excitação-contração e a transcrição gênica (BARLOW et al., 2006).

Nos miócitos vasculares estão presentes os canais Ca_v3 (Tipo-T) e Ca_v1 (Tipo-L), entretanto são os canais Ca_v1 (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 canais Ca_v é um determinante do tônus vascular e dos níveis de pressão sanguínea. Além disso, estes canais inativam lentamente durante despolarizações sustentadas, de maneira que o influxo de cálcio através de uma fração de canais Ca_v é suficiente para mediar a contração induzida por pressão em pequenas artérias, contribuindo desta maneira para autorregulação dinâmica de vários leitos vasculares. Desta forma, o influxo sustentado de cálcio, 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 (NELSON et al., 1990; SONKUSARE et al., 2006).

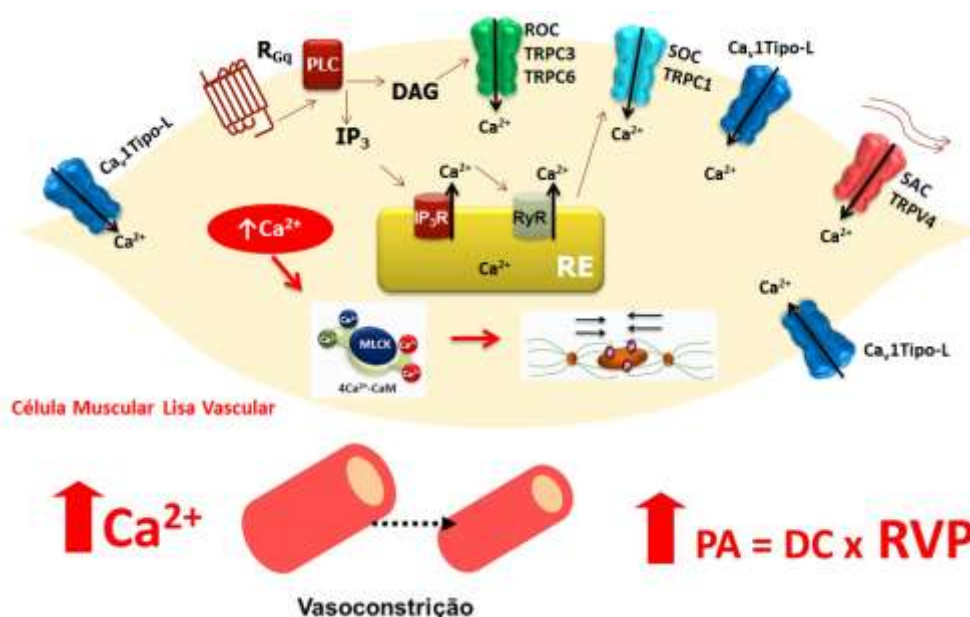


Figura 1: Representação esquemática da entrada de Ca^{2+} e vasoconstrição na CMLV. O Ca_v1 Tipo-L é o canal maioritário de entrada de cálcio. O TRPC1 (SOC) é ativado por depleção do

retículo sarcoplasmático. O TRPC6 (ROC) é ativado após acoplamento do agonista ao receptor GPCR. O TRPV4 (SAC) é ativado por estresse de cisalhamento. O IP3R e o RYR estão presentes no retículo sarcoplasmático (FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007, INOUE et al, 2006; BAYLIE, BRAYDEN, 2011).

Além dos Ca_v que têm suas funções bem estabelecidas no aumento de $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos, existe atualmente a família de canais permeáveis ao Ca^{2+} conhecida por canal receptor de potencial transiente (TRP). Que desde a sua descoberta, tem atraído 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 porque quando ativados, permitem o influxo majoritário de cargas positivas para a célula, gerando uma despolarização transiente chamada de potencial receptor, podendo ou não vir a gerar um potencial de ação (CLAPHAM, 2003).

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 (NO) na célula endotelial, proliferação das células musculares lisas, respostas miogênicas, sendo ainda os possíveis candidatos a canais operados por estoques (SOCs), canais de Ca^{2+} mecanossensíveis (MSCC), canais operados por receptor (ROCs) e canais ativado por estiramento (SAC) (FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007, INOUE et al, 2006; BAYLIE, BRAYDEN, 2011).

Vários fatores podem ativar os canais TRP como os receptores acoplados à proteína G, agentes picantes (capsaicina), lipídeos, pH, ácido, calor, estresse de cisalhamento, hipoosmolaridade, estresse oxidativo, elevação de Ca^{2+} intracelular, exposição à temperaturas baixas ou agentes resfriantes (INOUE et al., 2006; CLAPHAM et al., 2005).

Vale salientar que até o momento foram detectados mais de 10 membros distintos da superfamília dos TRPs nas células musculares lisas vasculares, em especial em aorta de rato, como por exemplo, os TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV6, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM6, TRPM7, TRPM8. Já os TRPC são onipresentes (*Ubiquitously*), onde a expressão de $TRPC1 > TRPC6 > TRPC3 > TRPC4 \approx TRPC5$ (KARK, 2008; WATANABE, et al. 2008; YANG, 2006; INOUE, et al., 2006; WANG,

2008; EARLEY; GONZALES; CRNICH, 2009; ZEBGER-GONG, 2011; NAYLOR, 2010; JOHNSON, 2009; PENG, 2010; JARDIN, 2013; TÓTH, 2014).

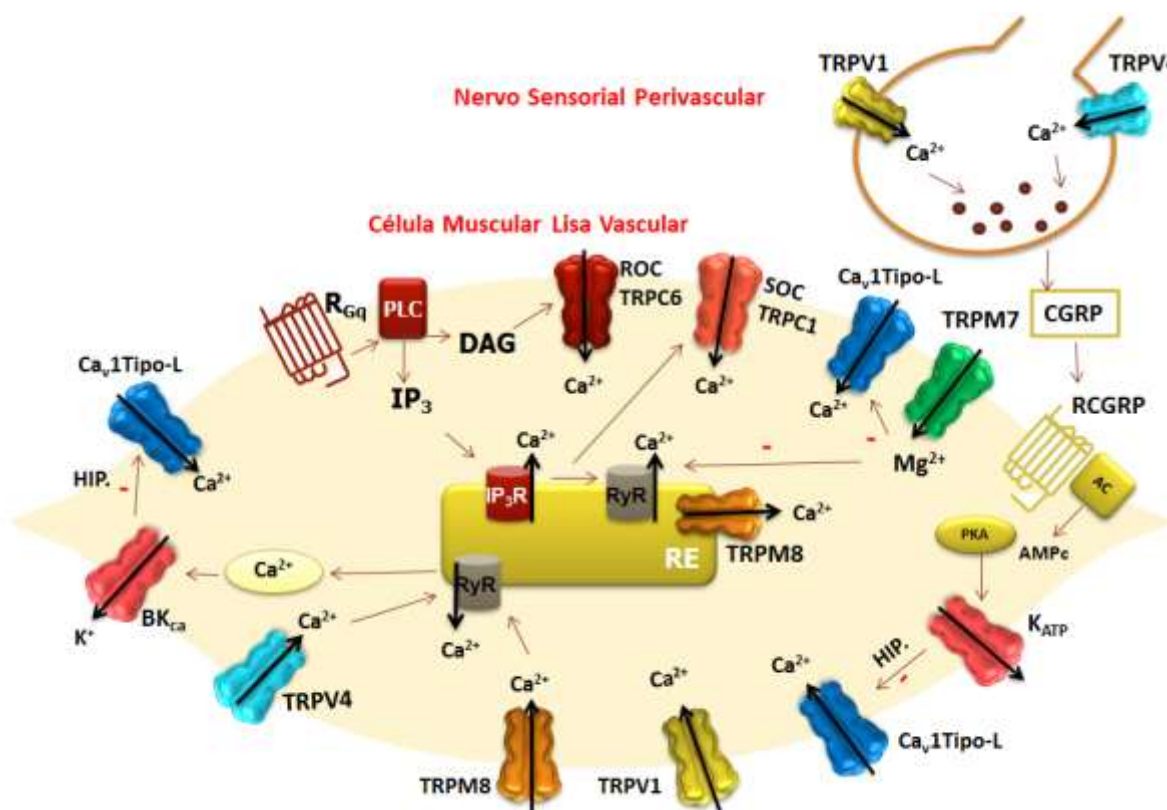


Figura 2: Representação esquemática dos canais TRP agindo sobre o tônus vascular (FREICHEL et al 2001; JOHNSON et al 2009; He et al; INOUE et al, 2006; BAYLIE, BRAYDEN, 2011; YOGI, 2011).

Dentre os canais TRP presentes no músculo liso vascular, o TRPC1 é postulado como um canal de cálcio operado por estoque (SOC), que regula a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dos estoques intracelulares, sendo importante para contração e proliferação da célula muscular lisa vascular (BERGDAHL et al., 2003; THORNELOE et al., 2005). Os TRPC3 também são importantes no sistema cardiovascular, estes canais estão acoplados ao trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), e são capazes de modular os sinais de Ca^{2+} celulares de uma maneira bidirecional, aumentando a entrada de Na^+ por canais TRPC3 levando a operação em modo reverso do NCX, resultando em um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular, diminuição de Na^+ com subsequente inibição dos Ca_v e estocagem de Ca^{2+} nos estoques intracelulares (ROSKER et al., 2004; EDER et al., 2005). O canal

TRPC4 é vastamente expresso no endotélio vascular e musculo liso (FREICHEL et al., 2001; TIRUPPATHI et al., 2002; BEECH; MURAKI; FLEMMING, 2004). Já o TRPC6 foi descrito como um canal operado por receptor (ROC) ativado por diacilglicerol (DAG). Os ROCs são abertos em resposta à ativação de receptores membranares acoplados a PLC. Recentemente foi observado que a perda de função ou diminuição da expressão do TRPC1, TRPC3 e TRPC6 leva à diminuição do tônus vascular de artérias e da contratilidade do musculo liso, causando hipotensão, efeitos importantes para o tratamento de enfermidades tais como a hipertensão arterial e pulmonar (HOFMANN et al., 1999; DIETRICH et al., 2005; NOORANI, 2011; KOCHUKOV, 2012).

No que se refere à família 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 levando ao vasorelaxamento (EARLEY et al., 2005). Além disso, os TRPV1 presentes em neurônios sensitivos de artéria mesentérica, quando ativados levam a liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) que induz relaxamento vascular (ZYGMUNT et al., 1999; INOUE, et al., 2006). Já Tóth e colaboradores (2014), observaram que a expressão do TRPV1 não é uniforme nos leitos vasculares e as respostas à capsaicina, um ativador de TRPV1, são diferentes em diferentes artérias isoladas, corroborando com outro estudo que mostrou que as artérias podem responder a capsaicina por dilatação ou por constrição dependendo das condições encontradas (Figura 3) (BAYLIE, BRAYDEN, 2011).

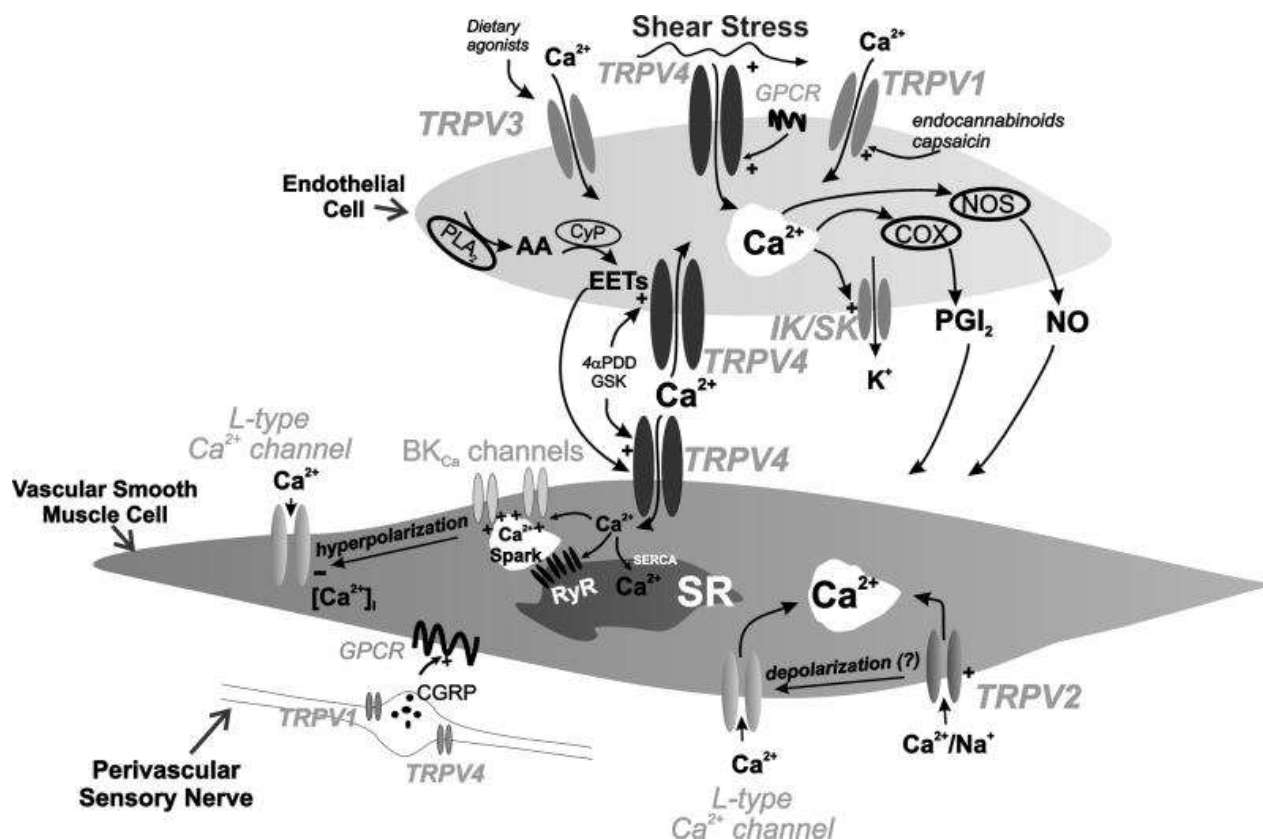


Figura 3: Representação esquemática da ação dos canais TRPV e seu complexo de sinalização na célula muscular lisa vascular, célula endotelial e nervo sensorial perivascular (BAYLIE, BRAYDEN, 2011).

A família dos canais TRPM consiste de 8 genes (TRPM1 – 8). O canal TRPM4 é um canal que participa da despolarização e contração, via PKC em resposta ao aumento de pressão intraluminal (EARLEY, WALDRON, BRAYDEN, 2004; GONZALES et al., 2010; CRNICH et al., 2010). O TRPM7 age como um canal catiônico e como uma cinase, estando envolvido tanto na regulação do magnésio intracelular como na sinalização celular, podendo ser inibido por Mg²⁺ livre intracelular. O aumento na concentração de [Mg²⁺]_i atenua a vasoconstrição e diminui a proliferação da célula muscular lisa vascular (NADLER et al., 2001; RUNNELS; YUE; CLAPHAM, 2001; FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007), pois ao ser ativado bloqueia canais de cálcio sensíveis à voltagem e canais de Rianodina (YOGI, 2011). O TRPM8 é um canal localizado na membrana plasmática e membrana do retículo sarcoplasmático, quando ativado permite o influxo de cálcio através da membrana e liberação do cálcio do

retículo sarcoplasmático. Contribuindo para manutenção do tônus vasomotor e para o vasorelaxamento (JOHNSON et al., 2009).

1.2 Considerações sobre hipertensão

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

Estas disfunções incluem aumento da relação parede versus luz das artérias e da resistência periférica, aumento da quantidade de massa cardíaca e muscular lisa, diminuição da complacência venosa e aumento da vasoconstrição com redução da vasodilatação, tanto dependente como independente do endotélio vascular (SAFAR et al., 1981; FOLKOW et al., 1982).

Atualmente existem várias linhagens de animais geneticamente hipertensos desenvolvidos com o objetivo de mimetizar a patogênese da hipertensão essencial humana. E a mais estudada é a linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (spontaneously hypertensive rats – SHR) (OKAMOTO; AOKI; 1963).

A linhagem isogênica de SHR foi desenvolvida no Japão, na década de 1960 por Okamoto e colaboradores, a partir dos ratos Wistar-Kyoto (WKY), por cruzamento entre os irmãos com pressão arterial elevada, resultando em 100% da prole com hipertensão espontânea (OKAMOTO; AOKI; 1963).

Como em humanos, a resposta hipertensiva da linhagem de SHR inicia-se com o avanço da idade e a causa do aumento da pressão sanguínea permanece desconhecida. O aumento da pressão começa por volta de 5 - 6 semanas de idade e a pressão arterial sistólica (PAS) pode atingir valores entre 180 e 200 mmHg em animais adultos. Com o avanço da idade os SHR apresentam doenças cardiovasculares características, como a hipertrofia do coração e vasos sanguíneos (CONRAD, 1995; KUNDU; RAO, 2008). À semelhança da hipertensão essencial humana, a patogênese

da hipertensão dos SHR também é multifatorial: alterações hemodinâmicas, neuro-humorais e renais têm sido observadas (TRIPPODO; FROHLICH, 1981).

Diversos estudos vêm mostrando que alterações na expressão de canais que regulam o tônus vascular podem ocasionar um remodelamento vascular, levando a fibrose, inflamação, contração, migração celular, crescimento celular com um consequente aumento da pressão arterial (OHYA, 1993; YOGI, 2011; TOUYZ, 2006; WALAS e PATON, 2014; ADEBIYI, 2012; CHEN, 2010; NOORANI, 2011; KOCHUKOV, 2012).

Devido as importantes funções que os canais Ca_v exercem no controle do tônus vascular, anormalidades nestes canais são consideradas como parte da extensiva adaptação biológica e morfológica que caracteriza a hipertensão, pois, um aumento do influxo de cálcio, desencadeia um tônus vascular anormal e elevação da resistência vascular periférica (SONKUSARE et al., 2006). Ohya e colaboradores (1993) observaram que em miócitos de artérias de SHR, havia um aumento da expressão de Ca_v1 (tipo-L), mostrando a importância dos canais Ca_v1 (tipo-L) no controle do tônus vascular e no desenvolvimento da hipertensão.

O papel dos canais TRPs na patogenia da hipertensão essencial foi primeiro descrito por Liu e colaboradores (2003), o estudo comparou a expressão e função dos TRPC em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos e em pacientes com hipertensão essencial, onde observaram aumento na expressão de TRPC3 e TRPC5, sendo associado com um consequente aumento no influxo de Ca^{2+} e essa resposta foi bloqueada por um inibidor dos TRP/SOCs (SKF 96365) e em animais *nocautes* para TRPC3 (LIU et al., 2003) e TRPC5 (LIU et al., 2006). Em outro estudo Liu e colaboradores (2009), mostraram que em SHR havia aumento da expressão de TRPC3 em aorta de rato e essa expressão era pronunciada com o uso de angiotensina II (LIU 2009), levando a um aumento da pressão arterial e do influxo de cálcio. Recentemente alguns estudos publicaram que o aumento na expressão do TRPC3 em animais SHR leva há um aumento da contração e a uma consequente elevação da pressão arterial (CHEN, 2010; NOORANI, 2011; ADEBIYI, 2012, KOCHUKOV, 2012).

Adicionalmente aos TRPC a subfamília dos canais TRPM pode também estar envolvida na hipertensão essencial. Um exemplo é o canal TRPM7, que pode regular o

transporte de Mg^{2+} e atenuar a vasoconstrição induzida por agonistas (KONRAD; SCHLINGMANN; GUDERMANN, 2004) e a proliferação nas células do músculo liso vascular, observada durante a hipertensão (TOUYZ, 2006). Estudos com CMLV de aorta e artéria mesentérica o TRPM7 teve sua expressão aumentada em resposta ao tratamento crônico com angiotensina II e aldosterona e interessantemente células deficientes em TRPM7 não proliferam em resposta à angiotensina II (YAO et al., 2005; TOUYZ et al., 2006). Já em um estudo recente foi demonstrado que a diminuição da expressão de TRPM7 em animais SHR, leva ao remodelamento vascular e um consequente aumento da pressão arterial (YOGI, 2011).

Outra subfamília que pode estar envolvida com a hipertensão essencial é o canal TRPV. Estudos com SHR mostraram que o bloqueio do TRPV1 impede a hipotensão promovida por anandamina, um ativador do TRPV1 (LI, KAMINSKI, WANG, 2003). Já Gao e colaboradores (2009), observaram que a ativação do TRPV4 leva a um efeito depressor. Esse estudo foi realizado em ratos hipertensos com sensibilidade ao sal, onde no grupo com alta ingesta de sal, observou-se que a expressão do TRPV4 estava diminuída e a PA elevada, tendo esse efeito atenuado pela superexpressão do TRPV4. Em outro estudo recente, os autores observaram que a expressão do TRPV4 estava diminuída em artéria carótida de animais espontaneamente hipertensos, levando a um aumento da pressão arterial (WALAS e PATON, 2014).

1.3 Considerações sobre os monoterpenos e o carvacrol

A identificação dos canais TRP só foi possível a partir de estudos com produtos naturais tendo suas funções avaliadas sobre os sistemas biológicos, onde os monoterpenos foram os produtos naturais mais promissores (CALIXTO et al., 2005).

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). Os monoterpenos são hidrocarbonetos extraídos de óleos essenciais, formados a partir de uma unidade básica, o isopreno [$CH_3C(CH_2)CH_2CH_2$], sendo constituídos de duas unidades isoprênicas (10 átomos de carbono).

Vários monoterpenos apresentam ações sobre o sistema cardiovascular como a exemplo a rotundifolona, o α -terpineol, o citrionelol, o timol e o carvacrol (SILVA et al., 2011; RIBEIRO, 2010; BASTOS et al., 2009; PEIXOTO-NEVES et al., 2009). Como exemplos de monoterpenos atuando sobre canais TRP, temos o mentol que é classicamente conhecido por ativar canais TRPM8, a cânfora que ativa TRPV3, o eucaliptol que ativa o TRPM8, o borneol que inibe o TRPL, o timol que ativa o TRPV3 (CALIXTO et al., 2005; MACPHERSON et al., 2006; PARNAS, et al., 2009).

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

O carvacrol é quimicamente denominado 5-isopropil-2-metilfenol e possui fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$ e peso molecular de 150,217g/mol (Figura 4). 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, bem como, pouca solubilidade em água. Seu ponto de fusão é de 2°C e seu ponto de ebulição é de 234 – 236°C.

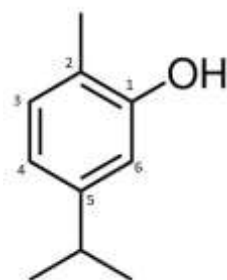


Figura 4: Estrutura química do carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol)

O Carvacrol apresenta baixa toxicidade, com uma DL_{50} de 910 mg/kg do peso corporal, quando administrado por via oral em ratos (JENNER et al., 1964).

Estudos anteriores mostraram que o carvacrol apresenta efeito hipotensor e bradicárdico em ratos normotensos anestesiados e adicionalmente promove um efeito vasorrelaxante em aorta, envolvendo inibição do influxo de cálcio (AYDIN et al., 2007; PEIXOTO-NEVES et al., 2009).

Recentemente em nossos estudos demonstramos que, o carvacrol promoveu um efeito hipotensor e bradicárdico em ratos normotensos não-anestesiados, podendo estar agindo diretamente no coração pelo inotropismo e cronotropismo negativo no átrio isolado, também inibiu as correntes de bário em miócitos de artéria mesentérica, comprovando o envolvimento dos canais de cálcio sensíveis a voltagem, também promoveu vasorelaxamento em artéria mesentérica, por inibição do influxo de cálcio por canais de cálcio sensíveis a voltagem (Cav) do tipo-L, canais operados por receptor/TRPC6, canais operados por estoques/TRPC1 além de agir sobre os canais TRPM7 (Figura 5) (DANTAS et al., 2015).

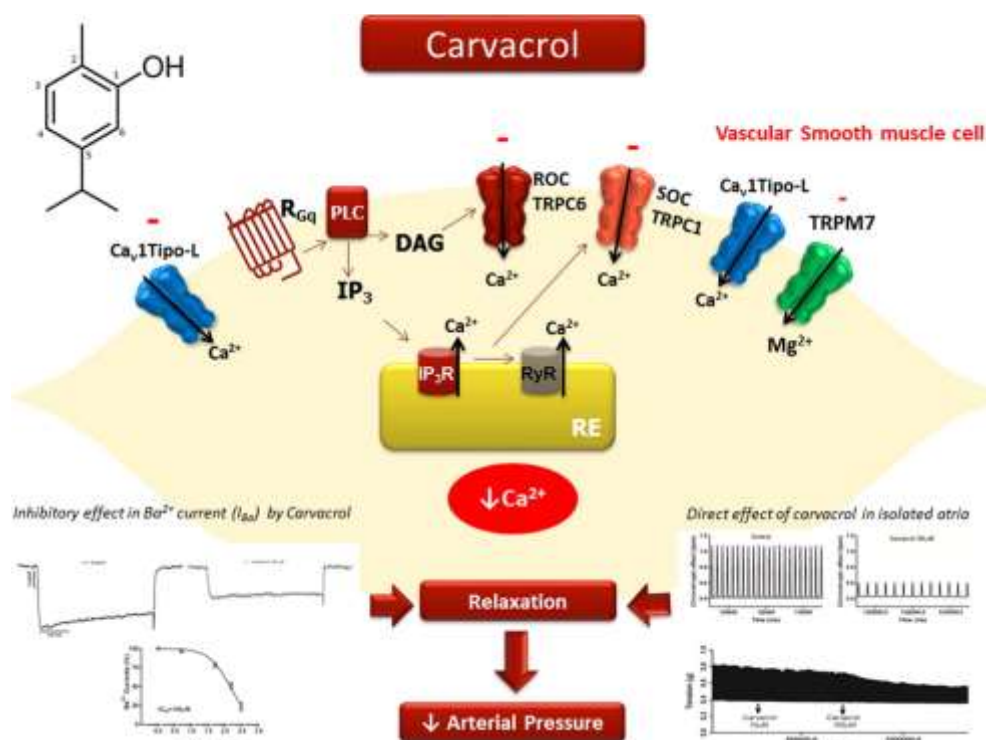


Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de ação do carvacrol em promover vasorelaxamento e redução da pressão arterial (DANTAS, et al., 2015).

A literatura também nos mostra que o carvacrol é um conhecido ativador dos canais TRPV3 (MACPHERSON et al., 2006, EARLEY et al., 2010) e TRPA1 (VOGT-EISELE et al., 2007) além de agir inibindo, em mamíferos, os canais TRPM7 expressos em células HEK e em neurônios do hipocampo do cérebro. Em estudos

eletrofisiológicos com cardiomiócitos humanos foi demonstrado, que o carvacrol inibe as correntes do canal TRPM7 (MACIANSKIENE et al., 2012).

Desse modo, fundamentamos a nossa proposta de trabalho, com base nos estudos até o momento realizados, onde o carvacrol apresenta efeitos farmacologicamente interessantes principalmente sobre o sistema cardiovascular, em especial atuando como ativador e inibidor de canais TRP, onde esses canais tem uma correlação funcional entre sua expressão e 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; YAN, 2007; AYDIN et al., 2007; PEIXOTO-NEVES et al., 2009; EARLEY 2010; MACIANSKIENE, 2012; MACPHERSON et al., 2006; VOGT-EISELE et al., 2007; PARNAS et al., 2009; EARLEY; GONZALES; GARCIA, 2010; DANTAS, 2010; MACIANSKIENE, 2012)

Portanto o nosso objetivo foi avaliar os efeitos cardiovasculares do carvacrol na hipertensão arterial correlacionando esses efeitos com os canais TRP.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos cardiovasculares promovidos pelo carvacrol em um modelo de hipertensão arterial, correlacionando esses efeitos a participação dos canais TRP.

2.2 Específicos

Estudos *in vitro*

- Avaliar o efeito do carvacrol sobre as correntes iônicas através dos canais de cálcio sensíveis a voltagem em miócitos vasculares de aorta de rato;
- Avaliar a expressão dos canais TRP em miócitos vasculares de aorta de SHR e WKY;
- Investigar a atividade vasorelaxante do carvacrol em anéis de aorta em SHR e WKY e a participação de canais TRP nestas respostas;

Estudos *in vivo*

- Investigar o efeito do carvacrol sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de WKY e SHR e avaliar a participação dos canais TRP nas respostas observadas.

Material

3. Material

3.1 Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, pesando em torno de 250-300 gramas, bem como, ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e seus controles normotensos wistar kyoto (WKY), ambos entre 12-14 semanas de idade, 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 ± 1 °C) , com ciclo claro-escuro de 12 horas tendo estes, livre acesso à água e a alimentação. Este trabalho seguiu o guia internacional para redução da dor e sofrimento e foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da UFPB de número CEUA 0207/11.

3.2 Drogas utilizadas

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas: cloridrato de L-fenilefrina (Sigma), cloridrato de acetilcolina (Sigma), cetamina (Sigma), xilasina (Sigma), vermelho de rutênio (Sigma), albumina sérica bovina (Sigma), collagenase tipo II (worthington biochemical corporation), capsazepina (Sigma), hialuronidase tipo II (Sigma), quimopapaína (Sigma), DL-ditiotreitol (Sigma), 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) (Sigma), capsaicina, BCTC (N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carbox-amide) (sigma), dimetilsulfóxido (DMSO), HEPES, EGTA.

Para a preparação das soluções estoques o BCTC, 2-APB, vermelho de rutênio e capsazepina foram dissolvidos em DMSO e diluídos em água destilada, de modo a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental (volume final de DMSO $\leq 0,1\%$). 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 Preparo 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.

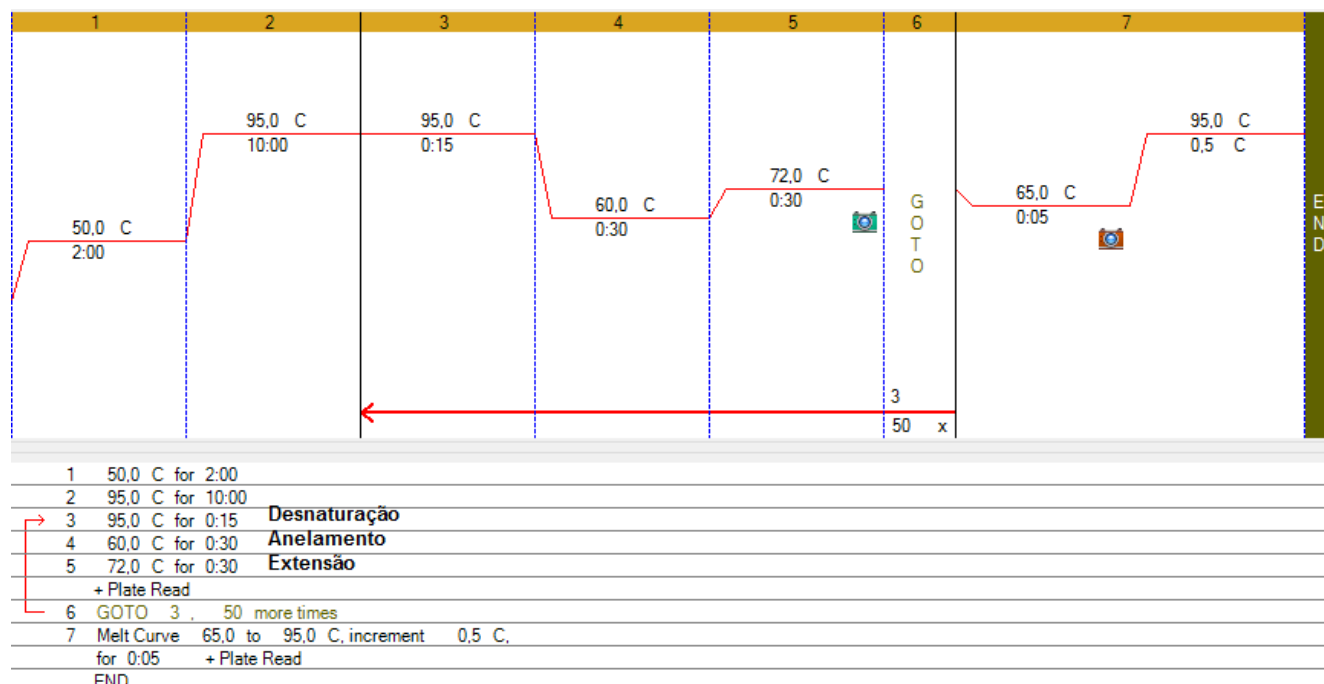
Para o preparo das soluções estoques de Carvacrol, o mesmo foi solubilizado em 100% DMSO e diluído em água destilada de modo a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental. As concentrações de DMSO em solução nunca excederam 0,1% e foram previamente testadas, apresentando ausência de efeito farmacológico.

3.4 Desenho dos Primers para o RT-PCR, sequências utilizadas para a amplificação dos genes.

Tabela 1: Especificações dos Primers (Primers obtidos da Sigma)

GENE	Sequencia dos primers	Tamanho do fragmento
TRPV1	F: 5'-GCGAGTTCAAAGACCCAGAG-3' R: 5'-GTGTCATTCTGCCATTGTG-3'	79 pb
TRPV3	F: 5'-AGTGCCTCTCTGGCAACTGT-3' R: 5'-CTGCCTCTGTTCTTCCTTGG-3'	122 pb
TRPV4	F: 5'-AGCAACCTGGAGACTGTGCT-3' R: 5'-TTGAACTTGCGAGACAGGTG-3'	143 pb
TRPM8	F: 5'-TCTCAGTGACGGGTGGAGCC-3' R: 5'-AGACCGTAATGAGTGCCTCC-3'	127 pb
TRPM7	F: 5'-CACTGGCATGGGACAGAGTT-3' R: 5'-CTCTTTTCGCAACTGAGGGGT-3'	350 pb
TRPC1	F: 5'-GCCAGACCCAGACAGAGCAT-3' R: 5'-GCCCCGAGATGTTGATGACC-3'	146 pb
B-actina	F: 5'-ACGGTCAGGTCATCACTATC-3' R: 5'-TGCCACAGGATTCCATACC-3'	90 pb
Gapdh	F: 5'-GCGAGATCCCGCTAACATCA-3' R: 5'-CCCTTCCACGATGCCAAAGT-3'	95 pb

3.5 Protocolo Maxima® SYBR® Green/Fluorescein qPCR master Mix (Fermentas, EUA).



3.6 Soluções Fisiológicas

Para o preparo das soluções fisiológicas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl) (MERCK), cloreto de potássio (KCl) (MERCK), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (MERCK), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (MERCK), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (MERCK), bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (VETEC), fosfato de sódio mono-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (VETEC), cloreto de magnésio (MgCl_2), sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), fosfato diácido de potássio monohidratado ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

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

Soluções fisiológicas para anéis de aorta torácica de rato

Tabela 2: Solução fisiológica para anéis de aorta torácica de rato - Composição da solução Krebs (pH=7,4)

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

Soluções fisiológicas para estudos com miócitos vasculares

Tabela 3: Composição da solução interna usada para avaliar as correntes de cálcio (CRUZ; MATSUDA, 1994).

Substância	Concentração (mM)
CsCl	130
EGTA	10
HEPES	10
MgCl ₂	4
TEACl	10

Tabela 4: Composição da solução externa usada para avaliar as correntes de cálcio (CRUZ; MATSUDA, 1994).

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

Tabela 5: Composição da solução salina fisiológica (SSF) para dissociação dos miócitos da aorta (XU et al., 1999).

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

Tabela 6: Composição da solução salina fisiológica (SSF) com baixa concentração de cálcio para dissociação dos miócitos da aorta (XU et al., 1999).

Substância	Concentração (mM)
NaCl	137
KCl	5,6
MgCl ₂	1
NaH ₂ PO ₄	0,44
Na ₂ HPO ₄	0,42
NaHCO	4,17
CaCl ₂	0,05
Glicose	5
Hepes	10

Métodos

4. MÉTODOS

4.1 Ensaios Farmacológicos

Foram utilizadas três diferentes formas de abordagem para caracterizar os canais TRP em animais SHR e a possível ação do carvacrol: ensaios moleculares (RT-PCR), ensaios farmacológicos *in vitro* (banho de órgãos) e ensaios *in vivo* (Registro de PA e FC), além de ensaios eletrofisiológicos para medir correntes de cálcio. Todos os animais foram sacrificados, seguindo as normas de cuidados com animais, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Cbiotec/UFPB, parecer n° 207/11.

4.2 Ensaios *in vitro*

4.2.1 Preparação dos miócitos vasculares de aorta de rato

As células musculares lisas foram provenientes da aorta de rato. Após o procedimento cirúrgico de isolamento da aorta torácica, a mesma foi dissecada e dividida em segmentos para facilitar a ação enzimática. Uma vez dissecado o tecido foi transferido para um tubo falcon, contendo papaína (0,7 mg/mL – sigma), albumina (1 mg/mL) e ditiotreitol (1 mg/mL), que foram diluídos em solução salina fisiológica-normal (SSF-normal) (CaCl_2 2,6mM) permanecendo 30 minutos a 37°C. Em seguida as amostras foram transferidas para a solução em SSF-baixo Ca^{2+} contendo collagenase (1 mg/mL), hialuronidase (0,9 mg/mL) e BSA (1 mg/mL) para digerir o tecido entre 15 a 30 min. As enzimas foram removidas lavando-se os tecidos 2 vezes com SSF-baixo Ca^{2+} . Já dissociada as células foram centrifugadas por 1000 rpm durante 1 min. Para os ensaios eletrofisiológicos os miócitos foram suspensos em solução SSF- baixo Ca^{2+} , após isto as células foram transferidas para placas de petri e deixadas aderir por 20 minutos. Após adesão das células foram dado início os experimentos eletrofisiológicos (Figura 5). Já para extração do RNA dos miócitos vasculares os mesmos foram tranferidos para um eppendorf após a dissociação.



Figura 5. Foto (microscopia de contraste de fase campo claro) do miócito vascular de aorta em ensaios de eletrofisiologia.

4.2.2 Registros Eletrofisiológicos

Os registros de "patch-clamp" foram realizados no modo "whole-cell voltage clamp" como descrito previamente (HAMILL et al, 1981). Os registros eletrofisiológicos foram obtidos sob a platina de um microscópio invertido (Carl Zeiss, Alemanha), posicionado sobre uma mesa antivibratória com suspensão pneumática (TMC, EUA). Um micromanipulador hidráulico de alta precisão (Narishige, Japão) foi usado para movimentação do eletrodo responsável pelo registro das correntes, e outro micromanipulador foi utilizado para posicionar a pipeta de perfusão, contendo a solução controle ou o composto testado. O uso da gaiola de faraday (TMC, EUA) minimizou as interferências elétricas no sistema preparado.

As correntes foram obtidas por meio de um amplificador (HEKA 10, Alemanha), filtradas por filtro passa-baixa a 2,0 kHz, convertidas em sinais digitais com frequência de 10 kHz. Correntes de vazamento ("leakage") foram removidas, com auxílio do protocolo P/4 onde quatro pulsos de amplitude igual a $\frac{1}{4}$ do pulso teste foram aplicados e a resposta de corrente, foi então, somada e subtraída da corrente do pulso teste. As

células que apresentaram valores altos para a resistência em série (acima de 5 M Ω) ou que não se mantiveram estáveis, não foram utilizadas na análise. As correntes foram adquiridas e analisadas em um computador PC-compatível usando-se o “software” PatchMaster e Fitmaster (HEKA Elektronik, Alemanha).

As micropipetas de vidro foram fabricadas por meio de um estirador (“puller”) vertical de 2 estágios (Narishige, Japão). As mesmas foram preenchidas com solução contendo, em (mM) 130 CsCl, 4 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, 10 TEACl pH 7,2 ajustado com CsOH. Foram utilizadas resistências entre 2.5 - 5 M Ω para as micropipetas. Um fino fio de prata/cloreto de prata (Ag / AgCl) foi introduzido na micropipeta e o conjunto foi acoplado a um pré-amplificador (“headstage”) que, por sua vez, estava conectado à entrada do amplificador. As células foram banhadas por uma solução externa, contendo em (mM) 137,0 NaCl, 5,6 KCl, 1,0 MgCl₂, 0,44 NaH₂PO₄, 0,42 Na₂HPO₄, 4,17 NaHCO₃, 2,6 CaCl₂, 10 HEPES e 5 Glicose, ajustada para pH 7,4 com NaOH. Todas as soluções foram submetidas a um filtro com porosidade (“mesh”) de 0,22 μ m. A osmolaridade das soluções foi ajustada com glicose, para valores de aproximadamente 310 mOsm (solução da micropipeta) e 330 mOsm (solução de banho).

Os gigaselo (resistência \geq 1G Ω) foram obtidos por meio de uma suave sucção feita no interior da micropipeta, e em seguida por meio de uma sucção mais vigorosa as células estudadas encontravam-se na configuração “whole-cell”. Esta última permitiu romper o pequeno fragmento de membrana que separava a solução interna, contida na pipeta, do citoplasma da célula em estudo. O aumento brusco do transiente capacitivo indicou a obtenção da configuração de “whole-cell”. Todos os registros foram realizados em células submetidas a um sistema de perfusão (Dagan, EUA) que consistiu de uma pipeta de vidro com aproximadamente 100 μ m de diâmetro interno que estava conectada à saída de uma válvula solenóide, alimentada por reservatórios de 5 mL, um deles contendo solução fisiológica sem adição do carvacrol e outros compartimentos contendo a solução externa adicionada com concentrações testes do composto. Com auxílio da válvula solenoide foi possível selecionar os compartimentos que estavam ligados à pipeta de perfusão, estabelecendo assim, um fluxo do seu conteúdo. Os fluxos (\sim 0,1 mL/min) foram impulsionados pela força da gravidade.

4.2.3 Protocolo experimental de eletrofisiologia utilizando os miócitos vasculares

4.2.3.1 Avaliação do efeito do carvacrol sobre as correntes de cálcio tipo L, em miócitos recém-dispersos, na configuração whole-cell.

Foi avaliado o efeito do carvacrol sobre as correntes de Ca^{2+} do tipo L, quando os miócitos de aorta de rato foram mantidos em um potencial de “holding” de -80mV, por um período de 50 ms, logo após esse período, foram aplicados pulsos-teste de 100ms de duração que despolarizam a célula para +10mV, em intervalos de 10-15s. As correntes de cálcio foram medidas na situação controle, com a célula perfundida por solução extracelular e situação teste, perfundida por solução extracelular, contendo 300 μM de carvacrol.

4.3 Ensaios Moleculares

4.3.1 Avaliação da expressão dos canais TRP nos miócitos de aorta de ratos *Wistar kyoto* (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).

4.3.1.1 Extração de RNA

Após a dissociação dos Miócitos vasculares dos animais controles normotensos (WKY) e do grupo de animais hipertensos (SHR), como descrita no item (4.2.1), os mesmos foram transferidos para um eppendorf. A extração do RNA dos Miócitos vasculares foi feita usando 1,0 mL de Trizol (Invitrogen) para cada 1×10^6 células de amostra ou usando o kit RNeasy mini (QIAGEN) de acordo com recomendações do fabricante. Para extração com Trizol as amostras foram homogeneizadas rapidamente para reduzir a degradação do RNA. Adicionou-se 200 μL de clorofórmio para cada amostra e agitou-se vigorosamente por 15 segundos, seguidos de incubação a 3 min a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a $12.000 \times g$ por 15 min a 4

°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o RNA total precipitado com 0,5 mL de isopropanol. As amostras foram misturadas gentilmente e centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75 % seguidos de centrifugação (7.500 x g por 3 min). O precipitado foi seco à temperatura ambiente. O RNA total foi ressuspendido em 30 µL de água livre de RNase e armazenados a -80 °C.

A quantidade de RNA presente nas amostras foi quantificada por espectrofotômetro Nanodrop® em absorbância de 260 nm e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, corado com Ez-vision® (Amresco) para a avaliação da integridade do RNA.

4.3.1.2 Obtenção do DNA complementar (cDNA)

A obtenção do cDNA, a partir do RNA total das amostras de células foi realizada utilizando-se o protocolo do kit SuperScript III First-Strand conforme descrito pelo fabricante (Invitrogen). Antes da síntese do cDNA o RNA foi tratado com DNase (RQ1 RNase free DNase – Promega). Desta maneira, 3 µg de RNA total foram adicionados ao mix contendo 1 µL de dNTP e 1 µL de primer oligo, essas amostras foram misturadas e incubadas a 65 °C por 5 min e colocadas no gelo por 1 min. Em seguida foram misturadas com outro mix 2 X contendo: 2 µL de RT buffer, 4 µL de MgCl₂, 2 µL de DTT e 1 µL de RNaseOUT. Os mixes foram misturados em um único tubo e incubados a 42 °C por 2 min. Em seguida adicionou-se 1 µL de transcriptase reversa SuperScript™ II. E incubou-se a 42 °C por 50 min, e 70 °C por 15 min. As amostras foram resfriadas no gelo e foi adicionado 1 µL de RNase H e incubado a 37 °C por 20 min. O cDNA obtido foi estocado a -20 °C ou usado imediatamente para reação de PCr em tempo real.

4.3.1.3 Expressão gênica pelo método de quantificação relativa por q-PCR em tempo real

O cDNA das amostras de miócitos vasculares de WKY e SHR foram amplificados pelo termociclador Bio-Rad Real-Time PCR CFX96 Touch (BIO-RAD, EUA). O protocolo utilizado foi o Maxima® SYBR® Green/Fluorescein qPCR master Mix (2x), conforme descrito pelo fabricante (Fermentas, EUA). Desta forma, 12,5 µL Maxima® SYBR® Green/Fluorescein qPCR master Mix reagente, 1 µL de cDNA de cada amostra em estudo, 10 µM de cada primer específico para cada gene (Tabela 1) foram adicionados e o volume foi completado para um total de 25 µL com água livre de RNase. Os níveis de expressão dos genes estudados foram normalizados em relação ao RNAm do gene endógeno (β -actina ou gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase-GAPDH)) e os valores de expressão dos animais SHR foram subtraídos da média dos seus controles normotensos WKY.

A reação para cada gene analisado foi cuidadosamente padronizada (temperatura de anelamento, concentração de primers e etc) a fim de evitar amplificação inespecífica. Como controle negativo foram usados amostras com ausência de cDNA, em cada um dos ensaios de qPCR.

A detecção dos produtos foi feita pelo monitoramento do sinal fluorescente emitido pelo corante SYBR Green (Fermentas), que intercala-se à dupla fita do cDNA, obtido no final de cada ciclo. Os valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar ou cycle threshold (Ct), onde o aumento do sinal é associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR que começam a serem detectados e analisados usando o programa CFX manager optical system software. Os níveis de expressão dos genes foram normalizados em relação ao RNAm do gene endógeno (beta-actina ou gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase-GAPDH). O método utilizado neste ensaio foi o método de quantificação relativa ou $2^{-\Delta Ct}$, e para isso foi necessário determinarmos inicialmente a eficiência de amplificação dos genes alvos e do controle endógeno.

Assim, foram realizadas duas curvas com diluições seriadas do cDNA nas concentrações 400, 40, 4 e 0,4 ng e amplificados para cada um dos genes estudados. Cada uma das diluições foi posteriormente amplificada por qPCR nas mesmas condições. As amostras foram amplificadas em duplicata. Tomou-se o cuidado de verificar a especificidade da reação de qPCR realizando a curva de dissociação. Para comparar a eficiência de amplificação dos genes em estudo, os valores de Ct do gene

alvo foram subtraídos dos valores de Ct do gene da β -actina ou do GAPDH. Também se calculou o Δ Ct de cada amostra, subtraindo-se os valores de Ct do gene alvo, dos valores de Ct do gene controle. As diferenças foram plotadas contra o logaritmo da quantidade da amostra inicialmente colocada. A inclinação da reta ou slope menor que 0,1 indica a eficiência de amplificação é comparável, podendo-se, portanto, aplicar o método relativo $2^{-\Delta\text{Ct}}$.

4.4 Ensaios *in vitro*

4.4.1 Preparações dos anéis de aorta isolada de WKY e SHR com ou sem endotélio funcional

Os ratos wistar kyoto (WKY) e os espontaneamente hipertensos (SHR) foram eutanasiados por guilhotina, seguindo os princípios de cuidados com animais aprovados pelo CEUA. Através de uma incisão no tórax do animal, a aorta torácica foi removida e anéis aórticos (2 – 4 mm) foram obtidos livres de tecido conectivo e adiposo. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis foram suspensos individualmente por hastes de aço inoxidável, conectadas a transdutores de força (Panlab), acoplado a um amplificador AVS Instruments que por sua vez estava conectado a um computador contendo o programa PowerLab System. Os anéis foram mantidos em cubas de vidro (10ml), contendo solução de Krebs (tabela 2) à 37 °C aeradas com uma mistura carbogênica (95% O₂ e 5% de CO₂) e estabilizados por um período de 60 minutos, durante o qual foram mantidos em tensão inicial de 2g.

Para verificar a viabilidade do tecido, após o período de estabilização, foi obtida uma contração com fenilefrina (FEN) 1 μ M. Em seguida, a acetilcolina (ACh) 1 μ M foi adicionada à cuba para avaliar a integridade do endotélio vascular. Anéis sem endotélio funcional foram obtidos pela remoção mecânica da camada endotelial, através do atrito provocado pelas hastes metálicas em contato com a parede interna do vaso. O endotélio vascular foi considerado íntegro, quando os anéis aórticos apresentavam relaxamento induzido pela ACh superior a 70% sobre a pré-contração com 1 μ M de

FEN e a retirada do endotélio foi confirmada quando o relaxamento era inferior a 10% (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Anéis com relaxamentos entre 10 e 70% foram descartados dos protocolos experimentais.

4.4.2 Protocolos experimentais utilizando aorta de WKY e SHR.

4.4.3 Avaliação do efeito do carvacrol em anéis de aorta de WKY e SHR, pré-contráídos com FEN 1 μ M

Nestes experimentos, após um período de estabilização de 60 minutos, concentrações crescentes de carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M), foram adicionadas nas preparações de anéis com endotélio funcional intacto ou em anéis desprovidos do endotélio funcional, ambos, pré-contráídos com fenilefrina (FEN) na concentração de 1 μ M. Anéis sem endotélio funcional foram obtidos como descrito anteriormente no protocolo 4.4.1. 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 1 μ M 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 $E_{m\acute{a}x}$ (Efeito Máximo) das curvas individuais na presença e na ausência do endotélio funcional (para detalhes, ver tópico referente à análise estatística) em WKY e SHR (Figura 6).

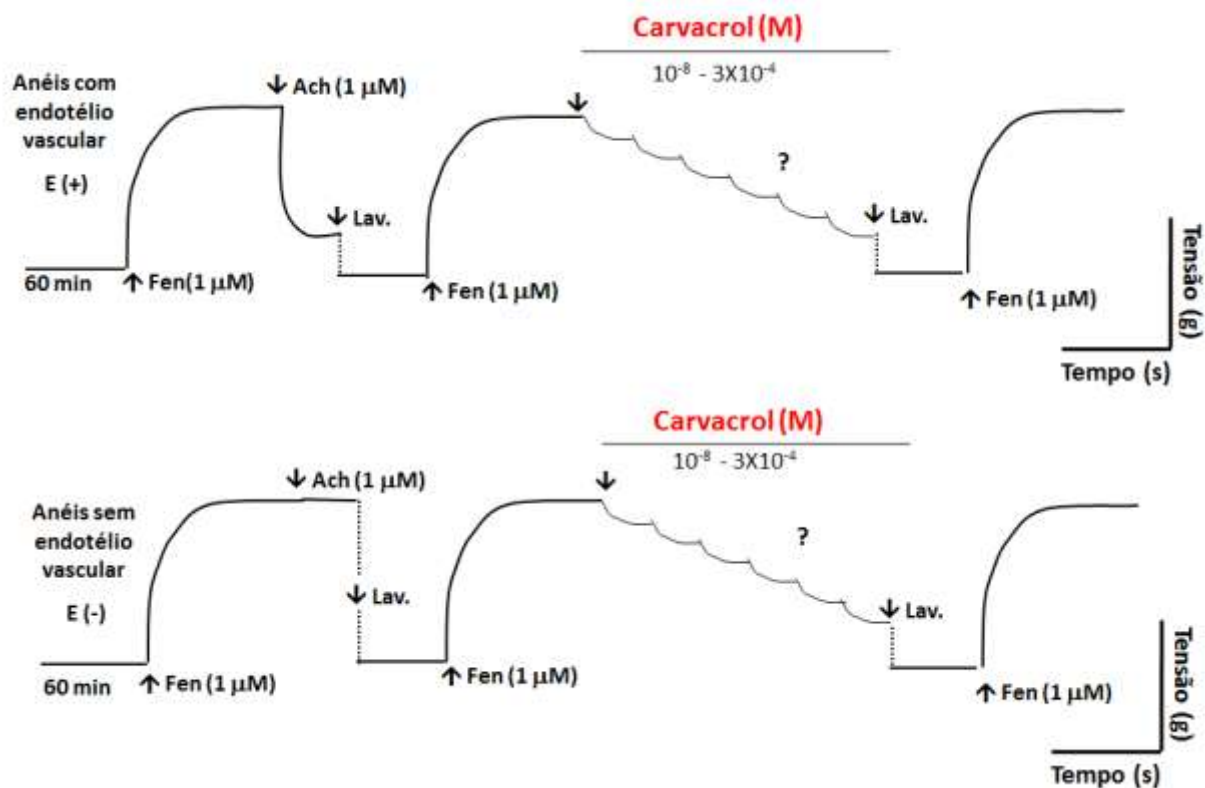


Figura 6: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de aorta de WKY e SHR com endotélio vascular e na ausência do mesmo, pré-contraídos com FEN (1 μM) e o teste de contratilidade do órgão.

4.4.4 Investigação do efeito do carvacrol em anéis aórticos sobre o tônus intrínseco vascular de WKY e SHR

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^{-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 7). Em seguida após esse tratamento, avaliou-se um possível dano tecidual como descrito anteriormente, para demonstrar a completa recuperação do órgão.

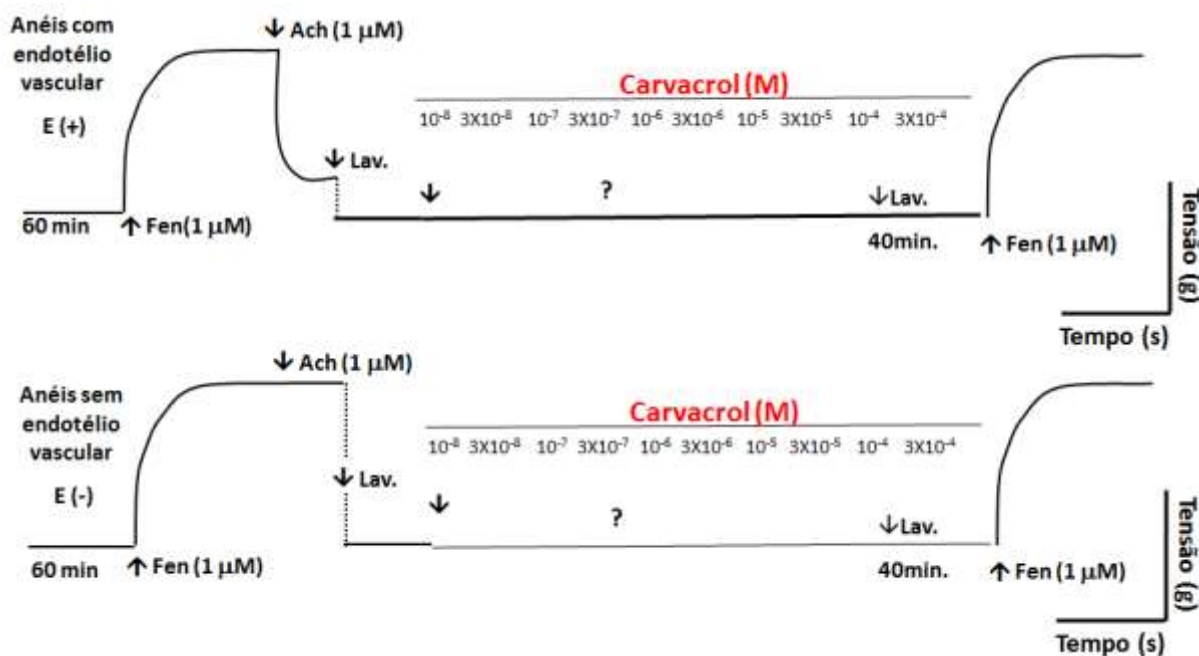


Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de aorta de rato, no tônus muscular espontâneo e posteriormente recuperação do órgão.

4.4.5 Investigação da participação dos canais potencial receptor transiente (TRP) na resposta vasorelaxante induzida por carvacrol em WKY e SHR.

4.4.5.1 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 aórticos de WKY e SHR 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 et al., 2005). Em seguida, uma nova contração tônica com FEN (1 μ 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 $E_{m\acute{a}x}$ foram obtidos e comparados na situação controle e na presença dos inibidores (Figura 8) em WKY e SHR.

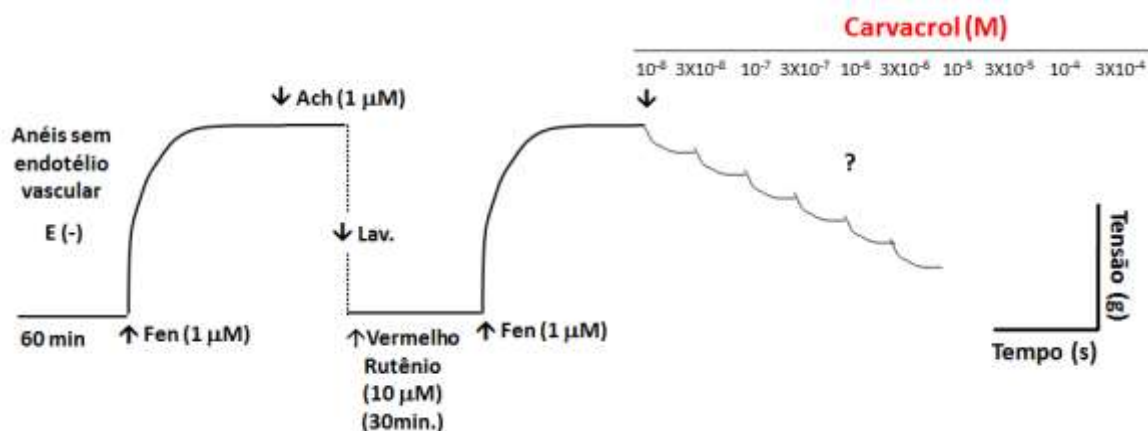


Figura 8: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de aorta de WKY e SHR, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com vermelho de rutênio.

4.4.5.2 Investigação da participação dos 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 aórticos de ratos foram pré-tratados, por um período de 30 minutos, com o bloqueador íon magnésio (Mg^{2+}), bloqueador do TRPM6 e TRPM7 (CLAPHAM, et al, 2005; BALDOLI, et al, 2013). Em seguida, uma nova contração tônica com FEN ($1 \mu M$) 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 $E_{máx}$ foram obtidos e comparados na situação controle e na presença dos inibidores (Figura 9) em WKY e SHR.

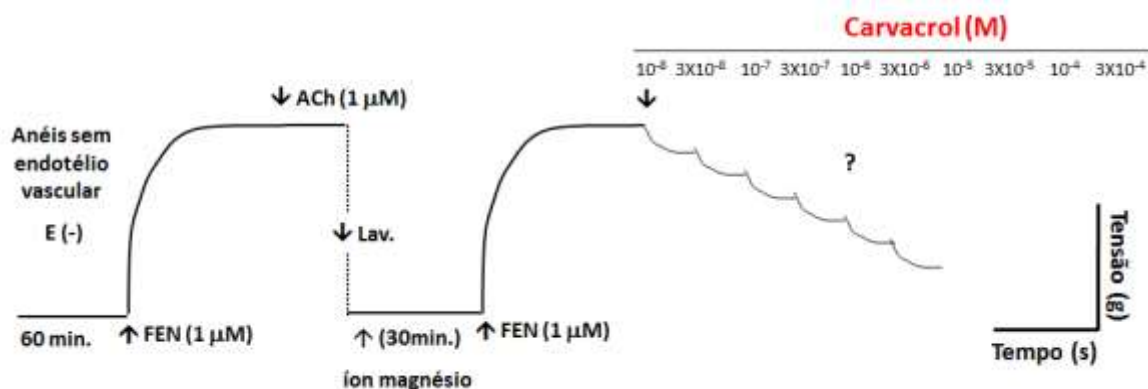


Figura 9: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de aorta de WKY e SHR, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com íon magnésio.

4.4.5.3 Investigação da participação dos TRPV1, TRPV3, TRPM6, TRPM7, TRPM8, TRPC1 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 aórticos de ratos foram pré-tratados, por um período de 30 minutos, com o bloqueador 2-APB, ativador dos TRPM6, TRPV1, TRPV3 (HINMAN, 2006, BALDOLI, 2013) e inibidor do TRPM7, TRPM8 E TRPC1 (GUILBERT, 2009; MACIANSKIENE, 2012; EL HIANI, 2009; SELESCU, 2013). Em seguida, uma nova contração tônica com FEN (1 μ 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 $E_{m\acute{a}x}$ foram obtidos e comparados na situação controle e na presença dos inibidores (Figura 10) em WKY e SHR.

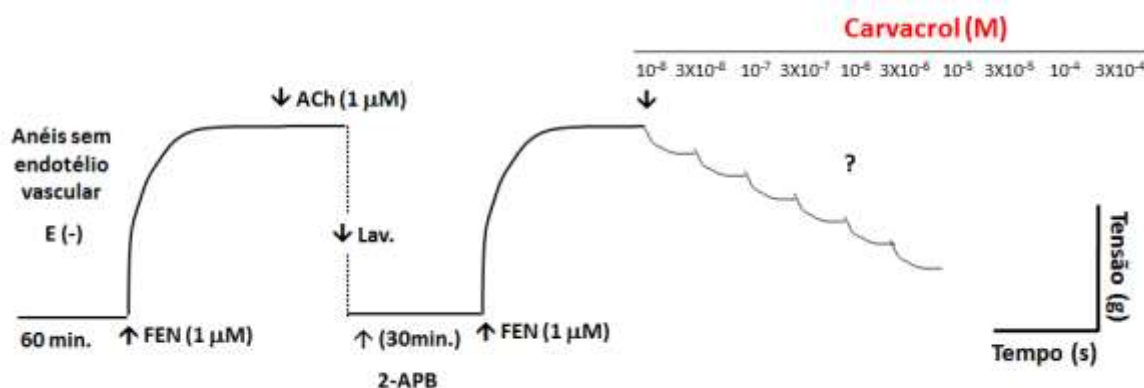


Figura 10: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de aorta de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com 2-APB.

4.4.5.4 Investigação da participação dos TRPV1 e TRPM8 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 aórticos de ratos foram pré-tratados, por um período de 30 minutos, com o bloqueador capsazepina inibidor do TRPV1 e TRPM8 (VALENZANO et al., 2003; INOUE, 2006; BEHRENDT, 2004; MALKIA, 2009). Em seguida, uma nova contração tônica com FEN (1 μ 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 $E_{máx}$ foram obtidos e comparados na situação controle e na presença dos inibidores (Figura 11) em WKY e SHR.

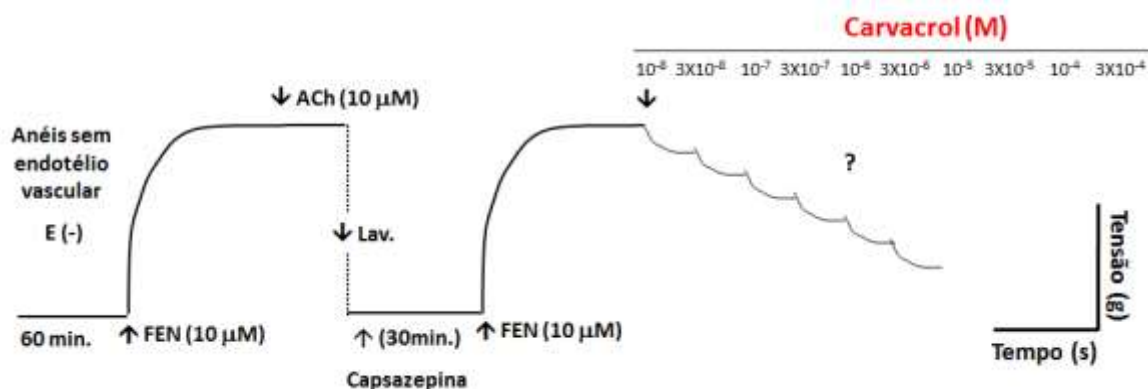


Figura 11: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de aorta de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com Capsazepina.

4.4.5.5 Investigação da participação dos TRPV1 e TRPM8 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 aórticos de ratos foram pré-tratados, por um período de 30 minutos, com o bloqueador BCTC, inibidor do TRPV1 e TRPM8 (VALENZANO, et al, 2003; BEHRENDT, 2004; SELESCU, 2013). Em seguida, uma nova contração tônica com FEN (1 μ 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 $E_{m\acute{a}x}$ foram obtidos e comparados na situação controle e na presença dos inibidores (Figura 12) em WKY e SHR.

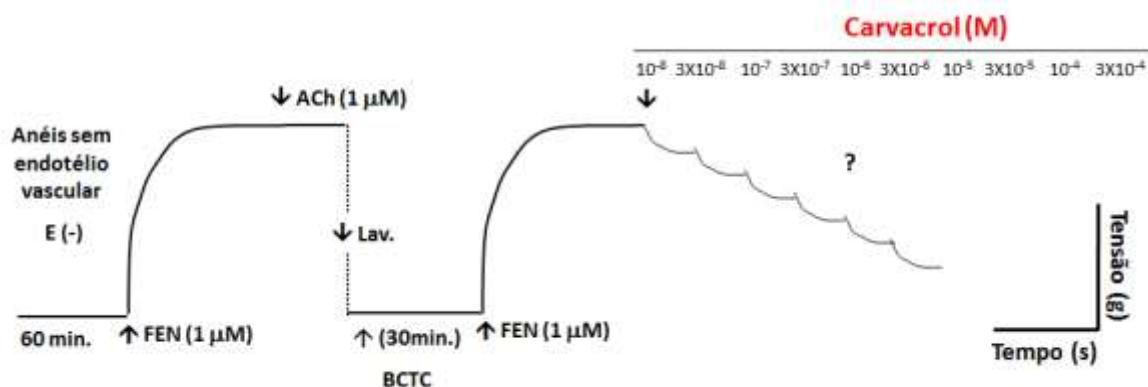


Figura 12: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de aorta de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com BCTC.

4.4.5.6 Investigação da participação do TRPV1 no efeito vasorelaxante de carvacrol em anéis de aorta de WKY e SHR.

A avaliação da participação do TRPV1 no efeito vasorelaxante induzido por carvacrol foi realizada mediante a dessensibilização dos receptores do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina presentes nas terminações nervosas do nervo sensorial perivascular, por meio de exposições repetidas e prolongadas a capsaicina, um agonista seletivo desses canais (HOPPS et al., 2009; INOUE et al., 2006; DANNERT et al., 2007). Para isso foi realizada a pré-incubação dos anéis por 1 hora com capsaicina (10^{-5} M), e posterior contração dos anéis com FEN, sendo adicionada a capsaicina sobre o componente tônico dessa contração. Caso fosse verificado relaxamento induzido pela capsaicina à preparação era lavada e novamente pré-incubada por 1 hora e verificado o relaxamento no componente tônico, a ausência do relaxamento com a capsaicina representava a dessensibilização dos canais.

Posteriormente os anéis foram contraídos com FEN e sobre o componente tônico foi adicionado o carvacrol de forma cumulativa, obtendo-se as curvas concentração-resposta. Os valores pD_2 e $E_{máx}$ foram obtidos e comparados na situação controle e na presença dos inibidores (Figura 13) em WKY e SHR.

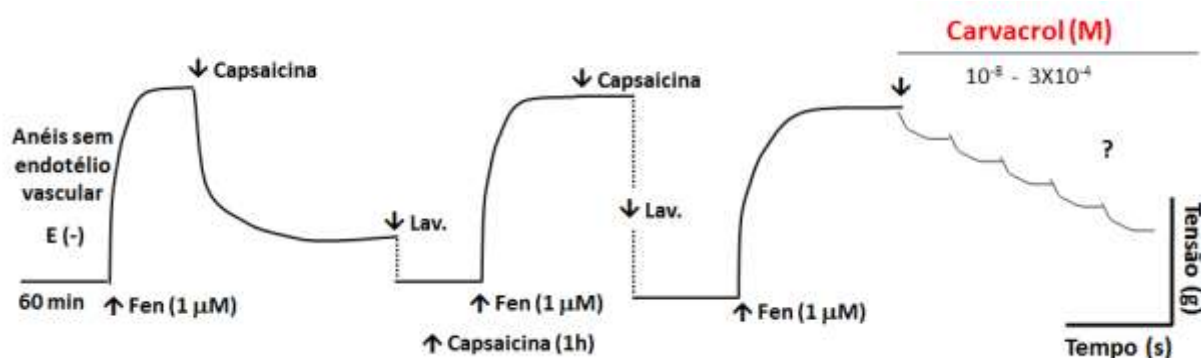


Figura 13: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes do carvacrol em anéis de aorta de rato, sem o endotélio funcional, pré-tratadas com capsaicina.

4.5 Estudos *in vivo*

4.5.1 Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em WKY e SHR 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. 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.

4.5.2 Protocolo experimental empregado nos estudos *in vivo*

4.5.2.1 Avaliação do efeito da administração intravenosa do carvacrol sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em WKY e SHR não anestesiados.

Para obtenção de uma curva dose-resposta, os animais foram mantidos em aclimação 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 (0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 mg/Kg, i.v.) como também a dose máxima com o veículo (Figura 14), 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.

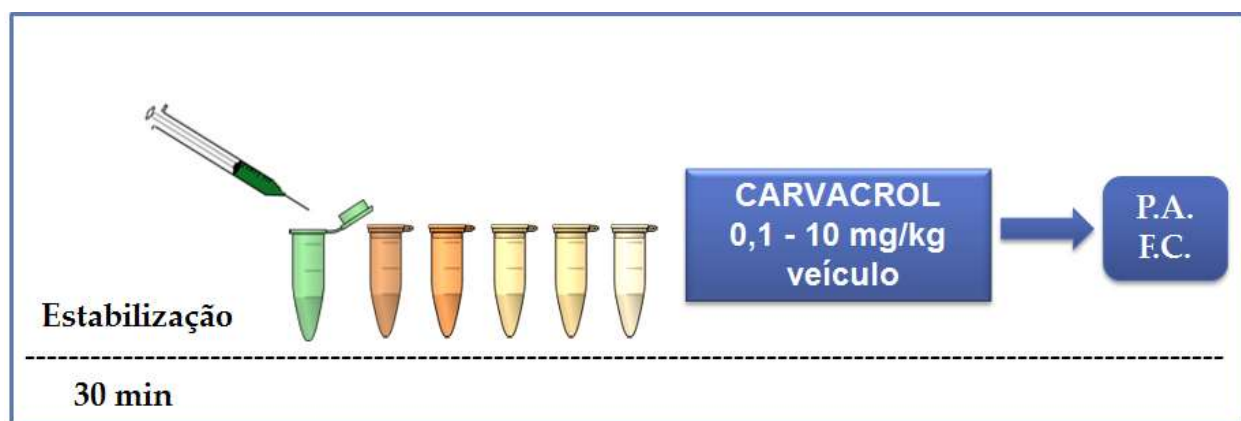


Figura 14: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de carvacrol (0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 mg/Kg, aleatoriamente, i.v.) sobre a PAM e FC em WKY e SHR não anestesiados.

4.12.4 Investigação da participação dos canais potencial receptor transiente vanilóide 4 (TRPV4) nas respostas cardiovasculares induzidas por carvacrol em WKY e SHR não anestesiados.

Para investigar a ação dos canais TRPV4 nas respostas cardiovasculares do carvacrol, os animais foram mantidos em aclimação por um período de no mínimo 30 minutos, a fim de estabilizar os parâmetros cardiovasculares. Após esse período foi administrado o carvacrol 5mg/Kg e registrado os parâmetros cardiovasculares. Após registrar o efeito do carvacrol e esperar um período de estabilização para voltar aos parâmetros normais, foi administrado o vermelho de rutênio 3mg/Kg, que é inibidor do TRPV4 (GAO, 2009) e após 5, 10, 20 e 30 minutos foram administrados uma dose de 5mg/Kg de carvacrol, em cada tempo, para observar se os parâmetros cardiovasculares foram alterados na presença do vermelho de rutênio. Os valores de PAM e FC foram computados antes (valores da linha de base), após a administração do carvacrol (controle) e nos tempos 5, 10, 20 e 30 após a introdução do vermelho de rutênio. Seus dados foram expressos em valores absolutos da variação em mmHg e batimentos/min., respectivamente (Figura 15)

4.12.5 Investigação da participação dos canais potencial receptor transiente vanilóide 1 (TRPV1) nas respostas cardiovasculares induzidas por carvacrol em WKY e SHR não anestesiados.

Para investigar a ação dos canais TRPV1 nas respostas cardiovasculares do carvacrol, foi utilizada a capsaicina, essa substância por ser extraída da pimenta, causa dor quando injetada intravenosamente, devido essa peculiaridade esses experimentos foram feitos com animais anestesiados com Uretano, que tem um efeito anestésico irreversível. Os animais após o procedimento cirúrgico foram conectados para os registros dos parâmetros cardiovasculares. Em seguida após um pequeno período de estabilização foi administrado o carvacrol 5mg/Kg e registrado os parâmetros cardiovasculares, em seguida foi registrado o efeito do carvacrol e esperou-se um período de estabilização para voltar aos parâmetros normais, após o qual foi

administrado o vermelho de rutênio 3mg/Kg, que é inibidor do TRPV1 (LI, 2003; GAO, 2009) e após 5, 10, 20 e 30 minutos foi administrada uma dose de 5mg/Kg de carvacrol, em cada tempo, para observar se os parâmetros cardiovasculares foram alterados na presença da capsaicina. Os valores de PAM e FC foram computados antes (valores da linha de base), após a administração do carvacrol (controle) e nos tempos 5, 10, 20 e 30 após a introdução do vermelho de rutênio. Seus dados foram expressos em valores absolutos da variação em mmHg e batimentos/min., respectivamente (Figura 15)

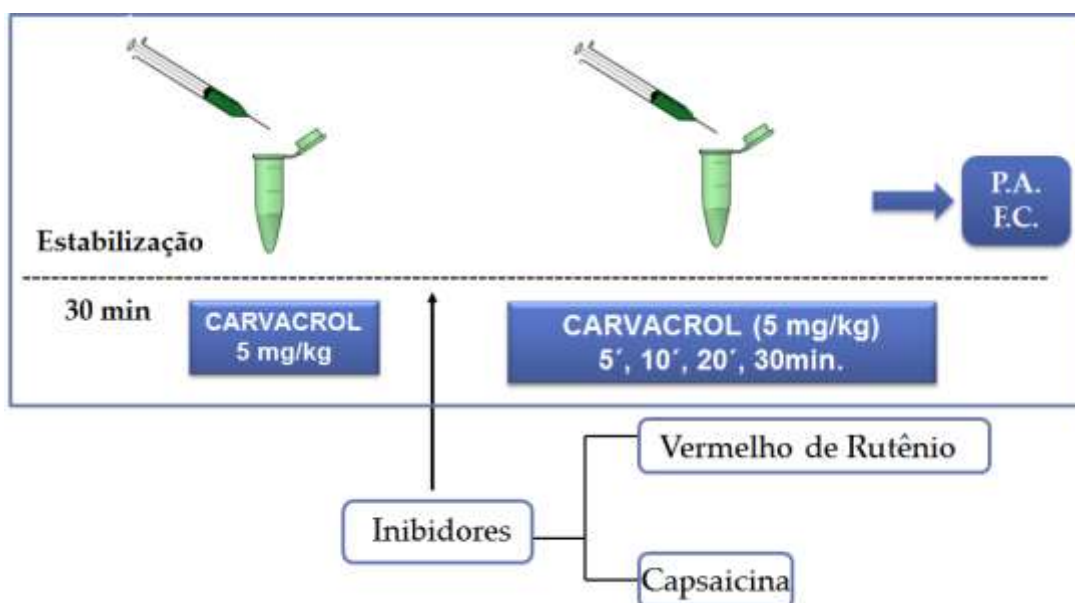


Figura 15: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influencia dos canais TRP nos efeitos cardiovasculares do carvacrol em WKY e SHR não anestesiados (vermelho de rutênio) e anestesiados (capsaicina).

4.6 Análise Estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.), onde os pontos representam a média de n experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.. As curvas concentração-resposta foram 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 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, $-\log CE_{50}$).

Os valores da PA e FC estão expressos em percentagem dos valores em Δ e foram calculados pela fórmula:

$$PA(\%) = \frac{(PA_{\text{depois}} - PA_{\text{antes}}) \times 100}{PA_{\text{antes}}}$$

$$FC(\%) = \frac{(FC_{\text{depois}} - FC_{\text{antes}}) \times 100}{FC_{\text{antes}}}$$

Nos experimentos *in vivo* foi calculado a DE_{50} que é a dose de uma substância que produz 50% de sua resposta máxima.

Os registros eletrofisiológicos foram normalizados em pA/pF, sendo obtida a média \pm e.p.m., de um número significativo de células.

Para avaliar os níveis de expressão do gene de interesse no RT-PCR, os valores do CT (cycle threshold) do gene controle foram subtraídos do CT do gene de interesse, obtendo-se o Δ CT. E a partir do Δ CT pode-se calcular o $\Delta\Delta$ CT e calcular o $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ que é o indicador de expressão gênica, onde valores acima de 1 (valor do controle) indicam altos níveis de RNAm e valores abaixo indicam altos valores de CT e baixos níveis de expressão:

$$\Delta CT_{\text{gene}} = CT_{\text{gene}} (\text{WKY}) - CT_{\text{b-actina}} (\text{WKY})$$

$$\Delta CT_{\text{gene}} = CT_{\text{gene}} (\text{SHR}) - CT_{\text{b-actina}} (\text{SHR})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{gene}} (\text{SHR}) - \text{média} \Delta CT_{\text{gene}} (\text{WKY})$$

$$2^{(-\Delta\Delta CT)} = \text{Valor da expressão do gene de interesse}$$

As análises estatísticas foram realizadas usando o teste *t* de *Student* ou análise de variância “one-way” (ANOVA) e “two-way” (ANOVA) seguido de teste de Bonferroni, quando apropriado. E os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Os programas utilizados para análise dos dados foram Graph Pad Prism 5.

Resultados

5. RESULTADOS

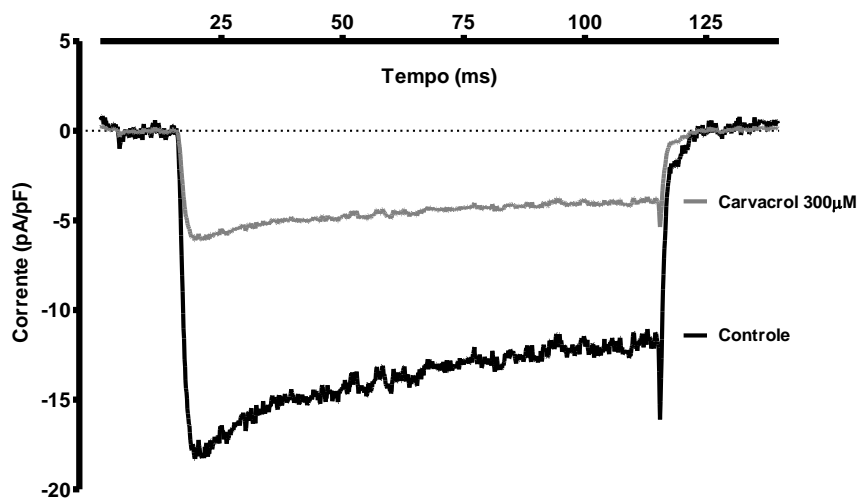
5.1 ESTUDOS *Eletrofisiológicos*

5.1.2 Caracterização eletrofisiológica do carvacrol

5.1.2.1 Efeito do carvacrol sobre os canais de cálcio sensíveis a voltagem em miócitos vasculares de aorta de rato WKY.

As correntes de entrada de Ba^{2+} através dos canais para Ca^{2+} , nos miócitos vasculares recém-dispersos de aorta (figura 5), apresentaram características típicas de correntes sensíveis à voltagem do tipo-L. As correntes de Ba^{2+} foram registradas, utilizando o protocolo no qual a célula era despolarizada para 10 mV, partindo de um potencial “holding” de -80 mV, com a frequência de estimulação 0,1Hz. É importante mencionar que em nossos experimentos só foram utilizadas as correntes Ba^{2+} nas células que se mantiveram estáveis. O gráfico 1A mostra que o carvacrol (300 μ M) apresentou efeito inibitório sobre as correntes de Ba^{2+} (I_{Ba}). Nessa concentração, o carvacrol inibiu a amplitude das correntes de Ba^{2+} de $-7,454 \pm 0,1088$ pA/pF (células controle, barra branca, n=7) para $-2,446 \pm 0,1381$ pA/pF (carvacrol 300 μ M, barra cinza, n=7) gráfico 1B.

A



B

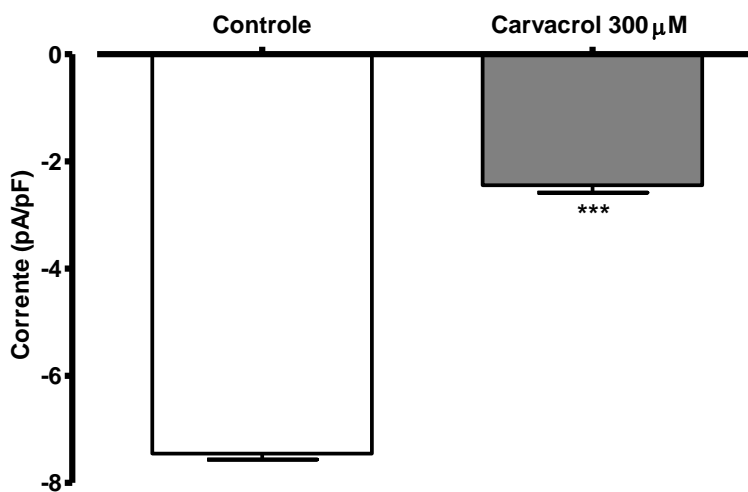


Gráfico 1: Caracterização das correntes de Ba^{2+} por canais para Ca^{2+} do tipo-L sensíveis à voltagem, nos miócitos vasculares recém dispersos de aorta. A. Traçado representativo antes (controle, em preto) e durante a aplicação de 300 μM (3×10^{-4}) de carvacrol (em cinza) sobre as correntes de entrada de Ba^{2+} , obtidas por pulsos despolarizantes de 10 mV, partindo de um potencial de “holding” de -80 mV. B. Resultado mostrando os valores de pico de correntes antes (controle) e após a inibição das correntes de Ba^{2+} pelo carvacrol. Os valores estão expressos como a média \pm e.p.m. ($n=7$).

5.2 ESTUDOS *Moleculares*

5.2.1 Expressão do RNAm do TRPV1 em miócitos vasculares de aorta de WKY e SHR.

Em relação à expressão do RNAm dos SHR ($2^{(-\Delta\Delta CT)} = 0,3060 \pm 0,1198$, $p=0,0007$, $N=6$) houve uma diminuição significativa na expressão gênica dos canais TRPV1 em miócitos vasculares de aorta, quando comparada ao seu controle WKY ($2^{(-\Delta\Delta CT)} = 1,091 \pm 0,09126$, $N=6$) gráfico 2.

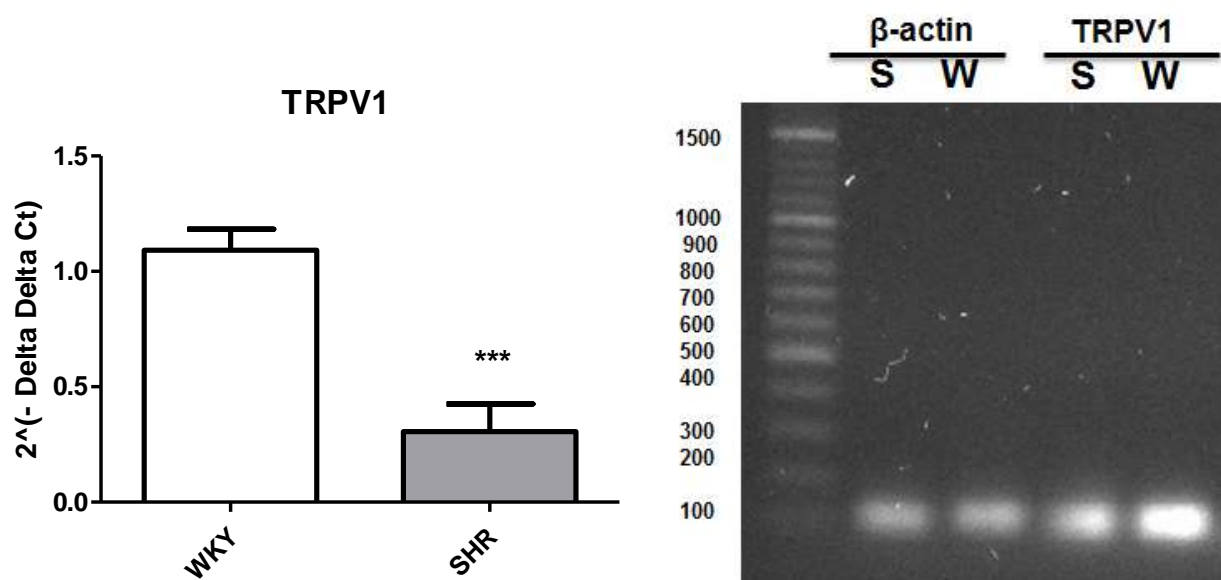


Gráfico 2: Expressão do RNAm para a síntese do TRPV1 em miócitos vasculares de aorta de WKY e SHR. O gráfico em barras mostra os valores da expressão do canal TRPV1 no controle WKY e a diminuição da expressão nos SHR (** $p < 0,001$, $N=6$).

Figura 16: Gel de corrida do processo final do PCR, mostrando o tamanho do fragmento em pares de base, onde beta actina 90pb e o TRPV1 79pb.

5.2.2 Expressão do RNAm do TRPV3 em miócitos vasculares de aorta de WKY e SHR.

Em relação à expressão do RNAm dos SHR ($2^{(-\Delta\Delta CT)} = 1,103 \pm 0,7060$, $p=0,9874$, $N=6$) não houve modificação na expressão gênica dos canais TRPV3 em miócitos vasculares de aorta, quando comparada ao seu controle WKY ($2^{(-\Delta\Delta CT)} = 1,091 \pm 0,09126$, $N=6$) gráfico 3.

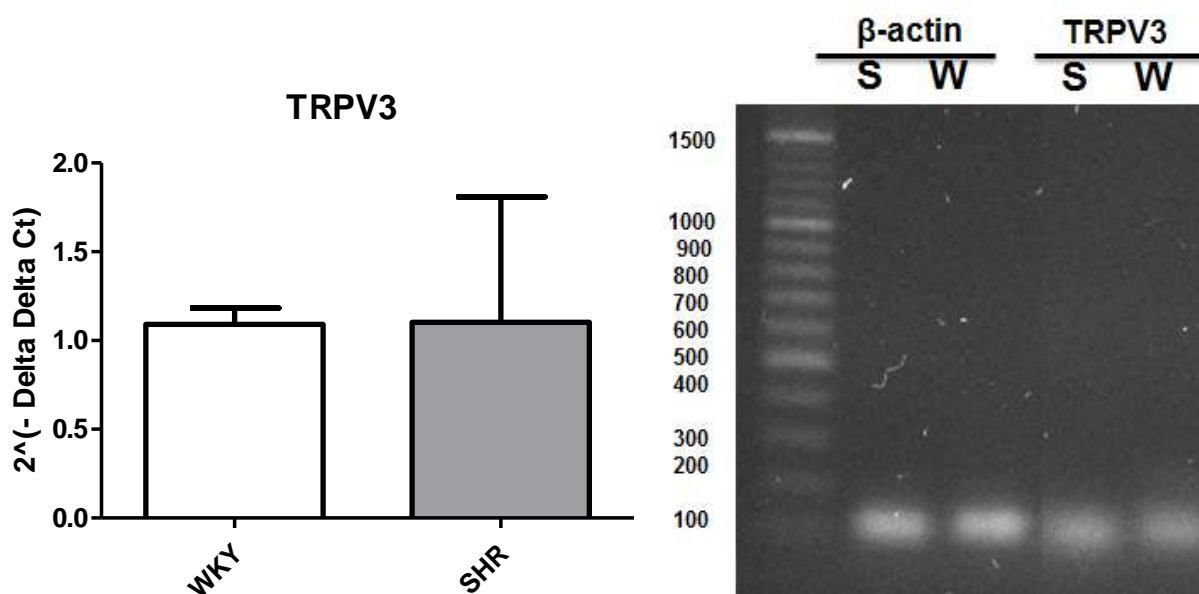


Gráfico 3: Expressão do RNAm para a síntese do TRPV3 em miócitos vasculares de aorta de WKY e SHR. O gráfico em barras mostra os valores da expressão do canal TRPV3 no WKY e no SHR.

Figura 17: Gel de corrida do processo final do PCR, mostrando o tamanho do fragmento em pares de base, onde beta actina 90pb e o TRPV3 122pb.

5.2.3 Expressão do RNAm do TRPV4 em miócitos vasculares de aorta de WKY e SHR.

Em relação à expressão do RNAm dos SHR ($2^{(-\Delta\Delta CT)} = 0,4256 \pm 0,01466$, $p=0,0002$, $N=6$) houve uma diminuição significativa na expressão gênica dos canais TRPV4 em miócitos vasculares de aorta, quando comparada ao seu controle normotenso WKY ($2^{(-\Delta\Delta CT)} = 1,091 \pm 0,09126$, $N=6$) gráfico 4.

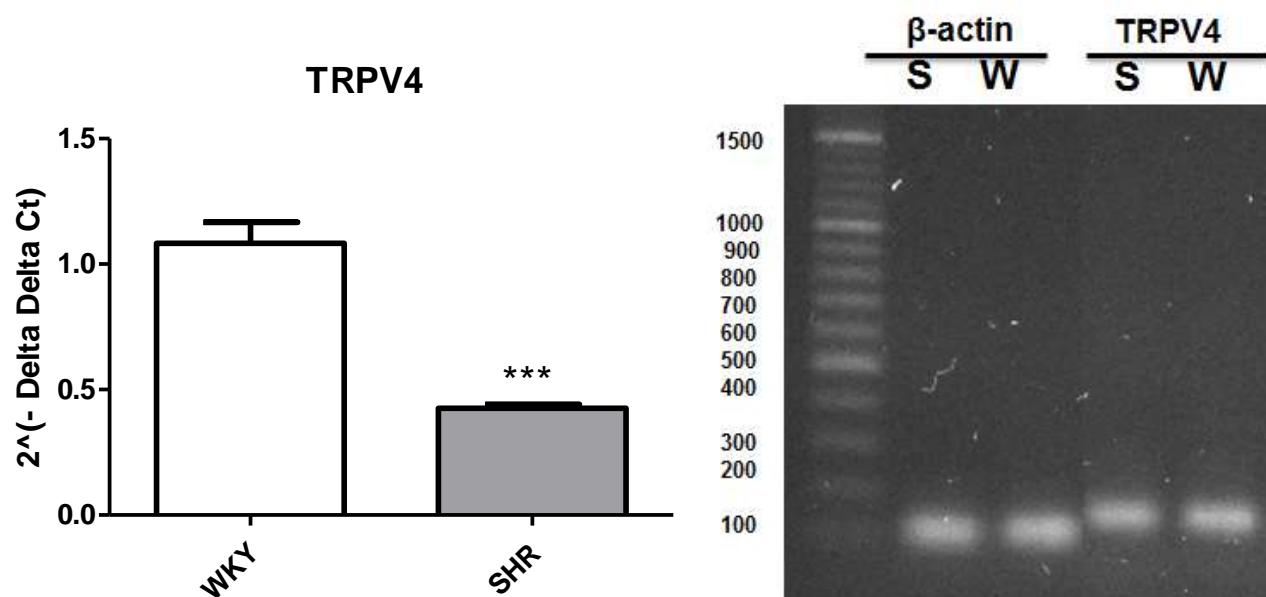


Gráfico 4: Expressão do RNAm para a síntese do TRPV4 em miócitos vasculares de aorta de WKY e SHR. O gráfico em barras mostra os valores da expressão do canal TRPV4 no WKY e a diminuição da expressão nos SHR (** $p < 0,001$, $N=6$).

Figura 18: Gel de corrida do processo final do PCR, mostrando o tamanho do fragmento em pares de base, beta actina 90pb e o TRPV4 143pb.

5.2.4 Expressão do RNAm do TRPM8 em miócitos vasculares de aorta de WKY e SHR.

Em relação à expressão do RNAm dos SHR ($2^{(-\Delta\Delta CT)} = 0,4130 \pm 0,07973$, $p=0,0008$, $N=6$) houve uma diminuição significativa na expressão gênica dos canais TRPM8 em miócitos vasculares de aorta, quando comparada ao seu controle WKY ($2^{(-\Delta\Delta CT)} = 1,091 \pm 0,09126$, $N=6$) Figura 19.

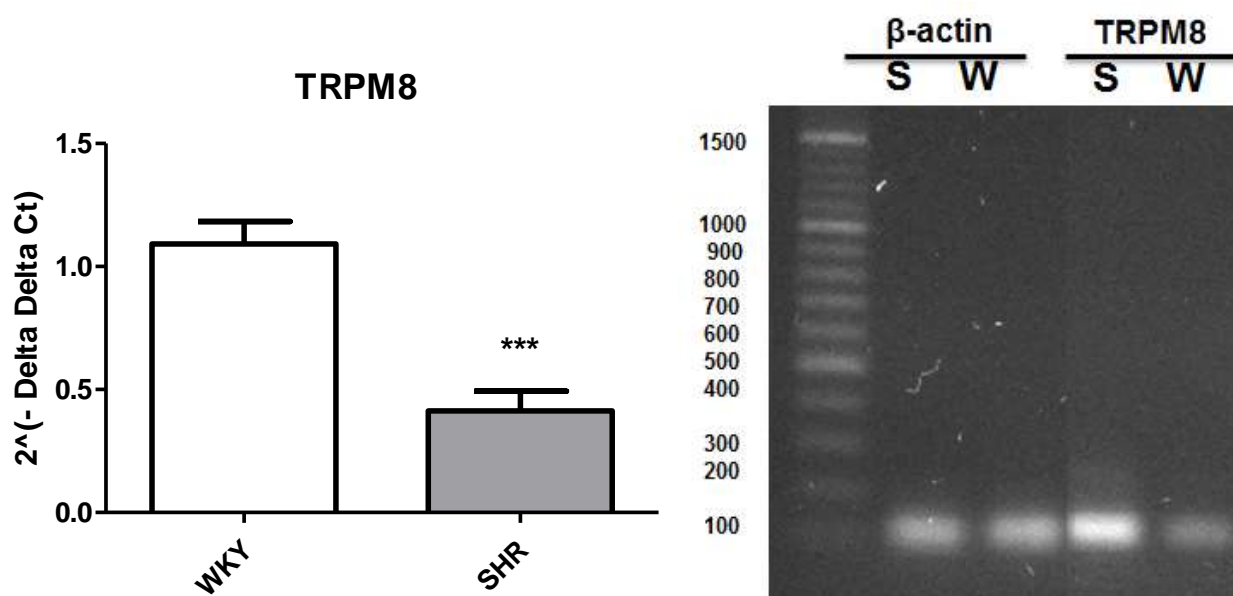


Gráfico5: Expressão do RNAm para a síntese do TRPM8 em miócitos vasculares de aorta de WKY e SHR . O gráfico em barras mostra os valores da expressão do canal TRPM8 no controle WKY e a diminuição da expressão nos SHR (** $p<0,001$, $N=6$).

Figura 19: Gel de corrida do processo final do PCR, mostrando o tamanho do fragmento em pares de base, beta actina 90pb e o TRPM8 127pb.

5.2.5 Expressão do RNAm do TRPM7 em miócitos vasculares de aorta de WKY e SHR.

Em relação à expressão do RNAm dos SHR ($2^{(-\Delta\Delta CT)} = 0,3094 \pm 0,02245$, $p=0,0091$, $N=6$) houve uma diminuição significativa na expressão gênica dos canais TRPM7 em miócitos vasculares de aorta, quando comparada ao seu controle WKY ($2^{(-\Delta\Delta CT)} = 1,091 \pm 0,09126$, $N=6$) Gráfico 6.

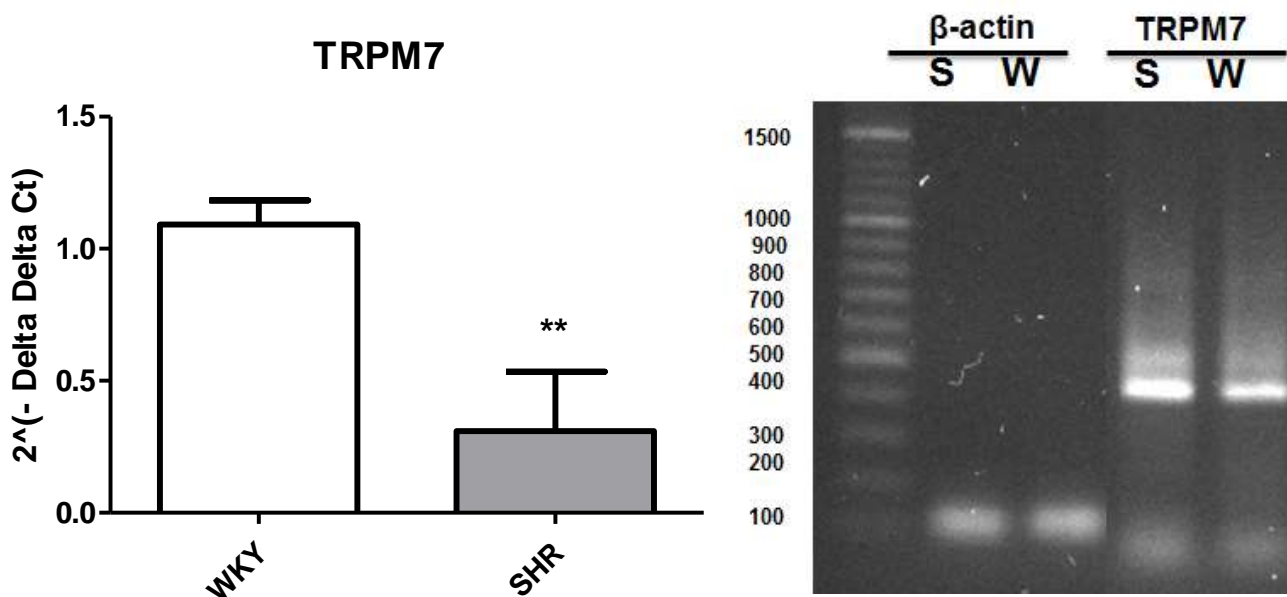


Gráfico 6: Expressão do RNAm para a síntese do TRPM7 em miócitos vasculares de aorta de WKY e SHR. O gráfico em barras mostra os valores da expressão do canal TRPM7 no controle WKY e a diminuição da expressão nos SHR (** $p<0,01$, $N=6$).

Figura 20: Gel de corrida do processo final do PCR, mostrando o tamanho do fragmento em pares de base, beta actina 90pb e o TRPM7 350pb.

5.2.6 Expressão do RNAm do TRPC1 em miócitos vasculares de aorta de ratos WKY e SHR.

Em relação à expressão do RNAm dos SHR ($2^{(-\Delta\Delta CT)} = 1,615 \pm 0,0373$, $p=0,02$, $N=6$) houve um aumento significativo na expressão gênica dos canais TRPC1 em miócitos vasculares de aorta, quando comparada ao seu controle normotenso WKY ($2^{(-\Delta\Delta CT)} = 1,125 \pm 0,09126$, $N=6$) Gráfico 7.

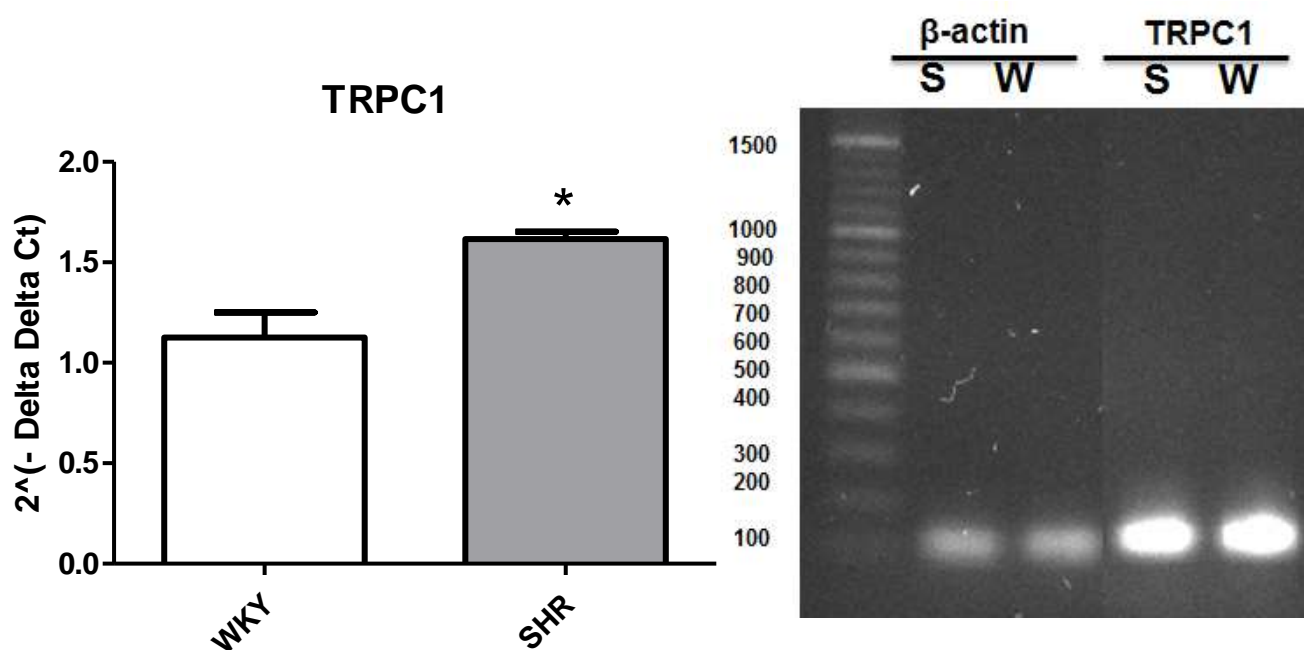


Gráfico 7: Expressão do RNAm para a síntese do TRPC1 em miócitos vasculares de aorta de ratos WKY e SHR. O gráfico em barras mostra os valores da expressão do canal TRPC1 no WKY e SHR.

Figura 21: Gel de corrida do processo final do PCR, mostrando o tamanho do fragmento em pares de base, beta actina 90pb e o TRPC1 146pb.

5.3 ESTUDOS *in vitro*

5.3.1 Efeito do carvacrol sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de aorta de WKY e SHR.

A administração cumulativa de carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) induziu um vasorelaxamento dependente de concentração em anéis intactos de aorta isolada de WKY e SHR, pré-contraídos com FEN (1 μ M). A remoção do endotélio vascular não alterou a resposta vasorelaxante induzida por carvacrol, em animais normotensos e hipertensos com uma potencia farmacológica demonstrada pelos valores de pD_2 obtidos da aorta com endotélio intacto WKY ($pD_2 = 5,09 \pm 0,08$, $n = 6$) e SHR ($pD_2 = 5,00 \pm 0,08$, $n = 6$) naquelas com o endotélio removido WKY ($pD_2 = 4,88 \pm 0,09$, $n = 6$) e SHR ($pD_2 = 4,93 \pm 0,08$, $n = 6$). Também, a percentagem de relaxamento máximo ($E_{m\acute{a}x}$) induzida por carvacrol não foi alterada pela remoção do endotélio, os valores do $E_{m\acute{a}x}$ WKY foram $99,60 \pm 0,88\%$ e $100,73 \pm 2,24\%$ e SHR foram $101,23 \pm 1,96\%$ e $110,06 \pm 2,07\%$ para aortas com ou sem endotélio funcional, respectivamente (Gráfico 8). A comparação entre animais normotensos e hipertensos, não houve alteração da resposta vasorelaxante entre os grupos estudados (Gráfico 9).

O tempo necessário para obter as respostas máximas para cada concentração de carvacrol variou entre 10 e 15 minutos. A reversão do relaxamento produzido por carvacrol foi conseguida após 30 minutos de sua remoção das cubas, pela troca da solução de Tyrode e verificação da resposta do tecido à FEN (1 μ M). A reversibilidade foi rotineiramente observada para assegurar que o relaxamento do tecido não fosse ocasionado por um possível dano tecidual, estando demonstrado no registro original da ação do carvacrol sobre a artéria mesentérica (Figura 22).

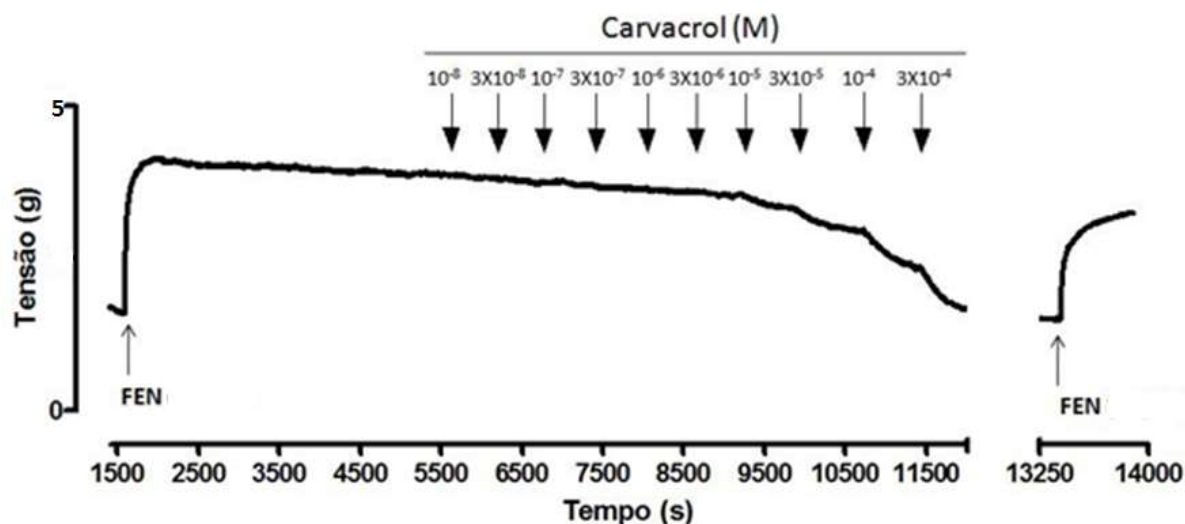


Figura 22: Registro original da ação do carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anel de aorta de rato WKY, com o endotélio removido e pré-contráido com FEN ($1 \mu\text{M}$). As setas indicam o momento da adição das substâncias.

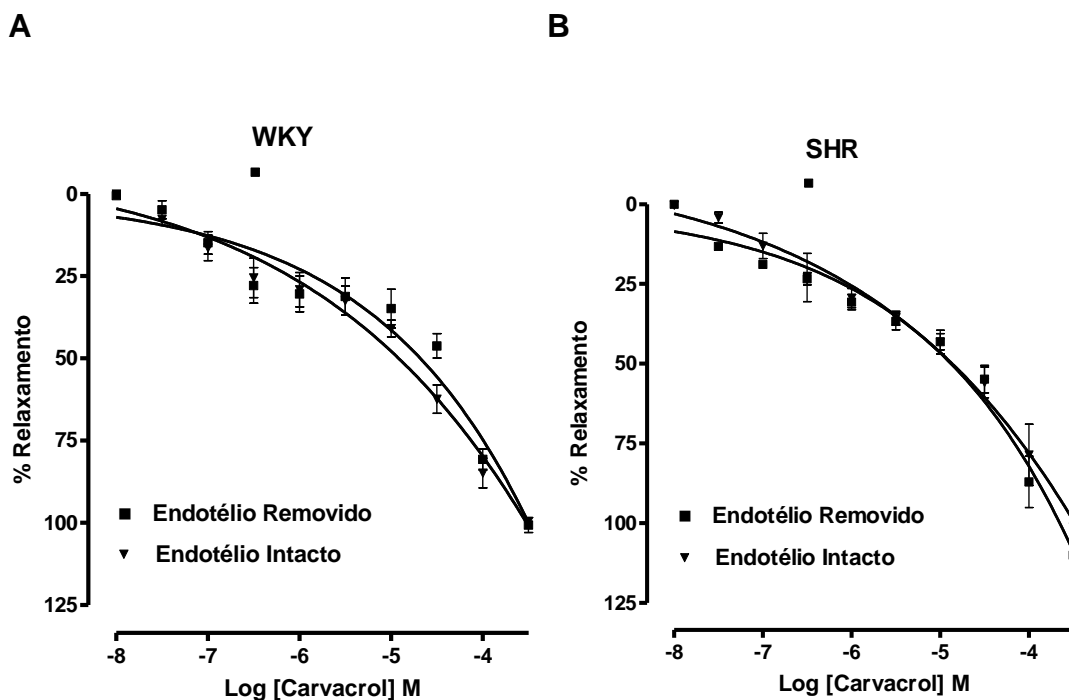


Gráfico 8: Efeito do carvacrol em anéis de aorta de WKY e SHR. Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de aorta com o endotélio intacto (■) ou endotélio removido (▲), pré-contráido com FEN ($1 \mu\text{M}$). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 experimentos, onde $p < 0,05$ é considerado significativo.

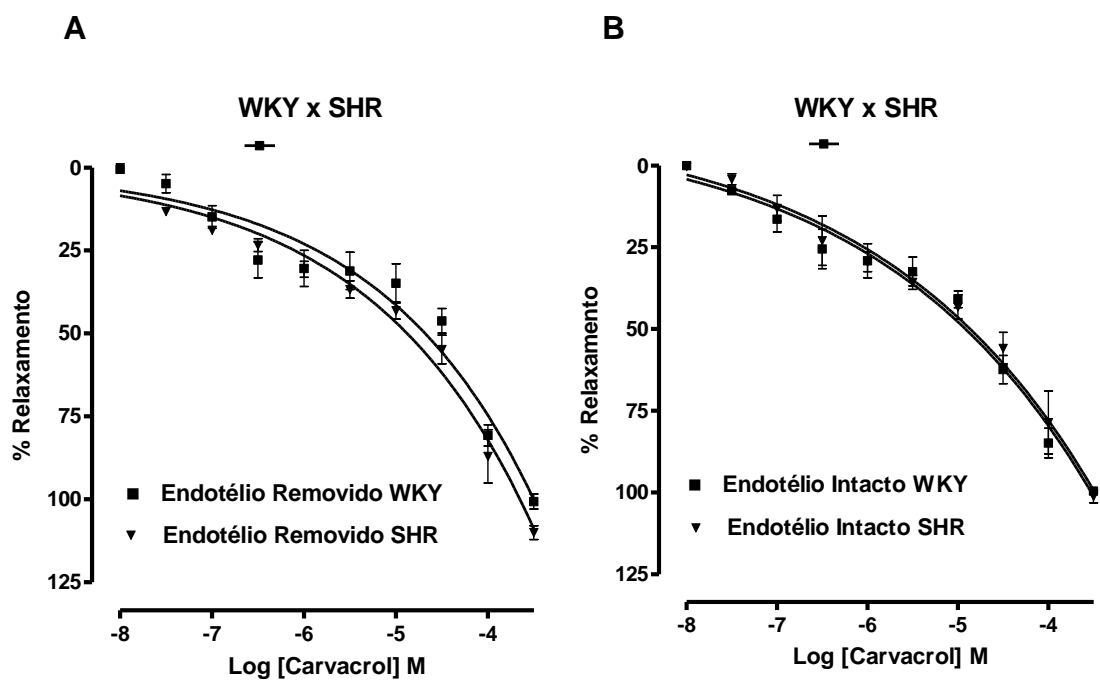


Gráfico 9: Comparação das curvas de concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anéis de aorta pré-contraídos com FEN entre WKY e SHR, com endotélio removido (A) e intacto (B).

5.3.2 Efeito do carvacrol sobre o tônus intrínseco vascular de anéis aórticos

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 de WKY e SHR (Gráfico 10).

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 aorta, no tônus vascular (Figura 23).

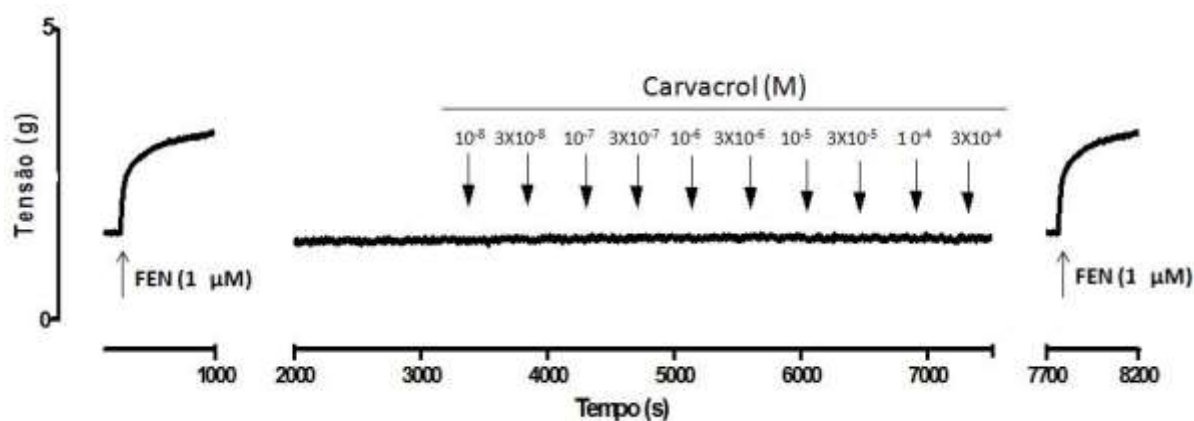


Figura 23: Registro original da ação do carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) em anel de aorta de rato WKY, com o endotélio removido, no tônus basal. As setas indicam o momento da adição das substâncias.

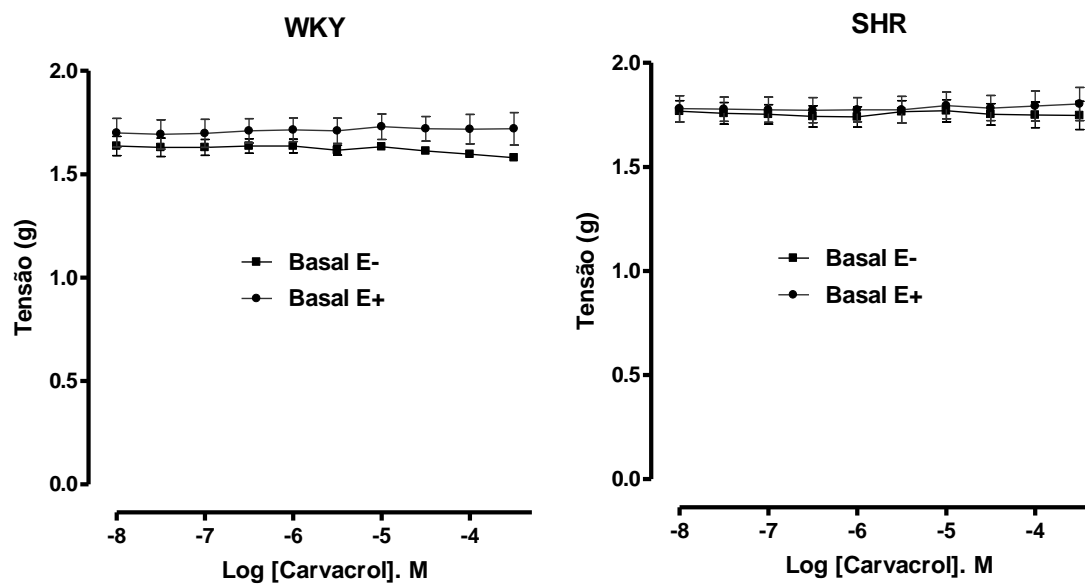


Gráfico 10: Efeito do carvacrol sobre o tônus basal de anéis de aorta de WKY e SHR. Gráfico representativo da ação do carvacrol (10^{-8} - 3×10^{-4} M) com o endotélio intacto (n=6) (■) ou endotélio removido (n=6) (▲), no tônus basal.

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

5.3.3.1 Efeito do carvacrol sobre anéis de aorta de WKY e SHR pré-contráídos com FEN na ausência e na presença de vermelho de rutênio

O relaxamento promovido pelo carvacrol em anéis de aorta de WKY pré-contráída com fenilefrina, na ausência do endotélio funcional ($pD_2 = 4,88 \pm 0,09$ e $E_{máx} = 100,73 \pm 2,24\%$), não foi alterada na presença do vermelho de rutênio ($pD_2 = 4,80 \pm 0,135$ e $E_{máx} = 92,75 \pm 3,30\%$) (bloqueador não-seletivo dos TRPV, TRPA1 e TRPM6) (CLAPHAM, et al, 2005), mas em SHR ($pD_2 = 4,93 \pm 0,08$ e $E_{máx} = 110,06 \pm 2,07\%$), tanto sua potência como sua eficácia foram diminuídas na presença do vermelho de rutênio ($pD_2 = 4,13 \pm 0,06$, $p < 0,0001$ e $E_{máx} = 85,39 \pm 1,72\%$, $p < 0,0001$) (Gráfico 11). Quando comparado o WKY frente o SHR a diferença na potencia farmacológica foi significativamente evidenciada ($p = 0,0019$) (Gráfico 12).

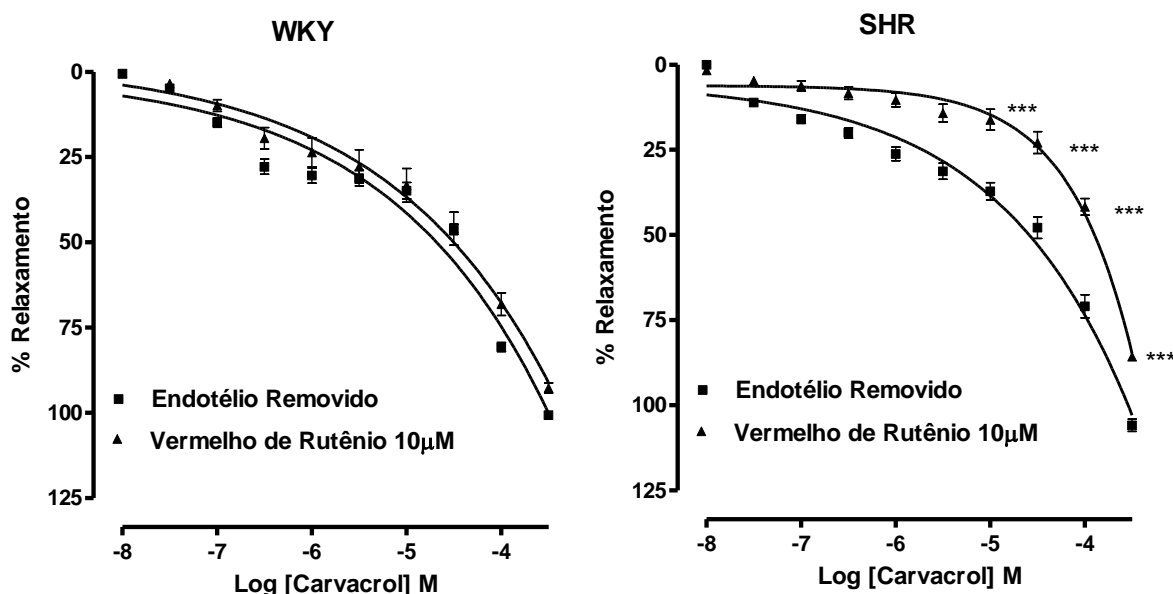


Gráfico 11: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de WKY e SHR, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença de vermelho rutênio (10 µM) (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m., onde *** $p < 0,001$ SHR vs. Controle E-.

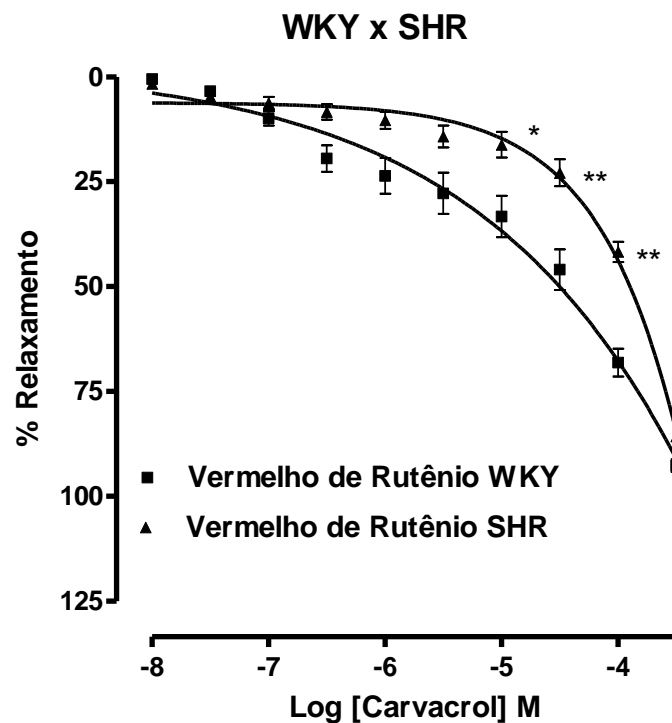


Gráfico 12: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de rato, sem endotélio vascular na presença de vermelho rutênio (10 μ M), WKY (■) e SHR (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m., onde ** $p < 0,001$ SHR vs. WKY.

5.3.3.2 Efeito do carvacrol sobre anéis de aorta de WKY e SHR pré-contráídos com FEN na ausência e na presença de magnésio

O relaxamento promovido pelo carvacrol em anéis de aorta de WKY pré-contráída com fenilefrina, na ausência do endotélio funcional ($pD_2 = 4,88 \pm 0,09$ e $E_{máx} = 100,73 \pm 2,24\%$), foi atenuada tanto sua potência como eficácia farmacológica na presença do íon magnésio (Mg^{2+}) (2,25 mM) ($pD_2 = 4,44 \pm 0,08$, $p=0,0081$ e $E_{máx} = 86,99 \pm 5,06\%$, $p=0,026$), bloqueador do TRPM6, TRPM7 (CLAPHAM, et al, 2005; BALDOLI, et al, 2013), o mesmo pode-se observar em SHR ($pD_2 = 4,93 \pm 0,08$ e $E_{máx} = 110,06 \pm 2,07\%$), tanto sua potência como sua eficácia foram diminuídas na presença do íon magnésio ($pD_2 = 4,36 \pm 0,09$, $p=0,001$ e $E_{máx} = 82,33 \pm 5,91\%$, $p=0,0006$) (Gráfico 13), mas quando comparado o WKY frente o SHR essa diferença não foi evidenciada na curva, só tendo diferença na penúltima concentração de $10^{-4}M$, com $p<0,01$ (Gráfico 14).

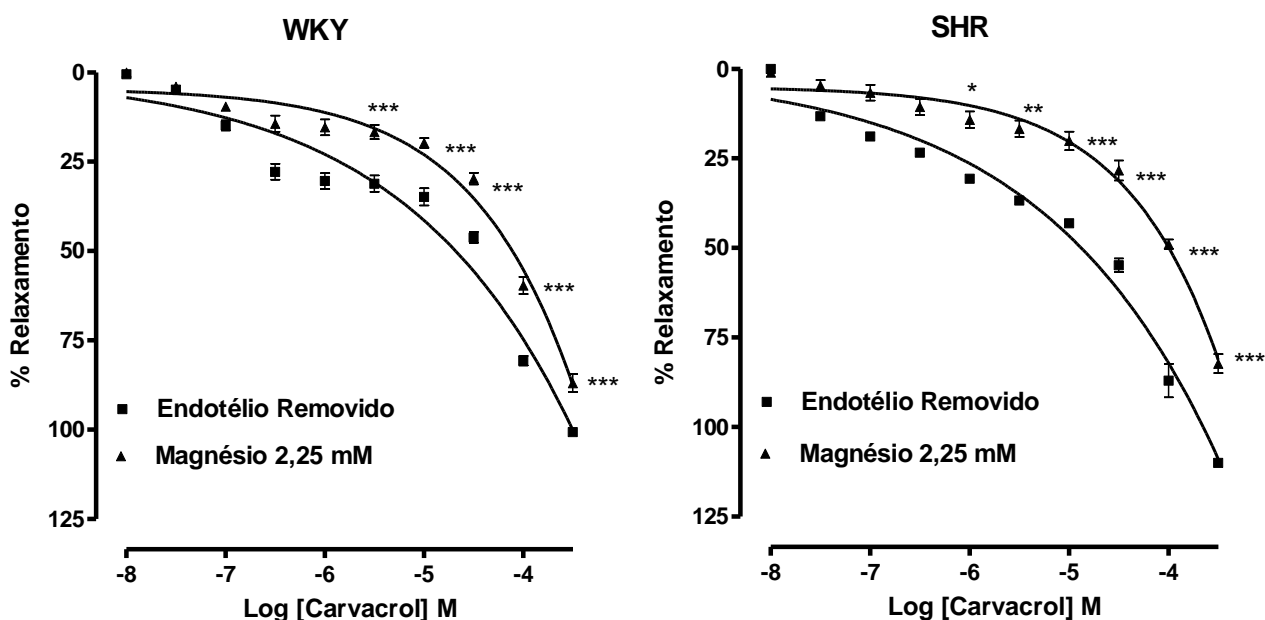


Gráfico 13: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de WKY e SHR, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença do íon magnésio (Mg^{2+}) (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m., onde *** $p<0,001$, ** $p<0,01$ e * $p<0,05$ vs. Controle E-.

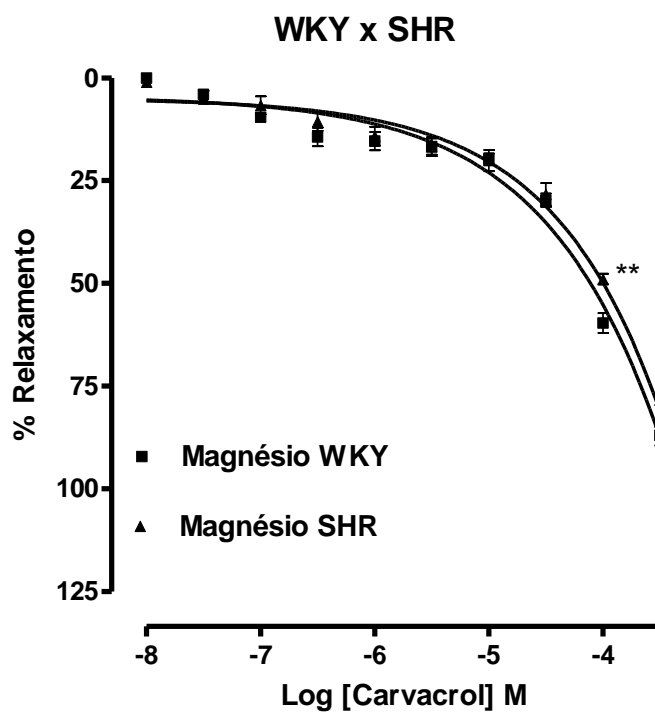


Gráfico 14: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de WKY e SHR, sem endotélio vascular na presença do íon magnésio (Mg^{2+}), WKY (■) e SHR (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m., ** $p < 0,01$ SHR vs. WKY.

5.3.3.3 Efeito do carvacrol sobre anéis de aorta de WKY e SHR pré-contráídos com FEN na ausência e na presença de 2-APB

O relaxamento promovido pelo carvacrol em anéis de aorta de WKY pré-contráída com fenilefrina, na ausência do endotélio funcional ($pD_2 = 4,88 \pm 0,09$ e $E_{m\acute{a}x} = 100,73 \pm 2,24\%$), teve atenuado a sua eficácia, enquanto que sua potência farmacológica foi potencializada na presença do 2-APB (30 μM) ($pD_2 = 5,38 \pm 0,07$, $p=0,0018$ e $E_{m\acute{a}x} = 90,21 \pm 1,73\%$, $p=0,004$), um ativador dos TRPM6, TRPV1, TRPV3 (HINMAN, 2006, BALDOLI, 2013) e inibidor do TRPM7, TRPM8 e TRPC1 (GUILBERT, 2009; MACIANSKIENE, 2012; EL HIANI, 2009; SELESCU, 2013), o mesmo pode-se observar em animais SHR ($pD_2 = 4,93 \pm 0,08$ e $E_{m\acute{a}x} = 110,06 \pm 2,07\%$), onde sua potência foi aumentada e sua eficácia foi diminuída na presença do 2-APB ($pD_2 = 5,54 \pm 0,05$, $p<0,0001$ e $E_{m\acute{a}x} = 100,41 \pm 1,89\%$, $p=0,0051$) (Gráfico 15). Quando comparado o WKY frente o SHR essas diferenças na eficácia farmacológica ($p=0,0023$) também foi significativamente evidenciada (Gráfico 16).

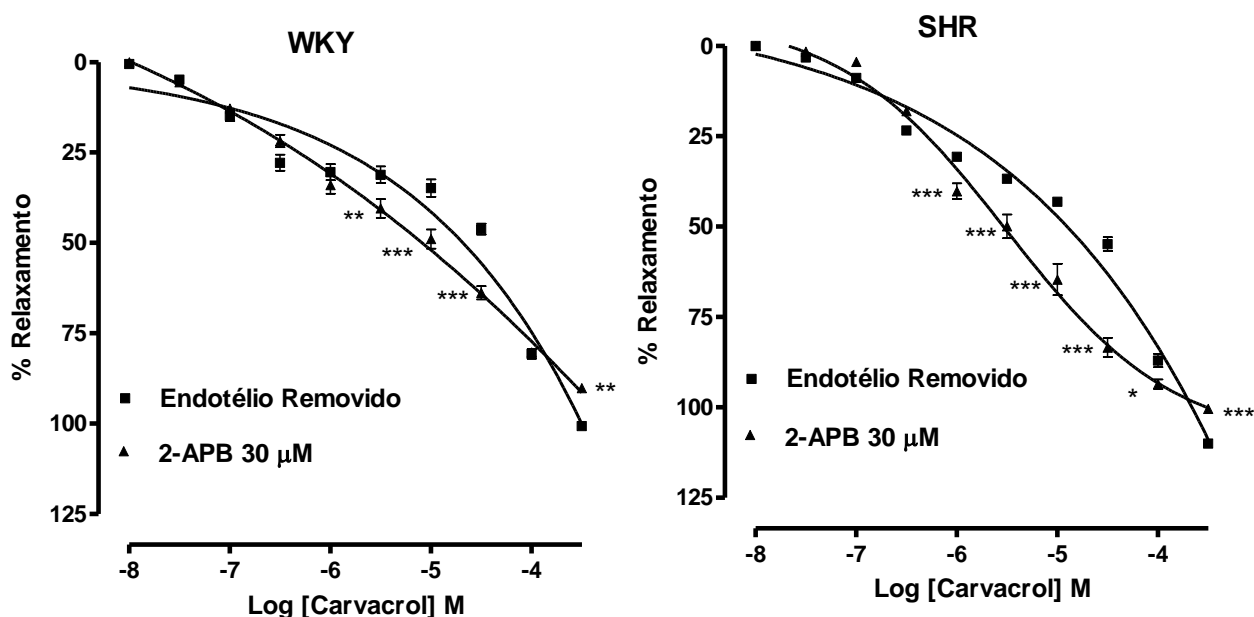


Gráfico 15: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de WKY e SHR, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença do 2-APB 30 μM (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m., onde *** $p<0,001$, ** $p<0,01$ e * $p<0,05$ vs. Controle E-.

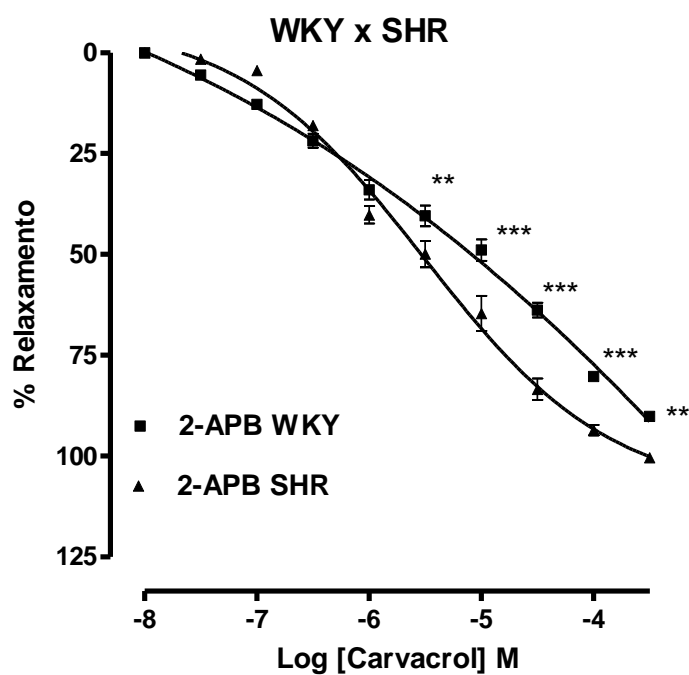


Gráfico 16: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de WKY e SHR, sem endotélio vascular na presença do 2-APB, WKY (■) e SHR (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m., *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ SHR vs. WKY.

5.3.3.4 Efeito do carvacrol sobre anéis de aorta de WKY e SHR pré-contráídos com FEN na ausência e na presença do Capsazepina

Na presença da capsazepina (CPZ), um bloqueador do TRPV1 e TRPM8 (VALENZANO et al., 2003; INOUE, 2006; BEHRENDT, 2004; MALKIA, 2009), o efeito relaxante produzido pelo carvacrol em anéis de aorta de WKY pré-contráídos com fenilefrina na ausência de endotélio funcional ($pD_2 = 4,88 \pm 0,09$ e $E_{máx} = 100,73 \pm 2,24\%$) foi potencializado sua potência farmacológica e sua eficácia na presença da CPZ ($pD_2 = 5,60 \pm 0,09$, $p < 0,0001$ e $E_{máx} = 110,55 \pm 8,49\%$, $p < 0,05$), o mesmo pode-se observar em SHR ($pD_2 = 4,93 \pm 0,08$ e $E_{máx} = 110,06 \pm 2,07\%$), nos quais o efeito relaxante na ausência do bloqueador teve sua potencia aumentada sem alteração na eficácia na presença da CPZ ($pD_2 = 5,32 \pm 0,05$, $p = 0,009$ e $E_{máx} = 115,08 \pm 0,46\%$) (Gráfico 17). Quando o efeito relaxante foi comparado entre WKY e SHR foi encontrada diferença significativa na potência farmacológica $p = 0,03$ (Gráfico 18).

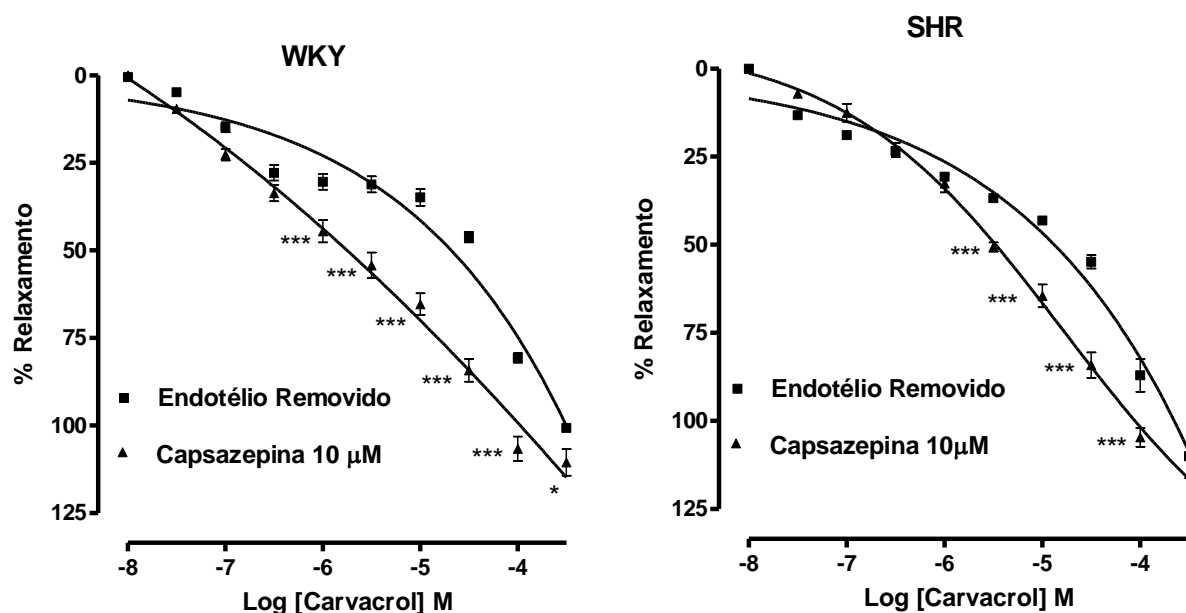


Gráfico 17: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de WKY e SHR, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença da capsazepina (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m., onde *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ vs. Controle E-.

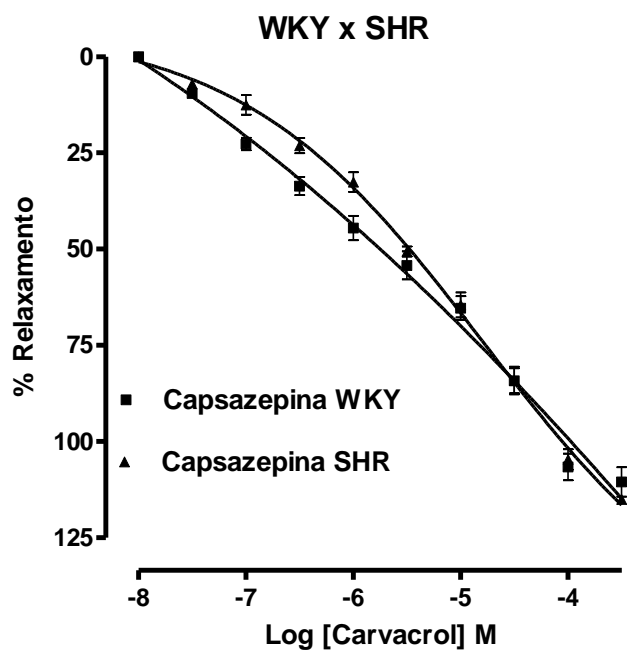


Gráfico 18: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de WKY e SHR, sem endotélio vascular na presença da capsazepina, WKY (■) e SHR (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m., onde $p < 0,05$ é considerado significativo.

5.3.3.5 Efeito do carvacrol sobre anéis de aorta de WKY e SHR pré-contraídos com FEN na ausência e na presença do BCTC

Na presença do BCTC, um bloqueador do TRPV1 e TRPM8 (VALENZANO, et al, 2003; BEHRENDT, 2004; SELESCU, 2013), o efeito relaxante produzido pelo carvacrol em anéis de aorta de WKY pré-contraídos com fenilefrina na ausência de endotélio funcional ($pD_2 = 4,88 \pm 0,09$ e $E_{m\acute{a}x} = 100,73 \pm 2,24\%$) não teve alteração na potência farmacológica, mas teve sua eficácia farmacológica potencializada nas ultimas concentrações na presença do BCTC ($pD_2 = 4,84 \pm 0,09$ e $E_{m\acute{a}x} = 114,56 \pm 6,00\%$), o mesmo pode-se observar em SHR ($pD_2 = 4,93 \pm 0,08$ e $E_{m\acute{a}x} = 110,06 \pm 2,07\%$), nos quais o efeito relaxante na ausência do bloqueador não sofreu alteração de sua potência, mas teve sua eficácia potencializada nas três ultimas concentrações na presença do BCTC ($pD_2 = 4,71 \pm 0,06$ e $E_{m\acute{a}x} = 125,57 \pm 6,48\%$) (Gráfico 19). Quando o efeito relaxante foi comparado entre animais WKY e SHR só foi encontrada diferença significativa quanto à eficácia na última concentração com $p < 0,05$ (Gráfico 20).

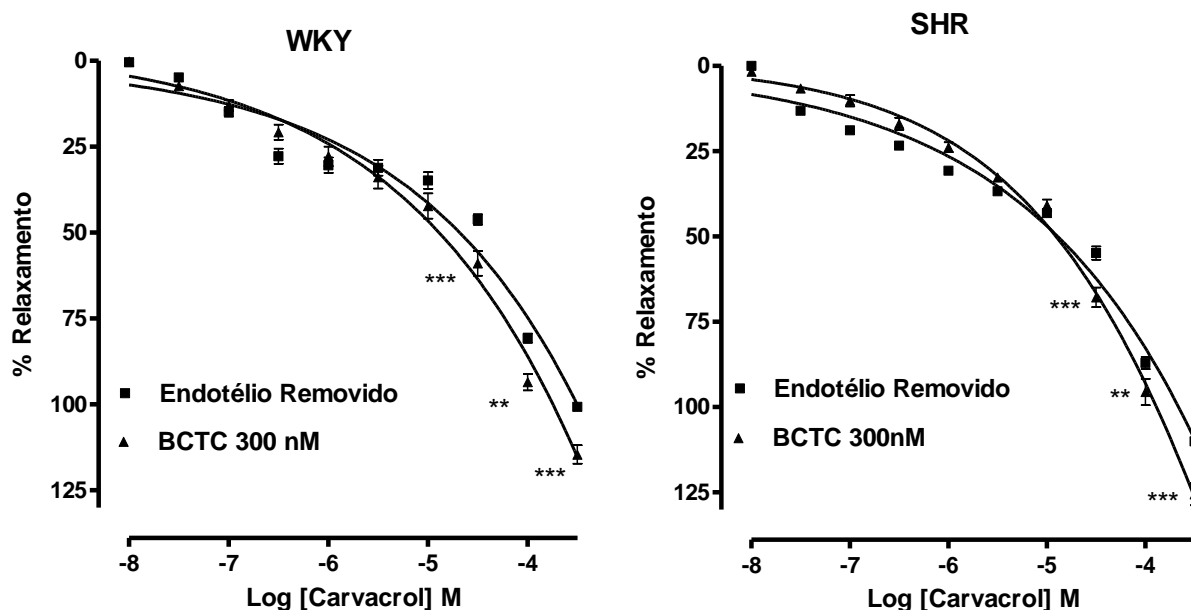


Gráfico 19: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de WKY e SHR, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença do BCTC (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m., onde *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ vs. Controle E-.

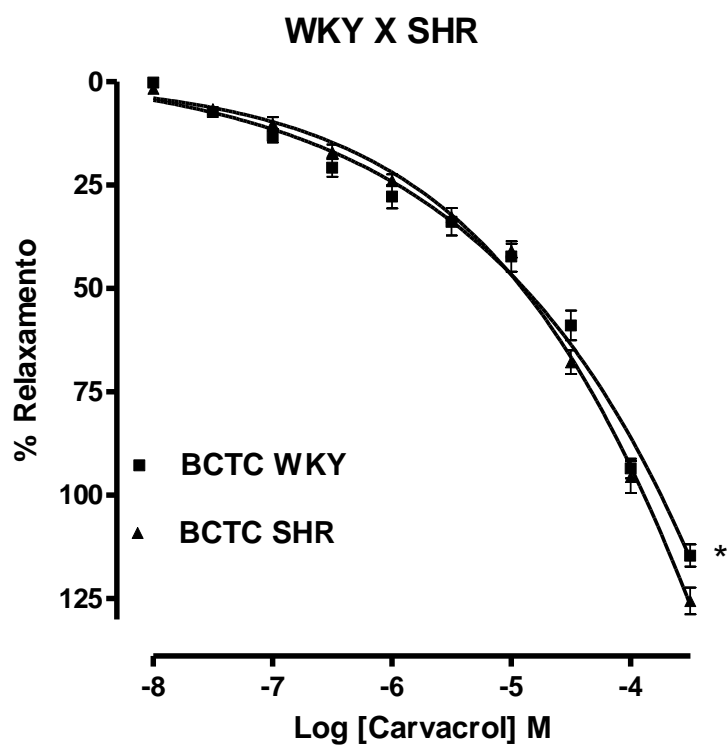


Gráfico 20: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de WKY e SHR, sem endotélio vascular na presença do BCTC, WKY (■) e SHR (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m., * $p < 0,05$ SHR vs. WKY.

5.3.3.6 Efeito do carvacrol sobre anéis de aorta de WKY e SHR pré-contráídos com FEN na ausência e na presença da Capsaicina

Na presença da Capsaicina (CAP), um ativador do TRPV1 (TÓTH et al., 2014) e dessensibilizante do nervo sensorial perivascular (HOPPS et al., 2012), o efeito relaxante produzido pelo carvacrol em anéis de aorta de WKY pré-contráídos com fenilefrina na ausência de endotélio funcional ($pD_2 = 4,88 \pm 0,09$ e $E_{máx} = 100,73 \pm 2,24\%$), foi potencializado sua potência farmacológica e diminuída a sua eficácia na presença da CAP ($pD_2 = 5,71 \pm 0,12$, $p=0,0002$ e $E_{máx} = 67,91 \pm 8,23\%$, $p=0,0032$), o mesmo pode-se observar em SHR ($pD_2 = 4,93 \pm 0,08$ e $E_{máx} = 110,06 \pm 2,07\%$), nos quais o efeito relaxante na ausência do bloqueador teve sua potencia potencializada com diminuição na eficácia na presença da CAP ($pD_2 = 5,69 \pm 0,10$, $p=0,0002$ e $E_{máx} = 92,52 \pm 1,84\%$, $0,0004$) (Gráfico 21). Quando o efeito relaxante foi comparado entre WKY e SHR a eficácia do SHR foi maior com $p = 0,045$ (Gráfico 22).

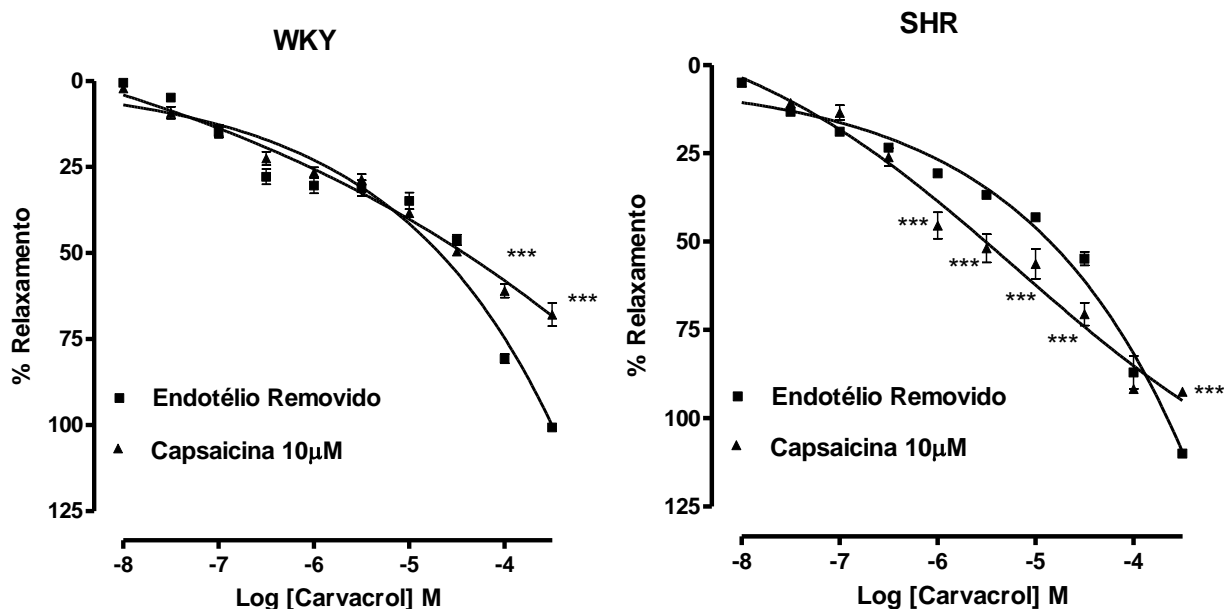


Gráfico 21: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de WKY e SHR, sem endotélio vascular, na ausência (■) ou na presença da capsaicina (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m., onde *** $p < 0,001$ vs. Controle E-.

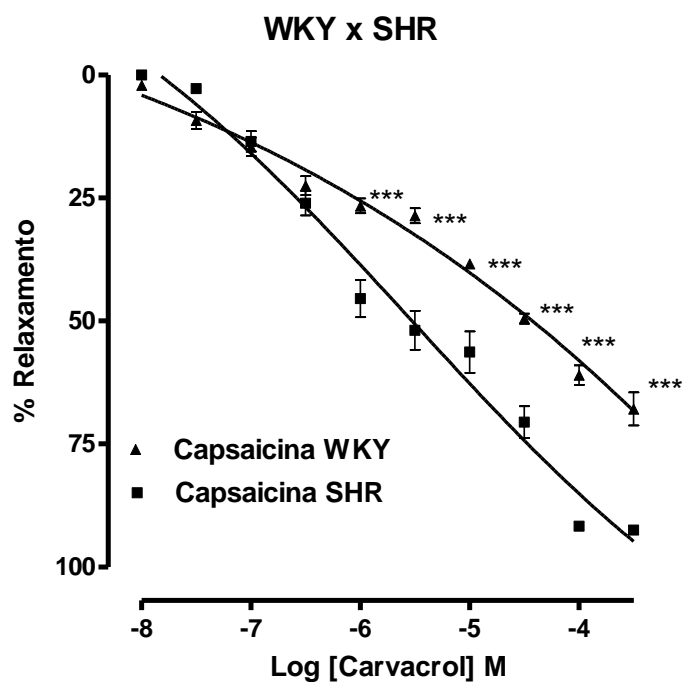


Gráfico 22: Efeito relaxante do carvacrol sobre os anéis de aorta de WKY e SHR, sem endotélio vascular na presença da capsaicina, WKY (■) e SHR (▲). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m., *** $p < 0,001$ SHR vs. WKY.

Tabela 7: Valores de pD_2 e $E_{m\acute{a}x}$ do efeito do carvacrol em WKY, comparando a situação controle *versus* situação em estudo.

WKY	pD_2	$E_{m\acute{a}x}$
Controle	$4,88 \pm 0,09$	$100,73 \pm 2,24$
Vermelho Rutênio	$4,80 \pm 0,13$	$92,75 \pm 3,30$
Magnésio	$4,44 \pm 0,08^{**}$	$86,99 \pm 5,06^{*}$
2-APB	$5,38 \pm 0,07^{**}$	$90,21 \pm 1,73^{**}$
BCTC	$4,84 \pm 0,09$	$114,56 \pm 6,00^{***}$
Capsazepina	$5,60 \pm 0,09^{***}$	$110,55 \pm 8,49$
Capsaicina	$5,71 \pm 0,12^{***}$	$67,91 \pm 8,23^{**}$

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

Tabela 8: Valores de pD_2 e $E_{m\acute{a}x}$ do efeito do carvacrol em SHR, comparando a situação controle *versus* situação em estudo e a comparação entre WKY *versus* SHR.

SHR	pD_2	$E_{m\acute{a}x}$
Controle	$4,93 \pm 0,08$	$110,06 \pm 2,07$
Vermelho Rutênio	$4,13 \pm 0,06^{***\#}$	$85,39 \pm 1,72^{***\#}$
Magnésio	$4,36 \pm 0,09^{**}$	$83,33 \pm 5,91^{***\#}$
2-APB	$5,54 \pm 0,05^{***}$	$100,41 \pm 1,89^{***\#}$
BCTC	$4,71 \pm 0,06$	$125,57 \pm 6,48^{***\#}$
Capsazepina	$5,32 \pm 0,05^{**\#}$	$115,08 \pm 0,46$
Capsaicina	$5,71 \pm 0,12^{***}$	$67,91 \pm 8,23^{***\#}$

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

5.4 ESTUDOS *in vivo*

5.4.1 Efeitos do carvacrol sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) não-anestesiados

Os valores basais da PAM e FC nos animais antes da administração do carvacrol foram respectivamente de $161,80 \pm 3,78$ mmHg e 380 ± 11 bpm para SHR e $118,00 \pm 3,20$ mmHg e $298,5 \pm 14$ bpm, para WKY (Gráfico 23). A administração do carvacrol (0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 mg/Kg, i.v., aleatoriamente) induziu uma resposta transiente (Figura 25) caracterizada por hipotensão WKY (Δ PAM (%) = $-7,8 \pm 3,18$; $-14,0 \pm 2,64$; $-39,2 \pm 12,87$; $-64,2 \pm 13,31$; $-77,2 \pm 4,04$; $-79,2 \pm 6,51$; $-80,0 \pm 2,68$ mmHg, respectivamente) e SHR (Δ PAM (%) = $-14 \pm 3,06$; $-19,80 \pm 4,89$; $-20,5 \pm 3,01$; $-27,0 \pm 8,43$; $-93,8 \pm 6,86$; $-96,0 \pm 3,57$; $-98,0 \pm 3,14$ mmHg, respectivamente) associada a bradicardia WKY (Δ FC = $-6,25 \pm 7,69$; $-12,66 \pm 5,23$; $-147,25 \pm 72,11$; $-313,8 \pm 26,02$; $-309,66 \pm 22,11$; $-293,0 \pm 25,19$; $-276,16 \pm 25,19$ bpm, respectivamente) e SHR (Δ FC = $-30,4 \pm 6,31$; $-34,75 \pm 5,43$; $-39,50 \pm 3,70$; $-232,66 \pm 11,21$; $-263,75 \pm 8,32$; $-280,75 \pm 6,83$; $-308,0 \pm 22,17$ bpm, respectivamente) tanto em SHR como em WKY, de maneira independente de dose (n=6) (Gráfico 24 e 25).

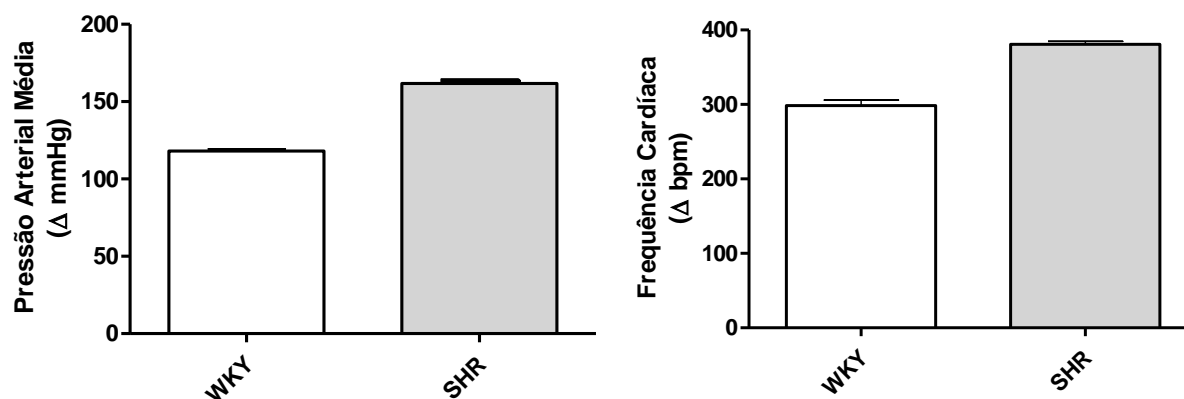


Gráfico 23. Valores médios basais da PAM e FC de ratos normotensos e hipertensos.

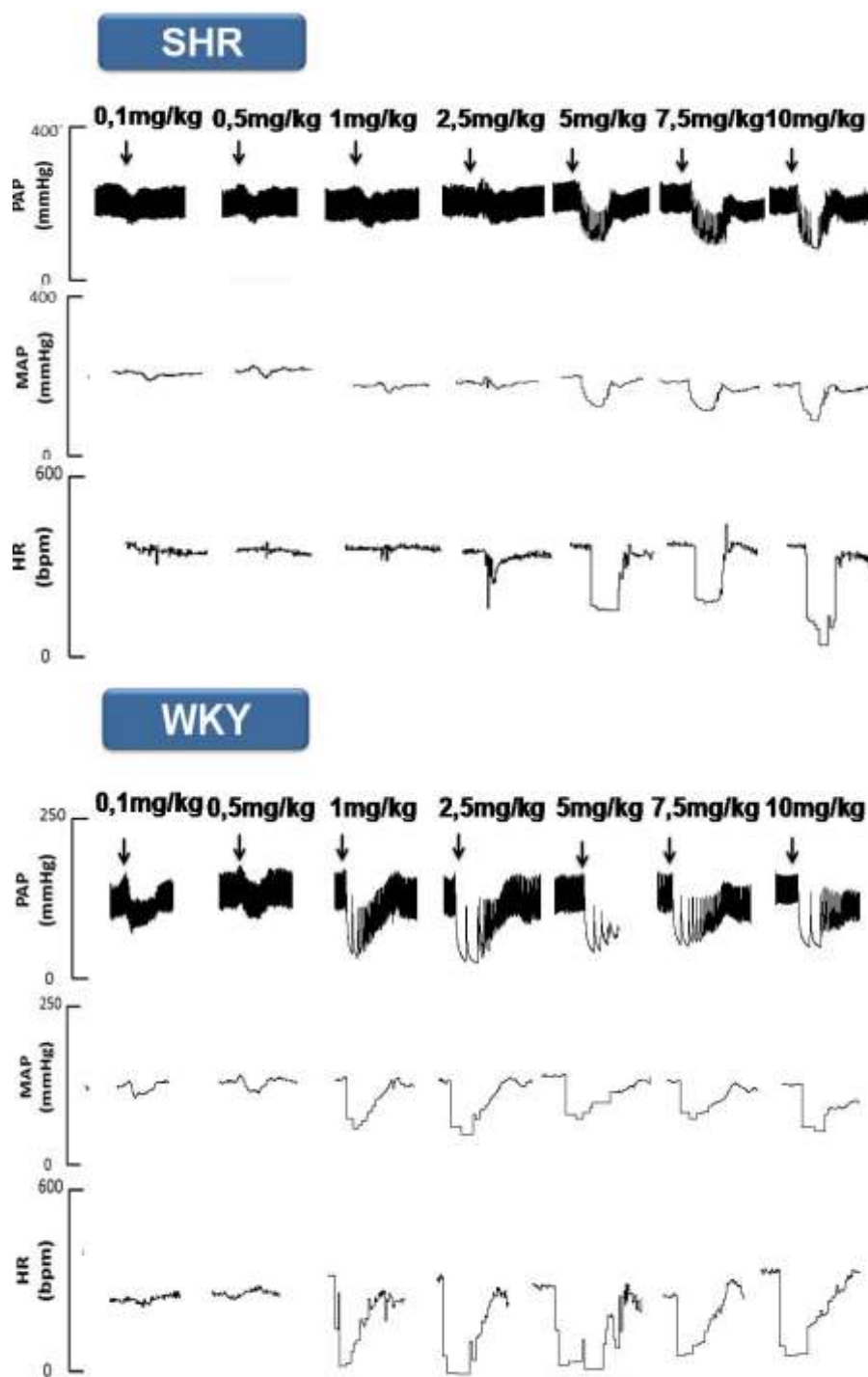


Figura 25: Registro original representativo ilustrando o efeito de doses crescentes do carvedilol (0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 mg/Kg, i.v.) sobre PAS, PAM, PAD e FC em ratos normotensos e hipertensos não anestesiado. As setas indicam o momento da administração do carvedilol.

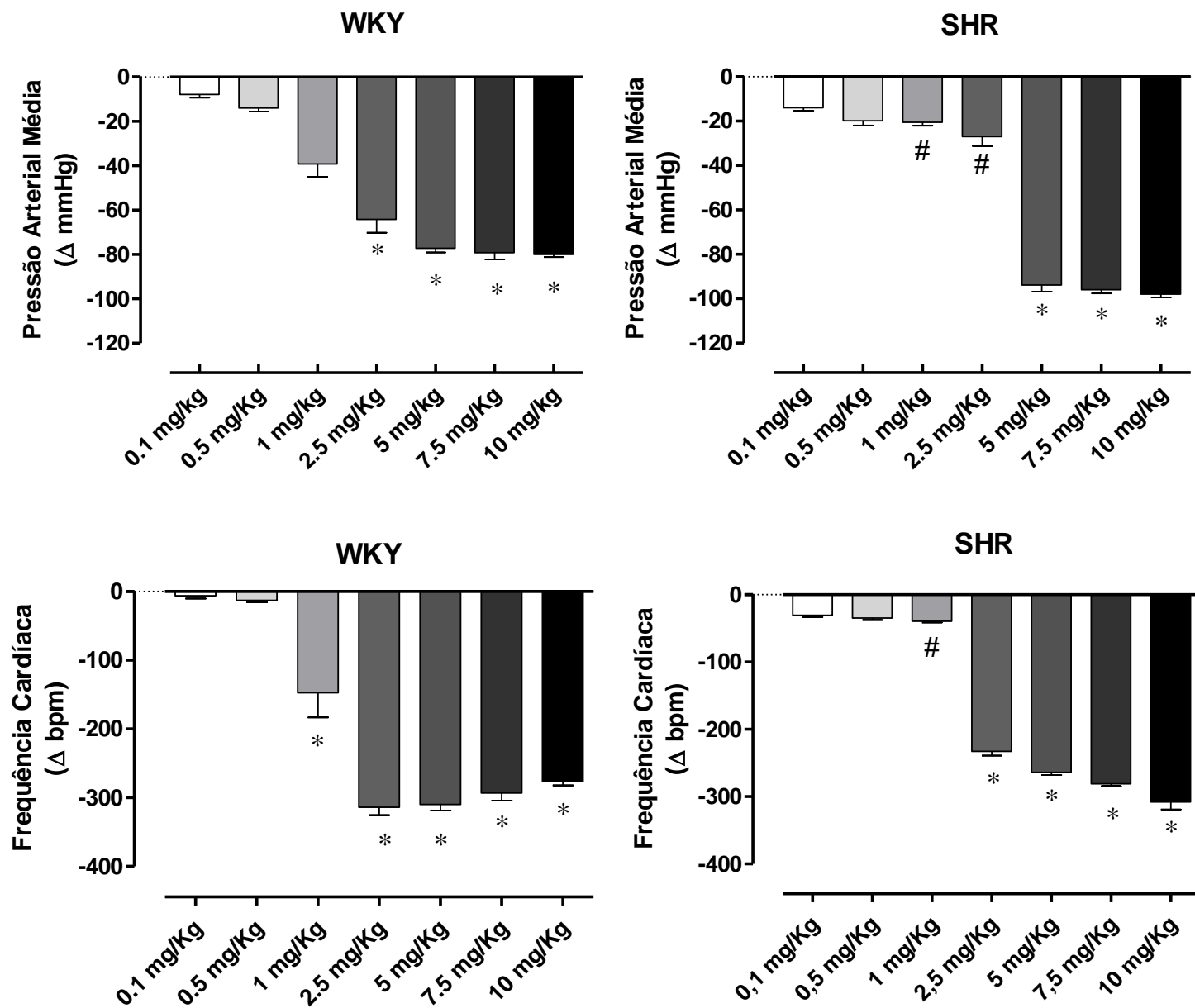


Gráfico 24:

Efeitos do carvedilol sobre a Pressão Arterial Média (PAM, mmHg) (* $p < 0.05$ vs. 0.1 mg/kg; # $p < 0.05$ SHR vs. WKY) e Frequência Cardíaca (FC, bpm) (* $p < 0.05$ vs. 0.1 mg/kg) em ratos normotensos e hipertensos não anestesiados. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. de 8 experimentos

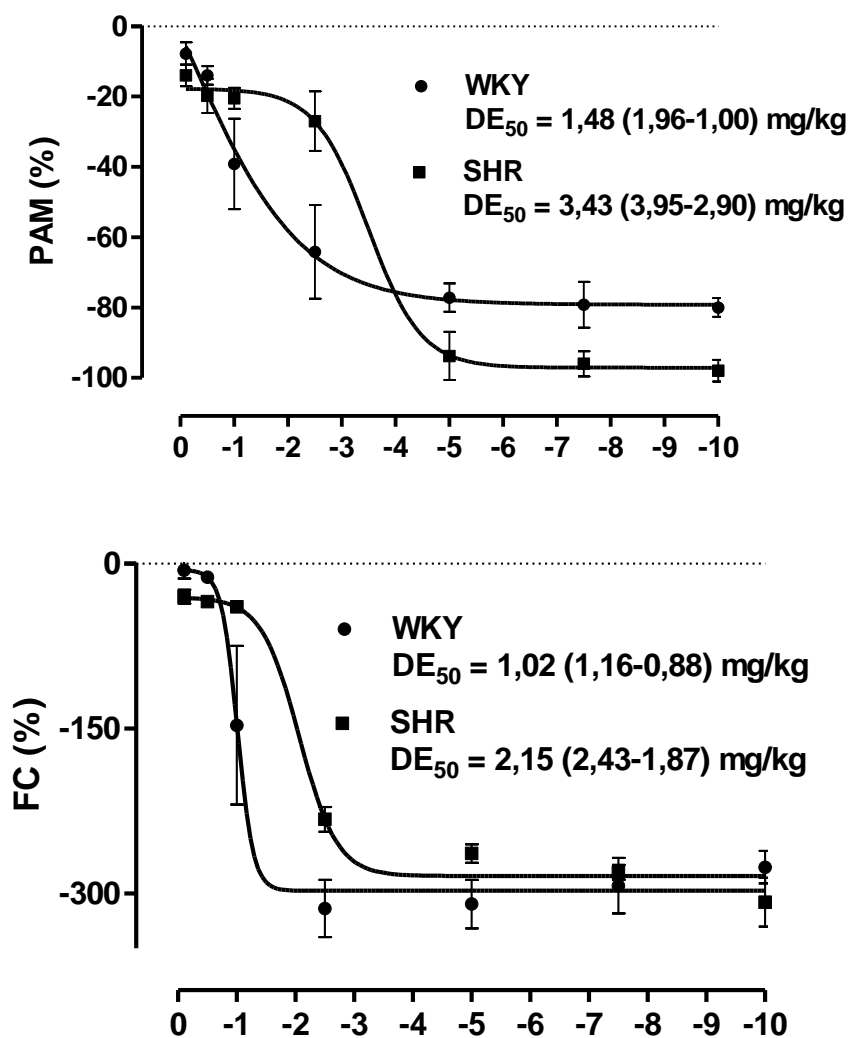


Gráfico 25: Efeitos do carvacrol sobre a Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) em ratos normotensos e hipertensos não anestesiados. Os pontos na figura representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m., os valores de DE_{50} estão expressos como média (95% de intervalo de confiança).

5.4.2 Influência dos canais potencial receptor transientes (TRP) sobre a resposta do carvacrol frente à pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) não-anestesiados.

Para avaliar a influência dos canais TRP nas respostas cardiovasculares do carvacrol em WKY e SHR, foi administrada uma dose de carvacrol de 5mg/kg como sendo a situação controle WKY (ΔPAM (%) = $-60,00 \pm 16,50$ mmHg e ΔFC = $-204,00 \pm 30,04$ bpm, N=6) e SHR (ΔPAM (%) = $-101,71 \pm 8,07$ mmHg e ΔFC = $-314,57 \pm 22,03$ bpm, N=7), dose essa que induz efeito máximo na resposta do carvacrol sobre PAM e FC. Após o registro da situação controle e o reestabelecimento dos parâmetros basais foi administrada uma dose de 3mg/kg do vermelho de rutênio, sendo este um inibidor dos TRPV4 (GAO, 2009). Após a adição do inibidor nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos, foi adicionado o carvacrol (5mg/kg) para avaliar a influencia dos canais TRP. Observou-se uma redução significativa nas respostas hipotensoras da PAM de WKY (ΔPAM (%) = $-29,60 \pm 2,76$; $-30,60 \pm 5,25$; $-34,33 \pm 7,88$; $-31,75 \pm 2,46$ mmHg, respectivamente) e SHR (ΔPAM (%) = $-57,71 \pm 8,07$; $-49,42 \pm 5,79$; $-41,42 \pm 5,24$; $-36,66 \pm 3,94$ mmHg, respectivamente) e bradicárdica da FC de WKY (ΔFC = $-34,00 \pm 5,14$; $-63,33 \pm 11,97$; $-52,00 \pm 31,00$; $-32,00 \pm 6,00$ bpm, respectivamente) e SHR (ΔFC = $-181,83 \pm 41,66$; $-133,83 \pm 42,66$; $-115,20 \pm 41,28$; $-57,25 \pm 22,81$ bpm, respectivamente) (Gráfico 26 e 27).

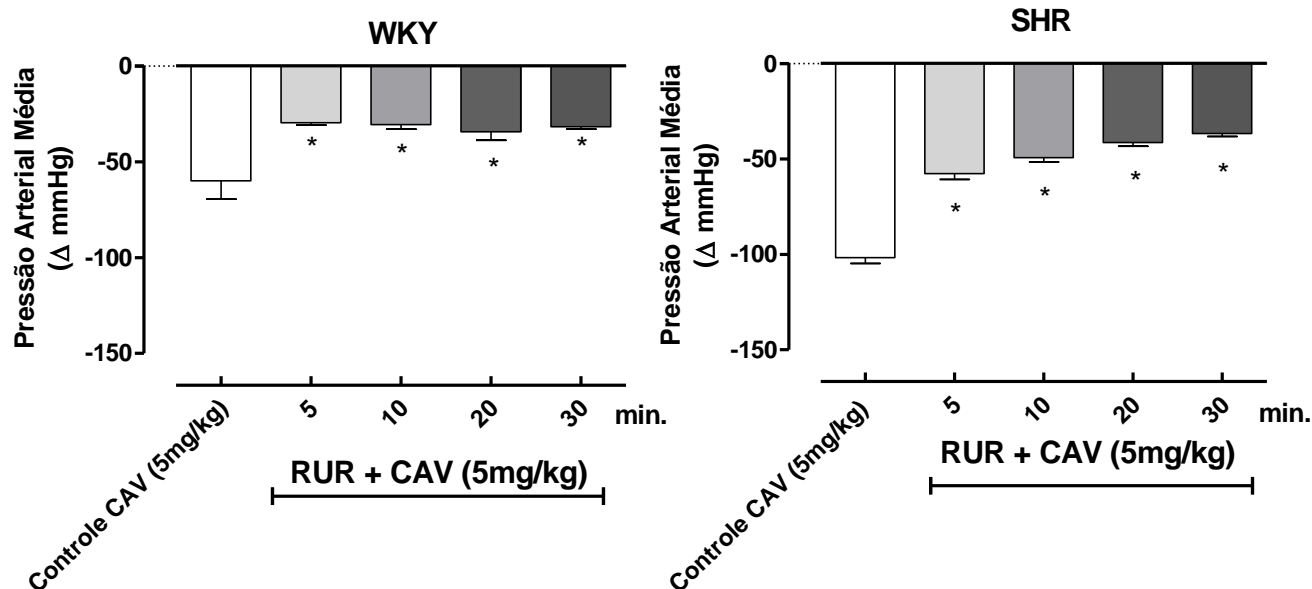


Gráfico 26: Inibição da hipotensão ocasionada pelo carvacrol na pressão arterial média, na presença do vermelho de rutênio, um bloqueador inespecífico dos canais TRP. * $P < 0,05$ vs carvacrol controle (antes do RuR). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. de 8 experimentos

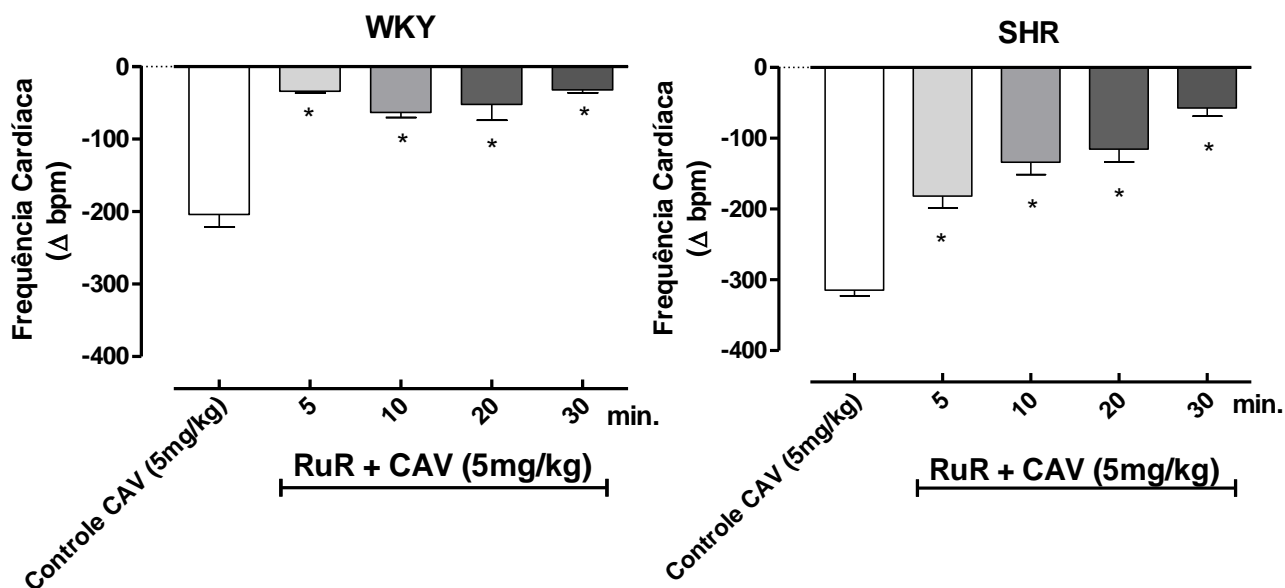


Gráfico 27: Inibição da bradicardia ocasionada pelo carvacrol na frequência cardíaca, na presença do vermelho de rutênio, um bloqueador inespecífico dos canais TRP. * $P < 0,05$ vs carvacrol controle (antes do RuR). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. de 8 experimentos

5.4.3 Influência dos canais potencial receptor transientes vanilóides tipo 1 (TRPV1) sobre a resposta do carvacrol frente a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) anestesiados.

Sabendo que a capsaicina é um agente picante nossos experimentos foram feitos com animais anestesiados e os valores basais da PAM e FC dos animais anestesiados com uretano (1,5g/kg i.p.) foram respectivamente de $101,83 \pm 5,73$ mmHg e $300,33 \pm 7,17$ bpm para SHR e $93,00 \pm 4,58$ mmHg e $305,50 \pm 19,42$ bpm, para WKY (Gráfico 28).

Para avaliar a influência dos canais TRP nas respostas cardiovasculares do carvacrol em WKY e SHR, foi administrada uma dose de carvacrol de 5mg/kg como sendo a situação controle WKY (ΔPAM (%) = $-37,00 \pm 4,43$ mmHg e ΔFC = $-164,00 \pm 58,10$ bpm) e SHR (ΔPAM (%) = $-38,25 \pm 3,56$ mmHg e ΔFC = $-184,50 \pm 39,09$ bpm), dose essa que induz efeito máximo na resposta do carvacrol sobre PAM e FC. Após o registro da situação controle e o reestabelecimento dos parâmetros basais foi administrado a capsaicina (30 μ g/kg), sendo este um ativador dos TRPV1 (LI, 2003; GAO, 2009). Após a adição do inibidor nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos, foi adicionado o carvacrol na mesma dose controle de 5mg/kg para avaliar a influencia dos canais TRPV1. E pode-se observar uma redução significativa nas respostas hipotensora da PAM de WKY (ΔPAM (%) = $-28,00 \pm 3,57$; $-30,20 \pm 4,02$; $-31,50 \pm 5,04$; $-29,80 \pm 4,09$ mmHg, respectivamente) e SHR (ΔPAM (%) = $-27,00 \pm 1,58$; $-31,40 \pm 1,98$; $-35,60 \pm 3,94$; $-39,20 \pm 2,37$ mmHg, respectivamente) e bradicárdica da FC de WKY (ΔFC = $-54,40 \pm 12,31$; $-58,40 \pm 11,65$; $-62,25 \pm 18,55$; $-49,00 \pm 7,29$ bpm, respectivamente) e SHR (ΔFC = $-63,40 \pm 4,93$; $-58,75 \pm 10,31$; $-54,75 \pm 9,54$; $-56,66 \pm 4,70$ bpm, respectivamente) (Gráfico 29 e 30).

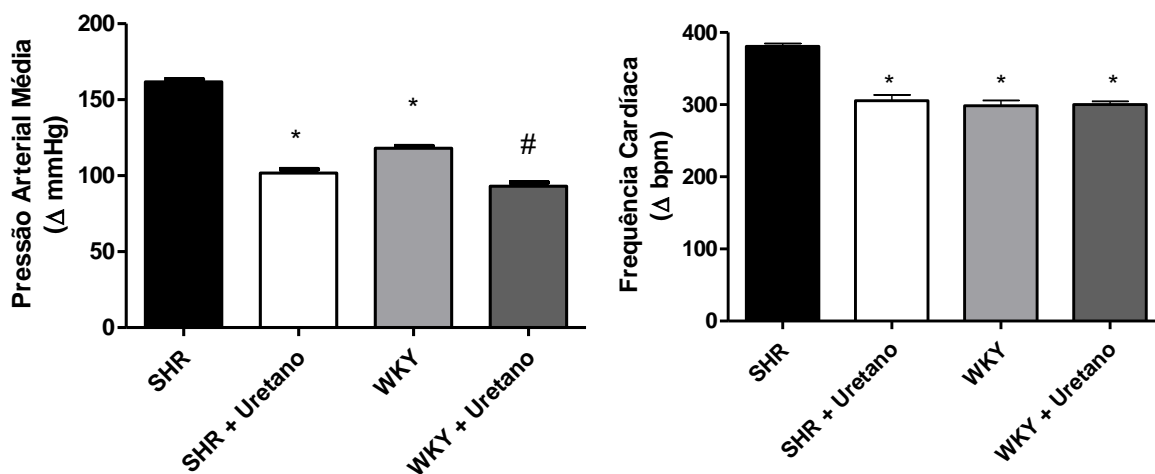


Gráfico 28. Valores médios basais da PAM e FC de ratos normotensos e hipertensos.

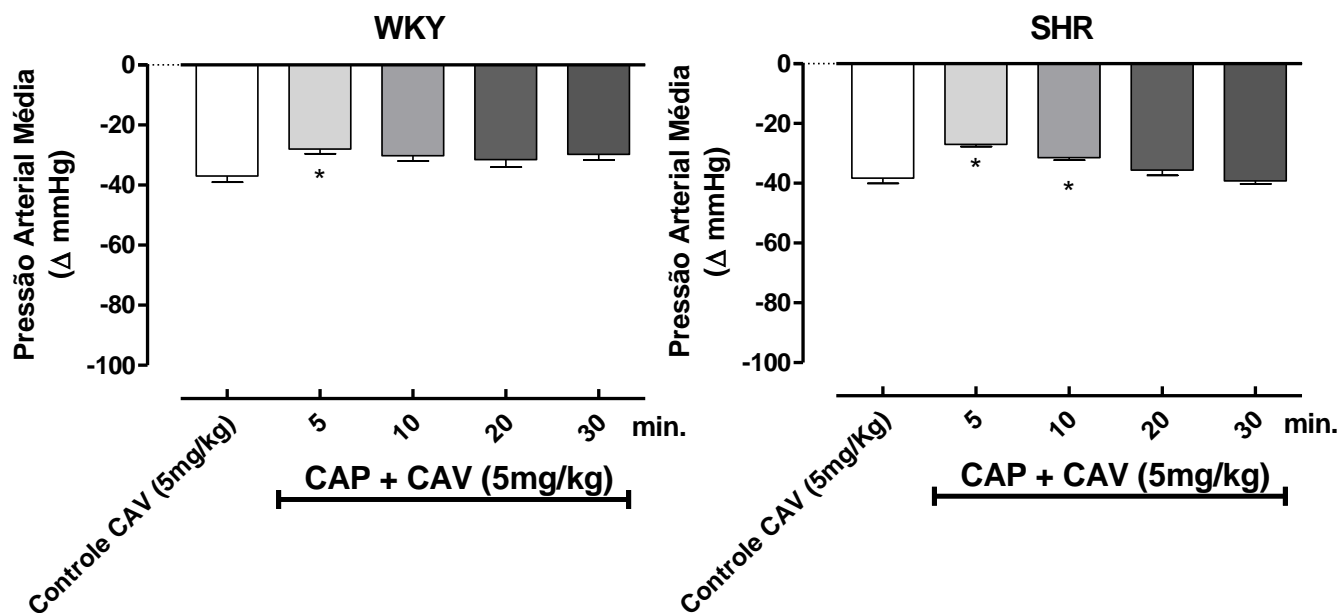


Gráfico 29: Inibição da hipotensão ocasionada pelo carvacrol na pressão arterial média, na presença da capsaicina, um ativador dos canais TRPV1. * $P < 0,05$ vs carvacrol controle (antes da CAP). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. de 7 experimentos

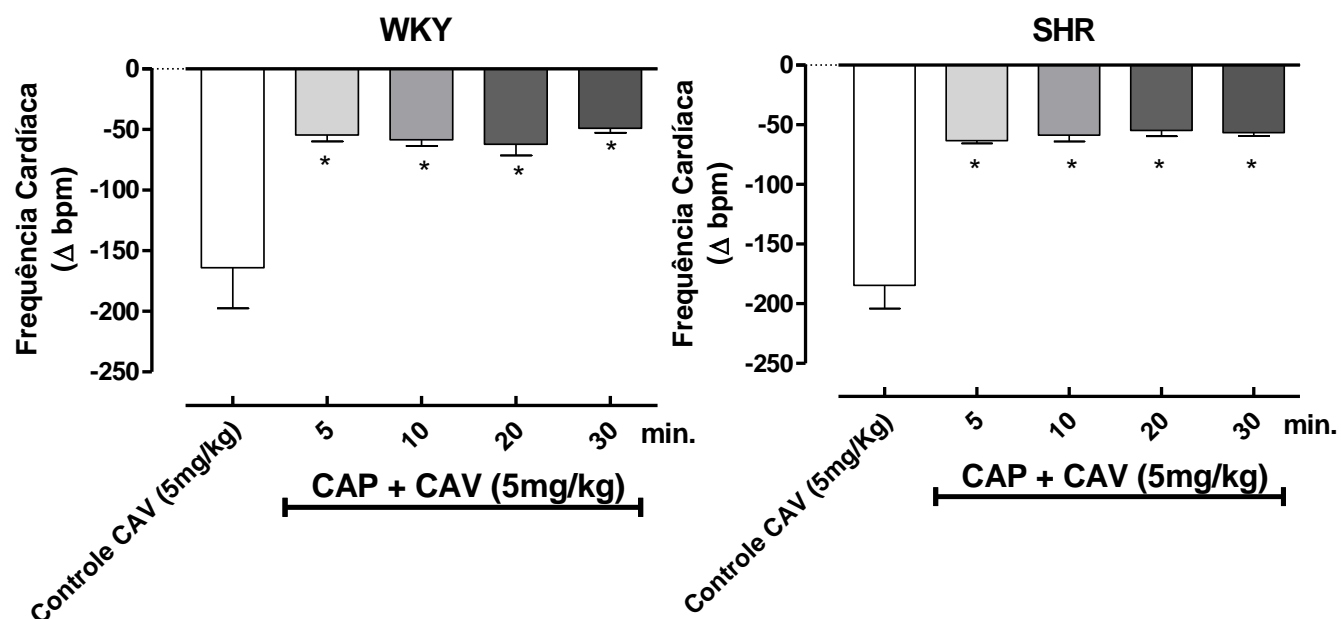


Figura 30: Inibição da bradicardia ocasionada pelo carvacrol na frequência cardíaca, na presença da capsaicina, um ativador dos canais TRPV1. * $P < 0,05$ vs carvacrol controle (antes da CAP). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. de 7 experimentos.

Discussão

6. Discussão

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o envolvimento dos canais TRP na hipertensão, de correlacionar a expressão desses canais com as alterações na pressão sanguínea e de avaliar os efeitos do carvacrol sobre os canais TRP no sistema cardiovascular e sua influência sobre o estado hipertensivo. E na tentativa de elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos, utilizamos abordagens *in vitro* – com anéis de aorta de ratos normotensos (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR) e miócitos vasculares de aorta, *in vivo* – com medidas diretas de pressão arterial e frequência cardíaca em WKY e SHR não anestesiados e ensaios moleculares – com miócitos vasculares de aorta de WKY e SHR.

As principais constatações foram primeiramente a confirmação da inibição do influxo de cálcio pelo carvacrol sobre os Ca_v tipo-L em ensaios eletrofisiológicos com miócitos de aorta. Em seguida, avaliamos a expressão dos canais TRP de animais hipertensos em comparação com seus controles normotensos e observamos uma diminuição da expressão dos canais TRPV1, TRPV4, TRPM7 e TRPM8 e um aumento da expressão do TRPC1 em miócitos de aorta dos SHR. Em abordagens *in vitro* com anéis de aorta observamos uma atividade vasorelaxante tanto em WKY como em SHR, efeito esse envolvendo provavelmente os canais TRPV1, TRPV4, TRPM8, TRPM7 e TRPC1 em SHR. Em adição, obtivemos uma atividade hipotensora e bradicárdica em WKY e SHR e a participação provavelmente do TRPV1 e TRPV4 nessas respostas, sendo estes resultados extremamente interessantes no âmbito dos estudos com monoterpenoides.

Existem várias evidências na literatura que monoterpenos, inclusive o carvacrol objeto de estudo do nosso trabalho, em experimentos com tecidos vasculares, alterem a mobilização de Ca^{2+} nas células musculares lisas (DANTAS et al., 2015; SILVA, 2011; ARAÚJO, 2011; PEIXOTO-NEVES et al., 2009; BASTOS et al., 2009; RIBEIRO, 2008; GUEDES et al., 2002).

Além disso, há indícios de que a contração induzida por solução despolarizante com alta concentração de K^+ é mediada principalmente por influxo de Ca^{2+} por Ca_v ,

efeito este visto em um trabalho recente do nosso grupo de pesquisa (GODFRAIND; MILLER; WIBO, 1986; SOMLYO; SOMLYO, 1994; BRIGGS, 1962; NELSON et al., 1988; DANTAS, 2010), onde também investigamos o subtipo de Ca_v envolvido no efeito vasorelaxante e observamos que contrações tônicas induzidas por S(-)-Bay K 8644 (agonista dos Ca_v 1 (tipo-L)), foram inibidas por carvacrol, sugerindo sua participação no efeito vasorelaxante em anéis de artéria mesentérica.

Para melhor elucidar e confirmar as hipóteses da ação do carvacrol sobre os canais de cálcio sensíveis a voltagem e sua inibição no influxo de cálcio por Ca_v 1 (tipo-L), foi realizado um experimento com ensaios eletrofisiológicos utilizando miócitos recém dispersos de aorta de rato normotenso, utilizando a técnica de *patch clamp* na configuração *whole cell – voltage clamp*, método importante e capaz de investigar o efeito do carvacrol sobre os canais iônicos na membrana celular. Nos ensaios eletrofisiológicos foram avaliadas as correntes de entrada de Ba^{2+} através dos canais para Ca^{2+} , que apresentam características típicas de correntes sensíveis à voltagem do tipo-L. Nestes experimentos foi constatado que o carvacrol (300 μ M) inibiu significativamente a amplitude das correntes de bário (I_{Ba}), confirmando e corroborando com os nossos estudos anteriores com artéria mesentérica (DANTAS et al., 2015), que o carvacrol age por inibição do influxo de cálcio via canais Ca_v do tipo-L, com consequente diminuição da $[Ca^{2+}]_i$.

Além dos Ca_v , que possuem funções bem estabelecidas, os canais TRP são canais catiônicos permeáveis ao cálcio, sendo os únicos que respondem a estímulos variados e estão associados a diversas funções fisiológicas (LEDOUX et al., 2006; CLAPHAM et al., 2005). Vale salientar que até então, foram detectados mais de 10 membros distintos da superfamília dos canais TRP nas células musculares lisas vasculares, em especial em aorta de rato normotenso, como por exemplo, os TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV6, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM6, TRPM7, TRPM8. Já os TRPC são onipresentes (*Ubiquitously*), onde a expressão de $TRPC1 > TRPC6 > TRPC3 > TRPC4 \approx TRPC5$ (KARK, 2008; WATANABE, et al. 2008; YANG, 2006; INOUE, et al., 2006; WANG, 2008; EARLEY; GONZALES; CRNICH, 2009; ZEBGER-GONG, 2011; NAYLOR, 2010; JOHNSON, 2009; PENG, 2010; JARDIN, 2013; TÓTH, 2014).

O papel dos canais TRP na patogenia da hipertensão essencial tem uma correlação funcional entre sua expressão com as alterações na pressão sanguínea, tornando-os potenciais alvos terapêuticos para o controle da vasoconstrição e proliferação das células musculares lisas vasculares (LIU, 2005; FIRTH; REMILARD; YAN, 2007; GAO, 2009; YOGI, 2011).

Diante do exposto acima, avaliamos pela primeira vez, a expressão dos canais TRP em miócitos vasculares de aorta de rato espontaneamente hipertenso comparado com o seu controle normotenso. Primeiramente avaliamos a expressão do TRPV1, que é um canal TRP da família dos vanilóides, descrito por promover hipotensão quando ativado (Li et al, 2003), foi recentemente descrito em alguns leitos vasculares (TÔTH, 2014) apresentando níveis de expressão diferenciados. Nos nossos estudos observamos surpreendentemente que houve uma diminuição da expressão do TRPV1 em SHR quando comparado com seu controle normotenso. Na sequência verificamos a expressão do TRPV3, canal descrito por ser ativado pelo carvacrol em células endoteliais (EARLEY, GONZALES, GARCIA, 2010) e notamos nos nossos experimentos que não houve alteração da expressão do SHR quando comparado com o WKY. Quando comparamos a expressão do TRPV4, canal descrito estar bastante expresso em aorta (YANG et al., 2006) e por promover um efeito depressor da pressão arterial quando ativado (GAO et al., 2009), observamos uma diminuição da sua expressão nos animais hipertensos quando comparados com seus controles normotensos, podendo essa diminuição ser uma das causas do aumento da pressão arterial visto que na CMLV o TRPV4 quando ativado, aumenta o cálcio intracelular, ativa canais de Rianodina que forma “spark” de cálcio que promove a abertura dos canais de potássio de grande condutância (BKca) hiperpolarizando a célula, consequentemente fechando os canais de cálcio sensíveis a voltagem.

Outro canal TRP avaliado, foi o TRPM8 por ser descrito ter alta expressão em aorta de rato (YANG et al., 2006) e também por ser um canal que exerce um papel fundamental na regulação do tônus vascular, permitindo o influxo de cálcio na membrana e liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (JOHNSON et al., 2009). Quanto a sua expressão notamos que houve, uma diminuição nos SHR quando comparados com o WKY, podendo essa diferença de expressão ser uma das possíveis

causas do aumento da PA por uma desregulação do tônus vascular. Estudamos também o canal TRPM7, que age como um canal de íon e também atua como uma cinase e desempenha um papel fundamental na homeostase, modulando $[Mg^{2+}]_i$ e regulando a sinalização na célula muscular lisa vascular (YOGI, 2011), é um canal que ao ser ativado inibe os canais de cálcio sensíveis à voltagem e canais de rianodina, levando há uma diminuição do cálcio intracelular, na literatura vem sendo estudado como um canal modulado pelo carvacrol (PARNAS et al., 2009; MACIANSKIENE et al., 2012; DANTAS et al., 2015), diante disso avaliamos sua expressão e interessantemente observou-se uma diminuição em SHR quando comparados com WKY, podendo essa diminuição da expressão ser uma das possíveis causas para o aumento da pressão arterial. Corroborando com estudos anteriores, que demonstraram que tanto a diminuição da expressão (TOUYZ, 2006) como um defeito no canal (YOGI, 2011) TRPM7, leva a um remodelamento vascular e aumento da pressão arterial.

Já os canais ditos como TRP clássicos (TRPC), investigamos a expressão do canal TRPC1, que é postulado como um canal de cálcio operado por estoque (SOC) e foi descrito ser inibido pelo carvacrol (DANTAS et al., 2015), além da sua importância na contratilidade vascular (CHEN, 2010; NOORANI, 2011, KOCHUKOV, 2012, ADEBIYI, 2012). E interessantemente observamos que houve um aumento na expressão de SHR quando comparado com o seu controle WKY, podendo esse aumento na expressão ser uma das causas do aumento da pressão arterial, por um aumento na contratilidade vascular.

Esses resultados nos mostram que há diferenças de expressão de alguns canais TRP em miócitos de aorta de SHR com relação ao WKY, podendo essas diferenças na expressão estar influenciando no aumento da pressão sanguínea na hipertensão. Levando-nos a questionar se essas alterações geram o estado hipertensivo ou a hipertensão que altera a expressão desses canais. Em um estudo de Liu e colaboradores (2009), foi avaliado esse questionamento e observado a expressão do canal TRPC3 em WKY, SHR pré-hipertenso ou jovem e SHR adulto e surpreendentemente, constataram que apenas o SHR adulto, a expressão do canal TRPC3 estava aumentada, levando a um aumento da pressão arterial e do influxo de cálcio.

Poucos são os estudos que 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 colaboradores (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 ratos Wistar. Em adição Earley e colaboradores (2010) avaliaram a atividade vasorelaxante na camada endotelial por ativar o canal TRPV3 em artéria cerebral e cerebelar. Em estudos eletrofisiológicos em cardiomiócitos humanos (MACIANSKIENE et al., 2012) foi observado o carvacrol inibindo as correntes do canal TRPM7. E recentemente em nossos estudos (DANTAS, 2010) demonstramos que, o carvacrol promoveu um efeito hipotensor e bradicárdico em ratos normotensos não-anestesiados, podendo estar agindo diretamente no coração pelo inotropismo e cronotropismo negativo no átrio isolado, também inibiu as correntes de bário em miócitos de artéria mesentérica, comprovando o envolvimento dos canais da cálcio sensíveis a voltagem e promoveu vasorelaxamento em artéria mesentérica, por inibição do influxo de cálcio por canais de cálcio sensíveis a voltagem (Cav) do tipo-L, canais operados por receptor/TRPC6, canais operados por estoques/TRPC1 além de agir sobre os canais TRPM7 (Figura 4) (DANTAS et al., 2015).

Diante dessas premissas, nos sentimos motivados em investigar e comparar em detalhes a ação vasorelaxante do carvacrol em animais hipertensos e seu controle normotenso e a participação dos canais TRP nessa patologia.

No presente estudo observamos que carvacrol promoveu um efeito vasorelaxante de maneira dependente de concentração em anéis de SHR e WKY pré-contraídos com FEN um agonista α -adrenérgico, na presença e na ausência do endotélio vascular.

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 vasoconstrictores e 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 aorta de rato WKY e SHR, 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, nem na potência farmacológica, levando-nos a sugerir que mediadores vasoativos liberados pelo endotélio vascular parecem não influenciar o efeito vasorelaxante induzido por carvacrol. Quando esses resultados foram comparados entre as linhagens hipertensas e normotensas não houve diferenças significantes entre elas. Estes dados estão em concordância com a literatura mostrando que a contratilidade de aorta isolada de animais SHR não difere de seus controles normotensos (SAFAR et al., 2001). A partir destes resultados investigamos os mecanismos de ação independente do endotélio vascular utilizado por carvacrol para induzir vasorelaxamento.

Dentro desse contexto, avaliamos se o efeito induzido pelo carvacrol era dependente de tônus vascular. Para tanto fizemos experimentos onde foram adicionadas ao tônus basal concentrações crescentes de carvacrol e, semelhantemente ao que foi visto em anéis mesentéricos de ratos Wistar (DANTAS, 2010), o tônus basal não foi alterado.

Para descartar a hipótese de que os efeitos mediados por carvacrol não estavam relacionados a um possível efeito tóxico, ao final de todos os experimentos o carvacrol foi removido do banho e uma nova contração com fenilefrina foi induzida. E pode-se constatar total reversão da contração induzida por fenilefrina, mostrando que o monoterpene não promoveu dano a maquinaria contrátil vascular.

Diante dos resultados iniciais, onde o carvacrol atua sobre canais de $Ca_v 1$ (tipo-L), fomos avaliar outra via de entrada de cálcio na célula, investigando quais os prováveis canais TRP que poderiam participar no efeito vasorelaxante induzido pelo carvacrol. Para tanto, utilizamos alguns bloqueadores e ativadores de canais TRP. 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 os canais TRPL (TRP-like) (PARNAS et al., 2009) como também agir em TRPM7 (PARNAS et al., 2009; DANTAS et al., 2015; MACIANSKIENE et al., 2012).

Diante do exposto realizamos um protocolo no qual utilizamos vermelho de rutênio que é um bloqueador não-seletivo dos canais TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1 e TRPM6 (CLAPHAM et al., 2005). Nestas condições, o efeito vasorelaxante induzido pelo monoterpeno não foi alterado em WKY, mas em SHR interessante, observamos que o efeito relaxante do carvacrol foi atenuado significativamente, com alteração na sua eficácia e potência farmacológica. Quando esses resultados foram comparados entre as linhagens hipertensa e normotensa, houve uma menor potência farmacológica em SHR. Sugerindo que o monoterpeno pode estar agindo nos canais TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1 e/ou TRPM6 em SHR, entretanto quando comparado esses resultados com os experimentos de expressão em RT-PCR, observamos que a expressão do TRPV1 e TRPV4 está diminuída em SHR, podendo essa diminuição na expressão, estar influenciando numa menor potência farmacológica do vasorelaxamento em SHR, entretanto o canal TRPV1 é um canal que leva há um aumento da contração da CMLV e TRPV4 leva há um vasorelaxamento, sugerindo assim que essa menor potência em SHR pode estar sendo influenciada pelo TRPV4, já que a expressão do TRPV2, TRPA1 e TRPM6 não foram avaliadas, não podemos sugerir a participação desses canais nas respostas observadas.

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 TRPM6 e TRPM7 (CLAPHAM, et al, 2005; MACIANSKIENE et al., 2012; BALDOLI, et al, 2013). Nesta condição, o efeito relaxante de carvacrol foi atenuado significativamente, com alteração na sua eficácia e potência farmacológica, tanto em animais WKY como em animais SHR, sugerindo que o monoterpeno pode estar agindo bloqueando canais TRPM7 para induzir o vasorelaxamento, já que ao usar o vermelho de rutênio não houve diferença na resposta vasorelaxante em animais WKY comparados com o controle, diferentemente do que

aconteceu ao adicionar o magnésio ao banho, sugerindo que o TRPM6 pode não estar participando na resposta vasorelaxante do carvacrol. Mas, quando comparamos WKY com SHR observamos que não há diferença entre eles, com exceção da concentração de 10^{-4}M que apresentou uma eficácia menor em SHR, sugerindo uma correlação com a diminuição da expressão do TRPM7 em SHR.

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 agir sobre os canais TRPM7 em aorta de rato, corroborando com dados na literatura que mostram que o carvacrol atua sobre TRPM7 em mamíferos (PARNAS et al., 2009; DANTAS et al., 2015; MACIANSKIENE et al., 2012).

Após avaliar o efeito do magnésio, utilizamos o 2-APB que é uma ferramenta farmacológica que age sobre canais TRP de forma não seletiva, sendo um ativador do TRPV1, TRPV3 e TRPM6 (HINMAN, 2006, BALDOLI, 2013) e inibidor do TRPM7, TRPM8 e TRPC1 (GUILBERT, 2009; MACIANSKIENE, 2012; EL HIANI, 2009; SELESCU, 2013) e interessante, observamos que o efeito do carvacrol nessas condições foi potencializado e sua eficácia diminuída, sugerindo que carvacrol deve estar induzindo a ativação de subtipos de canais TRP sensíveis ao 2-APB que levem a entrada de Ca^{2+} na célula muscular, como o TRPC1 que ao ser ativado promove o aumento do cálcio intracelular, favorecendo o estado contrátil do tecido vascular e desta forma prejudicando o relaxamento induzido por carvacrol, com a presença do 2-APB, bloqueando o canal, há uma potencialização do efeito vasorelaxante, sendo mais pronunciado em animais SHR, provavelmente pelo aumento na expressão do TRPC1. Adicionalmente, observamos que a sua eficácia foi diminuída, podendo sugerir que, há

uma participação na resposta dos canais TRPM7 e TRPM8, pois são canais que levam há um vasorelaxamento quando ativados e o que observamos ao bloquear esses canais com 2-APB, foi um efeito máximo prejudicado, outro fator que pode estar levando a essa menor eficácia é a ativação do canal TRPV1 que é descrito ser um canal que leva há uma contração quando ativado (FIRTH, 2007). Quando comparamos os animais hipertensos com seus controles normotensos, observamos uma diferença significativa na sua eficácia e potencia farmacológica, podendo ser influenciada pelas alterações de expressão de alguns canais TRP e no nosso trabalho, observamos diminuição na expressão do TRPV1, TRPM7 e TRPM8 e aumento do TRPC1 em SHR.

O TRPM8 exerce papel fundamental na regulação do tônus vascular e assim como os demais canais TRP é um alvo para monoterpeno (JOHNSON et al., 2009). Assim fomos investigar a participação do TRPM8 no efeito vasorelaxante do carvacrol, para isso utilizamos como bloqueador de TRPM8 a capsazepina que é também um bloqueador do TRPV1. Há uma grande similaridade estrutural entre os canais TRPV1 e TRPM8. Por isso, embora haja algumas substâncias descritas como antagonistas de canais TRPV ou mais seletivo para V1, esses podem interagir também com os canais TRPM8. Isso já foi observado para vários bloqueadores, antes descritos como seletivos para TRPV1 e que posteriormente descobriu-se serem bloqueadores de canais TRPM8. Como exemplo, podemos citar BCTC e Capsazepina (CPZ) (XING, 2007; MALKIA, 2009; BEHRENDT 2004, VRIENS 2009) e o que diferencia essa seletividade entre eles é a sua afinidade de antagonismo maior por um ou por outro. Behrendt e colaboradores (2004) observaram em seu estudo que o BCTC e CPZ tinham uma maior potência antagonista para os canais TRPV1 do que para canais TRPM8, nesse mesmo estudo observaram que a seletividade antagonista do BCTC era maior do que o da capsazepina para os canais TRPM8 ($BCTC > CPZ = TRPM8$).

Nos nossos estudos quando utilizamos a capsazepina o que observamos foi uma potencialização da resposta vasorelaxante tanto em animais SHR como em seus controles WKY, sugerindo que o carvacrol pode estar atuando nos canais TRPM8 e/ou TRPV1. Entretanto, a CPZ inibe ou antagoniza com uma potencia maior o TRPV1 do que o TRPM8, provavelmente sendo uma das causas dessa potencialização tanto na eficácia como na potencia farmacológica, já que o TRPV1 é descrito levar a um estado

contrátil do vaso diferentemente do TRPM8 que promove um vasorelaxamento. Mas, quando observamos os efeitos relaxantes de SHR e WKY na presença da capsazepina o que percebemos é uma diminuição da potência em animais SHR, resultado esse interessante, porque quando comparamos esse efeito com a expressão do TRPM8 e TRPV1, ambos estão com a expressão diminuída em animais SHR, podendo essa ser uma das razões dessa diminuição na potência farmacológica em animais hipertensos.

Após a obtenção desses dados avaliamos a participação dos canais TRPV1 e TRPM8 na presença do BCTC 300nM e observamos que o efeito do carvacrol, nessas condições foi potencializado na sua eficácia nas três últimas doses, entretanto menor do que na presença da CPZ, sugerindo que esse efeito é devido há um maior antagonismo sobre o TRPM8 pelo BCTC, diferentemente com o que acontece com a CPZ, que tem uma menor potencia antagonista sobre o TRPM8 (BCTC > CPZ). Além disso, o BCTC também antagoniza o TRPV1, por isso um maior efeito vasorelaxante na presença do BCTC, visto que o TRPV1 leva a contração da CMLV. Esses resultados corroboram com os resultados observados com a capsazepina, entretanto devido há uma maior seletividade pelo TRPV1 da CPZ, o efeito mais pronunciado é uma potencialização do vasorelaxamento, sendo esse efeito atenuado na presença do BCTC devido há uma maior seletividade pelo TRPM8.

Diante do exposto e para avaliar melhor a participação do canal TRPV1 na resposta vasorelaxante do carvacrol, optamos por efetuar a dessensibilização do canal TRPV1 por depleção do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina presentes nas terminações nervosas do nervo sensorial perivascular, para isso utilizamos um agonista clássico, substância de origem vanilóide denominada de capsaicina (GAO e WANG, 2010; HOPPS et al., 2009; INOUE et al., 2006; DANNERT et al., 2007). A dessensibilização de canais TRPV1 ocorre após exposição prolongada à capsaicina e caracteriza-se pela diminuição da atividade do canal. Em nosso estudo o que observamos foi um efeito vasorelaxante do carvacrol significativamente atenuado após a dessensibilização com 10^{-5} M de capsaicina, indicando que carvacrol parece estar ativando TRPV1 nas terminações nervosas sensoriais perivasculars próximas às células musculares lisas para promover a resposta vasorelaxante em animais SHR e WKY. Entretanto quando comparamos a resposta de SHR e WKY frente à

dessensibilização com a capsaicina, percebe-se uma acentuada atenuação da resposta em animais WKY, sugerindo assim que esse efeito deve ser pela diferença de expressão, dos receptores do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRPR), onde esse receptor está mais expresso em SHR (LI, KAMINSKI, WANG, 2003), promovendo assim uma menor atenuação da resposta.

Vale ressaltar que em um estudo de GAO e colaboradores (2010), eles avaliaram no nervo sensorial perivascular a co-expressão do TRPV4 e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e observaram que o TRPV4 participava da liberação do CGRP levando há um vasorelaxamento, semelhante ao que acontece com o TRPV1, nesse mesmo estudo o TRPV1 foi dessensibilizado com um pré-tratamento neonatal com a capsaicina e constatou-se que, houve um aumento da liberação do CGRP pelo TRPV4, entretanto com uma hipotensão menor do que com os animais sem o tratamento. Diante do exposto podemos sugerir que o carvacrol ao ser adicionado ao banho tem seu efeito máximo ou eficácia diminuída devido a dessensibilização do TRPV1, mas em contraponto tem uma potencia farmacológica maior quando comparada ao controle, provavelmente pela participação do TRPV4 presente no nervo sensorial perivascular que leva há um vasorelaxamento por liberação do CGRP, sendo esse efeito maior em SHR, muito provavelmente pela maior expressão dos receptores do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRPR) (LI, KAMINSKI, WANG, 2003).

Portanto, os nossos dados até o presente momento sugerem que carvacrol pode ter ação sobre os canais TRP em aorta de rato, provavelmente sobre TRPV1, TRPV4, TRPM7, TRPM8 e TRPC1.

No entanto, serão necessários estudos adicionais para confirmar as hipóteses sugeridas 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 inédito, 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 poderiam refletir numa alteração hemodinâmica, estudos *in vivo* foram realizados com WKY e SHR não anestesiados. Nesta condição experimental, observamos que a administração endovenosa do carvacrol promoveu um efeito hipotensor, provavelmente relacionado à vasodilatação que este composto pode induzir por uma diminuição da resistência vascular periférica total. Além disso, a administração endovenosa do carvacrol induziu um efeito bradicárdico, sugerindo uma ação direta sobre o coração, como foi observado em ratos *wistar* (DANTAS et al., 2015), em experimentos com átrio isolado observamos uma diminuição da força de contração (inotropismo negativo) e uma diminuição na frequência cardíaca (cronotropismo negativo) 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 Macianskiene e colaboradores (2012), foi demonstrado o carvacrol agindo sobre os canais TRPM7, podendo esta via de sinalização estar envolvida na resposta bradicárdica induzida por carvacrol, porém estudos adicionais devem 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, tanto

em animais WKY como em SHR, 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 de extrema importância para se obter um perfil mais amplo do efeito sistêmico induzido por uma droga, já que todos os sistemas regulatórios estão presentes. Além disso, o nosso trabalho é inédito, porque a literatura não contempla estudos investigando as ações do carvacrol em animais geneticamente hipertensos. Em nosso trabalho foi comparado o efeito do carvacrol em animais normotensos e hipertensos e como resultado observamos uma hipotensão e bradicardia tanto em animais hipertensos como em normotensos. Interessantemente, as curvas dose resposta para o carvacrol, em animais hipertensos, foram deslocadas para a direita sem alteração no efeito máximo, mostrando uma menor sensibilidade para a resposta induzida pelo carvacrol nesses animais. Esses achados podem ser indicativos de que a hipotensão induzida pelo carvacrol pode ser devido à bradicardia que leva a diminuição do débito cardíaco e em parte devido à vasodilatação periférica que culmina com a diminuição da RVPT.

Sabendo que carvacrol perifericamente promove seu efeito relaxante por agir em canais TRP e a literatura vem mostrando a influência e a presença de canais TRP no coração. Investigamos a participação desses canais no efeito hipotensor e bradicárdico do carvacrol nos animais hipertensos e normotensos.

Para isso realizamos um protocolo no qual utilizamos vermelho de rutênio que é um bloqueador não-seletivo dos canais TRPV (CLAPHAM et al., 2005). E observamos que após o uso do bloqueador vermelho de rutênio houve uma diminuição do efeito hipotensor e bradicárdico promovido pelo carvacrol tanto em animais WKY como em SHR. Em adição foi observado que em animais SHR houve um tempo maior para promover a inibição semelhante ao WKY. Sugerindo que algo está influenciando essa diferença na inibição em animais SHR. Em um recente trabalho de Gao e colaboradores (2009), eles avaliaram *in vivo* a ação do TRPV4 agindo na hipotensão e nesse estudo eles descartaram a ação antagonista do vermelho de rutênio sobre os canais TRPV1, sugerindo que o vermelho de rutênio estava agindo na concentração de 3 mg/kg sobre os canais TRPV4. O canal TRPV4 é descrito na literatura agindo promovendo um vasorelaxamento (FILOSA, 2013; BAYLIE, BRAYDEN, 2011). No

musculo liso foi observado que existe um complexo de sinalização de Ca^{2+} envolvendo TRPV4, receptores de rianodina e canais BK_{ca} levando ao vasorelaxamento pelo fechamento dos Cav (EARLEY et al., 2005), já na camada endotélial quando o TRPV4 é ativado ele pode regular a pressão arterial, ativando uma variedade de mecanismos vasodilatadores, tais como o óxido nítrico (NO), prostaglandinas I2 (PGI2) e canais de potássio ativados por cálcio de intermediária e pequena condutância (IKCa / SKCa) que medeiam a liberação dos fatores relaxantes derivados do endotélio (EDHF) (BAYLIE e BRAYDEN, 2011; EARLEY e BRAYDEN, 2010), já no nervo sensorial perivascular o TRPV4 pode levar há um aumento do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e a um vasorelaxamento. Diante dessas premissas e sabendo que a expressão do TRPV4 esta diminuída em miócitos de aorta em animais SHR, essa pode ser uma das razões da menor hipotensão em animais hipertensos. Já o efeito bradicárdico deve ser melhor investigado, avaliando se essa diminuição da bradicardia é por influencia da diminuição na pressão arterial ou por ação do carvacrol sobre os cardiomiócitos.

Em seguida avaliamos a participação do TRPV1, coma utilização de um ativador a capsaicina. Nesses experimentos utilizamos os animais anestesiados, porque a capsaicina é um agente picante e a anestesia foi necessária para amenizar a dor. O que observamos quando comparamos o efeito controle de 5mg/kg de carvacrol, na presença da capsaicina foi uma diminuição do efeito hipotensor tanto em animais WKY como em SHR. O mesmo pôde-se observar na frequência cardíaca onde houve uma drástica redução do efeito bradicárdico do carvacrol na presença da capsaicina, tanto em animais hipertensos como em seus controles. Efeito esse podendo ser influenciado, pelo menos em parte, via ativação do TRPV1 e talvez uma dessensibilização do canal, inibindo assim o efeito hipotensor e bradicárdico do carvacrol ou mesmo uma ação direta no coração em possíveis canais TRPV1 em cardiomiócitos, inibindo a bradicardia. Essas são hipóteses que precisam ser mais bem investigadas. Devido a grande gama de canais existentes nos vasos e no organismo como um todo, entretanto esses dados são promissores em se tratando de estudos in vivo com canais TRP.

Por fim, esses resultados em conjunto sugerem que carvacrol induz efeito vasorelaxante em anéis de aorta de rato SHR e WKY provavelmente por inibir o influxo de cálcio por $\text{Ca}_v 1$ (tipo-L), como também por agir sobre os canais TRPV1, TRPV4,

TRPM7, TRPM8 e TRPC1 em SHR. O efeito vasorelaxante observado pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo efeito hipotensor observado nos experimentos *in vivo*, podendo ser sugerido uma ação sobre TRPV4 e TRPV1. Além disso, carvacrol apresenta atividade bradicárdica, no entanto, serão necessários estudos adicionais para avaliar a influência de carvacrol sobre esta atividade cardíaca nos animais hipertensos e normotensos.

Desta forma esses resultados se mostram promissores e interessantes no que diz respeito a estudos sobre o sistema cardiovascular envolvendo os canais TRP na hipertensão. Correlacionando a sua expressão com alterações na pressão sanguínea e mostrando o efeito do carvacrol sobre esses canais, uma vez que se presta uma grande contribuição à farmacologia, esperando que esses resultados possam trazer acréscimo de informações importantes para os estudos no sistema cardiovascular em especial sobre o estado hipertensivo.

Conclusões

7. Conclusões

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

- O RNAm dos canais TRPV1, TRPV3, TRPV4, TRPM7, TRPM8 e TRPV1 estão expressas em miócitos vasculares de aorta de rato WKY e que as expressões de TRPV1, TRPV4, TRPM7 e TRPM8 estão diminuídas e TRPC1 esta aumentada em animais SHR.
- Carvacrol inibiu o influxo de cálcio por canais de cálcio sensíveis a voltagem em miócitos vasculares de aorta;
- Carvacrol promoveu um efeito vasorelaxante de maneira dependente de concentração em anéis de aorta de rato WKY e SHR e esse efeito ocorreu de maneira independente do endotélio vascular;
- Carvacrol parece atuar promovendo o vasorelaxamento em aorta de rato por agir sobre os canais TRPV1, TRPV4, TRPM7, TRPM8 e TRPC1;
- O carvacrol promoveu hipotensão e bradicardia em ratos normotensos e hipertensos não anestesiados.
- O efeito hipotensor do carvacrol sobre a pressão arterial pode ser provavelmente por ação sobre os canais TRPV1 e TRPV4.

Perspectivas

8. Perspectivas

- Avaliar o efeito do carvacrol sobre as correntes iônicas através dos canais TRPs em miócitos de células musculares lisas isolados de aorta de animais SHR, utilizando técnica de “patch clamp”;
- Analisar os efeitos do carvacrol na entrada capacitiva de Ca^{2+} por canais TRPs na aorta isolada de rato SHR.
- Avaliar o tratamento oral do carvacrol e as possíveis modificações na PA e FC de animais SHR e avaliar a expressão dos canais TRP nesses animais tratados;
- Avaliar melhor o efeito hipotensor promovido pelo carvacrol e a influencia dos canais TRP nessa resposta;
- Avaliar a expressão dos canais TRPs em cardiomiócitos de animais SHR e WKY;
- Investigar a atividade bradicárdica promovida pelo carvacrol e a influencia dos canais TRP nessa resposta;
- Avaliar a expressão dos canais TRP nas regiões neuroregulatórias da pressão arterial (SFO-PVN-RVLM)
- Avaliar o efeito do carvacrol sobre as áreas neuroregulatórias da pressão arterial e a possível ação dos canais TRP nessas respostas.

Referências

9. REFERÊNCIAS

ADEBIYI A., THOMAS-GATEWOOD C.M., LEO M.D., KIDD M. W., NEEB Z.P., JAGGAR J.H.; An Elevation in Physical Coupling of Type 1 IP3 Receptors to TRPC3 Channels Constricts Mesenteric Arteries in Genetic Hypertension. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.198820; **Hypertension**; 60(5): 1213–1219, 2012.

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.

BALDOLI E, CASTIGLIONI S, MAIER JAM- Regulation and Function of TRPM7 in Human Endothelial Cells: TRPM7 as a Potential Novel Regulator of Endothelial Function - PLoS ONE 8(3): e59891.DOI: 10.1371/journal.pone.0059891

BARLOW, C.A. ; ROSE, P. ; PULVER-KASTE, R.A. ; LOUNSBURY, K.M. ; LOUNSBURY, K.M. ; Excitation-transcription coupling in smooth muscle. **The journal of physiology**, v570,p59-64, 2006.

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.

BAYLIE RL, BRAYDEN JE. TRPV channels and vascular function. **Acta Physiol** 203:99-116, 2011.

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.

BEHRENDT HJ, GERMANN T, GILLEN C, HATT H, JOSTOCK R.- Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a

fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay - *Br J Pharmacol.* Feb;141(4):737-45, 2004.

BENATAR, M.G., Calcium channelopathies. **QJM: An international journal of medicine**, v92, n3, p 133-141, 1999.

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 Ca^{2+} entry dependent on TRPC1. **Circ. Res.**, v. 93, p. 839 - 847, 2003.

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

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.

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.

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.

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

CHEN J., CROSSLAND R.F., NOORANI M.M.Z., MARRELLI S.P.-Inhibition of TRPC1/TRPC3 by PKG contributes to NO-mediated vasorelaxation, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H417–H424, 2009 - doi:10.1152/ajpheart.01130.2008.

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.

COWLEY, A.W., The genetic dissection of essential hypertension. **Nature Reviews Genetics**, v7, n11, p.829-840, 2006.

CONRAD, C.H.; BROOKS, W.W.; HAYES, J.A.; SEN, S.; ROBINSON, K.G.O.H.L., **Circulation**, v.91, p.161-70, 1995.

CRIBBS, L. L. T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. **Cell Calcium**, v.40, n.20, p.221 - 230, 2006.

CRNICH, R., AMBERG, G.C., LEO, M.D., GONZALES, A.L., TAMKUN, M.M., JAGGAR, J.H., EARLEY, S., Vasoconstriction resulting from dynamic membrane trafficking of TRPM4 in vascular smooth muscle cells. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v.299,p.C682-694,2010.

CRUZ, J.S., MATSUDA, H. Depressive effects of arenobufagin on the delayed rectifier K^{+} current of guinea-pig cardiac myocytes. **European Journal Pharmacology**, v.266,n.3,p.317-325, 1994.

CZIKORA Á, LIZANECZ E, BAKÓ P, RUTKAI I, RUZSNAVSZKY F, MAGYAR J, PÓRSZÁSZ R, KARK T, FACSKÓ A, PAPP Z, ÉDES I, TÓTH A - Structure-activity relationships of vanilloid receptor agonists for arteriolar TRPV1- *British Journal of Pharmacology* (2012) 165 1801–1812 - DOI:10.1111/j.1476-5381.2011.01645.x

DANNERT MT, ALSASUA A, HERRADON E, MARTÍN MI, LÓPEZ-MIRANDA V., Vasorelaxant effect of Win 55,212-2 in rat aorta: new mechanisms involved. **Vasc Pharmacol** 46: 16–23., 2007.

DANTAS BPV, ALVES QL, ASSIS KS, RIBEIRO TP, ALMEIDA MM, VASCONCELOS AP1, ARAÚJO DA, BRAGA VA, MEDEIROS IA, ALENCAR JL, SILVA DF. Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvacrol in normotensive rat. *Vascul Pharmacol*.67-69:48-58. doi: 10.1016/j.vph.2015.02.016, 2015.

DANTAS, B.P.V., Participação dos Canais TRP nos efeitos cardiovasculares induzidos por carvacrol em ratos - **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** – Curso de Pós-graduação em farmacologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

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.

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 Ca²⁺ - 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.

EL HIANI Y, AHIDOUCHE A, LEHEN'KYI V, HAGUE F, GOUILLEUX F, MENTAVERRI R, KAMEL S, LASSOUED K, BRÛLÉ G, OUADID-AHIDOUCHE H. - Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 and TRPC1 channels are required for calcium-sensing receptor-stimulated MCF-7 breast cancer cell proliferation - *Cell Physiol Biochem*. 2009;23(4-6):335-46. doi: 10.1159/000218179, 2009.

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.

FILOSA J A., YAO X, RATH G - TRPV4 and the Regulation of Vascular Tone - *J Cardiovasc Pharmacol*;61:113–119-2013.

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 agonist-dependent vasorelaxation in TRPV4 $^{-/-}$ mice. **Nat. Cell Biol.**, v. 3, p. 121 - 127, 2001.

GAO F., WANG D.H. - Hypotension Induced by TRPV4 Activation: Role of Ca^{2+} -activated K^{+} Channels and Sensory Nerves - J Hypertens. 2010 January ; 28(1): 102–110. doi:10.1097/HJH.0b013e328332b865.

GAO F, SUI D, GARAVITO RM, WORDEN RM, WANG DH. Salt intake augments hypotensive effects of transient receptor potential vanilloid 4: functional significance and implication. **Hypertension**;53:228 –235, 2009.

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

GONZALES, A.L.; GARCIA, Z.I.; AMBERG, G.C.; EARLEY, S., Pharmacological inhibition of TRPM4 hyperpolarizes vascular smooth muscle. **American Journal of Physiology- cell physiology**, v.299, p.C1195-1202, 2010.

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.

GUILBERT, A., GAUTIER, M., DHENNIN-DUTHILLE, I., HAREN, N., SEVESTRE, H., OUADID-AHIDOUCH, H.,. Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** 297, C493–C502, 2009.

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

HINMAN A, CHUANG HH, BAUTISTA DM, JULIUS D., TRP channel activation by reversible covalent modification. **Proc Natl Acad Sci USA**; 103: 19564-8, 2006.

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.

HOPPS J.J., DUNN W.R., RANDALL M.D. - Vasorelaxation to capsaicin and its effects on calcium influx in arteries - *European Journal of Pharmacology* 681 (2012) 88–93 - doi:10.1016/j.ejphar.2012.02.019

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.

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

JANCSÓ G. *, ELISABETH KIRALY* & AURELIA JANCSÓ-GÁBOR† Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones - *Nature* **270**, 741-743 (22 December 1977) | doi:10.1038/270741a0; Accepted 25 October 1977

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.

JARDÍN I., DIONISIO N., LOPEZ J.J., SALIDO GM, ROSADO J.A., Pharmacology of TRP Channels in the Vasculature, **Current Vascular Pharmacology**, 11, 480-489 – 2013.

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.

KARK T, BAGI Z, LIZANECZ E, PÁSZTOR ET, ERDEI N, CZIKORA Á, PAPP Z, EDES I, PÓRSZÁSZ R, TÓTH A, Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. **Mol Pharmacol** 73:1405-1412- 2008.

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.

KISELYOV K, XU X, MOZHAYEVA G, KUO T, PESSAH I, MIGNERY G, ZHU X, BIRNBAUMER L, MUALLEM S. Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. **Nature**. 396:478–482,1998.

KOCHUKOV M.Y., BALASUBRAMANIAN A., NOEL R.C., MARRELLI S.P. - Role of TRPC1 and TRPC3 Channels in Contraction and Relaxation of Mouse Thoracic Aorta - *J Vasc Res* 2013;50:11–20-DOI: 10.1159/000342461, 2013.

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.

KONRAD, M., SCHLINGMANN, K.P., GUDERMANN, T., Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. **American journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 287, p. L962-969, 2004.

KUNDU, S., RAO, J.P., The story of spontaneously hypertensive rats (SHR): A Review. **Al Ameen Journal of Medical Science**, v.1, n.1, p.65-66, 2008.

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.

LI J., KAMINSKI N.E., WANG D.H., Anandamide-Induced Depressor Effect in Spontaneously Hypertensive Rats Role of the Vanilloid Receptor DOI: 10.1161/01.HYP.0000051641.58674.F7 **Hypertension**.; 41:757-762, 2003.

LIU, D.; LIMAN, E. R. Intracellular Ca^{2+} and the phospholipid PIP_2 regulate the taste transduction ion channel TRPM5. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 100, p. 15160 - 15165, 2003.

LIU D, SCHOLZE A, ZHU Z, KREUTZ R, WEHLAND-VON-TREBRA M, ZIDEK W, TEPEL M. Increased transient receptor potential channel TRPC3 expression in spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens**;18:1503–1507 - 2005.

LIU D, SCHOLZE A, ZHU Z, KRUEGER K, THILO F, BURKERT A, STREFFER K, HOLZ S, HARTENECK C, ZIDEK W, TEPEL M. Transient receptor potential channels in essential hypertension. **J Hypertens**;24:1115–1124- 2006.

LIU D., SCHOLZE A, KREUTZ R, WEHLAND-VON-TREBRA M, ZIDEK W, ZHU ZM, TEPEL M. Monocytes from spontaneously hypertensive rats show increased store-operated and second messenger-operated calcium influx mediated by transient receptor potential canonical type 3 channels. **Am J Hypertension**;20:1111–1118, 2007.

LIU D., YANG D., HE H., CHEN X., CAO T., FENG X., MA L., LUO Z., WANG L., YAN Z., ZHU Z., TEPEL M., Increased Transient Receptor potential Canonical Type 3 Channels in Vasculature, From Hypertensive Rats ISSN: 0194-911X. Online ISSN: 1524-4563 **Hypertension**.53:70-76-2009.

LIZANECZ E, BAGI Z, PASZTOR ET, PAPP Z, EDES I, KEDEI N et al. (2006). Phosphorylation-dependent desensitization by anandamide of vanilloid receptor-1 (TRPV1) function in rat skeletal muscle arterioles and in Chinese hamster ovary cells expressing TRPV1. *Mol Pharmacol* 69: 1015–1023, 2006.

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

MACIANSKIENE R., MARTISIENE I., ZABLOCKAITE D., GENDVILIENE V., Characterization of Mg^{2+} -regulated TRPM7-like current in human atrial myocytes; **Journal of Biomedical Science** 19:75, 2012.

MALKIA A, MADRID R, MESEGUER V, DE LA PE, VALERO M, BELMONTE C, VIANA F Bidirectional shifts of TRPM8 channel gating by temperature and chemical agents modulate the cold sensitivity of mammalian thermoreceptors. *J Physiol* 581:155-174, 2007.

MALKIA A, PERTUSA M, FERNANDEZ-BALLESTER G, FERRER-MONTIEL A, VIANA F - Differential role of the menthol-binding residue Y745 in the antagonism of thermally gated TRPM8 channels. *Mol Pain* 5:62, 2009.

MCNAMARA, F.N., RANDALL, A., GUNTHERPE, M.J., Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). **British journal of Pharmacology**, v.144,p.781-90, 2005.

MOHAPATRA, D.P., WANG, S.Y., WANG, G.K., NAU, C.A., A tyrosine residue in TM6 of the vanilloid receptor TRPV1 involved in desensitization and calcium permeability of capsaicin-activated currents. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v.23, p.314-324, 2003.

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.

NAYLOR J, LI J, MILLIGAN CJ, et al. Pregnenolone sulphate- and cholesterol-regulated TRPM3 channels coupled to vascular smooth muscle secretion and contraction. **Circ Res**; 106: 1507-15-2010.

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.

NOORANI M.M.Z., NOEL R.C., MARRELLI S.P.- Upregulated TRPC3 and downregulated TRPC1 channel expression during hypertension is associated with increased vascular contractility in rat. 22 July 2011- doi: 10.3389/fphys.2011.00042.

OHYA,Y.,ABE, I., FUJI,K., TAKATA, Y., FUJISHIMA, M., Voltage-dependent Ca^{2+} channels in resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. **Circulation Research**, v. 73, p. 1090-1993.

OKAMOTO, K., AOKI,K., Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**, v.27, p. 282-93, 1963.

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.

PENG G, LU W, LI X, et al. Expression of store-operated Ca^{2+} entry and transient receptor potential canonical and vanilloid-related proteins in rat distal pulmonary venous smooth muscle. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**; 299: L621-30-2010.

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

PENG J., YUAN-JIAN L - The vanilloid receptor TRPV1: Role in cardiovascular and gastrointestinal protection - *European Journal of Pharmacology* 627 (2010) 1–7 - doi: 10.1016/j.ejphar.2009.10.053, 2010.

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.

POBURKO D, LIAO CH, LEMOS VS, LIN E, MARUYAMA Y, COLE WC, VAN BREEMEN C. Transient receptor potential channel 6-mediated, localized cytosolic [Na⁺] transients drive Na⁺/Ca²⁺ exchanger-mediated Ca²⁺ entry in purinergically stimulated aorta smooth muscle cells. **Circ Res**;101:1030 –1038, 2007.

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.

RIBEIRO TP, PORTO DL, MENEZES CP, ANTUNES AA, SILVA DF, DE SOUSA DP et al. Unravelling the cardiovascular effects induced by alpha-terpineol: a role for the nitric oxide-cGMP pathway. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 37:811–6, 2010.

ROSKER, C.; GRAZIANI, A.; LUKAS, M.; EDER, P.; ZHU, M. X.; ROMANIN, C.; Groschner K.; Ca²⁺ signaling by TRPC3 involves Na⁺ entry and local coupling to the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 13696 - 13704, 2004.

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.

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

SAMAIN E, BOUILLIER H, MISEREY S, PERRET C, RENAUD JF, SAFAR M, DAGHER G. Extracellular signal-regulated kinase pathway is involved in basic fibroblast growth factor effect on angiotensin II-induced Ca^{2+} transiente in vascular smooth muscle cell from Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**.35:61– 67, 2000.

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.

SELESCU T., CIOBANU A.C., DOBRE C., REID G., BABE A. - Camphor Activates and Sensitizes Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) to Cooling and Icilin - Chem. Senses 38: 563–575, 2013 - doi:10.1093/chemse/bjt027, 2013.

SILVA, DF ; ARAUJO, I. G. A.; ALBUQUERQUE, J. G. F.; PORTO, D.L.; DIAS, K. L. G.; CAVALCANTE, K. V. M.; VERAS, R. C.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, JM; ARAÚJO, D.A.M.; CRUZ, J. S.; CORREIA, N.A.; MEDEIROS, I.A. Rotundifolone-induced relaxation is mediated by BKCa channel activation and Cav channel inactivation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2011, 109, 465–475.

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.

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.

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

TIRUPPATHI, C.; FREICHEL, M.; VOGEL, S. M.; PARIA, B. C.; MEHTA, D.; FLOCKERZI, V.; MALIK, A.B.; Impairment of store-operated Ca^{2+} entry in $\text{TRPC4}^{(-/-)}$ mice interferes with increase in lung microvascular permeability. **Circ. Res.**, v. 91, p. 70 - 76, 2002.

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.

TOUYZ RM, EL MABROUK M, HE G, WU XH, SCHIFFRIN EL. Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates angiotensin II-mediated signaling and contraction in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. **Circ Res.**;84:505–515,1999.

TOUYZ RM, Magnesium and hypertension, **Current opinion in Nephrology and hypertension**, v.15,p.141-144, 2006.

TÓTH A., CZIKORA A., PÁSZTOR E.T., DIENES B., BAI P., CSERNOCH L., RUTKAI I., CSATÓ V., MÁNYINÉ I.S., PÓRSZÁSZ R., ÉDES I., PAPP Z., AND BOCZÁN J., Vanilloid Receptor-1 (TRPV1) Expression and Function in the Vasculature of the Rat **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Vol. 62(2) 129–144, 2014.

TRIPPODO, N.C.; FROHLICH, E.D., Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circulation Research**, v.48, n.3, p.309-319, 1981.

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.

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

VRIENS J., APPENDINO G., NILIUS B. - Pharmacology of Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channels - *Molecular Pharmacology* 75:1262–1279, 2009- doi:10.1124/mol.109.055624.

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

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

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

WANG YX, WANG J, WANG C, et al. Functional expression of transient receptor potential vanilloid-related channels in chronically hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells. **J Membr Biol**; 223: 151-9-2008.

WALAS D., PATON J. - Transient receptor potential vanilloid type 4 channel as a putative target molecule for anti-hypertensive therapy (1067.10) - *The FASEB Journal* vol. 28 no. 1 Supplement 1067.10, 2014.

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.

XING H., CHEN M., LING J., TAN W., GU J.G. - TRPM8 Mechanism of Cold Allodynia after Chronic Nerve Injury - *The Journal of Neuroscience* - 27(50):13680 –13690, 2007.

XU,C.,LU,Y.,TANG,G.,WANG,R., Expression of voltage-dependent K⁺ channel genes in mesenteric artery smooth muscle cells. **American journal of Physiology: gastrointestinal and liver Physiology**, v.277, n.5,p G1055-1063, 1999.

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

YAO X, GARLAND CJ. Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels. **Circ Res**; 97: 853-63, 2005.

YOGI A., CALLERA G.E., ANTUNES T.T., TOSTES R.C., TOUYZ R.M. - Transient Receptor Potential Melastatin 7 (TRPM7) Cation Channels, Magnesium and the Vascular System in Hypertension - Circulation Journal Vol. 75 (2011) No. 2 p. 237-245 - <http://doi.org/10.1253/circj.CJ-10-1021>, 2011.

ZEBGER-GONG H, MULLER D, DIERCKE M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3-induced aortic calcifications in experimental uremia: up-regulation of osteoblast markers, calcium-transporting proteins and osterix. **J Hypertens**; 29: 339-48-2011.

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.