

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

MATHEUS MORAIS DE OLIVEIRA MONTEIRO

NOVOS DERIVADOS DA ISATINA CAUSAM VASORRELAXAMENTO EM
ARTÉRIA MESENTÉRICA CRANIAL DE RATOS WISTAR

JOÃO PESSOA– PB

2015

MATHEUS MORAIS DE OLIVEIRA MONTEIRO

**NOVOS DERIVADOS DA ISATINA CAUSAM VASORRELAXAMENTO EM
ARTÉRIA MESENTÉRICA CRANIAL DE RATOS WISTAR**

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
na área de Farmacologia.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

JOÃO PESSOA– PB

2015

M775n Monteiro, Matheus Morais de Oliveira.
Novos derivados da isatina causam vasorrelaxamento em
artéria mesentérica cranial de ratos wistar / Matheus Morais de
Oliveira Monteiro.- João Pessoa, 2015.
128f. : il.
Orientador: Valdir de Andrade Braga
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. Farmacologia. 3. Vasorrelaxamento.
4. SHR. 5. Pressão arterial. 6. Artéria mesentérica.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

MATHEUS MORAIS DE OLIVEIRA MONTEIRO

**NOVOS DERIVADOS DA ISATINA CAUSAM VASORRELAXAMENTO EM
ARTÉRIA MESENTÉRICA CRANIAL DE RATOS WISTAR**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

(Universidade Federal da Paraíba)

Orientador

Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva

(Universidade Federal de Pernambuco)

Examinador externo

Prof^a. Dr^a. Liana Clébia de Moraes Pordeus

(Universidade Federal da Paraíba)

Examinadora externa

Prof^a. Dr^a. Sandra Rodrigues Mascarenhas

(Universidade Federal da Paraíba)

Examinadora interna

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Agra

(Universidade Federal da Paraíba)

Examinadora interna

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Selma Monteiro e José Monteiro, grandes amores e razão da minha vida, por todo o carinho, afeto, amor e por ter depositado toda confiança em minha carreira. Obrigado por terem investido na minha educação e por acreditarem que isto é o maior legado que se pode deixar para os filhos.

À minha irmã Nayanny Monteiro, pessoa que tenho muita admiração por sua determinação e força de vontade.

À minha sobrinha e afilhada Elis Morais de Freitas, pelo amor que reina entre nós.

Aos meus demais familiares, tios, tias, primos e avó por todo o carinho, atenção e momentos de alegria e descontração que temos compartilhado por todos esses anos. A todos que não se encontram mais entre nós, como minha avó **Celina de Morais** que faleceu recentemente, vocês ficarão sempre em nossas lembranças e em nossos corações.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida, por me acompanhar, proteger, iluminar, consolar, conceder força, coragem e, acima de tudo, saúde. Por nos mostrar que quando se tem fé, tudo é possível.

Ao meu orientador, professor **Valdir de Andrade Braga**, pela oportunidade, confiança, disposição em ensinar com paciência, e pelos ensinamentos, palavras de estímulo e desafios propostos. Um exemplo de pesquisador, professor e orientador ao qual me espelho. Parafraseando Isac Newton "Eu sou um anão. Se pude ver mais longe foi porque subi em ombros de gigantes".

Aos professores **Sandra Rodrigues Mascarenhas**, **Maria de Fátima Agra** e **Fabiana de Andrade Cavalcante** examinadores da banca de qualificação, sendo as duas primeiras, juntamente com os professores **João Henrique da Costa Silva** e **Liana Clébia de Moraes Pordeus** compuseram a banca de defesa. Aos suplentes **Fabio Correia Sampaio** e **Márcia Regina Piovezam**. Obrigado pelo aceite, pelas sugestões e pelo interesse em aprimorar este trabalho. É uma honra tê-los como colaboradores.

Aos demais professores do Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos por fazerem parte da minha formação profissional.

Aos colegas de turma que tive tanto no mestrado como no doutorado.

Minha mãe **Selma**, meu pai **José Monteiro**, minha irmã **Nayanny** e minha sobrinha **Elis**, simplesmente por existirem e fazerem tudo isso valer a pena.

Leilane Carneiro, minha namorada, pela alegria de estamos juntos, por estar sempre presente em todos os momentos e pela ajuda auxiliando nos momentos mais necessários. Você tem sido muito importante para essa conquista. Amo você. Obrigado também ao acolhimento de sua família, já me sinto fazendo parte dela.

Aos professores que fazem o laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA), **Camille de Moura Balarini**, **Maria do Socorro de França Silva** e **Josiane de Campos Cruz**.

Aos alunos de mestrado, doutorado, pós-doutorado, iniciação científica e estagiários que fazem ou fizeram parte do LACONCHA durante o meu doutorado, **Leônidas Júnior**, **Thyago Queiroz**, **Bruna Dantas**, **Naiane Alves**, **Suênia Porpino**, **Juliana Carreiro**, **Diogo Guimarães**, **Luciano Leite**, **Alynne Carvalho**, **Clênia Cavalcante**, **Taísa França**, **Ricardo Bernardino**, **Cristiane Alves**, **Drielle Guimarães**, **Priscila Vaz**, **Danilo Duarte**, **John Aleff**, **Ana Karolina**, **Juliany Silva**, **Rafael Ribeiro**, **Alessandro Lucas**, **Renata Travassos**, **Atalia Lima**, **James Buchmeier**, **Tayla Hemínio**, **Rádamis Castor**, **Déborah Joanny**, **Christianne Emmanuelle**, **Karen Montenegro** e **Rayssa Toscano**. Em especial a **Priscila Vaz** que me ajudou bastante nos experimentos, a **Leônidas Júnior** que sempre discutiu comigo os resultados e me ensinou os experimentos com banho de órgãos, além do companheirismo de longas datas, a **Naiane Alves** pela troca de experiência e auxílio, a **Bruna Dantas** pela amizade

e por nossas discussões científicas produtivas e a **Thyago Queiroz** pelo companheirismo.

Ao professor **Eugene Nalivaiko**, pelos ensinamentos nos experimentos com projetos paralelos que realizamos em colaboração.

Ao companheiro **José Crispim Duarte**, grande amigo dentro e fora do trabalho, por sua força, palavras e por seu trabalho para todos do PgPNSB. Você foi essencial na conclusão deste trabalho.

Gilmário, Luís Cordeiro, Adriano Cordeiro e Inaldo pelo excelente trabalho realizado no biotério.

A **Sara Madeiro e Clênia Cavalcanti** por seus excelentes e notórios trabalhos desempenhados em nosso laboratório.

Aos colaboradores da química, em especial ao grupo do Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica do Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, pertencente ao Departamento de Química da UFPB nos nomes de **Helivaldo Diogenes e Bruno Freitas** que nos cederam os compostos testados neste trabalho.

Aos colaboradores de outros laboratórios do nosso centro, o Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, o Laboratório de Imunofarmacologia, o Laboratório de Psicofarmacologia, o Laboratório de Farmacologia Celular e Molecular e o Laboratório, o Laboratório de Farmacologia Funcional, o Laboratório de Farmacobotânica e o Laboratório de Ensaios Toxicológicos que estiveram todos a disposição para nos ajudar quando precisamos.

A **Carol Manguiera e Dayana Brandão** frente a secretaria por cooperar para o fortalecimento de nossa pós-graduação.

Aos professores **Maria de Fátima Agra, José Maria Barbosa Filho e Josean Fachine Tavares**, que fizeram e fazem um excelente trabalho frente a coordenação de nosso programa.

Aos amigos externos ao mundo científico, em especial a **Diogo Rafael, Cícero Vicente, Thiago Vicente, Jardis Caiçara, Humberto David, José Adauto e Bila**.

Ao amigo **Geovani Pereira** pela amizade desde os tempos de graduação.

Ao grande parceiro **Manuel Neto** por todo esse tempo de convívio.

À **Universidade Federal da Paraíba** por possibilitar a realização desta pesquisa.

A todos que fazem o **CBiotec**, o **IPerFarM** e o **PgPNSB**.

Ao **CNPq** e a **CAPES** pelo apoio financeiro e pelo acesso ao portal periódico CAPES.

Aos animais utilizados para que este trabalho fosse realizado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Novos derivados da isatina causam vasorrelaxamento em artéria mesentérica cranial de ratos Wistar. MONTEIRO, M. M. O. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, PgPNSB/UFPB (2015)

RESUMO

O processo de descoberta de novas drogas que atuam na camada muscular lisa causando relaxamento vascular tem importância fundamental no tratamento de doenças cardiovasculares. Neste contexto, destaca-se a isatina, uma substância bastante versátil encontrada em diversos tecidos de mamíferos e de plantas que pode facilmente sofrer modificações estruturais para dar origem a novas substâncias. Neste contexto foram estudados os efeitos farmacológicos de quatro novas drogas derivadas da isatina (IS-AK1, IS-BK1, B-001 e D-001) sobre o sistema cardiovascular, utilizando-se técnicas *in vivo* e *in vitro*. Nos estudos *in vitro*, anéis de mesentérica cranial isolada de rato foram mantidos em cubas contendo Tyrode a 37 °C gaseificado com carbogênio, em seguida foram fixados a um transdutor de força (PowerLab™, ADInstruments, MA, EUA) e acoplado a um sistema de aquisição de dados (WinDaq/XL, DI 148-U, Insight, Brasil) sob tensão de 0,75 g, durante 1 hora. Após este período, as preparações foram pré-contraindidas com fenilefrina (FEN, 10 µM) ou KCl (60 mM) e em seguida, concentrações crescentes dos derivados da isatina foram adicionadas cumulativamente. Todos os compostos testados apresentaram efeito vasorrelaxante, sendo o IS-AK1 o composto mais promissor por apresentar maior potência tanto na presença como na ausência do endotélio ($pD_2 = 7,99 \pm 0,11$ e $7,95 \pm 0,15$, respectivamente). Entretanto, as respostas vasorrelaxantes máximas não foram diferentes ($E_{max} = 85,69 \pm 5,18$ % vs. $74,62 \pm 5,33$ %) na presença e na ausência de endotélio. Portanto, o IS-AK1 foi selecionado para estudos subsequentes afim de investigar seu mecanismo de ação por meio de curvas concentração-resposta ao composto na presença dos bloqueadores ODQ (10 µM), bloqueador da ciclase de guanilil solúvel; TEA (3 mM), bloqueador inespecífico de canais para K^+ ; TEA (1 mM), bloqueador de BK_{Ca} ; GLIB (1 µM), bloqueador de K_{ATP} ; 4-AP (1 mM), bloqueador de K_v e $BaCl_2$ (30 µM), bloqueador de K_{IR} . Na presença do ODQ, o vasorrelaxamento foi significativamente atenuado ($E_{max} = 39,68 \pm 6,56$ %; $pD_2 = 5,07 \pm 0,2$, $n = 6$). Além disso, a resposta vasorrelaxante foi reduzida na presença de TEA (3 mM), ($E_{max} = 43,53 \pm 8,16$ %; $pD_2 = 6,72 \pm 0,2$, $n = 6$) e na presença de TEA (1 mM) ($E_{max} = 39,72 \pm 7,86$ %; $pD_2 = 5,63 \pm 0,2$, $n = 6$). Ocorreu redução na potência do IS-AK1 quando bloqueado por GLIB ($pD_2 = 7,23 \pm 0,17$, $n = 5$), 4-AP ($pD_2 = 7,1 \pm 0,17$, $n = 5$) e $BaCl_2$ ($pD_2 = 6,23 \pm 0,16$, $n = 5$), sugerindo a participação de diferentes canais para K^+ nesta resposta. Para os estudos *in vivo*, foram investigadas as alterações na pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não-anestesiados tratados agudamente com o IS-AK1. A administração de IS-AK1 (10 mg/kg) produziu hipotensão e bradicardia tanto em ratos normotensos (-50 ± 12 mmHg, -258 ± 40 bpm, $n = 7$) quanto em ratos hipertensos (-99 ± 7 mmHg, -278 ± 40 bpm, $n = 6$) com efeito mais pronunciado no efeito hipotensor em ratos hipertensos. Deste modo, a resposta vasorrelaxante promovida pelo IS-AK1 parece envolver a participação da enzima sGC, consequentemente levando a ativação da PKG, ocasionando a ativação de canais para K^+ do tipo K_{ATP} , K_v , K_{IR} e, principalmente, BK_{Ca} . Este mecanismo de ação pode estar contribuindo para a hipotensão e bradicardia observadas em ratos não-anestesiados.

Palavras-chave: Vasorrelaxamento, SHR, Pressão arterial, Canais para potássio, Artéria mesentérica.

New isatin derivatives cause vasorelaxation in cranial mesenteric artery of Wistar rats. MONTEIRO, M. M. O. Tese de doutorado, Programa de pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, PgPNSB/UFPB (2015)

ABSTRACT

The process of discovering new drugs that act on the smooth muscle layer causing vascular relaxation is of fundamental importance in the treatment of cardiovascular diseases. In this context highlights the isatin, a versatile substance found in various tissues of mammals and plants which can easily undergo structural changes to yield new substances. The pharmacological effects of four novel drugs derived from isatin (IS-AK1, IS-BK1, B-001 and D-001) on the cardiovascular system using techniques *in vivo* and *in vitro*. In *in vitro* studies, cranial mesenteric rings from rat were kept in vats containing Tyrode at 37 ° C gassed with carbogen then they were fixed to a force transducer (PowerLab™, ADInstruments, MA, EUA) and coupled to a data acquisition system (WinDaq/XL, DI 148-U, Insight, Brasil) under tension 0.75 g, for 1 hour. After this period, the preparations were pre-contracted with phenylephrine (PHE, 10 µM) and KCl (60 mM) and then increasing concentrations of isatin derivatives were added cumulatively. All tested compounds showed vasorelaxant effect and IS-AK1 the most promising compound for presenting higher power when both in presence and in absence of endothelium compared to others ($pD_2 = 7.99 \pm 0.11$ and 7.95 ± 0.15 , respectively), but these vasorelaxant responses were not different ($E_{max} = 85.69 \pm 5.18\%$ vs. $74.62 \pm 5.33\%$) in presence or in absence of endothelium. Therefore, IS-AK1 was then was selected for further studies in order to investigate its mechanism of action of the compound by concentration-response curves in the presence of blockers ODQ (10 µM), cyclase blocker soluble guanylyl; TEA 3 (mM) nonspecific blocker of K^+ channels; TEA (1 mM) BK_{Ca} blocker; GLIB (1 µM), K_{ATP} blocker; 4-AP (1 mM) K_V blocker and $BaCl_2$ (30 µM), K_{IR} blocker. In the presence of ODQ vasorelaxation was significantly attenuated ($E_{max} = 39.68 \pm 6.56\%$; $pD_2 = 5.07 \pm 0.2$, $n = 6$). In addition, in the presence of TEA 3 mM ($E_{max} = 43.53 \pm 8.16\%$, $6.72 pD_2 \pm 0.2$, $n = 6$) and presence of TEA 1 mM ($E_{max} = 39.72 \pm 7.86\%$; $pD_2 = 5.63 \pm 0.2$, $n = 6$) vasorelaxant response were reduced. There was reduction in the power of the IS-AK1 when blocked by GLIB ($pD_2 = 7.23 \pm 0.17$, $n = 5$), 4-AP ($pD_2 = 7.1 \pm 0.17$, $n = 5$) and $BaCl_2$ ($pD_2 = 6.23 \pm 0.16$, $n = 5$), suggesting the participation of different types of K^+ channels in this response. For *in vivo* studies, changes in blood pressure and heart rate were investigated in non-anesthetized rats treated acutely with the IS-AK1. The IS-AK1 administration (10 mg/kg) produced blood pressure and bradycardia both in normotensive (-50 ± 12 mmHg -258 ± 40 bpm, $n = 7$) and hypertensive rats (-99 ± 7 mmHg, -278 ± 40 bpm, $n = 6$) with effects more pronounced in hypotensor effect in hypertensive rats. Thus, the vasorelaxant response promoted by IS-AK1 possibly involves the participation of sGC enzyme, thereby leading to the activation of PKG causes activation of K^+ channels, K_{ATP} , K_V , K_{IR} and especially BK_{Ca} types. This mechanism of action may be contributing to hypotension and bradycardia observed in non-anesthetized rats.

Key-words: Vasorelaxation, SHR, Blood pressure, Potassium channels, Mesenteric artery.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	08
Lista de Quadros	10
Lista de abreviaturas e siglas	11
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 O sistema cardiovascular e o controle da pressão arterial	23
1.2 Regulação vascular da pressão arterial	24
1.3 Doenças cardiovasculares e hipertensão	31
1.4 Tratamento medicamentoso e não medicamentoso para a hipertensão	32
1.5 Produtos naturais e sintéticos bioativos	35
1.6 A isatina e seus derivados	36
2 OBJETIVOS	43
Objetivo geral	43
Objetivos específicos	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Animais	45
3.2 Drogas e ferramentas farmacológicas	45
3.3 Substâncias testes: Derivados da isatina	46
3.4 Protocolos <i>in vitro</i>	46
3.4.1 Soluções nutritivas	46
3.4.2 Preparação de anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos	47
3.4.3 Verificação da presença do endotélio funcional	48
3.4.4 Avaliação dos efeitos dos derivados da isatina em artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contraídos com fenilefrina	49
3.4.5 Avaliação da participação da enzima ciclase de guanilil solúvel (sGC) no efeito vasorrelaxante induzido pelo derivado da isatina em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contraídos com fenilefrina	51

3.4.6	Avaliação da participação dos canais Ca_v no efeito vasorrelaxante induzido pelo derivado da isatina em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráídos com fenilefrina	51
3.4.7	Avaliação da participação dos canais para K^+ no efeito vasorrelaxante induzido pelo derivado da isatina em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráídos com fenilefrina	52
3.4.8	Avaliação da participação dos canais para K^+ de grande condutância ativados pelo cálcio- BK_{Ca} no efeito vasorrelaxante induzido pelo derivado da isatina em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráídos com fenilefrina	53
3.4.9	Avaliação da participação de canais para K^+ sensíveis ao $ATP-K_{ATP}$ no efeito vasorrelaxante induzido pelo derivado da isatina no efeito vasorrelaxante induzido pelo derivado da isatina em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráídos com fenilefrina	54
3.4.10	Avaliação da participação de canais para K^+ ativados por voltagem- K_v no efeito vasorrelaxante induzido pelo derivado da isatina no efeito vasorrelaxante induzido pelo derivado da isatina em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráídos com fenilefrina	55
3.4.11	Avaliação da participação de canais para K^+ retificadores de influxo- K_{IR} no efeito vasorrelaxante induzido pelo derivado da isatina no efeito vasorrelaxante induzido pelo derivado da isatina em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráídos com fenilefrina	56
3.5	Protocolos experimentais <i>in vivo</i>	57
3.5.1	Cateteres vasculares	57
3.5.2	Implante de cateteres vasculares	57
3.5.3	Efeitos da administração aguda do derivado da isatina sobre a pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados	58
3.6	Análise estatística	59
4	RESULTADOS	60
4.1	Ensaio farmacológico <i>in vitro</i>	60
4.1.1	Efeitos induzidos pelos derivados da isatina sobre anéis de artéria mesentérica cranial	61

4.1.2	Participação da sGC na resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial	63
4.1.3	Efeitos induzidos pelo IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial pré-contraídos com KCl 60 mM	64
4.1.4	Participação de canais para potássio nos efeitos vasorrelaxante induzidos pelo IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial	65
4.1.5	Subtipos de canais para potássio envolvidos na resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato	66
4.1.5.1	Participação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de alta condutância (BK_{Ca}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1	66
4.1.5.2	Participação dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1	67
4.1.5.3	Participação dos canais para potássio ativados por voltagem (K_V), na resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1	68
4.1.5.4	Participação dos canais para potássio retificadores de influxo (K_{IR}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1	68
4.2	Ensaios farmacológicos <i>in vivo</i>	69
4.2.1	Efeito do IS-AK1 sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca em ratos não-anestesiados	69
5	DISCUSSÃO	78
6	CONCLUSÃO	91
7	PERSPECTIVAS	93
	REFERÊNCIAS	95
	ANEXO A	125
	PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Estrutura molecular da isatina	37
Figura 02 - Estrutura molecular dos quatro compostos derivados da isatina testados. A. Estrutura moléculas do IS-AK1. B. Estrutura moléculas do IS-BK1. C. Estrutura moléculas do B-001 e D. Estrutura moléculas do D-001.....	41
Figura 03 - Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação dos efeitos vasculares dos derivados da isatina	48
Figura 04 - Protocolo de verificação da viabilidade do tecido muscular liso e da funcionalidade do endotélio vascular de artéria mesentérica cranial de ratos. A, Anéis com endotélio funcional, B, Anéis sem endotélio funcional	49
Figura 05 - Esquema do protocolo para avaliação do possível efeito vasorrelaxante dos derivados da isatina em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráídos com fenilefrina (1 μ M)	50
Figura 06 - Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contráídos com FEN (1 μ M) na presença de ODQ (10 μ M)	51
Figura 07 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos do IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contráídos com solução despolarizante KCl 60 mM	52
Figura 08 - Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contráídos com FEN (1 μ M) na presença de TEA (3 μ M)	53
Figura 09 - Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contráídos com FEN (1 μ M) na presença de TEA (1 μ M)	54
Figura 10 - Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contráídos com FEN (1 μ M) na presença de GLIB (10 μ M)	55

Figura 11 - Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contráídos com FEN (1 μ M) na presença de 4-AP (10 mM)	56
Figura 12 - Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contráídos com FEN (1 μ M) na presença de BaCl ₂ (30 μ M)	58
Figura 13- A. Representação esquemática do local da incisão onde foram implantados os cateteres vasculares para registro dos parâmetros cardiovasculares e administração de drogas. B. Representação esquemática do rato após implantação dos cateteres vasculares	59
Figura 14 – Traçado original dos demonstrando a ação vasorrelaxante dos derivados da isatina em anéis na presença e na ausência do endotélio em artéria mesentérica cranial de ratos	
Figura 15 - Traçado original de um rato Wistar representativo, mostrando o efeito da administração aguda (5 e 10 mg/kg IV) de IS-AK1 comparada a administração de salina sobre a PAM e FC em ratos Wistar não anestesiados	72
Figura 16 - Traçado original de um rato SHR representativo, mostrando o efeito da administração aguda (5 e 10 mg/kg IV) de IS-AK1 comparada a administração de salina sobre a PAM e FC em ratos SHR não anestesiados	74
Figura 17: Esquema representativo indicando o mecanismo de ação do IS-AK1 causando vasorrelaxamento e, conseqüentemente, hipotensão nos ratos Wistar.....	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição da solução nutritiva de Tyrode 47

Quadro 2 - Composição da solução nutritiva de Tyrode com cloreto de potássio a 60 mM 47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 – Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante dos derivados da isatina na presença e na ausência do endotélio funcional	62
Gráfico 02 - Curvas concentrações-resposta para o IS-AK1 (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica cranial isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (n = 8) e na presença de ODQ 10 μ M (n = 6)	64
Gráfico 03 - Curvas concentrações-resposta para o IS-AK1 (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica cranial isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 μ M, n = 8) ou com KCl 60 mM (n = 5)	65
Gráfico 04 - Curvas concentração-resposta para o IS-AK1 (10^{-12} – 10^{-3}) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica cranial isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (n = 8) e na presença de TEA 3 mM (n = 6)	66
Gráfico 05 - Curvas concentrações-resposta para o IS-AK1 (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica cranial isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (n = 8) e na presença de TEA 1 mM (n = 6).	67
Gráfico 06 - Curvas concentração-resposta para o IS-AK1 (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica cranial isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (n = 8) e na presença de GLIB 10 μ M (n = 5)	68
Gráfico 07 - Curvas concentração-resposta para o IS-AK1 (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica cranial isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (n = 8) e na presença de 4-AP (1 mM, n = 5)	69
Gráfico 08 - Curvas concentração-resposta para o IS-AK1 (10^{-12} – 10^{-3}) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica cranial isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (n = 8) e na presença de BaCl ₂ (30 μ M, n = 5)	70
Gráfico 09 - Comparação da pressão arterial média basal (PAM, mmHg) dos ratos Wistar e SHR	71
Gráfico 10 - Comparação da frequência cardíaca (FC, bpm) dos ratos Wistar e SHR..	71

Gráfico 11 - Efeito da administração aguda do IS-AK1 (5 e 10 mg/kg, IV) sobre a pressão arterial média (PAM) em ratos Wistar não-anestesiados (n = 7)	72
Gráfico 12 - Efeito da administração aguda do IS-AK1 (5 e 10 mg/kg, IV) sobre a frequência cardíaca (FC) em ratos Wistar não-anestesiados (n = 7)	73
Gráfico 13 - Efeito da administração aguda do IS-AK1 (5 e 10 mg/kg, IV) sobre a pressão arterial média (PAM) em ratos SHR não-anestesiados (n = 6)	74
Gráfico 14 - Efeito da administração aguda do IS-AK1 (5 e 10 mg/kg, IV) sobre a frequência cardíaca (FC) em ratos SHR não-anestesiados (n = 6)	75
Gráfico 15 – Comparação dos efeitos da administração aguda do IS-AK1 (5 mg/kg, IV) sobre a pressão arterial média (PAM) em ratos Wistar (n = 7) e ratos SHR não-anestesiados (n = 6)	75
Gráfico 16 – Comparação dos efeitos da administração aguda do IS-AK1 (10 mg/kg, IV) sobre a pressão arterial (PAM) em ratos Wistar (n = 7) e ratos SHR não-anestesiados (n = 6)	76
Gráfico 17 – Comparação dos efeitos da administração aguda do IS-AK1 (5 mg/kg, IV) sobre a frequência cardíaca (FC) em ratos Wistar (n = 7) e ratos SHR não-anestesiados (n = 6)	76
Gráfico 18 – Comparação dos efeitos da administração aguda do IS-AK1 (10 mg/kg, IV) sobre a frequência cardíaca (FC) em ratos Wistar (n = 7) e ratos SHR não-anestesiados (n = 6)	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP	4-aminopiridina
[Ca²⁺]_i	Concentração de cálcio intracelular
AC	Ciclase de adenilil
ACh	Acetilcolina
AVC	Acidente vascular cerebral
BK_{Ca}	Canais para K ⁺ ativados pelo Ca ²⁺ de alta condutância
Ca_v	Canais para cálcio ativados por voltagem
DAG	Diacilglicerol
DC	Débito cardíaco
ECA	Enzima conversora da angiotensina
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
e.p.m.	Erro padrão da média
ET₁	Endotelina-1
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GPCRs	receptores acoplados à proteína G
GLIB	Glibenclamida
GTP	Trifosfato de guanosina
HA	Hipertensão arterial
IK_{Ca}	Canais para K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de intermediária condutância
i.p.	Via intraperitoneal

IV	Intravenoso
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP₃R	Receptores de 1,4,5-trifosfato de inositol
K_{ATP}	Canais para K ⁺ sensíveis ao ATP
K_{Ca}	Canais para K ⁺ ativados pelo Ca ²⁺
K_{IR}	Canais para K ⁺ retificadores de entrada
K_V	Canais para K ⁺ ativados por voltagem
MAO	Monoamina oxidase
MLC	Cadeia leve da miosina
MLCK	Quinase da cadeia leve de miosina
NAADP	Fosfato de dinucleotídeo de nicotidamida e adenina
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase dependente de Ca ⁺²
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PLCβ1	fosfolipase C β1
pD₂	Logaritmo negativo da concentração responsável por 50% do E _{max}
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGI₂	Prostaciclina
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-ona
RyR	Receptores de rianodina

RyR1	Receptor de rianodina 1
RyR2	Receptor de rianodina 2
ROCCs	Canais para cálcio operados por receptor
ROCK	Cinases dependentes do complexo RhoA-GTP
RVP	Resistência vascular periférica
sGC	Ciclase de guanilil solúvel
SK_{Ca}	Canais para K ⁺ ativados pelo Ca ²⁺ de pequena condutância
SMOCs	Canais operados por segundos mensageiros
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TRP	Canais para cátion potencial receptor transiente
TEA	Cloreto de tetraetilamônio
TXA₂	Tromboxano A2

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 O sistema cardiovascular e o controle da pressão arterial

O sistema cardiovascular é formado pelo coração, conectado a um circuito fechado de vasos sanguíneos preenchidos por plasma sanguíneo e células (SILVERTHORN, 2010). Este sistema é o principal sistema responsável pela regulação e manutenção da pressão arterial. Potanto, contribui de maneira fundamental para a manutenção do funcionamento normal do organismo, pois fornece fluxo sanguíneo adequado para os tecidos e órgãos periféricos (LANFRANCHI; SOMERS, 2002).

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

O sistema neural representado pelos barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares, é responsável pelo controle a curto prazo. Os barorreceptores, por exemplo respondem rapidamente às modificações na pressão arterial (KRIEGER, 1964). O sistema renal pode ser representado pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) que realiza o controle a longo prazo por determinar o balanço hídrico dos fluidos corporais (CONTRERAS et al., 2003). O sistema endócrino exerce uma importante participação no controle da pressão arterial com a ativação e liberação de hormônios que vão interferir sistematicamente na modulação da mesma, tais como norepinefrina, hormônio antidiurético, endotelina e bradicinina que contribuem com a homeostase vascular (GROSS; AIRD, 2000; LI et al, 2008).

A pressão arterial 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 (RVP). 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 na câmara ventricular antes da contração e é determinado pela pressão venosa, que está relacionada ao volume sanguíneo e ao tônus muscular venoso. Já a RVP, por sua vez, é o resultado de modificações tensionais no

músculo liso vascular (CRIBBS, 2006). Todos esses parâmetros são variáveis que são influenciados por diversos mecanismos regulatórios.

1.2 Regulação vascular da pressão arterial

Duas forças agem sobre as artérias: a tensão radial, como resultado da onda de pressão do sangue que se propaga ao longo da árvore arterial e a tensão laminar de cisalhamento em função da força de atrito causada pelo fluxo sanguíneo anterógrado.

Os vasos sanguíneos são formados por uma túnica externa, que é composta por tecido conjuntivo e por filetes nervosos e vasculares; uma túnica média, a camada intermediária composta por células musculares lisas e pequena quantidade de tecido conjuntivo elástico e uma túnica íntima que reveste internamente os vasos, constituída de células endoteliais (ALBERTS et al, 2002).

O tônus vascular, isto é, a atividade contrátil das células musculares lisas vasculares nas paredes das pequenas arteríolas e artérias, é o maior determinante da resistência ao fluxo sanguíneo pela circulação, desempenhando, então, um papel importante na regulação da pressão arterial e na distribuição do fluxo sanguíneo. A regulação desta atividade contrátil das células do músculo liso vascular na circulação sistêmica depende de uma complexa interação de estímulos vasodilatadores e vasoconstritores, de hormônios circulantes, neurotransmissores, fatores derivados de endotélio e da pressão arterial (JACKSON, 2000; CRIBBS, 2006).

O endotélio vascular constitui-se de uma camada única de células, presente na superfície luminal de todo o sistema vascular e contribui para a regulação da pressão arterial de diversas formas (BRYAN et al., 2005). As células endoteliais executam estas funções pela expressão, ativação e liberação de potentes substâncias, como também por estímulos físicos e químicos (mudanças na pressão, estresse por cisalhamento e pH) (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006; INAGAMI; NARUSE; HOOVER, 1995). Então, o endotélio intacto libera localmente, de forma controlada, compostos que induzem vasodilatação, como o óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), prostaciclina (PGI_2) e compostos que induzem vasoconstrição, tais como: endotelina-1 (ET_1), prostaglandina H_2 (PGH_2) e tromboxano A_2 (TXA_2) (BATLOUNI, 2001).

O tônus vascular também pode ser regulado pela atividade dos canais iônicos na membrana das células do músculo liso vascular. Estes canais iônicos estão ativamente envolvidos na determinação do movimento de íons para dentro e para fora das células e, então, são cruciais para a atividade elétrica de nervos, músculos e órgãos sensoriais e são essenciais para a homeostase (BAKER, 2000).

No músculo liso um aumento na concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) é a causa primária para a produção da contração e este efeito pode ser revertido quando se impede alguma etapa do processo contrátil (VAN BREEMEN; SAIDA, 1989). Assim, a regulação da resposta contrátil do músculo liso depende do aumento da $[Ca^{2+}]_i$, que ocorre como resultado da liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares, influxo de Ca^{2+} do meio extracelular, ou ambos. Então, os canais iônicos são importantes nesse processo de regulação da $[Ca^{2+}]_i$ e também por funcionarem como moduladores do potencial de membrana plasmática (KEVIN; NELSON, 2005).

Os canais para K^+ são a maior e mais diversa superfamília de canais iônicos. São proteínas de membrana tetraméricas e desempenham papel chave na excitabilidade e na excitabilidade e via de transdução de sinais celulares (MILLER, 2000; REN et al, 2014). São canais altamente seletivos e pelo menos 10000 vezes mais permeáveis a K^+ que ao Na^+ (DOYLE et al, 1998). Além de serem seletivo, os canais para K^+ são fortemente regulados. Outra propriedade é que muitos canais para K^+ podem ser inativados, o que significa que eles entram em estados não condutores estáveis logo após a abertura (KUANG et al, 2015).

São também a via de condução de íons dominante nas células de músculo liso vascular, uma vez que a atividade dos mesmos contribui para determinação e regulação do potencial de membrana e tônus vascular (JACKSON, 2005; NELSON; QUAYLE, 1995). Comprometimentos na função dos canais para K^+ estão intimamente ligados a um número de condições patológicas que geram ou acompanham malformação vascular ou vasoconstrição (SOLOVIEV et al, 2015).

Os canais para K^+ normalmente pode ser encontrado em três estados diferentes: repouso, ativado e inativado. Os canais estão normalmente fechados em estado de repouso e abertos após estímulos ativadores, seguindo de volta para estados não condutores. A comporta é o processo de controle de abertura e fechamento dos canais (JIANG et al, 2003).

Do ponto de vista molecular, os canais para K^+ representam um diverso grupo de canais iônicos. Eles podem ser divididos em cinco grandes subfamílias: Canais para K^+

dependentes por voltagem (K_v), canais para K^+ relacionados ao QT longo (K_{vLQT}), canais para K^+ retificadores influxo (K_{IR}), canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e canais para K^+ sensíveis ao cálcio (K_{Ca}). Na microcirculação, como em outros músculos vasculares, são identificadas quatro diferentes classes de canais para K^+ : K_v , K_{ATP} , canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de alta condutância (BK_{Ca}) e K_{IR} (JACKSON, 2000; KO et al, 2007; KUANG et al, 2015).

A organização básica dos canais para K^+ é um tetrâmero com cada monômero contendo um domínio formador de um poro. Os quatro domínios formadores dos poros compreendem um poro através dos quais os íons passam (MacKINNON, 2003).

Os K_v compreendem uma classe ubíqua que é ativada por despolarização da membrana em potenciais limiares de ≈ -30 mV. Cada subunidade destes canais é caracterizada por 6 hélices transmembrana, um sensor de voltagem da hélice S1 até a hélice S4 e um poro na região entre S5 e S6 (McCOY; NIMIGEAN, 2012). A maioria dos K_v se abrem quando a membrana está despolarizada (menos negativa dentro) e se fecha quando a membrana está hiperpolarizada (mais negativa dentro) (SWARTZ, 2008).

Os K_{ATP} se fecham quando a concentração de ATP aumenta, porém também são regulados por diversas vias de transdução independentes de mudanças na concentração de ATP (JACKSON, 2000).

Os BK_{Ca} são ativados por aumento no Ca^{2+} intracelular e despolarização da membrana (NELSON, QUAYLE, 1995; CARL et al, 1996). BK vem de “big potassium” e é um tipo particular de K_v que permite uma passagem de uma alta corrente de íons de K^+ através da membrana (MILLER, 1985). Por isso, em baixas concentrações de Ca^{2+} , os BK_{Ca} comportam-se verdadeiramente como K_v (TALUKDER, ALDRICH, 2000). Portanto, os canais BK_{Ca} são tanto voltagem quanto Ca^{2+} dependentes. A ativação por Ca^{2+} ocorre via ligação do Ca^{2+} a múltiplos sítios na região citosólica deste canal.

Os BK_{Ca} participam de muitos processos biológicos incluindo a geração de potenciais de ação, a modulação do tônus vascular e a liberação de hormônios e neurotransmissores (WANG; SIGWORTH, 2009). Comparados com outros K_{Ca} ou outros K_v , os BK_{Ca} têm limiares maiores para ativação por voltagem ou para $[Ca^{2+}]_i$ isolados, este limiar sendo geralmente fora de faixas fisiológicas. Então em células excitáveis a ativação destes canais requer consistente despolarização da membrana e elevação da $[Ca^{2+}]_i$ (SALKOFF et al, 2006; ZHANG; YAN, 2014) além de estarem

fisiologicamente acoplados aos Ca_v a fim de sentir localmente o Ca^{2+} (FAKLER; ADELMAN, 2008).

Os canais para potássio sensíveis ao cálcio de pequena condutância (SK_{Ca}) são não voltagem dependentes, apesar de possuir um domínio sensor de voltagem. O Ca^{2+} os ativa via ligação com a calmodulina, que está constitutivamente ligada a porção citosólica do canal (KEEN et al, 1999).

Os K_{IR} passam correntes de influxo de K^+ muito mais prontamente que correntes de efluxo em gradientes fisiológicos de íons e observa-se um grande aumento da condutância com aumentos na concentração de K^+ extracelular. Este subtipo de canal tem funções fisiológicas diversas nas células, dependendo do tipo e da localização, e é modulado por diversos mediadores, como íons, fosfolipídios e proteínas ligantes. Uma característica única dos K_{IR} é que eles conduzem íons K^+ na hiperpolarização ao invés de outros canais para K^+ que o fazem na despolarização (HIBINO et al, 2010).

As duas subunidades destes canais têm apenas duas hélices transmembrana com um poro entre elas, correspondente e homólogo aos segmentos S5 e S6 dos canais K_v . Possuem também um domínio citosólico composto tanto de C quanto de N terminais do canal que ajuda a regular a comporta do canal (HIBINO, 2010).

Todos esses canais desempenham papel importante na manutenção do tônus vascular, na formação do potencial de repouso e no mecanismo de ação de diversas substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras (JACKSON, 2000).

O gradiente eletroquímico para os íons K^+ faz com que a abertura dos canais para K^+ resultem na difusão deste cátion para fora da célula, culminando numa hiperpolarização da membrana (JACKSON, 2000). Este efeito é seguido pelo fechamento dos canais para cálcio dependentes de voltagem (Ca_v ou VOCCs = *voltage-operated Ca^{2+} channels*), levando à redução da entrada do Ca^{2+} e vasodilatação (KO et al., 2008; NELSON; QUAYLE, 1995). A contração da célula muscular lisa é iniciada por uma elevação da $[\text{Ca}^{2+}]$ que ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK), causando fosforilação da miosina, ou pela sensibilização dos miofilamentos ao Ca^{2+} através da inibição da miosina fosfatase (SOMLYO; SOMLYO, 1994).

Todos estes sinais são integrados no miócito vascular para determinar a atividade contrátil do músculo liso vascular, estabelecendo assim o diâmetro e a resistência dos vasos sanguíneos (JACKSON, 2005).

Duas vias clássicas aumentam o influxo de Ca^{2+} para a contração do músculo liso, são os mecanismos de acoplamento farmacomecânico e eletromecânico. Os

mecanismos que levam a uma resposta contrátil através do acoplamento eletromecânico são devido a uma despolarização de membrana diretamente pelo aumento da concentração extracelular de potássio ou indiretamente pela ligação dos agonistas aos seus receptores levando à abertura de Ca_v , causando aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e, consequentemente, a contração (REMBOLD, 1996). Por exemplo, a despolarização da membrana induzida pelo aumento da concentração de K^+ extracelular, promove influxo de Ca^{2+} através da abertura de canais Ca_v , causando contração (BULBRING; TOMITA, 1987).

Os mecanismos farmacomecânicos da contração ocorrem quando um agonista como a fenilefrina, a angiotensina II, a adrenalina entre outros, se ligam a seus receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata do inositol, através da proteína Gq ou G_{11} , cujas suas subunidades α ativam a fosfolipase C $\beta 1$ ($\text{PLC}\beta 1$) e, consequentemente, promovem hidrólise de fosfolipídios presentes na membrana do tipo 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP_2), produzindo o 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG) (BERRIDGE, 2008; BILLINGTON; PENN, 2003).

Adicionalmente, o IP_3 estimula a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático por sua ligação aos receptores de IP_3 (IP_3R), que são canais para Ca^{2+} ativados pelo IP_3 . Os receptores de rianodina (RyR), que são canais para Ca^{2+} ativados pelo próprio Ca^{2+} , são ativados pelo Ca^{2+} previamente liberado via IP_3R num processo denominado de liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} e juntamente com os IP_3R aumentam a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (DELLIS et al., 2006). Isso transloca a proteína quinase C ou proteína quinase dependente de Ca^{2+} (PKC) para a membrana plasmática, onde é ativada quando entra em contato com o DAG e Ca^{2+} . A PKC fosforila proteínas alvo específicas, como os Ca_v presentes na membrana plasmática ativando-os, promovendo o influxo de Ca^{2+} (BERRIDGE, 2009).

O Ca^{2+} aumentado também interage com a calmodulina e subsequentemente interage com a MLCK levando a sua fosforilação. A fosforilação da MLC leva a ciclicização das pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina, com consequente desenvolvimento da contração (GARRET; GRISHAM, 1995; REMBOLD, 1996; OGUT; BROZOVICH, 2003).

A via de sinalização do Ca^{2+} é um dos maiores sistemas sinalizadores nas células que regula muitas funções fisiológicas. Por isso, existem muitos canais que controlam sua entrada do meio externo para o citoplasma celular e sua liberação dos estoques

internos. Por exemplo, agonistas podem agir diretamente nos canais operados por receptor (ROCCs) na membrana plasmática e permitir que o Ca^{2+} do meio externo entre na célula; segundos mensageiros como DAG, GMPc e ácido araquidônico agem no lado citoplasmático abrindo canais operados por segundos mensageiros (SMOCs) na membrana plasmática; a despolarização da membrana ativa Ca_v na própria membrana plasmática e permite o influxo de Ca^{2+} externo; a despolarização da membrana também ativa uma isoforma específica de Ca_v , o canal $\text{Ca}_v1.1$ tipo L que ativa o receptor de rianodina 1 (RyR1) no músculo esquelético através de um mecanismo de acoplamento conformacional direto; o influxo de Ca^{2+} advindo do Ca_v também ativa receptores de rianodina 2 (RyR2) que libera o Ca^{2+} estocado no retículo sarcoplasmático através do processo de liberação de Ca^{2+} induzido por Ca^{2+} , mecanismo esse encontrado em músculos e neurônios; e por último agonistas agem em receptores da superfície gerando IP_3 que então se difunde dentro da célula e age sobre IP_3R para liberar Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (BERRIDGE, 2009).

Então, resumidamente, o Ca^{2+} atravessa a membrana plasmática pelos canais Ca_v , canais operados por agonistas (AOCs), ROCs, SMOCs e canais operados por estoque (SOCs). Já dos estoques, a liberação do Ca^{2+} ocorre por RyRs, IP_3R e pela liberação de Ca^{2+} controlada por fosfato de dinucleotídeo de nicotidamida e adenina (NAADP) (BERRIDGE, 2009).

Portanto, os mecanismos de contração do músculo liso envolvem a participação de vias de transdução, que convergem para o aumento das concentrações de Ca^{+2} citoplasmático, sendo este aumento por entrada deste íon por Ca_v e ROCC ou ainda por liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (WANG et al, 2008). Os canais para cátion potencial receptor transiente (TRP) são também considerados como importantes proteínas candidatas a mediar entrada de Ca^{2+} não relacionada a voltagem no endotélio vascular e músculo liso (ZHOLOS, 2010; EARLEY, 2012).

Por outro lado, os mecanismos que levam ao relaxamento podem envolver múltiplas vias de sinalização. Em células musculares lisas, tanto fatores derivados do endotélio como o potencial de membrana são importantes na regulação do tônus vascular (IGNARRO et al, 1987).

Em resumo, os vasoconstritores agem elevando a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, bem como, aumentando a sensibilidade dos processos contráteis ao Ca^{2+} na célula muscular lisa.

Por outro lado, agentes vasodilatadores exercem efeitos opostos na $[Ca^{2+}]_i$ neste tipo celular. Em contraste com as células musculares lisas, um aumento na $[Ca^{2+}]_i$ em células endoteliais resulta em relaxamento vascular através de fatores relaxantes derivados de endotélio como NO, PGI₂ e EDHF. Portanto, os canais iônicos são alvos para ação de muitas drogas usadas no tratamento da hipertensão (BAKER, 2000).

O mecanismo de ação de algumas drogas vasorrelaxantes requer a participação de segundos mensageiros como o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O NO, por exemplo, age principalmente ativando a enzima citosólica ciclase de guanilil solúvel (GCs), ao se ligar ao grupo heme desta enzima. A ativação da GCs resulta no aumento dos níveis de GMPc, pela conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em GMPc (MILLER et al., 2004; LIU; HUANG, 2008). O segundo mensageiro GMPc ativa proteína quinase G, ou também chamada proteína quinase dependente de GMPc (PKG) que leva a redução dos níveis de Ca^{2+} intracelular das células musculares lisas, diminuição da sensibilidade do sistema contrátil para o Ca^{2+} , desfosforilação da MLC e ativação dos canais para K^+ que resulta em relaxamento muscular (CARVAJAL et al, 2000).

Outro mecanismo de relaxamento do músculo liso ocorre por acoplamento farmacomecânico via GPCR acoplado a proteína G_s, cuja subunidade α ativa a ciclase de adenilil (AC) e conseqüentemente gera monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). O aumento nos níveis citosólicos de AMPc e GMPc nas células musculares lisas é considerado um dos mais importantes mecanismos que medeiam seu relaxamento sob condições fisiológicas (PUETZ; LUBOMIROV; PFITZER, 2009).

Dessa forma, ambas as proteínas quinases (PKA e PKG) fosforilam vários substratos, levando principalmente a ativação de canais para K^+ , que causam a desativação dos Ca_v ; inibição dos Ca_v ; aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase tanto do retículo sarcoplasmático como da membrana plasmática, diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ por ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} ; redução da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático pela PKG através da fosforilação dos IP₃R; inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo cálcio-calmodulina; inativação da RhoA por fosforilação do resíduo Ser¹⁸⁸, translocando-a para o citosol; fosforilação do resíduo de Ser⁶⁹⁵ da MYPT1 impedindo a fosforilação do resíduo de Thr⁶⁹⁵ pela RhoA quinase (ROCK); fosforilação do telokin um ativador endógeno da proteína de cadeia leve da miosina (MLCP)

(MAKHLOUF; MURTHY, 1997; REMBOLD, 1996; BLAUSTEIN, 1989; BERRIDGE, 2009, MURTHY, 2006; REMBOLD, 1992).

1.3 Doenças cardiovasculares e hipertensão

A regulação da pressão arterial é uma das funções fisiológicas mais complexas, que depende de ações integradas de vários sistemas, dentre eles o cardiovascular. Mudanças na estrutura e na função dos vasos e consequente aumento da resistência vascular periférica são alterações características das doenças cardiovasculares (TAHVANAINEN et al, 2006).

A hipertensão arterial (HA) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de PA acima de 140/90 mmHg. Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais. Atualmente, é tida como um grave problema de saúde pública devido ser uma das principais causas de doenças cardiovasculares (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010).

A hipertensão essencial ou hipertensão primária é a forma de hipertensão que não tem uma causa atribuível e identificável. A HA juntamente com as doenças cardiovasculares relacionadas são as principais causas de morte em países desenvolvidos e em desenvolvimento, causando um grande impacto na saúde humana. Segundo dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são responsáveis por um terço do total de mortes em todo o mundo e cerca de 80% destas ocorrendo em países em desenvolvimento (GAZIANO, 2006; WHO, 2011). A OMS ainda estimou que das 57 milhões de mortes que ocorreram globalmente em 2008, 36 milhões ou 63% delas ocorreram por doenças não transmissíveis, sendo as doenças cardiovasculares as líderes nesta classificação (WHO, 2013). Estima-se que 23,3 milhões de pessoas no mundo inteiro irão morrer anualmente de doenças cardiovasculares em 2030 (MATHERS, LONCAR, 2006).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares são o fumo, a inatividade física, o consumo de dietas não saudáveis e de álcool. Estes fatores de risco são comuns a outras doenças não transmissíveis como

câncer, diabetes e doenças respiratórias crônicas porque a exposição a longo prazo desses fatores leva ao aumento da pressão arterial, aumento da glicemia, aumentos e anormalidades na lipídemia e obesidade (WHO, 2011).

A HA apresenta elevados custos médicos e socioeconômicos decorrentes principalmente das complicações que a acompanham, tais como: acidente vascular cerebral (AVC), doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca e insuficiência renal crônica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010). Outros estudos ainda mostram que o diagnóstico, muitas vezes precoce, e tratamento generalizado de baixo custo com medicamentos surtiram efeito, reduzindo significativamente a pressão arterial média nessa população, contribuindo assim para uma redução nas mortes por doenças relacionadas ao sistema cardiovascular (CAIN; KHALIL, 2002; WHO, 2012).

Em várias doenças cardiovasculares, incluindo a HA, ocorre disfunção endotelial gerando vasoconstrição, acúmulo de lipídios, aumento da adesão leucocitária, proliferação de células do músculo liso vascular, agregação plaquetária, trombose entre outros (GIRARDI; GIRARDI; PETERS, 2006).

As alterações observadas na HA decorrem, em parte, do aumento na contratilidade da camada muscular lisa que forma a parede da artéria, o que acarreta o aumento do tônus vascular, que pode ocorrer devido à mudanças na estrutura e na função dos vasos e, conseqüentemente, aumento da RVP (TAHVANAIMEEN et al., 2006). Estas disfunções incluem aumento da relação parede versus luz das artérias e da resistência periférica, aumento da quantidade da massa cardíaca e muscular lisa, diminuição da complacência venosa e aumento da vasoconstrição com redução da vasodilatação, tanto dependente como independente do endotélio vascular (FOLKOW, 1982; SAFAR et al, 1981).

1.4 Tratamento medicamentoso e não medicamentoso para a hipertensão

A OMS recomenda um conjunto de intervenções políticas de baixo custo para melhorar o acesso a intervenções básicas de acesso a saúde, incluindo medicamentos essenciais e tecnologias médicas acessíveis necessárias para a detecção precoce e tratamento oportuno de doenças não transmissíveis.

Partindo-se de 115/75 mmHg de pressão arterial, o risco de doenças cardiovasculares duplica a cada aumento de 20/10 mmHg (CHOBANIAN et al, 2003).

Então um tratamento bastante eficaz para diminuir o risco de doenças cardiovasculares consiste em diminuir níveis de pressão arterial.

A recomendação inicial do Sétimo Relatório do Comitê Nacional Articulado sobre Prevenção, Detecção, Avaliação e Tratamento da Hipertensão Arterial (JNC 7) é que o tratamento seja iniciado com uma modificação do estilo de vida, e se isto não surtir efeitos, deve ser iniciado o tratamento farmacológico.

A primeira recomendação das Diretrizes Baseadas em Evidências de Hipertensão em Adultos para população geral com idade de 60 anos ou mais é iniciar o tratamento farmacológico para diminuição da pressão arterial em níveis de pressão arterial sistólica iguais ou superiores a 150 mmHg e de pressão arterial diastólica iguais ou superiores a 90 mmHg e tratar para alcançar níveis de pressão arterial menores que esses (JAMES et al, 2014). Se o tratamento for capaz de diminuir os níveis de pressão arterial e não estiver associado a efeitos adversos o mesmo não deve ser ajustado (JAMES et al, 2014).

Nem todos os pacientes hipertensos diagnosticados com HA requerem medicação, mas aqueles de alto e médio risco necessitam de um ou mais dos oito os tipos de medicamentos essenciais para diminuir o de risco cardiovascular. São eles: diuréticos tiazídicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), bloqueadores de canais de Ca^{2+} de ação prolongada, beta bloqueadores, metformina, insulina, estatina e aspirina (WHO, 2013).

O documento mais abrangente e recente publicado sobre o tratamento anti-hipertensivo é as Diretrizes para o Tratamento da Hipertensão Arterial da Sociedade Europeia de Hipertensão e o Guia da Sociedade Europeia de Cardiologia para o Tratamento da Hipertensão (MANCIA et al, 2013). Este guia recomenda modificação do estilo de vida em pacientes hipertensos além de tratamento inicial com ou sem anti-hipertensivos bloqueadores de canais de Ca^{2+} ou inibidores do sistema renina angiotensina aldosterona. Essas diretrizes recomendam mudanças no estilo de vida como: restrição ao sal, moderar o consumo de álcool, aumento do consumo de frutas e vegetais além de diminuir o consumo de gordura, redução e manutenção do peso corporal com a prática regular de exercícios físicos (MANCIA, 2013).

As Diretrizes do Instituto Nacional de Saúde e Excelência em Hipertensão de 2011, publicado em Colaboração com a Sociedade Britânica de Hipertensão recomendam bloqueadores da ECA e bloqueadores de receptores de angiotensina II como terapia de primeira linha para pacientes com hipertensão e idade menor que 55

anos, uma vez que maiores de 55 anos ou descendentes de africanos devem utilizar um bloqueador de canal de Ca^{2+} . Nelas também nenhum grupo de diuréticos é considerado como agente de primeira linha, a não ser que o paciente seja incapaz de tolerar outros fármacos.

Segundo o JNC 7, para hipertensão não complicada, diuréticos tiazídicos devem ser usados no tratamento medicamentoso, em maior parte, isoladamente ou em combinação com outras classes de drogas, uma vez que são a base terapêutica anti-hipertensiva para a maioria dos ensaios controlados com placebo. Porém existem excelentes dados de ensaios clínicos provando que as reduções da pressão arterial com outras classes de fármacos também reduzem as complicações da HA (inibidores da ECA, bloqueadores de receptores de angiotensina II, beta bloqueadores, bloqueadores de canais de Ca^{2+}). Isto delinea condições específicas de alto risco, que são indicadores convincentes para o uso de outras classes de drogas (CHOBANIAN, 2003).

Mais de dois terços dos indivíduos hipertensos não podem ter níveis de pressão arterial controlados com apenas um fármaco e requer dois ou mais agentes anti-hipertensivos de diferentes classes (CHOBANIAN, 2003).

Apesar da boa qualidade dos resultados promovidos pelos diuréticos tiazídicos como terapia anti-hipertensiva, muitos especialistas em hipertensão ainda preferem os inibidores da ECA e bloqueadores dos receptores de angiotensina II como fármacos iniciais de escolha nesta condição (OWEN; REISIN, 2015).

O uso de beta-bloqueadores para o tratamento da hipertensão na obesidade e síndrome metabólica tem enfrentado críticas no passado devido ao efeitos negativos secundários de agentes beta-bloqueadores tradicionais, que incluem piora na tolerância à glicose, dislipidemia e incapacidade de perder peso (RIPLEY; SASEEN, 2014; MESSERLI; GROSSMAN, 2004). No entanto, é observado que nos pacientes hipertensos ocorre aumento do tônus simpático e parece razoável que o bloqueio simpático pode fornecer benefícios adicionais nesta subpopulação (OWEN; REISIN, 2015). Porém BRADLEY et al (2006) e WIYONGE et al (2012) relataram que os beta-bloqueadores podem ser inferiores a algumas outras classes de medicamentos no que se refere a alguns resultados como mortalidade total e eventos cardiovasculares.

Os antagonistas de Ca^{2+} são um pouco mais eficazes que as demais classes na prevenção de acidente vascular cerebral, porém não está claro se este efeito pode ser atribuído a um efeito protetor sobre a circulação cerebral ou a sua ligeira melhoria no

controle mais uniforme da pressão arterial (MANCIA et al, 2013; MANCIA et al, 2009).

Um inibidor direto da renina no local da sua ativação, está disponível para o tratamento de doentes hipertensos, tanto como monoterapia como em combinação com outros agentes anti-hipertensivos. Os medicamentos ativos centralmente e os bloqueadores dos receptores alfa também são agentes eficazes (MANCIA, 2013).

Mesmo com alta diversidade terapêutica para o tratamento da HA, mais de 200 fármacos empregados no tratamento da HA, estudos apontam que, no Brasil, apenas 30 % das pessoas portadoras de hipertensão têm um controle efetivo da pressão arterial, enquanto pacientes americanos chegam a cerca de 50 % (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010; MOSER, ROCELLA, 2013). Além disso, quase 50% dos pacientes suspendem o tratamento dentro de seis meses devido à baixa eficácia e aos efeitos colaterais (COGOLLUDO; VIZCAÍNO-PÉREZ; TAMARGO, 2005). Tudo isso impulsiona a pesquisa em busca e desenvolvimento de novas drogas anti-hipertensivas.

Considerando ainda que a HA é um dos principais e mais incidentes problemas de saúde pública, acometendo direta ou indiretamente o funcionamento de órgãos nobres (coração, rins, vasos) e acarretando elevados níveis de morbidade e mortalidade na população, torna-se imperativa a necessidade de aprofundamento nesta área, no sentido de descobrir e validar a utilização de novos fármacos e alvos terapêuticos, úteis no tratamento desta enfermidade, e que sejam cada vez mais específicos, para que menos efeitos colaterais sejam desencadeados (FERRONI et al, 2006).

Além disto, os produtos naturais podem ser usados como modelos químicos para síntese parcial ou total de novos agentes terapêuticos. Tendo isso em vista, torna-se necessário a descoberta de novas drogas com objetivos de promover efeitos vasorrelaxantes e hipotensores, desvendando seus mecanismos de ação.

1.5 Produtos naturais e sintéticos bioativos

Desde a Idade Antiga, as plantas medicinais são utilizadas por diversas civilizações para o tratamento de diversos males, sendo a mais antiga e principal forma de medicação difundida no mundo. Os extratos de produtos naturais foram os primeiros,

e por um longo período, os únicos medicamentos disponíveis para a humanidade (GANESAN, 2008). No final do século XIX, a busca por medicamentos menos tóxicos resultou na introdução de substâncias sintéticas na terapêutica e seu uso foi amplamente disseminado no século XX (OLIVEIRA et al., 2008). Considerando a alta prevalência de HA e a necessidade de tratamento para doenças cardiovasculares, muitos estudos têm sido realizados para medir o vasorrelaxamento induzido por produtos naturais (DANTAS et al, 2014; RIBEIRO et al, 2010).

Historicamente, a química orgânica desenvolveu-se paralelamente com o estudo científico das plantas, formas de vida que mais tem contribuído para o tratamento de doenças que acometem o ser humano (MONTANARI et al., 2001). A síntese de substâncias orgânicas foi impulsionada devido a sua dificuldade de obtenção de produtos naturais com relativo grau de pureza a partir de produtos naturais, bem como a determinação de suas estruturas moleculares (BARREIRO et al, 1997).

Nas últimas décadas, os progressos alcançados pela química medicinal sintética mudaram o panorama da terapêutica moderna. Os extratos vegetais brutos de composição química complexa foram substituídos ou otimizados por substâncias puras de composição e estrutura química definidas, que podem se tornar fármacos úteis no tratamento de diversas patologias (BARREIRO; FRAGA, 2001). Os próprios produtos naturais têm inspirado avanços na química orgânica, conduzindo à otimização das metodologias sintéticas e à possibilidade de análogos de compostos originais, com melhores propriedades farmacológicas (HARVEY, 2008).

Com isso, os produtos sintéticos e semi-sintéticos se destacam em diversidade e em competitividade em relação aos produtos naturais em diversos setores industriais, sendo então predominantes, atingindo cerca de 75 % do total de fármacos consumidos no mundo, devido principalmente ao seu maior rendimento químico, menor custo e elevado grau de pureza (BARREIRO, 1990; PINTO et al., 2002). A descoberta de novas drogas de origem sintética ou semi-sintética tornou-se possível devido avanços científicos-tecnológicos em áreas como biologia estrutural, molecular e química computacional.

Neste contexto, são produzidas diversas substâncias com potencial farmacológico, incluindo as que atuam no controle da resistência vascular e outros mecanismos envolvidos na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares.

1.6 A isatina e seus derivados

A isatina é um composto indólico endógeno, amplamente distribuído em diversos tecidos e fluidos biológicos de mamíferos (Figura 01) (GLOVER et al., 1988; GLOVER, BHATTACHARYA, SANDLER, 1991; MEDVEDEV, 1996). Na natureza é encontrada em plantas do gênero *Isatis*, em *Couropita guianensis aubl* e *Calanthe discolor* Lindl. e secretado de glândulas parótidas de sapos do gênero *Bufo* (BERGMAN et al, 1988, SILVA et al, 2001). Ela foi obtida, pela primeira vez, por Erdman (1840) e Laurent (1840) como um produto a partir da oxidação do corante índigo por ácido nítrico e ácido crômico.

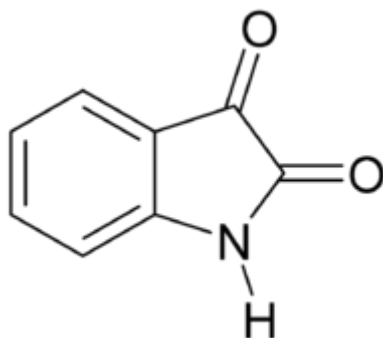


Figura 01 - Estrutura molecular da isatina.

GLOVER e colaboradores em 1980 encontraram evidências de um inibidor da monoamina oxidase (MAO) endógena em urina humana e deram-lhe o nome de tribulina. A tribulina é justamente o nome que se dá a uma família de substâncias não endógenas que inibem a MAO e a ligantes benzodiazepínicos. A MAO é uma enzima que metaboliza uma grande variedade de monoaminas e é importante no controle da concentração de neurotransmissores. A isatina foi o primeiro componente da tribulina identificado, substância essa que foi originalmente sintetizada para usos na fabricação de corantes e química analítica (GLOVER, 1988). Investigações mostram que a isatina age inibindo seletivamente a MAO B como um inibidor da ciclase de guanilil ligada a membrana estimulada pelo peptídeo natriurético atrial e como um inibidor da ciclase de guanilil solúvel (sGC) estimulada por óxido nítrico em baixas concentrações (até 10 nM) (GLOVER, MEDVEDEV, SANDLER, 1995; MEDVEDEV et al, 1996; MEDVEDEV et al, 2002).

A excreção de tribulina em urina humana aumenta durante várias condições como estresse e ansiedade (CLOW et al, 1988). Em roedores a isatina é anorexígena e sua excreção urinária está aumentada após a exposição ao frio (TOZAWA et al, 1998). Já em ratos o estresse causa um aumento de 2 a 3 vezes na concentração normal dessa substância no cérebro e no coração (IGOSHEVA et al, 2004).

A isatina tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e é encontrada distribuída no cérebro de ratos de maneira distinta e descontínua no núcleo do hipocampo, no córtex, no hipotálamo e no cerebelo. A concentração no hipocampo é de aproximadamente 0,1 µg/g, ou cerca de 1 µM (WATKINS et al, 1990; BHATTACHARYA, 1991). No sangue as concentrações podem exceder 1 µM, já no coração as concentrações máximas basais aproximam-se de 3 µM (IGOSHEVA, MATTA, GLOVER 2004; MEDVEDEV et al, 2007).

A isatina tem se mostrado como agente promissor para o descobrimento de novos fármacos uma vez que tem um baixo custo de produção e possui uma estrutura que permite a realização de modificações químicas em sua estrutura para síntese de novas substâncias com efeitos no sistema cardiovascular e sobre ação em vários alvos biológicos como canais iônicos (GABRIEL et al, 2010; AHRING et al, 2000; MAROÑAS et al, 2008; Medvedev et al, 1999).

Vários são os efeitos fisiológicos da isatina, desde efeitos anticonvulsivantes (SAREEN et al, 1962), proconvulsivantes (BHATTACHARYA; CHAKRABARTI, 1998), ansiogênicos com aumento nos níveis de cortisol (PALIT, 1997), antimicrobiano (RAJ et al, 2003), sedativo (BHATTACHARYA, 1991) e inibidores tanto do consumo de água como de alimentos (MORLEY et al, 1996). Baixas concentrações de isatina (na faixa de 10^{-8} a 10^{-6} M) podem atenuar a estimulação da sGC dependente da estimulação de NO de plaquetas humanas.

Em altas doses, como as de 50, 80 e 200 mg/kg, a isatina aumenta a concentração de monoaminas como dopamina, 5-hidroxitriptamina e noradrenalina no cérebro de ratos (MCINTYRE, NORMAN, 1990; BHATTACHARYA, ACHARYA, 1993; HAMAUE et al., 1994), mas esse efeito é pouco provável que seja devido a sua ação inibindo a MAO, pelo menos abaixo de 100 mg/kg, uma vez que Panova (1997) mostrou que a dose de 10 mg/kg não protege nem a MAO A nem a MAO B contra a subsequente administração de fenelzina, um inibidor não seletivo e irreversível da MAO.

Esse composto também tem mostrado efeitos em membranas cerebrais, cardíacas e renais agindo inibindo a ciclase de guanilil estimulada pelo peptídeo natriurético atrial, reduzindo a formação de GMPc (GLOVER, 1995; MEDVEDEV et al, 2005).

A isatina também é considerada um substrato sintético muito versátil, ou seja, é um composto que apresenta uma estrutura molecular que pode ser facilmente modificada originando diversos compostos derivados da mesma, compostos estes heterocíclicos, tais como indoís e quinolonas, e também podem ser utilizados como matéria-prima para a síntese de diversas drogas (SILVA, 2001). Assim como a isatina, os seus derivados apresentam diversas atividades biológicas.

Estudos mostram que compostos derivados da isatina tem grande potencial terapêutico por agir em diversas vias no nosso organismo. Portanto, é de fundamental importância compreender os diferentes mecanismos de ação produzidos por compostos desta classe para estabelecer novas estratégias terapêuticas, afim de tratar diversas doenças cardiovasculares, a exemplo da hipertensão.

Têm sido descritos diversos efeitos fisiológicos da isatina e seus derivados, como antiapoptóticos (CHAPMAN et al, 2002), antimalárico (NISHA, et al, 2014), anti-tuberculose (RAJ et al, 2014), anti-inflamatórios (FERNANDES et al, 2014), anticonvulsivantes (SAREEN et al, 1962; BHATTACHARIA, CHAKRABARTI, 1998), antimicrobianos (RAJ et al, 2003), ansiolíticos (BHATTACHARYA et al, 1991), sedativos-hipnóticos (ZAPATA-SUDO et al, 2007), anticancerígenos (PREMANATHAN et al, 2012; ARUN et al, 2014), anti-HIV (SHRUTHI et al, 2015), cardiovasculares (GARCÍA-VILLALÓN et al, 2011), anti-depressivo e antioxidantes (GLOVER, MEDVEDEV, SANDLER, 1995).

Estudos com preparações de rim isolado realizadas pelo grupo de Santos Neto (2008) mostraram que a própria isatina apresentou efeitos diuréticos e natriuréticos próprios na dose de 10 nM, fenômeno este parcialmente associado ao seu grande aumento na pressão de perfusão não tendo correspondência autoregulatória na resistência vascular renal, podendo, portanto, ter contribuições no aumento efetivo na carga filtrada.

Em uma revisão, MEDVEDEV et al, 2007 nos mostram os diversos alvos biológicos da isatina e de seus derivados. Entre eles estão a MAO, as enzimas citosólicas glicerol-3-fosfato desidrogenase, piruvato quinase e ubiquitina. Tem ainda

sido mostrado efeitos sobre proteases, caspases, transcriptase reversa, (IYER; HANNA, 1995; LEE et al, 2001; SRIRAM et al, 2005). Outro estudo mostra que um derivado da indirubina que é obtida a partir da dimerização da isatina possui potentes atividades inibitórias de quinases dependentes de ciclina e algumas outras quinases farmacologicamente importantes (LECLERC et al, 2001).

Os estudos que analisam os efeitos da isatina e de seus derivados no sistema cardiovascular ainda são restritos. O grupo composto por Maroñas et al (2008) e Gabriel et al (2011) estudaram novos compostos derivados de isatina e ambos apresentaram efeitos vasodilatadores de aorta de ratos, efeitos inotrópicos em preparações de músculos cardíacos isolados, além de alguns deles apresentarem efeitos hipotensores em estudos. Matheus et al, 2007 demonstraram que substituições na isatina por halogênios e outros afetaram na produção de NO em cultura de células de camundongos, possivelmente por afetar na expressão da COX-2 e/ou na iNOS. O NO é um gás muito importante devido a seus efeitos cardiovasculares.

Um estudo realizado por Hamaue e colaboradores em 1999 mostraram que altas doses de isatina quando administradas por via intraperitoneal (i.p.) não causaram qualquer alteração cardiovascular ou comportamental tanto em ratos *stroke-prone spontaneously hypertensive rats* (SHRSP) e quanto em ratos Wistar-Kyoto (WKY). Já o tratamento por via oral com altas doses causou aumento na pressão arterial dos ratos WKY comparados aos seus controles não tratados, porém não ocorreram efeitos tóxicos.

Tendo em vista a necessidade da descoberta de novas drogas que possam ter efeitos benéficos no sistema cardiovascular e à baixa quantidade de estudos dos derivados da isatina nesse sistema, este estudo buscou investigar se novos derivados da isatina poderiam promover efeitos vasorrelaxantes e hipotensores em ratos Wistar. Partiu-se para investigar se os derivados da isatina atuam no endotélio vascular ou em canais iônicos dos músculos lisos dos vasos sanguíneos periféricos de resistência causando vasorrelaxamento, resultando em queda da pressão arterial, contribuindo para diminuir as complicações decorrentes dos quadros hipertensivos. Os novos compostos derivados da isatina testados foram o éster etil 2-[5-indole-6,7-diona]-2-acético, o ácido 2-[5-indole-6,7-diona]-2-acético, o 1-(4-clorobenzoila)indol-2,3-dione e o 1-benzoindol-2,3-dione (IS-AK1, IS-BK1, B-001 e D-001, respectivamente). Suas estruturas moleculares são apresentadas na figura 02.

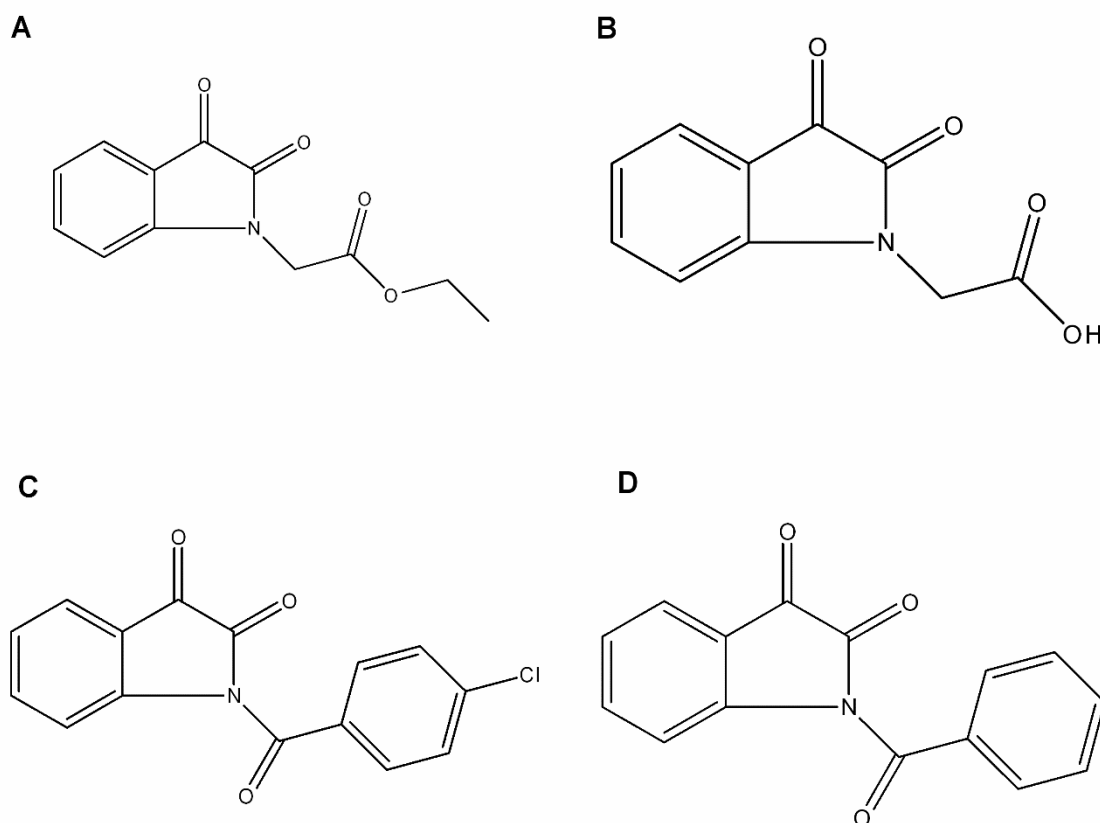


Figura 02 - Estruturas moleculares dos quatro compostos derivados da isatina testados. **A.** Estrutura molecular do IS-AK1. **B.** Estrutura molecular do IS-BK1. **C.** Estrutura molecular do B-001 e **D.** Estrutura molecular do D-001.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar os efeitos cardiovasculares dos derivados das isatinas éster etil 2-[5-indole-6,7-diona]-2-acético, ácido 2-[5-indole-6,7-diona]-2-acético, 1-(4-clorobenzoila)indol-2,3-dione e 1-benzoindol-2,3-dione (IS-AK1, IS-BK1, B-001 e D-001, respectivamente) em ratos Wistar e ratos SHR, elucidando os possíveis mecanismos de ação envolvidos na resposta do composto mais promissor, utilizando abordagens *in vivo* e *in vitro*.

Objetivos específicos

Testes *in vitro*

- Avaliar os efeitos dos derivados da isatina, IS-AK1, IS-BK1, B-001 e D-001 em artéria mesentérica cranial isolada de ratos normotensos, elucidando os mecanismos de ação implicados no efeito;
- Elucidar os possíveis mecanismos de ação do derivado da isatina que apresentar resposta mais promissora observando:
 - ✓ A participação do endotélio no vasorrelaxamento produzido;
 - ✓ A participação da sGC solúvel no efeito induzido pelo composto;
 - ✓ A participação de canais para K^+ e seus subtipos no efeito induzido pelo composto;
 - ✓ A participação de canais para Ca^{2+} no efeito induzido pelo composto.

Testes *in vivo*

- Caracterizar os efeitos do tratamento agudo periférico com o derivado da isatina mais promissor sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos normotensos e hipertensos não anestesiados.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR, *spontaneously hypertensive rats*) pesando entre 250 e 300 g com idade entre 13 e 14 semanas. Todos os animais foram provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPEFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, cada uma contendo seis ratos, mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a $21 \pm 1^\circ \text{C}$, com livre acesso a uma dieta à base de ração tipo pellets (Purina®) e água disponível em garrafas de polietileno com bicos de aço inoxidável, encaixadas na parte superior da grade metálica da gaiola. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6:00 às 18:00 horas.

Os procedimentos descritos no presente projeto foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética e Uso Animal (CEUA) do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba sob parecer CEUA nº 0111/14 (ANEXO 1).

3.2 Drogas e ferramentas farmacológicas

Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes substâncias: heparina (Parinex® 5000 U.I/ml - Laboratório Hipolabor Brasil); cloridrato de cetamina (Quetamina® Laboratório – Vetnil, Brasil); xilazina (Dopaser - Laboratório Calier, Espanha). Cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN); cloridrato de acetilcolina (ACh); 1 H-[1,2,4] oxadiazólo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ); glibenclamida (GLIB); cloreto de tetraetilamônio (TEA); 4-aminopiridina (4-AP); cloreto de bário (BaCl_2) e cloreto de potássio (KCl). Todas foram obtidas da Sigma-Aldrich®.

3.3 Substâncias testes: Derivados da isatina

Foram testados 4 derivados das isatinas (IS-AK1, IS-BK1, B-001 e D-001), cedidos pela colaboração com o Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica do Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, pertencente ao Departamento de Química da UFPB.

Os derivados das isatinas foram solubilizados utilizando Cremophor[®] (Sigma Aldrich[®]), em seguida diluídos nas concentrações desejadas, de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. Para estudos *in vivo* as substâncias teste foram diluídas em salina de NaCl (0,9%) e para estudos *in vitro* as diluições foram realizadas com água destilada. A solubilização e diluição foram realizadas momentos antes de sua utilização nos experimentos. As soluções foram estocadas ao abrigo da luz em recipientes fechados até a utilização.

A concentração de Cremofor[®] utilizada na cuba não excedeu 0,01%. Nesta concentração o cremofor não demonstra quaisquer efeitos em anéis de artéria mesentérica cranial de rato (MACEDO, 2014).

3.4 Protocolos *in vitro*

3.4.1 Soluções nutritivas

Nos protocolos *in vitro* foram utilizadas soluções nutritivas (pH = 7,4) aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantidas a 37° C. Para preparação das soluções nutritivas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl₂.2H₂O), cloreto de magnésio hexa-hidratado (MgCl₂.6H₂O), glicose (C₆H₁₂O₆), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), fosfato de sódio mono-hidratado (NaH₂PO₄.H₂O) e fosfato de sódio (NaH₂PO₄), todos obtidos da Sigma-Aldrich[®]. A composição em mM de cada sal é descrita no Quadro 1 a seguir.

Quadro 1: Composição da solução nutritiva de Tyrode (TANAKA et al, 1999).

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

Na preparação da solução Tyrode com cloreto de potássio na concentração de 60 mM, a concentração de Na⁺ foi isosmoticamente alterada conforme demonstrado no quadro 2 abaixo.

Quadro 2: Composição da solução nutritiva de Tyrode modificado com cloreto de potássio a 60 mM.

Sal	Concentração (mM)
NaCl	104,5
KCl	60
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaH ₂ PO ₄	0,42
NaHCO ₃	10,0
Glicose	5,6

3.4.2 Preparação de anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos

Os animais foram eutanasiados por decapitação com auxílio de uma guilhotina seguida de secção dos vasos cervicais. Através de uma incisão no abdômen, a artéria mesentérica cranial foi identificada, removida e imediatamente colocada em solução Tyrode. A artéria foi dissecada e seccionada em anéis (1-2 mm de comprimento). Os anéis foram imersos em cubas (10 ml) e suspensos verticalmente por linhas de algodão

fixadas a um transdutor de força (PowerLab™, ADInstruments, MA, EUA). Mudanças na tensão isométrica foram captadas pelo sistema de aquisição (WinDaq/XL, DI 148-U, Insight, Brasil). Os tecidos foram mantidos em solução de Tyrode, a 37° C, gaseificada com uma mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂ (carbogênio), para prover um pH relativamente constante de 7,2 a 7,4. Todos os anéis foram submetidos a uma tensão basal de aproximadamente 0,75 g, por um período de 60 min. Durante este período, a solução do banho foi trocada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos, e a linha de base foi ajustada, quando necessário (ALTURA; ALTURA, 1970). O protocolo experimental é mostrado na figura 03.

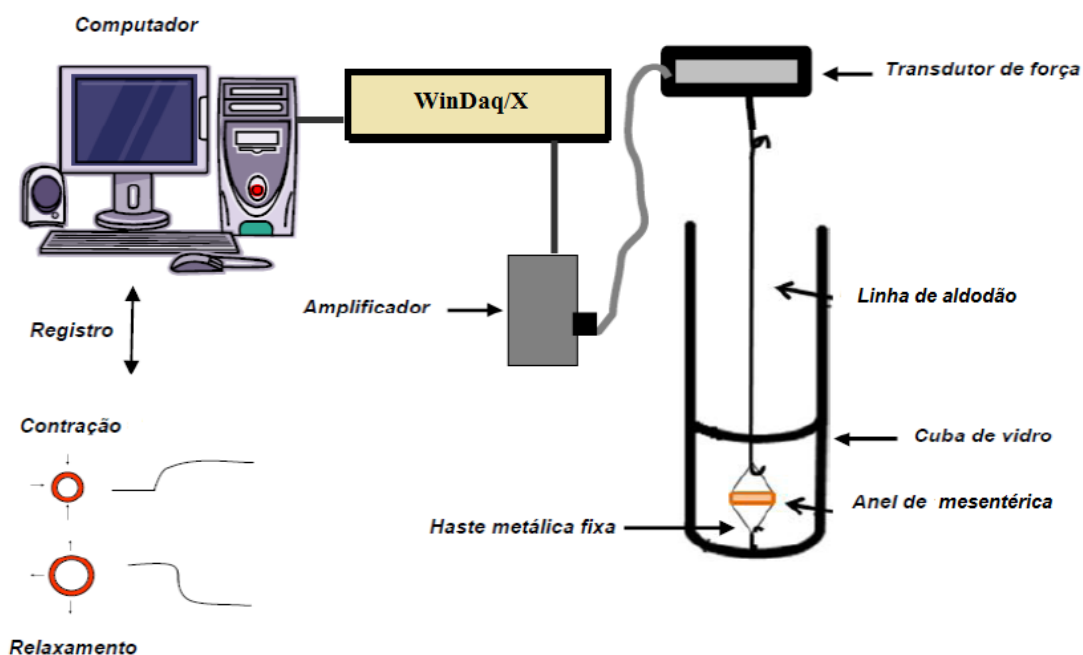


Figura 03- Preparação dos anéis isolados de mesentérica para avaliação dos efeitos vasculares dos derivados da isatina.

Após o período de estabilização a viabilidade funcional do tecido foi verificada com uma contração induzida por fenilefrina (FEN, 10 μ M), um agonista α -adrenérgico. Foram considerados viáveis os anéis que obtiverem uma contração superior a 0,30 g.

3.4.3 Verificação da presença do endotélio funcional

A presença do endotélio funcional foi verificada pelo relaxamento dos anéis pré-contráídos com FEN (10 μ M) após adição de acetilcolina (ACh, 10 μ M), um agonista dos receptores muscarínicos. Foram considerados com endotélio funcional os anéis com

relaxamento superior a 80% sobre pré-contracção com fenilefrina. Anéis com relaxamento inferior a 80% e superior a 10% foram descartados e os anéis foram considerados sem endotélio quando o relaxamento foi inferior a 10%. O líquido da cuba foi trocado para a retirada de todas as drogas e em seguida foram realizados os protocolos experimentais. O protocolo para a verificação da presença ou ausência do endotélio funcional é ilustrado na figura 04.

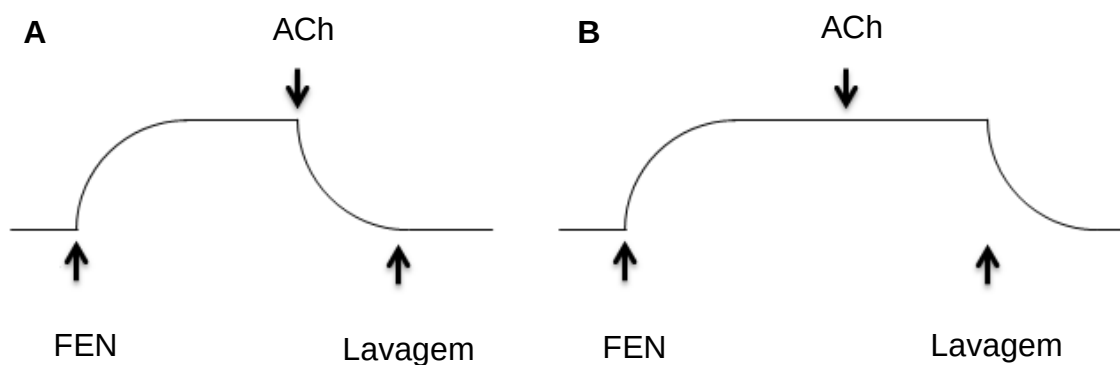


Figura 04- Protocolo de verificação da viabilidade do tecido muscular liso e da funcionalidade do endotélio vascular de artéria mesentérica cranial de ratos. A, Anéis com endotélio vascular funcional, B, Anéis sem endotélio funcional.

3.4.4 Avaliação dos efeitos dos derivados da isatina em artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráida com fenilefrina

Após um período de estabilização, a confirmação da viabilidade do órgão e a posterior verificação do endotélio funcional, as preparações foram submetidas à uma nova estabilização, na qual o meio nutritivo era trocado até que a tensão do órgão retornasse aos valores basais com tensão de repouso (0,75g). Após este processo de aproximadamente 30 minutos, foi induzida uma segunda contração por FEN (1 μ M). No

componente tônico desta contração, foram aplicadas concentrações cumulativas e crescentes dos derivados das isatinas (1 pM – 1 mM), cada um em uma cuba, para obtenção de uma curva concentração-resposta. Os efeitos foram avaliados em anéis com o endotélio funcional e anéis sem o endotélio funcional, ou seja, com o endotélio intacto e com endotélio mecanicamente removido, respectivamente. A remoção do endotélio foi realizada por atrito mecânico entre as paredes internas do vaso e uma haste de metal. O protocolo geral acima descrito está demonstrado na figura 05.

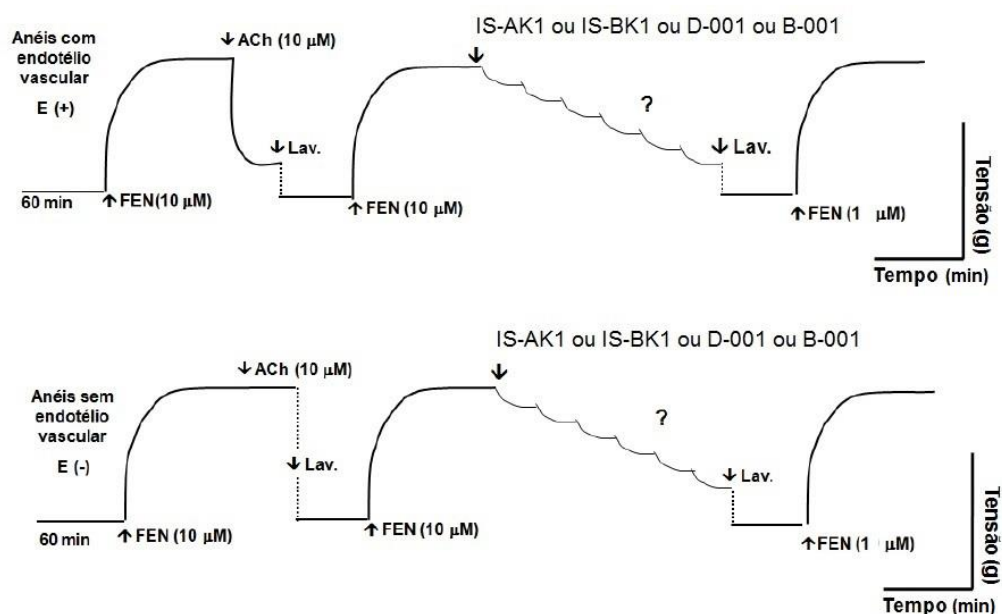


Figura 05 - Esquema do protocolo para avaliação do possível efeito vasorrelaxante dos derivados da isatina em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contraídos com fenilefrina (1 µM).

A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento em relação à contração produzida pela FEN. Destes dados foram coletados os dados de eficácia e potência das substâncias por meio dos valores de efeito máximo (E_{max}) e de pD_2 da droga, respectivamente. O segundo é calculado como o logaritmo na base 10 de concentração efetiva que causa 50 % da concentração da substância que causa 50 % de seu efeito máximo (CE_{50}) da substância testada. Com esses dados foi analisado qual dos derivados da isatina é mais o potente e os experimentos seguintes foram realizados com o mesmo para desvendar quais os seus possíveis mecanismos de ação.

3.4.5 Avaliação da participação da enzima ciclase de guanilil solúvel (sGC) no efeito vasorrelaxante induzido pelo IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráida com fenilefrina

As preparações de anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato, com endotélio removido foram incubadas por 30 minutos com ODQ (10 μ M), um inibidor da enzima sGC (GARTHWAITE et al, 1995). Após este período, uma contração tônica com FEN (1 μ M) foi obtida e concentrações crescentes e cumulativas do derivado da isatina escolhido (1 pM – 1 μ M) foram adicionadas ao banho. A potência e eficácia do vasorrelaxamento do derivado da isatina foram avaliadas por meio dos valores de pD₂ e E_{max}, respectivamente. O esquema do protocolo experimental para avaliação da participação da sGC no efeito vasorrelaxante induzido pelo derivado da isatina é descrito abaixo na figura 06.

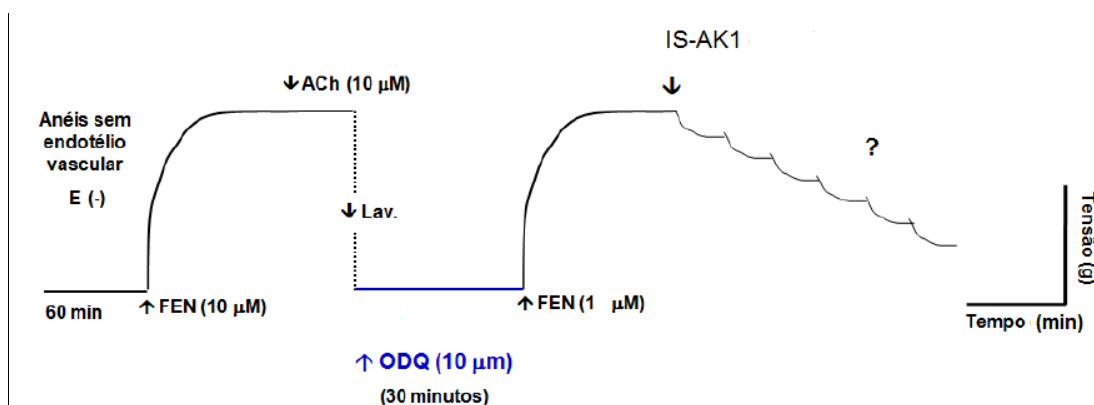


Figura 06 - Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contráidos FEN (1 μ M) na presença de ODQ (10 μ M).

3.4.6 Avaliação da participação dos canais Ca_v no efeito vasorrelaxante induzido pelo IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráida com fenilefrina

Para investigar a resposta vasorrelaxante do derivado da isatina sobre a contração induzida por uma via inespecífica, foi utilizado uma solução com KCl (60 mM) (Quadro 2), que promove uma maior despolarização da membrana plasmática,

levando, dentre outros efeitos, à ativação dos Ca_v e, conseqüentemente, à contração do músculo liso vascular (CHEN; REMBOLD, 1995; KRAVTSOV et al., 2003).

Após a verificação da presença ou ausência do endotélio funcional, e um período de estabilização de aproximadamente 30 minutos, a solução de Tyrode normal foi substituída por uma solução de Tyrode com KCl (60 mM). No componente tônico desta contração, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas do derivado da isatina, para obtenção de uma curva concentração-resposta (Figura 07). A potência e eficácia do vasorrelaxamento do derivado da isatina foram avaliadas por meio dos valores de pD_2 e E_{max} , respectivamente. O esquema do protocolo experimental para avaliação da participação dos canais Ca_v no efeito vasorrelaxante induzido pelo IS-AK1 é descrito na figura 07.

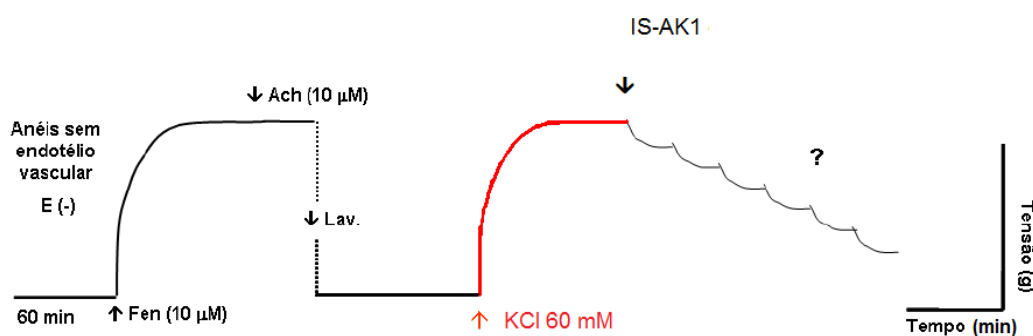


Figura 07 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos do IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 60 mM).

3.4.7 Avaliação da participação dos canais para K^+ no efeito vasorrelaxante induzido pelo derivado da isatina em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contraída com fenilefrina

Após a verificação da presença ou ausência do endotélio, as preparações foram incubadas com tetraetilamônio (TEA) 3 mM, que nesta concentração é descrito por bloquear o efluxo de K^+ pelos canais para K^+ (WANG et al., 2008). Após 30 minutos na presença deste bloqueador, as preparações foram incubadas com FEN (1 µM) e uma nova contração tônica foi obtida. Em seguida, uma curva concentração-resposta para o derivado da isatina, na presença do TEA, foi observada. A potência e a eficácia do efeito vasorrelaxante do derivado da isatina foram avaliadas por comparação dos

valores de pD_2 e E_{max} , respectivamente, na ausência e na presença de TEA (3 mM). O esquema do protocolo experimental para avaliação da participação dos canais para K^+ no efeito vasorrelaxante induzido pelo IS-AK1 é descrito na figura 08.

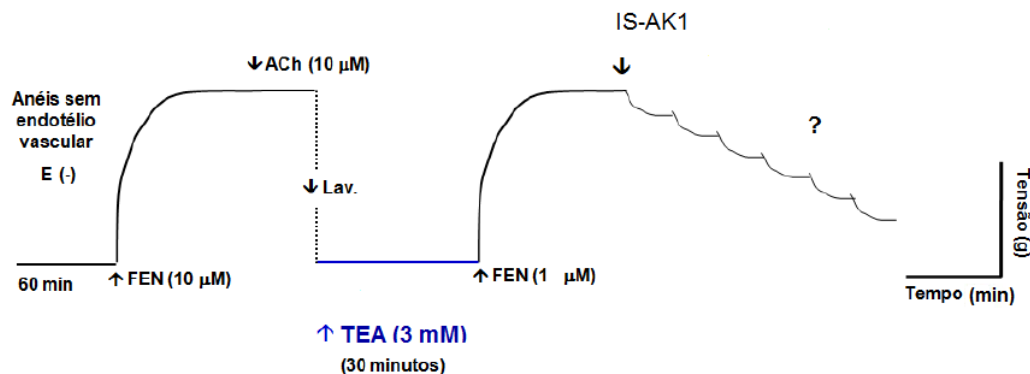


Figura 08 - Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contraídos FEN (1 µM) na presença de TEA (3 mM).

3.4.8 Avaliação da participação dos canais para K^+ de alta condutância sensível ao cálcio (BK_{Ca}) no efeito vasorrelaxante induzido pelo IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contraída com fenilefrina

Após a verificação da presença do endotélio funcional, os anéis foram incubados com 1 mM de TEA, pois, nesta concentração, o TEA inibe seletivamente os canais BK_{Ca} (WHITE, 2002). Após 30 minutos de incubação, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (1 µM) e, em seguida, foram adicionadas concentrações cumulativas do derivado da isatina. A potência e eficácia do efeito vasorrelaxante do derivado da isatina foram avaliadas por comparação dos valores de pD_2 e E_{max} , respectivamente, na ausência e na presença de TEA (1 mM). O esquema do protocolo experimental para avaliação da participação dos canais BK_{Ca} no efeito vasorrelaxante induzido pelo IS-AK1 é descrito na figura 09.

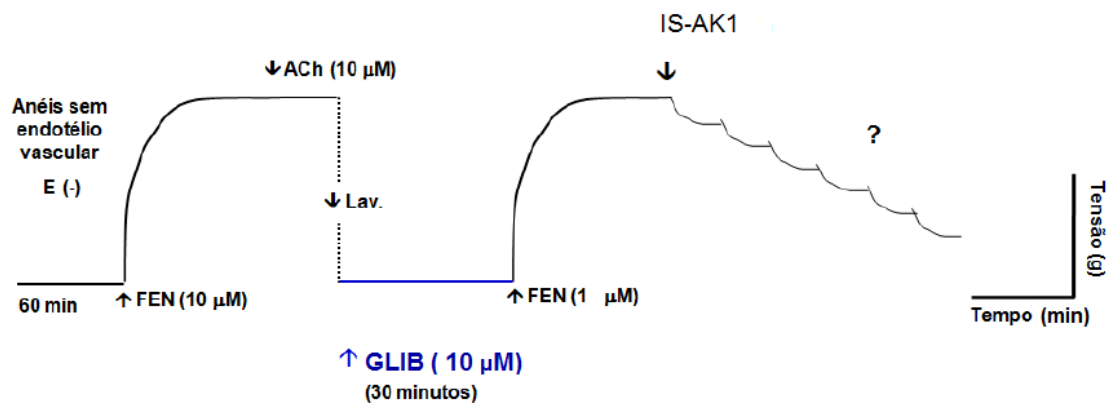


Figura 09 - Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contráídos FEN (1 µM) na presença de TEA (1 mM).

3.4.9 Avaliação da participação de canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) no efeito vasorrelaxante induzido pelo IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráída com fenilefrina

Após a verificação da presença ou ausência do endotélio funcional, os anéis foram incubados separadamente com 10 µM de glibenclamida (GLIB), um bloqueador seletivo de canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (OHRNBERGER, KHAN, MEISHERI, 1993). Após 30 minutos de incubação, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (1µM) e, em seguida, foram adicionadas concentrações cumulativas do derivado da isatina. A potência e eficácia do efeito vasorrelaxante do IS-AK1 foram avaliadas por comparação dos valores de pD_2 e E_{max} , respectivamente, na ausência e na presença de GLIB. O esquema do protocolo para avaliação da participação dos canais K_{ATP} no efeito vasorrelaxante induzido pelo IS-AK1 é descrito na figura 10.

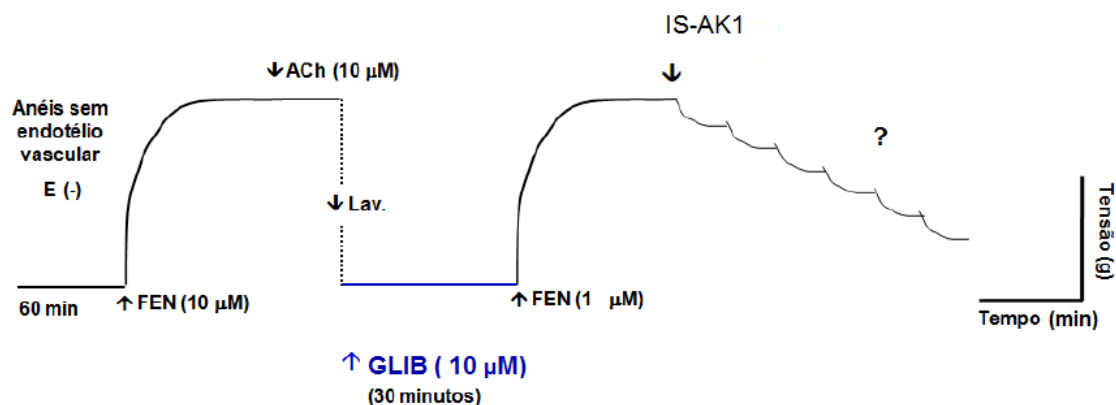


Figura 10 - Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contraídos FEN (1 μ M) na presença de GLIB (10 μ M).

3.4.10 Avaliação da participação de canais para K^+ dependentes de voltagem (K_v) no efeito vasorrelaxante induzido pelo IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contraída com fenilefrina

Após a confirmação da ausência do endotélio funcional, os anéis foram incubados separadamente com 1 mM de 4-AP, um inibidor seletivo dos canais para K^+ dependentes de voltagem (K_v) (BERG, 2002). Após 30 minutos de incubação, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (1 μ M) e, em seguida, foram adicionadas concentrações cumulativas do derivado da isatina. A potência e eficácia do efeito vasorrelaxante do IS-AK1 foram avaliadas por comparação dos valores de pD_2 e E_{max} , respectivamente, na ausência e na presença de 4-AP. O esquema do protocolo experimental para avaliação da participação dos canais K_v no efeito vasorrelaxante induzido pelo IS-AK1 é descrito abaixo na figura 11.

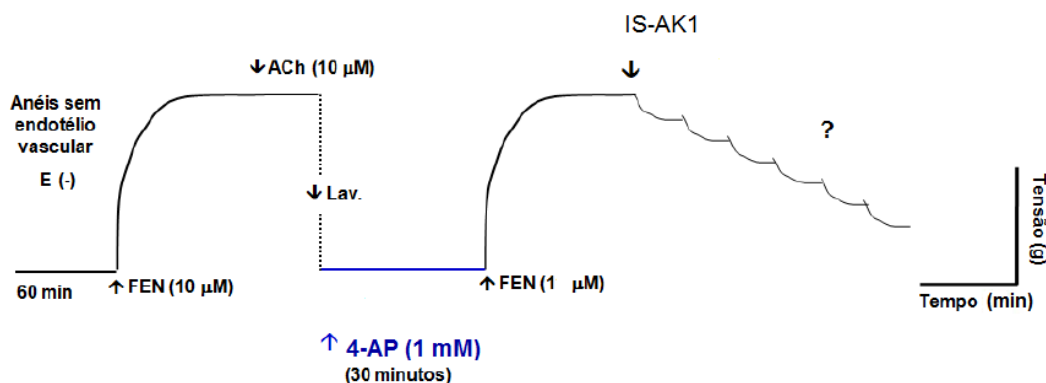


Figura 11 - Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contraídos FEN (1 μ M) na presença de 4-AP (10 mM).

3.4.11 Avaliação da participação de canais para K^+ retificadores de influxo (K_{IR}) no efeito vasorrelaxante induzido pelo IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contraída com fenilefrina

Após a confirmação da ausência do endotélio funcional, os anéis foram incubados separadamente com 30 μM de BaCl_2 , um inibidor seletivo dos canais K_{IR} (CHRISSOBOLIS, 2000). Após 30 minutos de incubação, foi induzida uma nova contração tônica com FEN (1 μM) e, em seguida, foram adicionadas concentrações cumulativas do derivado da isatina. A potência e eficácia do efeito vasorrelaxante do derivado da isatina foram avaliadas por comparação dos valores de pD_2 e E_{max} , respectivamente, na presença e na ausência de BaCl_2 . O esquema do protocolo para avaliação da participação dos canais K_{IR} no efeito vasorrelaxante induzido pelo IS-AK1 é descrito abaixo na figura 12.

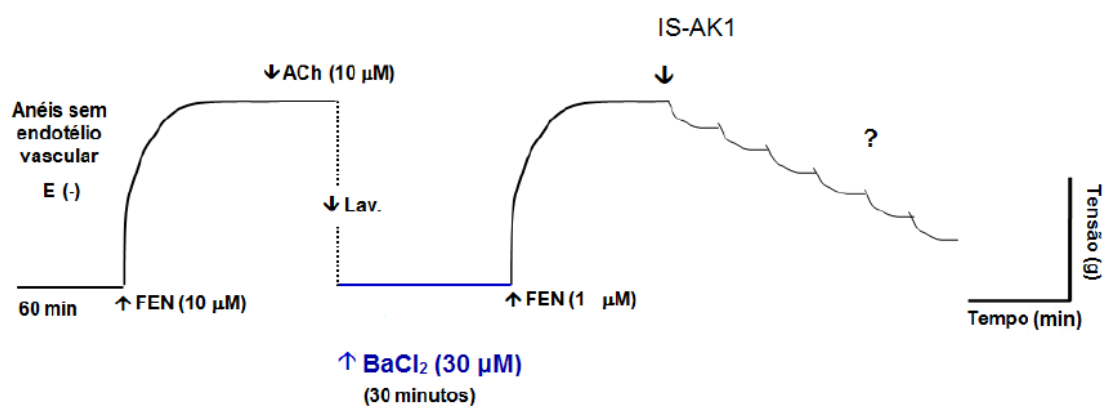


Figura 12 - Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito de concentrações crescentes do IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contraídos FEN (1 μM) na presença de BaCl_2 (30 μM).

3.5 Protocolos experimentais *in vivo*

3.5.1 Cateteres vasculares

Na confecção dos cateteres, utilizados nos protocolos *in vivo*, foram utilizados tubos de polietileno PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 - 0,61 mm, respectivamente) de 4 cm para o cateter arterial e 2,5 cm para o cateter venoso, soldados por aquecimento a tubos de polietileno PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 - 0,96 mm, respectivamente) de 22 cm. Antes da canulação, os cateteres foram preenchidos com solução salina (0,9%) + 500 UI de heparina e a extremidade PE-50 de cada cateter foi obstruída com pino de metal. Os cateteres tinham extensão suficiente para atingirem os vasos alvos, a artéria aorta e a veia cava caudal, com as medidas abaixo:

- Cateter Arterial: PE-10 = 4 cm, PE-50 = 15 cm
- Cateter Venoso: PE-10 = 3 cm, PE-50 = 15 cm

3.5.2 Implante de catéteres vasculares

Foram utilizados ratos normotensos Wistar e SHR. Os animais foram anestesiados com cetamina (75 mg/kg i.p.) + xilazina (20 mg/kg, i.p.). Em seguida, foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica. Uma pequena incisão na região femoral foi realizada, separando a musculatura para localização do feixe vasculo-nervoso femoral. A artéria e a veia femorais foram identificadas, dissecadas e expostas. A extremidade PE-10 do cateter foi introduzida na artéria femoral em direção à aorta abdominal, para registro dos parâmetros cardiovasculares; outra extremidade PE-10 foi introduzida em direção à veia cava caudal, por meio da veia femoral, para administração das drogas. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical dorsal do animal (Figura 13).

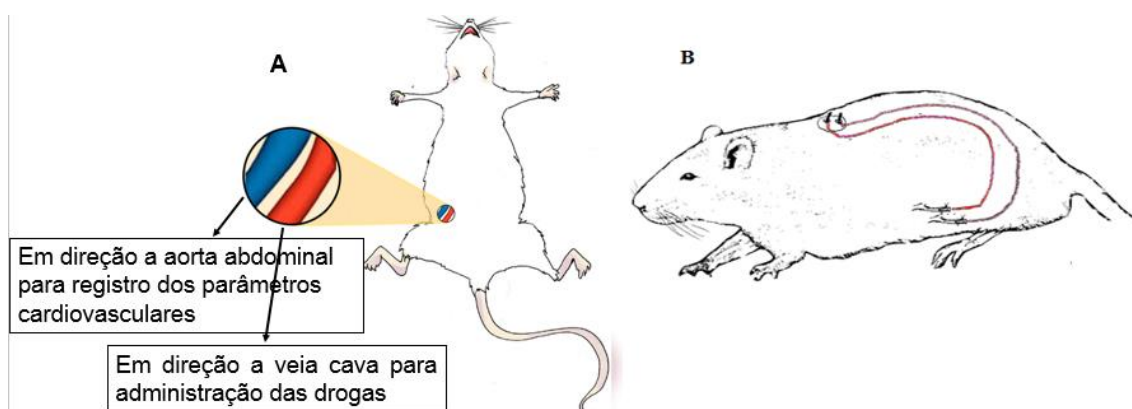


Figura 13 - A. Representação esquemática do local da incisão onde foram implantados os cateteres vasculares para registro dos parâmetros cardiovasculares e administração de drogas. B. Representação esquemática do rato após implantação dos cateteres vasculares.

3.5.3 Efeitos da administração aguda do derivado da isatina sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca em ratos não anestesiados

Após 24 horas de recuperação do processo cirúrgico e dos efeitos anestésicos, a pressão arterial e a frequência cardíaca foram registradas em ratos conscientes e com

livre movimentação. O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (MLT0380/D, ADInstruments, Austrália) acoplado a um amplificador e conectado a um sistema de aquisição de dados (LabChart, ADInstruments, Austrália). Como software de aquisição e análise foi utilizado o LabChart 5.0.

No cateter venoso foi administrada as doses teste de 5 e 10 mg/kg do derivado da isatina no animal baseada em estudos que serão descritos mais adiante. Os valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram registrados imediatamente antes (PAM e FC basal) e imediatamente após a administração. As variações dos parâmetros cardiovasculares foram calculadas fazendo-se a diferença entre o valor da variável após a administração da droga e antes da injeção da droga, conforme as fórmulas abaixo:

$$\Delta PAM = PAM_{\text{após a administração da droga}} - PAM_{\text{basal}}$$

$$\Delta FC = FC_{\text{após a administração da droga}} - FC_{\text{basal}}$$

Os valores de variação de PAM e de variação de FC foram comparados entre doses diferentes no mesmo tipo de animal. A comparação das respostas de variação de PAM e de variação de FC das doses testadas foram realizadas também nos dois modelos animais, normotensos Wistar e hipertensos SHR.

3.6 Análise estatística

O teste estatístico apropriado foi escolhido conforme a normalidade dos resultados obtidos. Utilizou-se o teste *t* de student não pareado e a análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) dependendo do número de grupos a serem comparados e utilizou-se o pós-teste de Tukey pareado para múltiplas comparações. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E. P. M). Para as curvas concentrações-resposta, os valores de $E_{\max}$ e de pD_2 foram obtidas por regressão não linear. Houve diferença significativa quando $p < 0,05$. O programa utilizado foi o GraphPad Prism versão 6[®].

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Ensaios farmacológicos *in vitro*

4.1.1 Efeitos induzidos pelos derivados da isatina sobre anéis de artéria mesentérica cranial

Os derivados da isatina quando adicionados ao banho de maneira cumulativa (10^{-12} – 10^{-3} M), promoveram vasorrelaxamento concentração-dependente em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos pré-contraídos com FEN na presença e na ausência de endotélio funcional (figura 14). Os resultados são mostrados no Gráfico 01 e na Tabela 1.

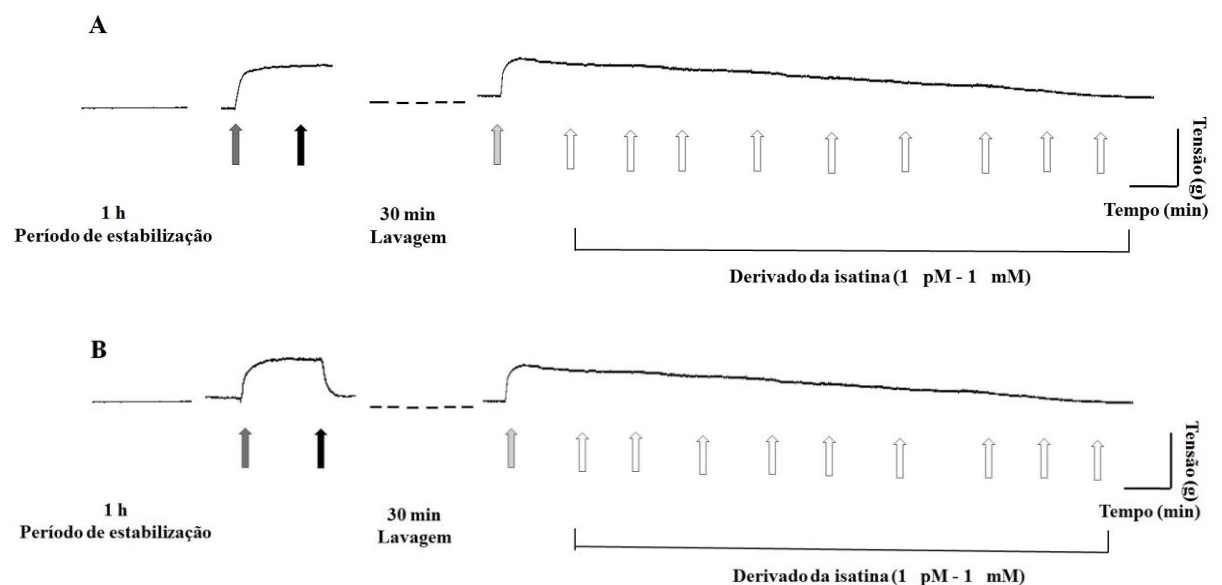


Figura 14 – Traçado original dos demonstrando a ação vasorrelaxante dos derivados da isatina em anéis na presença e na ausência do endotélio em artéria mesentérica cranial de ratos. Setas cinza escura, FEN 10 μ M; Setas pretas, ACh 10 μ M; Setas cinzas claras, FEN 1 μ M; Setas brancas, derivados da isatina.

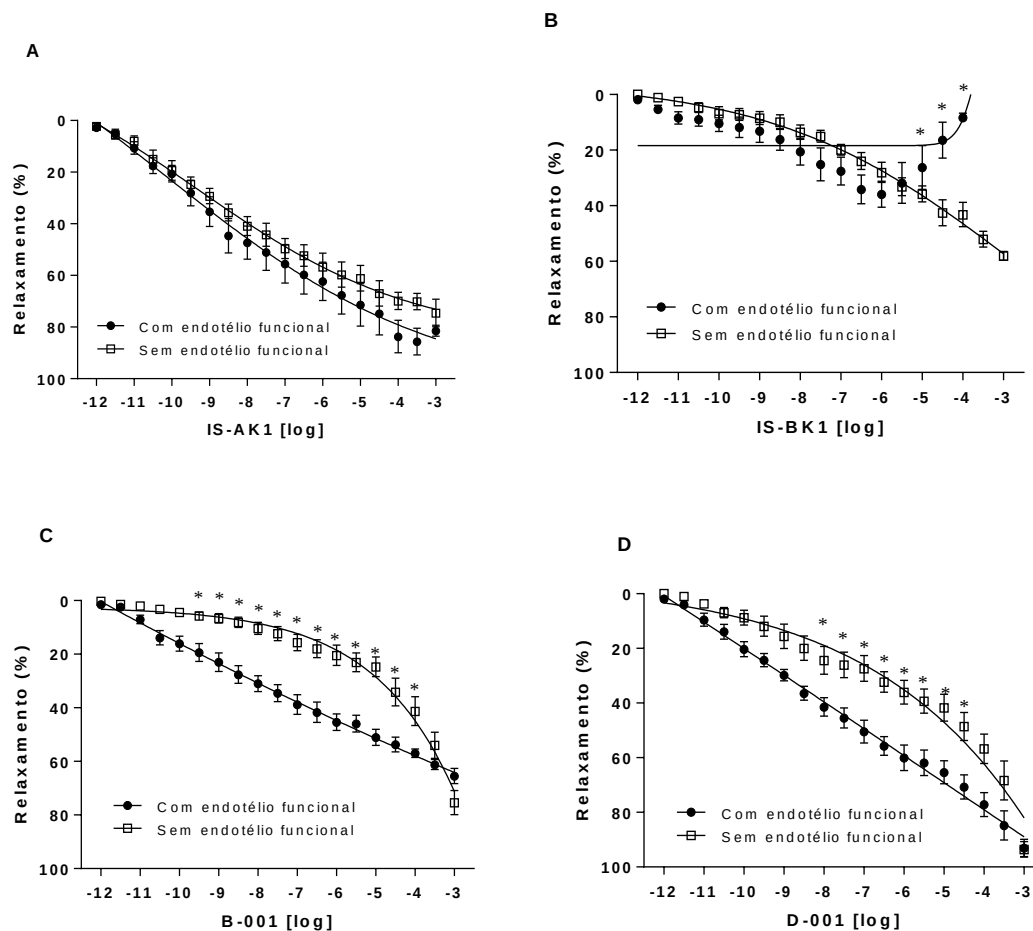


Gráfico 01 – Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante dos derivados da isatina na presença e na ausência do endotélio funcional. **A:** IS-AK1 (n=8, n=6, respectivamente); **B:** IS-BK1 (n=5, n=6); **C:** B-001 (n=7, n=6); **D:** D-001 (n=6, n=5). Valores expressos como média $\pm$ E. P. M. $p < 0,05$ quando comparado a mesma concentração na ausência do endotélio funcional.

Composto	Endotélio funcional presente		Endotélio funcional ausente	
	pD ₂ $\pm$ E. P. M.	E _{max} $\pm$ E. P. M.	pD ₂ $\pm$ E. P. M.	E _{max} $\pm$ E. P. M.
IS-AK1	7,99 $\pm$ 0,11	85,69 $\pm$ 5,18 %	7,95 $\pm$ 0,15	74,62 $\pm$ 5,33 %
IS-BK1	4,02 $\pm$ 0,19	35,94 $\pm$ 4,68 %	6,02 $\pm$ 0,09*	58,14 $\pm$ 1,56 %*
B-001	7,54 $\pm$ 0,1	65,58 $\pm$ 2,82 %	4,64 $\pm$ 0,1*	75,47 $\pm$ 4,48 %
D-001	7,18 $\pm$ 0,09	93,13 $\pm$ 3,19 %	5,26 $\pm$ 0,2*	93,59 $\pm$ 2,83 %

Tabela 1: Valores (%) de E_{máx} e de pD₂ referentes ao efeito vasorrelaxante dos derivados da isatina em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contraídos com FEN, na

presença e na ausência de endotélio funcional. * $p < 0,05$ quando comparado ao seu efeito com endotélio funcional.

Todos os compostos testados promoveram vasorrelaxamento tanto em anéis na presença quanto na ausência do endotélio. Apenas o IS-AK1 não apresentou diferença na resposta na presença e na ausência de endotélio ($E_{\text{máx}} = 85,69 \pm 5,18\%$; $pD_2 = 7,99 \pm 0,11$ e $n = 8$ vs. $74,62 \pm 5,33\%$; $pD_2 = 7,95 \pm 0,15$ e $n = 8$). Já o IS-BK1 apresentou diferença tanto na eficácia ($E_{\text{máx}} = 35,94 \pm 4,68\%$, $n = 5$ vs. $58,14 \pm 1,56\%$, $n = 6$, $p < 0,05$) quanto na potência ($pD_2 = 4,02 \pm 0,19$, $n = 5$, vs. $pD_2 = 6,02 \pm 0,09$, $n = 6$, $p < 0,05$) quando comparadas as respostas na presença e na ausência do endotélio. A remoção do endotélio diminuiu apenas a potência da resposta vasorrelaxante do composto B-001 ($pD_2 = 7,54 \pm 0,1$, $n = 7$, vs. $pD_2 = 4,64 \pm 0,1$, $n = 6$, $p < 0,05$). Da mesma forma a remoção do endotélio foi capaz de alterar a potência do composto D-001 ($pD_2 = 5,26 \pm 0,2$, $n = 6$ vs. $pD_2 = 7,18 \pm 0,09$, $n = 5$, $p < 0,05$).

Além disso o IS-AK1 foi o derivado da isatina que apresentou maior potência na resposta vasorrelaxante tanto na presença quanto na ausência, portanto, o IS-AK1 foi o composto escolhido para investigações posteriores. Todas as investigações também foram realizadas na ausência do endotélio funcional devido a não participação do mesmo no efeito do IS-AK1.

Durante a triagem farmacológica, foi evidenciado que o tempo necessário para que fossem obtidas as respostas máximas nas preparações funcionais de artéria mesentérica cranial isolada, para cada concentração dos derivados da isatina foi semelhante e variou entre 3 a 4 min. No final dos experimentos, a reversão do relaxamento produzido por todos os derivados da isatina foi conseguido após 20 minutos de sua retirada das cubas por meio da troca de solução de Tyrode e verificação da reposta do tecido a FEN ($1 \mu\text{M}$), a qual induziu contrações de magnitude similar às induzidas antes da adição do composto em estudo. A reversibilidade foi realizada para assegurar que o relaxamento não foi devido a danos na contractilidade e responsividade do tecido. Adicionalmente, nas mesmas condições experimentais, foi adicionado o veículo (cremofor 0,03%) nas mesmas proporções utilizadas para solubilizar os todos os derivados da isatina, e não foi constatada atividade vascular deste veículo.

4.1.2 Participação da sGC na resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial

Na presença de ODQ, um inibidor seletivo da sGC, o relaxamento induzido por concentrações crescentes de IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato, desprovidos de endotélio funcional e pré-contráídos com FEN foi significativamente atenuado ($E_{\max} = 58,81 \pm 8,7 \%$, $pD_2 = 5,57 \pm 0,16$, $n = 6$, vs. $E_{\max} = 74,62 \pm 5,33\%$; $pD_2 = 7,95 \pm 0,15$ e $n = 8$, $p < 0,05$). Comparando as concentrações de maneira ponto a ponto notamos que ocorreu diferença da concentração de $3 \cdot 10^{-8}$ até a última. Isto pode ser mostrado no gráfico 02 abaixo, comprovando o efeito deste derivado da isatina sobre esta enzima.

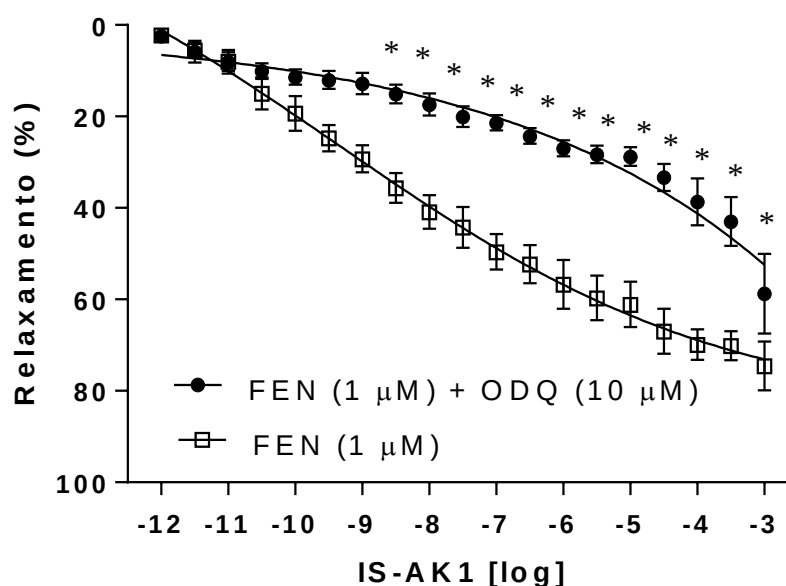


Gráfico 02 - Curvas concentrações-resposta para o IS-AK1 ($10^{-12} - 10^{-3}$ M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica cranial isolada de rato, pré-contráídos com FEN (1 μ M), na ausência ($n = 8$) e na presença de ODQ 10 μ M ($n = 6$). * $p < 0,05$ comparando-se a mesma concentração na curva controle.

4.1.3 Efeitos induzidos pelo IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial pré-contráídos com KCl 60 mM

Em anéis mesentéricos, sem endotélio funcional, pré-contraídos com uma solução despolarizante de KCl 60 mM, que aumenta a concentração de K^+ no meio extracelular e aumenta o influxo de Ca^{2+} por Ca_v , a resposta vasorrelaxante produzida pela adição cumulativa do IS-AK1 foi atenuada significativamente, quase que completamente, quando comparada ao efeito deste derivado da isatina sobre anéis pré-contraídos com FEN com redução da potência de cerca de 760 vezes ($E_{máx} = 39,68 \pm 6,56 \%$; $pD_2 = 5,07 \pm 0,2$, $n = 5$ vs. $E_{máx} = 74,62 \pm 5,33\%$; $pD_2 = 7,95 \pm 0,15$ e $n = 6$, $p < 0,05$) conforme mostrado no gráfico 03 abaixo, sugerindo que este composto tem um melhor relaxamento sob contrações induzidas por FEN. Este resultado sugere também que a via comum entre a solução despolarizante com 60 mM de KCl e da FEN (isto é, a ativação de Ca_v) não está relacionada ao efeito vasodilatador do derivado da isatina em estudo.

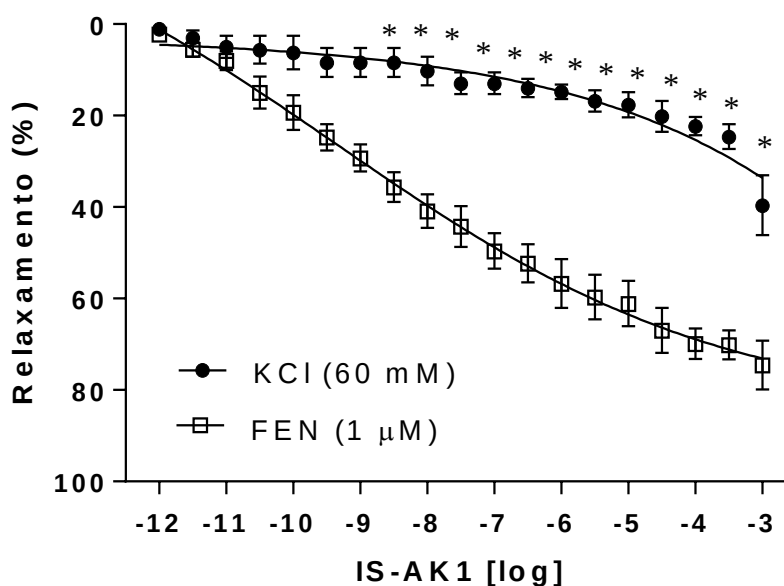


Gráfico 03 - Curvas concentrações-resposta para o IS-AK1 (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica cranial isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 μ M, $n = 8$) ou com KCl 60 mM ($n = 5$). * $p < 0,05$ comparando-se a mesma concentração na curva controle.

4.1.4 Participação de canais para potássio nos efeitos vasorrelaxante induzidos pelo IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial

Para avaliar a participação dos canais para K^+ no efeito vasodilatador causado por IS-AK1, utilizou-se o tetraetilamônio (TEA) 3 mM uma ferramenta farmacológica, que nesta concentração, atua como um bloqueador inespecífico de canais para K^+ . Na presença do TEA, a curva concentração-resposta induzida pelo IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato, na ausência do endotélio funcional, foi deslocada para a direita, com alterações significativas ($p < 0,05$) nos valores de $E_{\max}$ e de pD_2 ($E_{\max} = 43,53 \pm 8,16 \%$; $pD_2 = 6,72 \pm 0,2$, $n = 6$) quando comparados aos anéis sem endotélio funcional, na ausência do TEA e pré-contraídos com FEN ($1 \mu M$) ($E_{\max} = 74,62 \pm 5,33 \%$; $pD_2 = 7,95 \pm 0,15$, $n = 8$), conforme gráfico 04 abaixo. Este resultado sugere a participação destes canais da resposta vascular ao IS-AK1. Por isso, diferentes bloqueadores foram usados para desvendar quais canais poderiam estar envolvidos.

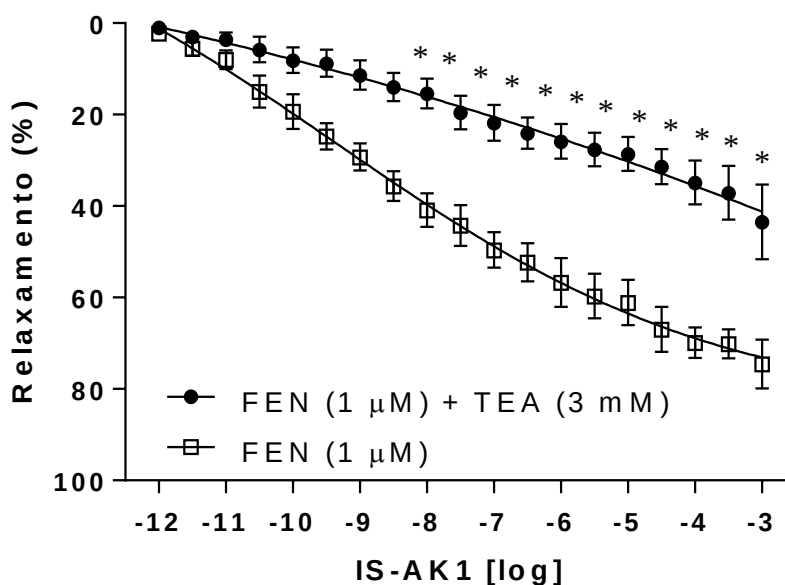


Gráfico 04 - Curvas concentração-resposta para o IS-AK1 ($10^{-12} - 10^{-3}$) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica cranial isolada de rato, pré-contraídos com FEN ($1 \mu M$), na ausência ($n = 8$) e na presença de TEA 3 mM ($n = 6$). * $p < 0,05$ comparando-se a mesma concentração na curva controle.

4.1.5 Subtipos de canais para potássio envolvidos na resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1 em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato

4.1.5.1 Participação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de alta condutância (BK_{Ca}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1

Na presença de TEA 1 mM, que nesta concentração age como um bloqueador de canais para potássio sensíveis ao cálcio de alta condutância (BK_{Ca}), a resposta vasorrelaxante induzida por concentrações crescentes de IS-AK1 indicada pela curva concentração-resposta foi alterada de maneira significativa, havendo uma redução da potência ($pD_2 = 5,63 \pm 0,2$, $n = 6$ vs. $7,95 \pm 0,15$, $p < 0,05$) em cerca de 200 vezes e redução no efeito máximo ($E_{m\acute{a}x} = 39,72 \pm 7,86 \%$ vs. $74,62 \pm 5,33 \%$, $p < 0,05$), conforme gráfico 05 abaixo. Isto confirma a participação destes canais no mecanismo vasodilatador de IS-AK1.

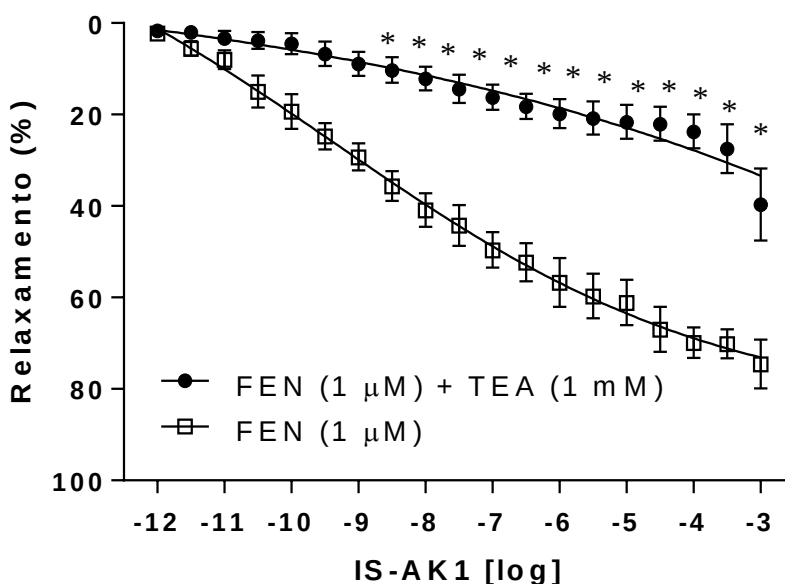


Gráfico 05 - Curvas concentrações-resposta para o IS-AK1 ($10^{-12} - 10^{-3}$ M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica cranial isolada de rato, pré-contráídos com FEN (1 μ M), na ausência ($n = 8$) e na presença de TEA 1 mM ($n = 6$). * $p < 0,05$ comparando-se a mesma concentração na curva controle.

4.1.5.2 Participação dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1

Na presença de 10 μ M de GLIB, um bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP, ocorreu diminuição significativa da potência em cerca de 5 vezes na

resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1 ($pD_2 = 7,23 \pm 0,17$ vs. $7,95 \pm 0,15$, $p < 0,05$, $n = 5$), ocasionando um leve desvio para direita da curva, conforme gráfico 06 abaixo. Este resultado sugere a participação dos canais para potássio sensíveis a ATP na resposta ao IS-AK1, embora de maneira menos marcante que os canais para potássio sensíveis ao cálcio de alta condutância (BK_{Ca}).

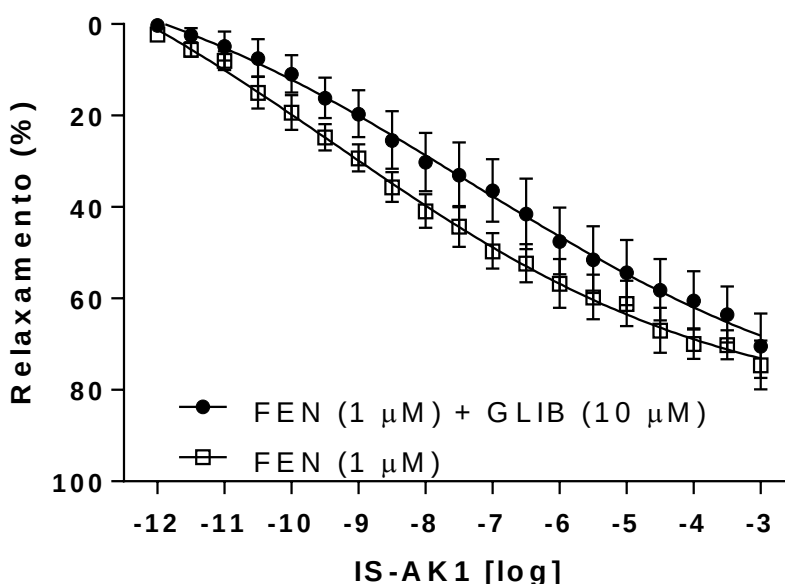


Gráfico 06 - Curvas concentração-resposta para o IS-AK1 ($10^{-12} - 10^{-3}$ M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica cranial isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 μM), na ausência ($n = 8$) e na presença de GLIB 10 μM ($n = 5$).

4.1.5.3 Participação dos canais para potássio dependentes de voltagem (K_v) na resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1

A incubação com 4-AP na concentração de 1 mM, que funciona como um bloqueador de canais para K_v , diminuiu em 7 vezes a potência da resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1 ($pD_2 = 7,1 \pm 0,17$ vs. $7,95 \pm 0,15$, $p < 0,05$, $n = 5$). Pode-se notar que houve um discreto desvio para direita da curva concentração-resposta do IS-AK1 na presença do bloqueador de K_v , conforme gráfico 07 abaixo. Este resultado sugere a participação dos canais para potássio dependentes de voltagem (K_v) na resposta ao IS-AK1, embora de maneira menos marcante que os canais para BK_{Ca} .

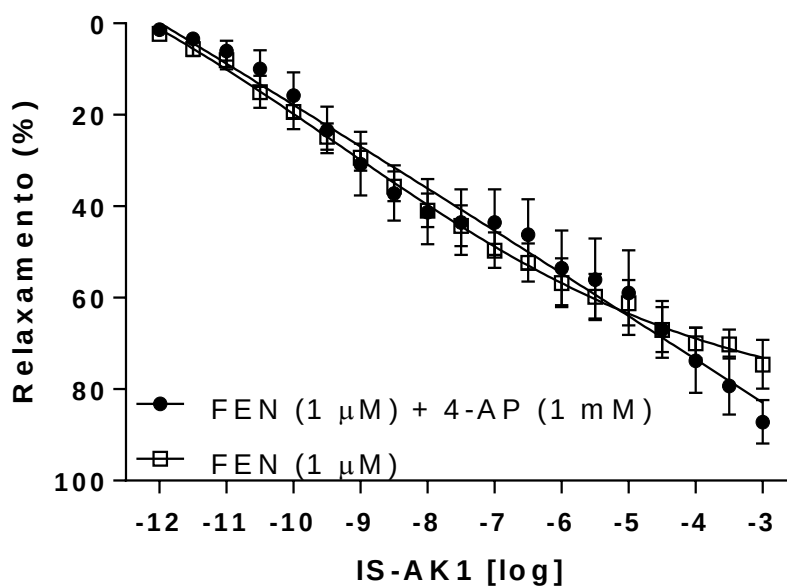


Gráfico 07 - Curvas concentração-resposta para o IS-AK1 (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica cranial isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (n = 8) e na presença de 4-AP (1 mM, n = 5).

4.1.5.4 Participação dos canais para potássio retificadores de influxo (K_{IR}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1

Para avaliar a participação dos canais K_{IR} nos efeitos vasculares induzidos por IS-AK1 foram realizados experimentos na presença de 30 μ M $BaCl_2$, um bloqueador destes tipos de canais. Nestas condições, a curva concentração-resposta foi levemente deslocada para a direita com diminuição de cerca de 52 vezes da potência ($pD_2 = 6,23 \pm 0,16$ vs. $7,95 \pm 0,15$, $p < 0,05$, n = 5), conforme gráfico 08 abaixo. Este resultado sugere a participação dos canais K_{IR} na resposta ao IS-AK1, embora de maneira menos marcante que os BK_{Ca} .

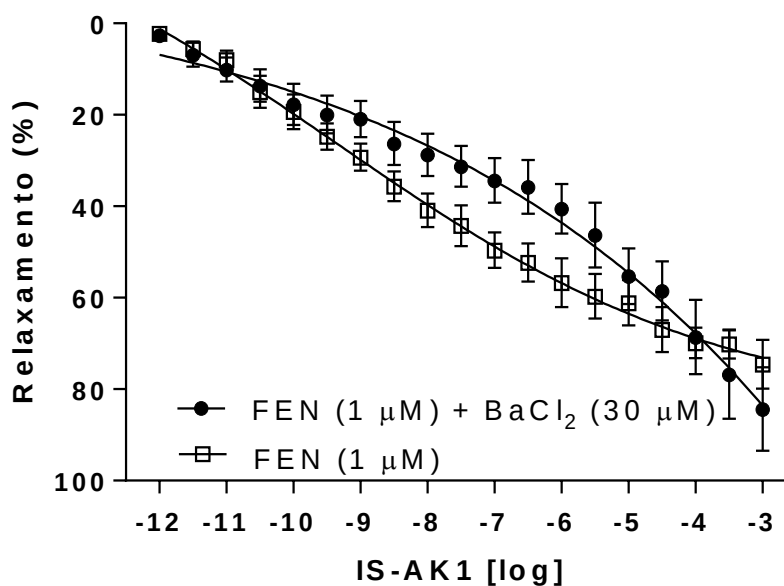


Gráfico 08 - Curvas concentração-resposta para o IS-AK1 (10^{-12} – 10^{-3}) em anéis sem endotélio funcional de artéria mesentérica cranial isolada de rato, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (n = 8) e na presença de BaCl₂ (30 μ M, n = 5).

4.2 Ensaios farmacológicos *in vivo*

4.2.1 Efeito do IS-AK1 sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca em ratos não-anestesiados

Após um período de estabilização, os parâmetros cardiovasculares de ratos Wistar não-anestesiados foram avaliados. Como já esperado, a PAM basal dos ratos SHR mostrou-se maior que as dos ratos Wistar (143 ± 7 mmHg, n = 7 vs. 113 ± 2 mmHg, n = 6) porém a frequência cardíaca basal dos dois tipos de animais não diferiu (371 ± 9 bpm, n = 6 vs. 350 ± 22 bpm, n = 7) como pode ser observado nos gráficos 09 e 10.

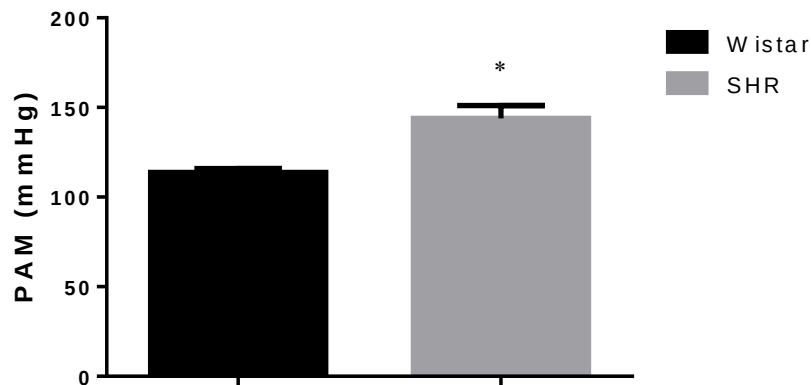


Gráfico 09– Comparação da pressão arterial média basal (PAM, mmHg) dos ratos Wistar e SHR. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com administração de salina.

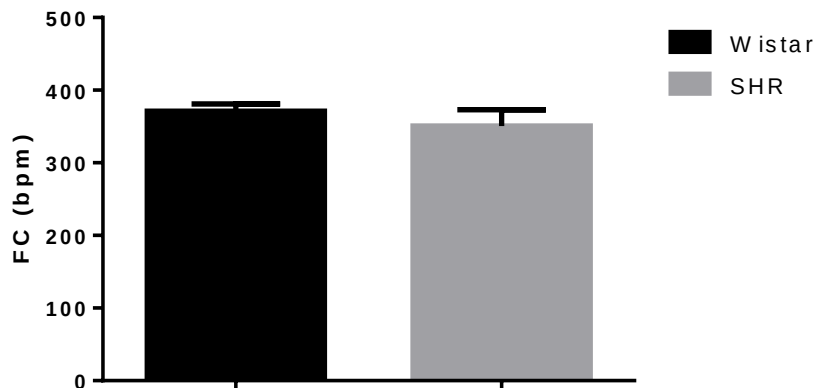


Gráfico 10– Comparação da frequência cardíaca (FC, bpm) dos ratos Wistar e SHR. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M.

A administração intravenosa (IV) de IS-AK1 na dose de 10 mg/kg promoveu hipotensão e bradicardia (-50 ± 12 mmHg, -258 ± 40 bpm, $n = 7$, $p < 0,05$), quando comparada a injeção de salina (2 ± 1 mmHg e 2 ± 1 bpm, $n = 6$) em ratos Wistar. A dose de 5 mg/kg não promoveu efeitos significativos tanto na pressão arterial média (-3 ± 1 mmHg) quanto na frequência cardíaca (-4 ± 7 bpm, $n = 6$) dos ratos Wistar. Estes dados podem ser melhores observados na figura 15 e nos gráficos 11 e 12.

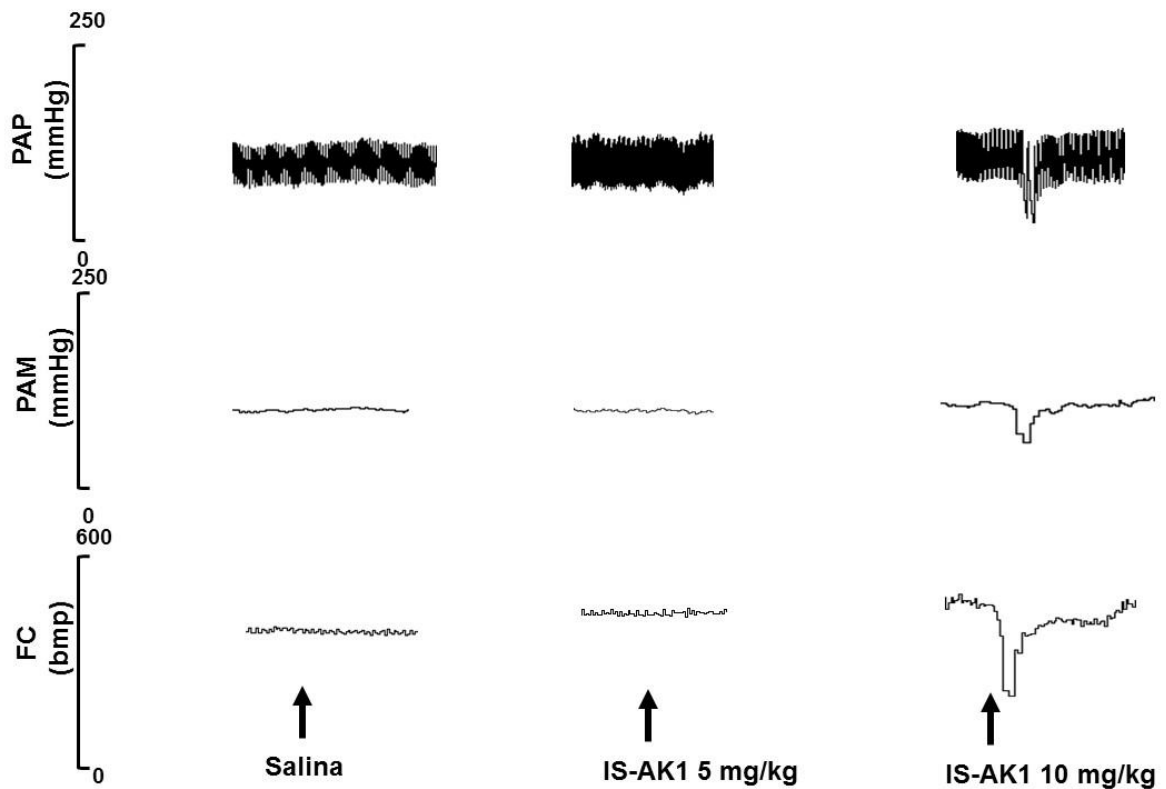


Figura 15 - Traçado original de um rato Wistar representativo, mostrando o efeito da administração aguda (5 e 10 mg/kg IV) de IS-AK1 comparada a administração de salina sobre a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos Wistar não anestesiados.

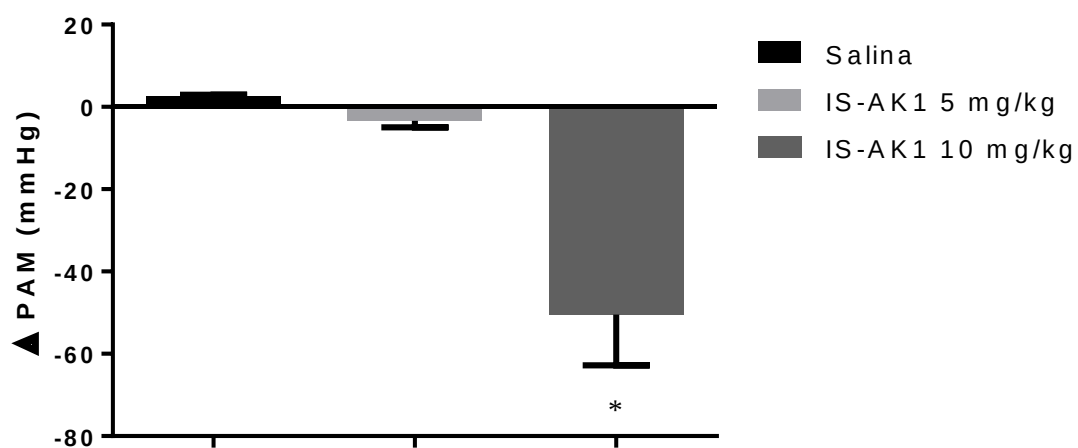


Gráfico 11 - Efeito da administração aguda de salina e do IS-AK1 (5 e 10 mg/kg, IV) sobre a pressão arterial média (PAM) em ratos Wistar não-anestesiados (n = 7). Valores expressos como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com administração de salina.

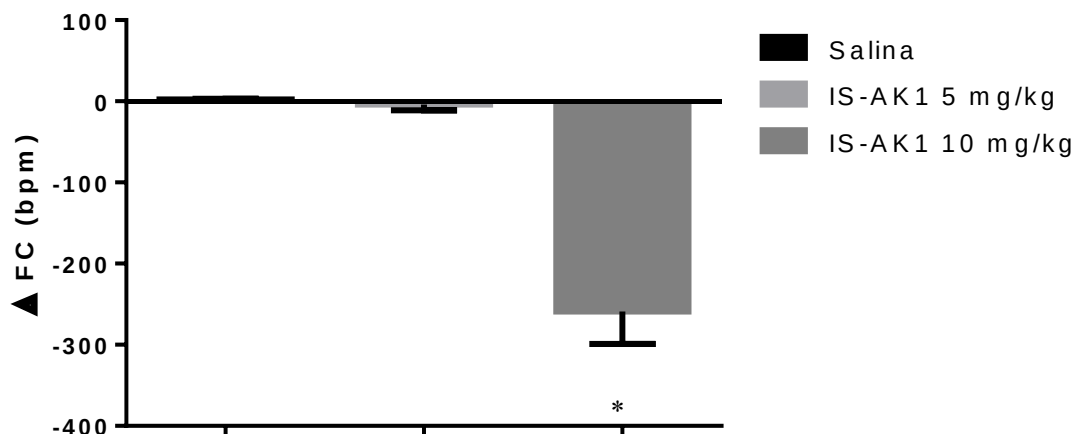


Gráfico 12 - Efeito da administração aguda de salina e do IS-AK1 (5 e 10 mg/kg, IV) sobre a frequência cardíaca (FC) em ratos Wistar não-anestesiados (n = 7). Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com administração de salina.

Os efeitos do IS-AK1 também foram avaliados em animais hipertensos do modelo de hipertensão SHR. A administração IV do IS-AK1 na dose de 10 mg/kg também promoveu hipotensão e bradicardia (-99 ± 7 mmHg, -278 ± 40 bpm, $n = 6$, $p < 0,05$), quando comparados a injeção de salina (2 ± 1 mmHg e 1 ± 1 bpm, $n = 6$). Da mesma forma que em ratos Wistar, a dose de 5 mg/kg não promoveu efeitos significativos tanto na PAM (-3 ± 2 mmHg) quanto na FC (-1 ± 1 bpm, $n = 6$) dos ratos Wistar. Estes dados podem ser melhores observados na figura 16 e nos gráficos 13 e 14.

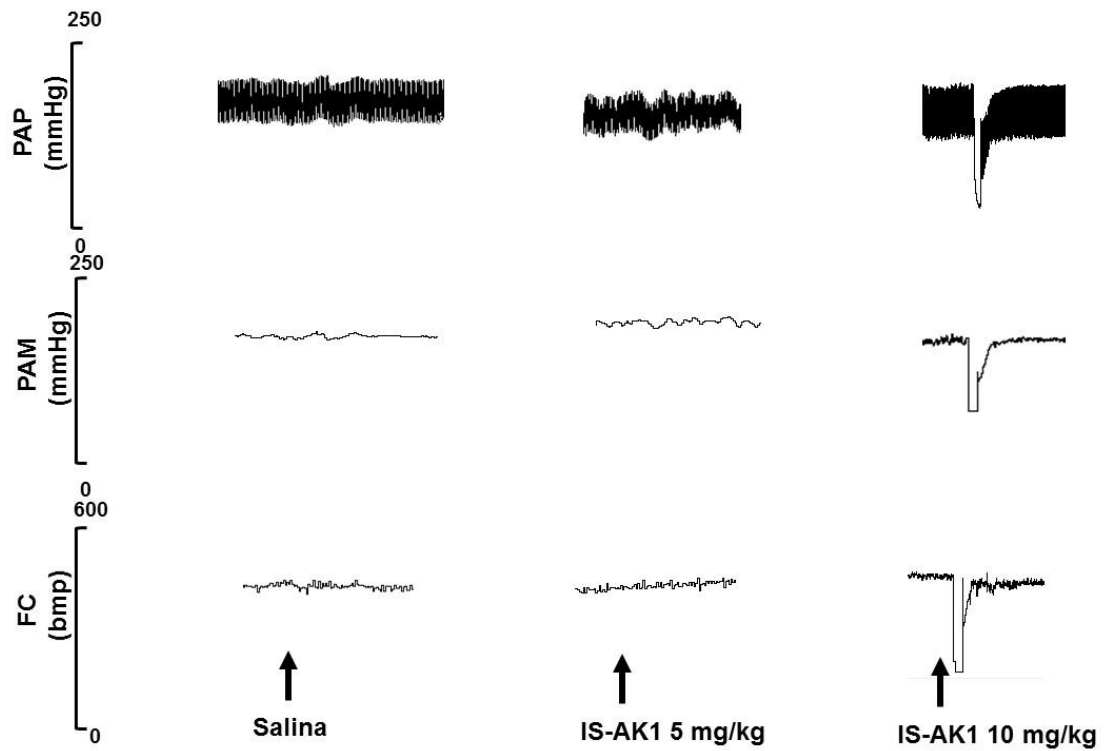


Figura 16 - Traçado original de um rato SHR representativo, mostrando o efeito da administração aguda (5 e 10 mg/kg IV) de IS-AK1 comparada a administração de salina sobre a PAM e FC em ratos SHR não anestesiados.

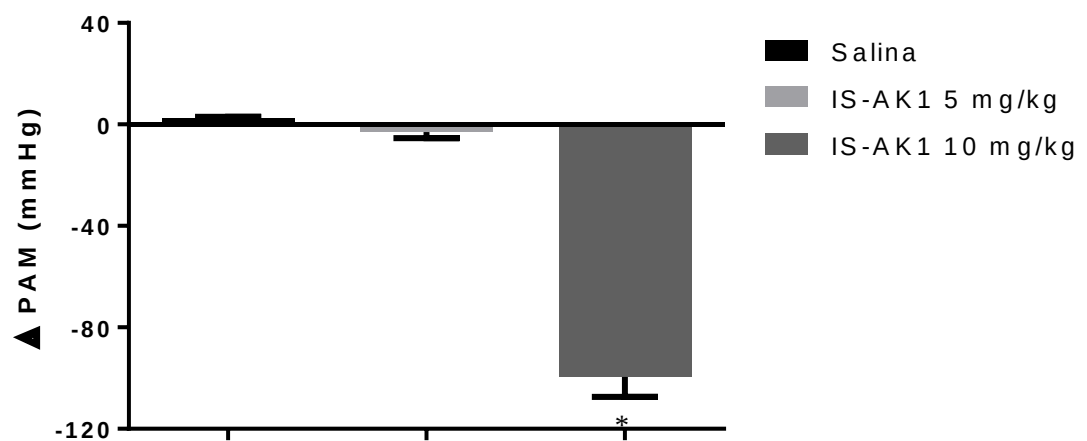


Gráfico 13 - Efeitos da administração aguda do IS-AK1 (5 e 10 mg/kg, IV) sobre a pressão arterial média (PAM) em ratos SHR não-anestesiados (n = 6). Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com administração de salina.

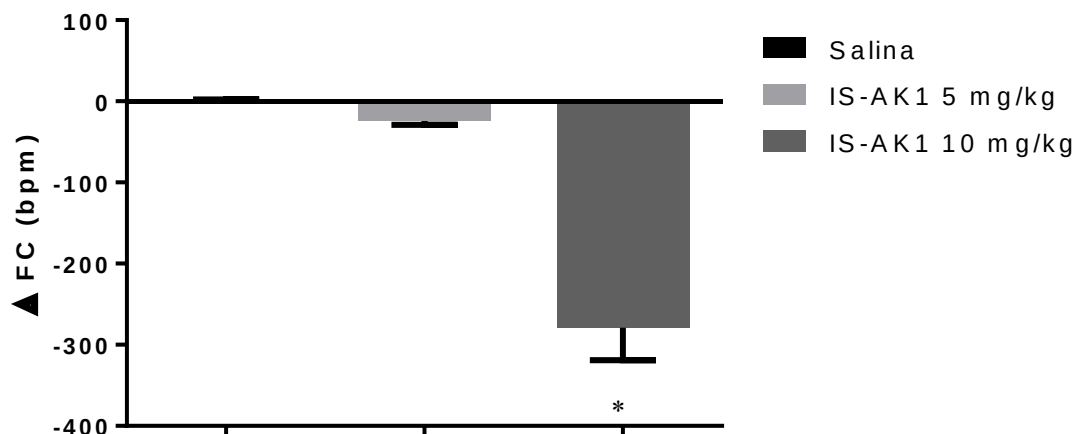


Gráfico 14 - Efeitos da administração aguda do IS-AK1 (5 e 10 mg/kg, IV) sobre a frequência cardíaca (FC) em ratos SHR não-anestesiados (n = 6). Valores expressos como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com administração de salina.

Quando comparamos os efeitos hipotensores entre ratos Wistar e SHR, notamos que na dose de 5 mg/kg não houve diferença nas respostas, porém a resposta hipotensora na dose de 10 mg/kg foi mais pronunciada em ratos hipertensos que em ratos normotensos, conforme pode ser notado nos gráficos 15 e 16. Diferentemente das respostas hipotensoras, as respostas bradicárdicas foram semelhantes em ratos normotensos e hipertensos, conforme pode ser observado nos gráficos 17 e 18.



Gráfico 15 – Comparação dos efeitos da administração aguda do IS-AK1 (5 mg/kg, IV) sobre a pressão arterial média (PAM) em ratos Wistar (n = 7) e ratos SHR não-anestesiados (n = 6). Valores expressos como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com administração de salina.

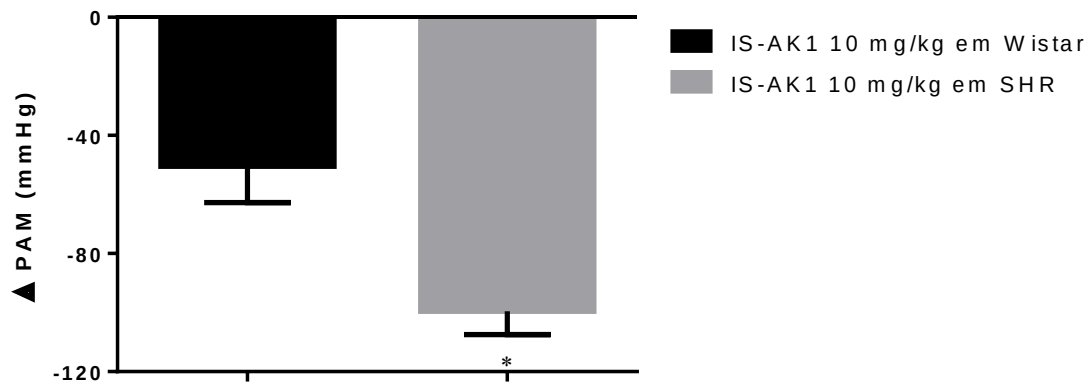


Gráfico 16 – Comparação dos efeitos da administração aguda do IS-AK1 (10 mg/kg, IV) sobre a pressão arterial (PAM) em ratos Wistar ($n = 7$) e ratos SHR não-anestesiados ($n = 6$). Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com administração de salina.

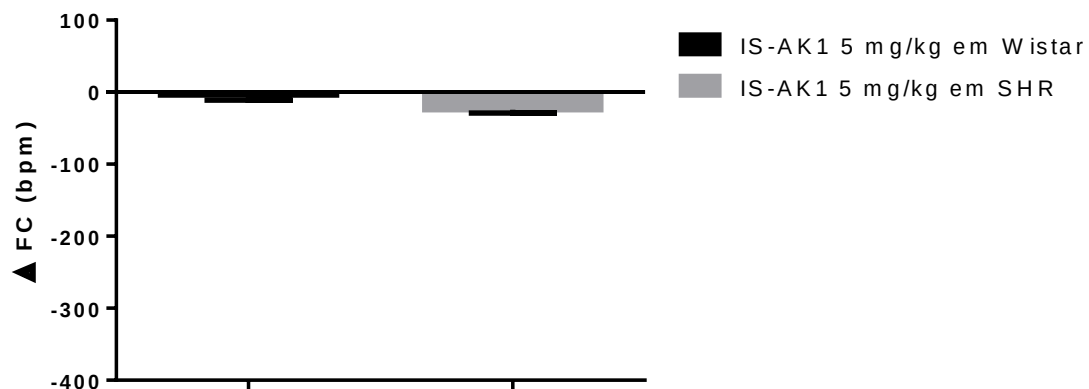


Gráfico 17 – Comparação dos efeitos da administração aguda do IS-AK1 (5 mg/kg, IV) sobre a frequência cardíaca (FC) em ratos Wistar ($n = 7$) e ratos SHR não-anestesiados ($n = 6$). Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com administração de salina.

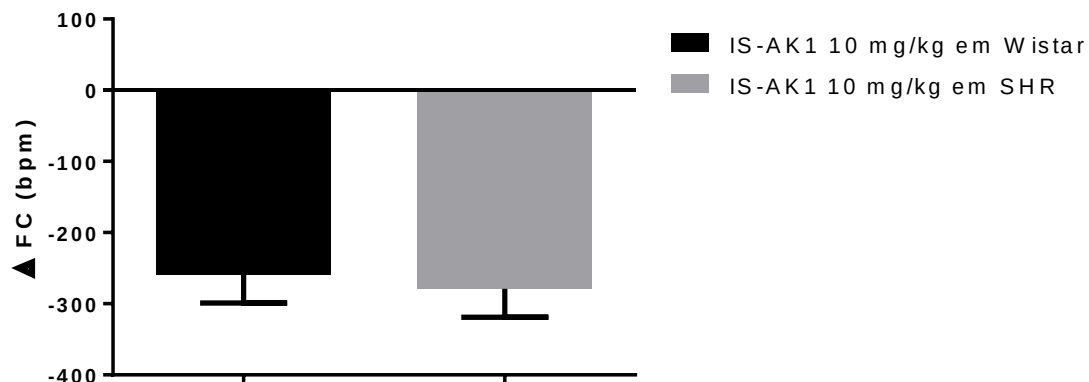


Gráfico 18 – Comparação dos efeitos da administração aguda do IS-AK1 (10 mg/kg, IV) sobre a frequência cardíaca (FC) em ratos Wistar ($n = 7$) e ratos SHR não-anestesiados ($n = 6$). Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo com administração de salina.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Este estudo buscou investigar os efeitos cardiovasculares de quatro derivados das isatinas inéditos o IS-AK1, o IS-BK1, o B-001 e o D-001 em ratos Wistar, elucidando os possíveis mecanismos de ação envolvidos na resposta pelo composto mais promissor.

A etiologia da hipertensão está associada com a disfunção endotelial e a mudanças no tônus muscular liso vascular (BRUNNER et al, 2005). Muitas alterações cardiovasculares, como hipertensão, angina e insuficiência cardíaca, são frequentemente tratadas com fármacos vasodilatadores, que atuam diretamente no músculo liso vascular causando vasorrelaxamento, ou indiretamente, por meio da estimulação da liberação de fatores vasorrelaxantes endógenos, ou ainda por inibir a liberação de fatores vasoconstritores. Esses fármacos resultam em efeitos benéficos principalmente pela dilatação de artérias, vasos de resistência, ou dilatação de veias, vasos de capacitância, reduzindo o retorno venoso para o coração (GURNEY, 1994).

A disfunção endotelial é definida como um desequilíbrio de fatores vasoativos derivados do endotélio e levando à vasoconstrição excessiva. A disfunção endotelial pode ser causada por desequilíbrio entre fatores vasodilatadores e fatores constritores, pró e anticoagulantes ou inibidores e promotores de crescimento (RUBANYI, 1993). É um evento precoce na fisiopatologia das principais doenças cardiovasculares (SERBAN; NILIUS; VANHOUTTE, 2010). Esse desequilíbrio é principalmente causado pela redução da biodisponibilidade do NO e/ou aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (MONTEZANO, TOUYZ, 2012).

Uma alternativa para o controle efetivo vascular é a utilização de nitratos orgânicos os quais são bastante conhecidos por causar vasorrelaxamento devido a liberação de NO originário do grupo NO₂ em sua estrutura. Porém, os nitratos orgânicos utilizados na clínica, induzem tolerância, efeito caracterizado pela redução na biotransformação dos nitratos em meio fisiológico, redução da ativação da sGC e consequente redução da resposta vasorrelaxante induzida pelos mesmos, limitando muito sua eficácia (BENNETT et al, 1988; GOYAL et al, 2006; KLEMENSKA; BERSEWICZ, 2009).

Uma vez que o endotélio se encontra disfuncional no estado hipertensivo, o tratamento com substâncias que tenham ação de forma dependente de endotélio é menos eficaz, nestes casos. Outra alternativa é a utilização de drogas que atuam de forma independente do endotélio vascular, agindo diretamente sobre a camada muscular. No que diz respeito ao relaxamento do músculo liso vascular, várias doenças cardiovasculares como hipertensão, vasoespasma coronariano e isquemia cardíaca tem sido associados com expressão ou ativação alterada de vários canais para potássio (CHAN, WOODMAN, 1999; HIBINO, 2006 JEPPS et al, 2011). Neste contexto se destacam as drogas que agem em canais iônicos celulares como os canais para potássio.

Analisando-se os dados descritos na tabela 1 e gráfico 1, observa-se que todos os derivados da isatina testados apresentam efeito vasorelaxante dependente de endotélio, com exceção do IS-AK1 que também foi a substância que apresentou maior potência na capacidade de relaxamento. Em uma recente revisão, LUNA-VÁZQUEZ et al. (2013) mostraram que metade dos compostos testados extraídos de plantas com mecanismos de ação vasorrelaxante descritos tem seus efeitos, pelo menos em parte, de maneira dependente de endotélio.

As diferenças nos efeitos das substâncias se devem, muito provavelmente, as mudanças estruturais dos compostos testados. Decidiu-se, então, dar continuidade aos estudos, tentando desvendar os mecanismos pelos quais age o composto IS-AK1.

MARONÑAS et al, (2008) mostraram o efeito vasodilatador de seis novos carbamatos derivados da isatina em aorta de ratos. Três deles desencadearam seus efeitos vasodilatadores por um processo dependente de endotélio, com dois deles por ação em receptores muscarínicos e o mais potente deles incluindo a ativação de receptores opióides na via de relaxamento. Outro estudo do mesmo grupo realizado por GABRIEL et al, 2011 mostrou que outros dois novos compostos produzem vasodilatação aorta, um deles causando vasodilatação por estimulação de receptores muscarínicos e opióides e o outro causando, além de vasodilatação também inotropismo negativo em músculos papilares ventriculares por estimulação de receptores de bradicinina e opióides.

Baseando-se em estudos que mostram que a isatina age tanto na atividade da ciclase de guanilil particulada do cérebro de ratos estimulada pelo peptídeo natriurético atrial e pelo peptídeo natriurético cerebral quanto na atividade da sGC ativada por NO (MEDVEDEV et al 1998; MEDVEDEV et al 2002), decidiu-se investigar se o IS-AK1

poderia estar causando vasodilatação em artérias mesentéricas craniais de ratos por agir na sGC.

Para isso, utilizou-se o inibidor ODQ na concentração de 10 μM e notou-se que a curva concentração-resposta que compara os efeitos da substância teste na presença do inibidor foi deslocada para a direita quando comparada com a curva concentração-resposta na ausência do inibidor, causando diminuição da potência. Nota-se que houve também redução do efeito máximo, ou seja, da eficácia do IS-AK1 em resposta ao bloqueio com ODQ. Estes resultados podem ser visualizados no gráfico 05 e sugerem que os efeitos deste derivado da isatina se devem em parte a ação sobre a sGC. Sugere-se então que o IS-AK1 age na sGC aumentando a concentração de GMPc, pela maior conversão de GTP em GMPc.

LUNA-VÁZQUEZ et al. (2013) mostraram que de 207 compostos extraídos de plantas com atividades vasodilatadoras 40% apresentam um ou mais mecanismos de ação. Partiu-se então para investigar a via “*downstream*” que desencadeia o vasorrelaxamento no músculo liso vascular do IS-AK1: a participação de canais iônicos.

O cálcio é o regulador primário da tensão nos músculos lisos. Drogas que atuam ativando canais para K^+ ou bloqueando canais para Ca^{+2} podem fechar Cav reduzindo o influxo de cálcio, relaxando o músculo liso vascular causando diminuição da pressão arterial, portanto podendo ser considerados candidatos a novos fármacos no controle da HA (BAKER, 2000).

Tendo isso em vista avaliou-se a participação dos canais Cav no efeito vasorrelaxante do IS-AK1. Para isso utilizou-se a solução de Tyrod com o KCl na concentração de 60 mM que nesta concentração, bloqueia o efluxo de íons K^+ , gerando despolarização e induzindo contração por aumento do influxo de cálcio extracelular através de Cav tipo L e T. Além da ação sobre os Cav , esta condição experimental ativa canais de potencial receptor transiente (TRPs) e inibe a atividade da fosfatase da MLC por ativação da ROCK, aumentando portanto, a sensibilidade ao Ca^{2+} e mantendo o tônus do músculo liso vascular (OLIVEIRA; MEDEIROS; MUKEIJEE, 1996; RATZ; BERG, 2006; RATZ; MINER; BARBOUR, 2009).

Frente a esta solução despolarizante, se o vasorrelaxamento for atenuado de maneira significativa, a via comum entre a solução despolarizante com 60 mM de KCl e da FEN, ativação dos Cav e envolvimento da via da ROCK, não está implicada no

efeito vasodilatador da substância (KARAKI et al., 1997; SAKAMOTO et al., 2003; SOMLYO; SOMLYO, 1994).

A atenuação da resposta após indução da contração com 60 mM de KCl, sugerem que o efeito vasorrelaxante do IS-AK1, observado no gráfico 03, provavelmente, envolve a participação de canais para K^+ . Dados da literatura mostram que compostos vasodilatadores, cujos mecanismos são dependentes de canais para K^+ , apresentam uma perda de seus efeitos quando expostos a soluções com alta concentração de K^+ , pelo fato de que esse aumento do K^+ extracelular atenua o gradiente eletroquímico deste íon através da membrana, tornando, assim, o mecanismo de ativação destes canais ineficaz (KHAN; HIGDON; MEISHERI, 1998; MENEZES et al., 2007).

Considerando que os dados referentes ao KCl 60 mM sugerem a participação de canais para K^+ na resposta vasodilatadora induzida por IS-AK1 e considerando a importância dos canais para K^+ na regulação do tônus vascular, decidiu-se então investigar os a participação dos quatro tipos de canais para K^+ identificados no músculo liso vascular (BK_{Ca} , K_V , K_{ATP} e K_{IR}) na resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1.

Em células musculares lisas, a atividade dos canais para K^+ está ligada ao tônus contrátil, então fatores que regulam a atividade destes canais têm maior influência no tônus e também no diâmetro de vasos sanguíneos e consequentemente na resistência vascular, fluxo sanguíneo e pressão arterial (STANDEN; QUAYLE, 1998). Além disso, doenças como a hipertensão podem induzir mudanças na função e/ou expressão padrão dos canais de K^+ (ARAÚJO et al, 2014). Daí a importância de moléculas que atuem abrindo estes canais.

Além disso, AHRING et al, (2000) mostraram que derivados da isatina com estrutura química semelhantes a estrutura química do IS-AK1 apresentaram efeitos sobre K_{Ca} em diversos sistemas biológicos. Decidiu-se então investigar a participação de canais para K^+ nos efeitos do IS-AK1. Para tanto, utilizou-se o bloqueador inespecífico destes canais, o TEA na concentração de 3 mM (WANG et al., 2008).

Quando se compara a curva concentração-resposta na presença do inibidor com a curva concentração-resposta na ausência do inibidor, verifica-se que ocorreu um desvio para direita da mesma, com diminuição da resposta máxima e da potência. A

atenuação da resposta foi bastante significativa (~50%). Estes dados sugerem que os canais para K^+ estão envolvidos nos efeitos vasorrelaxantes induzidos pelo IS-AK1.

O próximo passo foi investigar quais subtipos de canais para K^+ que estariam envolvidos na resposta vasorrelaxante induzida pelo IS-AK1. O envolvimento de diferentes subtipos de canais para potássio no efeito vasorrelaxante de novos compostos tem sido avaliado pelo uso de diferentes bloqueadores específicos de canais. Os subtipos de canais para K^+ investigados foram BK_{Ca} , K_{IR} , K_{ATP} e K_V .

Existem outros subtipos de canais para K^+ descritos em artérias mesentéricas cranial de ratos, como os canais para potássio sensíveis ao cálcio de intermediária condutância (IK_{Ca}) e os SK_{Ca} , mas esses subtipos de canais estão envolvidos em respostas mediadas por hiperpolarização dependente de endotélio e nosso composto testado age de forma independente de endotélio (EDWARDS et al, 1998; FÉLÉTOU; VANHOUTTE; 2010). De fato os SK_{Ca} são expressos no endotélio, mas não em células musculares lisas vasculares, já os IK_{Ca} tem sido mostrado serem expressos em células musculares lisas vasculares, mas apenas quando miócitos estavam em estado proliferativo (NEYLON et al, 1999).

Toxinas de escorpião são peptídeos de cadeia curta que fazem duas, três ou quatro pontes dissulfeto que podem agir seletivamente em diferentes subtipos de canais para K^+ e são amplamente usadas como provas moleculares para diferenciar em qual subtipo de canal uma substância age (SWARTZ, 2013). Miller et al, (1985) foi o primeiro a descrever o efeito do veneno do escorpião Israelí, *Leiurus quinquestriatus*, e o nomeou de caribdotoxina que contém uma pequena proteína que se liga a um único sítio no lado externo dos BK_{Ca} bloqueando seu poro. Curiosamente, os SK_{Ca} são apenas inibidos por uma pequena quantidade de toxinas de escorpião tais como as toxinas P05, BmP05 e ScyTx que interagem sobre K_V e BK_{Ca} . A estrutura da caribdotoxina foi avaliada recentemente por Banerjee et al (2013) e mostrou-se que ela age também sobre K_V .

Utilizou-se o TEA na concentração de 1 mM (nesta concentração, é bem relatado que bloqueia BK_{Ca}) (ADARAMOYE; MEDEIROS, 2009; FÉLÉTOU, 2009; LANGTON et al., 1991). Este subtipo de canal desempenha um papel fundamental na regulação da pressão arterial e então, sugere-se que seja um potencial alvo para novas drogas com enfoque no tratamento de doenças cardiovasculares (COGOLLUDO et al,

2007). Os BK_{Ca} são ativados na microcirculação durante a vasoconstrição ativa por agentes como norepinefrina e tensão de O₂ elevada, então eles parecem desempenhar um papel de feedback negativo para limitar a vasoconstrição ativa e prevenir o vasoespasm (JACKSON, 2000)

Outros relatos demonstram que este subtipo de canal é altamente expresso em células musculares lisas, onde participam da criação do potencial de repouso da membrana, regulando o tônus vascular e funcionando como um mecanismo de compensação para a vasoconstrição (HU, ZANG, 2012; HILL et al, 2010). Além disso, Kang et al, (2007) mostraram que a função desse subtipo de canal está comprometida em artérias mesentéricas de resistência de vários modelos de hipertensão, como infundidos por angiotensina II, associados ou não a um aumento na ingestão de sal, e hipertensão dependente de sal-DOCA.

Conforme se pode notar no gráfico 05, a curva concentração-resposta com o bloqueio dos BK_{Ca} foi deslocada para a direita, reduzindo o efeito máximo e a potência do composto testado, sugerindo que boa parte dos efeitos vasorrelaxantes do mesmo se deve a sua ação sobre este tipo de canal. Os canais BK_{Ca} podem ser ativados por diversas quinases, incluindo a proteína quinase A ou proteína quinase dependente de AMPc (PKA), PKG e a PKC (SCHUBERT, NELSON, 2001, KUME et al, 1989). Agindo sobre BK_{Ca}, geralmente, vasodilatadores endógenos elevam os níveis de cAMP e cGMP e vasoconstritores levam a ativação da PKG (LEDOUX et al, 2006). A ativação destes canais pela PKG confirma nossos resultados referentes ao bloqueio da GCs pelo ODQ uma vez que esta enzima é responsável pela conversão GTP em GMPc, que por sua vez, ativa a PKG (MURPHY, 2006).

Outro subtipo de canal que teve sua participação avaliada foram os canais K_{ATP}. Trata-se de uma classe de canais iônicos expresso em uma variedade de tecidos sendo amplamente distribuídos em diferentes órgãos e tecidos do corpo. São melhores descritos em células cardíacas e células β pancreáticas, mas também estão presentes no sistema nervoso central e periférico e células musculares lisas vasculares e não vasculares (AZIZ et al, 2015). Este subtipo de canal está envolvido em uma ampla variedade de processos fisiológicos, como controle do tônus vascular e proteção de células cardíacas contra injúria isquêmica e, portanto, mudanças na expressão ou função deste subtipo de canal está associado a comprometimentos na vasodilatação (MARTIN

et al, 2013; CLIMENT et al., 2014). Além dos níveis de ATP, outros mecanismos abrem os K_{ATP} como adenosina, prostaciclina e o isoproterenol (JACKSON, 1993a; JACKSON, 1993b).

Para investigar sua participação nos efeitos do IS-AK1, utilizou-se a GLIB (10 μ M), uma ferramenta farmacológica que bloqueia especificamente esse tipo de canal (OHRNBERGER; KHAN; MEISHERI, 1993). Observa-se que o bloqueio dos canais K_{ATP} diminuiu levemente de 5 vezes na potência do IS-AK1, sugerindo sua participação nos efeitos vasorrelaxantes do mesmo. Em estados hipertensivos, os K_{ATP} se mostram com função comprometida em aorta de ratos hipertensos DOCA-sal (GHOSH et al, 2004).

Outro subtipo de canal para potássio que teve sua participação investigada foi o K_V . Para isso utilizou-se o 4-AP na concentração de 1mM, que nessa concentração bloqueia especificamente esse subtipo de canal (BERG, 2002). Nota-se que houve uma diferença muito discreta de 7 vezes na potência do efeito vasorrelaxante do IS-AK1, sugerindo que este subtipo de canal tenha participação parcial em seu no efeito vasorrelaxante. Estudos mostram que este subtipo de canal pode ser ativado por poucas vias de sinalização, que um número de quinases tem a capacidade de fosforilá-los e alterar suas propriedades funcionais e ainda que alguns vasodilatadores modulam canais K_V indiretamente, por ativação de proteínas quinases A e G (COX, 2005; JACKSON, 2005). Uma upregulation de canais para Ca^{2+} do tipo-L e/ou uma perda de K_V tem sido proposto como um mecanismo chave excitatório que resulta em despolarização da membrana e aumento do influxo de Ca^{2+} em artérias expostas a alta pressão arterial.

Um subtipo de canais bastante abundante em células musculares lisas de vasos de resistência de pequeno diâmetro que tem participação na capacidade vasorrelaxante é o subtipo K_{IR} (PARK et al, 2006). Sugere-se duas funções deste canal na célula muscular lisa: a primeira é que este canal contribua para o potencial de membrana e o tônus de repouso na musculatura lisa vascular de pequeno diâmetro e a segunda é que a ativação deste canal em resposta ao aumento moderado na concentração extracelular de K^+ possa causar dilatação (KO et al, 2008).

Sua participação no efeito vasorrelaxante induzido pelo IS-AK1 foi também investigada e nota-se que uma diminuição da potência deste composto, sugerindo que o mesmo tem participação em sua via de relaxamento em artérias mesentéricas craniais.

Nota-se que a participação do canal BK_{Ca} na resposta vasodilatadora do derivado da isatina escolhido se destacou dentre os demais, apresentando-se redução da potência em cerca de 210 vezes na curva-concentração resposta na presença do inibidor de acordo com o pD_2 , portanto, seus efeitos são de grande relevância. Este foi o subtipo de canal para K^+ , que quando bloqueado, diminuiu com maior intensidade a potência do IS-AK1. Isso é de fundamental importância, uma vez que estudos relatam a relevância dos ativadores deste canal na regulação do tônus vascular e da PA, dando base racional sólida para a utilização deste composto na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares (LEDOUX, 2006). Além disso, estudos mostram que a função e expressão deste tipo de canal se mostra alterado em animais hipertensos como SHR (JONES, 1973; JONES; HART, 1975; CHANG et al, 2006).

Alguns vasodilatadores agem através da ciclase de guanilil, levando ao aumento intracelular de GMPc e conseqüentemente, a ativação da PKG, que ocasiona ativação de canais para K^+ (KO et al, 2008). O aumento de AMPc e GMPc nas células musculares lisas é considerado um dos importantes mecanismos de relaxamento. O GMPc ativa seletivamente a PKG, enquanto que o AMPc ativa seletivamente a PKA, porém concentrações aumentadas de AMPc pode ativar também a PKG (MURTHY, 2006).

HOESSEL et al (1999) mostraram que a indirubina, um derivado da isatina, e seus análogos tem efeitos sobre quinases dependentes de ciclina. Propõe-se neste trabalho que o IS-AK1 ativa a PKG pela formação de GMPc a partir da ativação da sGC, com conseqüente ativação de K_V , K_{ATP} , BK_{Ca} e K_{IR} e isto, por sua vez ocasiona inativação dos Ca_V , com diminuição do influxo de Ca^{+2} e diminuição na $[Ca^{+2}]$ na célula muscular lisa, desfosforilação da MLC e vasorrelaxamento (Figura 17).

Com base nos nossos achados *in vitro* resolveu-se então analisar se esses efeitos vasorrelaxantes se refletiriam em redução da pressão arterial *in vivo* em ratos adultos normotensos Wistar e hipertensos do modelo de hipertensão SHR. A dose de 5 e 10 mg/kg do IS-AK1 foram utilizadas devido ao fato de estudos mostrarem que estas doses utilizadas em estudos *in vivo* com derivados da isatina não causam efeitos centrais, confirmando o efeito pela via periférica, provavelmente por relaxamento de artérias de resistência.

A partir de acasalamentos consanguíneos entre irmãos de ratos Wistar, da colônia de Kyoto no Japão, que apresentavam pressão arterial elevada espontaneamente,

Okamoto e Aoki (1963) desenvolveram a linhagem de ratos SHR. Esta hipertensão espontânea foi definida como valores de pressão arterial sistólica acima de 150 mmHg persistindo por mais de um mês. Apesar de ser um modelo de hipertensão bastante estudado em ratos, os mecanismos de desenvolvimento da hipertensão ainda não estão completamente entendidos (LI et al, 2015).

Segundo Yamori (1984) estes animais desenvolvem hipertensão espontaneamente na sétima a décima quinta semana de vida, já segundo McGuire e Tweitmeyer (1985) a hipertensão ocorre entre a décima segunda e décima quarta semanas. Este modelo genético de hipertensão primária apresenta características fenotípicas semelhantes àsquelas observadas na hipertensão essencial em humanos, por isso este modelo animal é amplamente usado como modelo animal para estudo da hipertensão essencial em humanos (PINTO et al., 1998).

Em estágios iniciais de hipertensão, os SHR têm um débito cardíaco aumentado com resistência periférica total normal, mas com a progressão da hipertensão para um estado estabelecido, o débito cardíaco retorna ao normal e os vasos sanguíneos hipertrofiados produzem um aumento na resistência periférica total (SMITH, 1979).

Este modelo também está associado com aumento na resistência vascular periférica, além de hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca, disfunção renal e outras patologias (PINTO et al, 1998; FAZAN et al., 2001). Em estágios avançados, ele apresenta ainda, além de vasorrelaxamento de artérias comprometido, tendência a desenvolver acidentes vasculares e também de desenvolver aterosclerose não macroscópica ou trombose vascular (PINTO et al, 1998). Levando isto em consideração este foi o modelo escolhido neste estudo e os ratos utilizados tinham mais de 12 semanas de vida.

Neste estudo, verificou-se que a dose de 10 mg/kg do IS-AK1 foi capaz de gerar potente efeito hipotensor *in vivo* do IS-AK1 e também um importante efeito bradicárdico tanto em ratos Wistar quanto em SHR. O efeito hipotensor foi mais pronunciado nos ratos hipertensos. Esse efeito bradicárdico pode ser devido à grande diminuição do retorno venoso causado pela grande vasodilatação vascular, mas também pode ser devido a efeitos diretos da substância no coração uma vez que o efeito na frequência cardíaca ocorreu milésimos de segundo antes do efeito hipotensor.

De forma semelhante ao IS-AK1, fármacos que agem como os doadores de NO, como nitroglicerina, nitroprussiato de sódio e outros mais recentemente descobertos, são capazes de causar vasorrelaxamento em artérias de ratos e maiores efeitos hipotensores em ratos hipertensos quando comparados aos efeitos hipotensores em ratos normotensos (FRANÇA-SILVA et al, 2012; MUNHOZ et al, 2012; POTJE et al, 2014). Essas drogas também se assemelham ao IS-AK1 por causar esta hipotensão associada a bradicardia, porém é observado uma taquicardia reflexa como resposta a hipotensão causada pelos doadores de NO o que não ocorre com o nosso composto testado.

Provavelmente, o efeito hipotensor mais pronunciado do IS-AK1 em ratos SHR se deve a alterações vasculares que ocorrem nos canais iônicos deste modelo de hipertensão. Registro eletrofisiológicos mostram que tanto correntes de canais Cav quanto canais K_{Ca} estão aumentados nos SHR (SHI et al, 2015). Foi relatado também por BEHULIAK et al, (2013) uma maior sensibilização de entrada de Ca^{2+} por Cav que este modelo apresenta desencadeando manutenção de altos níveis de pressão arterial e/ou aumento da contração vascular comparados aos seus controles normotensos. Além disso, a expressão de BK_{Ca} e as correntes de saída de K^+ aumentam em células musculares lisas dos SHR, conforme aumenta a idade, mas sempre é superior a expressão nos ratos normotensos (HU et al, 2013).

Como nós sugerimos que nosso composto teste escolhido, o IS-AK1, age em canais para K^+ , provavelmente a abertura dos mesmos leva a inibição dos Cav e, consequentemente, efeito mais acentuado no modelo SHR.

Doses acima de 10 mg/kg da isatina causam efeitos centrais como aumento de monoaminas cerebrais. Doses na faixa entre 50 e 100 mg/kg por via i.p. atravessam a barreira hemato-encefálica sendo confirmada por mensuração após eutanásia do animal (BHATTACHARYA, 1991). Doses como as de 80 a 200 mg/kg foram confirmadas em uma variedade de modelos experimentais como capazes de promover efeito anticonvulsivante (SAREEN et al, 1962). Segundo YUWILER (1990), a dose de 80 mg/kg quando administrada por via i.p. causou aumento dos níveis serotoninérgicos cerebrais quando analisados até duas horas após a administração. Da mesma forma que a isatina, tem sido mostrado que derivados da isatina quando administrados por via i.p. na dose de 100 mg/kg causam efeitos centrais, principalmente efeitos anticonvulsivantes e antidepressivos em camundongos. Utilizando-se esta dose de 10 mg/kg confirma-se então que os efeitos encontrados são por ações periféricas.

Outro estudo mostra que altas doses (50 e 200 mg/kg i.p.) de isatina produziram aumento na concentração de norepinefrina cerebral em WKY de forma aguda diferentemente de ratos SHRSP. Porém as mesmas doses foram testadas e uma simples injeção da isatina não induziu qualquer efeito cardiovascular ou comportamental em nenhuma das doses testadas tanto em WKY quanto em SHRSP. Já por via oral o tratamento por 4 semanas com a dose de 200 mg/kg causou aumento da pressão arterial nos ratos WKY que pode ter sido ocasionado pelo aumento de norepinefrina e dopamina circulantes, uma vez que foram encontradas concentrações aumentadas desses componentes na urina (HAMAUE et al, 1999).

A toxicidade da isatina e de seus derivados foi previamente avaliada por CÂNDIDO-BACANI et al, (2011), no qual foi mostrado que a administração aguda de doses altas como a de 50 mg/kg, 100 mg/kg e 150 mg/kg de isatina por via oral não causam lesões no DNA após 4 e 24 horas, nem aumentos nas células sanguíneas periféricas mononucleadas nos tempos de 36, 48 e 72 horas.

Os compostos testados apresentaram efeitos vasorrelaxantes consideráveis e o composto escolhido para dar continuidade nos experimentos para desvendar o mecanismo de ação, o IS-AK1 se mostrou ser um potente ativador da sGC e de canais de potássio (figura 17). Além disso, também apresentou importante efeito hipotensor, inclusive efeito esse mais pronunciado em ratos hipertensos. Observa-se também notório efeito bradicárdico e esse efeito pode ser devido a efeitos da substância também no coração. Portanto, maiores estudos adicionais são necessários para desvendar os mecanismos de ação *in vivo* e seus efeitos específicos sobre o coração.

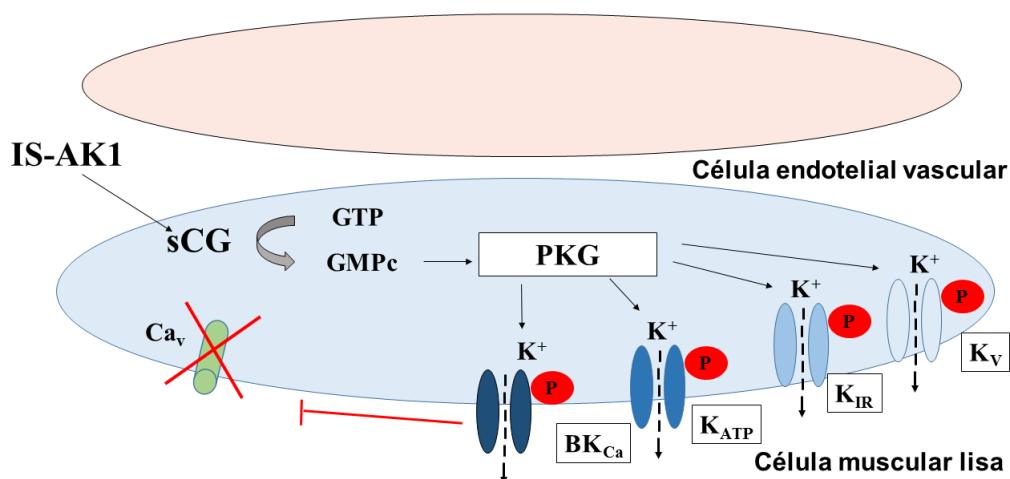


Figura 17 - Esquema representativo indicando o mecanismo de ação do IS-AK1 causando vasorrelaxamento e, conseqüentemente, hipotensão nos ratos Wistar.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

- Os quatro compostos derivados da isatina testados apresentam atividade vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos;
- O IS-BK1, o B-001 e o D-001 apresentam a participação do endotélio nos seus efeitos vasorrelaxantes;
- O IS-AK1 causa efeitos vasorrelaxantes de maneira independente do endotélio;
- O IS-AK1 causa efeitos hipotensores e bradicárdicos *in vivo* em ratos Wistar e em ratos SHR;
- O mecanismo de ação proposto para o IS-AK1 envolve a participação da enzima sGC, consequentemente levando a ativação da PKG que ocasiona ativação de canais para K^+ do tipo K_{ATP} , K_V , K_{IR} e, principalmente, BK_{Ca} ;
- Apesar do IS-AK1 não agir sobre canais Ca_v , sugere-se que a ativação dos canais de K^+ leva ao fechamento dos canais Ca_v gerando diminuição do influxo de Ca^{+2} na célula muscular lisa, desfosforilação da MLC e vasorrelaxamento;
- Os mecanismos de ação destes compostos merecem ser melhor investigados, tornando-os possíveis candidatos a novos fármacos no controle da PA.

7 PERSPECTIVAS

- Desvendar os mecanismos de ação dos outros derivados da isatina testados (IS-BK1, B-001 e D-001);
- Analisar os efeitos diretos dos IS-AK1 sobre o coração;
- Realizar estudos crônicos com o IS-AK1 em animais normotensos e hipertensos;
- Avaliar os efeitos centrais do IS-AK1 em áreas do SNC envolvidas com a regulação da PA;
- Realizar estudos de toxicidade do IS-AK1.

Referências

REFERÊNCIAS

ADARAMOYE, O. A.; MEDEIROS, I. A. Endothelium-independent vasodilation induced by kolaviron, a biflavonoid complex from *Garcinia kola* seeds, in rat superior mesenteric arteries. **Journal of Smooth Muscle Research**. v. 45, n. 1, p. 39-53, 2009.

AHRING, P. K.; CHRISTOPHERSEN, P.; JENSEN, B. S.; JOERGENSEN, T. D.; OLESEN, S. P.; STROEBAEK, D.; TEUBER, L. **Use of isatin derivatives as ion channel activating agents**. WO/2000/033834. Dinamarca, 15 junho, 2000.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; KEITH, R.; WALTER, P. *Molecular Biology of Cell*. 4 Ed. Garland Science. 2002.

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

ANGELI, J. K. Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas. **Exposição aguda ao cádmio induz lesão endotelial em aorta de ratos: Papel do estresse oxidativo, da angiotensina II e dos prostanóides da via da ciclooxigenase**. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Espírito Santo Vitória, Julho de 2013.

ARAÚJO, A. V.; MARCELLA, M. D.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Function and Protein Expression of Potassium Channels in Mesenteric Resistance Arteries Isolated from 2K-1C Hypertensive Rats. **Hypertension: Open Access**. v. 3, p. 1-7. 2014.

ARUN, Y.; SARANRAJ, K.; BALACHANDRAN, C.; PERUMAL, P. T. Novel spirooxindolepyrrolidine compounds: Synthesis, anticancer and molecular docking studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 74, p. 50-64. 2014.

AZIZ, Q.; LI, Y.; TINKER, A. ATP-sensitive potassium channels and vascular function. **Channels**. v. 9:1, n. 3-4. 2015.

BAKER, E. H. Ion channels and the control of blood pressure. **Journal of Clinical Pharmacology**. v. 49, p. 185-198. 2000.

BANERJEE, A.; LEE, A.; CAMPBELL, E.; MACKINNON, R. Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K⁺ channel. **eLife**. v. 2, p. e00594. 2013.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v.13, n.1, p.29-39. 1990.

BARREIRO, E.; FERREIRA, M.; COSTA, P. R. R. Substâncias enantiomericamente puras (sep): a questão dos fármacos quirais **Química Nova**, v. 20, p. 647, 1997.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal**. Artmed, Porto Alegre, 2001.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 328-338, 2001.

Behuliak, M.; Pintérova, M.; Bencze, M.; Petrová, M.; Li's'kova, S.; Karen, P.; Kunes, J.; Vane' c'kova', I.; Zicha, J. Ca²⁺ sensitization and Ca²⁺ entry in the control of blood pressure and adrenergic vasoconstriction in conscious Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**. v. 31. n. 10. 2013.

BENNETT, B. M.; SCHRODER, H.; HAYWARD, L. D.; WALDMAN, S. A.; MURAD, F. Effect of in vitro organic nitrate tolerance on relaxation, cyclic GMP accumulation, and guanylate cyclase activation by glyceryl trinitrate and the enantiomers of isoidide dinitrate. **Circulation Research**. v. 63, p. 693 – 701, 1988.

BERG, T. Analysis of the pressor response to the K⁺ channel inhibitor 4-aminopyridine. **European Journal Pharmacology**. v.452, p.325-337, 2002.

BERGMAN, J.; LINDSTROM, J. O.; TILSTAM, U. The structure and properties of some indolic constituents in *Couroupita guianensis* Aubl. **Tetrahedron**. v. 41, p. 2879. 1988.

BHATTACHARYA, S. K.; MITRA S. K.; ACHARYA, S. B. Anxiogenic activity of isatin, a putative biological factor in rodents. **Journal of Psychopharmacol.** v. 5, n. 202– 6. 1991.

BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 21, p. 5047-5061, 2009.

BHATTACHARYA, S. K.; ACHARYA, S. B. Further investigations on the anxiogenic effects of isatin. **Biogen. Amines**. v. 9, p. 453-463. 1993.

BHATTACHARYA, S. K.; CHAKRABARTI, A. Dose-related proconvulsant and anticonvulsant activity of isatin, a putative biological factor, in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**. v 36, p. 118–121. 1998.

BHATTACHARYA, S. K.; CLOW, A.; PRZYBOROWSKA, A.; HALKET, J.; GLOVER, V.; SANDLER, M. Effect of aromatic amino acids, pentylentetrazole and yohimbine on isatin and tribulin activity in rat brain. **Neurosci Lett**. v. 132, n. 44–6. 1991.

BHATTACHARYA, S. K.; MITRA, S. K.; ACHARYA, S. B. Anxiogenic activity of isatin, a putative biological factor, in rodents. **Journal of Psychopharmacology Oxford England**. v. 5, p. 202–206. 1991.

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

BILLINGTON, C. K.; PENN, R. B. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. **Respiratory Research**. v. 4, n. 1, p. 2, 2003.

BRADLEY, H. A.; WIYONGE, C. S.; VOLMINK, V. A.; MAYOSI, B. M.; OPIE, L. H. How strong is the evidence for use of beta-blockers as first line therapy for hypertension? **Journal of Hypertension**. v. 24, p. 2131–2141. 2006.

BRUNNER, H.; COCKCROFT, J.R.; DEANFIELD, J. Endothelial function and dysfunction. Part II: association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial factors of the European Society of Hypertension. **Journal of Hypertension**. v. 23, p. 233–246. 2005.

BRYAN, R. M.; YOU, J.; GOLDING, E. M.; MARRELLI, S. P. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Anesthesiology**. v. 102, n. 6, p. 1261–1277, 2005.

BULBRING, E.; TOMITA, T. Catecholamine action on smooth muscle. **Pharmacological Reviews**. v. 39, p. 49–96. 1987.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v. 8, p. 30-40, 2001.

CAIN, A. E.; KHALIL, R. A. Pathophysiology of essential hypertension: role of the pump, the vessel, end the kidney. **Seminars in Nephrology**, v. 22, p. 3 - 16, 2002.

CÂNDIDO-BACANIA, P. M.; REIS, M. B.; SERPELONI, J. M.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A.; CÓLUS, I. M S. Mutagenicity and genotoxicity of isatin in mammalian cells in vivo. **Mutation Research**. v. 719, p. 47–51, 2011.

CANE, A.; TOURNAIRE, M. C.; BARRITAU, D.; CRUMEYROLLE-ARIAS, M. The endogenous oxindoles 5-hydroxyoxindole and isatin are antiproliferative and

proapoptotic. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 276, p. 379–84, 2000.

CARL, A.; LEE, H. K.; SANDERS, K. M. Regulation of ion channels in smooth muscles by calcium. **American Journal of Physiology**. v. 271, p. C9–C34. 1996.

CARVAJAL, J. A.; GERMAIN, A. M.; HUIDOBRO-TORO, J. P.; WEINER, C. P. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. **Journal of Cellular Physiology**. v. 184, n. 3, p. 409–420, 2000.

CHAN, E.; WOODMAN, O. Enhanced role for the opening of potassium channels in relaxant responses to acetylcholine after myocardial ischaemia and reperfusion in dog coronary arteries. **British Journal of Pharmacology**. v. 126, p. 925–932. 1999.

CHANG, T.; WU, L.; WANG, R. Altered expression of BK channel beta1 subunit in vascular tissues from spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**. v. 19, p. 678–685. 2006.

CHAPMAN, J. G.; MAGEE, W. P.; STUKENBROK, H. A.; BECKIUS, G. E.; MILICI, A. J.; TRACEY, W. R. A Novel nonpeptidic caspase-3/7 inhibitor, (S)-(+)-5-[1-(2-methoxymethylpyrrolidiny)sulfonyl]isatin reduces myocardial ischemic injury. **European Journal of Pharmacology**. v. 456, p. 59–68. 2002.

CHEN, X. L.; REMBOLD, C. M. Phenylephrine contracts rat tail artery by one electromechanical and three pharmacomechanical mechanisms. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**. v. 268, n. 1, p. 74–81, 1995.

CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; GREEN, L. A.; IZZO JÚNIOR, J. L.; JONES, D. W.; MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; WRIGHT JÚNIOR, J. T, ROCCELLA EJ; Joint National Committee On Prevention, Detection, Evaluation, And Treatment Of High Blood Pressure. National Heart, Lung, And Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**. v. 42(6), v. 1206-52. 2003.

CHRISSOBOLIS, S.; ZIOGAS, J.; CHU, Y.; FARACI, F. M; SOBEY, C.G. Role of inwardly rectifying K1 channels in K1-induced cerebral vasodilatation in vivo. **American Journal of Physiology**. v. 279, p. 2704–2712, 2000.

CLIMENT, B.; SIMONSEN, U.; RIVERA, L. Effects of obesity on vascular potassium channels. **Current Vascular Pharmacology**. v. 12, p. 438-452. 2014.

CLOW, A.; GLOVER, V.; SANDLER. M.; TILER, J. Increased urinary tribulin output in generalized anxiety disorder. **Psychopharmacology**. v. 95, n. 378-380, 1988.

COGOLLUDO, A.; FRAZZIANO, G.; BRIONES, A.M.; COBEÑO, L.; MORENO, L.; LODI, F.; SALAICES, M.; TAMARGO, J.; PEREZ-VIZCAINO, F. The dietary flavonoid quercetin activates BKCa currents in coronary arteries via production of H₂O₂. Role in vasodilatation. **Cardiovascular Research**. v. 73, p. 424–431. 2007.

CONTRERAS, F.; DE LA PARTE, M. A.; CABRERA, J.; OSPINO, N.; ISRAILI, Z. H.; VELASCO, M. Role of angiotensin II AT1 receptor blockers in the treatment of arterial hypertension. **American Journal of Therapeutics**, v. 10, n. 6, p. 401-408, 2003.

COX, R.H. Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle. **Cell Biochemistry and Biophysics**. 42, 167-195. 2005.

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

COGOLLUDO, A.; VIZCAÍNO-PÉREZ, F.; TAMARGO, J. New insights in the pharmacological therapy of arterial hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 14, p. 423 – 427, 2005.

DANTAS, B. P. V.; RIBEIRO, T. P.; ASSIS, V.; FURTADO, F. F.; ASSIS, K.; ALVES, J.; SILVA, T. S.; CAMARA, C.; FRANÇA-SILVA, M. S.; VERAS, R. C.; MEDEIROS, I.A.; ALENCAR, J.; BRAGA, V. A. Vasorelaxation induced by a new naphthoquinone-oxime is mediated by NO-sGC-cGMP pathway. **Molecules (Basel. Online)**, v. 19, p. 9773-9785, 2014.

DELLIS, O.; DEDOS, S. G.; TOVEY, S. C.; TAUFIQ-UR-RAHMAN, DUBEL, S. J.; TAYLOR, C. W. Ca^{2+} entry through plasma membrane IP_3 receptors. **Science**. v. 14, n. 313 (5784), p. 229-33, 2006.

DOYLE, D. A.; MORAIS-CABRAL, J.; PFUETZNER, R. A.; KUO, A.; GULBIS, J. M.; COHEN, S. L.; CHAIT, B. T.; MACKINNON, R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. **Science**. v. 280(5360), p. 69–77. 1998.

EARLEY, S. TRPA1 channels in the vasculature. **British Journal of Pharmacology**. v. 167, p. 13–22. 2012.

ERDMANN, O. L.; J. **Prakt. Chem.**, v. 19, n. 321; 1840.

EDWARDS, G.; DORA, K. A.; GARDENER, M. J.; GARLAND, C. J.; WESTON, A. H. K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature**. v. 396, p. 269–72. 1998.

FÉLÉTOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? **British Journal of Pharmacology**. v. 156, p. 545-562, 2009.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. **Current Hypertens Report**. v. 12, p. 267–75. 2010.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). **American Journal of Physiology: Heart and Circulation Physiology**. v. 291, n. 3, p. H985-H1002, 2006.

FERNANDES, P. D.; ZARDO, R. S.; FIGUEIREDO, G. S. M.; SILVA, B. V.; PINTO, A. C. Anti-inflammatory properties of convolutamydine A and two structural analogues. **Life Sciences**. v. 116 p. 16–24. 2014

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiological Reviews**, v. 62, p. 347 - 504, 1982.

FRAÇA-SILVA, M. S.; MONTEIRO, M. M. O.; QUEIROZ, T. M.; SANTOS, A. F.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BRAGA, V. A. The new nitric oxide donor 2-nitrate-1,3-dibuthoxypropan alters autonomic function in spontaneously hypertensive rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**. v. 171, p. 28–35. 2012.

GABRIEL D, PONTES LB, DA SILVA JS, SUDO RT, CORRÊA MB, PINTO AC, GARDEN SJ, ZAPATA-SUDO G. Pharmacological activity of novel 2-hydroxyacetophenone isatin derivatives on cardiac and vascular smooth muscles in rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 57(1), p. 20-7. 2011

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 306-317, 2008.

GARCÍA-VILLALÓN, A. L.; FERNÁNDEZ, N.; MONGE, L.; DIÉGUEZ, G. Coronary response to diadenosine tetraphosphate after ischemia–reperfusion in the isolated rat heart. **European Journal of Pharmacology**. v. 660, p. 394–401. 2011

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

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C. L.; NIELSEN, E. B.; SHIMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Molecular Pharmacology**, v. 48, n. 2, p 184-188, 1995.

GAZIANO, T. A. Cardiovascular disease in the developing world old and its cost-effective management. **Circulation**, v.112, n.23, p. 3547 - 53, 2006.

GIRARDI, J. M.; GIRARDI, F. A.; PETERS, V. M. Endotélio vascular e efeitos das estatinas. **HU Revista**, v.32, n.1, p.21-25, 2006.

GHOSH, M.; HANNA, S. T.; WANG, R.; MCNEILL-JÚNIOR. Altered vascular reactivity and KATP channel currents in vascular smooth muscle cells from

deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 44, p. 525-531. 2004.

GLOVER V, BHATTACHARYA SK, SANDLER M. Isatin-a new biological factor. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 29, p. 1–5. 1991.

GLOVER, V.; HALKET, J. M.; WATKINS, P. J.; CLOW, A.; GOODWIN, B. L.; SANDLER, M. Isatin: identity with the purified monoamine oxidase inhibitor tribulin. **J Neurochem**. v. 51, p. 656 –9. 1988.

GLOVER, V.; MEDVEDEV, A.; SANDLER, M. Isatin is a potent endogenous antagonist of guanylate cyclase-coupled atrial natriuretic peptide receptors. **Life Sciences**. v. 57, p. 2073– 9. 1995.

GLOVER, V.; REVELEY, M. A. SANDLER, M. A Monoamine oxidase inhibitor in human urine. **Biochemical Pharmacology**, v. 29, pp. 467-470. 1980.

GOYAL, U.; KIRAN, S.; CHAUHAN, R.; JUNEJA, M.; CHOUDHARY, P. Efficacy of glyceril trinitrate inhalation in reducing pulmonary arterial hypertension in children with congenital heart disease. **British Journal of Anaesthesia**. v. 97, p. 208–214, 2006.

GREWAL, A. S. Isatin Derivatives with Several Biological Activities. **International Journal of Pharmaceutical Research**. v. 6, n. 1, p. 1-7, 2014.

GROSS, P. L.; AIRD, W. C. The endothelium and thrombosis. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 26, n. 5, p. 463–478, 2000.

GURNEY, A. M. Mechanisms of Drug-induced Vasodilation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 242-251, 1994.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Neuroscience**, v. 7, p. 335-346, 2006.

FAKLER, B.; ADELMAN, J. P. Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. **Neuron**. v. 59, p. 873–881. 2008.

FAZAN JÚNIOR, R.; SILVA, V. J. D.; SALGADO, H. C. Modelos de hipertensão arterial. **Brazilian Journal of Hypertension**. v. 8, p. 19–29. 2001.

HAMAUE, N.; MINAMI, M.; KANAMARU, Y. ISHIKURA, M.; YAMAZAKI, N.; SAITO, H. PARVEZ, S.H. Identification of isatin, an endogenous MAO inhibitor, in the brain of stroke prone SHR rats. **Biogenes Amines**. v. 10, p. 99-110. 1994.

HAMAUE, N.; MINAMI, M.; HIRAFUJI, M.; TERADO, M.; MACHIDA, M.; YAMAZAKI, N.; YOSHIOKA, M.; OGATA, A.; TASHIRO, K. Isatin, an Endogenous MAO Inhibitor, as a New Biological Modulator. **CNS Drug Reviews**. v. 5, n. 4, p. 331-346. 1999.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 18-20, p. 894-901, 2008.

HIBINO, H.; KURACHI, Y. A new insight into the pathogenesis of coronary vasospasm. **Circulation Research**. v. 98, p. 579–581. 2006.

HIBINO, H.; INANOBE, A.; FURUTANI, K.; MURAKAMI, S.; FINDLAY, I.; KURACHI, Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. **Physiology Reviews**. v. 90(1), p. 291–366. 2010.

HILL, M. A.; YANG, Y.; ELLA, S. R.; DAVIS, M. J.; BRAUN, A. P. Large conductance, Ca^{2+} -activated K^+ channels (BK_{Ca}) and arteriolar myogenic signaling. **FEBS Letters**. v. 584, p. 2033–2042. 2010.

HOESSEL, R.; LECLERC, S.; ENDICOTT, J.; NOBLE, M.; LAWRIE, A.; TUNNAH, P.; LEOST, M.; DAMIENS, E.; MARIE, D.; MARKO, D.; NIEDERBERGER, E.; TANG, W.; EISENBRAND, G.; MEIJER, L. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. **Nature Cellular Biology**. v. 1, p. 60–67, 1999.

HU, X. Q.; ZHANG, L. Function and regulation of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel in vascular smooth muscle cells. **Drug Discovery Today**. v. 17, P. 974-987. 2012.

HU, Z.; MA, A.; TIAN, H.; XI, Y.; FAN, L.; WANG, T. Effects of age on expression of BK_{Ca} channel in vascular smooth muscle cells from mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**. v. 69(4), p. 945-55. 2013.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Mechanisms of endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation elicited by bradykinin and VIP. **The American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology**. v. 253, n. 5, p. H1074–H1082, 1987.

IGOSHEVA, N.; MATTA, S.; GLOVER, V. Effect of acute stress and gender on isatin in rat tissues and serum. **Physiol Behav**. v. 80, p. 665–8, 2004.

IYER, R. A.; HANNA, P. E. N-(carbobenzyloxy)isatin: a slow binding α -keto lactam inhibitor of α -chymotrypsin. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**. v. 5:89–92. 1995.

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

JIANG Y, LEE A, CHEN J, RUTA V, CADENE M, CHAIT BT, MACKINNON R X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. **NATURE**. v. 423(6935), p. 33–41. 2003.

JONES, A. W. Altered ion transport in vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. Influences of aldosterone, norepinephrine, and angiotensin. **Circulation Research**. v. 33, p. 563-572. 1973.

JONES, A. W.; HART, R. G. Altered ion transport in aortic smooth muscle during deoxycorticosterone acetate hypertension in the rat. **Circulation Research**. v. 37, p. 333-341. 1975.

INAGAMI, T.; NARUSE, M.; HOOVER, R. Endothelium as an endocrine organ. **Annals Reviews of Physiology**. v. 57, p. 171-189, 1995.

JACKSON, W. F.; KÖNIG, A.; DAMBACHER, T.; BUSSE, R. Prostacyclin-induced vasodilation in the rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**. v. 264, p. H238–H243. 1993.

JACKSON, W. F. Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**. v. 265, p. H1797–H1803. 1993.

JACKSON, W. F. Potassium channels in the peripheral microcirculation. **Microcirculation**, v.12, n.1, p.113-27, 2005.

JAMES, P. A.; OPARIL, S.; CARTER, B. L.; CUSHMAN, W. C.; DENNISON-HIMMELFARB, C.; HANDLER, J.; LACKLAND, D. T.; LEFEVRE, M. L.; MACKENZIE, T. D.; OGEDEGBE, O.; SMITH-JÚNIOR, S. C.; SVETKEY, L. P.; TALER, S. J.; TOWNSEND, R. R.; WRIGHT-JÚNIOR, J. T.; NARVA, A. S.; ORTIZ, E. 2014 Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **JAMA**. v. 311(5), p. 507-20. 2014.

JEPPS, T.A.; CHADHA, P.S.; DAVIS, A.J.; HARHUN, M.I.; COCKERILL, G.W.; OLESEN, S.P.; HANSEN, R.S.; GREENWOOD, I.A. Downregulation of Kv7.4 channel activity in primary and secondary hypertension. **Circulation**. v. 124, p. 602–611. 2011.

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

KANG, K. T.; SULLIVAN, J. C.; SASSER, J. M.; IMIG, J. D.; POLLOCK, J. S. Novel nitric oxide synthase--dependent mechanism of vasorelaxation in small arteries from hypertensive rats. **Hypertension**. v. 49, p. 893-901. 2007.

KEEN, J. E.; KHAWALED, R.; FARRENS, D.L.; NEELANDS, T.; RIVARD, A.; BOND, C.T.; JANOWSKY, A.; FAKLER, B.; ADELMAN, J.P.; MAYLIE, J. Domains responsible for constitutive and Ca^{2+} -dependent interactions between calmodulin and small conductance Ca^{2+} -activated potassium channels, **Journal of Neuroscience**. v. 19. 8830–8838. 1999.

KHAN, S. A.; HIGDON, N. R.; MEISHERI, K. D. Coronary vasorelaxation by nitroglycerin: involvement of plasmalemmal calcium-activated K^+ channels and intracellular Ca^{2+} stores. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 284, n. 3, p. 838-846, 1998.

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

KLEMENSKA, E.; BERESEWICZ, A. Bioactivation of organic nitrates and the mechanism of nitrate tolerance. **Cardiology Journal**, v. 16, p. 11 – 19, 2009.

KO, E. A.; HAN, J.; JUNG, I. D.; PARK, W. S. Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth muscle cells. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008.

KRAVTSOV, G. M.; BRUCE, I. C.; WONG, T. M.; KWAN, C. A new view of K^+ -induced contraction in rat aorta: the role of Ca^{2+} binding. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**. v. 446, v. 5, p. 529-540, 2003.

KRIEGER, E. M. Neurogenic Hypertension in the Rat. **Circulation Research**, v. 15, n. 6, p. 511–521, 12 jan. 1964.

KUME, H.; TAKAI, A.; TOKUNO, H.; TOMITA, T. Regulation of Ca^{2+} -dependent K^+ -channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. **Nature**. v. 341, p. 152–154, 1989.

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

LANFRANCHI P.A; SOMERS V.K. Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, p. 815 - 826, 2002.

LANGTON, P. D.; NELSON, M. T.; HUANG, Y.; STANDEN, N. B. Block of calciumactivated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**. v. 260, n. 3, p. H927-H934, 1991.

LAURENT, A. "Recherches sur l'indigo". **Annu. Rev. Chem. Phys.** v. 3, n. 393. 1840.

LECLERC, S.; GARNIER, M.; HOESSEL, R.; MARKO, D.; BIBB, J. A.; SNYDER, G. L.; GREENGARD, P.; BIERNATI, J.; WUI, Y.; Mandelkowi, E.; EISENBRAND, G.; MEIJER, L.. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3b and CDK5/P25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's **Diseases Journal of Biological Chemistry**. v. 276, p. 251–60. 2001.

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

LEE, D.; LONG, S. A.; ADAMS, J. L.; CHAN, G.; VAIDYA, K. S.; FRANCIS, T. A.; KIKLY, K.; WINKLER, J. D.; SUNG, C. M.; DEBOUCK, C.; RICHARDSON, S.; LEVY, M. A.; DEWOLF, W. E. J. R.; KELLER, P. M.; TOMASZEK, T.; HEAD, M. S.; RYAN, M. D.; HALTIWANGER, R. C.; LIANG, P. H.; JANSON, C. A.;

MCDEVITT, P. J.; JOHANSON, K.; CONCHA, N. O.; CHAN, W.; ABDELMEGUID, S. S.; BADGER, A. M.; LARK, M. W.; NADEAU, D. P.; SUVA, L. J.; GOWEN, M.; NUTTALL, M. E. Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7. **Journal of Medical Chemistry**. V. 44. P 2015–26. 2001.

LI, C.; LI, J.; WENG, X.; LAN, X.; CHI, X. Farnesoid X receptor agonist CDCA reduces blood pressure and regulates vascular tone in spontaneously hypertensive rats. **Journal of the American Society of Hypertension**. v. 9. p. 507–516. 2015.

LI, Z.; YU, C.; HAN, Y.; REN, H.; SHI, W.; FU, C.; HE, D.; HUANG, L.; YANG, C.; WANG, X.; ZHOU, L.; ASICO, L. D.; ZENG, C.; JOSE, P. A. Inhibitory effect of D1-like and D3 dopamine receptors on norepinephrine-induced proliferation in vascular smooth muscle cells. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**. v. 294, n. 6, p. H2761–2768, jun. 2008.

LIANG, C.; XIA, J.; LEI D, LI, XIANG.; YAO, Q.; GAO, J. Synthesis, in vitro and in vivo antitumor activity of symmetrical bis-Schiff base derivatives of isatin. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 74, p. 742e750. 2014.

LIU, V. W. T.; HUANG, P. L. Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. **Cardiovascular Research**. v. 77, p. 19–29, 2008.

LUNA-VÁZQUEZ, F. J.; IBARRA-ALVARADO, C.; ROJAS-MOLINA, A.; ROJAS-MOLINA, I.; ZAVALA-SÁNCHEZ, M. A. Vasodilator compounds derived from plants and their mechanisms of action. **Molecules**. v. 18, p. 5814–5857. 2013.

MACEDO, C. L.; VASCONCELOS, L, H, C.; CORREIA, A. C. C.; MARTINS, I. R. R.; LIRA, D. P.; SANTOS, B. V. O.; CAVALCANTE, F. A.; SILVA, B. A.

Mechanisms underlying vasorelaxation induced in rat aorta by galetin 3,6-dimethyl ether, a flavonoid from *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke. **Molecules**. v. 19, p. 19678-19695; 2014.

MANCIA, G.; FAGARD, R.; NARKIEWICZ, K.; REDÓN, J.; ZANCHETTI, A.; BÖHM, M.; CHRISTIAENS, T.; CIFKOVA, R.; De BACKER, G.; DOMINICZAK, A.; GALDERISI, M.; GROBBEE, D. E.; JAARSMA, T.; KIRCHHOF, P.; KJELDSSEN, S. E.; LAURENT, S.; MANOLIS, A. J.; NILSSON, P. M.; RUILOPE, L. M.; SCHMIEDER, R. E.; SIRNES, P. A.; SLEIGHT, P.; VIIGIMAA, M.; WAEBER, B.; ZANNAD, F.; Task Force Members. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **Journal of Hypertension**. v. 31(7), p. 1281-357. 2013.

MANCIA, G.; LAURENT, S.; AGABITI-ROSEI, E.; AMBROSIONI, E.; BURNIER, M.; CAULFIELD, M. J.; CIFKOVA, R.; CLÉMENT, D.; COCA, A.; DOMINICZAK, A.; ERDINE, S.; FAGARD, R.; FARSANG, C.; GRASSI, G.; HALLER, H.; HEAGERTY, A.; KJELDSSEN, S. E.; KIOWSKI, W.; MALLION, J. M.; MANOLIS, A.; NARKIEWICZ, K.; NILSSON, P.; OLSEN, M. H.; RAHN, K. H.; REDON, J.; RODICIO, J.; RUILOPE, L.; SCHMIEDER, R. E.; STRUIJKER-BOUDIER, H. A.; VAN ZWIETEN P. A.; VIIGIMAA, M.; ZANCHETTI, A.; European Society of Hypertension. Re-appraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. **Journal of Hypertension**. v. 27, p. 2121–2158. 2009.

MAKHLOUF, G. M.; MURTHY, K. S. Signal Transduction in Gastrointestinal Smooth Muscle. **Cellular Signalling**. v. 9, n. 3, p. 269–276, 1997.

MAROÑAS, P. A.; SUDO, R. T.; CORRÊA, M. B.; PINTO, A. C.; GARDEN, S. J. TRACHEZ, M. M.; ZAPATA-SUDO G. Vasodilatory activity of novel carbamate

derivatives of isatin. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v. 35, p.1091–1096. 2008.

MARTIN, G. M.; CHEN, P. C.; DEVARANENI, P.; SHYNG, S. L. Pharmacological rescue of trafficking-impaired ATP-sensitive potassium channels. **Frontiers in Physiology**. v. 4, p. 386. 2013.

MATHERS, C.D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS Med**. v. 3 (11), p. e442. 2006.

MATHEUS, M. E.; ALMEIDA-VIOLANTE, F.; GARDEN, S. J.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. Isatins inhibit cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in a mouse macrophage cell line. **European Journal of Pharmacology**. v. 556, p. 200–6. 2007.

MacKINNON, R. Potassium channels. **FEBS Letters**. v. 555(1), p. 62–65. 2003.

McCOY, J. G.; NIMIGEAN, C. M. Structural correlates of selectivity and inactivation in potassium channels. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1818 p. 272–285. 2012.

McGUIRE, P. G.; TWEITMEYER, T. A. Aortic endothelial functions in developing hypertension. **Hypertension**. v. 7, p. 483–490. 1985.

McINTYRE, I. M.; NORMAN, T. R. Serotonergic effects of isatin: An endogenous MAO inhibitor related to tribulin. **J. Neural Transm. (Gen. Sect.)**. v. 79, p. 35-40. 1990.

MEDVEDEV, A.; BUNEEVA, A.; GLOVER, V. Biological targets for isatin and its analogues: Implications for therapy. **Biologics: Targets & Therapy**. v. 1(2), p. 151–162. 2007.

MEDVEDEV, A.; BUSSYGYN, O.; PYATAKOVA, N.; GLOVER, V.; SEVERINA, I. Effect of isatin on nitric oxide-stimulated soluble guanylate cyclase from human platelets. **Biochemical Pharmacology**. v. 63, p. 763–6. 2002.

MEDVEDEV, A. E.; CLOW, A.; SANDLER, M.; GLOVER, V. Isatin: a link between natriuretic peptides and monoamines? **Biochem Pharmacol**. v. 52, n. 385–91, 1996.

MEDVEDEV, A. E.; CRUMEYROLLE-ARIAS, M.; CARDONA, A.; SANDLER, M.; GLOVER, V. Natriuretic peptide interaction with [3H]isatin binding sites in rat brain. **Brain research**. v. 1042, p. 119–124. 2005.

MEDVEDEV A, SANDLER M, GLOVER V. Interaction of isatin with type-A natriuretic peptide receptor: possible mechanism. **Life Sciences**. v. 62, p. 2391–8. 1998.

MENEZES, I. A.; MOREIRA, I. J.; CARVALHO, A. A.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**. v. 47, p. 41–47, 2007.

MESSERLI, F. H.; GROSSMAN, E. Beta-blockers in hypertension: is carvedilol different. **American Journal of Cardiology**. v. 93(9A), p. 7B–12. 2004.

MILLER, C. An overview of the potassium channel family. **Genome Biol**. v. 1(4), p. 1–5. 2000.

MILLER C, MOCZYDLOWSKI E, LATORRE R, PHILLIPS M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^{+} channels from mammalian skeletal muscle. **Nature**. v. 313, p. 316–8. 1985.

MILLER, M. R.; OKUBO, K.; ROSEBERRY, M. J.; WEBB, D. J.; MEGSON, I. L. Extracellular nitric oxide release mediates soluble guanylate cyclase-independent vasodilator action of spermine NONOate: comparison with other nitric oxide donors in isolated rat femoral arteries. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 43, n. 3, p. 440-451, 2004.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species and endothelial function—role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v. 110, p. 87–94. 2012.

MORLEY, J. E.; FARR, S. A.; FLOOD, J. F. Isatin inhibits food intake in mice. **Journal of Pharmacology**. v. 305: p. 23-29. 1996.

MOSER, M; ROCELLA, E. J. The Treatment of Hypertension: A Remarkable Success Story. **The Journal of Clinical Hypertension**. v. 15, n. 2, p. 88-91, 2013.

MUNHOZ, F. C.; POTJE, S. R.; PEREIRA, A. C.; DARUGE, M. G.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M.; ANTONIALI, C. Hypotensive and vasorelaxing effects of the new NO-donor $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$ in spontaneously hypertensive rats. **Nitric Oxide**. v. 26, p. 111–117. 2012.

MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annual Review of Physiology**. v. 68, n. 1, p. 345-374, 2006.

NATIONAL CLINICAL GUIDELINE CENTRE. **Hypertension: the clinical management of primary hypertension in adults: update of clinical guidelines 18 to 34**. Royal College of Physicians (UK) 2011.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v. 268, n. 4, p. C799-C822, 1995.

NEYLON, C. B.; LANG, R. J.; FU, Y.; BOBIK, A.; REINHART PH. Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel in vascular smooth muscle: relationship between $\text{K}_{(\text{Ca})}$ channel diversity and smooth muscle cell function. **Circulation Research**. v. 85, p. e33–e43, 1999.

NISHA.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; KUMAR, V. β -amino-alcohol tethered 4-aminoquinoline-isatin conjugates: Synthesis and antimalarial evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 84, p. 566-573. 2014.

OHRNBERGER, C. E.; KHAN, S. A.; MEISHERI, K.D. Synergistic effects glyburide and U-37883A, two structurally different vascular ATP-sensitive potassium channel antagonists. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.267, p.25–30, 1993.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rat. **Japanese Circulation Journal**. v. 27, p. 282–293. 1963.

OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; MAFRA, R. A.; ARAÚJO, D. A.; CRUZ, J. S.; MEDEIROS, I. A. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). **Vascular Pharmacology**. v. 44, p. 338-344, 2006.

OLIVEIRA, E. J; MEDEIROS, I. A; MUKEIERJEE, R. Hypotensive and spasmolytic effects of normacusine b from *Strychnos atlantica* root. **Phytomedicine**. v. 3(1), 45-49, 1996.

OLIVEIRA, S. M.; SILVA, J. P. B.; HERNANDES, M. Z.; LIMA, M. C. A; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas das hidantoínas. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 614-622, 2008.

OWEN, J. G.; REISIN, E. Anti-hypertensive drug treatment of patients with and the metabolic syndrome and obesity: a review of evidence, meta-analysis, post hoc and guidelines publications. *Curr Hypertens Rep.* v. 17, p. 46. 2015.

PALIT, G.; KUMAR, R.; PATNAIK, G. K.; BHATTACHARYA, S. K. Behavioural effects of isatin, a putative biological factor, in rhesus monkeys. **Biogenic Amines.** v. 13, p. 131-142. 1997.

PANOVA, N. G., ZEMSKOVA, M. A., AXENOVA, L. N. AND MEDVEDEV, A. E. Does isatin interact with rat brain monoamine oxidases in vivo? **Neurosci. Lett.** v. 233: 58-60. 1997.

PARK, W. S.; SON, Y. K.; KIM, N. R.; YOUM, J. B.; JOO, H.; WARDA, M.; KO, J. H.; EARM, Y. E.; HAN, J. The protein kinase A inhibitor, H-89, directly inhibits KATP and Kir channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 340, p. 1104–1110. 2006.

PINTO, Y.M., PAUL, M., GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. **Cardiovascular Research.** v. 39, p. 77–88. 1998.

PREMANATHAN, M.; RADHAKRISHNAN, S.; KULANGIAPPAR, K.; SINGARAVELU, G.; THIRUMALAIARASU, V.; SIVAKUMAR, T.; KATHIRESAN, K. Antioxidant & anticancer activities of isatin (1H-indole-2,3-dione), isolated from the flowers of *Couroupita guianensis* Aubl. **Indian Journal of Medical Research.** v. 136, p. 822–826. 2012.

PINTO, A.C.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S., et al. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v.25, n.1, p.45-61. 2002.

POTJE, S. R.; MUNHOZ, F. C.; PERASSA, L. A.; GRATON, M. E.; PEREIRA, A. A. F.; NAKAMUNE, A. C. M. S.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M.; SUMIDA, D. H.; ANTONIALI, C. Mechanisms underlying the hypotensive and vasodilator effects of $\text{Ru(terpy)(bdq)NO}]^{3+}$, a nitric oxide donor, differ between normotensive and

spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 74, p. 222–229. 2014.

PUETZ, S.; LUBOMIROV, L. T.; PFITZER, G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. **Physiology (Bethesda, Md.)**. v. 24, p. 342–356, 2009.

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

RAJ, A. A.; RAGHUNATHAN, R.; SRIDEVIKUMARI, M. R.; RAMAN, N. Synthesis, antimicrobial and antifungal activity of a new class of spiro pyrrolidines. **Bioorganic Medicine Chemistry**. v. 11, p. 407–419. 2003.

RAJ, R.; BIOT, C.; CARRÈRE-KREMER, S.; KREMER, L.; GUÈRARDEL, Y.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; FORGE, D.; KUMAR, V. 7-Chloroquinoline–isatin Conjugates: Antimalarial, Antitubercular, and Cytotoxic Evaluation. **Chemical and Biological Drugs Design**. v. 83, p. 622–629. 2014.

RATZ, P. H; BERG, K. M. 2-Aminoethoxydiphenyl borate inhibits KCl-induced vascular smooth muscle contraction. **European Journal of Pharmacology**. v. 141(3), p. 177 - 183, 2006.

RATZ, P. H; MINER, A. S; BARBOUR, S. E. Calcium-independent phospholipase A2 participates in KCl-induced calcium sensitization of vascular smooth muscle. **Cell Calcium**. v. 46 (1), p. 65–72, 2009.

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

REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**. v. 20, n. 2, p. 129–137, 1992.

REN, J. D.; FAN, L.; TIAN, F. Z.; FAN, K. H.; YU, B. T.; JIN, W. H.; TAN, Y. H.; CHENG, L. Involvement of a membrane potassium channel in heparan sulphate-induced activation of macrophages. **Immunology**. v. 141(3), p. 345–352. 2014.

RIBEIRO, T. P.; PORTO, D. L.; MENEZES, C. P.; ANTUNES, A. A.; SILVA, D. F.; SOUZA, D. P.; NAKAO, L. S.; BRAGA, V. A.; MEDEIROS, I. A. Unraveling the cardiovascular effects induced by alpha-terpineol: a role for the NO-cGMP pathway. **Clinical Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 811-6, 2010.

RIPLEY, T. L.; SASEEN, J. J. Beta-blockers: a review of their pharmacological and physiological diversity in hypertension. **Annals Pharmacotherapy**. v. 48(6), p. 723–33. 2014.

RUBANYI, G. M. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. **Journal of cardiovascular pharmacology**. v. 22(Supl 4), p. S1–14, 1993.

SAKAMOTO, K.; HORI, M.; IZUMI, M.; OKA, T.; KOHAMA, K.; OZAKI, H.; KARAKI, H. Inhibition of high K⁺-induced contraction by the ROCKs inhibitor Y-27632 in vascular smooth muscle: possible involvement of rocks in a signal transduction pathway. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 92, p. 56-69, 2003.

SALKOFF, L.; BUTLER, A.; FERREIRA, G.; SANTI, C.; WEI, A. High-conductance potassium channels of the SLO family. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 7, p. 921–931. 2006.

SANTOS-NETO, M. S. Tese de doutorado: **Um estudo renal das interações entre uroguanilina, urodilatina e bradicina na presença de bloqueador de guanilato-ciclase**. (isatin e oq), Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, UFC, Brasil, 2008.

SAFAR, M. E.; PERONNEAU, P. P.; LEVENSON, J. A.; TOTO-MOUKOUO, J. A.; SEAMON, K. B.; PADEGETT, W.; DALY, J. W. Forskolin: unique diterpene activator of adenilate ciclase in membranes and intact cells. **Proceedings of the National Academi of Science**, v. 78, p. 3363 – 3367, 1981.

SAREEN, K.; KOHLI, M. K. P.; GUJRAL, M. L. Anticonvulsant drugs based on the neurochemistry of seizures. **Indian J Physiology Pharmacology**. v. 6, p. 87–89. 1962.

SCHUBERT, R.; NELSON, M. T. Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 22, p. 505–512, 2001.

SERBAN, D. N.; NILIUS, B.; VANHOUTTE, P. M. The endothelial saga: the past, the present, the future. **Pflugers Archiv**, v.;459 (6), p.787-92, 2010.

SHI, L.; ZHANG, H.; CHEN, Y.; LIU, Y.; LU, N.; ZHAO, T.; ZHANG, L. Chronic exercise normalizes changes in Cav 1.2 and KCa 1.1 channels in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**. v. 172, p. 1846-58. 2015

SHRUTHI, N.; POOJARY, B.; KUMAR, V.; PRATHIBHA, A.; HUSSAIN, M. M.; REVANASIDDAPPA, B. C.; JOSHI, H. Synthesis and biological evaluation of n-(substituted phenyl)-2-(5h-[1,2,4]triazino[5,6-b]indol-3-ylsulfanyl)acetamides as antimicrobial, antidepressant and anticonvulsant agents. **Bioorg Khim**. v. 41. P. 249-56. 2015.

SILVA, J. F. M.; GARDEN, S. J.; PINTO, A. C. The Chemistry of Isatins: a Review from 1975 to 1999. **Journal of Brazilian Chemistry**. Soc. v. 12, p. 273, 2001.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana – Uma abordagem integrada**, 5 ed. Artmed, Porto Alegre. 2010.

SMITH, T. L.; HUTCHINS, P. M. Central hemodynamics in the developmental stages of spontaneous hypertension in the anaesthetized rat. **Hypertension**. v. 1, p. 508–517. 1979.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 13 n. 1, p. 8-11, 2010.

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 13, p. 8-11, 2010.

SOLOVIEV, A.; ZHOLOS, A.; IVANOVA, I.; NOVOKHATSKA, T.; TISHKIN, S.; RAEVSKA, A.; STROYUK, A.; YEFANOV, V. Plasmonic gold nanoparticles possess the ability to open potassium channels in rat thoracic aorta smooth muscles in a remote control manner. v. XX, p. XXX-XXX, 2015. (no prelo).

SOMLYO, A.P.; A.V. SOMLYO, Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**. v. 17. 372(6503), p. 231-6. 1994.

SRIRAM, D.; BAL. T. R.; YOGEE SWARI, P. Design, synthesis and biological evaluation of novel non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors with broad-spectrum chemotherapeutic properties. **Bioorg Med Chem**. v. 12, p. 5865–73. 2005.

STANDEN, N. B.; QUAYLE, J. M. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**. v. 164, p. 549-557. 1998.

SWARTZ, K. J. Sensing voltage across lipid membranes. **Nature** v. 456(7224):891–897. 2008.

SWARTZ, K. J. The scorpion toxin and the potassium channel. **Elife**. v. 2, p. e00873. 2013.

TAHVANAINEN, A.; TAURIO, J.; MÄKI-JOUPPI, J.; KÖÖBI, P.; MUSTONEN, J.; KÄHÖNEN, M.; SAND, J.; NORDBACK, I.; PÖRSTI, I. Increased wall tension in response to vasoconstrictors in isolated mesenteric arterial rings from patients with high blood pressure. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 99, p. 440-449, 2006.

TALUKDER, G.; ALDRICH, R. W. Complex voltage-dependent behavior of single unliganded calcium-sensitive potassium channels. **Biophysical Journal**. v. 78, p. 761–772, 2000.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; TANAKA, H.; SHIGENOBU, K. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympatic neurogenic contraction of rat mesenteric. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 1602-1608, 1999.

TEITZ, Y.; RONEN, D.; VANSOVER, A.; STEMATSKY, T. Riggs JL, Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin-beta 4':4'-diethylthiosemicarbazone and N-allylisatin-beta-4':4'-diallythiosemicarbazone, **Antiviral Research**. v. 24(4), p. 305-314, 1994.

TOZAWA, Y.; UEKI, A.; MANABE, S.; MATSUSHIMA, K. Stress-induced increase in urinary isatin excretion in rats-reversal by both dexamethasone and a-methyl-p-tyrosine. **Biochem Pharmacol**. v. 56, n. 1041-1046. 1998.

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

WANG, SP.; ZANG, WJ.; KONG, SS.; YU, XJ.; SUN, L.; ZHAO, XF.; WANG, SX.; ZHENG, XH. Vasorelaxant effect of isopropyl 3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoate, a novel metabolite from *Salvia miltiorrhiza*, on isolated rat mesenteric artery. **European Journal of Pharmacology**. v. 579, p. 283-288, 2008.

WATKINS, P.; CLOW, A.; GLOVER, V.; HALKET, J.; PRZYBOROWSKA, A.; SANDLER, M. Isatin, regional distribution in rat brain and tissues. **Neurochem Int**. 17:321–3. 1990.

WANG, L.; SIGWORTH, F. J. Structure of the BK potassium channel in a lipid membrane from electron cryomicroscopy. **Nature**. v. 461(7261), p. 292–295. 2009.

WIYONGE, C. S.; BRADLEY, H. A.; VOLMINK, J.; MAYOSI, B. M.; MBENIN, A.; OPIE, L. H. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. 2012.

WHITE, R. E.; HANA, G.; MAUNZ, M.; DIMITROPOULOU, C.; EL-MOWAFY, M. A.; BARLOW, R. S.; CATRAVAS, J. D.; SNEAD, C.; CARRIER, G.O.; ZHU, S.; YU, X. Endothelium-independent effect of estrogen on Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human coronary artery smooth muscle cells. **Cardiovascular Research**. v.53, p. 650–661, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A Global brief on Hypertension**. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Essential medicines and basic health technologies for noncommunicable diseases: towards a set of actions to improve equitable access in Member States**. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control**. Published by the the World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization. Editors: Shanthi Mendis, Pekka Puska and Bo Norrving, September 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020**. 2013

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention and control of noncommunicable diseases: Guidelines for primary health care in low resource settings**. Geneva, World Health Organization, 2012.

YUWILER, A. The effect of isatin (tribulin) on metabolism of indoles in rat brain and pineal: in vitro and in vivo studies. **Neurochemical Research**. v. 15, n. 1, p. 95-100, 1990.

ZHANG, J.; YAN, J. Regulation of BK channels by auxiliary γ subunits. *Frontiers in Physiology*. v. 5 (401), p. 1-7. 2014.

ZAPATA-SUDO, G.; PONTES, L. B.; GABRIEL, D.; MENDES, T. C. F.; RIBEIRO, N. M.; PINTO, A. C.; TRACHEZ, M. M.; SUDO, R. T. Sedative-hypnotic profile of novel isatin ketals. **Pharmacology Biochemistry Behavior**. v. 86, p. 678–685. 2007.

ZHOLOS, A. Pharmacology of transient receptor potential melastatin channels in the vasculature. **British Journal of Pharmacology**. v. 159, p. 1559–1571. 2010.

ANEXOS

Anexo A**Parecer do comitê de ética**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO



João Pessoa, 12 de dezembro de 2014
CEUA Nº 01 11/14

Ilmo(a). **Valdir de Andrade Braga**
Departamento Biotecnologia - CBIOTEC - UFPB

Orientando(a): **Matheus Moraes de Oliveira Monteiro, (Doutorado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de 11/12/2014 analisou e **APROVOU** a execução do projeto **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS VASORRELAXANTES E HIPOTENSORES DE NOVOS DERIVADOS DA ISATINA EM RATOS WISTAR**.

Com previsão de empregar **246 Ratos WISTAR - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George**.

Para serem utilizados no período de **01-01-2014 a 26-11-2016**

Atenciosamente,



Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBIOTEC/UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBIOTEC
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba
<https://sites.google.com/site/ceuaacbiotec/> – ceua@cbiotec.ufpb.br

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO

Resumos publicados em anais de congressos e apresentação de trabalhos:

- **MONTEIRO, M. M. O.**; MENDES JUNIOR, L. G.; GUIMARAES, D. D.; NALIVAICO, E.; BRAGA, V. A. Dorsolateral PAG mediates respiratory arousal in rats. In: Experimental Biology, 2014, San Diego, CA. The Faseb Journal, 2014. v. 28. p. Supplem 1178.3.
- ALVES, N. F. B.; PORPINO, S. K. P.; **MONTEIRO, M. M. O.**; GOMES, E. R. M.; BRAGA, V. A. Treinamento de natação combinado à suplementação de óleo de coco reduz pressão arterial e atividade simpática de ratos espontaneamente hipertensos. In: IX Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2014, Anais da IX Reunião Regional da FESBE, 2014.
- **MONTEIRO, M. M. O.**; DANTAS, B. P. V.; GONCALVES, J. C. R. ; ARAUJO, D. A. M. ; BRAGA, V. A. Different expression of transient receptor potential channels in brain autonomic regulatory nuclei in hypertensive rats. In: XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013, Ribeirão Preto. Anais do XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013.
- DANTAS, B. P. V.; **MONTEIRO, M. M. O.**; CRUZ, J. C.; FRANÇA-SILVA, M. S.; BRAGA, V. A. Hypotension and bradycardia induced by carvacrol is mediated by transient receptor potential channels in spontaneously hypertensive rats. In: XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013, Ribeirão Preto. Anais do XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013.
- PORPINO, S. K. P.; ALVES, N. F. B.; **MONTEIRO, M. M. O.**; QUEIROZ, T. M.; TRAVASSOS, R. A.; BRAGA, V. A. Chronic creatine supplementation and physical exercise reduces oxidative stress in Wistar rats. In: 5 Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2013, Florianópolis. Anais 5 Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2013.

- ALVES, N. F. B.; PORPINO, S. K. P.; **MONTEIRO, M. M. O.**; QUEIROZ, T. M.; MONTENEGRO, K. P. B.; BRAGA, V. A. Coconut oil supplementation reduces blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. In: 5 Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2013, Florianópolis. Anais 5 Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2013.
- FRANÇA-SILVA, M. S.; **MONTEIRO, M. M. O.**; MEDEIROS, I. A.; BRAGA, V. A. The 2-nitrate-1,3-dibuthoxypropan, a nitric oxide donor, alters autonomic function in spontaneously hypertensive rats. In: Experimental Biology, 2012, San Diego, CA. FASEB J, 2012. v. 26. p. 1091.52-1091.52.

Premiações:

- Menção Honrosa na IX Reunião Regional, Federação de Sociedades de Biologia Experimental para o trabalho: Treinamento de natação combinado à suplementação de óleo de coco reduz pressão arterial e atividade simpática de ratos espontaneamente hipertensos. ALVES, N. F. B.; PORPINO, S. K. P.; **MONTEIRO, M. M. O.**; GOMES, E. R. M.; BRAGA, V. A. In: IX Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2014, João Pessoa. Anais da IX Reunião Regional da FESBE, 2014.

Artigos completos publicados em periódicos:

- ALVES, N. F. B.; PORPINO, S. K. P.; MONTEIRO, M. M. O.; GOMES, E. R. M.; BRAGA, V. A. Coconut oil supplementation and physical exercise improves baroreflex sensitivity and oxidative stress in hypertensive rats. Applied Physiology, Nutrition and Metabolism (Print), v. X, p. 1-8, 2015.
- QUEIROZ, T. M.; MONTEIRO, M. M. O.; BRAGA, V. A. Angiotensin-II-derived reactive oxygen species on baroreflex sensitivity during hypertension: new perspectives. Frontiers in Physiology, v. 4, p. 1/105-1, 2013.
- MENDES JUNIOR, L. G.; MONTEIRO, M. M. O.; CARVALHO, A. S.; QUEIROZ, T. M.; BRAGA, V. A. Oral Supplementation with the Rutin Improves Cardiovagal Baroreflex Sensitivity and Vascular Reactivity in

Hypertensive Rats. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism (Print)*, v. 1, p. 1099-1106, 2013.