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

MÔNICA MOURA DE ALMEIDA

Efeitos Cardiovasculares induzidos pelo Óleo Essencial de *Mentha x-villosa* Hudson (OEMV), rotundifolona e mentol em Ratos Espontaneamente Hipertensos – O papel dos canais Potencial Receptor Transiente (TRP)

João Pessoa
2016

MÔNICA MOURA DE ALMEIDA

Efeitos Cardiovasculares induzidos pelo Óleo Essencial de *Mentha x-villosa* Hudson (OEMV), rotundifolona e mentol em Ratos Espontaneamente Hipertensos – O papel dos canais Potencial Receptor Transiente (TRP)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

João Pessoa

2016

A447e Almeida, Mônica Moura de

Efeitos cardiovasculares induzidos pelo óleo essencial de *Mentha x-villosa* Hudson (OEMV), rotundifolona e mentol em ratos espontaneamente hipertensos - o papel dos canais Potencial Receptor Transiente (TRP) / Mônica Moura de Almeida.- João Pessoa, 2016.

237f. : il.

Orientador: Isac Almeida de Medeiros

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS

1. Produtos naturais. 2. Rotundifolona. 3. Mentol. 4. Ratos SHR. 5. Efeito cardiovascular. 6. Canais TRP.

UFPB/BC CDU: 547.9(043)

MÔNICA MOURA DE ALMEIDA

Efeitos Cardiovasculares induzidos pelo Óleo Essencial de*Mentha x-villosa* Hudson (OEMV), rotundifolona e mentol em Ratos Espontaneamente Hipertensos – O papel dos canais Potencial Receptor Transiente (TRP)

Aprovada em 24 / 02 / 15

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
Orientador

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Examinadora Interna

Prof. Dr. Luis Fernando Marques dos Santos
Examinador Interno

Profa. Dra. Caliandra Maria Bezerra Luna Lima
Examinadora Externa

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier
Examinador Externo

Dedicatória

Agradecimentos

A Deus, por cada dia que Ele me concede e por me guiar com amor e cuidado, me dando forças para vencer as dificuldades e nunca desistir dos meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros, meu orientador, pelas oportunidades que me concedeu na pesquisa, e por todo o apoio, incentivo e compreensão ao longo de minha iniciação científica e pós-graduação, sempre depositando confiança e crédito no meu trabalho e na minha capacidade. Muito obrigada por ter acreditado em mim.

À Profa. Dra. Darízy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos e ao Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras, pela colaboração e contribuição no desenvolvimento deste trabalho e por todo incentivo e apoio ao longo da minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho e sua aluna Daysiane Lira Uchoa, pela parceria firmada para o isolamento da substância utilizada nesse estudo.

À Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam, pela colaboração e por disponibilizar seu laboratório para a realização de experimentos com cultivo celular.

Ao Prof. Dr. Demétrius Machado de Araújo, pela colaboração para a realização de experimentos de Western blot.

Aos Professores Dr. Jader dos Santos Cruz, Dra. Maria Aparecida Gomes e Dr. Jorge Luiz Pesquero, da UFMG, pela colaboração e por disponibilizarem seus laboratórios para a realização de experimentos de PCR.

Aos alunos de Iniciação Científica envolvidos diretamente neste trabalho, Nataly Rodrigues Vitorino Braga, Anaís Bezerra de Gusmão e Tays Amanda Felisberto da Silva pela ajuda na bancada, amizade e momentos de descontração.

Aos alunos de Pós-Graduação Valéria Lopes de Assis e Matheus Morais de Oliveira Monteiro pela ajuda na bancada, discussões científicas, apoio e amizade.

Aos demais amigos do laboratório, pelo apoio, incentivo, amizade e discussões construtivas.

Ao técnico José Crispim Duarte pelo cuidado com os animais utilizados neste trabalho, e pela atenção, apoio e amizade.

Aos técnicos Luís Cordeiro da Silva e Adriano Cordeiro pelo cuidado com os animais utilizados neste trabalho.

Aos amigos (as) Pós-Graduandos (as), pelo convívio e por tudo o que aprendi com cada um deles.

Aos professores deste Programa, pelas contribuições para a minha formação.

Às secretárias Tânia Maria Alves de Araújo e Caroline Mangueira, por sua competência e disponibilidade, sempre dispostas a resolver os problemas e prestar informações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pelo compromisso e apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

Mônica Moura de Almeida

Resumo

RESUMO

Introdução: Os monoterpenos presentes em óleos essenciais de plantas atuam sobre canais Potencial Receptor Transiente (TRP). Alguns canais TRP com expressão alterada em ratos hipertensos podem ser novos alvos terapêuticos para o controle da hipertensão arterial. **Objetivo:** Comparar as respostas induzidas pelo Óleo Essencial de *Mentha x-villosa* Hudson (OEMV), pela rotundifolona e pelo mentol em Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) e normotensos Wistar Kyoto (WKY), avaliando o papel de canais TRP. **Métodos e Resultados:** Estudos in vivo (medida de pressão arterial e freqüência cardíaca), in vitro (medida da freqüência e força de contração em átrios e da tensão isométrica em artérias mesentéricas superiores) e bioquímicos (PCR e Western blot) foram usados. O OEMV (3, 5, 10, 20 mg/kg), a rotundifolona (10, 20 e 30 mg/kg), e o mentol (3, 5, 10 e 20 mg/kg) induziram significativa resposta hipotensora e bradicárdica em ratos SHR e WKY não-anestesiados. A redução na pressão arterial diastólica foi significativamente maior do que a redução na pressão arterial sistólica, sugerindo uma maior ação sobre o componente vascular da pressão arterial. Entretanto, o significativo efeito bradicárdico e a redução na pressão arterial sistólica sugerem também uma ação sobre o componente cardíaco. Além disso, a diminuição na pressão arterial e freqüência cardíaca induzida por rotundifolona e por mentol foram significativamente mais potentes em ratos SHR. A ação do OEMV, da rotundifolona e do mentol em átrios direito (com atividade espontânea) e esquerdo (estimulado eletricamente) mostrou efeitos cronotrópico e inotrópico negativos e culminando na completa inibição da atividade cardíaca. Além disso, o efeito inotrópico negativo foi mais potente em ratos SHR e a proteína do canal TRPM8 mostrou expressão aumentada nos ventrículos (esquerdo > direito) e nos átrios (esquerdo > direito) de ratos SHR. O OEMV, a rotundifolona e o mentol também induziram resposta vasorrelaxante em artérias mesentéricas superiores de ratos SHR e WKY, pré-contraídos com FEN. O mecanismo majoritário envolve a via independente do endotélio, que foi mais potente em ratos SHR. O mecanismo da resposta vasorrelaxante independente do endotélio induzida por rotundifolona e mentol envolve provavelmente canais TRPM8, que apresentaram expressão aumentada em ratos SHR, e canais TRPC1, TRPC3 e TRPC6. Entretanto, a resposta induzida por mentol em ratos WKY envolve outros canais TRP (provavelmente TRPM6 e TRPM7). Além disso, a citometria de fluxo mostrou um aumento na $[Ca^{2+}]_i$ induzido por rotundifolona em miócitos vasculares de ratos SHR, provavelmente por ativação de canais TRPM8. **Conclusões:** As respostas hipotensora, bradicárdica, inotrópica negativa e vasorrelaxante induzidas por OEMV, rotundifolona e mentol foram significativamente mais potentes em ratos SHR do que em ratos WKY. O mecanismo da resposta vasorrelaxante independente de endotélio induzida por rotundifolona e mentol envolve canais TRPM8, TRPC (provavelmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6), BK_{Ca} e Ca_V, porém o mentol pode estar atuando em outros canais TRP (provavelmente TRPM6 e TRPM7) em ratos WKY. Os canais TRPM8 mostraram expressão aumentada em ratos SHR. Dessa forma, a ação do OEMV, da rotundifolona e do mentol sobre esses canais pode estar relacionada com a maior potência observada em ratos SHR. **Palavras-chave:** 1. Rotundifolona; 2. Mentol; 3. Ratos SHR; 4. Cardiovascular; 5. Canais TRP.

Abstract

ABSTRACT

Introduction: The monoterpenes found in essential oils from plants act on transient receptor potential channels (TRP). Some TRP channels with altered expression in hypertensive rats may be new therapeutic targets for the control of hypertension. **Aim:** Compare the responses induced by Essential Oil of Mentha x villosa Hudson (OEMV), rotundifolone and menthol in Spontaneously Hypertensive rats (SHR) and normotensive Wistar Kyoto (WKY), evaluating the role of TRP channels. **Methods and Results:** In vivo (blood pressure measurement and heart rate), in vitro (measure of the frequency and force of contraction in the atria and the isometric tension in superior mesenteric arteries) and biochemical (PCR and Western blot) studies were used. The OEMV (3, 5, 10 and 20 mg/kg), the rotundifolone (10, 20 and 30 mg/kg) and the menthol (3, 5, 10 and 20 mg/kg) induced significant hypotensive and bradycardic response in non-anesthetized SHR and WKY rats. The reduction in the diastolic blood pressure was significantly greater than the decrease in the systolic blood pressure, suggesting a greater action on the vascular component of blood pressure. However, the significant bradycardic effect and reduction in the systolic blood pressure also suggest an action on the cardiac component. Furthermore, the decrease in the blood pressure and heart rate induced by rotundifolone and by menthol were significantly more potent in SHR. The action of OEMV, the rotundifolone and menthol in the right atrium (with spontaneous activity) and left (electrically stimulated) showed negative inotropic and chronotropic effects and culminating in complete inhibition of cardiac activity. Moreover, the negative inotropic effect was more potent in SHR and protein TRPM8 channel showed increased expression in the ventricles (left > right) and atria (left > right) of SHR rats. Also, OEMV, rotundifolone and menthol induced vasorelaxant response in superior mesenteric arteries of SHR and WKY rats, precontracted with PHE. The major mechanism involves the endothelium-independent route, which was more potent in SHR. The mechanism of the endothelium-independent vasorelaxant response induced by rotundifolone and menthol probably involves TRPM8 channels, which showed increased expression in SHR, and TRPC1, TRPC3 and TRPC6 channels. However, the response induced by menthol in WKY rats involves other TRP channels (probably TRPM6 and TRPM7). In addition, the flow cytometry showed an increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by rotundifolone in SHR vascular myocytes, probably by activating of the TRPM8 channel. **Conclusions:** The hypotensive, bradycardia, negative inotropic and vasorelaxant responses induced by OEMV, rotundifolone and menthol were significantly more potent in SHR than in WKY rats. The mechanism of the endothelium-independent vasorelaxant response induced by rotundifolone and menthol involves TRPM8, TRPC (probably TRC1, TRPC3 and TRPC6), BK_{Ca} and Ca_V channels, but menthol may be acting in other TRP channels (probably TRPM6 and TRPM7) in WKY rats. The TRPM8 channel showed increased expression in SHR rats. Thus, the action of OEMV, rotundifolone and menthol on these channels can be related with the higher potency observed in SHR rats. **Key-words:** 1. Rotundifolone; 2. Menthol; 3. SHR rats; 4. Cardiovascular; 5. TRP channels.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura de um monômero de canal TRP, mostrando os seus seis segmentos transmembranares e a formação de tetrâmeros (Homo- ou Hetero-) (Adaptado de FIRTH; REMILLARD; YUAN 2007).

Figura 2. Representação esquemática da estrutura das subfamílias de canais TRP. a) Subfamílias de canais TRP pertencentes ao Grupo 1. b) Subfamílias de canais TRP pertencentes ao Grupo 2. c) Subfamílias de canais TRP encontradas em vermes, moscas, camundongos e humanos (VENKATACHALAM; MONTELL, 2007).

Figura 3. Representação esquemática da estrutura das sete subfamílias de canais TRP, mostrando as principais diferenças estruturais observadas entre elas. (YIN; KUEBLER, 2010).

Figura 4: Representação esquemática da entrada de Ca^{2+} pelos canais TRPC1 (SOC) e TRPC3 e TRPC6 (SOC e ROC) e funcionamento reverso do trocador Na^{+}/Ca^{2+}. Em destaque o funcionamento normal do trocador Na^{+}/Ca^{2+} (em preto) e o funcionamento reverso (em vermelho) (Adaptado de FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007).

Figura 5. Foto da espécie *Mentha x villosa* Hudson.

Figura 6: Estrutura química, fórmula molecular e massa molecular de rotundifolona e mentol.

Figura 7. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta induzida por OEMV ou rotundifolona ou mentol sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos SHR e WKY não-anestesiados.

Figura 8. Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase (PCR) (http://dc340.4shared.com/doc/AWnFwCif/preview_html_7538fe47.png).

Figura 9. Representação esquemática da estrutura do “sanduiche” para o processo de transferência protéica do gel para a membrana (http://www.bio-rad.com/en-us/applications-technologies/protein-blotting-methods).

Figura 10. Marcadores de peso molecular utilizados nos experimentos de Western blot (http://www.bio-rad.com/en-us/sku/161-0375-precision-plus-protein-kaleidoscope-standards). Os retangulos indicam as bandas do padrão de peso molecular visualizadas nas membranas.

Figura 11. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta induzida por OEMV ou rotundifolona ou mentol em átrio direito (acima) ou átrio esquerdo (abaixo) isolados de ratos WKY e SHR.

Figura 12. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta induzida por concentrações crescentes de fenilefrina (FEN) em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR.

Figura 13. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta induzida por OEMV ou rotundifolona ou mentol nas contrações induzidas por FEN em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR na presença (acima) ou ausência de endotélio vascular funcional (abaixo).

Figura 14. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação da participação de canais TRP na resposta induzida por rotundifolona ou mentol em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR na ausência de endotélio vascular funcional.

Figura 15. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação da participação do TRPV1 na resposta induzida por rotundifolona ou mentol em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR na ausência de endotélio vascular funcional.

Figura 16. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta induzida por rotundifolona ou mentol nas contrações induzidas por solução de Tyrode modificado com 60 mM de KCl, em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR ausência de endotélio vascular funcional.

Figura 17. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação da participação de canais BK_{Ca} na resposta induzida por rotundifolona ou mentol em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR na ausência de endotélio vascular funcional.

Figura 18. Registro original mostrando o efeito de OEMV (1, 3, 5, 10, 20 e 30 mg/kg) em ratos não anestesiados WKY (acima) e SHR (abaixo). As linhas tracejadas indicam o momento de adição das doses de OEMV.

Figura 19. Efeito hipotensor induzido por OEMV em ratos WKY e SHR. (A) Pressão arterial sistólica (■) e diastólica (▲) de ratos WKY (linha contínua, n = 6) e pressão arterial sistólica (□) e diastólica (Δ) de SHR (linha tracejada, n = 6). (B) Pressão arterial média de ratos (●) WKY (linha contínua, n = 6) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA “two way” seguida do pós-teste de Bonferroni, $*p < 0,05$ (SHR *vs.* WKY).

Figura 20. Efeito bradicárdico induzido por OEMV em ratos WKY e SHR. Curvas dose-resposta mostrando diminuição induzida por OEMV na frequência cardíaca de ratos (●) WKY (linha contínua, n = 6) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA “two way” seguida do pós-teste de Bonferroni, $*p < 0,05$ (SHR *vs.* WKY).

Figura 21. Registro original mostrando o efeito de veículo na pressão arterial e freqüência cardíaca de ratos não anestesiados.

Figura 22. Registro original mostrando o efeito de rotundifolona (1, 3, 5, 10, 20 e 30 mg/kg) em ratos não anestesiados WKY (acima) e SHR (abaixo). As linhas tracejadas indicam o momento de adição das doses de rotundifolona.

Figura 23. Efeito hipotensor induzido por rotundifolona em ratos WKY e SHR. (A) Pressão arterial sistólica (■) e diastólica (▲) de ratos WKY (linha contínua, n = 7) e pressão arterial sistólica (□) e diastólica (Δ) de SHR (linha tracejada, n = 6). (B) Pressão arterial média de ratos (●) WKY (linha contínua, n = 7) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

Figura 24. Efeito bradicárdico induzido por rotundifolona em ratos WKY e SHR. Curvas dose-resposta mostrando diminuição induzida por rotundifolona na frequência cardíaca de ratos (●) WKY (linha contínua, n = 7) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

Figura 25. Registro original mostrando o efeito de mentol (1, 3, 5, 10 e 20 mg/kg) em ratos não anestesiados WKY. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das doses de mentol.

Figura 26. Registro original mostrando o efeito de mentol (1, 3, 5, 10 e 20 mg/kg) em ratos não anestesiados SHR. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das doses de mentol.

Figura 27. Efeito hipotensor induzido por mentol em ratos WKY e SHR. (A) Pressão arterial sistólica (■) e diastólica (▲) de ratos WKY (linha contínua, n = 6) e pressão arterial sistólica (□) e diastólica (Δ) de SHR (linha tracejada, n = 6). (B) Pressão arterial média de ratos (●) WKY (linha contínua, n = 6) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

Figura 28. Efeito bradicárdico induzido por mentol em ratos WKY e SHR. Curvas dose-resposta mostrando diminuição induzida por rotundifolona na frequência cardíaca de ratos (●) WKY (linha contínua, n = 6) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

Figura 29. Registro original mostrando o efeito de veículo na pressão arterial e freqüência cardíaca de ratos não anestesiados.

Figura 30. Expressão do RNAm para síntese do TRPM8 em artéria mesentérica de rato SHR e Wistar. Gráfico em barras mostrando a razão entre o RNAm do TRPM8 e o da proteína constitutiva β – actina (n = 2) (acima) e as imagens representativas do gel (abaixo). Os valores da densitometria foram normalizados pelos níveis de β-actina nos mesmos animais.

Figura 31. Expressão da proteína TRPM8 no coração de ratos SHR e WKY. Imagens representativas das bandas em membranas de western blot da proteína TRPM8 em átrio direito (ATD), átrio esquerdo (ATE), ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE), isolados de ratos SHR (A) e WKY (C) e da proteína β-actina (B e D, respectivamente).

Figura 32. Expressão da proteína TRPM8 no coração de ratos SHR. Gráfico em barras mostrando a razão entre a proteína do TRPM8 e a proteína constitutiva β – actina em átrio direito (ATD), átrio esquerdo (ATE), ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) de ratos SHR (n = 3 em triplicata) (acima) e as imagens representativas das membranas (abaixo). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, $*p < 0,05$ (ATE *vs.* ATD e VE *vs.* VD); $^{\#}p < 0,05$ (VD *vs.* ATD e VE *vs.* ATE).

Figura 33. Expressão da proteína TRPM8 no coração de ratos WKY. Gráfico em barras mostrando a razão entre a proteína do TRPM8 e a proteína constitutiva β – actina em átrio direito (ATD), átrio esquerdo (ATE), ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) de ratos SHR (n = 3 em triplicata) (acima) e as imagens representativas das membranas (abaixo). Os dados foram expressos como média ± e.p.m.

Figura 34. Expressão da proteína TRPM8 na artéria mesentérica superior isoloada de ratos WKY e SHR. Imagens representativas das bandas em membranas de western blot para proteína TRPM8 (esquerda) e β-actina (direita) em ratos WKY e SHR.

Figura 35. Expressão da proteína TRPM8 em artéria mesentérica superior de ratos SHR e WKY. Gráfico em barras mostrando a razão entre a proteína do TRPM8 e a proteína constitutiva β – actina em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY (n = 3 em triplicata) (acima) e as imagens representativas da membrana (abaixo). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, $*p < 0,05$ (SHR *vs.* WKY).

Figura 36. Registro original mostrando o efeito de OEMV (0,1 - 300 µg/mL) em átrio direito (acima) ou esquerdo (abaixo) de rato WKY. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações de OEMV.

Figura 37. Registro original mostrando o efeito de OEMV (0,1 - 300 µg/mL) em átrio direito (acima) ou esquerdo (abaixo) de rato SHR. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações de OEMV.

Figura 38. Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos por OEMV em ratos WKY e SHR. Curvas concentração-resposta mostrando as respostas induzidas por OEMV em (A) átrios direitos de ratos (■) WKY (linha contínua, n = 5) e (●) SHR (linha tracejada, n = 6) e em (B) átrios esquerdos de ratos (□) WKY (linha contínua, n = 7) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA “two way” seguida do pós-teste de Bonferroni, $*p < 0,05$ (SHR *vs.* WKY).

Figura 39. Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos por OEMV em ratos WKY e SHR. Curvas concentração-resposta mostrando as respostas induzidas por OEMV (A) em átrios (■) direitos e (□) esquerdos de ratos WKY (linha contínua, n = 5 e 7 respectivamente) e (B) em átrios (●) direitos e (○) esquerdos de ratos SHR (linha tracejada, n = 6 e 6 respectivamente). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (Átrio direito *vs.* Átrio esquerdo).

Figura 40. Registro original mostrando o efeito de rotundifolona (10^{-7} – 10^{-2} M) em átrio direito (acima) ou esquerdo (abaixo) de rato WKY. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações de rotundifolona.

Figura 41. Registro original mostrando o efeito de rotundifolona (10^{-7} – 10^{-2} M) em átrio direito (acima) ou esquerdo (abaixo) de rato SHR. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações de rotundifolona.

Figura 42. Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos por rotundifolona em ratos WKY e SHR. Curvas concentração-resposta mostrando as respostas induzidas por rotundifolona em (A) átrios direitos de ratos (■) WKY (linha contínua, n = 6) e (●) SHR (linha tracejada, n = 6) e em (B) átrios esquerdos de ratos (□) WKY (linha contínua, n = 6) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

Figura 43. Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos por rotundifolona em ratos WKY e SHR. Curvas concentração-resposta mostrando as respostas induzidas por rotundifolona (A) em átrios (■) direitos e (□) esquerdos de ratos WKY (linha contínua, n = 6 e 6 respectivamente) e (B) em átrios (●) direitos e (○) esquerdos de ratos SHR (linha tracejada, n = 6 e 6 respectivamente). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (Átrio direito *vs.* Átrio esquerdo).

Figura 44. Registro original mostrando o efeito de mentol (10^{-7} – 10^{-2} M) em átrio direito (acima) ou esquerdo (abaixo) de rato WKY. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações de mentol.

Figura 45. Registro original mostrando o efeito de mentol (10^{-7} – 10^{-3} M) em átrio direito (acima) ou esquerdo (abaixo) de rato SHR. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações de mentol.

Figura 46. Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos por mentol em ratos WKY e SHR. Curvas concentração-resposta mostrando as respostas induzidas por mentol em (A) átrios direitos de ratos (■) WKY (linha contínua, n = 5) e (●) SHR (linha tracejada, n = 5) e em (B) átrios esquerdos de ratos (□) WKY (linha contínua, n = 6) e (○) SHR (linha tracejada, n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

Figura 47. Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos por mentol em ratos WKY e SHR. Curvas concentração-resposta mostrando as respostas induzidas por mentol (A) em átrios (■) direitos e (□) esquerdos de ratos WKY (linha contínua, n = 5 e 6 respectivamente) e (B) em átrios (●) direitos e (○) esquerdos de ratos SHR (linha tracejada, n = 5 e 5 respectivamente). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (Átrio direito *vs.* Átrio esquerdo).

Figura 48. Contração induzida por FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY sem endotélio funcional. (A) Aumento na tensão basal induzida por FEN em ratos (■) WKY (n = 5) e (●) SHR (n = 5). (B) Porcentagem de aumento na tensão basal induzida por FEN em ratos (■) WKY (n = 5) e (●) SHR (n = 5). Os dados foram expressos como Média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

Figura 49. Efeito de rotundifolona na contração induzida por FEN em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR sem endotélio funcional. Efeito de rotundifolona (A) em anéis de WKY pré-contraídos com 1 μM (□, n = 7) ou 10 μM de FEN (■, n = 6) e (B) em anéis de SHR pré-contraídos com 1 μM (○, n = 6) ou 10 μM de FEN (●, n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (10 μM FEN *vs.* 1 μM FEN).

Figura 50. Efeito de mentol na contração induzida por FEN em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR sem endotélio funcional. Efeito de mentol (A) em anéis de WKY pré-contraídos com 1 μM (□, n = 7) ou 10 μM de FEN (■, n = 6) e (B) em anéis de SHR pré-contraídos com 1 μM (○, n = 6) ou 10 μM de FEN (●, n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (10 μM FEN *vs.* 1 μM FEN).

Figura 51. Efeito de OEMV na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos WKY e SHR com endotélio funcional ou sem endotélio funcional. Efeito de OEMV em ratos (A) WKY (■) com endotélio funcional (n = 5) ou (□) sem endotélio funcional (n = 6) e (B) SHR (●) com endotélio funcional (n = 5) ou (○) sem endotélio funcional (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (Sem endotélio funcional *vs.* Com endotélio funcional).

Figura 52. Efeito de OEMV na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos WKY ou SHR. Efeito de OEMV em (A) anéis com endotélio funcional de ratos (■) WKY (n = 5) e (●) SHR (n = 5) e em (B) anéis sem endotélio functional de ratos (□) WKY (n = 6) e (○) SHR (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

Figura 53. Registro original mostrando o efeito do OEMV (1 – 400 μg/mL) em artéria mesentérica isolada de ratos WKY (acima) e SHR (abaixo). As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações do OEMV.

Figura 54. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos WKY e SHR com endotélio funcional ou sem endotélio funcional. Efeito de rotundifolona em ratos (A) WKY (■) com endotélio funcional (n = 6) ou (□) sem endotélio funcional (n = 7) e (B) SHR (●) com endotélio funcional (n = 6) ou (○) sem endotélio funcional (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (Sem endotélio funcional *vs.* Com endotélio funcional).

Figura 55. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos WKY ou SHR. Efeito de rotundifolona em (A) anéis com endotélio funcional de ratos (■) WKY (n = 6) e (●) SHR (n = 6) e em (B) anéis sem endotélio functional de ratos (□) WKY (n = 7) e (○) SHR (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

Figura 56. Registro original mostrando o efeito da rotundifolona (10^{-7} – $3x10^{-3}$ M) em artéria mesentérica isolada de ratos WKY (acima) e SHR (abaixo). As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações do rotundifolona.

Figura 57. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos WKY e SHR com endotélio funcional ou sem endotélio funcional. Efeito de mentol ratos (A) WKY (■) com endotélio funcional (n = 6) ou (□) sem endotélio funcional (n = 5) e (B) SHR (●) com endotélio funcional (n = 7) ou (○) sem endotélio funcional (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (Sem endotélio funcional *vs.* Com endotélio funcional).

Figura 58. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos WKY ou SHR. Efeito de mentol em (A) anéis com endotélio funcional de ratos (■) WKY (n = 6) e (●) SHR (n = 7) e em (B) anéis sem endotélio funcional de ratos (□) WKY (n = 5) e (○) SHR (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

Figura 59. Registro original mostrando o efeito do mentol (10^{-7} – $3x10^{-3}$ M) em artéria mesentérica isolada de ratos WKY (acima) e SHR (abaixo). As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações do mentol.

Figura 60. Registro original mostrando o efeito do veículo (10^{-7} – 10^{-2} M) em artéria mesentérica isolada de rato SHR. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações de veículo.

Figura 61. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de BCTC. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (▲) na presença de 1 μM de BCTC (n = 6) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou (▲) na presença de 1 μM de BCTC (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 62. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de BCTC. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou na presença de (▲) 1 μM (n = 9) ou (▼) 10 μM de BCTC (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou na presença de (▲) 1 μM (n = 6) ou (▼) 10 μM de BCTC (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle), $^{\#}p$ < 0,05 (10 μM vs. 1 μM de BCTC).

Figura 63. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de AMTB. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (▲) na presença de 1 μM de AMTB (n = 6) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou (▲) na presença de 1 μM de AMTB (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 64. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou após dessensibilização do TRPV1 com capsaicina. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (◆) após dessensibilização do TRPV1 com 10 μM de capsaicina (n = 6) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou (◆) após dessensibilização do TRPV1 com 10 μM de capsaicina (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 65. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de vermelho de rutênio. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (△) na presença de 10 μM de vermelho de rutênio (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou (△) na presença de 10 μM de vermelho de rutênio (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 66. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de La^{3+}. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (▽) na presença de 100 μM de La^{3+} (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou (▽) na presença de 100 μM de La^{3+} (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 67. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de Mg^{2+}. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (△) na presença de 2,25 mM de Mg^{2+} (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou (△) na presença de 2,25 mM de Mg^{2+} (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 68. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de Gd^{3+}. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (▽) na presença de 25 μM de Gd^{3+} (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou (▽) na presença de 25 μM de Gd^{3+} (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 69. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de BCTC. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou na presença de (▲) 1 μM de BCTC (n = 6) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou na presença de (▲) 1 μM de BCTC (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 70. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de BCTC. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou na presença de (▲) 1 μM (n = 6) ou (▼) 10 μM de BCTC (n = 9) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou na presença de (▲) 1 μM (n = 7) ou (▼) 10 μM de BCTC (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Controle), $^{\#}p$ < 0,05 (10 μM vs. 1 μM de BCTC).

Figura 71. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de AMTB. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou (▲) na presença de 1 μM de AMTB (n = 7) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou (▲) na presença de 1 μM de AMTB (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 72. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou após dessensibilização do TRPV1 com capsaicina. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou (◆) após dessensibilização do TRPV1 com 10 μM de capsaicina (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou (◆) após dessensibilização do TRPV1 com 10 μM de capsaicina (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 73. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de vermelho de rutênio. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou (△) na presença de vermelho de rutênio (n = 7) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou (△) na presença de 10 μM de vermelho de rutênio (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 74. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de La^{3+}. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou (▽) na presença de 100 μM de La^{3+} (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou (▽) na presença de 100 μM de La^{3+} (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 75. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de Mg^{2+}. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou (△) na presença de 2,25 mM de Mg^{2+} (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou (△) na presença de 2,25 mM de Mg^{2+} (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 76. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de Gd^{3+}. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou (▽) na presença de 25 μM de Gd^{3+} (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou (▽) na presença de 25 μM de Gd^{3+} (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 77. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN ou 60 mM de KCl em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR sem endotélio funcional. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□, ▲) (n = 7 e 14 respectivamente) e em (B) SHR (○, ▲) (n = 6 e 13 respectivamente). Os dados foram expressos como média ± e.p.m.

Figura 78. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN ou 60 mM de KCl em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR sem endotélio funcional. Efeito de mentol em (A) WKY (□, ▲) (n = 5 e 9 respectivamente) e em (B) SHR (○, ▲) (n = 7 e 6 respectivamente). Os dados foram expressos como média ± e.p.m.

Figura 79. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de TEA. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (▼) na presença de 1 mM de TEA (n = 6) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou (▼) na presença de 1 mM de TEA (n = 8). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 80. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de TEA. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou (▼) na presença de 1 mM de TEA (n = 12) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou (▼) na presença de 1 mM de TEA (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle).

Figura 81. Efeito de rotundifolona na intensidade de fluorescência do Fluo-4/AM em células musculares lisas de aortas de ratos SHR. Medida da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo em miócitos pré-incubados com (□) veículo ou (■) 10^{-6}, (■) 10^{-5}, (■) 10^{-4} ou (■) 10^{-3} M de rotundifolona em leitura imediatamente após a adição (0 min) ou após a incubação por 3, 6 ou 9 min (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Veículo).

Figura 82. Participação de canais TRPM8 na resposta induzida por rotundifolona na intensidade de fluorescência do Fluo-4 (Ester AM) em células musculares lisas de aortas de ratos SHR. Medida da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo em miócitos, pré-incubados por 6 ou 9 min, com (□) veículo ou 10^{-3} M de rotundifolona na (■) ausência ou na presença de (■) 1 μM de AMTB ou (■) 10 μM de BCTC (n = 4). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Veículo).

Figura 83. Registro original mostrando a participação de canais TRPM8 na resposta induzida por rotundifolona na intensidade de fluorescência do Fluo-4 (Ester AM) em células musculares lisas de aortas de ratos SHR. Gráficos mostrando histogramas da medida da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo em miócitos, pré-incubados por 9 min, com (A) veículo, (B) 10^{-3} M de rotundifolona, (C) 10^{-3} M de rotundifolona na presença de 1 μM de AMTB e (D) 10^{-3} M de rotundifolona na presença de 10 μM de BCTC.

Figura 84. Efeito de WS-12 na intensidade de fluorescência do Fluo-4 (Ester AM) em células musculares lisas de aortas de ratos SHR. Medida da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo em miócitos pré-incubados com (□) veículo ou (■) 10^{-4} ou (■) 10^{-3} M de WS-12 em leitura imediatamente após a adição (0 min) ou após a incubação por 3, 6 ou 9 min (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Veículo).

Figura 85. Representação esquemática da provável via de sinalização da resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona em artéria mesentérica superior de ratos SHR e WKY. Os círculos destacam os canais ativados ou bloqueados pela rotundifolona: 1) Bloqueio de canais TRPC (provavelmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6); 2) Ativação de canais TRPM8; 3) Bloqueio de canais Ca_V; 4) Ativação de canais BK_{Ca} (Adaptado de INOUE et al., 2006).

Figura 86. Representação esquemática da provável via de sinalização da resposta vasorrelaxante induzida por mentol em artéria mesentérica superior de ratos SHR. Os círculos destacam os canais ativados ou bloqueados pelo mentol: 1) Bloqueio de canais TRPC (provavelmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6); 2) Ativação de canais TRPM8; 3) Bloqueio de canais Ca_V; 4) Ativação de canais BK_{Ca}; (5) Ativação ou bloqueio de canais TRPM6 e/ou TRPM7 (Adaptado de INOUE et al., 2006).

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Canais TRP expressos em células musculares lisas de artérias.

Tabela 2. Composição da solução de Krebs Henseleit (pH = 7,4).

Tabela 3. Composição da solução de Tyrode normal (pH = 7,4).

Tabela 4. Composição da solução de Tyrode com KCl a 60 mM (pH = 7,4).

Tabela 5. Composição da solução tampão fosfato-salino (PBS) (pH = 7,4).

Tabela 6. Composição da solução de Hanks sem cálcio (pH = 7,4).

Tabela 7. Composição da solução de Hanks com cálcio (pH = 7,4).

Tabela 8. Valores de $E_{máx}$ e DE_{50} para a resposta hipotensora e bradicárdica induzida por OEMV em ratos WKY e SHR.

Tabela 9. Valores de $E_{máx}$ e DE_{50} para a resposta hipotensora e bradicárdica induzida por rotundifolona em ratos WKY e SHR.

Tabela 10. Valores de $E_{máx}$ e DE_{50} para a resposta hipotensora e bradicárdica induzida por mentol em ratos WKY e SHR.

Tabela 11. Valores de $E_{máx}$ e CE_{50} para os efeitos cronotrópico e inotrópico induzidos por OEMV em átrios direitos e esquerdos isolados de ratos WKY e SHR.

Tabela 12. Valores de $E_{máx}$ e pD_2 para os efeitos cronotrópico e inotrópico induzidos por rotundifolona em átrios direitos e esquerdos isolados de ratos WKY e SHR.

Tabela 13. Valores de $E_{máx}$ e pD_2 para os efeitos cronotrópico e inotrópico induzidos por mentol em átrios direitos e esquerdos isolados de ratos WKY e SHR.

Tabela 14. Resposta de OEMV na contração induzida por 1 µM de FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, com ou sem endotélio funcional.

Tabela 15. Resposta de rotundifolona na contração induzida por 1 µM de FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, com ou sem endotélio funcional.

Tabela 16. Resposta de mentol na contração induzida por 1 µM de FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, com ou sem endotélio funcional.

Tabela 17. Resposta de rotundifolona na contração induzida por 1 µM de FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, sem endotélio funcional, na ausência (controle) ou na presença de bloqueadores de canais TRP.

Tabela 18. Mecanismo envolvido na resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona em artéria mesentérica superior de ratos SHR e WKY.

Tabela 19. Resposta de mentol na contração induzida por 1 µM de FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, sem endotélio funcional, na ausência (controle) ou na presença de bloqueadores de canais TRP.

Tabela 20. Mecanismo envolvido na resposta vasorrelaxante induzida pelo mentol em artéria mesentérica superior de ratos SHR e WKY.

Tabela 21. Resposta de rotundifolona na contração induzida por 1 µM de FEN e 60 mM de KCl em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, sem endotélio funcional.

Tabela 22. Resposta de mentol na contração induzida por 1 µM de FEN e 60 mM de KCl em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, sem endotélio funcional.

Tabela 23. Resposta de rotundifolona na contração induzida por 1 µM de FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, sem endotélio funcional, na ausência (controle) ou na presença de 1 mM de TEA, bloqueador de canais BK_{Ca}.

Tabela 24. Resposta de mentol na contração induzida por 1 µM de FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, sem endotélio funcional, na ausência (controle) ou na presença de 1 mM de TEA, bloqueador de canais BK_{Ca}.

Tabela 25. Resposta de rotundifolona na $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos de ratos SHR.

Tabela 26. Resposta de rotundifolona na $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos de ratos SHR após a incubação na ausência ou na presença de bloqueadores de canais TRPM8.

Tabela 27. Resposta de WS-12 na $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos de ratos SHR.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

7-AAD	7-aminoactinomicina D
ACh	Acetilcolina
AMTB	N-(3-aminopropil)-2-[(3-metilfenil)metoxi]-N-(2-tienilmetil)-benzamida
ANOVA	Análise de variância
BCTC	N-(4-tertiaributil-phenil)-4-(3-cloropiridin-2-il)tetrahidropirazina-1(2H)-carboxamida
BSA	Albumina sérica bovina
BK_{Ca}	Canais para K^+ sensíveis à Ca^{2+} de grande condutância
Ca_v	Canais de cálcio sensíveis a voltagem
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
$[Ca^{2+}]$	Concentração de cálcio
$[Ca^{2+}]_c$	Concentração de cálcio citoplasmática
$[Ca^{2+}]_i$	Concentração de cálcio intracelular
CE_{50}	Concentração da substância que produz 50 % de seu efeito máximo
DE_{50}	Dose da substância que produz 50 % de seu efeito máximo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOCA	Deoxicorticosterona acetato
$E_{máx}$	Efeito máximo
e.p.m.	Erro padrão da média
FEN	Fenilefrina
FC	Frequência cardíaca
$GdCl_3$	Cloreto de gadolinio
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
Kg	Quilograma
$LaCl_3$	Cloreto de lantânio
LH	Ratos Hipertensos de Lyon
LN	Ratos Normotensos de Lyon
M	Molar

mM	Milimolar
MSCC	Canais de Cálcio Sensíveis a Estímulos Mecânicos
n	Número de experimentos
OEMV	Óleo Essencial da *Mentha x-villosa* Hudson
p	Significância Estatística
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial media
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PLC	Fosfolipase C
ROC	Canal de Cálcio Operado por Receptor
ROT	Rotundifolona
rpm	Rotação por minute
S5	Quinto segmento transmembranar
S6	Sexto segmento transmembranar
SAC	Canal ativado por estiramento
SD	Ratos Sprague Dawley
SFB	Soro fetal bovino
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
SOCs	Canais de Cálcio Operados por Estoques
TRP	Potencial Receptor Transiente
TRPA1	Receptor TRP proteínas transmembranas ankirinas 1
TRPC	Receptor TRP classic
TRPM	Receptor TRP melastatina
TRPML	Receptor TRP muculipina
TRPN	Receptores TRP mecanoreceptores potencial C
TRPP	Receptor TRP policistina
TRPV	Receptor TRP vanilóide
WKY	Ratos Wistar Kyoto

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 33

1.1 Hipertensão arterial sistêmica essencial 34
1.2 Prevenção e Tratamento da hipertensão arterial sistêmica..... 37
1.3 Canais TRP 38
1.4 A importância dos Produtos Naturais 51
1.4.1 *Mentha x-villosa* Hudson, rotundifolona e mentol 53

2 OBJETIVOS 61

2.1 Geral..... 61
2.2 Específicos 61

3 MATERIAL 63

3.1 Animais..... 63
3.2 Obtenção das drogas testadas..... 63
3.2.1 Obtenção do OEMV e do mentol..... 63
3.2.2 Isolamento e identificação de rotundifolona 63
3.3 Preparação das soluções de OEMV, rotundifolona e mentol 64
3.4 Substâncias e reagentes 64
3.5 Soluções fisiológicas 65
3.6 Equipamentos 68

4 MÉTODOS 70

4.1 Ensaios *in vivo* 70
4.1.1 Procedimento cirúrgico para medida da pressão arterial e frequência cardíaca 70
4.1.2 Medida da pressão arterial e frequência cardíaca..... 71

4.2 Ensaios Bioquímicos 72
4.2.1 Investigação da expressão do RNAm dos canais TRPM8 em ratos SHR.... 72
4.2.2 Investigação da expressão protéica dos canais TRPM8 em ratos SHR 75

4.3 Ensaios *in vitro* 78

4.3.1 Ensaios em átrios isolados de ratos SHR e WKY 78
4.3.1.1 Obtenção das preparações de átrios isolados de ratos SHR e WKY..... 78
4.3.1.2 Protocolos experimentais utilizando átrios isolados de ratos SHR e WKY 79
4.3.1.2.1 Avaliação da resposta induzida por OEMV, rotundifolona ou mentol..... 79

4.3.2 Ensaios em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY 80
4.3.2.1 Obtenção das preparações de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY..... 80
4.3.2.2 Protocolos experimentais utilizando artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY..... 81
4.3.2.2.1 Avaliação da resposta contracturante induzida por fenilefrina 81
4.3.2.2.2 Avaliação da resposta vasorrelaxante induzida por OEMV, rotundifolona ou mentol 82
4.3.2.2.3 Avaliação da participação de canais TRP na resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona ou mentol 83
4.3.2.2.4 Avaliação da participação de canais TRPV1 na resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona ou mentol 84
4.3.2.2.5 Avaliação da participação de canais sensíveis a voltagem na resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona ou mentol..... 85
4.3.2.2.6 Avaliação da participação de canais para potássio sensíveis a cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) na resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona ou mentol 86

4.3.3 Ensaios em células musculares lisas de aortas de ratos SHR 87
4.3.3.1 Obtenção das preparações de células musculares lisas de aortas de ratos SHR..... 87
4.3.3.2 Protocolos experimentais utilizando células musculares lisas de aortas de ratos SHR para detecção da $[Ca^{2+}]_i$ 89

4.3 Análise estatística 90

5 RESULTADOS 93

5.1 Ensaios *in vivo* 93
5.1.1 Efeitos hipotensor e bradicárdico em ratos SHR e WKY..... 93
5.1.1.1 Efeitos hipotensor e bradicárdico induzidos pelo OEMV..... 93
5.1.1.2 Efeitos hipotensor e bradicárdico induzidos pela rotundifolona..... 97
5.1.1.3 Efeitos hipotensor e bradicárdico induzidos pelo mentol..... 100

5.2 Ensaios Bioquímicos 105
5.2.1 Expressão do RNAm do TRPM8 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR 105
5.2.2 Expressão protéica dos canais TRPM8 em ratos SHR 106
5.2.2.1 Expressão protéica dos canais TRPM8 em átrios e ventrículos isolados de ratos SHR e WKY 106
5.2.2.2 Expressão protéica dos canais TRPM8 em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY 110

5.3 Ensaios *in vitro* 112

5.3.1 Ensaios em átrios isolados de ratos SHR e WKY 112
5.3.1.1 Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos pelo OEMV..... 112
5.3.1.2 Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos pela rotundifolona..... 117
5.3.1.3 Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos pelo mentol 122

5.3.2 Ensaios em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY 127
5.3.2.1 Resposta contracturante induzida pela fenilefrina 127
5.3.2.2 Resposta vasorrelaxante induzida por OEMV, rotundifolona ou mentol 127
5.3.2.3 Participação de canais TRP na resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona 141
5.3.2.4 Participação de canais TRP na resposta vasorrelaxante induzida pelo mentol 153
5.3.2.5 Participação de canais sensíveis a voltagem na resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona ou pelo mentol 165
5.3.2.6 Participação de canais para potássio sensíveis a cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) na resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona ou pelo mentol 169

5.3.3 Ensaios em células musculares lisas de aortas de ratos SHR 173
5.3.3.1 Participação de canais TRPM8 no aumento na $[Ca^{2+}]_i$ induzida pela rotundifolona em células musculares lisas vasculares 173

6 DISCUSSÃO 179

7 CONCLUSÃO 201

8 PERSPECTIVAS 203

REFERÊNCIAS 205

ANEXO 232

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares constituem grave problema de saúde pública, correspondendo a cerca de 30% de todas as mortes ocorridas mundialmente, sendo a maioria em países de baixo e médio desenvolvimento econômico e mais da metade em indivíduos entre 45 e 69 anos (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010).

No Brasil, as doenças cardiovasculares têm sido a principal causa de morte, sendo responsáveis por 308.466 óbitos em 2007. As doenças cardiovasculares também são responsáveis por alta frequência de internações, ocasionando custos médicos e socioeconômicos elevados. Em 2007 foram registradas 1.157.509 internações e em 2009 houve 91.970 internações por doenças cardiovasculares no SUS, resultando em um custo de R$165.461.644,33. Além disso, a doença renal terminal ocasionou a inclusão de 94.282 indivíduos em programa de diálise no SUS, registrando-se 9.486 óbitos em 2007 (Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010).

A principal causa de morte em todas as regiões do Brasil é o acidente vascular cerebral, cujo principal fator de risco é a hipertensão arterial sistêmica (HAS) (LOTUFO, 2005). A HAS constitui uma das condições clínicas mais comuns associada à complicações cardiovasculares, tais como acidente vascular cerebral, doenças das artérias coronárias, aneurisma dissecante da aorta, insuficiência cardíaca, insuficiência renal, infarto do miocárdio e morte cardíaca súbita (PSATY et al., 2003).

Diante disso, torna-se fundamental descobrir e validar novos alvos terapêuticos e fármacos úteis no controle da pressão arterial (FERRONI et al., 2006). Atualmente, estudos têm demonstrado que ocorre uma expressão alterada de alguns subtipos de canais Potencial Receptor Transiente (TRP) em animais hipertensos em relação aos seus controles normotensos (YU et al., 2004; YAO et al., 2005; LIU et al., 2005; TOUYZ et al., 2006; FIRTH; REMILLARD; YAN, 2007; NISHIDA; KUROSE, 2008; LIU et al., 2009; CHEN et al., 2010; WANG et al., 2014; BLAUSTEIN; HAMLYN, 2014).

A correlação funcional entre a expressão dos canais TRP e as alterações na pressão sanguínea na hipertensão torna esses canais novos alvos terapêuticos para o controle da vasoconstrição e proliferação das células musculares lisas vasculares que caracterizam o estado hipertensivo (YAO et al., 2005; FIRTH; REMILARD; YAN, 2007; LIU et al., 2009). Com isso, substâncias que atuam sobre canais TRP podem constituir uma resposta promissora para o tratamento da HAS.

1.1 Hipertensão arterial sistêmica essencial

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

A HAS pode ser de dois tipos: primária ou essencial e secundária ou adquirida. A HAS essencial apresenta prevalência de aproximadamente 95% e caracteriza-se por elevação da pressão sanguínea sem causa aparente, associada a vários fatores de risco, tais como a predisposição genética, sedentarismo, obesidade, consumo elevado de álcool e sal (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão - Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2010).

Por outro lado, a HAS secundária apresenta causa detectada, como a hipertensão arterial renovascular, hipertensão por excesso de mineralocorticoides (hiperaldosteronismo), por excesso de glicocorticoides (síndrome de Cushing) ou por excesso de catecolaminas (feocromocitoma) (CARVALHO, 1996), podendo ainda ser induzida por manipulações farmacológicas, como a hipertensão L-NAME, ou cirúrgicas, como é o caso da hipertensão 2-rins-1-clip (FREITAS, 2003).

Atualmente, existem vários modelos de ratos geneticamente hipertensos desenvolvidos para mimetizar a HAS essencial humana. Esses modelos são os ratos geneticamente hipertensos da Nova Zelândia (GH) (SMIRK; HALL, 1958);

os ratos hipertensos Dahl/Rapp sensíveis (DS) e resistentes ao sal (DR) (DAHL et al., 1962); os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (OKAMOTO; AOKI, 1963); os ratos hipertensos DOCA de Israel sensíveis (SBH) e resistentes ao sal (SBN) (BEM-ISHAY et al., 1972); os ratos hipertensos de Lyon (LH) (DUPONT et al., 1973); os ratos hipertensos de Milão (MSH) (BIANCHI et al., 1974); os ratos hipertensos Fawn hooded (FHH) (KUIJPERS; GRUYS, 1984); os ratos hipertensos de Praga (PHR) (HELLER et al., 1993); os ratos com diabetes insípida hipotalâmica (tensão de Brattleboro) (HALL et al., 1973); os ratos hipertensos diabéticos de Cohen-Rosenthal (COHEN et al., 1993); os ratos corpulentos de James C. Russell (JCR:LA-cp) (RUSSELL et al., 1987); os ratos Zuker obesos (ZUCKER; ZUCKER, 1961); os ratos gordos de Otsuka Long-Evans Tokushima (OLETF) (KAWANO et al., 1992); os ratos Wistar gordos (IKEDA et al., 1981); e os ratos hipertensos propensos à insuficiência cardíaca (SHHR/Mcc-cp) (MCCUNE et al., 1990).

Os ratos LH são animais geneticamente hipertensos, que apresentam origem na espécie *Sprague Dawley* (SD) e são obtidos por cruzamento consaguíneo entre ratos SD apresentando níveis mais elevados de pressão arterial. Dessa forma, após vários cruzamentos os ratos SD passavam a apresentar níveis de pressão mais elevados sendo denominados de ratos LH, enquanto os que apresentavam níveis normais de pressão arterial eram denominados ratos LN (DUPONT et al., 1973).

Em comparação com os ratos LN, a linhagem LH consiste num modelo de HAS essencial moderada caracterizada por peso corporal elevado (SASSOLAS et al., 1981), baixos níveis de renina e elevada sensibilidade renal para a angiotensina II (SASSARD; MING; KIAO-LING, 2003), alterações na função endotelial em aorta e atéria mesentérica, maior reatividade a agonistas vasoconstritores e sensibilidade aumentada ao cálcio, provavelmente devido à uma expressão aumentada de Rho-kinase (FREITAS et al., 2003).

Dentre os vários modelos de ratos geneticamente hipertensos, a linhagem de ratos SHR, selecionada por Okamoto e Aoki (1963) é a mais estudada. A linhagem SHR foi desenvolvida no Japão, na década de 1960 por Okamoto e colaboradores, a partir dos ratos WKY, por cruzamento entre os

irmãos com pressão arterial elevada, resultando em 100% de progênie com hipertensão espontânea (OKAMOTO; AOKI, 1963). Desde então, vários especialistas relatam que a linhagem SHR é um excelente modelo para estudo de HAS essencial (TRIPPODO; FROHLICH, 1981; KUNDU; RAO, 2008).

O modelo de HAS essencial de ratos SHR apresenta diversas semelhanças com a HAS essencial de humanos. Nos ratos SHR a resposta hipertensiva inicia-se com o avanço da idade, começando por volta de 5 a 6 semanas e atingindo níveis de PAS entre 180 e 200 mmHg em animais adultos (CONRAD, 1995; KUNDU; RAO, 2008). Alterações hemodinâmicas, neurohumorais e renais tem sido observadas (TRIPPODO; FROHLICH, 1981), bem como hipertrofia do coração e vasos sanguíneos com aproximadamente 40 - 50 semanas de idade (CONRAD, 1995; KUNDU; RAO, 2008).

Como em humanos, o rim é o principal candidato como iniciador da hipertensão arterial de ratos SHR. Kawabe e colaboradores (1978) demonstraram que o transplante renal de um rato SHR para um rato normotenso WKY aumenta os níveis de pressão arterial do rato WKY, mesmo que o transplante ocorra antes do aparecimento da HAS do SHR. Por outro lado, a transferência de um rim do rato WKY para o SHR normaliza a pressão arterial do rato SHR, indicando o papel primordial do rim para o desenvolvimento de hipertensão em ratos SHR (KAWABE et al., 1978; KUNDU; RAO, 2008).

Outro aspecto interessante da hipertensão dos animais SHR, é o distúrbio do metabolismo do Ca^{2+}. A hipocalcemia observada em ratos SHR decorre da redução do transporte ativo de Ca^{2+} pelo intestino e perda excessiva de Ca^{2+} através da urina (HSU et al., 1987; SHIBATA et al., 1990; KUNDU; RAO, 2008). Além disso, foi relatada uma redução da síntese do metabólito ativo da vitamina D pelo rim em ratos SHR. Esses dados foram reforçados por estudos que demonstraram que a correção da hipocalcemia pela dieta rica em Ca^{2+} ou administração de vitamina D resulta em redução da pressão arterial, enquanto a dieta pobre em Ca^{2+} leva a um aumento na resposta hipertensiva (YOUNG et al., 1986; SCHLEIFFER et al., 1984; KUNDU; RAO, 2008).

Atualmente, estudos têm demonstrado que ocorre uma expressão alterada de alguns subtipos de canais Potencial Receptor Transiente (TRP) em ratos SHR em relação aos seus controles normotensos WKY. Diante dessas observações, os canais TRP têm sido foco de estudos com a finalidade de avaliar seu papel na HAS essencial (YU et al., 2004; YAO et al., 2005; LIU et al., 2005; TOUYZ et al., 2006; FIRTH; REMILLARD; YAN, 2007; NISHIDA; KUROSE, 2008; LIU et al., 2009; CHEN et al., 2010; WANG et al., 2014; BLAUSTEIN; HAMLYN, 2014).

1.2 Prevenção e Tratamento da hipertensão arterial sistêmica

A detecção, o tratamento e o controle da HAS são fundamentais para a redução dos eventos cardiovasculares. Mudanças no estilo de vida constituem medidas não-medicamentosas para o retardo do desenvolvimento da HAS em indivíduos com pressão limítrofe, reduzindo a mortalidade cardiovascular.

As principais recomendações são alimentação saudável, consumo controlado de sódio e álcool, ingestão de potássio, combate ao sedentarismo e ao tabagismo. Em caso de insucesso das medidas não-medicamentosas e em pacientes com riscos médios, altos ou muito altos, a abordagem deve ser uma combinação com medidas medicamentosas (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão - Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2010).

Os anti-hipertensivos considerados de primeira linha são diuréticos tiazídicos (como hidroclorotiazida e clortalidona), betabloqueadores (como propanolol e atenolol), inibidores da enzima conversora da angiotensina (como captopril e enalapril), bloqueadores do receptor do tipo 1 da angiotensina II (como losartana e ibesartana) e bloqueadores dos canais de cálcio diidropiridínicos de longa duração (como anlodipina e nifedipina) (MION-JÚNIOR et al., 2006).

A monoterapia pode ser a estratégia anti-hipertensiva inicial para pacientes com hipertensão arterial estágio 1, e com risco cardiovascular baixo a moderado. Se o objetivo terapêutico não for conseguido com a monoterapia inicial, é possível aumentar a dose do medicamento em uso; substituição do

antihipertensivo inicialmente utilizado ou associação com anti-hipertensivo de outro grupo terapêutico (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão - Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2010).

Entretanto, as metas de pressão arterial recomendadas para os pacientes hipertensos têm exigido o uso de uma combinação maior de medicamentos, e nem sempre é possível conseguir o objetivo, principalmente em pacientes com diabetes ou com insuficiência renal, nos quais os valores de pressão-alvo são mais baixos. Dessa forma, novas classes de medicamentos anti-hipertensivos estão sendo introduzidas com boas perspectivas para o tratamento dos pacientes com hipertensão resistente, por bloquear alterações fisiopatológicas frequentemente neles encontradas, tais como os inibidores da renina (BORTOLOTTO; MALACHIAS, 2009).

Além disso, novos alvos com alterações fisiopatológicas na hipertensão vêm sendo considerados, sendo demonstrada uma correlação funcional entre a expressão dos canais TRP e a hipertensão arterial. Com isso, substâncias que atuam sobre canais TRP podem constituir uma resposta promissora para o tratamento da HAS (YAO et al., 2005; FIRTH; REMILARD; YAN, 2007; LIU et al., 2009).

1.3 Canais TRP

Diversos canais iônicos exercem influência no potencial da membrana plasmática e na $[Ca^{2+}]_i$, apresentando extrema importância na regulação da contratilidade dos músculos liso e cardíaco (THORNELOE; NELSON, 2005). Os principais canais que aumentam a $[Ca^{2+}]_c$ são os canais de cálcio sensíveis à voltagem (Ca_v) e os canais catiônicos não-seletivos, localizados na membrana plasmática, e os receptores de IP_3 e de ryanodina, localizados na membrana do retículo sarcoplasmático (LEDOUX et al., 2006).

Dentre os canais catiônicos não-seletivos destacam-se os canais Potencial Receptor Transiente (TRP), os quais têm atraído a atenção por serem canais catiônicos, na sua maioria, permeáveis ao Ca^{2+} que podem ser

ativados por uma grande diversidade de estímulos e que possuem graus diferentes de seletividade (CLAPHAM, 2003).

Os canais TRP foram assim denominados, pois quando ativados esses canais permitem o influxo de cargas positivas para a célula, gerando uma despolarização. Entretanto esta despolarização não se caracteriza como um potencial de ação, mas como um potencial receptor (ou potencial graduado) transiente, podendo ou não vir a gerar um potencial de ação (CLAPHAM, 2003).

A estrutura primária dos monômeros de canais TRP mostra a presença de seis domínios transmembranares com um domínio formador de poro entre o quinto (S5) e sexto (S6) segmentos, e as regiões C e N-terminais direcionadas para o lado intracelular. Estes monômeros se agrupam formando homotetrâmeros, pela junção de monômeros iguais, ou heterotetrâmeros, pela junção de monômeros diferentes (MINKE; COOK, 2002; CLAPHAM et al., 2005; INOUE et al., 2006) (Figura 1).

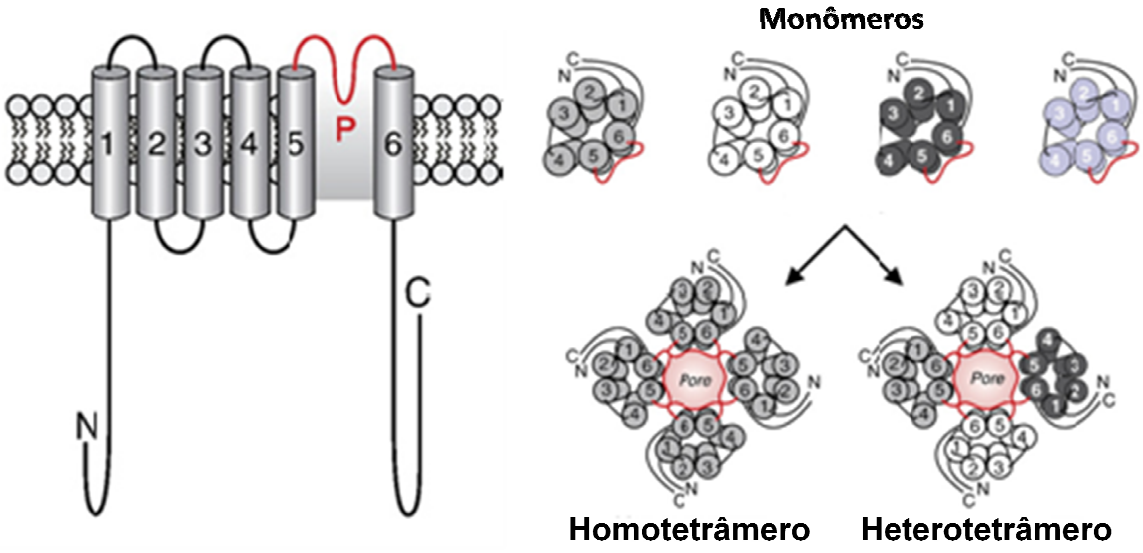
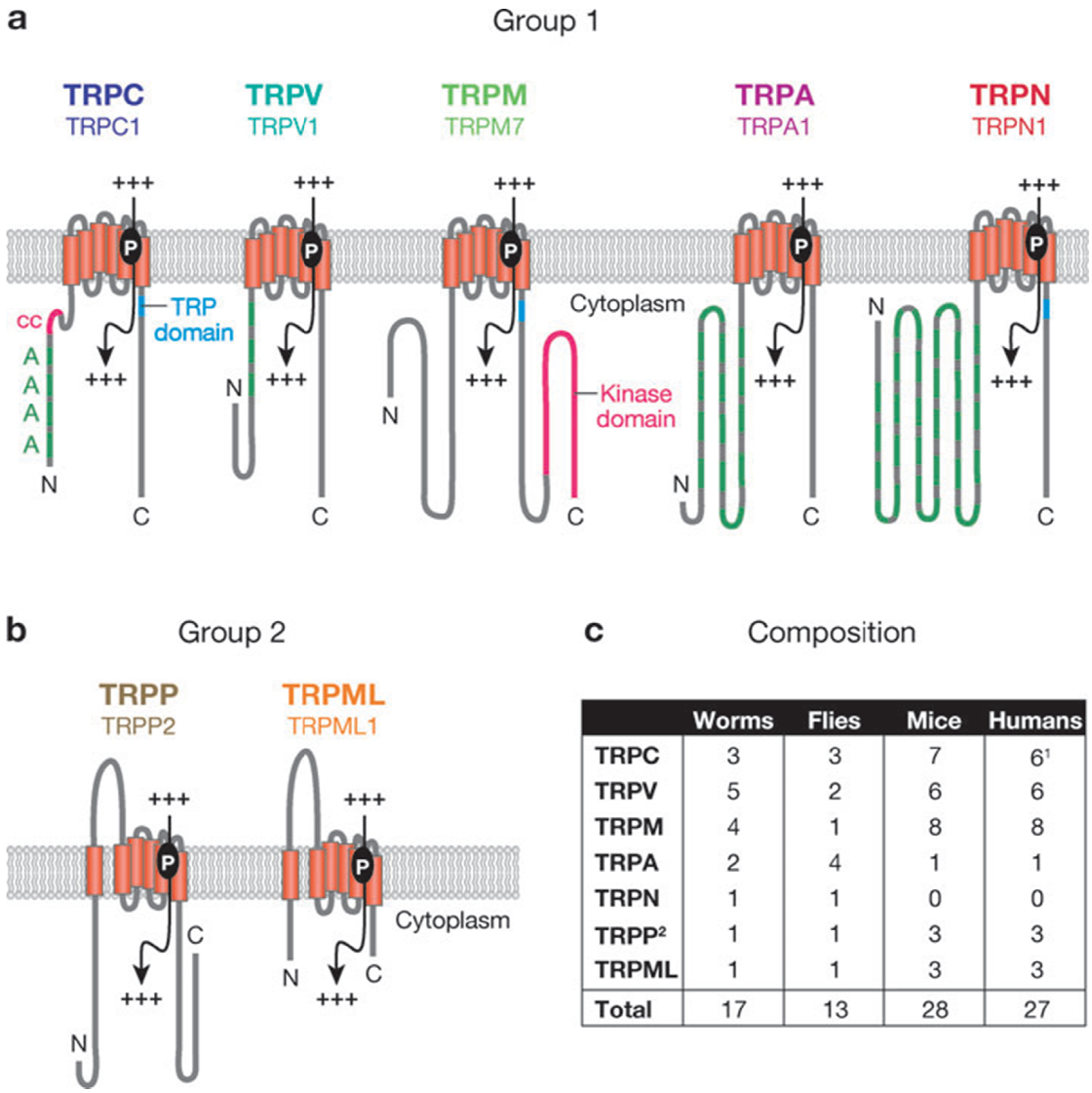


Figura 1. Representação esquemática da estrutura de um monômero de canal TRP, mostrando os seus seis segmentos transmembranares e a formação de tetrâmeros (Homo- ou Hetero-) (Adaptado de FIRTH; REMILLARD; YUAN 2007).

Os canais TRP foram inicialmente descobertos no sistema visual de mutantes *trp* de *Drosophila melanogaster* (MINKE, 2006; INOUE et al., 2006), e atualmente tem sido demonstrado que esses canais estão presentes e funcionam em uma grande variedade de organismos multicelulares, inclusive em humanos. Estes canais são expressos em vários órgãos, tais como cérebro, coração, rim, testículos, pulmão, fígado, baço, ovários, intestino, próstata, placenta, útero e tecidos vasculares, e em muitos tipos de células, incluindo neurônios (sensoriais e aferentes primários), células endoteliais vasculares, epiteliais e musculares lisas (MINKE; COOK, 2002; ver revisão MONTELL, 2005).

A superfamília de canais TRP é dividida em dois grupos dependendo das sequências e diferenças topológicas apresentadas por esses canais (MONTELL; RUBIN, 1989; CLAPHAM; RUNNELS; STRUBING, 2001; MONTELL, 2005; PHELPS; GAUDET, 2007).

O grupo 1 apresenta uma forte sequência homóloga e sua maior região abrange os seis segmentos transmenbranares incluindo o poro que é formado entre o quinto e sexto segmento (MONTELL; BIRNBAUMER; FLOCKERZI, 2002). Já o grupo 2 está distantemente relacionado, pelo fato de suas proteínas compartilharem uma sequência diferente nos segmentos transmembranares e também conter uma alça separando o primeiro e o segundo domínios transmembranares (PALMER; AYDAR; DJAMGOZ, 2005) (Figura 2).



	Worms	Flies	Mice	Humans
TRPC	3	3	7	6[1]
TRPV	5	2	6	6
TRPM	4	1	8	8
TRPA	2	4	1	1
TRPN	1	1	0	0
TRPP[2]	1	1	3	3
TRPML	1	1	3	3
Total	17	13	28	27

Figura 2. Representação esquemática da estrutura das subfamílias de canais TRP. a) Subfamílias de canais TRP pertencentes ao Grupo 1. b) Subfamílias de canais TRP pertencentes ao Grupo 2. c) Subfamílias de canais TRP encontradas em vermes, moscas, camundongos e humanos (VENKATACHALAM; MONTELL, 2007).

O grupo 1 é dividido em cinco subfamílias: canais TRP clássicos (TRPC), TRP receptores vanilóides (TRPV), TRP melastatinas ou TRP longos (TRPM), TRP mecanoreceptores potencial C (TRPN), TRP proteínas transmembranas ancrinas (ANKTM ou TRPA). Já o grupo 2 possui duas subfamílias: canais TRP receptores policistinas (TRPP) e TRP receptores mucolipinas (TRPML) (VENKATACHALAM; MONTELL, 2007). Nos mamíferos

foram encontrados 28 membros de canais TRP pertencentes às subfamílias C, V, M, A, ML e P (MONTELL, 2005; PHELPS; GAUDET, 2007) (Figura 2).

A nomenclatura de cada subfamília de canais TRP ocorre baseada em diversos aspectos. Os canais TRP clássicos (TRPC) recebem esse nome porque foram os primeiros a serem descobertos e por serem a subfamília de canais TRP mais intimamente relacionada com os canais TRP de Drosophila. Já os canais TRP receptores vanilóides (TRPV) recebem esse nome por serem ativados por compostos contendo o grupo vanilil como, por exemplo, a capsaicina e a vanilina (MONTELL, 2005).

Outros canais TRP possuem nomenclatura baseada em genes, funções e correlações com doenças. Diante disso, os canais TRP melastatinas ou TRP longos (TRPM) receberam esse nome porque a diminuição na expressão dos genes que codificam essas proteínas gera o aparecimento de melanoma. Os canais TRP receptores policistinas (TRPP) recebem esse nome porque mutações nos genes que codificam essas proteínas podem causar o aparecimento de doença renal policística. Os canais TRP receptores mucolipinas (TRPML) recebem esse nome por estarem envolvidos no transporte de lipídios e proteínas entre lisossomos e endossomos e pelo fato de que mutações nos genes que codificam essas proteínas geram o aparecimento de mucolipidose (MONTELL, 2005).

Outras subfamílias são ainda denominadas baseando-se em alguma diferença estrutural observada, como é o caso dos canais TRP proteínas transmembranas ankirinas 1 (ANKTM1 ou TRPA1) que possuem ankirinas repetidas na sua estrutura, ou ainda pelo mecanismo de ativação, como é o caso dos canais TRP mecanorreceptores potencial C (TRPN), que são ativados por estímulos mecânicos (MONTELL, 2005).

Algumas diferenças estruturas podem ainda ser observadas entre as subfamílias de canais TRP. Algumas subfamílias de canais TRP possuem um motivo de 25 aminoácidos, denominado de domínio TRP, contendo a caixa TRP (EWKFAR) na região C-terminal do sexto segmento transmembrana (S6). O domínio TRP e a caixa TRP estão presentes em todos os genes TRPC e TRPM, mas não em outros canais TRP. Além disso, os domínios

citoplasmáticos N-terminais de canais TRPC, TRPV e TRPA contém ankirinas repetidas, enquanto que apenas os canais TRPC e TRPM contém sequências ricas em prolina justamente na porção C-terminal do domínio TRP, denominado como caixa TRP 2 (YIN; KUEBLER, 2010) (Figura 3).

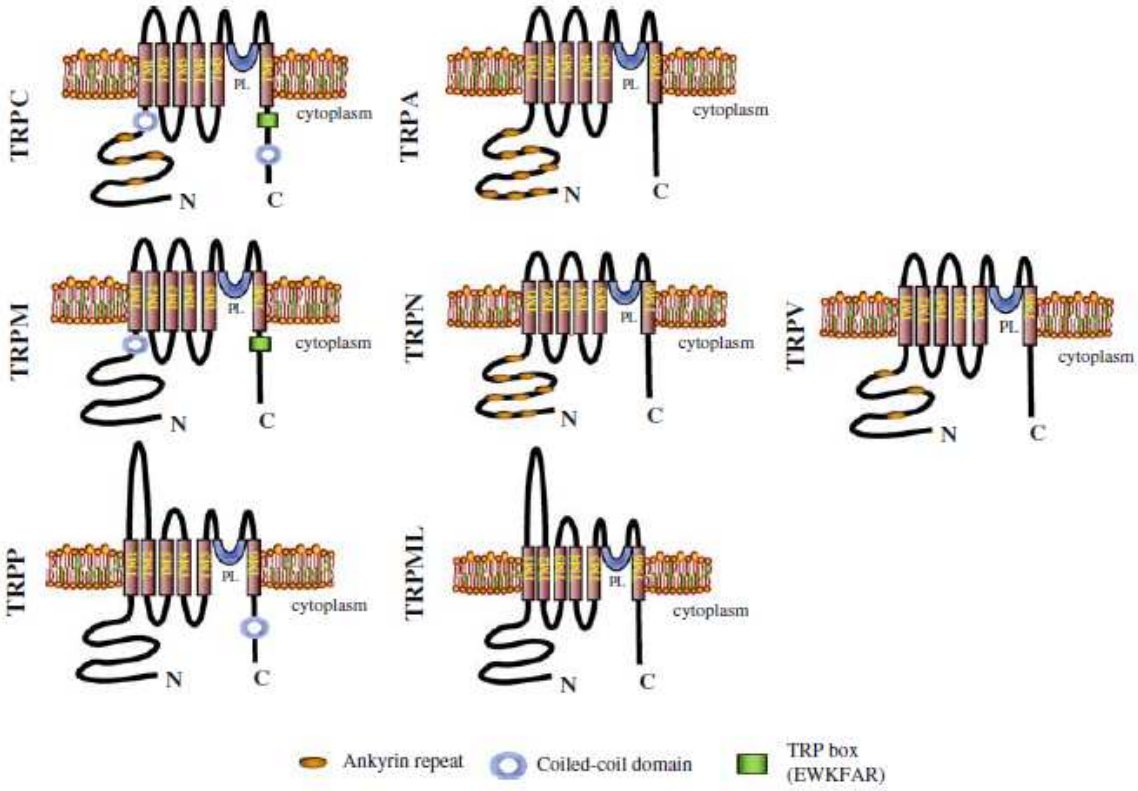


Figura 3. Representação esquemática da estrutura das sete subfamílias de canais TRP, mostrando as principais diferenças estruturais observadas entre elas. (YIN; KUEBLER, 2010).

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

Dentre os fatores que podem ativar os canais TRP podemos citar receptores acoplados a proteína G, agentes picantes, por exemplo, a capsaicina, lipídeos, ácidos, estresse de cisalhamento e hiposmolaridade (exemplo de ativadores dos canais TRPV), estresse oxidativo, elevação de Ca^{2+} intracelular e agentes resfriantes, tais como mentol e icilina (ativadores dos canais TRPM) (CATERINA, 1999; ZUKER, 2002; HARTENECK, 2005).

Além disso, alguns canais TRP são proteínas termorreceptoras, presentes em terminações nervosas livres de neurônios especializados que inervam a superfície corporal e a cavidade oral, sendo responsáveis pela sensação de calor e frio (CATERINA, 1999; ZUKER, 2002). A temperatura exerce papel nos processos biológicos e os canais TRP termossensíveis traduzem a temperatura, que é um estímulo físico, em um sinal químico, que é o influxo de íons para as células, incluindo o cálcio, que é essencial para uma série de funções celulares (WU; SWEET; CLAPHAM, 2010).

O TRPV1 é ativado por temperaturas moderadas (37 - 43 ºC) e por compostos vanilóides, como a capsaicina, substância presente nas pimentas de chili (BRAUCHI; ORIO; LATORRE, 2004; VOETS et al., 2004; PHELPS; GAUDET, 2007), o endocanabinóide anandamida (ZYGMUNT et al., 1999, VENKATACHALAM; MONTELL, 2007), o analgésico tópico cânfora (XU; BLAIR; CLAPHAM, 2005; VENKATACHALAM; MONTELL, 2007) e a piperina, substância pungente presente na pimenta preta (MCNAMARA; RANDALL; GUNTHORPE, 2005; VENKATACHALAM; MONTELL, 2007) e a alicina, presente no alho (MACPHERSON et al., 2005; VENKATACHALAM; MONTELL, 2007).

Os canais TRPV1 atuam na hiperalgesia térmica em resposta a mediadores inflamatórios, como a bradicinina e o fator de crescimento neuronal (CATERINA et al., 2000; DAVIS et al., 2000; CHUANG et al., 2001), no funcionamento normal da bexiga (BIRDER et al., 2002), nas respostas comportamentais ao etanol (BLEDNOV; HARRIS, 2009; ELLINGSON et al., 2009), nas doenças inflamatórias das vias aéreas (GEPPETTI et al., 2006) e detecção de sal (LYALL et al., 2004).

O TRPV2 é 50 % idêntico ao TRPV1, porém responde a temperaturas acima de 50 ºC (JULIUS; BASBAUM, 2001; ZUKER, 2002) e não é ativado por capsaicina (CATERINA, 1999; ZUKER, 2002). Os canais TRPV2 atuam como canais de liberação de cálcio do retículo endoplasmático (SAITO et al., 2007), na exocitose e na fagocitose por macrófagos (WU; SWEET; CLAPHAM, 2010).

Os canais TRPV3 são ativados em temperaturas mornas (33 - 39 ºC) (MONTELL, 2005; PHELPS; GAUDET, 2007) e pelos monoterpenos cânfora, eugenol, timol e carvacrol (MOQRICH et al., 2005; XU et al., 2006). Os canais TRPV3 estão envolvidos em respostas comportamentais e na sinalização do fator de crescimento epidérmico (CHENG et al., 2010a)

Os canais TRPV4 são ativados por temperaturas de 27 a 34 ºC (MONTELL, 2005; PHELPS; GAUDET, 2007). Os canais TRPV4, presentes no hipotálamo, pele e neurônios sensoriais primários, atuam na regulação da sede, pressão osmótica sistêmica e síntese de hormônio antidiurético em resposta à hipertonicidade sistêmica induzida por ingestão de sal (LIEDTKE; FRIEDMAN, 2003) e na regulação da composição da bile (GRADILONE et al., 2007).

Os canais TRPM8 são ativados por temperaturas moderadamente frias (8 a 27 ºC) e por compostos refrescantes como mentol, eucaliptol (ambos compostos de origem natural) e icilina (PEIER et al., 2002; MCKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002; ZUKER, 2002; CHUANG; NEUHAUSSER; JULIUS, 2004; HUI; GUO; FENG, 2005; INOUE, et al., 2006; COLBURN et al., 2007; DHAKA et al., 2007; BAUTISTA et al., 2007; PHELPS; GAUDET, 2007; BÖDDING; WISSENBACH; FLOCKERZI, 2007; YANG et al., 2010). Os canais TRPM8 são os principais detectores de temperaturas frias in vivo, que tem implicações nas sensações somáticas, nocicepção e desenvolvimento de analgesia (WU; SWEET; CLAPHAM, 2010).

As funções desempenhadas pelos canais TRP no sistema cardiovascular consistem em: vasoconstrição, vasodilatação via liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e produção de óxido nítrico (NO) na célula endotelial, proliferação de células musculares e respostas miogênicas, e atuam como canais operados por estoques (SOCs) (DIETRICH

et al., 2005b; INOUE, et al., 2006), canais operados por receptor (ROCs) (HOFMANN et al., 1999; INOUE et al., 2001; YANG et al., 2006) e canais de Ca^{2+} mecanossensíveis (MSCC) (READING et al., 2005; INOUE, et al., 2006).

Alguns canais TRP foram detectados em células endoteliais, como os canais TRPC3 e 4; TRPV3 e 4 e TRPA1, e em células musculares lisas vasculares, como por exemplo, os TRPC1, 3 e 6; TRPV2, 3 e 4; TRPM2, 3, 4, 6, 7 e 8 (GRAZIANI et al. 2004; INOUE, et al., 2006; YANG et al., 2006; EARLEY; GONZALES; GARCIA, 2010) (Tabela 1).

Tabela 1. Canais TRP expressos em células musculares lisas de artérias.

Canal TRP	Artéria	Referências
TRPC1	Mesentérica de coelho e Mesentérica de rato	SALEH et al., 2008; LARGE et al., 2009 HILL et al., 2006
TRPC3	Artéria cerebral de rato Coronária de coelho Aorta de rato	READING et al., 2005 PEPPIATT-WILDMAN et al., 2007 LIU et al., 2009
TRPC6	Mesentérica de coelho e Mesentérica de rato	SALEH et al., 2008; LARGE et al., 2009 HILL et al., 2006
TRPV2	Mesentérica de rato Aorta e Pulmonar de rato	INOUE, et al., 2006 YANG et al., 2006
TRPV3	Aorta e Pulmonar de rato	YANG et al., 2006
TRPV4	Mesentérica de rato Aorta e Pulmonar de rato	INOUE, et al., 2006 YANG et al., 2006
TRPM2	Aorta e Pulmonar de rato	YANG et al., 2006
TRPM3	Aorta e Pulmonar de rato	YANG et al., 2006
TRPM4	Mesentérica de rato Aorta e Pulmonar de rato	INOUE, et al., 2006 YANG et al., 2006
TRPM6	Mesentérica e Aorta de rato	CHUBANOV et al., 2004; HE et al., 2005
TRPM7	Mesentérica e Aorta de rato Aorta e Pulmonar de rato	CHUBANOV et al., 2004; HE et al., 2005 YANG et al., 2006
TRPM8	Aorta e Pulmonar de rato Mesentérica de rato Femoral e Caudal de rato	YANG et al., 2006 JOHNSON et al., 2009 JOHNSON et al., 2009

Baseado na expressão de canais TRP nos vasos sanguíneos, estudos têm sido desenvolvidos para avaliar o papel que esses canais exercem nos processos fisiológicos e seus mecanismos de ativação. Os principais canais TRP estudados no sistema cardiovascular são os canais TRPC, TRPM e TRPV.

Com relação aos canais TRPC, estudos relatam que o TRPC1 é descrito como um canal operado por depleção de estoques (SOC), envolvido na reestocagem de Ca^{2+} para os estoques intracelulares (BEECH et al., 2003; BERGDAHL et al., 2003; KUNICHIKA et al., 2004; DIETRICH et al., 2005b). Adicionalmente, foi descrito que o TRPC1 atua na contração e proliferação da célula muscular lisa vascular (BERGDAHL et al., 2003), e como um canal catiônico mecanosensível ativado por estiramento (SAC), que induz a despolarização de membrana e ativação de canais Ca_V nas células musculares lisas vasculares (MAROTO et al., 2005; THORNELOE et al., 2005).

Por outro lado, os canais TRPC3 e TRPC6 atuam tanto como canais operados por receptor (ROC) (HOFMANN et al., 1999; JUNG et al.; 2002; LARGE, 2002; LIN et al., 2004; YANG et al., 2006), quanto como canais operado por depleção de estoques (SOC) (LIN et al., 2004; JACKSON, 2006). Os canais do tipo ROC são abertos em resposta a ativação de receptores transmembranares acoplados a PLC, de forma independente de PKC, por meio de mecanismo envolve ativação direta pelo DAG (HOFMANN et al., 1999; INOUE et al., 2001; YANG et al., 2006), enquantos os canais do tipo SOC são ativos pela depleção de estoques intracelulares, como já mencionado (DIETRICH et al., 2005b).

A análise do funcionamento do canal TRPC3 nas células musculares lisas mostrou que este canal encontra-se acoplado ao trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX1), também ativo em células musculares cardíacas, células neuronais e células endócrinas. O funcionamento normal do trocador NCX1 permite o influxo de Na^+ e efluxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática, diminuindo dessa forma a $[Ca^{2+}]_c$.

No entando, este trocador é capaz de modular os sinais de Ca^{2+} celulares de uma maneira bidirecional, ou seja, o aumento da entrada de Na^{+} por canais TRPC3 faz com que o trocador NCX1 funcione de modo reverso. A atuação reversa do trocador resulta em um aumento na $[Ca^{2+}]_c$ e em uma diminuição na $[Na^{+}]_c$, com consequente ativação dos canais Ca_v e reestocagem de Ca^{2+} nos estoques intracelulares. Dessa forma, o canal TRPC3 atua como SOC (ROSKER et al., 2004; EDER et al, 2005) (Figura 4).

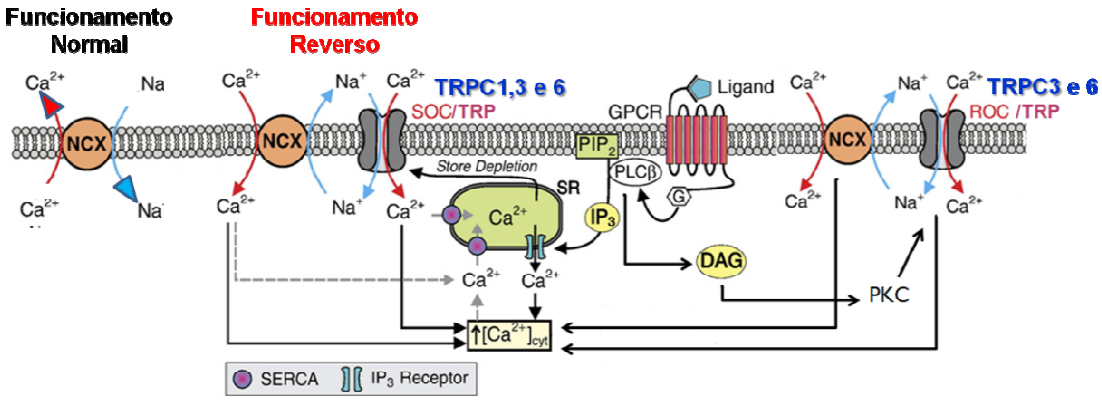


Figura 4: Representação esquemática da entrada de Ca^{2+} pelos canais TRPC1 (SOC) e TRPC3 e TRPC6 (SOC e ROC) e funcionamento reverso do trocador Na^{+}/Ca^{2+}. Em destaque o funcionamento normal do trocador Na^{+}/Ca^{2+} (em preto) e o funcionamento reverso (em vermelho) (Adaptado de FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007).

Adicionalmente, foi descrito que os canais TRPC6 atuam como canais mecanossensíveis (SAC) (READING et al., 2005) e que desempenham um papel crítico na despolarização induzida por pressão intravascular, causando contração de pequenas artérias e arteríolas, resposta conhecida como efeito *Bayliss* (WELSH et al., 2002). Além disso, foi observado que a perda de função de canais TRPC6 leva a diminuição no tônus vascular das artérias e na contratilidade do músculo liso de traquéia, causando hipotensão e redução na contratilidade das vias aéreas (DIETRICH et al., 2003, 2005a).

Outros canais que têm mostrado participação na função cardiovascular são os canais TRPM. O TRPM4 é um canal que exerce um papel importante na despolarização e contração de artéria cerebral de rato, via PKC, em resposta

ao aumento de pressão intraluminal (EARLEY; WALDRON; BRAYDEN, 2004; GONZALES et al., 2010, CRNICH et al., 2010).

Já o canal TRPM7 é um canal catiônico constitutivamente ativado que permite o influxo de Mg^{2+}, regulando a $[Mg^{2+}]_c$ (NADLER et al., 2001; RUNNELS; YUE; CLAPHAM, 2001). O Mg^{2+} é o segundo cátion divalente mais abundante no músculo liso vascular e o aumento na $[Mg^{2+}]_i$ diminui a vasoconstrição induzida por agonistas (KONRAD; SCHLINGMANN; GUDERMANN, 2004; FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007) e atua na proliferação das células musculares lisas vasculares observada durante a hipertensão (TOUYZ, 2006; FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007).

Por outro lado, o canal TRPM8 é um canal localizado na membrana plasmática ou na membrana de organelas, como retículo endo/sarcoplasmático e mitocôndrias (THEBAULT et al., 2005; SABNIS et al., 2008; YANG et al.; 2009; JOHNSON et al., 2009). O canal TRPM8 contribui para a manutenção do tônus vasomotor em artéria caudal (JOHNSON et al., 2009) e para o vasorrelaxamento de artéria mesentérica (SILVA, 2008, ALMEIDA, 2012) e caudal (JOHNSON et al., 2009).

Assim como os canais TRPM, os canais TRPV têm sido investigados com a finalidade de avaliar seus efeitos vasorrelaxantes. O TRPV4 é um canal que quando ativado permite a entrada de Ca^{2+} gerando a ativação de receptores de rianodina e canais BK_{ca} no músculo liso de arteria cerebral de rato, induzindo vasorrelaxamento (EARLEY et al., 2005). Já o TRPV2 é um canal mecanossensível, que detecta o aumento da osmolaridade em aorta de camundongo (MURAKI et al., 2003; YANG et al., 2006).

Outro canal TRPV que induz o vasorrelaxamento é o canal TRPV1. Este canal está presente em neurônios sensitivos cujas terminações nervosas localizam-se próximas às células musculares lisas vasculares. Quando ativados, os canais TRPV1 induzem a liberação do peptideo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) que por sua vez atua sobre o músculo liso vascular induzindo vasorelaxamento (ZYGMUNT et al., 1999; REID, 2005; GRADIN et al., 2008).

Existem outros canais TRP expressos no músculo liso de artérias, tais como os canais TRPV3, TRPM2, TRPM3 e TRPM6, porém suas funções no sistema vascular ainda não estão esclarecidas (EARLEY, 2010).

Os canais TRP têm chamado a atenção da comunidade científica, como potenciais novos alvos farmacológicos para o tratamento de diversas doenças. O interesse envolve a descoberta da expressão desses canais em diversos órgãos e tecidos do corpo e a possibilidade de sua participação nas respostas fisiológicas do organismo.

Diante da potencialidade emergente dos canais TRP, tem ocorrido uma ênfase no estudo de substâncias naturais e sintéticas capazes de ativar ou bloquear algum subtipo de canal TRP, com a finalidade de descobrir atividades preventivas e curativas úteis à promoção da saúde.

1.4 A importância dos Produtos Naturais

As plantas medicinais são utilizadas desde a antiguidade para o tratamento de diversas doenças humanas, incluindo a hipertensão, sob a forma de preparações caseiras e, ainda hoje, a maioria dos medicamentos é derivada de plantas, seja na forma de extratos ou de compostos isolados (MCNEILL; JURGENS, 2006).

Os produtos naturais, especialmente os de origem vegetal, são fontes de substâncias potencialmente aplicáveis com propriedades biológicas, farmacológicas ou terapêuticas (HARVEY, 2000). Além disso, os produtos naturais e seus derivados podem ser utilizados para investigação de processos fisiológicos e fisiopatológicos e descoberta de novos alvos envolvidos nesses processos, tais como enzimas, receptores, transportadores ou canais iônicos, os quais poderiam constituir sítios de ação de fármacos (SIMMONDS, 2003). Neste contexto, os produtos naturais têm desempenhado importante papel para avaliar o papel funcional dos canais TRP no sistema cardiovascular e em outros sistemas biológicos (CALIXTO et al., 2005).

O Brasil possui uma grande diversidade de plantas aromáticas, utilizadas na medicina popular, sob a forma de chás e infusos, como sedativos,

estomáquicos, antiespasmódicos, antidiarréico (FREISE, 1935; ITOKAWA; AIYAMA; IKUTA, 1981; KIUCHI et al., 1992; BEZERRA, 1994; COELHO-DE-SOUZA et al., 1997; COELHO-DE-SOUZA; CRIDDLE; LEAL-CARDOSO, 1998; MAGALHÃES et al., 1998), antiparasitários, antimicrobianos, analgésicos, diuréticos, hipotensores (LUZ et al.,1984; MENDONÇA, 1989; MENDONÇA et al., 1991), antimaláricos (KLAYMAN, 1985), antihemorroidários (PRUDENTE et al., 1993), anti-sifilíticos (MENDONÇA, 1989) e no tratamento de rinite alérgica (BEZERRA, 1994).

Dentre os vários constituintes presentes nas plantas aromáticas encontram-se os óleos essenciais, também denominados de óleos voláteis ou essências, que apresentam aroma intenso, volatilidade, imiscibilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos (COSTA, 1975). Os óleos essenciais são constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos, fenil-propanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; LAVABRE, 1993).

Os monoterpenos são compostos orgânicos de ocorrência natural, que constituem os componentes majoritários dos óleos essenciais derivados de plantas (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; LAVABRE, 1993). Do ponto de vista farmacêutico, os monoterpenos são utilizados como antimicrobianos (ÍSCAN et al., 2002), anestésicos, analgésicos (GALEOTTI et al., 2001, 2002; XU; BLAIR; CLAPHAM, 2005), anti-inflamatórios (SANTOS; RAO, 2001), antipruriginosos (UMEZU; SAKATA; ITO, 2001; ANAND, 2003), antiespasmódicos (HILLS; ARONSO, 1991; COELHO-DE-SOUZA et al., 1997; MAGALHÃES et al., 1998) e miorrelaxantes (ALBUQUERQUE et al., 1995).

Embora os mecanismos de ação para as várias atividades dos monoterpenos ainda não sejam completamente conhecidos, tem sido demonstrado que várias dessas substâncias ativam, bloqueiam ou modulam canais iônicos, principalmente os canais TRP (PEIER et al., 2002; MCKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002; BEHRENDT et al., 2004; MOQRICH et al., 2005; XU; BLAIR; CLAPHAM, 2005, XU et al., 2006; MACPHERSON et al., 2006; VOGT-EISELE et al., 2007; PATEL; ISHIUJI; YOSIPOVITCH, 2007).

1.4.1 *Mentha x-villosa* Hudson, rotundifolona e mentol

O gênero *Mentha L.*, pertencente à família Lamiaceae, é originário da região mediterrânea e parte da Ásia, sendo atualmente encontrado em quase todo o mundo, principalmente em regiões temperadas. Esse Gênero é constituído por cerca de 13 espécies e vários híbridos (HARLEY, 1973).

A espécie *Mentha x villosa* Hudson, também chamada de *M. crispa* ou *M. rotundifolia* é popularmente conhecida como hortelã-da-folha-miúda, hortelã-rasteira e hortelã-de-panela. A hortelã-da-folha-miúda é uma planta herbácea, rasteira, com raiz fibrosa, caule avermelhado, ereto, ramoso, com folhas aromáticas opostas variando de 2-5 cm de tamanho, limbo oval-lanceolado com borda serrilhada e superfície rugosa e glabra, pecíolo de 2-3 mm e sem inflorescências (MATOS, 1994) (Figura 5).

FONTE:https://mail.google.com/mail/?ui=2&ik=859a642851&view=att&th=12a594663ca08691&attid=0.1&disp=inline&zw



Figura 5. Foto da espécie *Mentha x villosa* Hudson.

No nordeste brasileiro, as folhas de *Mentha x villosa* Hudson são muito usadas tanto na culinária como condimentos, quanto na medicina popular e na indústria fitoterápica, atuando como estomáquico, ansiolítico, antidiarréico, contra cólicas menstruais (MATOS, 1994), contra Schistossoma mansoni (BORBA et al., 1990a; BORBA; BARBOSA-FILHO; PADOVANI, 1991; MATOS-ROCHA et al., 2013), no tratamento de afecções parasitárias como amebíase, giardíase e tricomoníase (BORBA et al., 1990a, 1990b; BORBA; MELO, 1988; MORAES et al., 2012) e antimicrobiano contra *S. aureus* e *C. albicans* (ARRUDA et al, 2006).

O extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Mentha x villosa* Hudson mostraram propriedades antiparasitárias significativas em cultura de *Entamoeba histolytica* (BORBA et al., 1988) e em estudos clínicos, o extrato hidroetanólico das folhas de *Mentha x villosa* Hudson apresentou comprovada atividade amebicida e giardicida. Em testes com 93 pacientes portadores de *Entamoeba histolytica* e 29 pacientes portadores de *Giardia lamblia* foi obtido cura de 91 % do primeiro grupo e 68 % do segundo grupo (SANTANA et al., 1992). Além disso, estudos pré-clínicos mostraram que o extrato etanólico bruto da *Mentha x villosa* Hudson também possui atividade no tratamento da esquistossomose mansônica (BORBA et al., 1989a; BORBA et al., 1989b).

O óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson (OEMV) também apresenta atividade antibacteriana contra *Candida albicans*, *Trychophyton rubrum* e *Aspergillus parasiticus* (BARBOSA-FILHO et al., 1992; ARRUDA et al., 2006). Além disso, o OEMV também apresenta atividades analgésica (ALMEIDA; HIRUMA; BARBOSA-FILHO,1996), contracturante em músculo esquelético de sapo (FOGAÇA et al., 1997) e antitumoral (AMARAL, 2014).

No sistema cardiovascular, o OEMV apresentou atividades hipotensora e bradicárdica em ratos anestesiados com uretana, sem alteração significativa na freqüência respiratória e em índices como pH, hematócrito e gasometria (SOUSA, 1999). Resposta semelhante foi observada em ratos anestesiados com pentobarbital, sendo atenuada pela vagotomia bilateral e pelo pré-tratamento com metil-atropina (LAHLOU et al., 2001). Além disso, o OEMV apresentou resposta vasorrelaxante em aorta de cobaia (SOUSA, 1999).

No óleo essencial das folhas de *Mentha x villosa* Hudson foram detectados 23 compostos químicos. Dentre eles estão limoneno, β-cariofileno, 1,8-cineol (eucaliptol), α e β-pineno, linalol e o componente majoritário (63,47%) o 1,2-epoxi-p-ment-4(8)-en-3-ona também denominado de óxido de piperitenona ou rotundifolona (HIRUMA; ALMEIDA; BARBOSA-FILHO, 1992) que é uma cetona monoterpênica de peso molecular igual a 166,219 g (BUCKINGHAM, 1994).

Na literatura é relatado que a rotundifolona apresenta atividade analgésica (ALMEIDA; HIRUMA; BARBOSA-FILHO, 1996), espasmolítica em íleo de cobaia (SOUSA et al., 1997), hipotensora e bradicárdica em ratos anestesiados com uretana (SOUSA, 1999) e com pentobarbital (LAHLOU et al., 2001), bem como inibição das contrações promovidas por solução despolarizante de KCl (60 mM) e PDB (dibutirato de forbol) em aorta de cobaia e leito mesentérico de rato perfundido (SOUSA, 1999).

A rotundifolona ($C_{10}H_{15}O_2$) possui estrutura química semelhante à do mentol ($C_{10}H_{20}O$), um monoterpeno encontrado em diversas espécies do gênero *Mentha L*. e conhecido como ativador de canais TRPM8 (Figura 6).

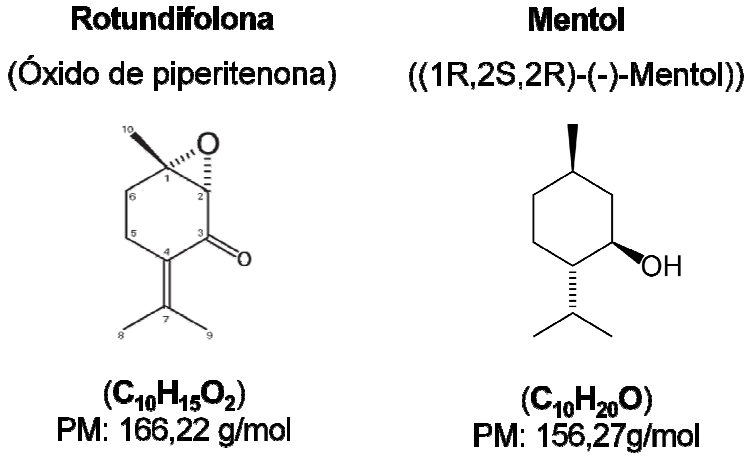


Figura 6: Estrutura química, fórmula molecular e massa molecular de rotundifolona e mentol.

O mentol, ((1R,2S,5R)-2-isopropil- 5-metilciclohexanol) é largamente utilizado em alimentos, bebidas e artigos de higiene pessoal devido a sua fragrância e sensação de refrescância inerentes (ECCLES, 1994), sendo ainda conhecido por suas propriedades medicinais (SHE et al, 2012), como atividades analgésica, anestésica (KLEIN et al, 2011) e anti-tussinogênica (WISE et al, 2012).

Estudos com formulações contendo mentol mostraram que o gel de mentol a 3,5 % reduziu o fluxo sanguíneo em artéria radial após aplicação tópica (TOPP et al., 2011) e a pomada de mentol a 3,5 % reduziu significativamente a condutância em artéria braquial (OLIVE et al., 2010). Além disso, a administração de uma dose única de mentol puro (100 mg) retardou a absorção e diminuiu o efeito da cafeína sobre a freqüência cardíaca (GELAL et al., 2003).

O mentol também atua em tecidos cardíacos e arteriais. A resposta observada em tecidos cardíacos consiste em efeito inotrópico negativo em músculo atrial de cobaia (HAWTHORN et al., 1988) e em cardiomiócito isolado de coelho por inibição de canais Ca_V (BAYLIE et al., 2010). Em tecidos arteriais, o mentol induz vasorrelaxamento em aorta, artéria mesentérica superior e artéria coronária por inibição dos canais Ca_V (CHEANG et al., 2013). Além disso, o mentol induz resposta vasorrelaxante em artéria pulmonar (YANG et al., 2006), aorta e artérias caudal, femoral e mesentérica de ratos *Sprague Dawley* (SD) por ativação de canais TRPM8 (JOHNSON et al., 2009).

O OEMV e o seu componente majoritário, a rotundifolona, são drogas que têm sido estudadas no nosso grupo de pesquisa, avaliando seus efeitos sobre o sistema cardiovascular para descobrir uma resposta eficaz na redução da pressão arterial elevada e um possível uso no tratamento da HAS.

Estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa mostraram uma redução significativa na pressão arterial e na frequência cardíaca induzida pelo OEMV e pela rotundifolona em ratos Wistar não-anestesiados. A resposta hipotensora envolve a ativação de receptores M_3 e produção de NO, enquanto a resposta bradicárdica envolver a ativação de receptores M_3, porém sem produção de NO (GUEDES et al., 2002; 2004a,b).

No coração, as respostas observadas foram diminuição na freqüência (efeito cronotrópico negativo) e na força de contração (efeito inotrópico negativo), entretanto o mecanismo envolvido não foi avaliado. Já em aorta isolada de ratos Wistar, a resposta vasorrelaxante ocorre de maneira dependente e independente de endotélio vascular funcional. A via dependente de endotélio envolve a produção de NO e prostaciclinas (GUEDES et al., 2002; 2004a), enquanto a via independente de endotélio funcional envolve o bloqueio dos Ca_V e dos receptores de IP_3 da membrana do retículo sarcoplasmático (GUEDES et al., 2004b).

Em ratos Wistar tratados com L-NAME, um inibidor da enzima NO sintase, durante 7 dias, as respostas hipotensoras induzidas pelo OEMV e pela rotundifolona foram significativamente atenuadas, não sendo observadas alterações significativas nos efeitos bradicárdicos (GUEDES et al., 2002; 2004a,b). O tratamento com L-NAME consiste em um dos modelos de indução de HAS secundária.

A continuação do estudo de Guedes e colaboradores (2002, 2004a,b) teve como finalidade a avaliação do mecanismo envolvido nas respostas hipotensora, bradicárdica e vasorrelaxante induzidas por rotundifolona em um modelo de HAS essencial. O modelo avaliado por Silva (2008) consistiu na utilização de ratos hipertensos (LH) e normotensos de Lyon (LN).

A rotundifolona promoveu hipotensão e bradicardia em ratos LN e LH não anestesiados. Além disso, observou-se vasorelaxamento em artéria mesentérica superior de ratos LN e LH de maneira dependente e independente de endotélio vascular funcional. A via independente do endotélio vascular envolve a ativação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) e a inibição dos Ca_v (SILVA, 2008; SILVA et al., 2011).

SILVA (2008) também observou um aumento transiente da $[Ca^{2+}]_c$ em miócitos de artéria mesentérica superior de rato SD, que foi atenuado significativamente na presença de capsazepina, um antagonista competitivo dos receptores TRPV1 e TRPM8.

Esses achados levantaram a hipótese de que os canais TRP poderiam estar envolvidos na resposta induzida por rotundifolona em artéria mesentérica de ratos SD. Dessa forma, SILVA (2008) propôs um mecanismo de ação através do qual a rotundifolona poderia estar promovendo efeito vasorrelaxante em artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos SD. O mecanismo poderia envolver a ativação de canais TRP, que seriam responsáveis pelo aumento transiente da $[Ca^{2+}]_c$, que por sua vez provavelmente resultaria em ativação dos BK_{Ca} e inativação dos Cav, resultando na repolarização da membrana e diminuição no influxo de Ca^{2+}, com conseqüente relaxamento das células musculares lisas vasculares.

Posteriormente obtivemos dados capazes de promover a aceitação da hipótese de envolvimento dos canais TRP na resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona em ratos SD. No estudo mencionado foram utilizados bloqueadores de canais TRP, os quais mostraram a provável participação dos canais TRPM8 e TRPC na resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona e mentol em artéria mesentérica superior isolada de ratos SD (ALMEIDA, 2012).

Durante o estudo mencionado acima também mostramos a expressão de canais TRPM8 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SD, informação que aparecia nos artigos científicos de forma controversa e duvidosa até aquele momento (ALMEIDA, 2012). Muitos autores mostravam a expressão de canais TRPM8 em aorta e apenas uma expressão marginal ou mesmo ausência de expressão em artéria mesentérica, sendo mencionada uma expressão significativa por JOHNSON e colaboradores (2009).

Depois de confirmada a expressão dos canais TRPM8 em artéria mesentérica e verificada sua participação na resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona em ratos normotensos (SD), surgiu a necessidade de caracterizar como as respostas induzidas pelo OEMV e pela rotundifolona estariam ocorrendo em ratos com HAS essencial, quais seriam as prováveis alterações observadas e o papel dos canais TRP nessas possíveis diferenças.

Entretanto, a maioria dos estudos realizados com canais TRP utilizam células com super-expressão desses canais, sendo escassos os estudos em organismos íntegros ou tecidos isolados. Dessa forma este estudo foi desenvolvido com a finalidade de caraterizar as respostas cardiovasculares induzidas pelo OEMV, pela rotundifolona e pelo mentol em um organismo vivo, com todos os mecanismos de regulação atuantes, e em tecidos e células isoladas onde ocorre a expressão fisiológica dos canais TRP e de proteínas que podem estar associadas a esses canais. Com isso, torna-se possível uma visão mais ampla do papel dos canais TRP na função cardiovascular e na fisiopatologia da Hipertensão Essencial, bem como do potencial que substâncias que atuam sobre os canais TRP possuem para a terapêutica.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- ✓ Comparar as respostas induzidas por OEMV, rotundifolona e mentol em ratos hipertensos e normotensos, avaliando o papel de canais TRP nessas respostas e na hipertensão.

2.2 Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram investigar:

- ✓ As respostas induzidas por OEMV, rotundifolona e mentol sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) e seus controles normotensos *Wistar Kyoto* (WKY);

- ✓ As respostas induzidas por OEMV, rotundifolona e mentol em átrios direito e esquerdo isolados de ratos SHR e WKY;

- ✓ A resposta vasorrelaxante induzida por OEMV, rotundifolona e mentol em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY;

- ✓ A participação de canais TRP nas respostas induzidas por rotundifolona e mentol em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY;

- ✓ A resposta induzida por rotundifolona na $[Ca^{2+}]_i$ em células musculares lisas vasculares de ratos SHR e a participação de canais TRPM8 nessa resposta;

- ✓ A expressão de canais TRPM8 em artéria mesentérica superior e no coração de ratos SHR e WKY.

Material

3 MATERIAL

3.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos SHR e WKY, com idade de 12 a 14 semanas, pesando entre 250 e 300 g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da UFPB.

Esses animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura e ventilação, e submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 06h00 às 18h00, tendo livre acesso a água e a uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Purina).

Os animais foram eutanasiados seguindo as normas de cuidados com animais, e os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CBiotec/UFPB, parecer nº 1201/11.

3.2 Obtenção das drogas testadas

3.2.1 Obtenção do OEMV e do mentol

O óleo essencial das folhas frescas da espécie *Mentha x villosa* Hudson (OEMV) foi obtido do laboratório Hebron®, enquanto o (1R,2S,5R)-(−)-mentol foi obtido da Sigma-Aldrich (EUA).

3.2.2 Isolamento e identificação de rotundifolona

A rotundifolona foi isolada do OEMV (Hebron®) no laboratório de farmacoquímica do CBiotec por meio de colaboração com o Prof. Dr. José Maria Barbosa-Filho, da Universidade Federal da Paraíba.

Os procedimentos de isolamento e identificação de rotundifolona foram realizados conforme descrito por Guedes e colaboradores (2002). O OEMV foi submetido a uma Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), utilizando-se como eluente o hexano P.A. (Vetec-Química Fina S.A.).

As placas cromatográficas foram reveladas em lâmpada ultravioleta λ 254 nm (Modelo UV LS-25), e mostravam a presença de um constituinte majoritário, a rotundifolona, a qual se apresentava como uma extensa faixa logo acima do ponto de aplicação do OEMV.

A rotundifolona foi então removida das placas cromatográficas e posteriormente recuperada da sílica gel por extração em clorofórmio P.A. (Vetec-Química Fina S.A.). Por fim a rotundifolona teve suas propriedades físicas e espectrais comparadas com as amostras-padrões disponíveis no Laboratório de Farmacoquímica do CBiotec/UFPB.

3.3 Preparação das soluções de OEMV, rotundifolona e mentol

Para preparar as soluções estoques de OEMV e rotundifolona, essas drogas foram solubilizadas em cremofor® (50 µL por mL de solução) e diluídas em água deslilada ou salina. Já o mentol foi solubilizado em cremofor® (50 µL por mL de solução) e etanol absoluto P.A., e diluído em água destilada ou salina para obtenção das concentrações desejadas para cada protocolo experimental. Essas soluções foram conservadas a 0 °C, sendo diluídas em água destilada ou salina para obter outras soluções de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. O cremofor® (óleo de castor) é um agente emulsivo. Suas concentrações não excederam 0,01% e foram previamente testadas, apresentando ausência de efeito farmacológico.

3.4 Substâncias e reagentes

Para o preparo das soluções fisiológicas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2.2H_2O$), sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($MgCl_2.6H_2O$), glicose ($C_6H_{12}O_6$), bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), fosfato de sódio monobásico mono-hidratado ($NaH_2PO_4.H_2O$), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e fosfato de potássio (KH_2PO_4) (Sigma).

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes substâncias: tiopental sódico (Cristália), sal sódico de heparina (Roche), nitroprussiato de sódio, cloridrato de L(-) fenilefrina (FEN), cloridrato de acetilcolina (ACh), vermelho de rutênio, capsaicina, cloreto de lantânio ($LaCl_3$), cloreto de gadolínio ($GdCl_3$), cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e N-(3-aminopropil)-2-[(3-metilfenil)metoxi]-N-(2-tienilmetil)-benzamida hidrocloridrato (AMTB), solução de tripsina (0,2%) + EDTA (0,02%) (Sigma), N-(4-tertiaributil-phenil)-4-(3-cloropiridin-2-il)tetrahidropirazina-1(2H)-carboxamida (BCTC) (Santa Cruz Biotechnology), Fluo-4 (Ester AM) (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA). A mistura carbogênica (95 % de O_2 e 5 % d e CO_2) foi obtida da White Martins (Brasil).

3.5 Soluções fisiológicas

Tabela 2. Composição da solução de Krebs Henseleit (pH = 7,4).

Substância	**Concentração (mM)**
NaCl	108,4
KCl	4,7
$CaCl_2$	2,5
$MgSO_4$	1,2
KH_2PO_4	1,2
$NaHCO_3$	25,0
Glicose	10,0

Fonte: NASA et al., 1992.

Tabela 3. Composição da solução de Tyrode normal (pH = 7,4).

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

Fonte: TANAKA et al, 1999.

Tabela 4. Composição da solução de Tyrode com KCl a 60 mM (pH = 7,4).

Substância	**Concentração (mM)**
NaCl	101,93
KCl	60,0
$CaCl_2$	1,0
$MgCl_2$	1,05
NaH_2PO_4	0,42
$NaHCO_3$	10,0
Glicose	5,6

Fonte: TANAKA et al, 1999.

Tabela 5. Composição da solução tampão fosfato-salino (PBS) (pH = 7,4).

Substância	**Concentração (mM)**
NaCl	137
KCl	2,7
KH_2PO_4	1,8
Na_2HPO_4	10

Fonte: DULBECCO; VOGT, 1954.

Tabela 6. Composição da solução de Hanks sem cálcio (pH = 7,4).

Substância	Concentração (mM)
NaCl	137,93
KCl	5,33
$MgCl_2$	0,49
$MgSO_4$	0,41
KH_2PO_4	0,44
Na_2HPO_4	0,34
$NaHCO_3$	4,17
Glicose	5,56

Fonte: HANKS; WALLACE, 1949.

Tabela 7. Composição da solução de Hanks com cálcio (pH = 7,4).

Substância	Concentração (mM)
NaCl	137,93
KCl	5,33
$CaCl_2$	1,26
$MgCl_2$	0,49
$MgSO_4$	0,41
KH_2PO_4	0,44
Na_2HPO_4	0,34
$NaHCO_3$	4,17
Glicose	5,56

Fonte: HANKS; WALLACE, 1949.

3.6 Equipamentos

As substâncias foram pesadas em balança analítica modelo AG200 e os animais em balança semi-analítica (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

Os órgãos foram suspensos em cubas de vidro (10 mL) aquecidas à temperatura adequada por bomba termostática contidas no banho de órgão automático *Panlab Harvard Apparatus* (ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia).

As contrações isométricas foram registradas por meio de transdutores de força isométricos modelo TRI201AD (ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia) e a pressão arterial e frequência cardíaca foram registradas por meio de transdutores de pressão modelo MLT1199 (ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia). Os transdutores estavam conectados a um amplificador *PowerLab* (ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia). O amplificador por sua vez estava conectado a uma placa conversora analógico/digital instalada em um microcomputador com o programa de aquisição de dados *LabChart*® versão 7.3.7 (ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia).

A estimulação elétrica dos átrios esquerdos foi realizada com estimulador elétrico *Panlab Harvard Apparatus* LE12406 TC/OM (ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia).

Os experimentos de Western blot foram realizados utilizando o sistema *Mini Protean II* e o sistema de transferência *Mini Trans-Blot Cell*, acoplados ao sistema *PowerPac HC Power Supply*, e o sistema de fotodocumentação *ChemiDoc*™ XRS+ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA). Para os experimentos de PCR foi utilizado o termociclador (Techne, Burlington, NJ, EUA).

As medidas intracelulares foram realizadas em citômetro de fluxo *BD FACS Canto II*™ e o programa de aquisição de dados utilizado foi o *FACSDiva* versão 6.1.3 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA).

Métodos

4 MÉTODOS

Para a realização desse trabalho foram utilizados ensaios farmacológicos (*in vivo* e *in vitro*) e ensaios bioquímicos (PCR e Western blot), e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CBiotec/UFPB, parecer nº 1201/11.

4.1 Ensaios *in vivo*

4.1.1 Procedimento cirúrgico para medida da pressão arterial e frequência cardíaca

Para efetuar a medida da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), os ratos SHR e WKY foram inicialmente submetidos a um procedimento cirúrgico para inserção dos cateteres. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.), e dois cateteres de polietileno (PE), compostos por um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente) soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente) foram implantados.

Um dos cateteres foi inserido na artéria femoral esquerda chegando até a aorta abdominal e o outro foi inserido na veia femoral esquerda chegando até a veia cava inferior. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal. O cateter arterial foi utilizado para medida da pressão arterial e o cateter venoso foi utilizado para a administração de substâncias (OLIVEIRA et al., 1996).

4.1.2 Medida da pressão arterial e frequência cardíaca

A medida da pressão arterial (PA) foi realizada no animal acordado não anestesiado e com livre movimentação, visto que a anestesia modifica o funcionamento dos principais sistemas de regulação da pressão arterial, como o sistema renina-angiotensina, o sistema nervoso simpático e o baroreflexo (FLUCKIGER et al., 1985; DORWARD et al., 1985); produz depressão de algumas sinapses do sistema nervoso central alterando as respostas autonômicas (KORNER et al., 1968; WHITE; MCRITCHIE, 1973; ZIMPFER et al., 1982); e altera os sistemas básicos de controle fisiológico da pressão arterial (FLUCKIGER et al., 1985; SMITH; HUTCHINS, 1980).

A pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) foram medidas 24 h após o procedimento cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia) acoplado a um amplificador *PowerLab* (ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia) e conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital (ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia) e com o programa *LabChart*® versão 7.3.7 (ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia).

A frequência de amostragem dos dados foi de 500 Hz e para cada ciclo cardíaco, o computador calculou a pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), e o intervalo de pulso, denominado de frequência cardíaca (FC).

Os animais foram submetidos a um período de estabilização de 30 minutos para a estabilização do sinal e em seguida foi administrado (via cateter venoso) nitroprussiato de sódio (NPS) (10 µg/kg i.v.) para verificar a inserção do catéter venoso. Após um período de 30 minutos foram administradas doses de OEMV ou rotundifolona ou mentol (1, 3, 5, 10, 20 e 30 mg/kg i.v.) e do veículo de forma aleatória, sendo OEMV e rotundifolona administradas em animais diferentes. O efeito da administração dessas substâncias sobre a pressão arterial e frequência cardíaca foi observado em ratos SHR e WKY não anestesiados (Figura 7).

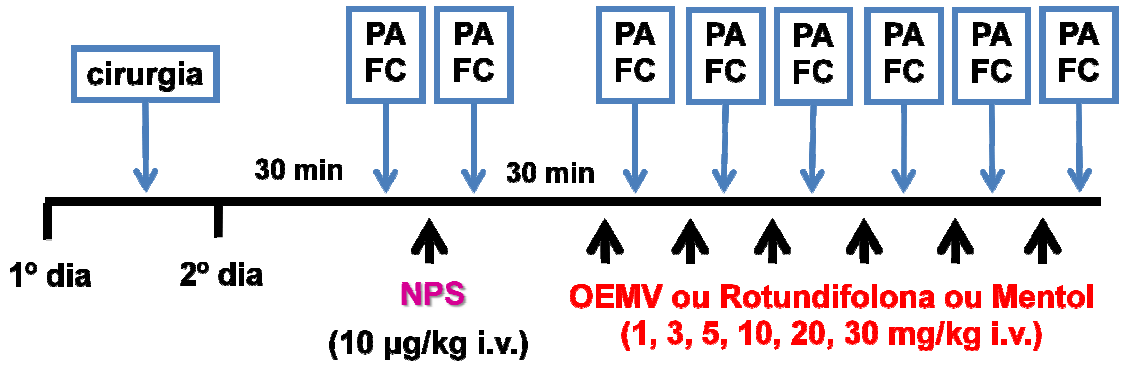


Figura 7. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta induzida por OEMV ou rotundifolona ou mentol sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos SHR e WKY não-anestesiados.

4.2 Ensaios Bioquímicos

Com a finalidade de investigar a expressão dos canais TRPM8 em artéria mesentérica superior e no coração de ratos foram utilizadas as técnicas de PCR e Western blot.

4.2.1 Investigação da expressão do RNAm dos canais TRPM8 em ratos SHR

Para investigar a expressão do RNAm do canal TRPM8 em artéria mesentérica superior isolada de rato foi utilizada a técnica de PCR (JOHNSON et al., 2009). Primeiramente procedeu-se a extração do RNA. Para isso inicialmente a artéria mesentérica foi removida, congelada em nitrogênio líquido e triturada na presença de trizol (1 mL) sendo mantida à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente foi adicionado ao mesmo tubo 0,2 mL de $CHCl_3$ sendo agitado vigorosamente por 15 minutos e incubado a temperatura ambiente por 2 minutos. O conteúdo foi então transferido para um eppendorf e centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4ºC.

A fase aquosa contendo o RNA foi então coletada e transferida para outro eppendorf contendo 0,5 mL de isopropanol, sendo incubada por 10

minutos a -20ºC. Posteriormente esse eppendorf foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4ºC, sendo o sobrenadante descartado e o pellet lavado com 1 mL de etanol a 75 %.

Em seguida o pellet foi ressuspendido com vortex e centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4ºC. O pellet foi então seco moderadamente, ressuspendido em água DEPC (água destilada contendo dietilpirocarbonato) e aquecido a 50 ºC por 15 minutos. O RNA foi quantificado por meio de leitura em espectrofotômetro a 260 nm, sendo realizado o cálculo do volume que seria necessário para obter 4 μg de RNA da amostra.

Em seguida foi sintetizado o cDNA, utilizando um kit de transcrição reversa (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para isso, utilizou-se o volume calculado de RNA total da amostra juntamente com 10 μL do mix contendo enzima transcriptase reversa, tampão da enzima, dNTPs (nucleotídeos), ditiltreitol e random primers. Esse conteúdo foi colocado em termociclador (Techne, Burlington, NJ, EUA) e submetido a 40ºC por 50 minutos e 70ºC por 15 minutos. Dessa forma foi obtido o cDNA para a realização da PCR utilizando mix para PCR (S.A. Biosciences, Frederick, MD). A PCR consiste em 30 a 40 ciclos de 3 etapas de temperaturas diferentes (Figura 8).

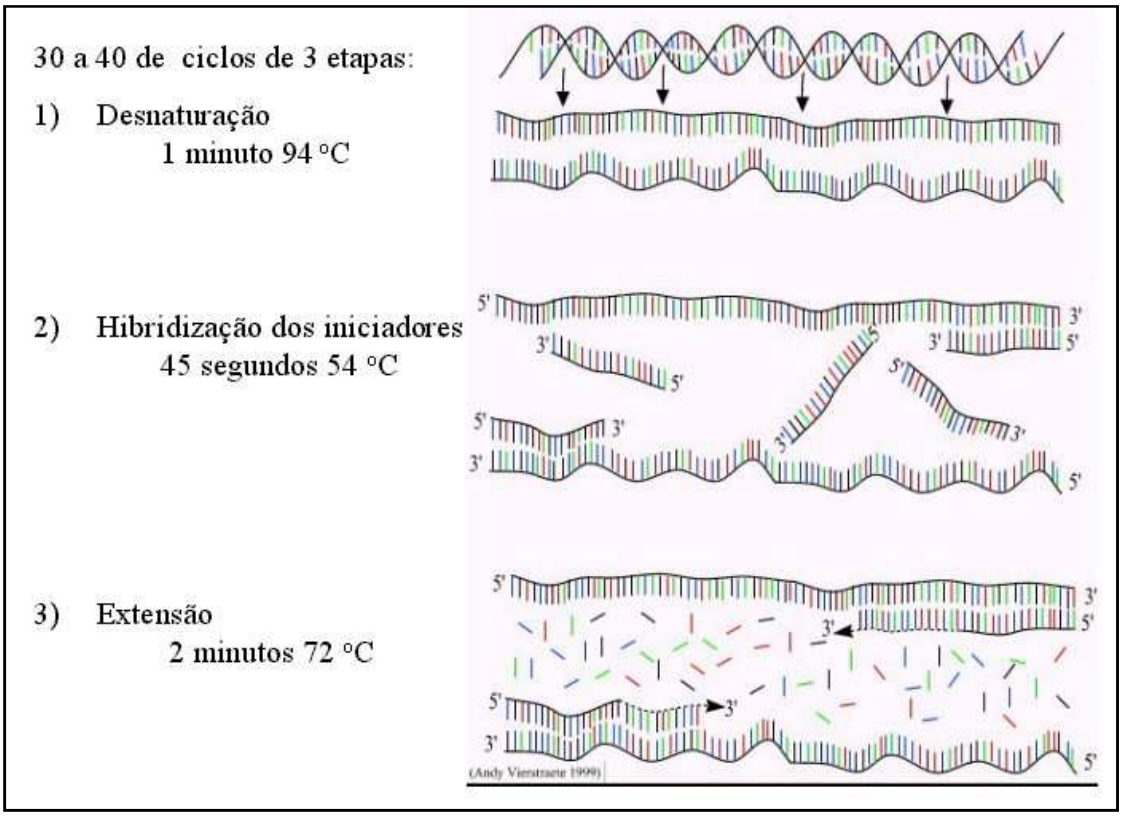


Figura 8. Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase (PCR) (http://dc340.4shared.com/doc/AWnFwCif/preview_html_7538fe47.png).

Para a realização da PCR, 2 ou 4 µL de cDNA da amostra foram adicionados a 9 µL do mix contendo Taq DNA polimerase, tampão da enzima 10x, primers sense e antisense para a sequência codificadora do TRPM8, dNTPs e Mg^{2+}. A PCR também foi realizada para a sequência codificadora de uma proteína constitutiva (β-actina), na qual em vez dos primers sense e antisense para o TRPM8 foram utilizados os primers sense e antisense para a proteína constitutiva.

O cDNA amplificado foi separado por eletroforese utilizando gel de poliacrilamida a 4%. As amostras juntamente com tampão contendo azul de bromofenol e azul xileno cianol foram aplicadas no gel, que foi submetido a uma diferença de voltagem de 120 V por 90 minutos. Em seguida, o gel foi fixado com solução de etanol (10 %) e ácido acético (0,5 %) e corado com solução de prata por 7 a 10 minutos. Posteriormente o gel foi colocado em solução reveladora de NaOH e formol.

4.2.2 Investigação da expressão protéica dos canais TRPM8 em ratos SHR

A avaliação de expressão dos canais TRPM8 em átrios, ventrículos e artérias mesentéricas superiores isolados de ratos SHR e WKY foi realizada por meio da utilização da técnica de Western blot (JOHNSON et al., 2009). Inicialmente os tecidos (átrio direito, átrio esquerdo, ventrículo direito, ventrículo esquerdo, artéria mesentérica superior) foram congelados isolamente em nitrogênio líquido e homogeneizados em tampão de lise RIPA (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, EUA) e coquetel inibidor de protease (Roche, Mannheim, Germany). O tecido foi então macerado sendo em seguida centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi então retirado e utilizado para a dosagem de proteína usando reagente de folin, segundo o método de Lowry (LOWRY et al., 1951), pela medida da absorbância e comparação com soluções padrão de BSA. Em seguida foi realizada a eletroforese em gel SDS-PAGE (gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio) utilizando o sistema Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA).

As placas de vidro foram colocadas no sistema Mini Protean II, o gel de corrida ou separação SDS-PAGE (7,5 %) foi colocado entre as duas placas e após a polimerização colocou-se o gel de concentração SDS-PAGE (4%) entre as placas acima do gel de separação, sendo inseridas as canaletas. Após a polimerização do gel de concentração, as canaletas foram retiradas e as placas colocadas dentro do sistema de corrida contendo o tampão de corrida. As amostras foram então aplicadas no gel e submetidas a uma diferença de voltagem de 120 V por 90 minutos utilizando o sistema *PowerPac HC Power Supply* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA).

Terminada a eletroforese, o gel foi colocado em contato com membrana de nitrocelulose para realização do processo de transferência das proteínas do gel para a membrana. Para isso o gel e a membrana foram arranjados numa estrutura semelhante a um “sanduiche” (Figura 9).

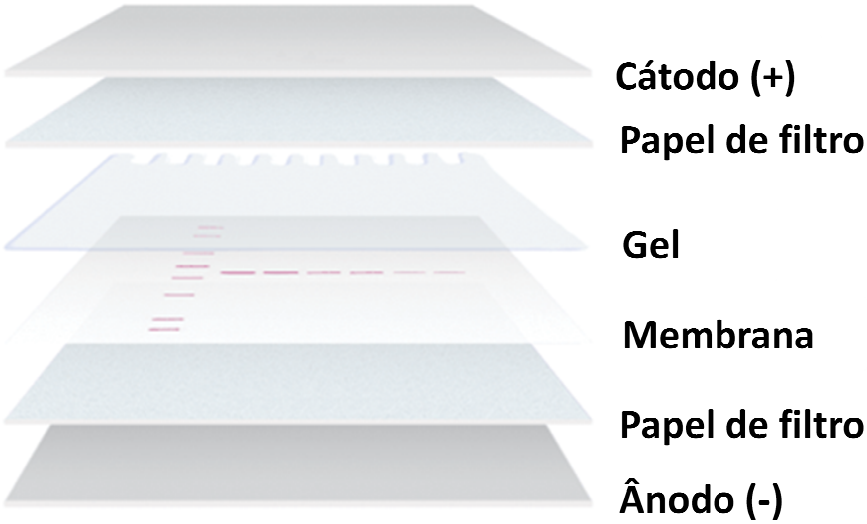


Figura 9. Representação esquemática da estrutura do "sanduiche" para o processo de transferência protéica do gel para a membrana (http://www.bio-rad.com/en-us/applications-technologies/protein-blotting-methods).

O sanduiche foi colocado no sistema de transferência *Mini Trans-Blot Cell* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA) contendo tampão de transferência e submetido a uma diferença de voltagem de 120 V por 90 minutos

Após o término da transferência a membrana de nitrocelulose (PerkinElmer, Waltham, MA) foi colocada no shaker (agitador) e lavada com TBS – Tween por 3 vezes. Foi realizado então o bloqueio da membrana com leite diluído em TBS – Tween (5%) por 60 minutos, sendo a membrana em seguida lavada com TBS – Tween por 3 vezes.

A membrana foi incubada a 4 ºC "*overnight*" com o anticorpo policlonal específico para o TRPM8 de coelho (1:1.000; Abcam, Cambridge, MA). A membrana foi então lavada com TBS – Tween por 3 vezes e incubada com o anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugado a peroxidade (1:3.000; Abcam, Cambridge, MA) por 120 minutos no agitador de placas (shaker), sendo a membrana lavada em seguida com TBS – tween por 3 vezes.

A membrana foi então revelada em sistema de fotodocumentação *ChemiDoc*^{TM} XRS+ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA), que consiste em um sistema de imagens de gel, incluindo câmara escura, transiluminador UV, iluminação epi-branco e câmera.

Para a revelação, as membranas de western blot foram colocadas dentro da câmara do sistema de fotodocumentação. Em seguida, o sistema de detecção para western blot *Luminata Forte* (EMD Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) foi adicionado sobre a membrana, iniciando-se o processo de captura de imagem conforme pré-estabelecido no software.

O sistema de fotodocumentação é controlado pelo software *Image Lab*™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA), que suporta vários métodos de detecção, incluindo fluorescência, quimiofluorescência, densitometria, colorimetria e quimiluminescência. A colorimetria foi utilizada para a detecção do marcador de peso molecular, e a quimiofluorescência, para a detecção da fluorescência emitida quando o sistema de detecção para western blot (substrato) entra em contato com o anticorpo secundário.

Dessa forma, foram detectadas bandas correspondentes às proteínas marcadas, e os pesos moleculares dessas proteínas foram determinados com referência nos marcadores de peso molecular *Precision Plus Protein Kaleidoscope* ou *Dual Color* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA) (Figura 10).

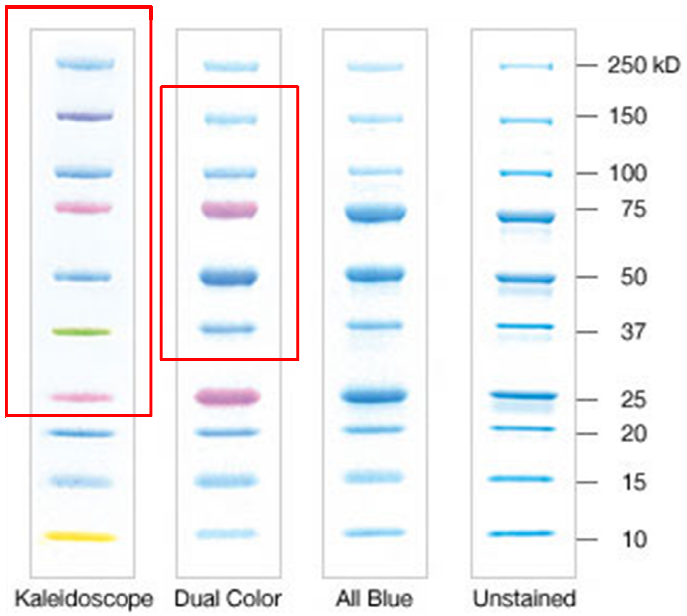


Figura 10. Marcadores de peso molecular utilizados nos experimentos de Western blot (http://www.bio-rad.com/en-us/sku/161-0375-precision-plus-protein-kaleidoscope-standards). Os retangulos indicam as bandas do padrão de peso molecular visualizadas nas membranas.

4.3 Ensaios *in vitro*

4.3.1 Ensaios em átrios isolados de ratos SHR e WKY

Com a finalidade de avaliar a ação do OEMV, da rotundifolona e do mentol sobre o componente cardíaco da pressão arterial foram utilizadas preparações de átrios direito (com atividade espontânea) e esquerdo (estimulado eletricamente), isolados de ratos SHR e WKY, nos quais foram avaliadas a freqüência e a força de contração respectivamente.

4.3.1.1 Obtenção das preparações de átrios isolados de ratos SHR e WKY

Os átrios foram isolados de acordo com a técnica descrita por Nasa e colaboradores (1992). Os ratos foram eutanasiados, o tórax foi aberto e, em seguida, os átrios esquerdo e direito foram isolados rapidamente e suspensos por hastes metálicas em cubas contidas em banho para órgão contendo solução fisiológica de Krebs Henseileit (Tabela 2) a 37ºC e foram gaseificados com carbogênio.

Cada átrio foi mantido a uma tensão inicial de 0,55 g por 30 minutos. Durante este tempo de estabilização, o meio nutritivo foi trocado a cada 10 minutos. Os átrios esquerdos não apresentam nodo sino-atrial, por isso foram estimulados eletricamente de forma contínua (estimulação de campo), usando o estimulador elétrico *Panlab Harvard Apparatus* LE12406 TC/OM (ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia), com pulsos retangulares com uma frequência de 3 Hz, duração de 3 ms e uma voltagem de 1,5 vezes o limiar de excitação.

Os átrios direitos foram montadas no mesmo banho para órgão, entretanto não foram estimulados eletricamente, permitindo a medidas das contrações espontâneas desencadeados pelo nodo sino-atrial. Os parâmetros cardíacos foram registrados pelo sistema de aquisição de dados *Panlab Harvard Apparatus* (ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia).

4.3.1.2 Protocolos experimentais utilizando átrios isolados de ratos SHR e WKY

4.3.1.2.1 Avaliação da resposta induzida por OEMV, rotundifolona ou mentol

Para investigar as respostas induzidas por OEMV ou rotundifolona ou mentol sobre o coração de ratos SHR e WKY, foram utilizados átrios direito e esquerdo. Esses tecidos foram submetidos a um período de estabilização, e em seguida as substâncias testadas foram adicionadas ao banho, de forma isolada, sendo avaliadas as alterações obtidas na freqüência cardíaca (efeito cronotrópico) e na força de contração (efeito inotrópico) (Figura 11).

O efeito inotrópico foi calculado a partir da amplitude de contração (tensão em g) do átrio esquerdo antes (controle) e após a adição de cada concentração da substância. O efeito cronotrópico foi avaliado no átrio direito, que apresenta o nodo sino atrial. A frequência (batimentos/min) foi registrada antes (controle) e após a adição de cada concentração da substância.

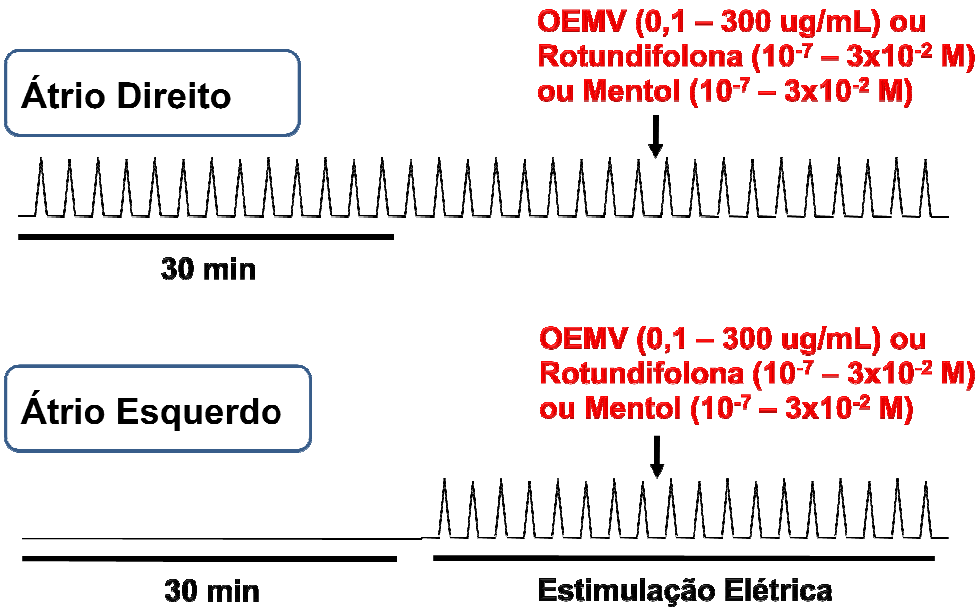


Figura 11. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta induzida por OEMV ou rotundifolona ou mentol em átrio direito (acima) ou átrio esquerdo (abaixo) isolados de ratos WKY e SHR.

4.3.2 Ensaios em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY

Com a finalidade de investigar a ação do OEMV, da rotundifolona e do mentol sobre o componente vascular da pressão arterial foram utilizadas preparações de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY, nas quais foram avaliadas a resposta vasorrelaxante induzida pelas substâncias testadas.

4.3.2.1 Obtenção das preparações de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY

Os ratos SHR e WKY foram eutanasiados e, em seguida, foi realizada uma incisão no abdome do animal, sendo a artéria mesentérica superior identificada, removida e colocada em uma placa de Petri contendo uma solução de Tyrode (Tabela 3) a uma temperatura de 37° ± 1℃ e gaseificada com uma mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2).

A artéria mesentérica superior foi livre de tecidos adjacentes e seccionada em anéis de 2 a 3 mm, que foram mantidos em cubas para órgãos isolados, contendo 10 mL de solução fisiológica de Tyrode com pH 7,4 a uma temperatura de 37 ± 1℃ e gaseificada com uma mistura carbogênica.

Os anéis foram fixados a um transdutor de força (ADInstruments), o qual era conectado a um amplificador (ADInstruments), que estava conectado a um sistema de aquisição de dados (ADInstruments) para registro das tensões isométricas do músculo.

Os anéis foram submetidos a uma tensão constante de 0,75 g por um período de estabilização de 60 min, sendo a solução nutritiva substituída a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Os anéis sem endotélio foram obtidos mecanicamente através do atrito entre as hastes metálicas e as paredes internas do vaso. A presença de endotélio foi verificada pelo relaxamento dos anéis após a adição de 10 µM de ACh sobre o componente tônico da contração induzida por 10 µM de FEN (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Foram considerados com endotélio funcional os anéis com relaxamento superior a 90% e sem endotélio funcional os anéis com relaxamentos inferiores a 10 %. Anéis com relaxamentos entre 10 e 90% foram descartados.

4.3.2.2 Protocolos experimentais utilizando artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY

4.3.2.2.1 Avaliação da resposta contracturante induzida por fenilefrina

Para avaliar a resposta contracturante induzida por FEN em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY sem endotélio funcional, concentrações crescentes de FEN (1 nM a 10 µM) foram adicionadas de forma cumulativa, obtendo-se dessa forma as curvas concentração-resposta para esse agonista, sendo as respostas obtidas em ratos hipertensos comparada com aquelas obtidas em seus controles normotensos (Figura 12).

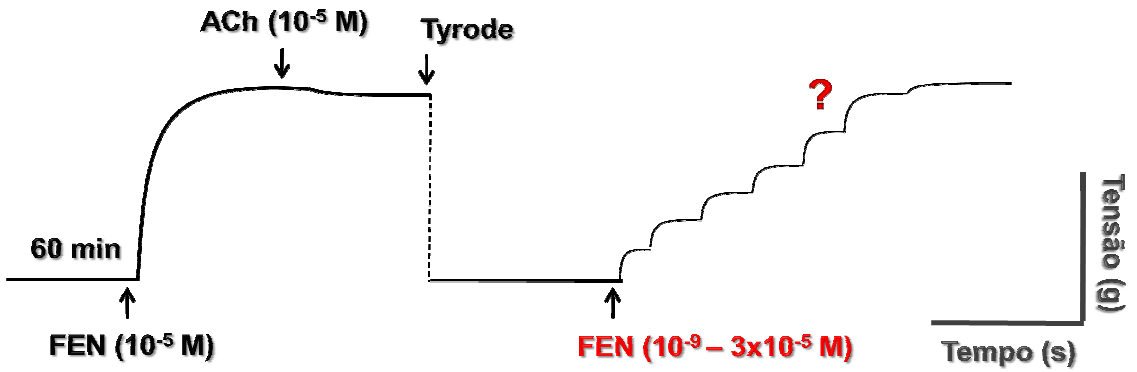


Figura 12. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta induzida por concentrações crescentes de fenilefrina (FEN) em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR.

4.3.2.2.2 Avaliação da resposta vasorrelaxante induzida por OEMV, rotundifolona ou mentol

As resposta vasorrelaxantes induzidas por rotundifolona ou mentol em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR sem endotélio funcional foram comparadas em contrações induzidas por 1 µM ou 10 µM de FEN.

Baseado nessas respostas, os anéis de artérias mesentéricas superiores de ratos WKY e SHR com e sem endotélio vascular funcional foram pré-contraídos com 1 µM de FEN, e sob o platô das contrações foram adicionadas concentrações crescentes de OEMV (0,1; 1; 10; 100; 200 e 300 µg/mL) ou rotundifolona ou mentol (10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4}, 3 x 10^{-4}, 10^{-3} e 3 x 10^{-3} M) ou veículo, de forma cumulativa, obtendo-se curvas concentração-resposta. O relaxamento foi expresso como percentagem de inibição da contração induzida por FEN. As respostas na ausência do endotélio foram comparadas com as obtidas na presença do endotélio, e as respostas em SHR foram comparadas com as obtidas em WKY (Figura 13).

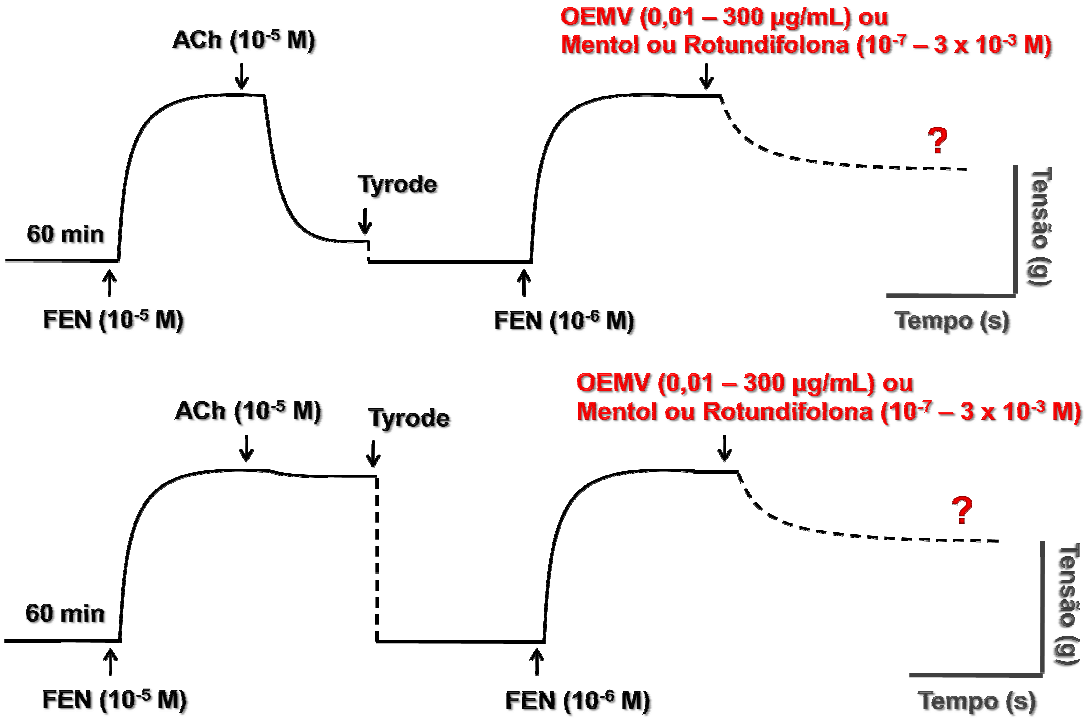


Figura 13. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta induzida por OEMV ou rotundifolona ou mentol nas contrações induzidas por FEN em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR na presença (acima) ou ausência de endotélio vascular funcional (abaixo).

4.3.2.2.3 Avaliação da participação de canais TRP na resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona ou mentol

Para avaliar os subtipos de canais TRP envolvidos nas respostas vasorrelaxantes induzidas por rotundifolona ou mentol, os anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY sem endotélio funcional foram previamente incubados por 30 minutos com vermelho de rutênio (10 µM), bloqueador não-seletivo de TRPV, TRPC3, TRPM6 e TRPA1; La^{3+} (100 µM), bloqueador não-seletivo de TRPV, TRPC3, TRPC6, TRPM3, 4 e 7; Gd^{3+} (25 µM), bloqueador de TRPC1, TRPC3, TRPC6 e TRPV4; Mg^{2+} (2,25 mM), bloqueador do TRPM3, 6 e 7; BCTC (1 ou 10 µM), bloqueador de TRPV1 e TRPM8 (BEHRENDT et al., 2004; CLAPHAM et al., 2005; MCKEMY, 2005; REUBISH et al., 2009; MALKIA et al., 2009) e AMTB (1 µM), bloqueador seletivo do TRPM8 (LASHINGER et al., 2008; MCKEMY, 2010).

Em seguida os anéis foram pré-contraídos com FEN, e sob o platô foram adicionadas concentrações crescentes de rotundifolona ou mentol (10^{-7} a 3×10^{-2} M) de forma cumulativa, obtendo-se as curvas concentração-resposta. As respostas obtidas na presença dos bloqueadores foram comparadas com aquelas obtidas na ausência dos bloqueadores. O relaxamento foi expresso como a percentagem de inibição da contração induzida por FEN (Figura 14).

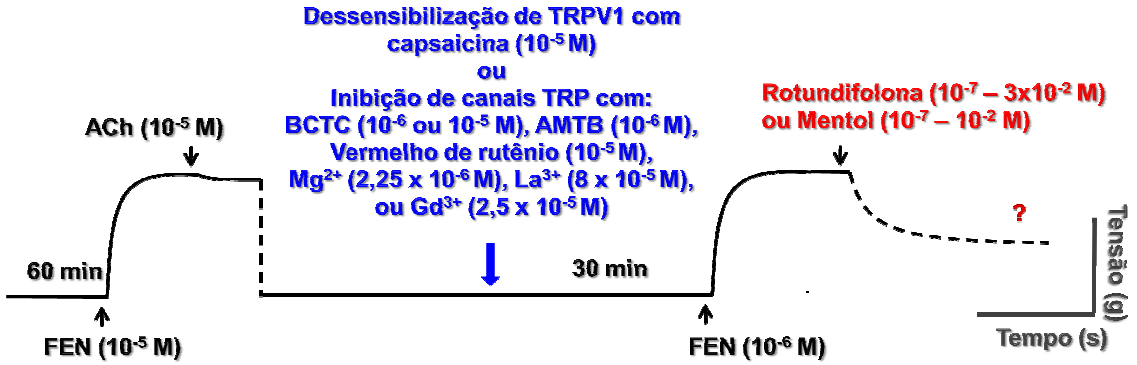


Figura 14. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação da participação de canais TRP na resposta induzida por rotundifolona ou mentol em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR na ausência de endotélio vascular funcional.

4.3.2.2.4 Avaliação da participação de canais TRPV1 na resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona ou mentol

A avaliação da participação do TRPV1 na resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona ou mentol em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY sem endotélio funcional, foi realizada mediante a dessensibilização dos canais TRPV1 presentes nas terminações nervosas. A dessensibilização de canais TRPV1 foi realizada por meio de exposições repetidas e prolongadas a capsaicina, um agonista seletivo desses canais (INOUE et al., 2006; DANNERT et al., 2007).

Para isso foi realizada a pré-incubação dos anéis por 60 min com capsaicina (10 µM), e contração dos anéis com FEN, sendo adicionada a capsaicina sobre o componente tônico dessa contração. Em caso de

relaxamento induzido pela capsaicina, a preparação era lavada e o procedimento descrito anteriormente repetido, até a ausência de relaxamento significativo induzido pela capsaicina. Posteriormente os anéis foram contraídos com FEN e sobre o componente tônico foi adicionado rotundifolona ou mentol de forma cumulativa, obtendo-se as curvas concentração-resposta. As respostas obtidas na presença do bloqueador foram comparadas com aquelas obtidas na ausência do bloqueador (Figura 15).

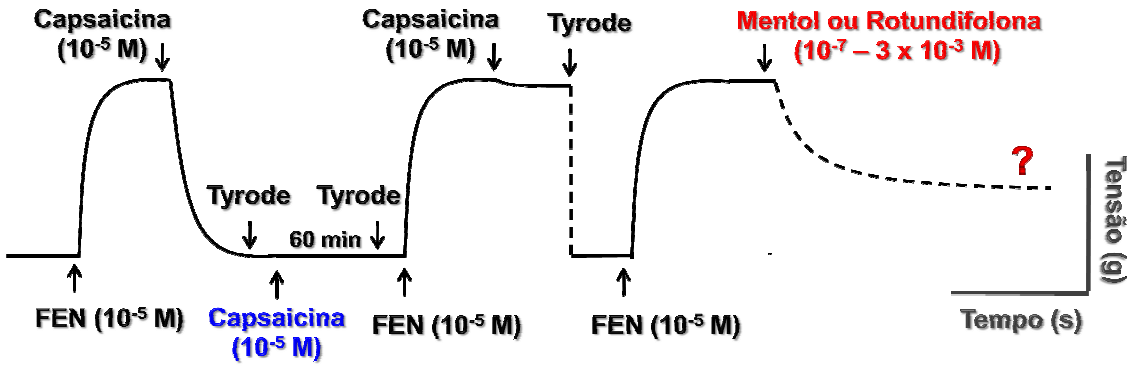


Figura 15. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação da participação do TRPV1 na resposta induzida por rotundifolona ou mentol em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR na ausência de endotélio vascular funcional.

4.3.2.2.5 Avaliação da participação de canais sensíveis a voltagem na resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona ou mentol

Para investigar a participação de canais sensíveis a voltagem na resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona ou mentol, foi utilizada a solução de Tyrode modificada com 60 mM de KCl (Tabela 4), que promove despolarização da membrana plasmática, levando à ativação de canais sensíveis a voltagem, como por exemplo os canais TRP, tais como TRPC1, TRPC3 e TRPC6 (LIU et al., 2012), TRPM4 (LAUNAY et al., 2002), e os canais para Ca^{2+} ativados por voltagem (Ca_V). A ativação de canais sensíveis a voltagem, por sua vez, induz a contração do músculo liso vascular (OLIVEIRA et al., 2006).

Dessa forma, após o período de estabilização e verificação da ausência de endotélio vascular funcional, a solução de Tyrode normal (Tabela 3) foi substituída por uma solução de Tyrode com KCl a 60 mM (Tabela 4). No componente tônico da contração, após 60 minutos, foram adicionadas concentrações crescentes do rotundifolona ou mentol (10^{-7} – 10^{-2} M) de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta. A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento em relação à contração produzida pela solução com 60 mM de KCl, sendo essa resposta comparada com aquela obtida nas contrações induzidas por FEN (Figura 16).

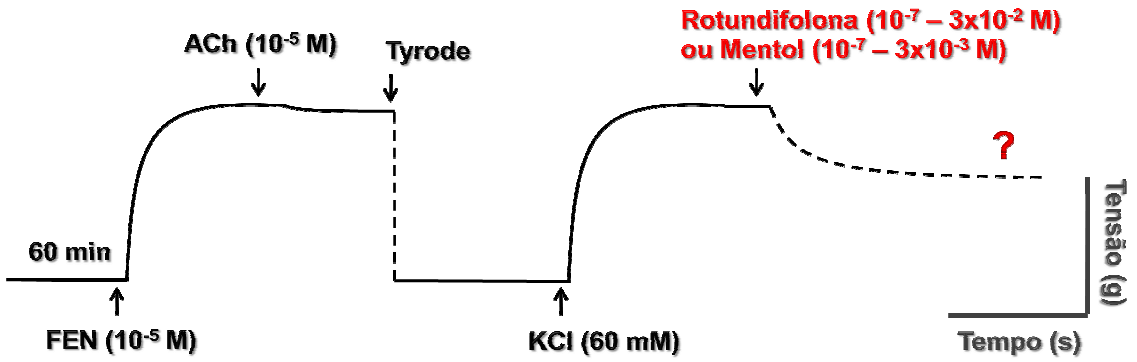


Figura 16. Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da resposta induzida por rotundifolona ou mentol nas contrações induzidas por solução de Tyrode modificado com 60 mM de KCl, em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR ausência de endotélio vascular funcional.

4.3.2.2.6 Avaliação da participação de canais para potássio sensíveis a cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) na resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona ou mentol

Para investigar a participação de canais BK_{Ca} na resposta induzida por rotundifolona ou mentol, os anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY sem endotélio funcional foram previamente incubados por 30 minutos com TEA (1 mM), bloqueador dos canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de larga condutância - BK_{Ca} (COX, 2001).

Em seguida os anéis foram pré-contraídos com FEN, e sob o platô foram adicionadas concentrações crescentes de rotundifolona ou mentol (10^{-7} a 3×10^{-2} M) de forma cumulativa, obtendo-se as curvas concentração-resposta. As respostas obtidas na presença do bloqueador foram comparadas com aquelas obtidas na ausência do bloqueador. O relaxamento foi expresso como a percentagem de inibição da contração induzida por FEN (Figura 17).

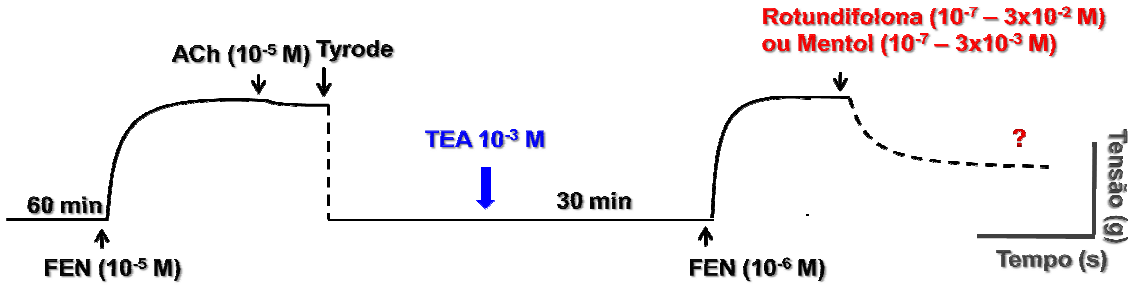


Figura 17. Representação esquemática do protocolo experimental para investigação da participação de canais BK_{Ca} na resposta induzida por rotundifolona ou mentol em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR na ausência de endotélio vascular funcional.

4.3.3 Ensaios em células musculares lisas de aortas de ratos SHR

Com a finalidade de avaliar a ação da rotundifolona na $[Ca^{2+}]_i$ foram utilizadas células musculares lisas vasculares de aortas de ratos SHR.

4.3.3.1 Obtenção das preparações de células musculares lisas de aortas de ratos SHR

As células musculares lisas de aortas de ratos SHR foram obtidas através de cultura por meio da técnica de explantes (KIRSCHENLOHR et al., 1996). Os ratos eram anestesiados, sendo as aortas abdominais removidas, livres de sangue e de tecido adiposo e conjuntivo adjacentes. As aortas eram então colocadas em eppendorfs contendo solução nutritiva de Hanks sem Ca^{2+} estéril (Tabela 6) e levadas para o fluxo laminar.

No fluxo laminar as artérias foram lavadas 2x com solução de Hanks sem Ca^{2+}, e colocadas em uma placa estéril, onde eram abertas longitudinalmente. Nessas condições, a camada interna da artéria (endotélio) era removida com um bisturi, passando-se a lâmina sobre a parte luminal da artéria. Em seguida, as artérias foram lavadas 3x com solução de Hanks sem Ca^{2+} e transferidas para outra placa contendo DMEM + 10 % de SFB, onde foram cortadas em fragmentos com dimensões menores do que 1 mm^2. Esses fragmentos eram transferidos com o auxílio de uma pinça esterilizada para frascos de cultivo celular (25 mm^2) contendo o assoalho umidificado com DMEM + 10 % de SFB (aproximadamente 2 a 4 fragmentos / cm^2). Os frascos eram então levemente inclinados para permitir que os fragmentos ficassem aderidos ao assoalho. Em seguida, os frascos com os explantes (cobertos cada um com uma gota de DMEM + 10 % de SFB) eram transferidos para a incubadora (37 ℃ / 5% de CO_2).

Após 24 h, eram adicionados, gota a gota, 0,5 - 1 mL de DMEM + 10 % de SFB, até atingir uma altura de 1-2 mm do frasco, sendo os frascos recolocados na incubadora. Após 48h, ou seja, no terceiro dia após o plaqueamento, era removida a metade do volume do meio e adicionada a mesma quantidade de DMEM + 20 % de SFB pré-aquecido, sendo também removidos os explantes que não estavam aderidos.

Esse mesmo procedimento foi repetido a cada 2 dias com DMEM + 20 % de SFB até que, utilizando um microscópio invertido, fosse observado que a quantidade de células ao redor dos explantes seria de 50 - 70% do assoalho ocupado por células (de duas a três semanas a partir da migração inicial). Nesse momento os explantes eram removidos, o meio era trocado e os frascos eram transferidos novamente para a incubadora, sendo realizada troca de meio a cada 2 dias, até atingir a quantidade de 80 % do assoalho da placa preenchido com células.

As células aderidas no frasco para cultivo celular em quantidade acima de 80 % foram lavadas 3x com PBS (Tabela 5) e incubadas com 1,5 mL / 25 cm^2 de solução de tripsina / EDTA (0,5 g/L de tripsina + 0,2 g/L de EDTA) por 3 a 4 minutos em incubadora (37 ℃ / 5% de CO_2). Em seguida, os frascos foram

agitados vigorosamente e examinados ao microscópio para confirmar a suspensão das células, sendo adicionada quantidade igual de volume de DMEM + 20 % de SFB para inativar a tripsina.

As células foram então transferidas para um tubo cônico e centrifugadas a 3000 rpm por 3 min (para completa remoção da tripsina). Em seguida, as células foram ressuspensas em DMEM + 20 % de SFB e colocadas em 2 frascos para cultivo celular que foram transferidos novamente para a incubadora. As células nesse estágio eram denominadas células de primeira passagem (P1) e o meio era trocado a cada dois dias até que fosse atingida quantidade de células acima de 80 % do frasco, quando então era realizada outra passagem.

4.3.3.2 Protocolos experimentais utilizando células musculares lisas de aortas de ratos SHR para detecção da $[Ca^{2+}]_i$

Para a realização dos protocolos experimentais, as células na terceira passagem (P3) aderidas nos frascos para cultivo celular e cuja ocupação do assoalho estivesse em quantidade acima de 80 % foram suspendidas conforme o procedimento descrito acima.

A suspensão das células teve a tripsina inativada pela adição de igual volume de DMEM + 20 % de SFB. As células foram então transferidas para um tubo cônico e centrifugadas a 3000 rpm por 3 min, sendo ressuspensas em solução de Hanks sem cálcio e novamente centrifugadas para completa remoção do meio contendo tripsina.

Após o procedimento acima, as células foram ressuspensas em solução de Hank com Ca^{2+} (Tabela 7) e uma alíquota foi utilizada para contagem de células utilizando a câmara de Neubauer, sendo a concentração celular ajustada para $5x10^5$ cél/mL.

Nessas condições, uma parte dos miócitos vasculares foi incubada com com 7-AAD (7-aminoactinomicina D) para investigação da viabilidade celular ou com as drogas a serem testadas para investigar a presença de autofluorescência.

As células restantes foram divididas em duas partes. Uma parte dos miócitos vasculares foi incubada com Fluo-4 (Ester AM) por 30 min e o excesso removido por centrifugação (3000 rpm / 3 min), sendo essas células denominadas de células marcadas. Outra parte das células foi mantida sem incubação com Fluo-4 (Ester AM), sendo estas denominadas de células não-marcadas.

As células marcadas foram distribuídas em tubo para citômetro, tratadas com veículo ou rotundifolona, fixadas com paraformaldeído a 2 % e lidas em citômetro de fluxo *BD FACS Canto II*^{TM} (Figura 24) para medida da intensidade de fluorescência de Fluo-4 (Ester AM) (excitação a 485 nm, emissão a 520 nm). Os dados foram adquiridos e analisados no *FACSDiva* versão 6.1.3 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA).

O protocolo utilizado consistiu na incubação das células marcadas com veículo ou rotundifolona (10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4} ou 10^{-3} M), sendo lidas imediatamente ou após 3, 6 ou 9 min da incubação com esse monoterpeno. As células marcadas também foram incubadas por 3, 6 ou 9 min com veículo ou rotundifolona (10^{-3} M) na ausência ou presença de BCTC (10 µM), bloqueador de canais TRPM8 e TRPV1, ou AMTB (1 µM), bloqueador seletivo de canais TRPM8. Nessas condições foi avaliado o aumento de fluorescência induzida pelo Fluo-4 (Ester AM), que corresponde à detecção da $[Ca^{2+}]_i$ nos miócitos vasculares.

4.4 Análise estatística

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m.). As curvas concentração-resposta foram ajustadas segundo equação de Hill. Os parâmetros analisados foram a eficácia farmacológica, observada por meio da resposta máxima induzida pela substância ($E_{máx}$) e potência farmacológica, analisada por meio da concentração da substância que induz 50% do seu efeito máximo (CE_{50}). A avaliação da potência farmacológica das substâncias isoladas (mentol e rotundifolona) foi expressa na forma de logaritmo negativo da CE_{50} (pD_2).

As análises estatísticas foram feitas utiliando o teste "*t"* de *Student* não pareado ou análise de variância ANOVA "two way" (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni. O teste "*t"* de *Student* foi utilizado para a comparação entre dois valores de CE_{50} e entre dois valores de $E_{máx}$. A análise de variância ANOVA "*two way*" (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni foi utilizada para as análise ponto-a-ponto entre várias médias e para as comparações nos testes *in vivo*. Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$. O programa utilizado para análise dos dados foi o *Graph Pad Prism* 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Ensaios *in vivo*

5.1.1 Efeitos hipotensor e bradicárdico em ratos SHR e WKY

5.1.1.1 Efeitos hipotensor e bradicárdico induzidos pelo OEMV

O OEMV induziu efeito hipotensor e bradicárdico em ratos WKY e SHR (Tabela 8, Figuras 18, 19 e 20), de forma dependente de dose. A redução na PAD foi significativamente maior do que a redução na PAS, sugerindo uma maior ação sobre o componente vascular da pressão arterial. Além disso, não foi observada diferença significativa na resposta observada em animais hipertensos em relação aos seus respectivos controles normotensos. A administração do veículo não alterou significativamente a pressão arterial e freqüência cardíaca dos animais (Figura 21).

Tabela 8. Valores de $E_{máx}$ e DE_{50} para a resposta hipotensora e bradicárdica induzida por OEMV em ratos WKY e SHR.

	WKY		**SHR**	
	$E_{máx}$ (%)	**DE_{50} (mg/kg)**	**$E_{máx}$ (%)**	**DE_{50} (mg/kg)**
Pressão Sistólica	32,3 ± 2,7	7,52 ± 1,23	46,9 ± 1,4	9,09 ± 1,31
Pressão Diastólica	83,4 ± 3,4	6,72 ± 0,83	71,9 ± 8,4	7,30 ± 1,02
Pressão Média	56,0 ± 2,6	6,05 ± 0,87	57,6 ± 5,3	6,95 ± 1,19
Frequência Cardíaca	90,1 ± 1,2	4,52 ± 0,38	87,6 ± 2,3	4,91 ± 0,80

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA “two way” seguida do pós-teste de Bonferroni, *$p < 0,05$ (SHR *vs* WKY).

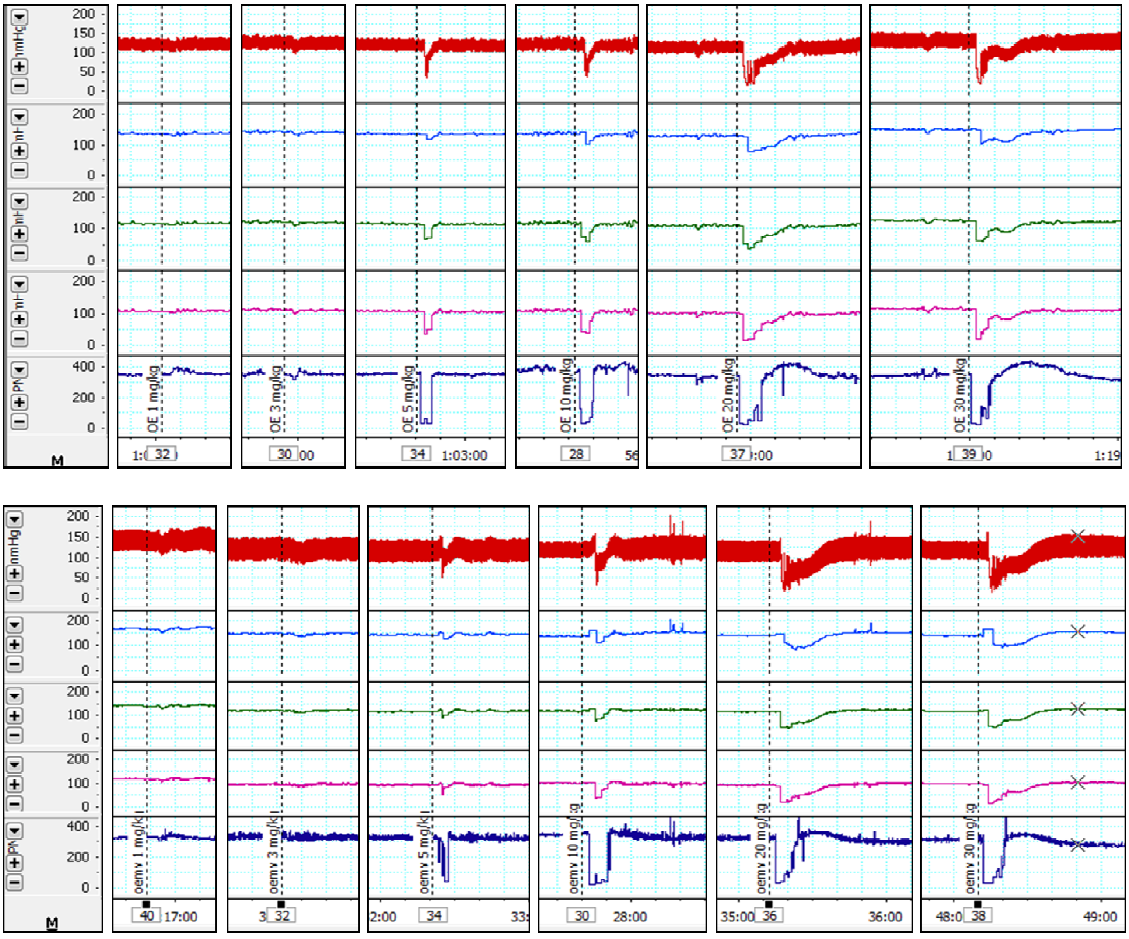


Figura 18. Registro original mostrando o efeito de OEMV (1, 3, 5, 10, 20 e 30 mg/kg) em ratos não anestesiados WKY (acima) e SHR (abaixo). As linhas tracejadas indicam o momento de adição das doses de OEMV.

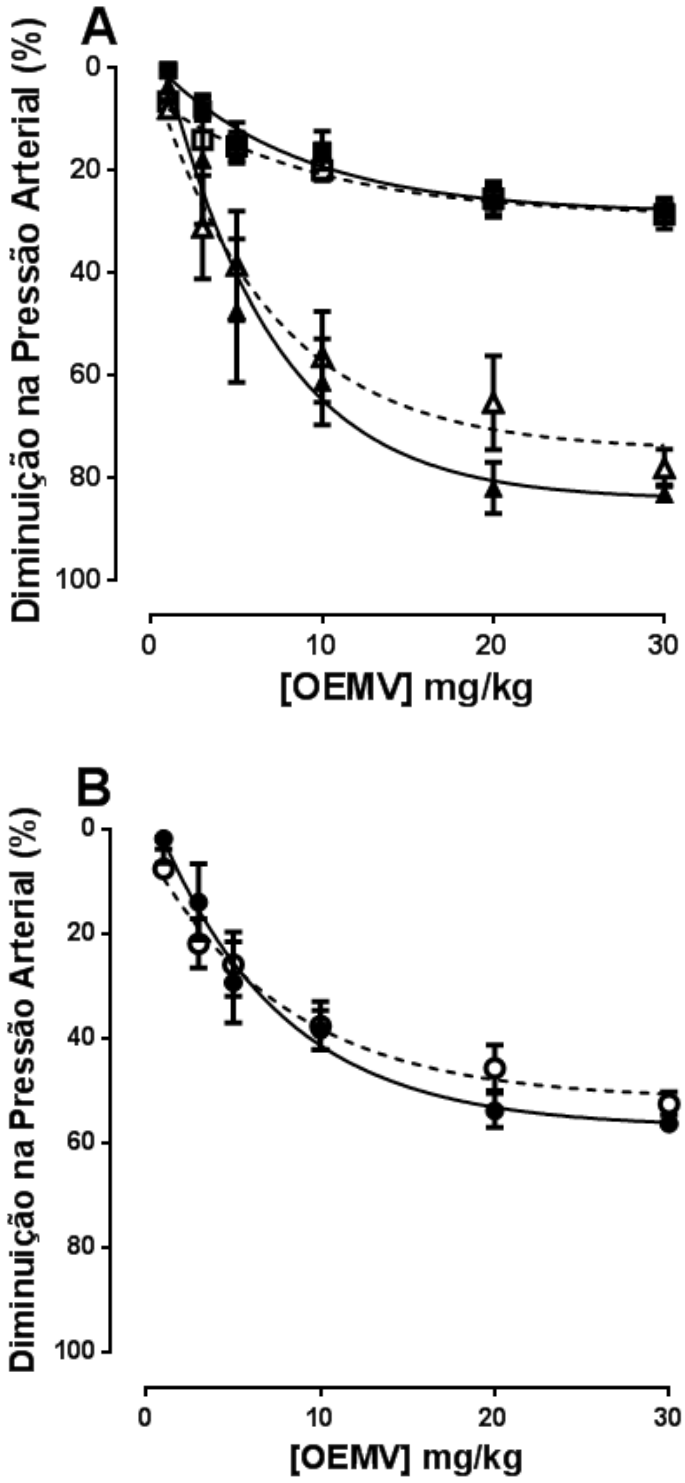


Figura 19. Efeito hipotensor induzido por OEMV em ratos WKY e SHR. (A) Pressão arterial sistólica (■) e diastólica (▲) de ratos WKY (linha contínua, n = 6) e pressão arterial sistólica (□) e diastólica (Δ) de SHR (linha tracejada, n = 6). (B) Pressão arterial média de ratos (●) WKY (linha contínua, n = 6) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

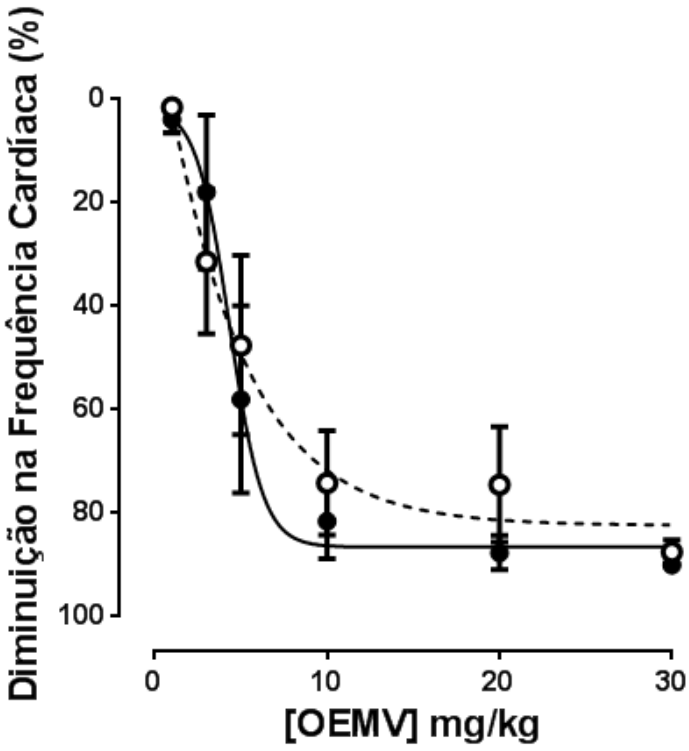


Figura 20. Efeito bradicárdico induzido por OEMV em ratos WKY e SHR. Curvas dose-resposta mostrando diminuição induzida por OEMV na frequência cardíaca de ratos (●) WKY (linha contínua, n = 6) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

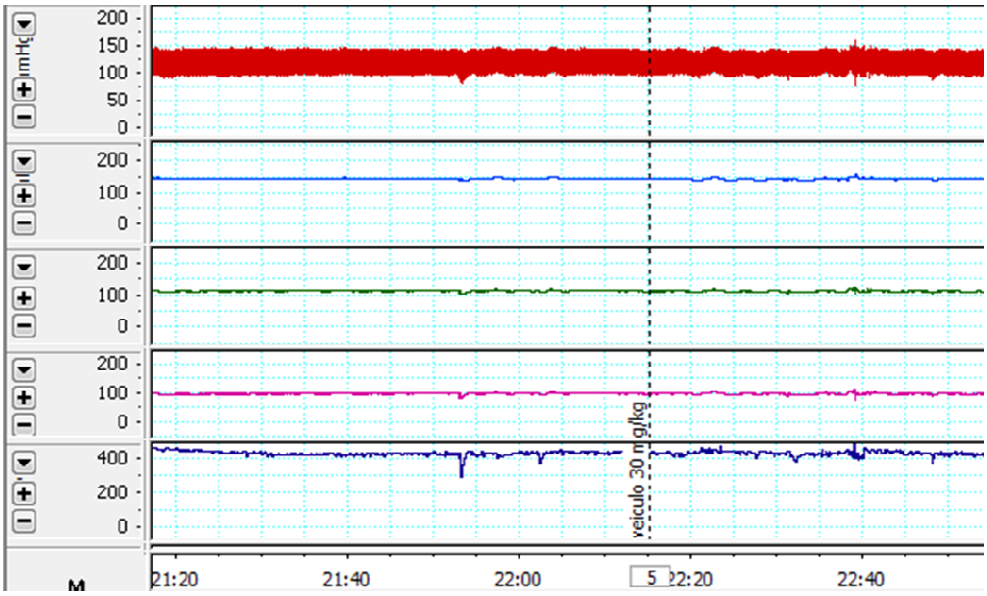


Figura 21. Registro original mostrando o efeito de veículo na pressão arterial e freqüência cardíaca de ratos não anestesiados.

5.1.1.2 Efeitos hipotensor e bradicárdico induzidos pela rotundifolona

A rotundifolona induziu efeito hipotensor e bradicárdico em ratos WKY e SHR (Tabela 9, Figuras 22, 23 e 24), de forma dependente de dose. A redução na PAD foi significativamente maior do que a redução na PAS, sugerindo uma maior ação sobre o componente vascular da pressão arterial. Além disso, as respostas induzidas na PAS e PAM, bem como na FC foram significativamente mais potentes (aproximadamente 0,3 vezes) em animais hipertensos em relação aos seus respectivos controles normotensos. Entretanto, a diminuição na PAD induzida por rotundifolona foi semelhante em ratos SHR e WKY, não havendo diferença significativa entre as respostas observadas.

Tabela 9. Valores de $E_{máx}$ e DE_{50} para a resposta hipotensora e bradicárdica induzida por rotundifolona em ratos WKY e SHR.

	WKY		**SHR**	
	$E_{máx}$ (%)	**DE_{50} (mg/kg)**	**$E_{máx}$ (%)**	**DE_{50} (mg/kg)**
Pressão Sistólica	32,3 ± 2,7	15,68 ± 1,43	46,9 ± 1,4	11,30 ± 0,87 (*)
Pressão Diastólica	83,4 ± 3,4	16,50 ± 1,36	71,9 ± 8,4	12,06 ± 1,00
Pressão Média	56,0 ± 2,6	15,34 ± 1,27	57,6 ± 5,3	12,20 ± 1,37 (*)
Frequência Cardíaca	88,2 ± 1,5	10,28 ± 0,46	89,7 ± 1,7	8,63 ± 1,03 (*)

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA “two way” seguida do pós-teste de Bonferroni, *$p < 0,05$ (SHR *vs.* WKY).

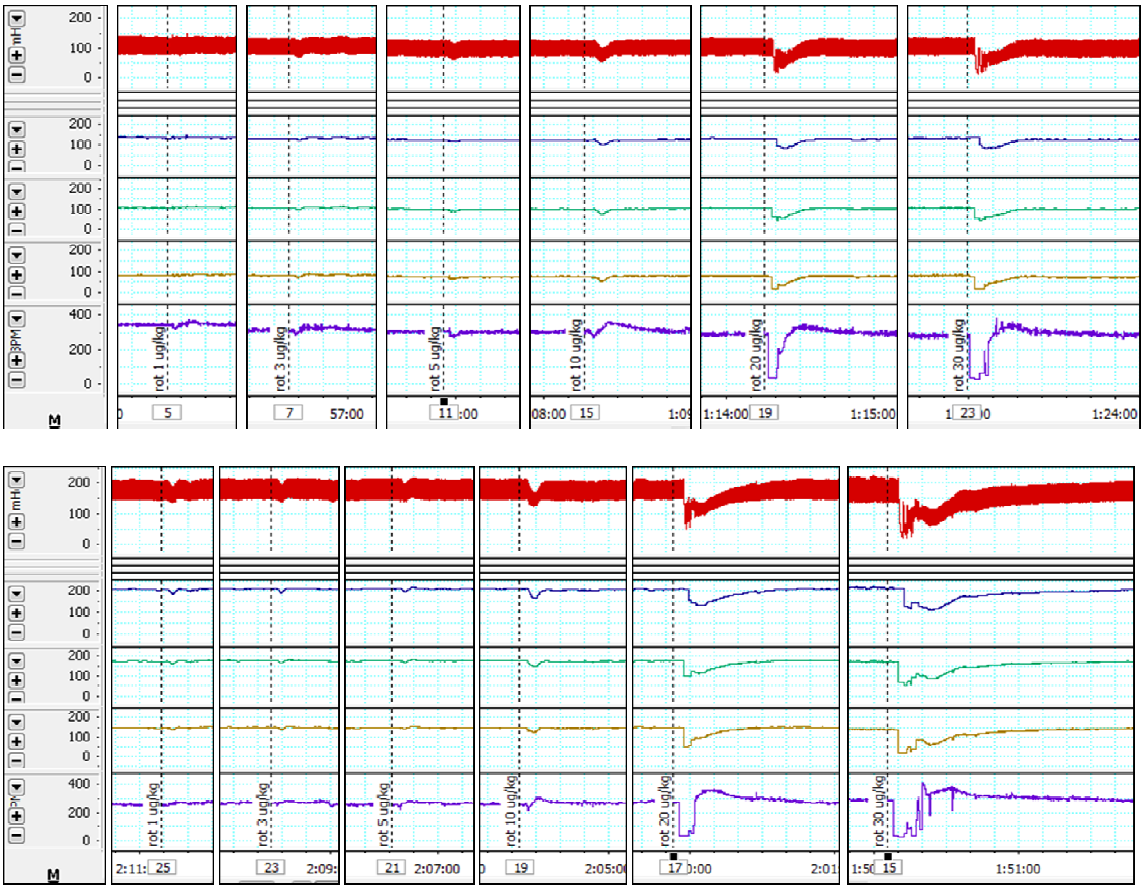


Figura 22. Registro original mostrando o efeito de rotundifolona (1, 3, 5, 10, 20 e 30 mg/kg) em ratos não anestesiados WKY (acima) e SHR (abaixo). As linhas tracejadas indicam o momento de adição das doses de rotundifolona.

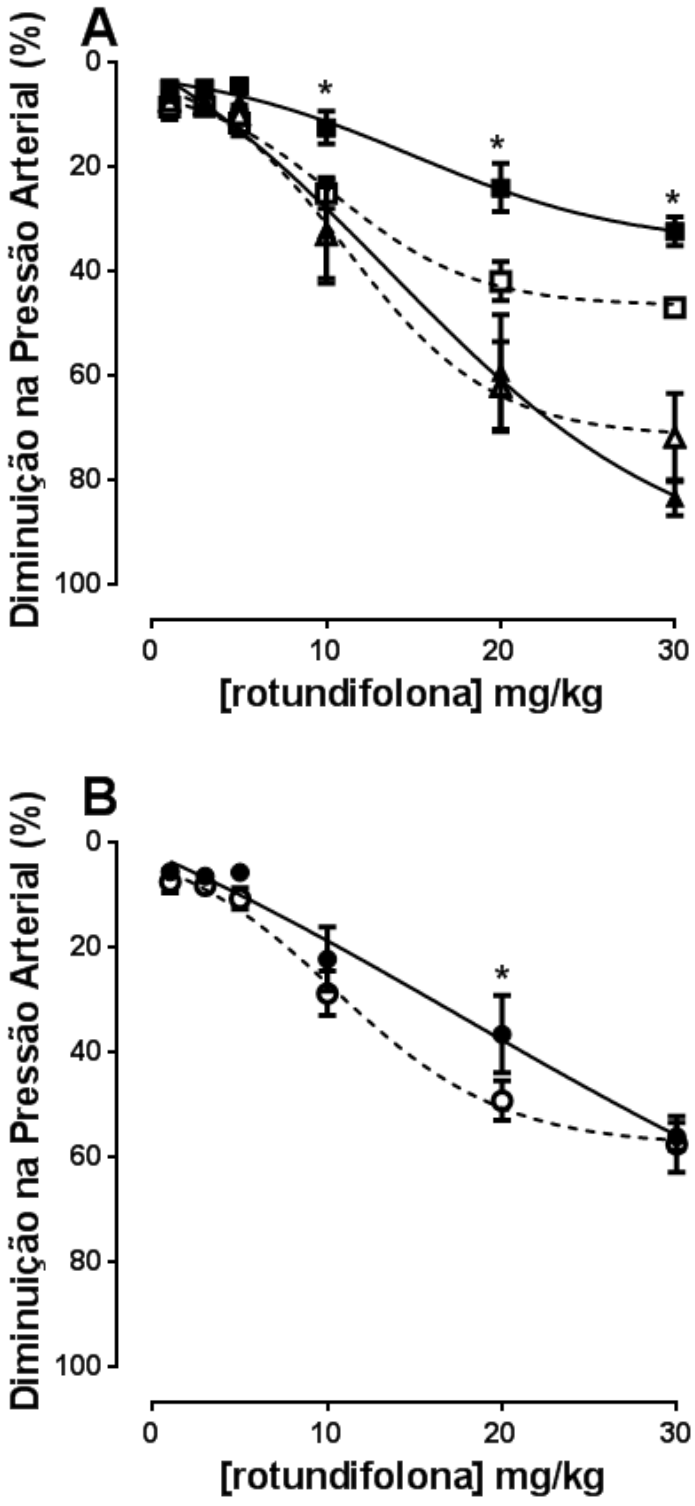


Figura 23. Efeito hipotensor induzido por rotundifolona em ratos WKY e SHR. (A) Pressão arterial sistólica (■) e diastólica (▲) de ratos WKY (linha contínua, n = 7) e pressão arterial sistólica (□) e diastólica (Δ) de SHR (linha tracejada, n = 6). (B) Pressão arterial média de ratos (●) WKY (linha contínua, n = 7) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

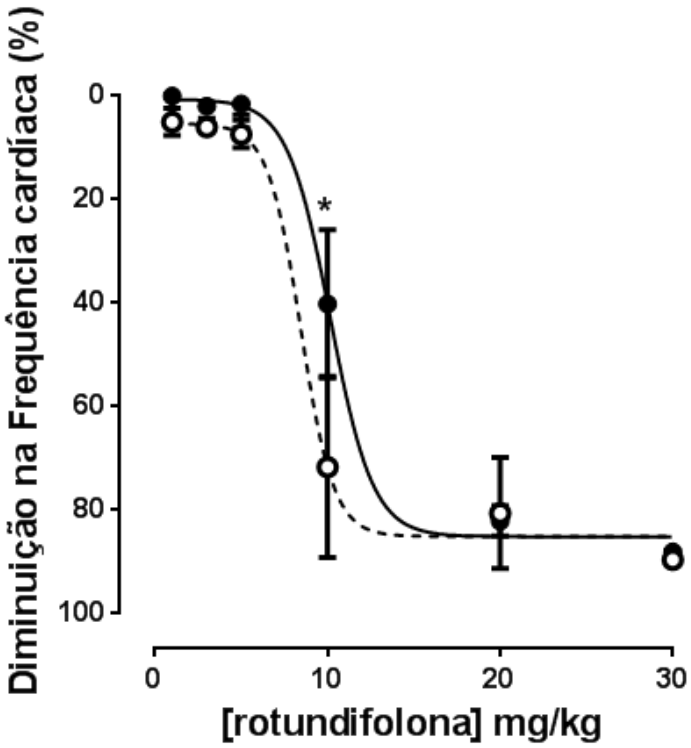


Figura 24. Efeito bradicárdico induzido por rotundifolona em ratos WKY e SHR. Curvas dose-resposta mostrando diminuição induzida por rotundifolona na frequência cardíaca de ratos (●) WKY (linha contínua, n = 7) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

5.1.1.3 Efeitos hipotensor e bradicárdico induzidos por mentol

O mentol induziu efeito hipotensor e bradicárdico em ratos WKY e SHR (Tabela 10, Figuras 25, 26, 27 e 28), de forma dependente de dose. A redução na PAD foi significativamente maior do que a redução na PAS, sugerindo uma maior ação sobre o componente vascular da pressão arterial. Além disso, as respostas induzidas na PAS, PAD e PAM, bem como na FC foram significativamente mais potentes (aproximadamente 4 vezes) em animais SHR em relação aos seus respectivos controles normotensos. Além disso, a dose de 20 mg/kg induziu perfil semelhante ao observado para anestésicos como o tiopental, com ausência de movimentos e de sensibilidade à dor (pinçando a pata e a cauda). A administração do veículo não alterou significativamente a pressão arterial e freqüência cardíaca dos animais (Figura 29).

Tabela 10. Valores de $E_{máx}$ e DE_{50} para a resposta hipotensora e bradicárdica induzida por mentol em ratos WKY e SHR.

	WKY		SHR	
	$E_{máx}$ (%)	DE_{50} (mg/kg)	$E_{máx}$ (%)	DE_{50} (mg/kg)
Pressão Sistólica	34,5 ± 4,9	16,88 ± 3,14	51,2 ± 6,1 (*)	5,85 ± 1,18 (*)
Pressão Diastólica	75,7 ± 9,0	19,88 ± 2,12	84,2 ± 3,2 (*)	3,44 ± 0,36 (*)
Pressão Média	56,0 ± 7,0	18,85 ± 2,40	68,9 ± 1,5 (*)	3,97 ± 0,44 (*)
Frequência Cardíaca	83,4 ± 8,0	21,21 ± 1,64	87,6 ± 3,4 (*)	3,28 ± 0,42 (*)

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA “two way” seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

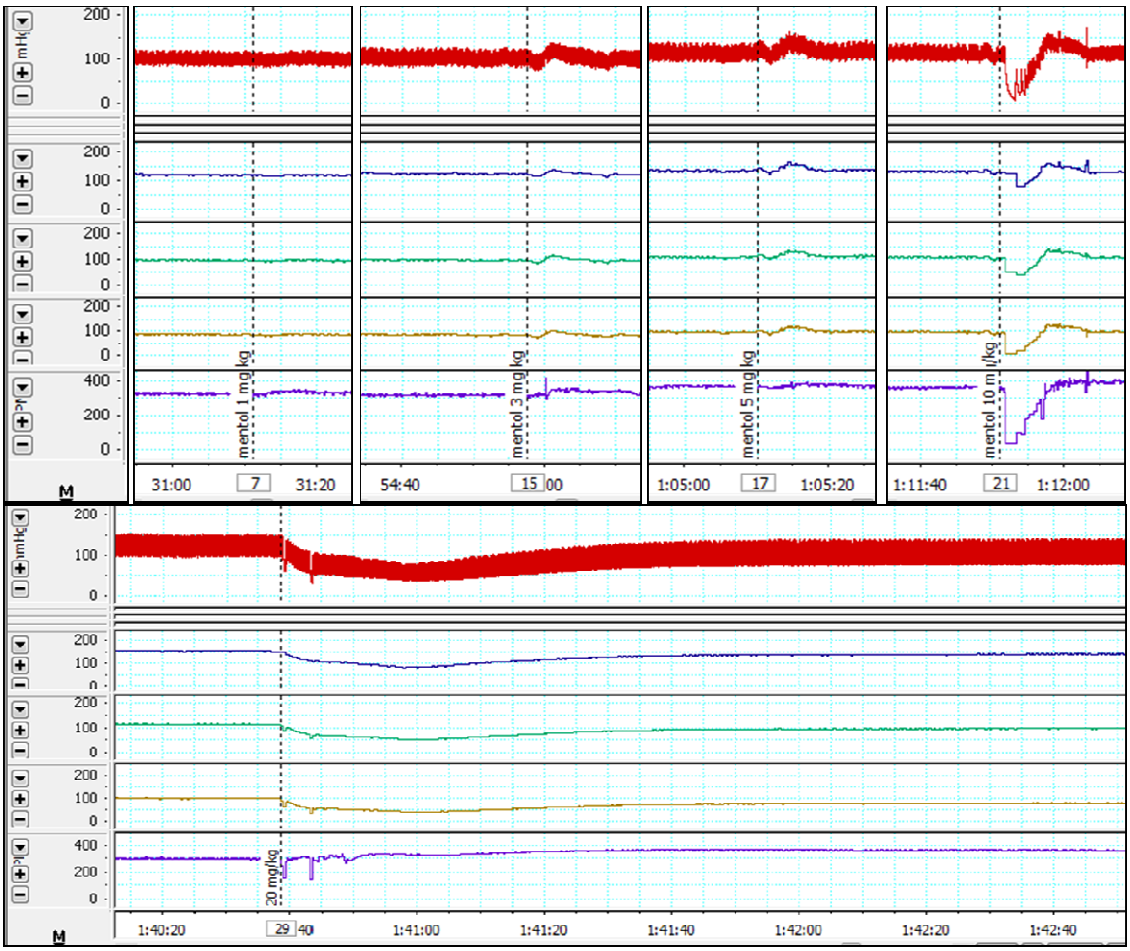


Figura 25. Registro original mostrando o efeito de mentol (1, 3, 5, 10 e 20 mg/kg) em ratos não anestesiados WKY. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das doses de mentol.

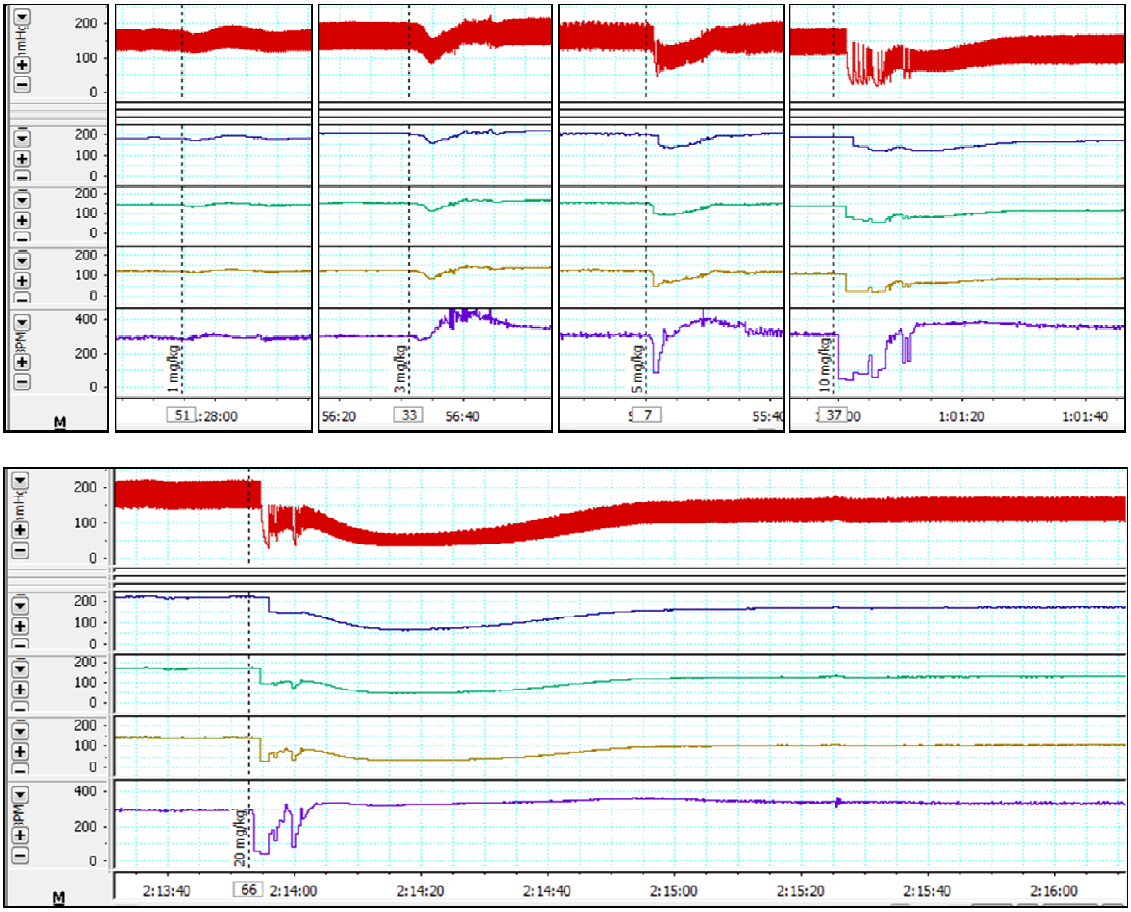


Figura 26. Registro original mostrando o efeito de mentol (1, 3, 5, 10 e 20 mg/kg) em ratos não anestesiados SHR. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das doses de mentol.

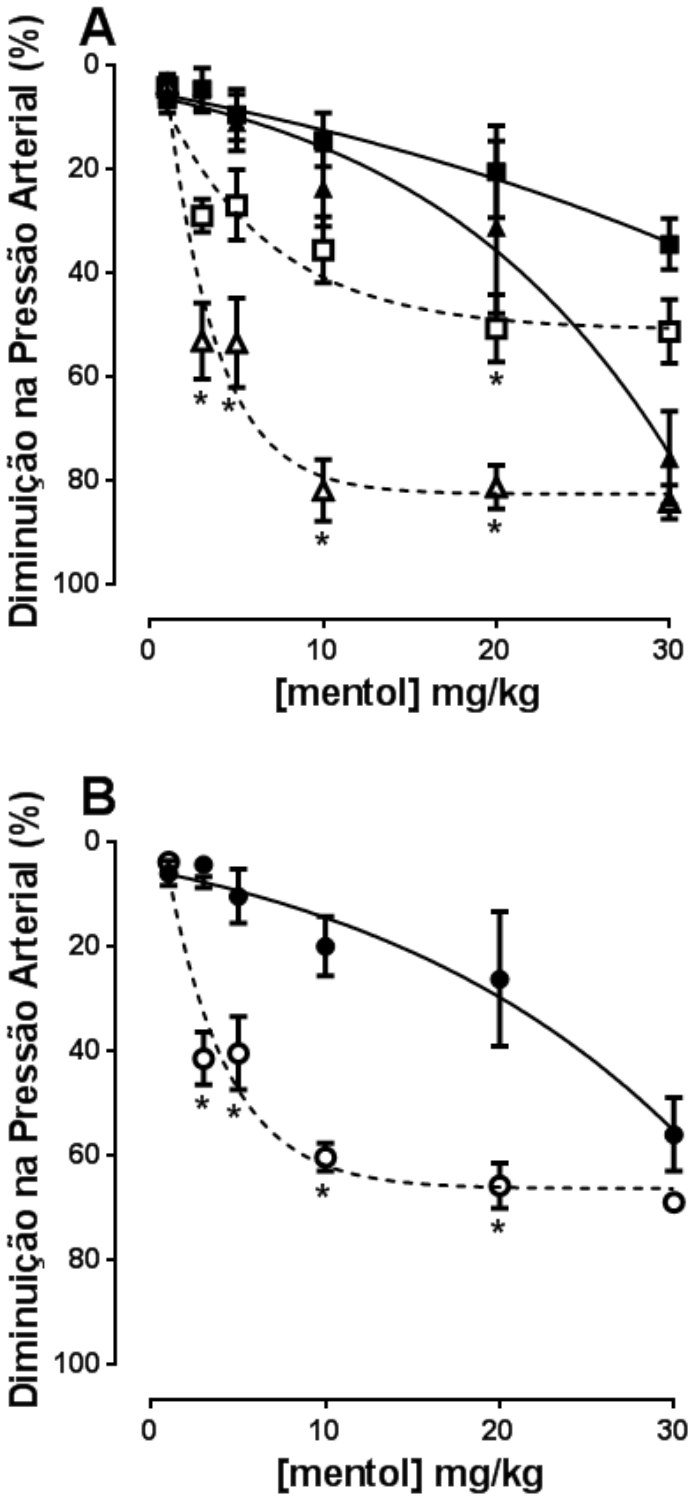


Figura 27. Efeito hipotensor induzido por mentol em ratos WKY e SHR. (A) Pressão arterial sistólica (■) e diastólica (▲) de ratos WKY (linha contínua, n = 6) e pressão arterial sistólica (□) e diastólica (∆) de SHR (linha tracejada, n = 6). (B) Pressão arterial média de ratos (●) WKY (linha contínua, n = 6) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

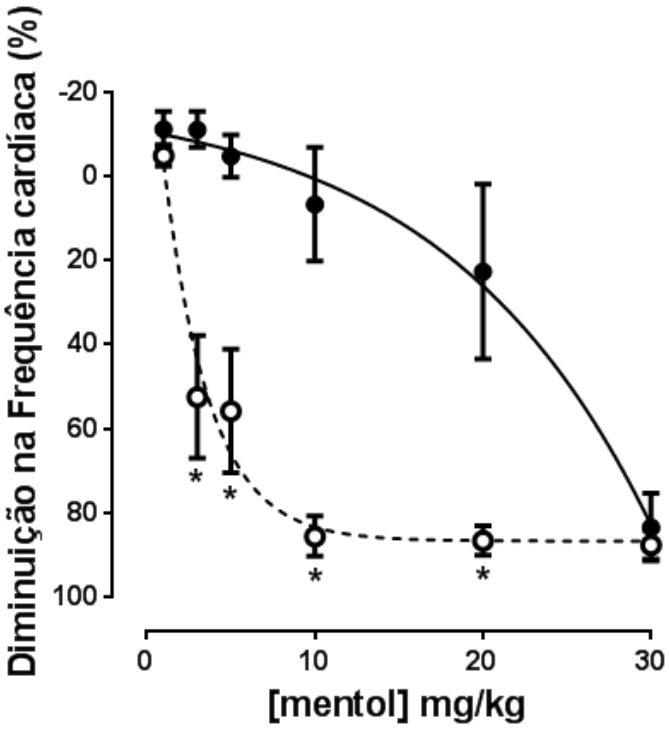


Figura 28. Efeito bradicárdico induzido por mentol em ratos WKY e SHR. Curvas dose-resposta mostrando diminuição induzida por rotundifolona na frequência cardíaca de ratos (●) WKY (linha contínua, n = 6) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

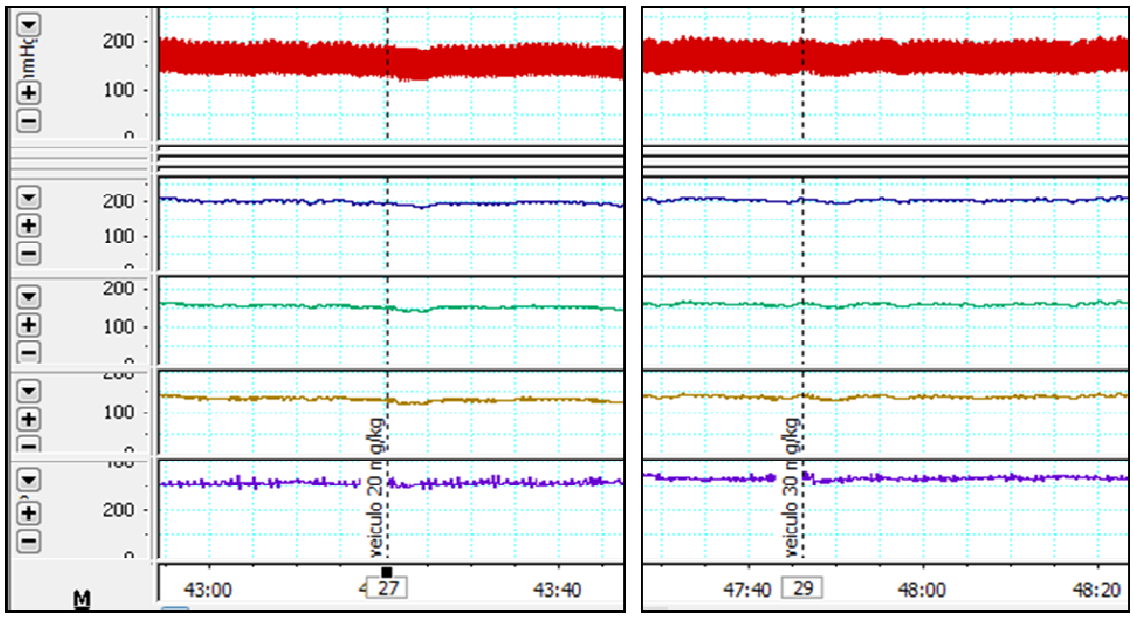


Figura 29. Registro original mostrando o efeito de veículo na pressão arterial e freqüência cardíaca de ratos não anestesiados.

5.2 Ensaios Bioquímicos

5.2.1 Expressão do RNAm do TRPM8 em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR

A análise de expressão de RNAm por meio da técnica de PCR mostrou que o RNAm do canal TRPM8 está expresso em artéria mesentérica superior isolada de rato. A comparação da expressão do canal TRPM8 com a da proteína constitutiva actina, mostrou que em rato SHR há uma expressão aumentada em relação ao rato Wistar (Figura 30).

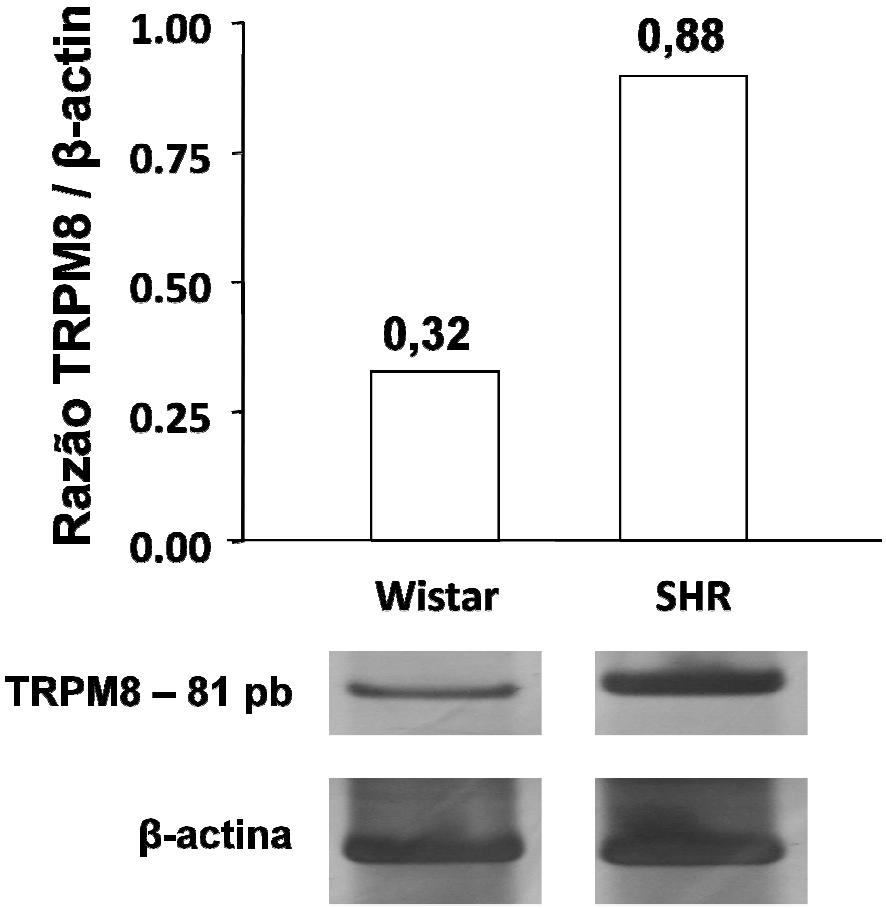


Figura 30. Expressão do RNAm para síntese do TRPM8 em artéria mesentérica de rato SHR e Wistar. Gráfico em barras mostrando a razão entre o RNAm do TRPM8 e o da proteína constitutiva β – actina (n = 2) (acima) e as imagens representativas do gel (abaixo). Os valores da densitometria foram normalizados pelos níveis de β-actina nos mesmos animais.

5.2.2 Expressão protéica dos canais TRPM8 em ratos SHR

5.2.2.1 Expressão protéica dos canais TRPM8 em átrios e ventrículos isolados de ratos SHR e WKY

A análise da expressão protéica utizando Western blot mostrou que o canal TRPM8 está expresso em átrios direito (ATD) e esquerdo (ATE), e ventriculos direito (VD) e esquerdo (VE) de ratos SHR e WKY. A expressão protéica apresentou perfil diferencial entre os tecidos em ratos SHR, sendo observada uma maior expressão nos ventrículos esquerdos, seguidos de ventrículos direitos, átrios esquerdos e átrios direitos, respectivamente (Figura 31). Além disso, os dados mostraram uma expressão aumentada de canais TRPM8 nos ratos SHR em comparação com seus controles normotensos WKY (Figuras 32 e 33).

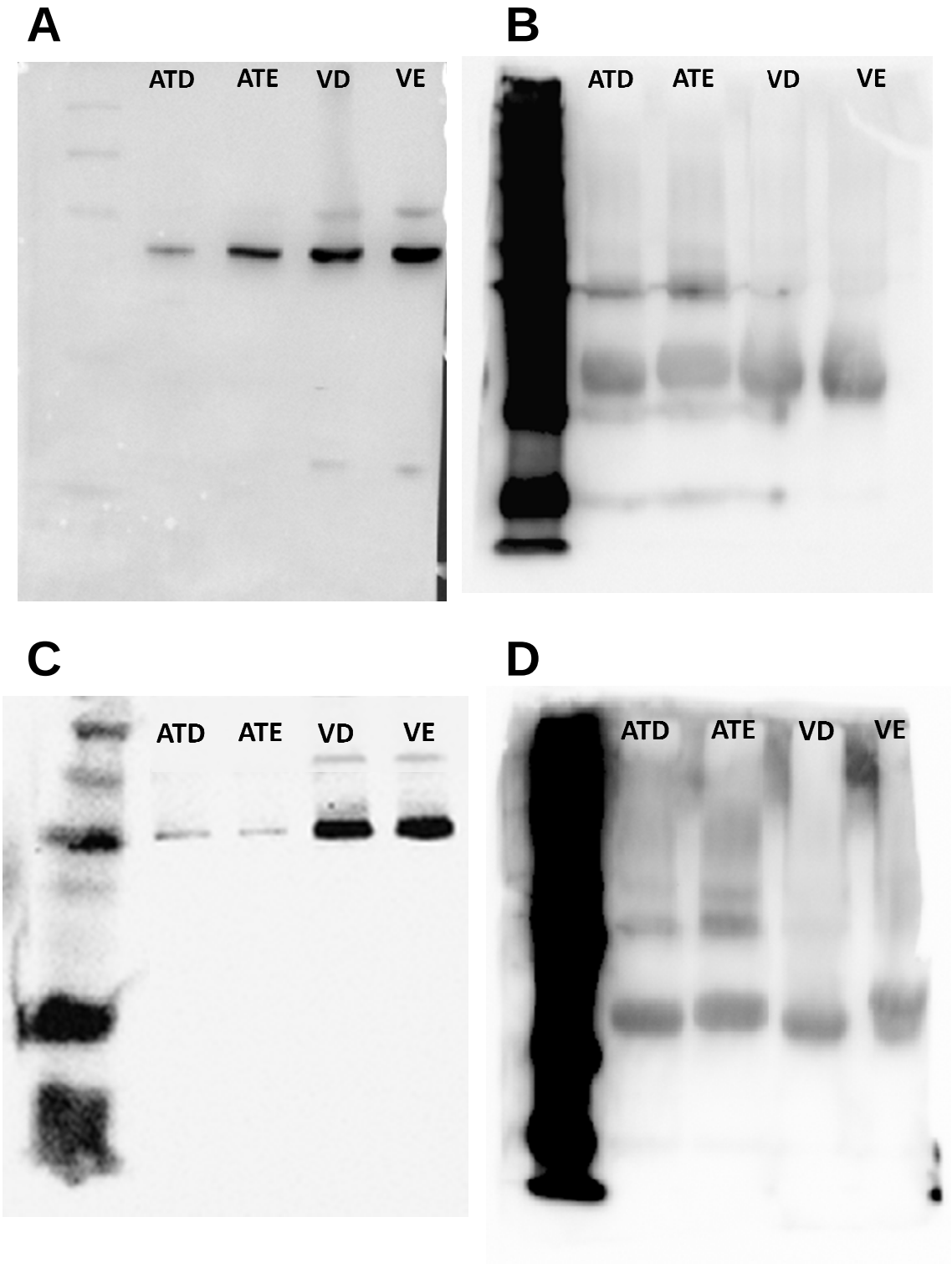


Figura 31. Expressão da proteína TRPM8 no coração de ratos SHR e WKY. Imagens representativas das bandas em membranas de western blot da proteína TRPM8 em átrio direito (ATD), átrio esquerdo (ATE), ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE), isolados de ratos SHR (A) e WKY (C) e da proteína β-actina (B e D, respectivamente).

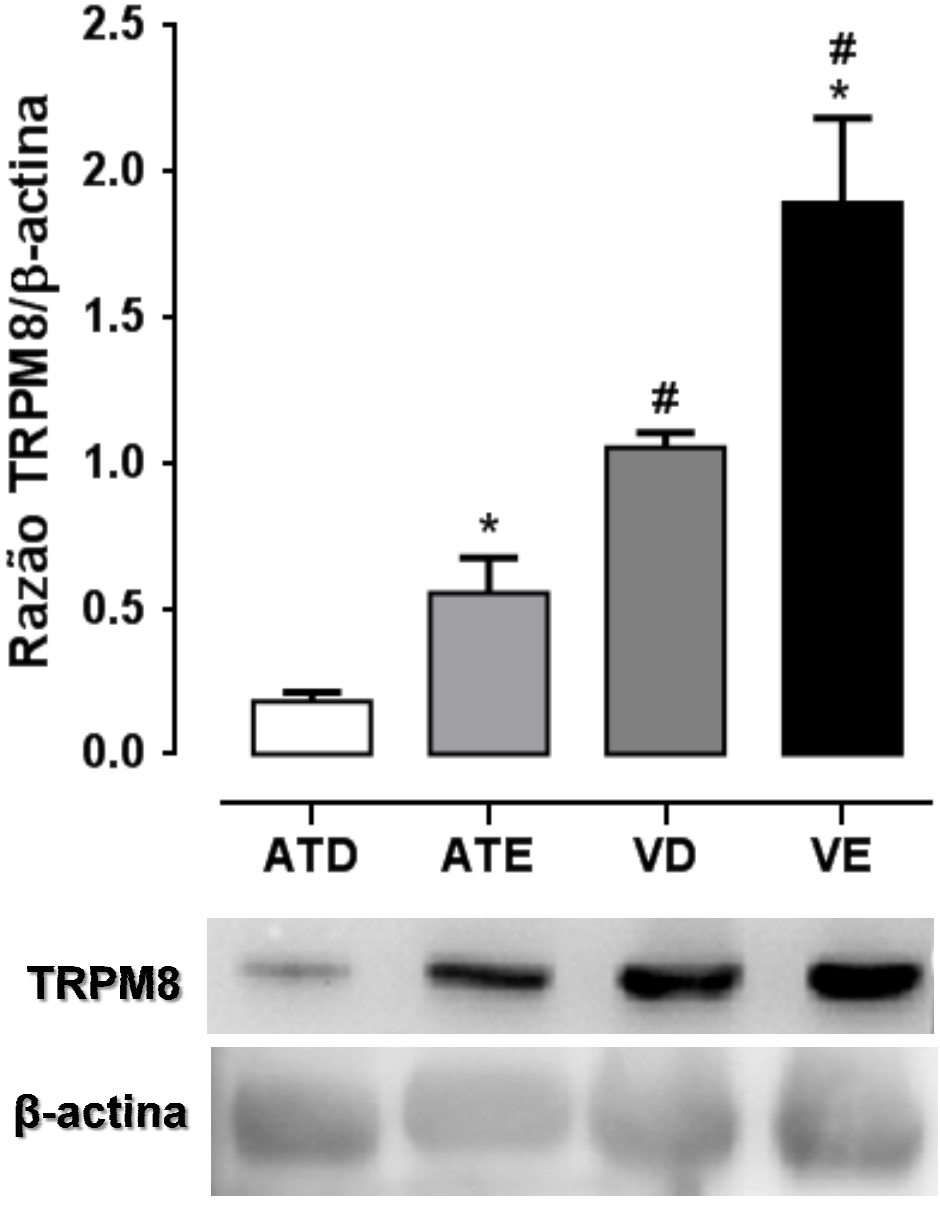


Figura 32. Expressão da proteína TRPM8 no coração de ratos SHR. Gráfico em barras mostrando a razão entre a proteína do TRPM8 e a proteína constitutiva β – actina em átrio direito (ATD), átrio esquerdo (ATE), ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) de ratos SHR (n = 3 em triplicata) (acima) e as imagens representativas das membranas (abaixo). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, **p* < 0,05 (ATE *vs.* ATD e VE *vs.* VD); $^{\#}p$ < 0,05 (VD *vs.* ATD e VE *vs.* ATE).

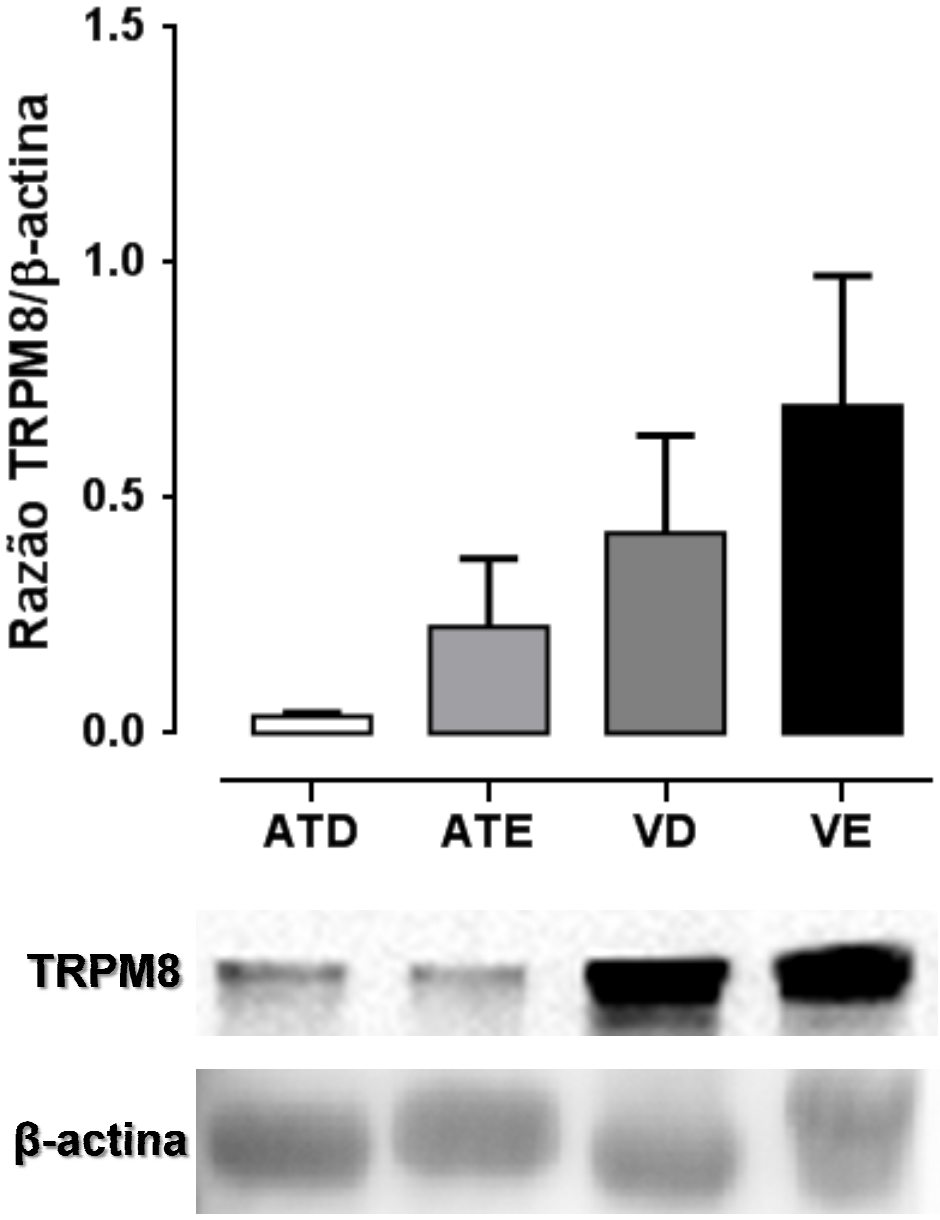


Figura 33. Expressão da proteína TRPM8 no coração de ratos WKY. Gráfico em barras mostrando a razão entre a proteína do TRPM8 e a proteína constitutiva β – actina em átrio direito (ATD), átrio esquerdo (ATE), ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) de ratos SHR (n = 3 em triplicata) (acima) e as imagens representativas das membranas (abaixo). Os dados foram expressos como média ± e.p.m.

5.2.2.2 Expressão protéica dos canais TRPM8 em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY

A análise da expressão protéica utizando Western blot mostrou que o canal TRPM8 está expresso em artéria mesentérica superior de ratos SHR e WKY (Figura 34). Além disso, os dados mostraram uma expressão aumentada de canais TRPM8 nos ratos SHR em comparação com seus controles normotensos WKY (Figura 35).

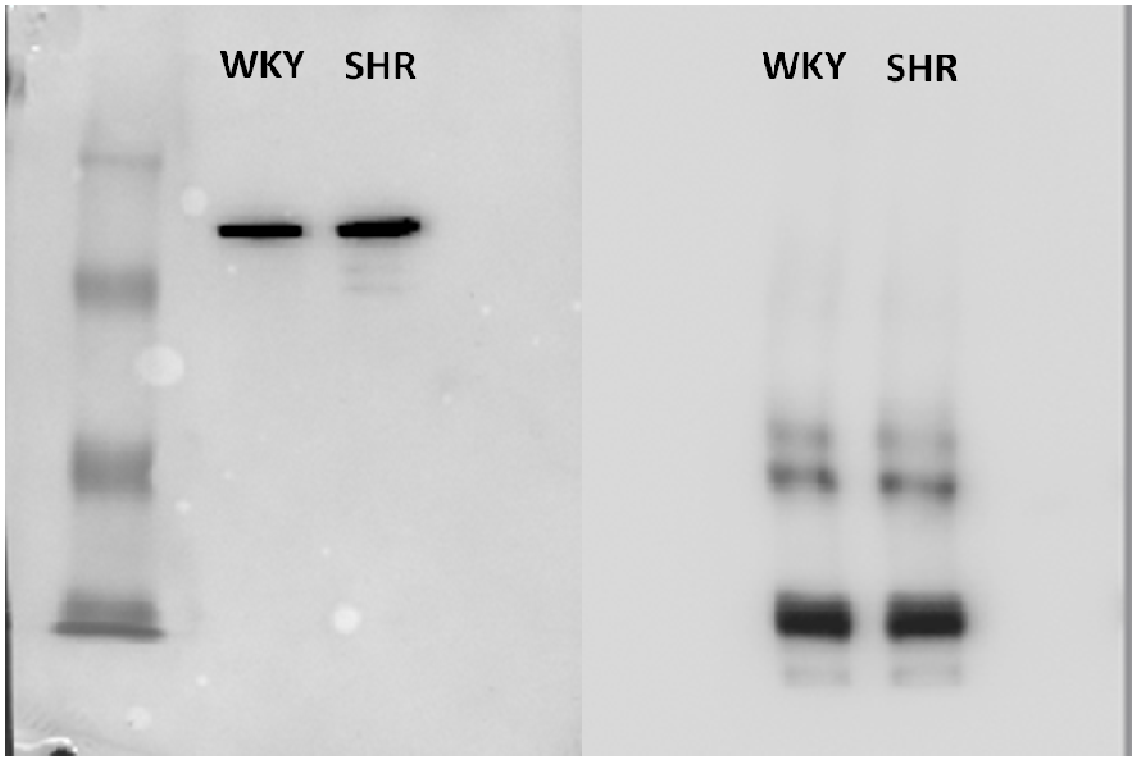


Figura 34. Expressão da proteína TRPM8 na artéria mesentérica superior isoloada de ratos WKY e SHR. Imagens representativas das bandas em membranas de western blot para proteína TRPM8 (esquerda) e β-actina (direita) em ratos WKY e SHR.

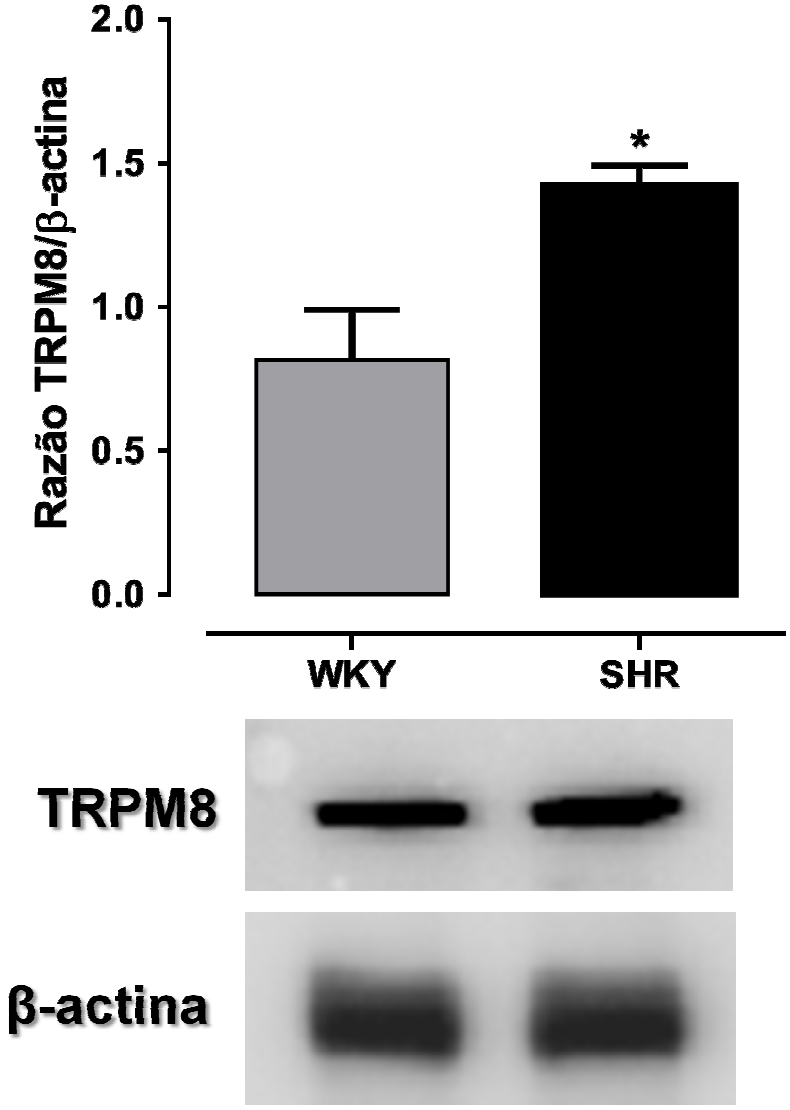


Figura 35. Expressão da proteína TRPM8 em artéria mesentérica superior de ratos SHR e WKY. Gráfico em barras mostrando a razão entre a proteína do TRPM8 e a proteína constitutiva β – actina em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY (n = 3 em triplicata) (acima) e as imagens representativas da membrana (abaixo). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, *$p < 0,05$ (SHR *vs.* WKY).

5.3 Ensaios *in vitro*

5.3.1 Ensaios em átrios isolados de ratos SHR e WKY

5.3.1.1 Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos pelo OEMV

O OEMV induziu diminuição significativa na freqüência (efeito cronotrópico negativo) e na força de contração (efeito inotrópico negativo) em átrios direito e esquerdo, respectivamente. A resposta induzida pelo OEMV ocorreu de maneira dependente de concentração tanto em ratos WKY (Tabela 11, Figuras 36, 38 e 39A) e quanto em ratos SHR (Tabela 11, Figuras 37, 38 e 39B), culminando na completa inibição de ambos os átrios.

O efeito inotrópico negativo induzido pelo OEMV foi significativamente mais potente (aproximadamente 0,2 vezes) em ratos SHR em relação aos seus respectivos controles normotensos. Entretanto, o efeito cronotrópico negativo induzido pelo OEMV foi semelhante em ratos SHR e WKY, não havendo diferença significativa entre as respostas observadas (Tabela 11, Figuras 36, 37, 38 e 39). Além disso, a comparação entre os efeitos sobre freqüência e força de contração no mesmo tipo de animal mostrou que nos ratos SHR o efeito inotrópico negativo foi mais potente (aproximadamente 0,2 vezes) do que o efeito cronotrópico negativo (Tabela 11, Figura 39B).

Tabela 11. Valores de $E_{máx}$ e CE_{50} para os efeitos cronotrópico e inotrópico induzidos por OEMV em átrios direitos e esquerdos isolados de ratos WKY e SHR.

	WKY		**SHR**	
	$E_{máx}$ (%)	**CE_{50} (µg/mL)**	**$E_{máx}$ (%)**	**CE_{50} (µg/mL)**
Efeito Cronotrópico	100,0 ± 0,1	147,39 ± 0,06	99,7 ± 0,2	126,35 ± 0,06
Efeito Inotrópico	99,1 ± 0,9	126,35 ± 0,04	99,1 ± 0,8	105,31 ± 0,04 (*)

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, *$p < 0,05$ (SHR *vs.* WKY).

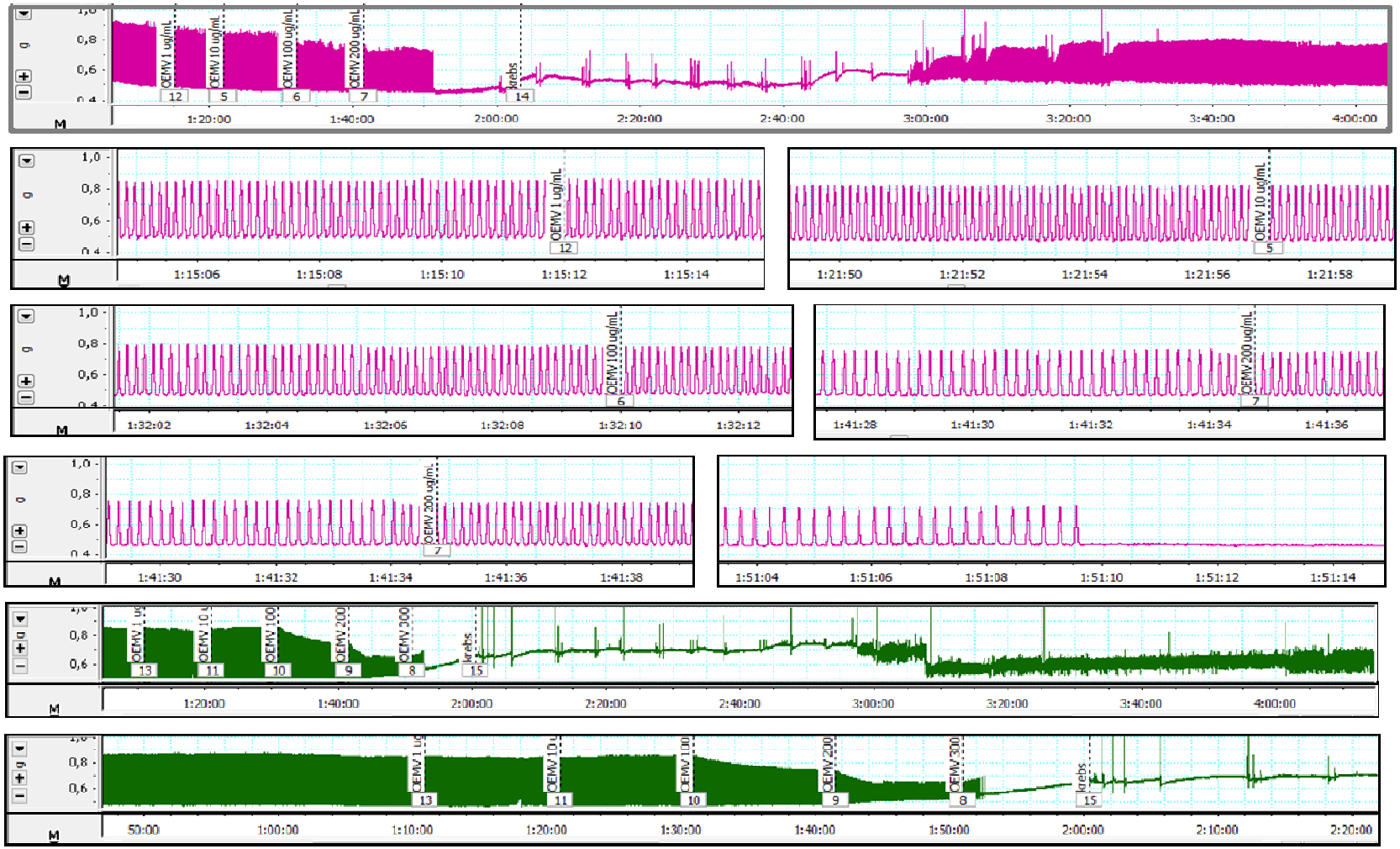


Figura 36. Registro original mostrando o efeito de OEMV (0,1 - 300 µg/mL) em átrio direito (acima) ou esquerdo (abaixo) de rato WKY. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações de OEMV.

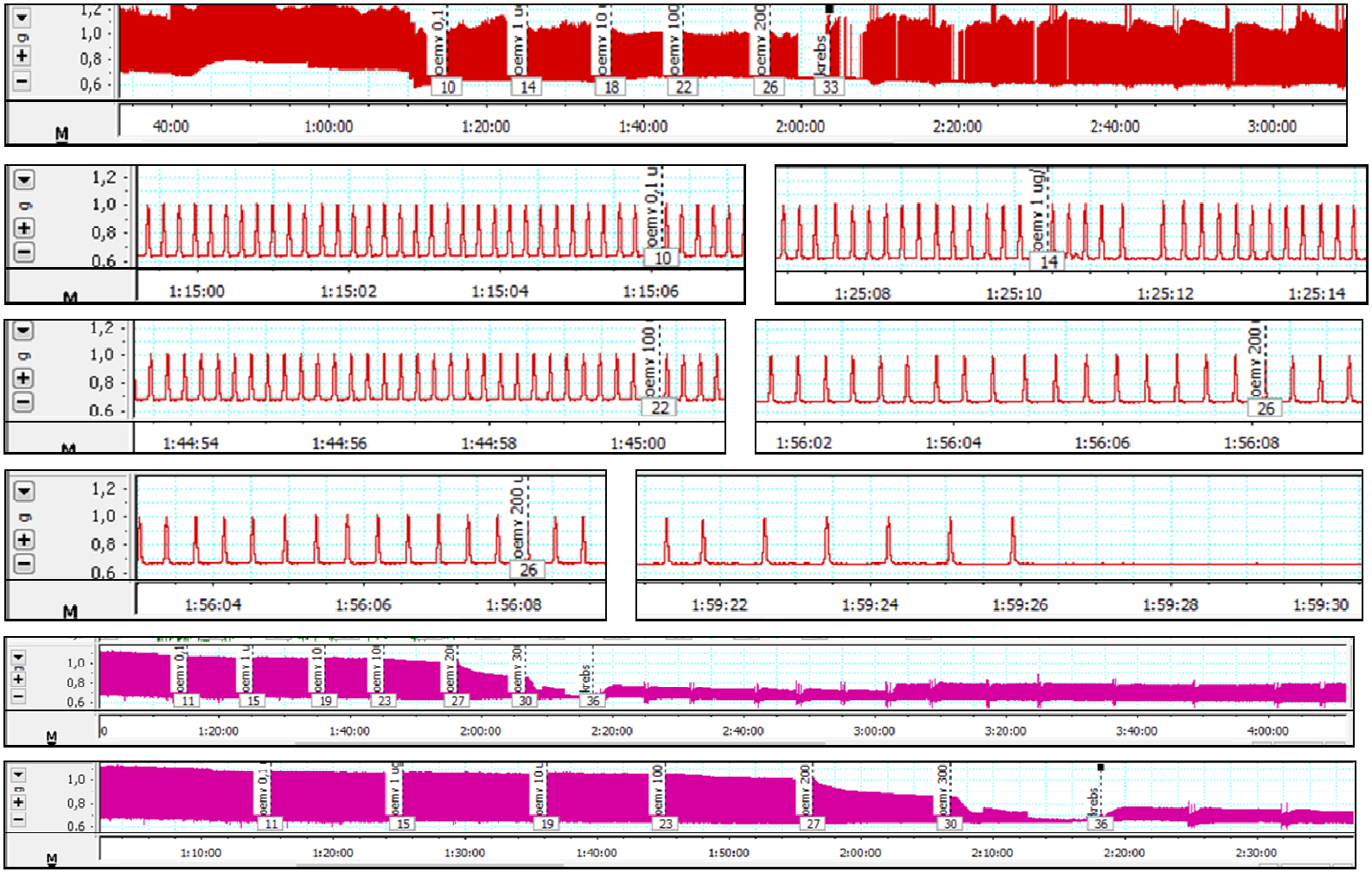


Figura 37. Registro original mostrando o efeito de OEMV (0,1 - 300 µg/mL) em átrio direito (acima) ou esquerdo (abaixo) de rato SHR. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações de OEMV.

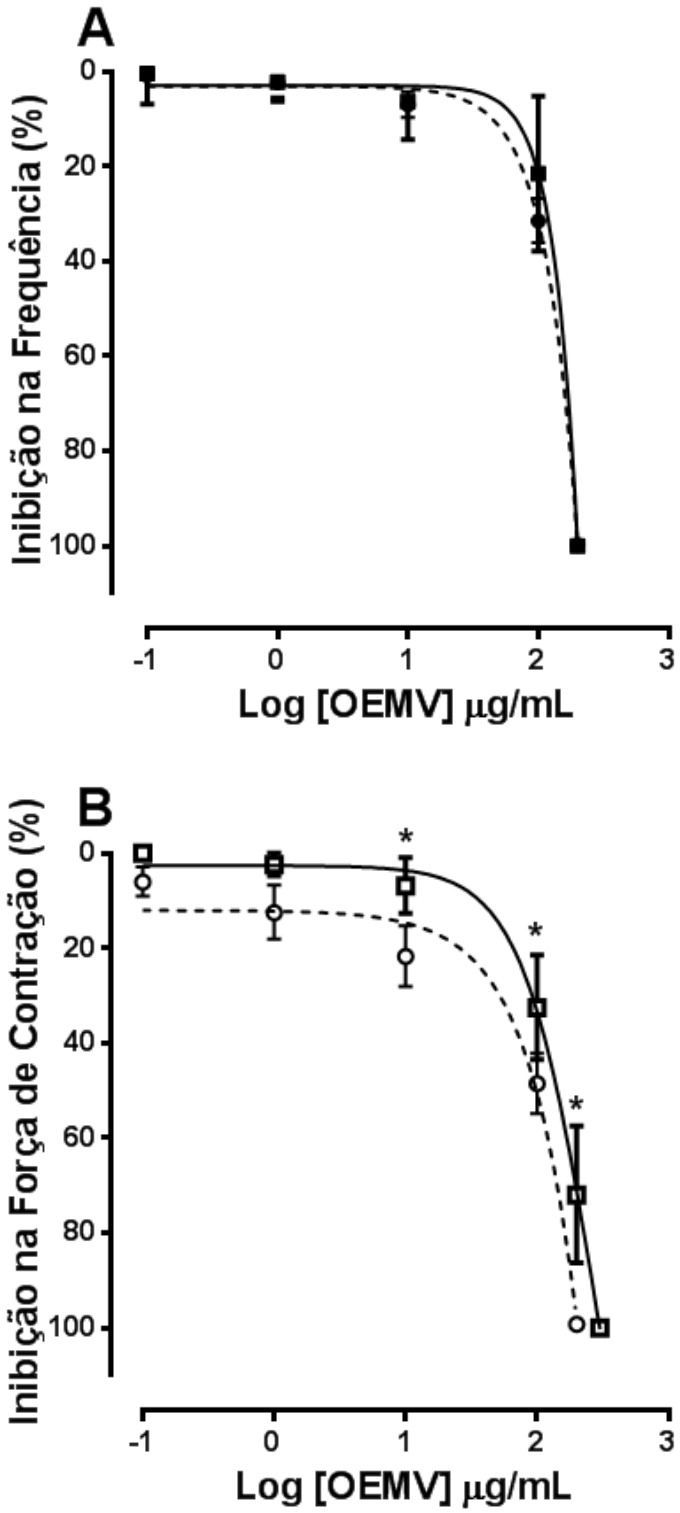


Figura 38. Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos por OEMV em ratos WKY e SHR. Curvas concentração-resposta mostrando as respostas induzidas por OEMV em (A) átrios direitos de ratos (■) WKY (linha contínua, n = 5) e (●) SHR (linha tracejada, n = 6) e em (B) átrios esquerdos de ratos (□) WKY (linha contínua, n = 7) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

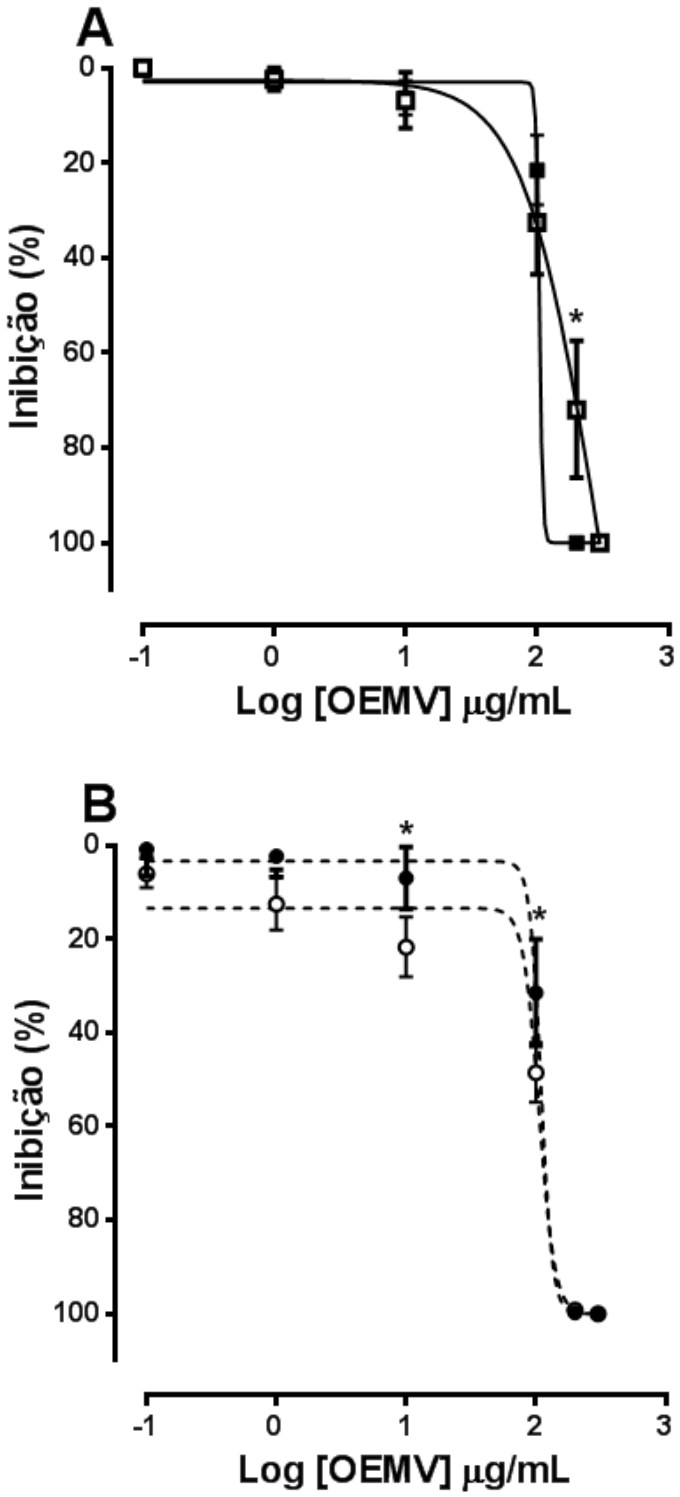


Figura 39. Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos por OEMV em ratos WKY e SHR. Curvas concentração-resposta mostrando as respostas induzidas por OEMV (A) em átrios (■) direitos e (□) esquerdos de ratos WKY (linha contínua, n = 5 e 7 respectivamente) e (B) em átrios (●) direitos e (○) esquerdos de ratos SHR (linha tracejada, n = 6 e 6 respectivamente). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (Átrio direito *vs.* Átrio esquerdo).

5.3.1.2 Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos pela rotundifolona

A rotundifolona induziu diminuição significativa na freqüência e na força de contração de átrios direito e esquerdo, respectivamente, de maneira dependente de concentração, em ratos WKY (Tabela 12, Figuras 40, 42 e 43A) e SHR (Tabela 12, Figuras 41, 42, 43B), culminando na completa inibição de ambos os átrios. Os efeitos inotrópico e cronotrópico negativos foram significativamente mais potente (aproximadamente 0,3 e 0,2 vezes respectivamente) em ratos SHR em relação aos seus respectivos controles normotensos (Tabela 12, Figura 42).

Além disso, a comparação entre os efeitos sobre freqüência e força de contração no mesmo tipo de animal mostrou que nos ratos SHR o efeito inotrópico negativo foi mais potente (aproximadamente 0,2 vezes) do que o efeito cronotrópico negativo (Tabela 12, Figura 43B).

Tabela 12. Valores de $E_{máx}$ e pD_2 para os efeitos cronotrópico e inotrópico induzidos por rotundifolona em átrios direitos e esquerdos isolados de ratos WKY e SHR.

	WKY		**SHR**	
	$E_{máx}$ (%)	**pD_2 (µg/mL)**	**$E_{máx}$ (%)**	**pD_2 (µg/mL)**
Efeito Cronotrópico	100,0 ± 0,0	2,01 ± 0,02	100,0 ± 0,0	2,39 ± 0,12 (*)
Efeito Inotrópico	100,0 ± 0,0	2,21 ± 0,04	100,0 ± 0,0	2,90 ± 0,04 (*)

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

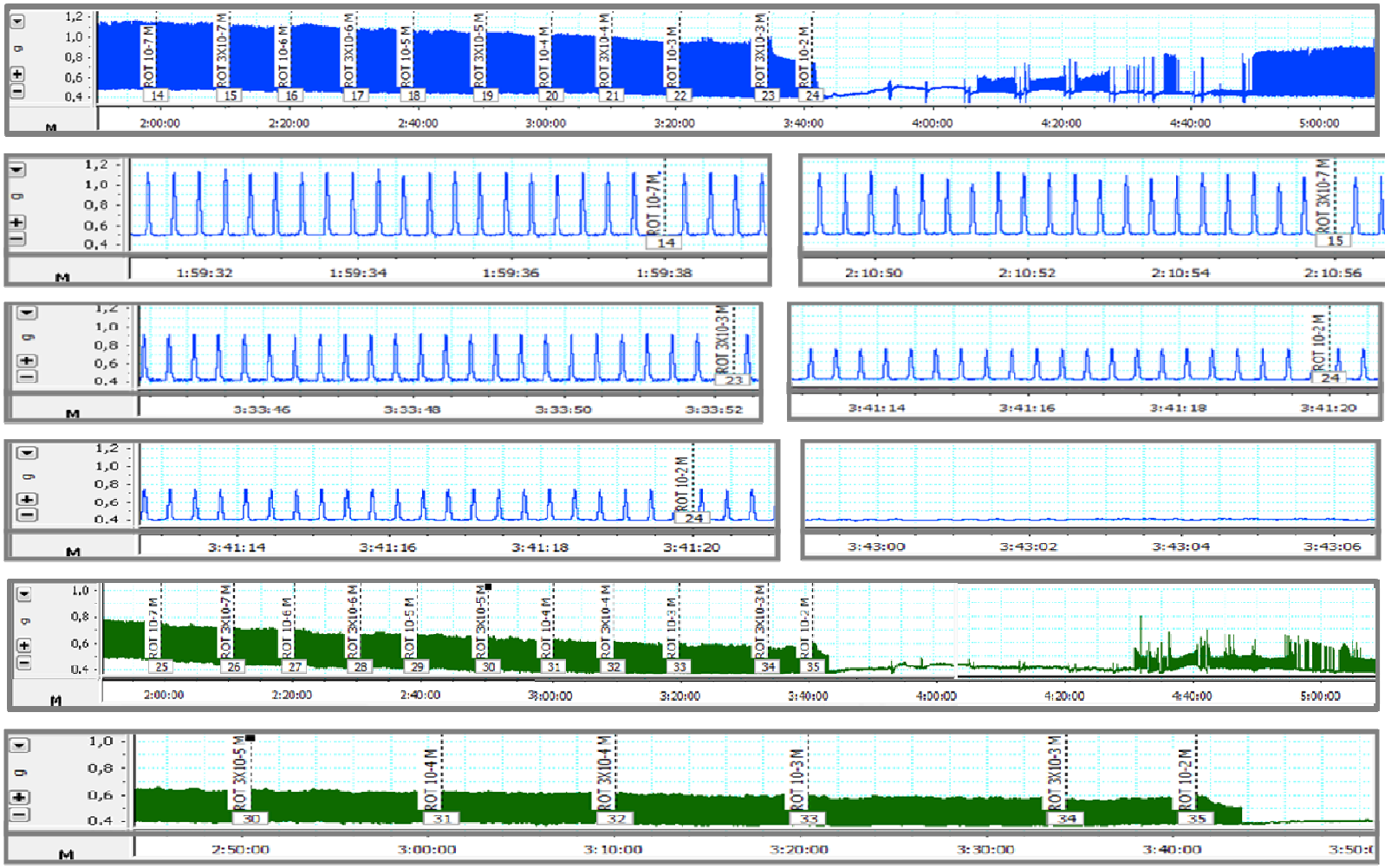


Figura 40. Registro original mostrando o efeito de rotundifolona (10^{-7} – 10^{-2} M) em átrio direito (acima) ou esquerdo (abaixo) de rato WKY. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações de rotundifolona.

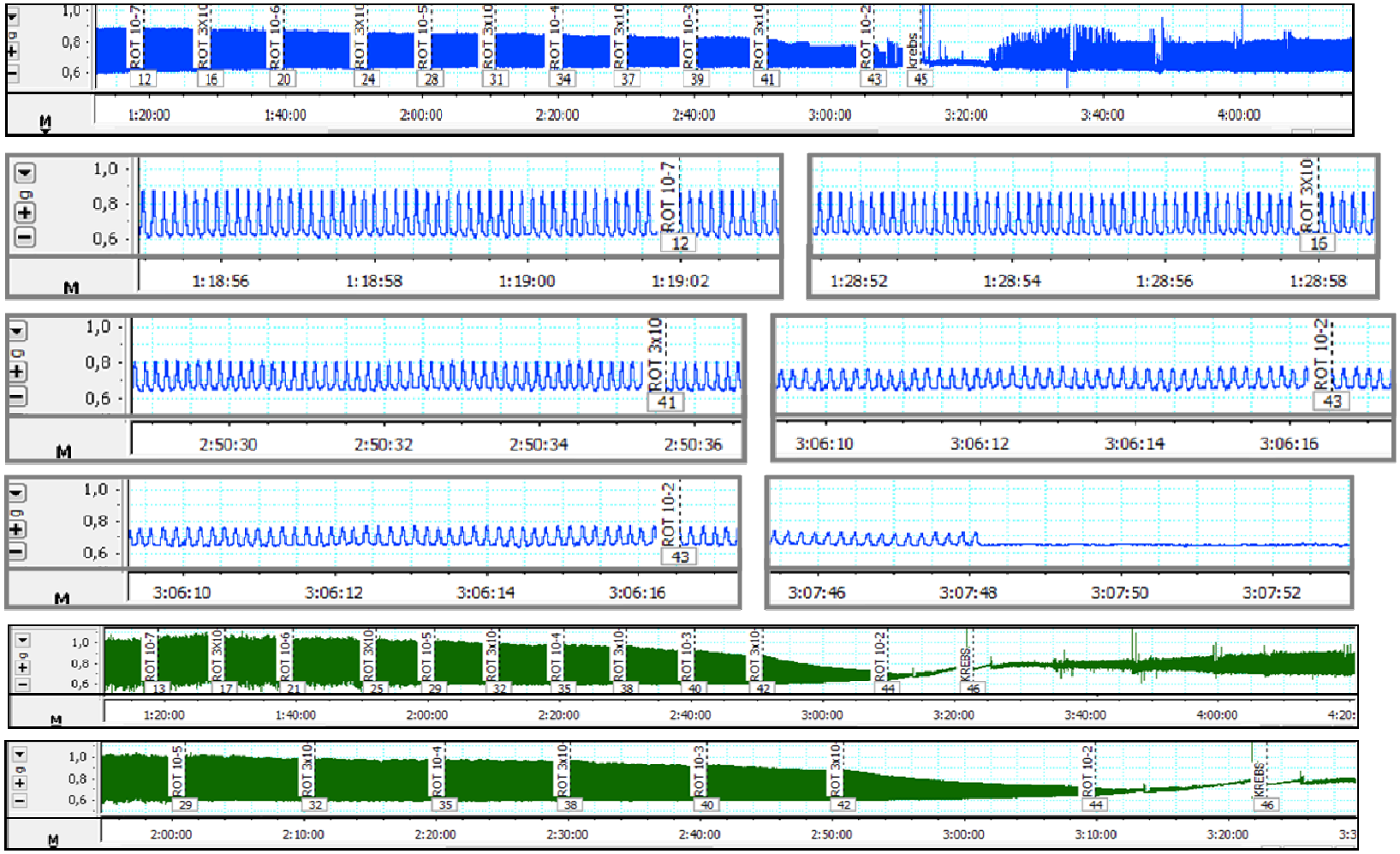


Figura 41. Registro original mostrando o efeito de rotundifolona (10^{-7} – 10^{-2} M) em átrio direito (acima) ou esquerdo (abaixo) de rato SHR. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações de rotundifolona.

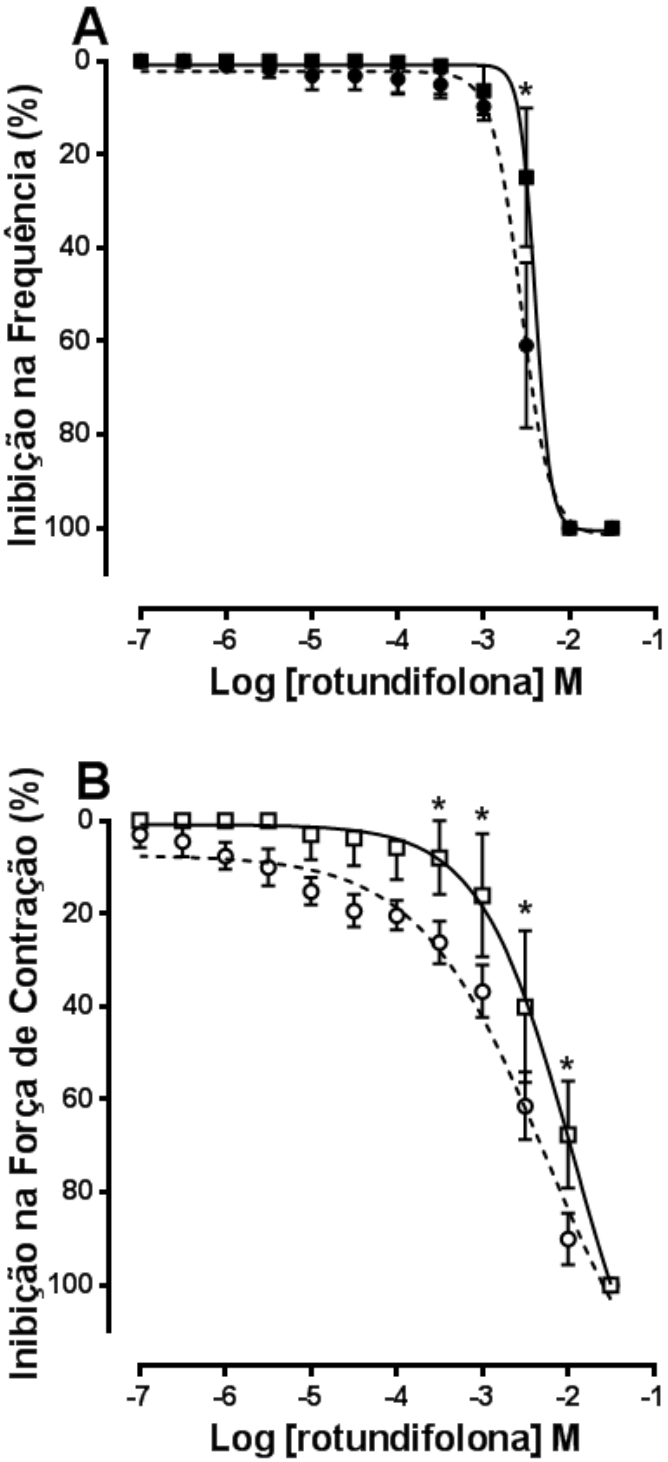


Figura 42. Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos por rotundifolona em ratos WKY e SHR. Curvas concentração-resposta mostrando as respostas induzidas por rotundifolona em (A) átrios direitos de ratos (■) WKY (linha contínua, n = 6) e (●) SHR (linha tracejada, n = 6) e em (B) átrios esquerdos de ratos (□) WKY (linha contínua, n = 6) e (○) SHR (linha tracejada, n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

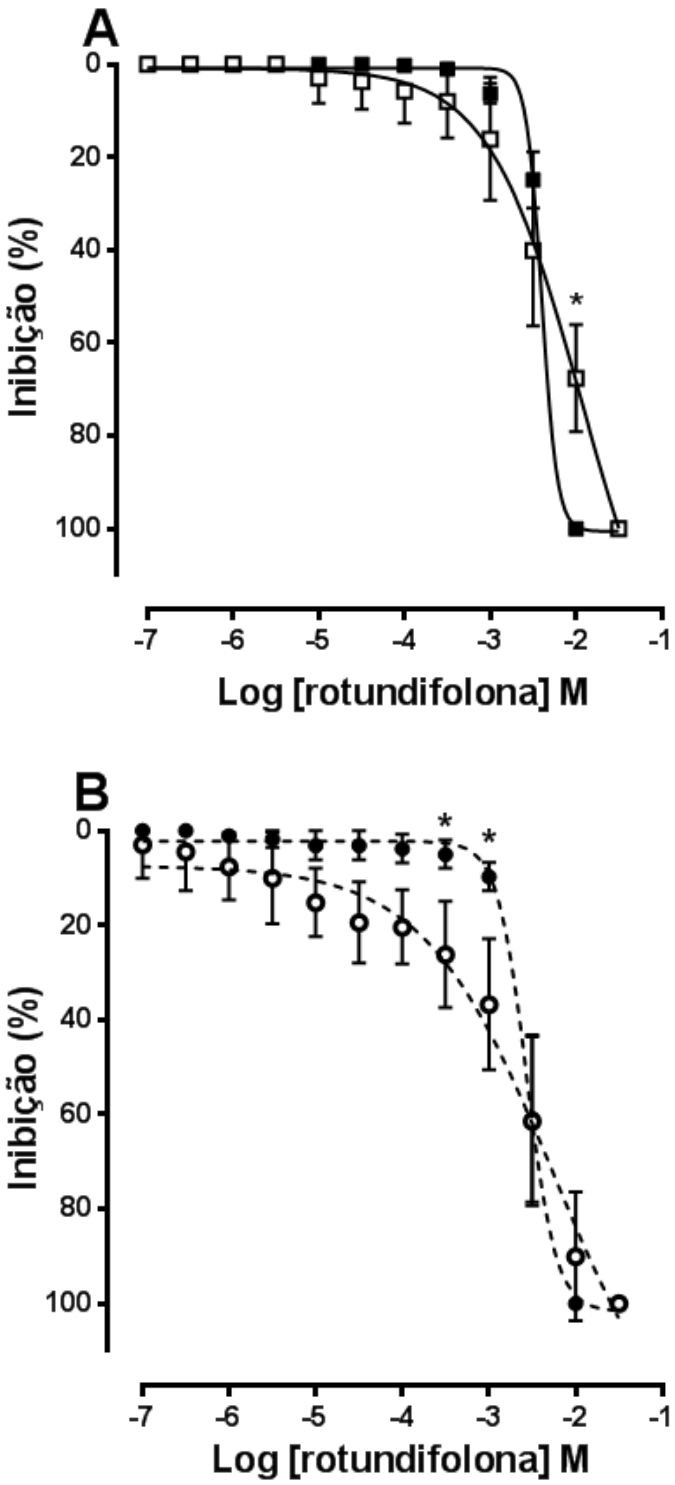


Figura 43. Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos por rotundifolona em ratos WKY e SHR. Curvas concentração-resposta mostrando as respostas induzidas por rotundifolona (A) em átrios (■) direitos e (□) esquerdos de ratos WKY (linha contínua, n = 6 e 6 respectivamente) e (B) em átrios (●) direitos e (○) esquerdos de ratos SHR (linha tracejada, n = 6 e 6 respectivamente). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (Átrio direito *vs.* Átrio esquerdo).

5.3.1.3 Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos pelo mentol

O mentol induziu diminuição significativa na freqüência e na força de contração de átrios direito e esquerdo, respectivamente, de maneira dependente de concentração, em ratos WKY (Tabela 13, Figuras 44, 46 e 47A) e SHR (Tabela 13, Figuras 45, 46 e 47B), e completa inibição de ambos os átrios.

O efeito inotrópico negativo foi significativamente mais potente (aproximadamente 0,2 vezes) em ratos SHR, enquanto o efeito cronotrópico negativo induzido por mentol foi semelhante em ratos SHR e WKY, não havendo diferença significativa entre as respostas observadas (Tabela 13, Figura 46). Além disso, a comparação entre os efeitos sobre freqüência e força de contração no mesmo tipo de animal mostrou que nos ratos SHR o efeito inotrópico negativo foi mais potente (aproximadamente 0,2 vezes) do que o efeito cronotrópico negativo (Tabela 13, Figura 47).

Tabela 13. Valores de $E_{máx}$ e pD_2 para os efeitos cronotrópico e inotrópico induzidos por mentol em átrios direitos e esquerdos isolados de ratos WKY e SHR.

	WKY		**SHR**	
	$E_{máx}$ (%)	**pD_2 (µg/mL)**	**$E_{máx}$ (%)**	**pD_2 (µg/mL)**
Efeito Cronotrópico	100,0 ± 0,0	3,54 ± 0,03	100,0 ± 0,0	3,61 ± 0,02
Efeito Inotrópico	100,0 ± 0,0	3,78 ± 0,03	100,0 ± 0,0	4,31 ± 0,05 (*)

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, *$p < 0,05$ (SHR *vs.* WKY).

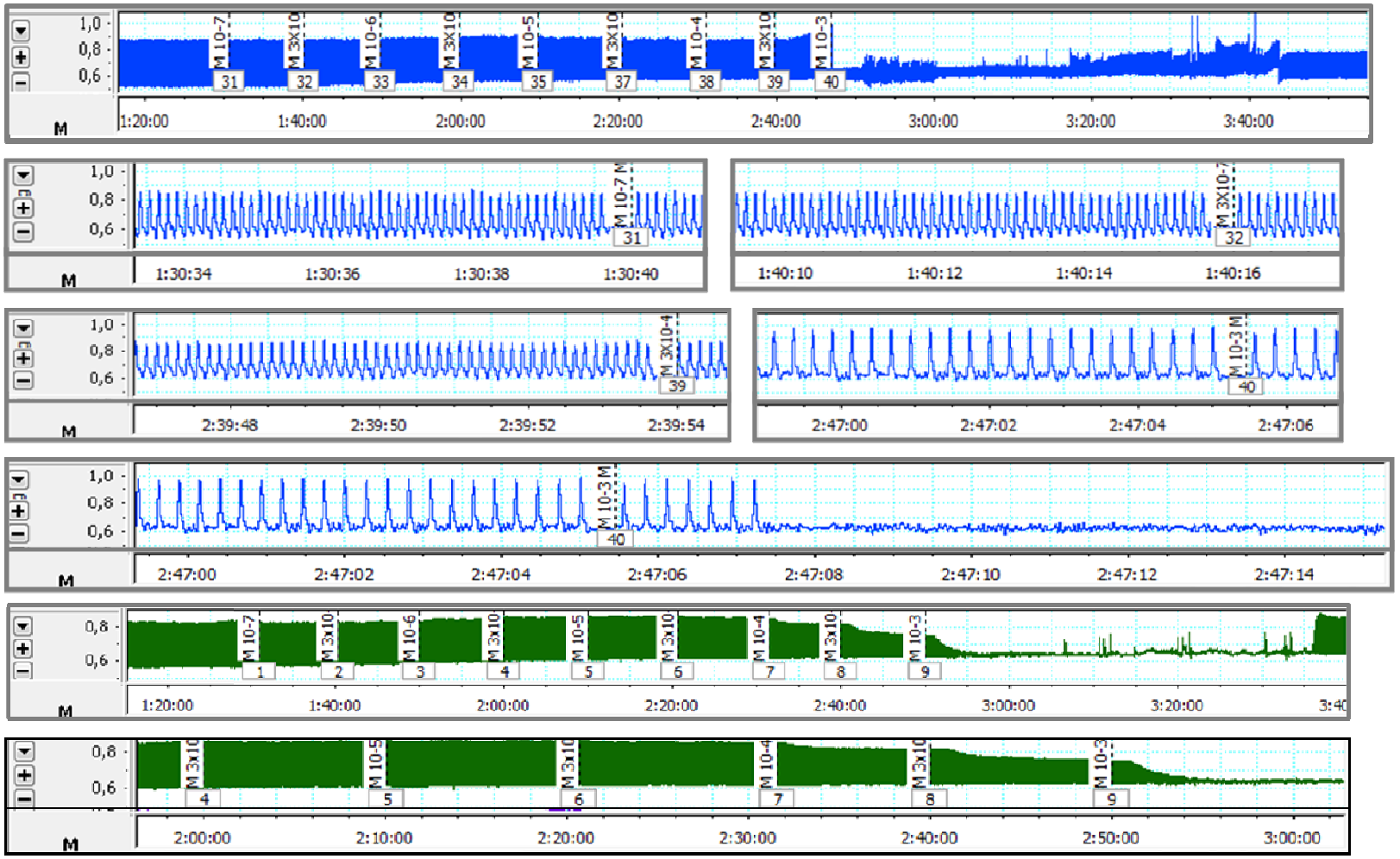


Figura 44. Registro original mostrando o efeito de mentol (10^{-7} – 10^{-2} M) em átrio direito (acima) ou esquerdo (abaixo) de rato WKY. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações de mentol.

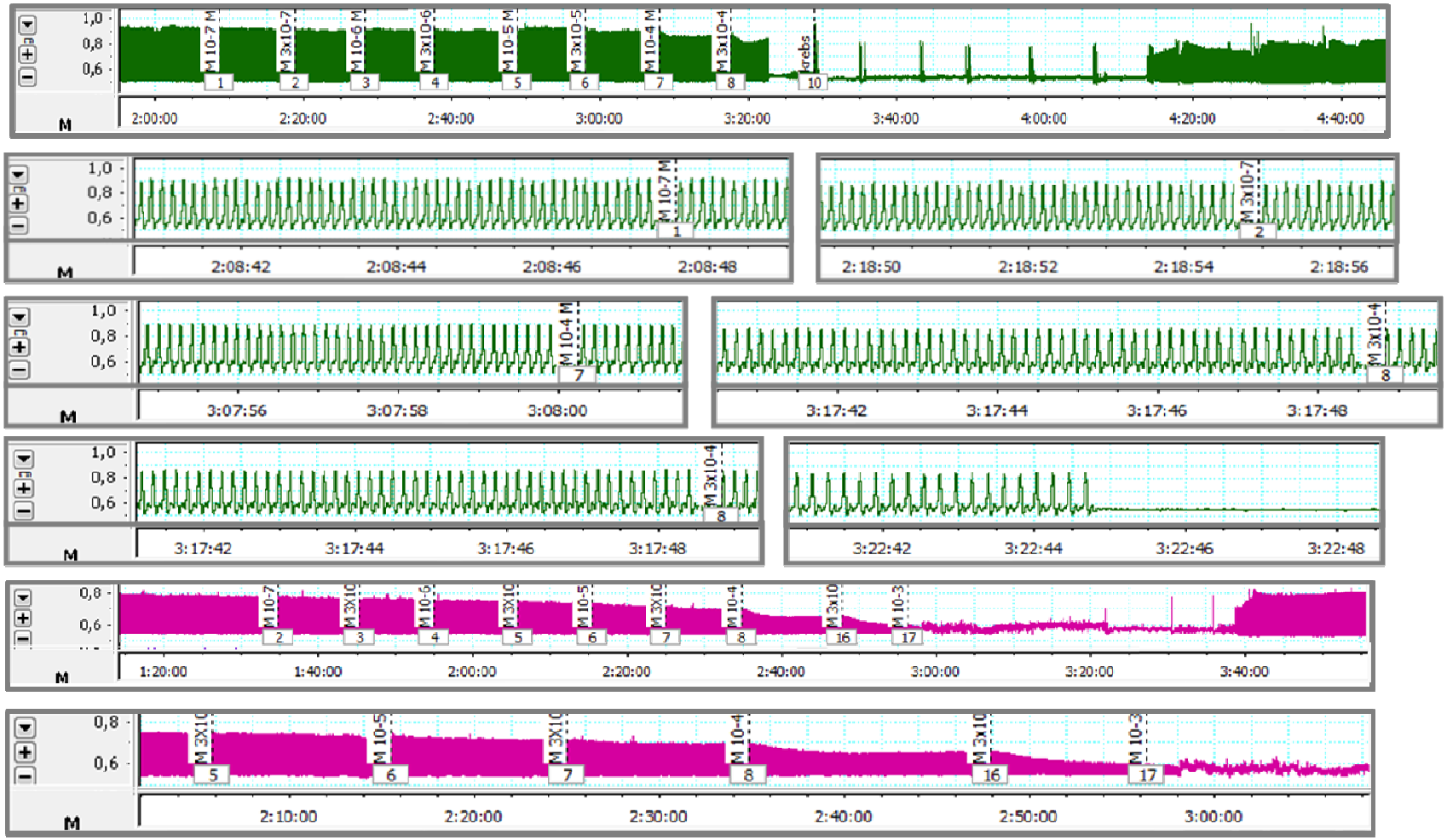


Figura 45. Registro original mostrando o efeito de mentol (10^{-7} – 10^{-3} M) em átrio direito (acima) ou esquerdo (abaixo) de rato SHR. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações de mentol.

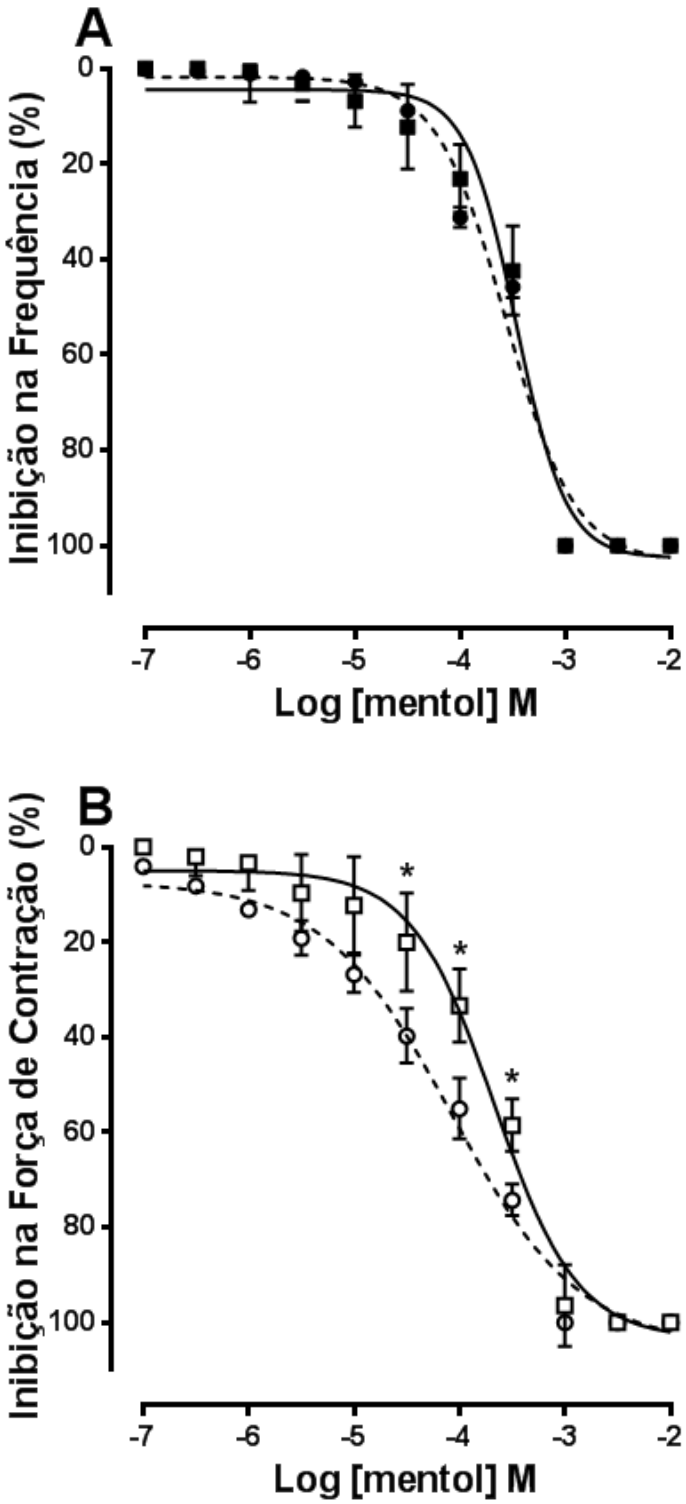


Figura 46. Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos por mentol em ratos WKY e SHR. Curvas concentração-resposta mostrando as respostas induzidas por mentol em (A) átrios direitos de ratos (■) WKY (linha contínua, n = 5) e (●) SHR (linha tracejada, n = 5) e em (B) átrios esquerdos de ratos (□) WKY (linha contínua, n = 6) e (○) SHR (linha tracejada, n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

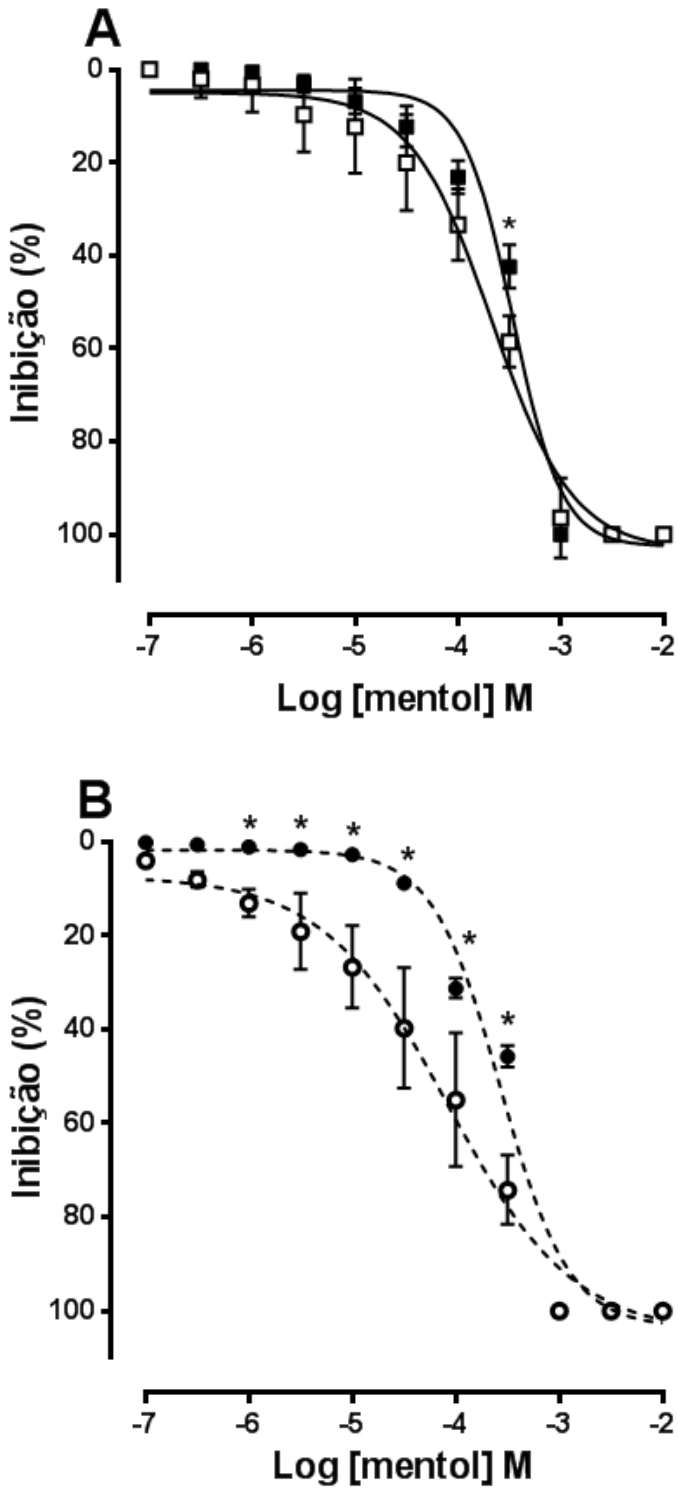


Figura 47. Efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos por mentol em ratos WKY e SHR. Curvas concentração-resposta mostrando as respostas induzidas por mentol (A) em átrios (■) direitos e (□) esquerdos de ratos WKY (linha contínua, n = 5 e 6 respectivamente) e (B) em átrios (●) direitos e (○) esquerdos de ratos SHR (linha tracejada, n = 5 e 5 respectivamente). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (Átrio direito *vs.* Átrio esquerdo).

5.3.2 Ensaios em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY

5.3.2.1 Resposta contracturante induzida pela fenilefrina

A resposta contracturante induzida pela fenilefrina foi semelhante em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR e WKY, não havendo diferença significativa entre as respostas observadas. A partir da curva concentração-resposta obtida foi possível observar que a resposta máxima foi obtida na concentração de 10 µM, e a sub-máxima na concentração de 1 µM (Figura 48).

5.3.2.2 Resposta vasorrelaxante induzida por OEMV, rotundifolona ou mentol

O OEMV, a rotundifolona e o mentol induziram respostas vasorrelaxantes dependente de concentração em anéis sem endotélio e com endotélio vascular funcional (Figuras 51, 54 e 57).

A resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona foi semelhante em anéis de artérias mesentéricas superiores sem endotélio funcional pré-contraídos com 1 ou 10 µM de FEN, não havendo diferença significativa nas respostas observadas em ratos SHR e WKY (Figura 49).

De forma semelhante, a resposta induzida pelo mentol foi semelhante em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR pré-contraídos com 1 ou 10 µM de FEN (Figura 50B). Entretanto, em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY, a resposta vasorrelaxante induzida por mentol foi significativamente mais potente em contrações induzidas por 10 µM de FEN em relação àquelas induzidas por 1 µM de FEN (Figura 50A).

Em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, pré-contraídos com 1 µM de FEN, o OEMV induziu resposta vasorrelaxante dependente de concentração, não havendo diferença

significativa entre as respostas observadas na presença e ausência do endotélio vascular funcional (Tabela 14, Figura 51).

De forma semelhante, a rotundifolona induziu resposta vasorrelaxante dependente de concentração em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR, pré-contraídos com 1 µM de FEN, não havendo diferença significativa entre as respostas observadas na presença e ausência do endotélio vascular funcional (Tabela 15, Figura 54B). Entretanto, em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY, a resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona nos anéis sem endotélio vascular funcional foi significativamente atenuada (aproximadamente 0,2 vezes) em comparação com aquela observada em anéis com endotélio funcional (Tabela 15, Figura 54A).

Por outro lado, o mentol induziu resposta vasorrelaxante dependente de concentração em anéis com e sem endotélio vascular funcional em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, pré-contraídos com 1 µM de FEN. No entanto, a resposta observada em anéis sem endotélio vascular funcional foi significativamente mais potente (aproximadamente 0,2 vezes) em comparação com aquela observada em anéis com endotélio funcional (Tabela 16, Figura 57).

Comparando-se as respostas vasorrelaxantes em anéis sem endotélio funcional de ratos WKY e SHR induzidas pelo OEMV (Tabela 14, Figuras 52 e 53), pela rotundifolona (Tabela 15, Figuras 55 e 56) e pelo mentol (Tabela 16, Figuras 58 e 59) foi observado que a resposta em ratos hipertensos foi significativamente mais potente (aproximadamente 0,4; 0,2 e 0,2 vezes respectivamente) em relação aos seus controles normotensos, não havendo diferença significativa no efeito máximo. Nenhuma resposta significativa foi observada quando o veículo foi adicionado de forma cumulativa em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com FEN (Figura 60).

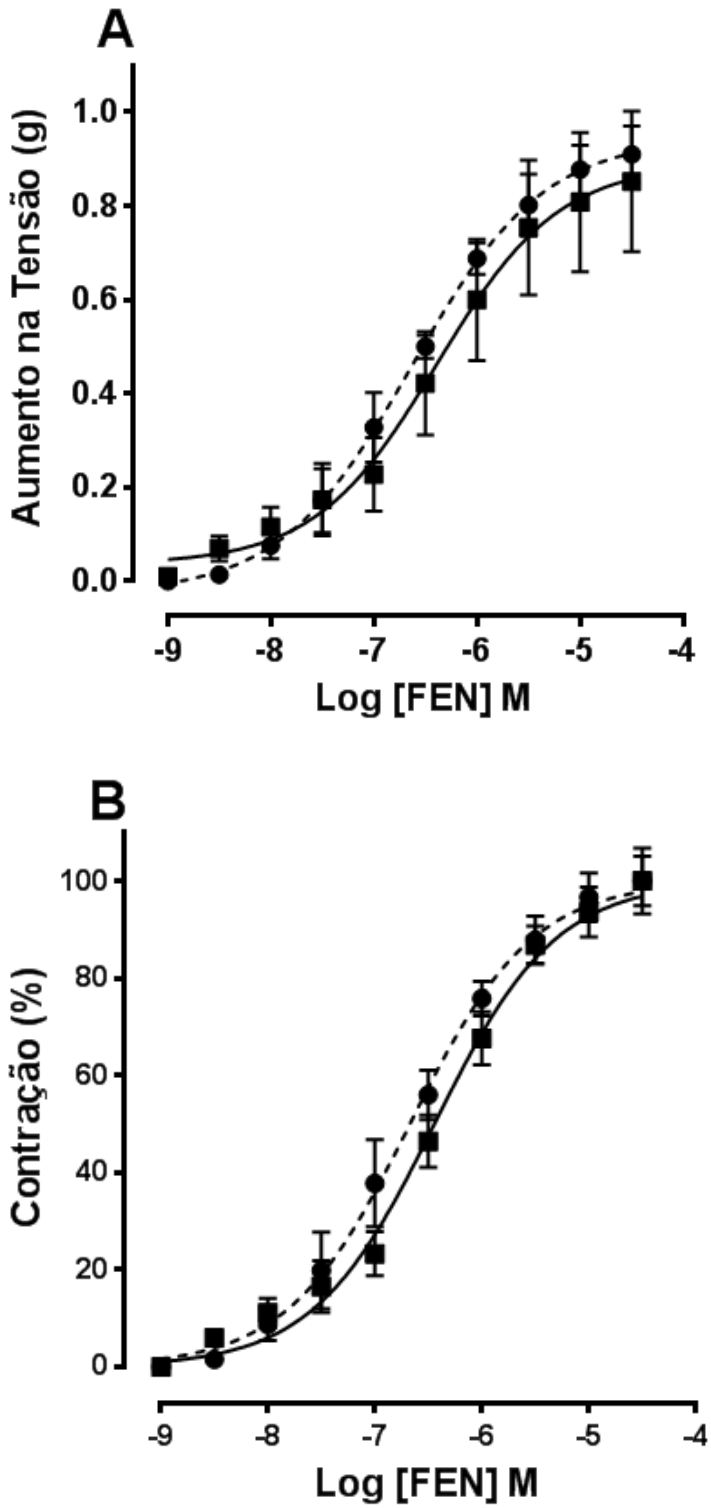


Figura 48. Contração induzida por FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY sem endotélio funcional. (A) Aumento na tensão basal induzida por FEN em ratos (■) WKY (n = 5) e (●) SHR (n = 5). (B) Porcentagem de aumento na tensão basal induzida por FEN em ratos (■) WKY (n = 5) e (●) SHR (n = 5). Os dados foram expressos como Média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

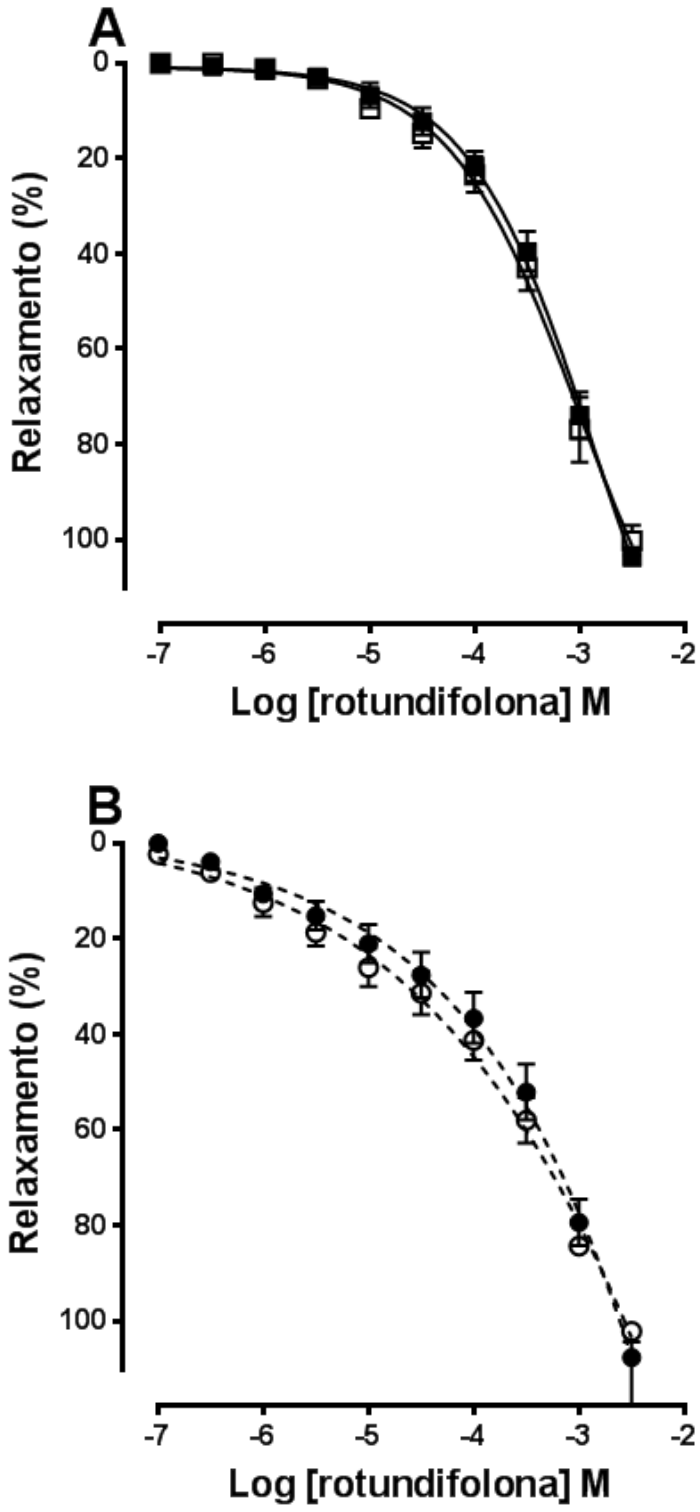


Figura 49. Efeito de rotundifolona na contração induzida por FEN em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR sem endotélio funcional. Efeito de rotundifolona (A) em anéis de WKY pré-contraídos com 1 μM (□, n = 7) ou 10 μM de FEN (■, n = 6) e (B) em anéis de SHR pré-contraídos com 1 μM (○, n = 6) ou 10 μM de FEN (●, n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (10 μM FEN *vs.* 1 μM FEN).

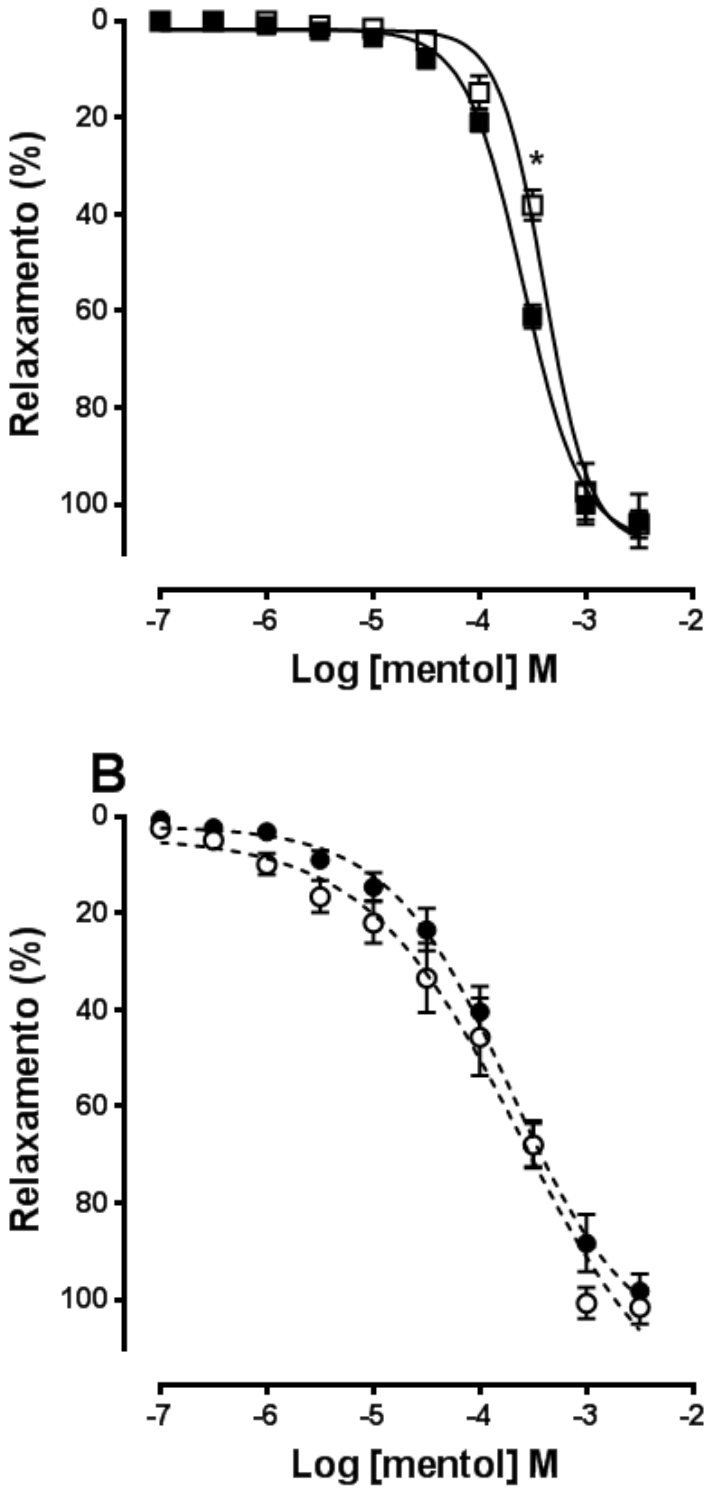


Figura 50. Efeito de mentol na contração induzida por FEN em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR sem endotélio funcional. Efeito de mentol (A) em anéis de WKY pré-contraídos com 1 μM (□, n = 7) ou 10 μM de FEN (■, n = 6) e (B) em anéis de SHR pré-contraídos com 1 μM (○, n = 6) ou 10 μM de FEN (●, n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (10 μM FEN *vs.* 1 μM FEN).

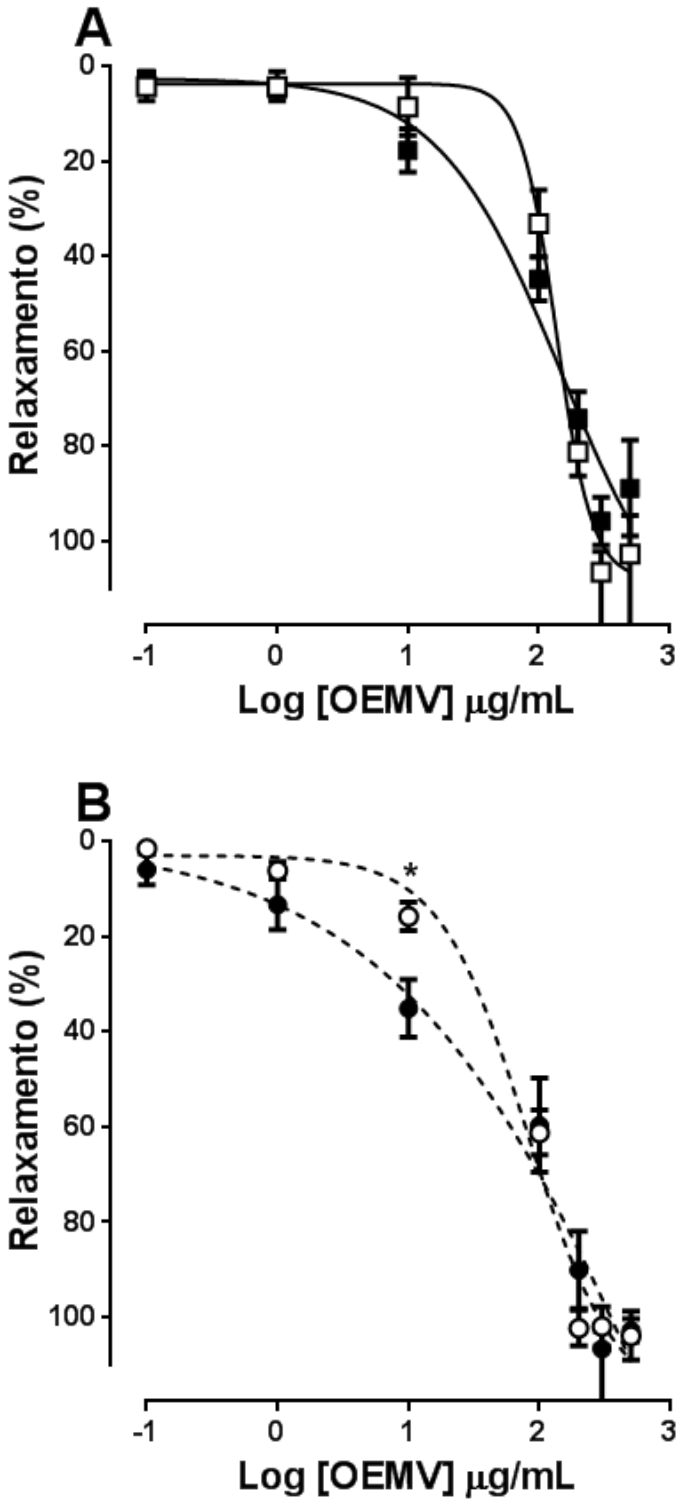


Figura 51. Efeito de OEMV na contração induzida por 1 µM de FEN em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos WKY e SHR com endotélio funcional ou sem endotélio funcional. Efeito de OEMV em ratos (A) WKY (■) com endotélio funcional (n = 5) ou (□) sem endotélio funcional (n = 6) e (B) SHR (●) com endotélio funcional (n = 5) ou (○) sem endotélio funcional (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (Sem endotélio funcional *vs.* Com endotélio funcional).

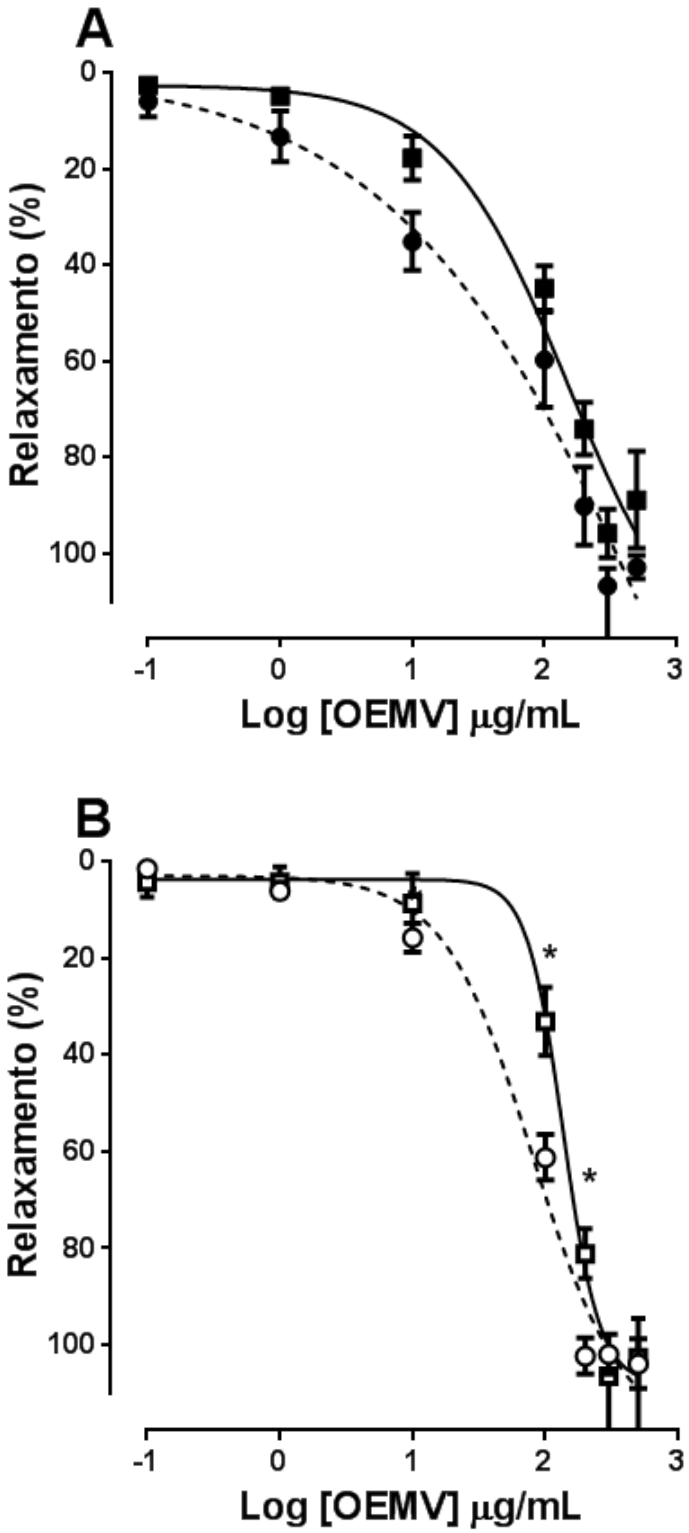


Figura 52. Efeito de OEMV na contração induzida por 1 µM de FEN em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos WKY ou SHR. Efeito de OEMV em (A) anéis com endotélio funcional de ratos (■) WKY (n = 5) e (●) SHR (n = 5) e em (B) anéis sem endotélio funcional de ratos (□) WKY (n = 6) e (○) SHR (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

Tabela 14. Resposta de OEMV na contração induzida por 1 µM de FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, com ou sem endotélio funcional.

	WKY		SHR	
	$E_{máx}$ (%)	CE_{50} (µg/mL)	$E_{máx}$ (%)	CE_{50} (µg/mL)
Com Endotélio	95,7 ± 5,0	113,10 ± 5,90	106,6 ± 3,5	76,92 ± 10,45
Sem Endotélio	106,4 ± 4,3	141,02 ± 0,02	102,5 ± 4,3	101,90 ± 5,24 $^{(*)}$

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, $^{*}p < 0,05$ (SHR *vs.* WKY), $^{\#}p < 0.05$ (Sem endotélio *vs.* Com endotélio).

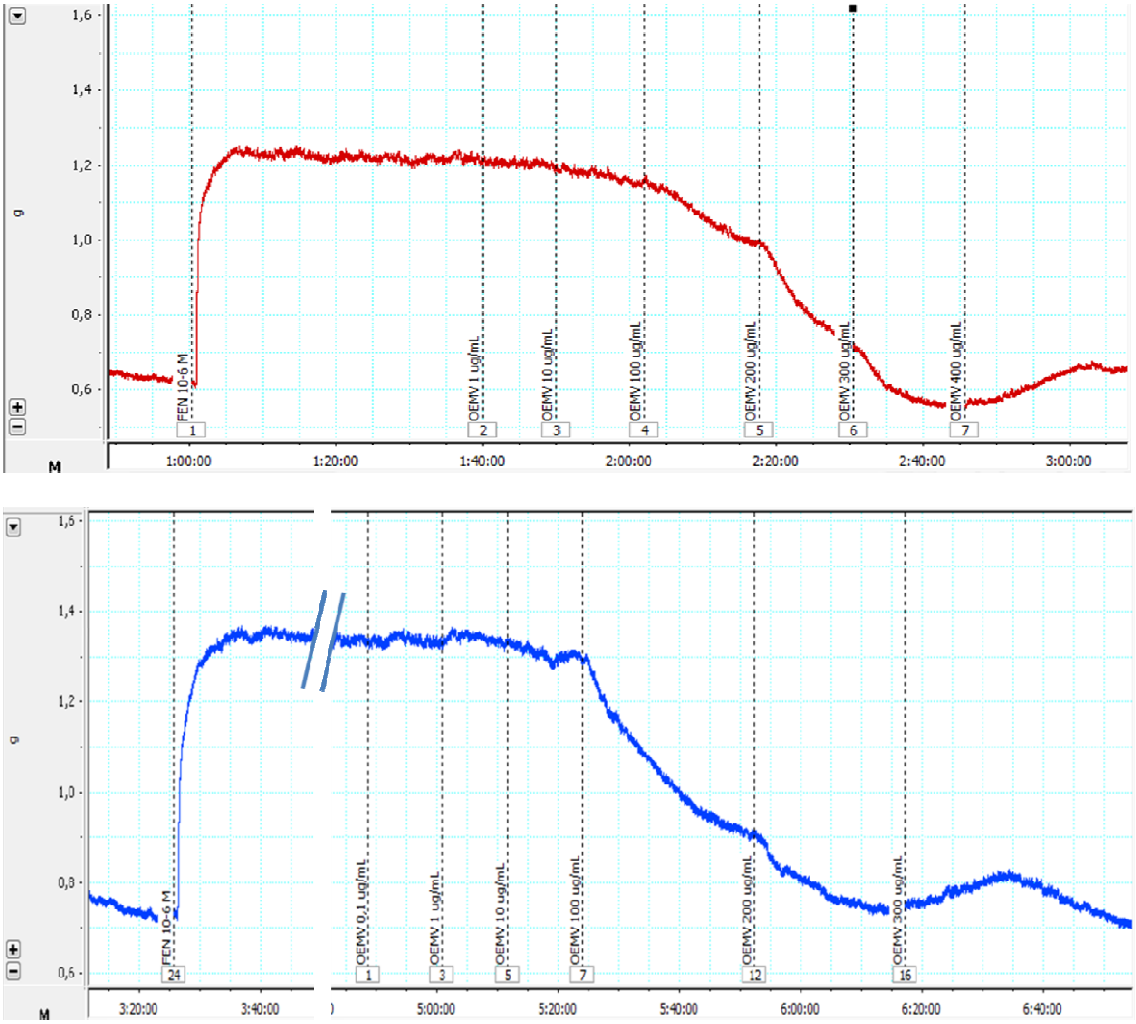


Figura 53. Registro original mostrando o efeito do OEMV (1 – 400 µg/mL) em artéria mesentérica isolada de ratos WKY (acima) e SHR (abaixo). As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações do OEMV.

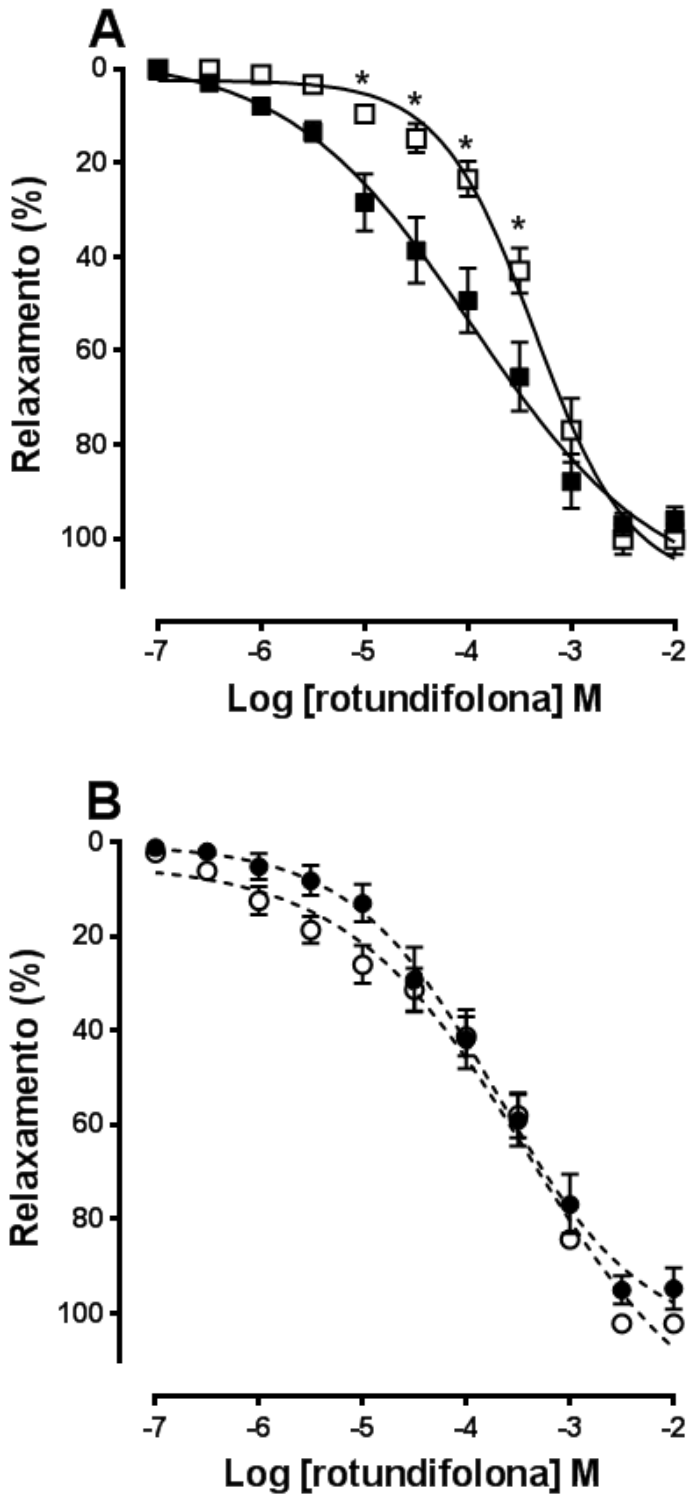


Figura 54. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 µM de FEN em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos WKY e SHR com endotélio funcional ou sem endotélio funcional. Efeito de rotundifolona em ratos (A) WKY (■) com endotélio funcional (n = 6) ou (□) sem endotélio funcional (n = 7) e (B) SHR (●) com endotélio funcional (n = 6) ou (○) sem endotélio funcional (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *$p < 0,05$ (Sem endotélio funcional *vs.* Com endotélio funcional).

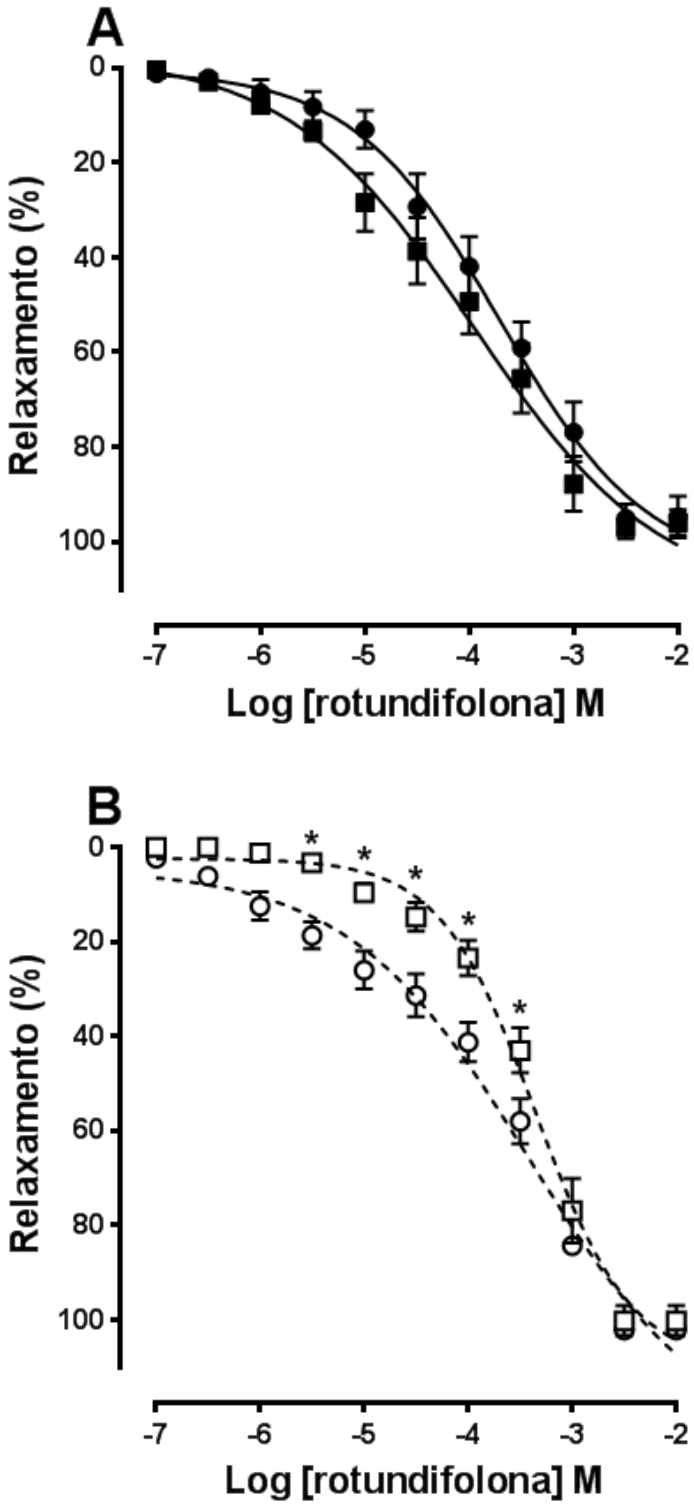


Figura 55. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos WKY ou SHR. Efeito de rotundifolona em (A) anéis com endotélio funcional de ratos (■) WKY (n = 6) e (●) SHR (n = 6) e em (B) anéis sem endotélio functional de ratos (□) WKY (n = 7) e (○) SHR (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

Tabela 15. Resposta de rotundifolona na contração induzida por 1 µM de FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, com ou sem endotélio funcional.

	WKY		SHR	
	$E_{máx}$ (%)	pD_2 (µg/mL)	$E_{máx}$ (%)	pD_2 (µg/mL)
Com Endotélio	95,9 ± 2,6	4,21 ± 0,07	94,7 ± 4,3	3,91 ± 0,06 (*)
Sem Endotélio	100,1 ± 3,1	3,48 ± 0,04 (#)	102,0 ± 1,4	3,89 ± 0,05 (*)

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY), #p < 0.05 (Sem endotélio *vs.* Com endotélio).

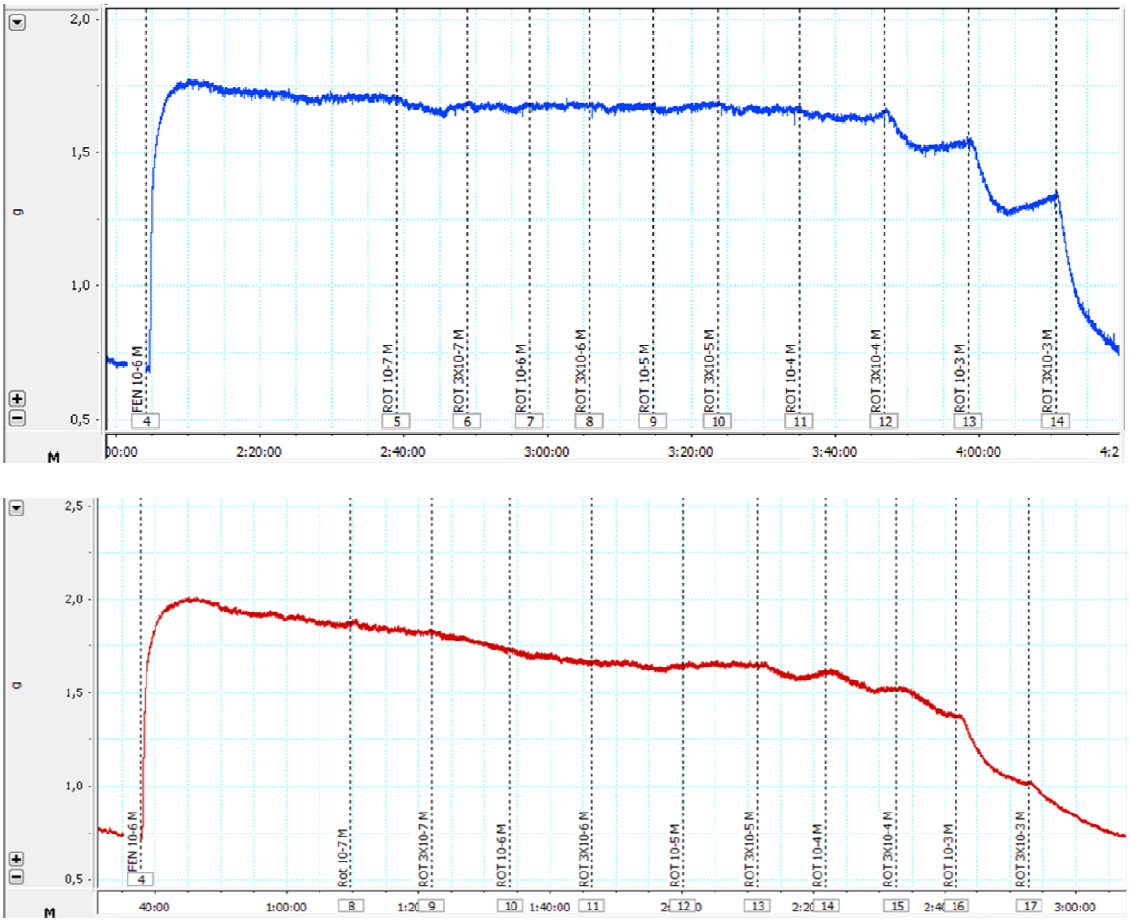


Figura 56. Registro original mostrando o efeito da rotundifolona (10^{-7} – $3x10^{-3}$ M) em artéria mesentérica isolada de ratos WKY (acima) e SHR (abaixo). As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações do rotundifolona.

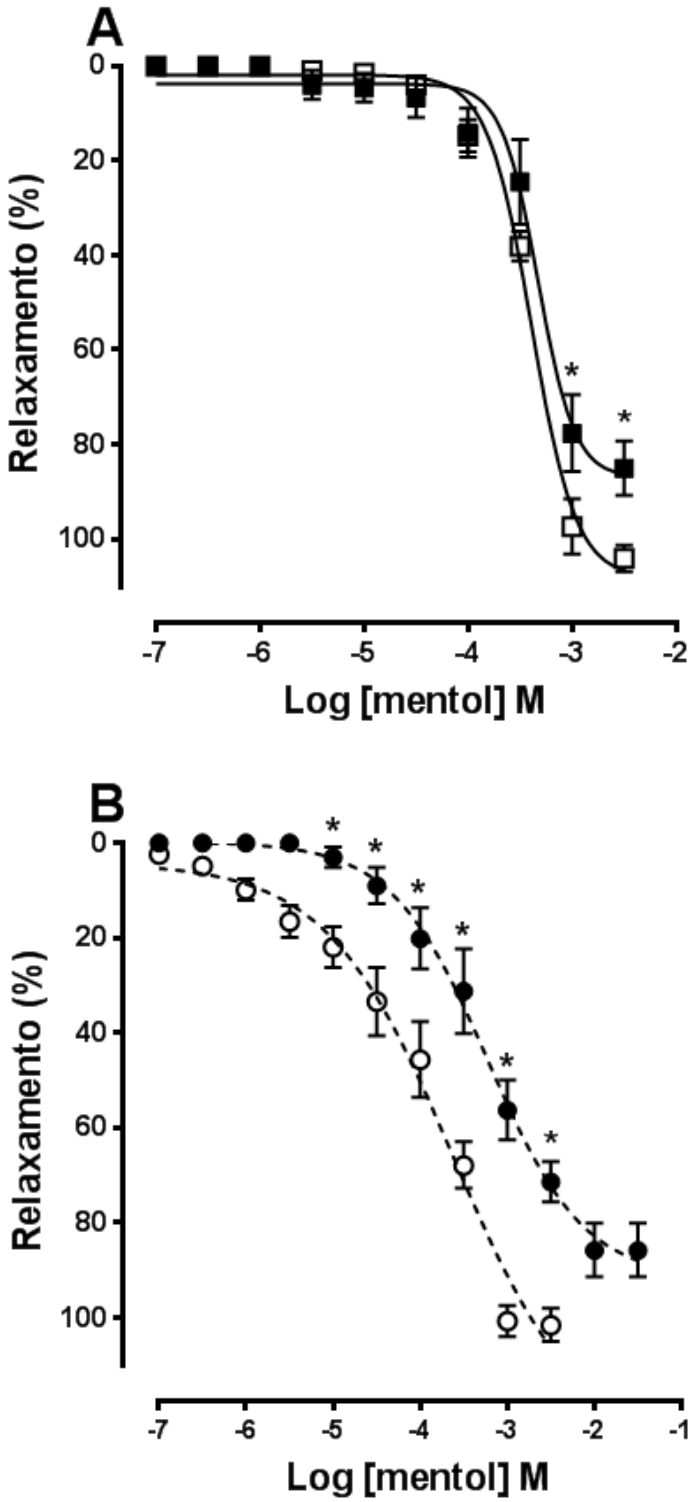


Figura 57. Efeito de mentol na contração induzida por 1 µM de FEN em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos WKY e SHR com endotélio funcional ou sem endotélio funcional. Efeito de mentol em ratos (A) WKY (■) com endotélio funcional (n = 6) ou (□) sem endotélio funcional (n = 5) e (B) SHR (●) com endotélio funcional (n = 7) ou (○) sem endotélio funcional (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (Sem endotélio funcional *vs.* Com endotélio funcional).

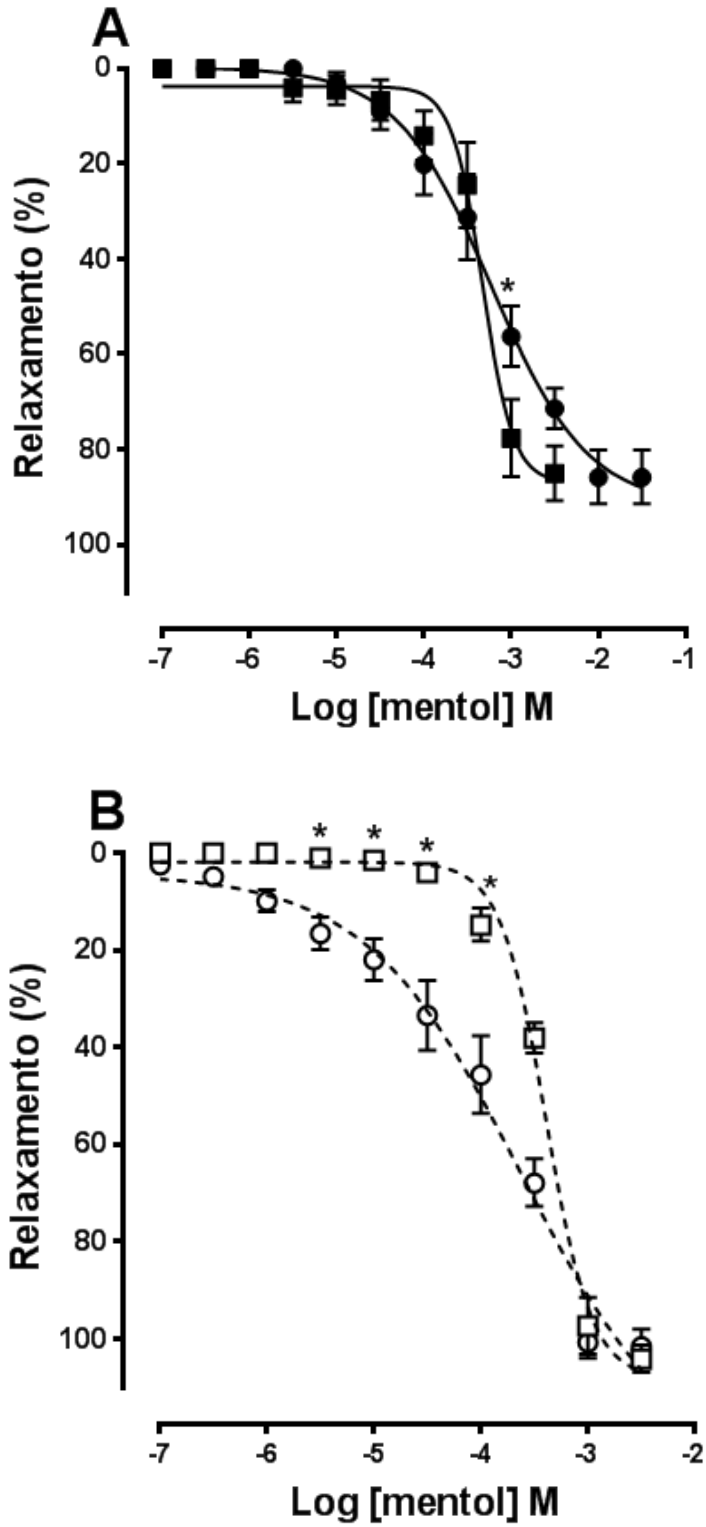


Figura 58. Efeito de mentol na contração induzida por 1 µM de FEN em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos WKY ou SHR. Efeito de mentol em (A) anéis com endotélio funcional de ratos (■) WKY (n = 6) e (●) SHR (n = 7) e em (B) anéis sem endotélio funcional de ratos (□) WKY (n = 5) e (○) SHR (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (SHR *vs.* WKY).

Tabela 16. Resposta de mentol na contração induzida por 1 µM de FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, com ou sem endotélio funcional.

	WKY		SHR	
	$E_{máx}$ (%)	pD_2 (µg/mL)	$E_{máx}$ (%)	pD_2 (µg/mL)
Com Endotélio	84,9 ± 5,7	3,36 ± 0,04	85,7 ± 5,6	3,31 ± 0,06
Sem Endotélio	104,0 ± 2,7	3,42 ± 0,02	101,5 ± 3,4$^{(\#)}$	4,09 ± 0,06$^{(*, \#)}$

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, **p* < 0,05 (SHR *vs.* WKY), $^{\#}p$ < 0.05 (Sem endotélio *vs.* Com endotélio).

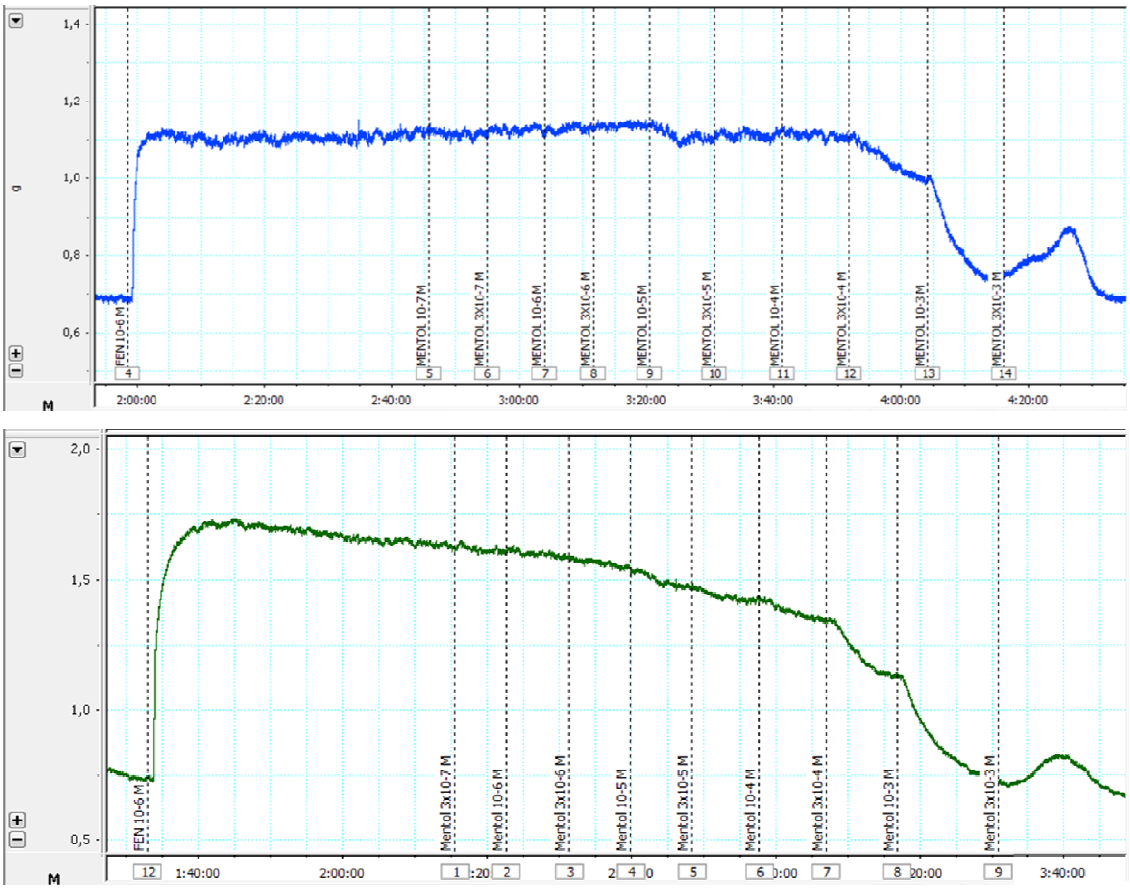


Figura 59. Registro original mostrando o efeito do mentol (10^{-7} – $3x10^{-3}$ M) em artéria mesentérica isolada de ratos WKY (acima) e SHR (abaixo). As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações do mentol.

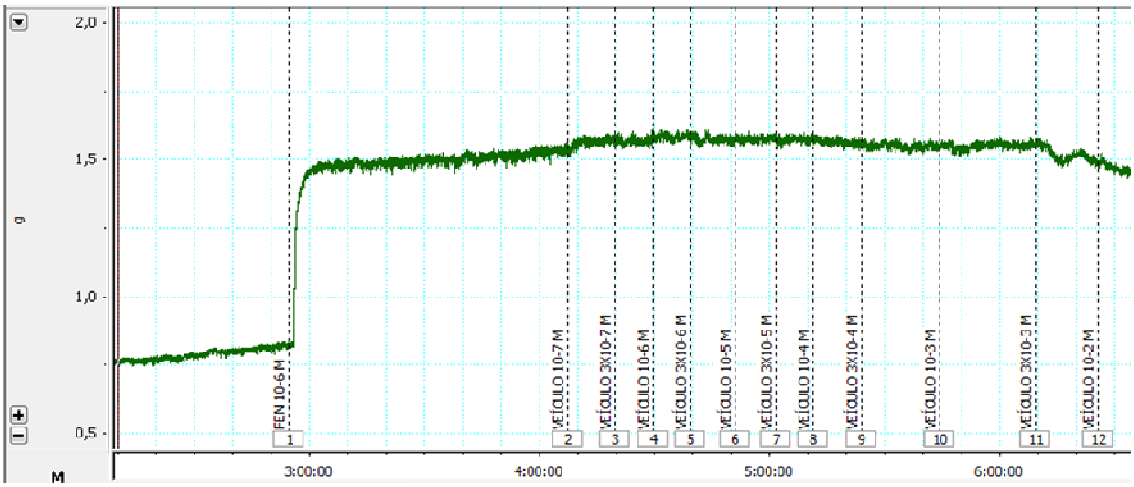


Figura 60. Registro original mostrando o efeito do veículo (10^{-7} – 10^{-2} M) em artéria mesentérica isolada de rato SHR. As linhas tracejadas indicam o momento de adição das concentrações de veículo.

5.3.2.3 Participação de canais TRP na resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona

A resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona em anéis sem endotélio vascular funcional de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY (Tabela 17) foi significativamente atenuada na presença de BCTC (1 ou 10 µM), bloqueador de canais TRPM8 e TRPV1 (Figuras 61 e 62), bem como na presença de AMTB (1 µM), bloqueador seletivo de canais TRPM8 (Figura 63). Esses dados sugerem que os canais TRPM8 estão envolvidos no mecanismo da resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona.

A atenuação da resposta por BCTC (10 µM) foi significativamente maior em ratos SHR (aproximadamente 0,8 vezes) do que em ratos WKY (aproximadamente 0,4 vezes), diminuindo a diferença existente na potência entre as respostas nos ratos SHR e WKY. Esses achados sugerem que os canais TRPM8 provavelmente estariam envolvidos na potencialização observada em ratos SHR.

Em contrapartida, a resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona não foi significativamente atenuada após a dessensibilização dos canais TRPV1 com capsaicina (10 µM), um agonista dos canais TRPV1 (Figura 64), nem na presença de vermelho de rutênio (10 µM), bloqueador não-seletivo dos canais TRPV, TRPC3, TRPM6 e TRPA1 (Figura 65), sugerindo que esses canais provavelmente não estariam envolvidos no mecanismo da resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona.

A resposta induzida pela rotundifolona em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY sem endotélio vascular funcional foi significativamente atenuada também na presença de La^{3+} (100 µM), bloqueador não-seletivo dos canais TRPV, TRPC3 e TRPC6, TRPM3, TRPM4 e TRPM7 (Figura 66), bem como na presença de Gd^{3+} (25 µM), bloqueador dos canais TRPC1, TRPC3, TRPC6 e TRPV4 (Figura 68). Entretanto, não foi observada diferença significativa na presença de Mg^{2+} (2,25 mM), bloqueador do TRPM3, TRPM6 e TRPM7 (Figura 67). Esses dados sugerem a participação dos canais TRPC1, TRPC3 e TRPC6 na resposta induzida por rotundifolona, enquanto provavelmente não haveria a participação de canais TRPM3, TRPM6 e TRPM7.

A atenuação da resposta por La^{3+} (100 µM) e Gd^{3+} (25 µM) foi significativamente maior em ratos SHR (aproximadamente 0,2 vezes) do que em ratos WKY (aproximadamente 0,1 vezes), diminuindo a diferença existente na potência entre as respostas nos ratos SHR e WKY. Além disso, na presença desses bloqueadores, houve uma redução significativa no $E_{máx}$ em ratos SHR, não sendo observada alteração significativa nesse parâmetro em ratos WKY (Tabela 17). Esses achados sugerem que os canais TRPC1, TRPC3 e TRPC6 provavelmente estariam envolvidos na potencialização observada em ratos SHR.

Tabela 17. Resposta de rotundifolona na contração induzida por 1 µM de FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, sem endotélio funcional, na ausência (controle) ou na presença de bloqueadores de canais TRP.

	WKY		**SHR**	
	$E_{máx}$ (%)	**pD_2 (µg/mL)**	**$E_{máx}$ (%)**	**pD_2 (µg/mL)**
Controle	100,1 ± 3,2	3,48 ± 0,04	102,1 ± 1,5	3,89 ± 0,05 (*)
BCTC 1 µM	100,9 ± 3,1	3,06 ± 0,03 (#)	97,5 ± 5,7	3,41 ± 0,04 (*, #)
BCTC 10 µM	100,9 ± 3,1	2,58 ± 0,05 (#)	101,5 ± 4,4	2,21 ± 0,02 (*, #)
AMTB 1 µM	102,8 ± 5,1	2,99 ± 0,03 (#)	98,6 ± 4,9	3,35 ± 0,09 (*, #)
Capsaicina 10 µM	98,2 ± 3,2	3,60 ± 0,06	101,5 ± 4,6	3,73 ± 0,07
Vermelho de rutênio 10 µM	100,9 ± 1,0	3,53 ± 0,05	98,7 ± 2,5	3,81 ± 0,08
Lantânio 100 µM	105,0 ± 4,5	3,16 ± 0,04 (#)	85,5 ± 6,2 (*, #)	3,39 ± 0,06 (*, #)
Magnésio 2,25 mM	106,3 ± 2,6	3,45 ± 0,07	105,0 ± 4,3	3,72 ± 0,05
Gadolínio 25 µM	99,8 ± 3,1	3,20 ± 0,03 (#)	88,9 ± 6,4 (#)	3,33 ± 0,04 (#)

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, **p* < 0,05 (SHR *vs.* WKY), #*p* < 0.05 (*vs.* Controle).

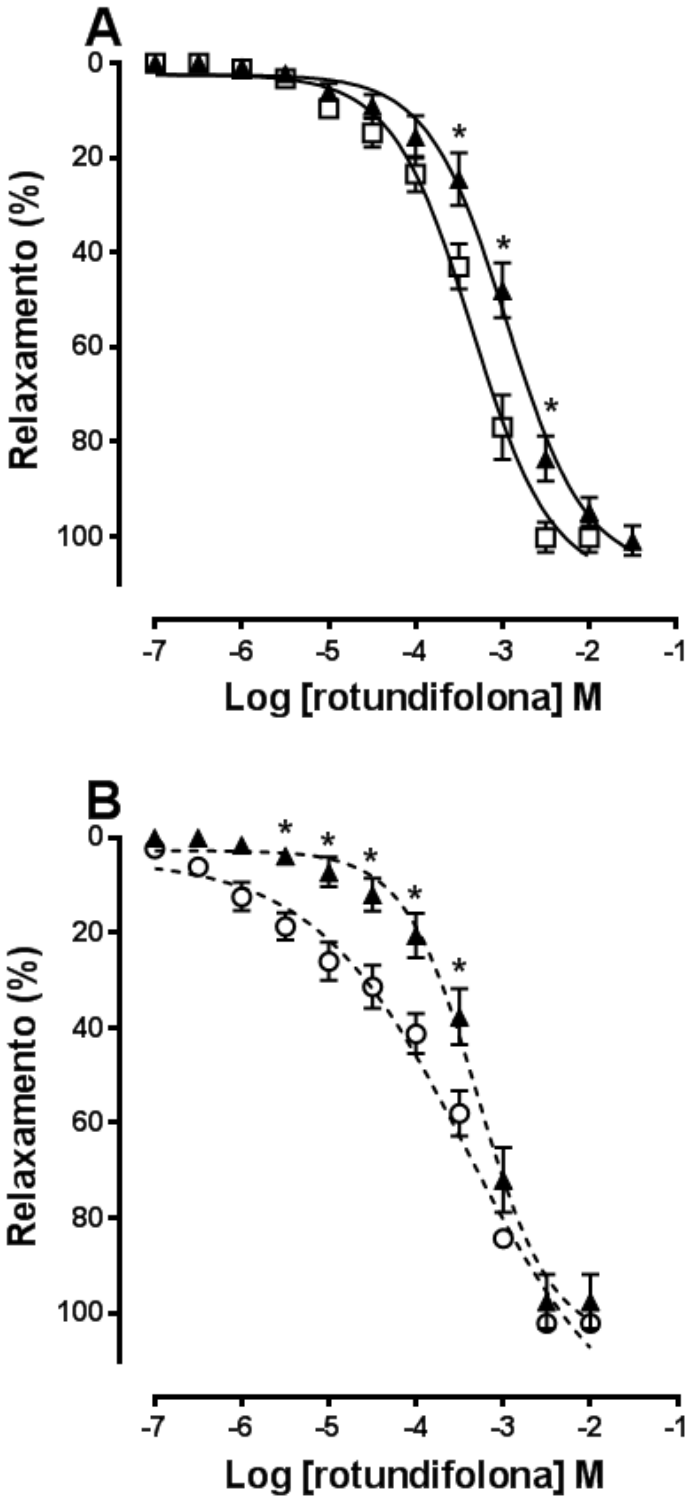


Figura 61. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de BCTC. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (▲) na presença de 1 μM de BCTC (n = 6) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou (▲) na presença de 1 μM de BCTC (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Controle).

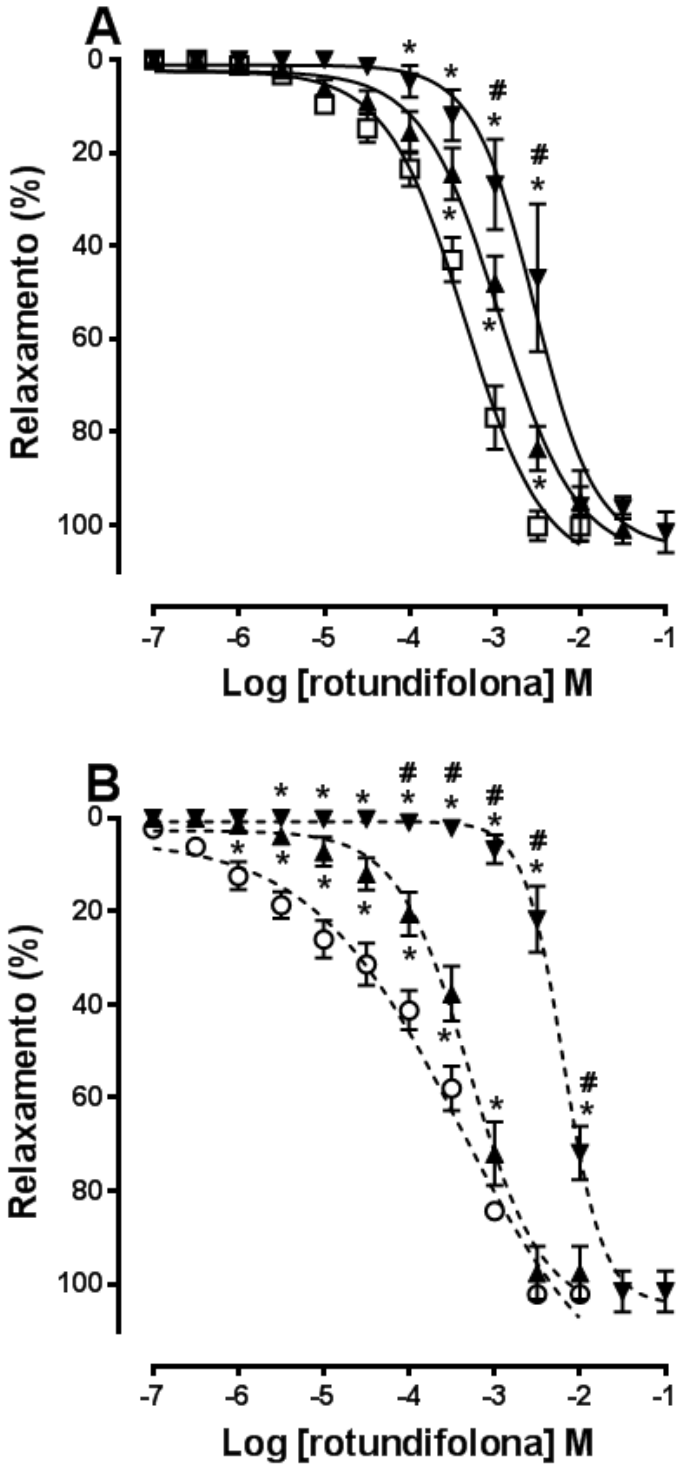


Figura 62. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de BCTC. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou na presença de (▲) 1 μM (n = 9) ou (▼) 10 μM de BCTC (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou na presença de (▲) 1 μM (n = 6) ou (▼) 10 μM de BCTC (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Controle), $^{\#}p$ < 0,05 (10 μM vs. 1 μM de BCTC).

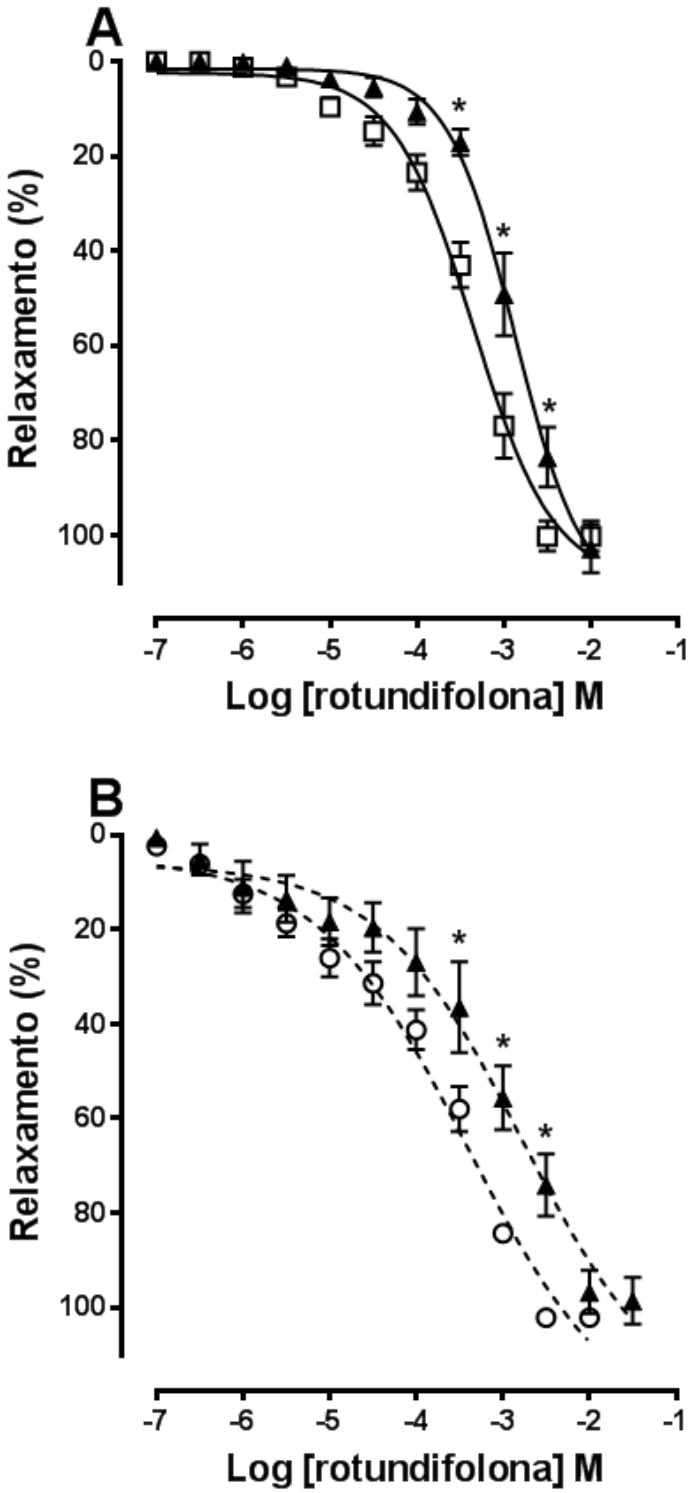


Figura 63. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de AMTB. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (▲) na presença de 1 μM de AMTB (n = 6) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou (▲) na presença de 1 μM de AMTB (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Controle).

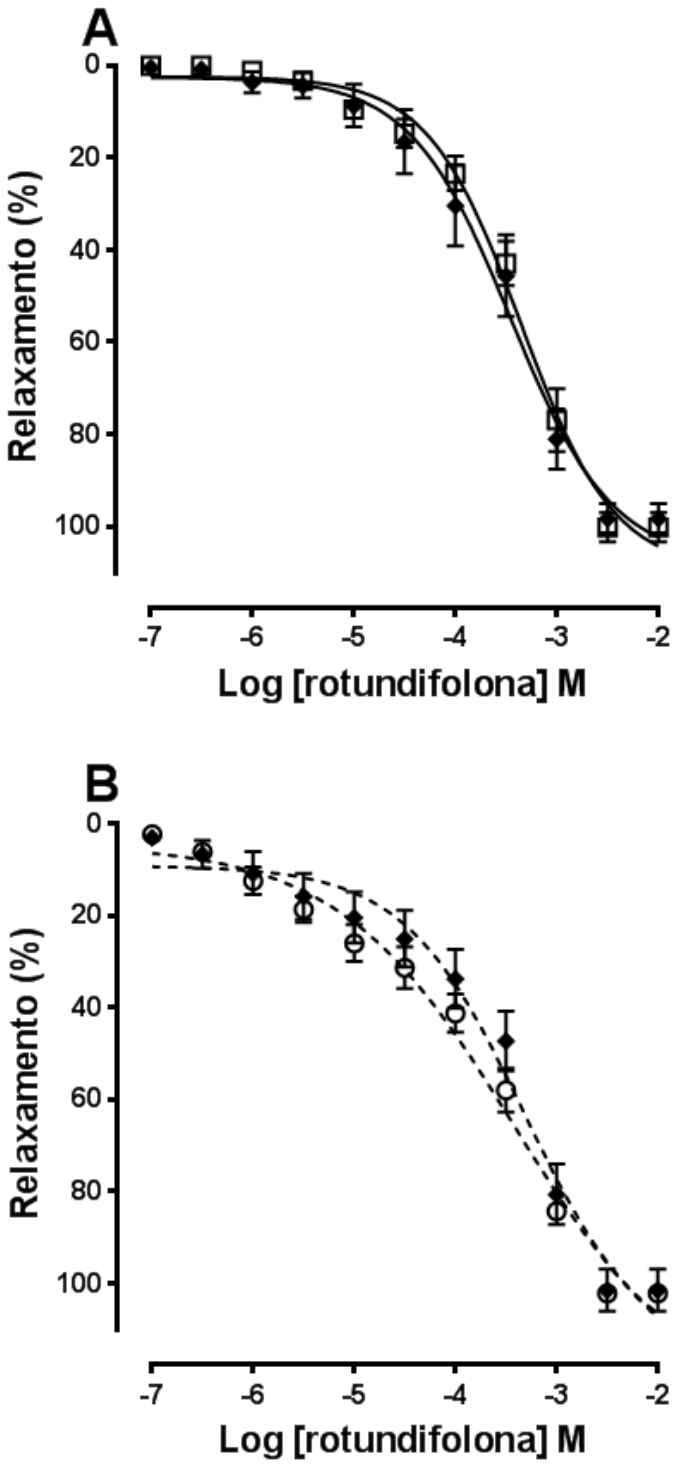


Figura 64. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou após dessensibilização do TRPV1 com capsaicina. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (◆) após dessensibilização do TRPV1 com 10 μM de capsaicina (n = 6) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou (◆) após dessensibilização do TRPV1 com 10 μM de capsaicina (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Controle).

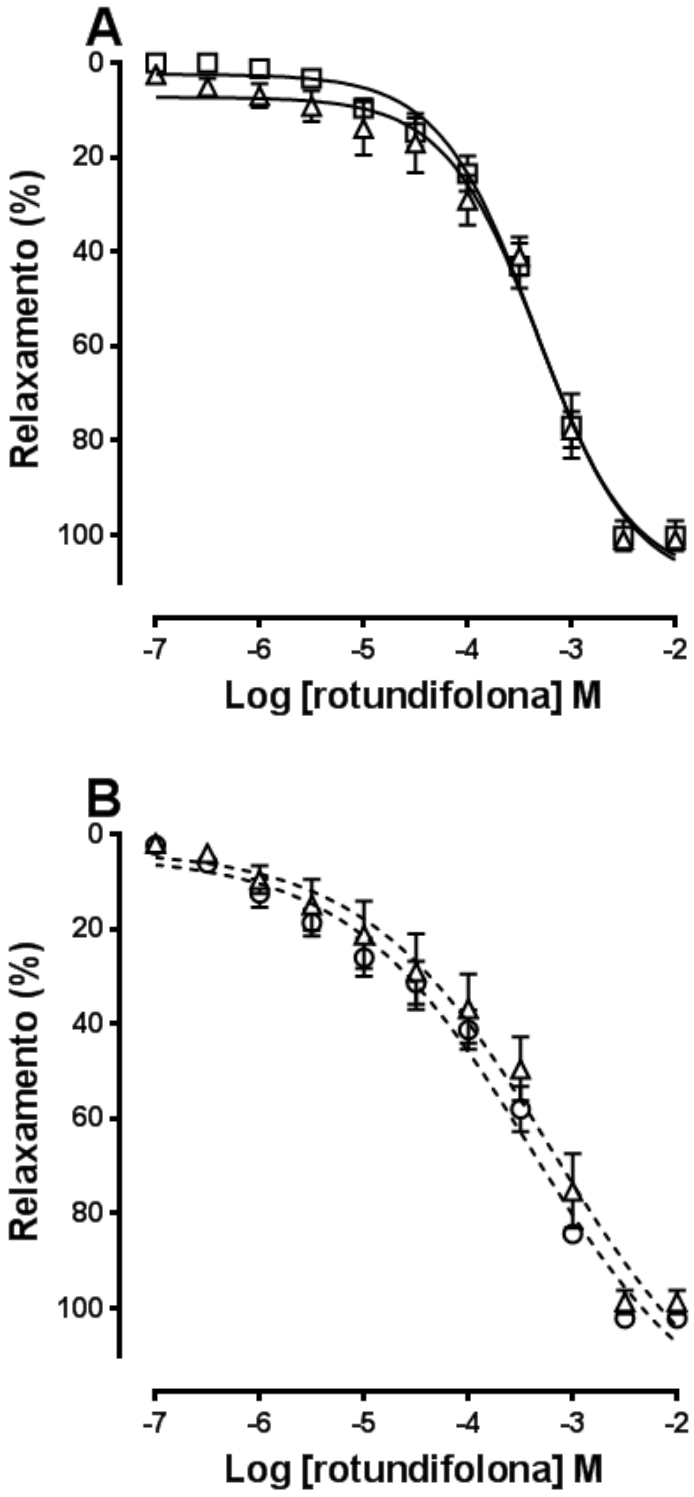


Figura 65. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de vermelho de rutênio. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (△) na presença de 10 μM de vermelho de rutênio (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (n = 6) ou (△) na presença de 10 μM de vermelho de rutênio (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Controle).

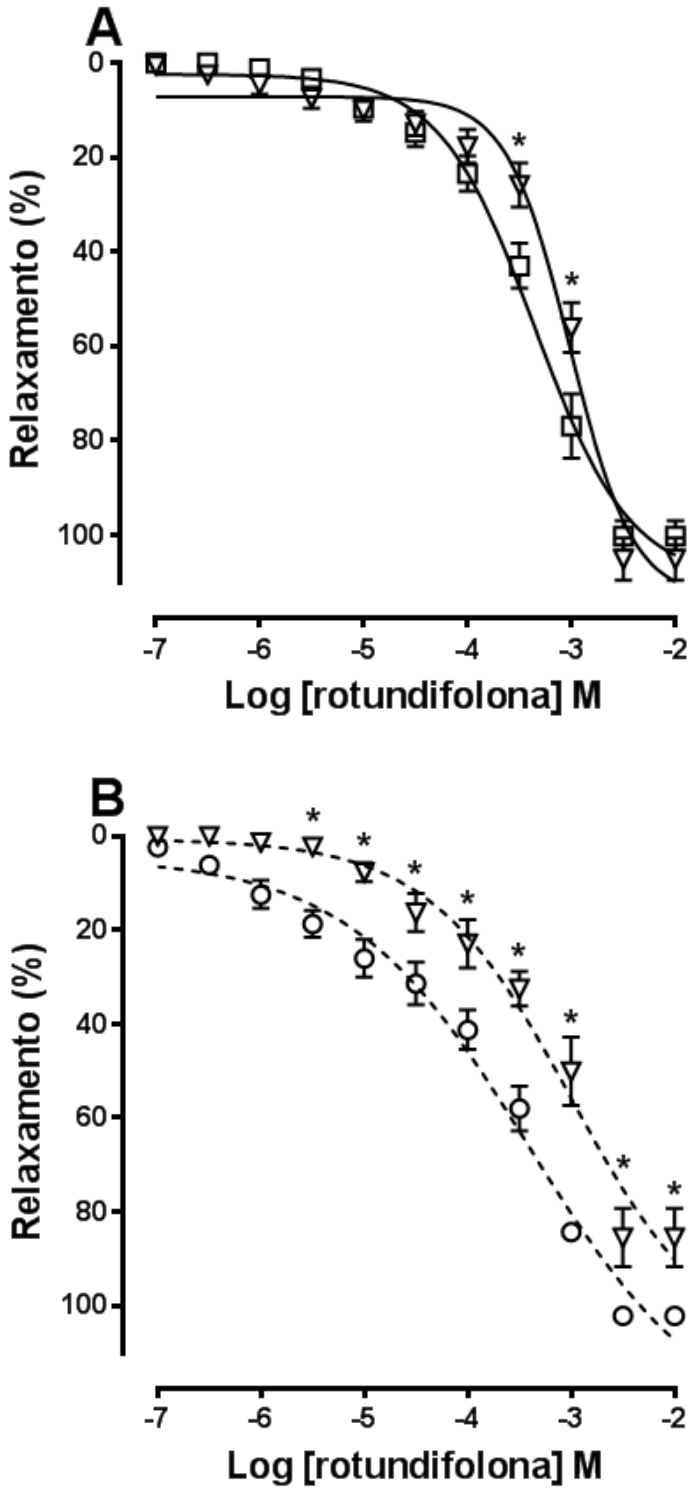


Figura 66. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de La^{3+}. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (▽) na presença de 100 μM de La^{3+} (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou (▽) na presença de 100 μM de La^{3+} (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Controle).

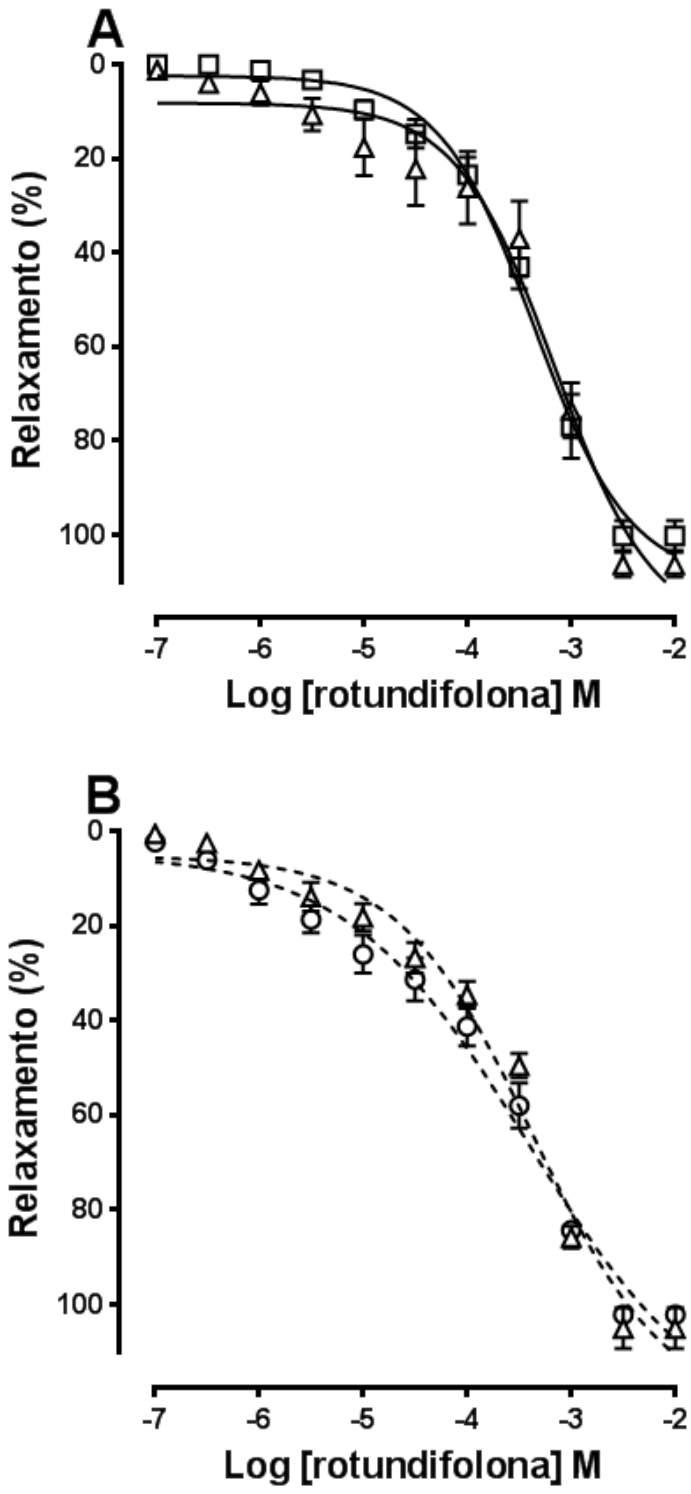


Figura 67. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de Mg^{2+}. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (△) na presença de 2,25 mM de Mg^{2+} (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou (△) na presença de 2,25 mM de Mg^{2+} (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Controle).

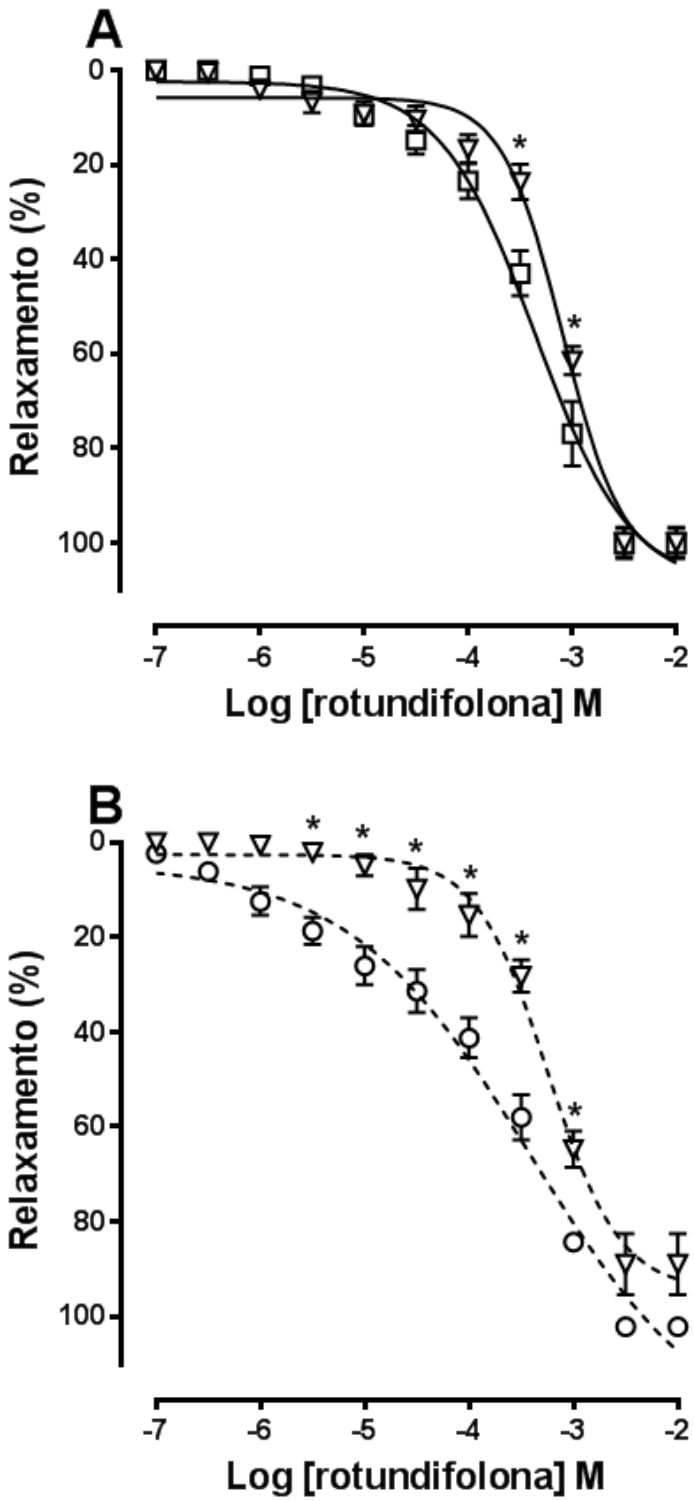


Figura 68. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 µM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de Gd^{3+}. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (▽) na presença de 25 µM de Gd^{3+} (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou (▽) na presença de 25 µM de Gd^{3+} (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Controle).

Os resultados obtidos mostraram que a resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY sem endotélio vascular funcional envolve canais TRPM8 e canais TRPC1, TRPC3 e TRPC6, mas provavelmente não envolve a participação de canais TRPV1 ou de outros canais TRPM, tais como TRPM3, TRPM4, TRPM6 e TRPM7 (Tabela 18).

Tabela 18. Mecanismo envolvido na resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona em artéria mesentérica superior de ratos SHR e WKY.

Mecanismo vasorrelaxante de rotundifolona				
	Ratos WKY		Ratos SHR	
Bloqueador	***p* < 0,05**	**Canais TRP**	***p* < 0,05**	**Canais TRP**
BCTC (1 e 10 µM)	SIM	~~TRPV1~~, TRPM8	SIM	~~TRPV1~~, TRPM8
AMTB (1 µM)	SIM	TRPM8	SIM	TRPM8
Capsaicina (10 µM)	NÃO	~~TRPV1~~	NÃO	~~TRPV1~~
Vermelho de rutênio (10 µM)	NÃO	~~TRPV~~, ~~TRPC3~~, ~~TRPM6~~, ~~TRPA1~~	NÃO	~~TRPV~~, ~~TRPC3~~, ~~TRPM6~~, ~~TRPA1~~
La^{3+} (100 µM)	SIM	~~TRPV~~, TRPC3, TRPC6, ~~TRPM3~~, ~~TRPM4~~, ~~TRPM7~~	SIM	~~TRPV~~, TRPC3, TRPC6, ~~TRPM3~~, ~~TRPM4~~, ~~TRPM7~~
Mg^{2+} (2,25 mM)	NÃO	~~TRPM3~~, ~~TRPM6~~, ~~TRPM7~~	NÃO	~~TRPM3~~, ~~TRPM6~~, ~~TRPM7~~
Gd^{3+} (25 µM)	SIM	TRPC1, TRPC3, TRPC6, ~~TRPV4~~	SIM	TRPC1, TRPC3, TRPC6, ~~TRPV4~~

Os círculos destacam os canais provavelmente ativados ou inibidos pela rotundifolona e as barras representam os canais que provavelmente não estão envolvidos no mecanismo da resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona.

5.3.2.4 Participação de canais TRP na resposta vasorrelaxante induzida pelo mentol

A resposta vasorrelaxante induzida pelo mentol em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR sem endotélio vascular funcional (Tabela 19) foi significativamente atenuada na presença de BCTC (1 ou 10 µM), bloqueador de canais TRPM8 e TRPV1 (aproximadamente 0,1 e 0,2 vezes respectivamente) ou AMTB (1 µM) bloqueador seletivo de canais TRPM8 (aproximadamente 0,15 vezes) (Figura 69B, 70B e 71B respectivamente). Entretanto, em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY não foi observada atenuação significativa na presença de BCTC (1 ou 10 µM) (Figuras 69A e 70A) ou AMTB (1 µM) (Figura 71A).

Esses achados sugerem que os canais TRPM8 estão envolvidos no mecanismo da resposta vasorrelaxante induzida pelo mentol em ratos SHR, não sendo possível afirmar o envolvimento desses canais na resposta observada nos ratos WKY. Essa diferença sugere que provavelmente os canais TRPM8 estariam participando na potencialização observada em ratos SHR.

Além disso, a resposta vasorrelaxante induzida pelo mentol (Tabela 19) em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR não foi significativamente atenuada após a dessensibilização do TRPV1 com capsaicina (10 µM), um agonista dos canais TRPV1 (Figura 72). Sugerindo que os canais TRPV1 provavelmente não estão envolvidos na resposta vasorrelaxante induzida por mentol em ratos WKY e SHR.

Em contrapartida, a resposta vasorrelaxante induzida pelo mentol em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR foi significativamente potencializada na presença de vermelho de rutênio (10 µM), bloqueador não-seletivo dos canais TRPV, TRPC3, TRPM6 e TRPA1 (Figura 73), sendo essa potencialização maior em ratos WKY (aproximadamente 0,12 vezes) do que em ratos SHR (aproximadamente 0,1 vezes).

De forma semelhante, em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY, a resposta vasorrelaxante induzida por mentol foi potencializada na presença de La^{3+} (100 µM), bloqueador não-seletivo de

TRPV, TRPC3 e 6, TRPM3, TRPM4 e TRPM7 (aproximadamente 0,2 vezes) (Figura 74A) e na presença de Mg^{2+} (2,25 mM), bloqueador do TRPM3, TRPM6 e TRPM7 (aproximadamente 0,1 vezes) (Figura 75A). Entretanto, não foi observada diferença significativa na presença de Gd^{3+} (25 µM), bloqueador dos TRPC1, TRPC3, TRPC6 e TRPV4 (Figura 76A). Esses dados sugerem que, em ratos WKY, o mentol exerce também uma resposta contrária ao vasorrelaxamento, que pode envolver provavelmente canais TRPM6 e TRPM7.

Por outro lado, em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR, a resposta induzida por mentol foi significativamente atenuada (aproximadamente 0,1 vezes) na presença de La^{3+} (Figura 74B) e na presença de Gd^{3+} (25 µM), bloqueador dos TRPC1, TRPC3, TRPC6 e TRPV4 (Figura 76B), não sendo observada diferença significativa na presença de Mg^{2+} (Figura 75B). Esses dados sugerem a participação de canais TRPC1, TRPC3 e TRPC6 na resposta induzida por mentol em ratos SHR, e demonstra que provavelmente não há a participação de canais TRPM3, TRPM6 e TRPM7 em ratos SHR.

Tabela 19. Resposta de mentol na contração induzida por 1 µM de FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, sem endotélio funcional, na ausência (controle) ou na presença de bloqueadores de canais TRP.

	WKY		**SHR**	
	$E_{máx}$ (%)	**pD_2 (µg/mL)**	**$E_{máx}$ (%)**	**pD_2 (µg/mL)**
Controle	104,1 ± 2,8	3,42 ± 0,02	101,5 ± 3,5	4,03 ± 0,06 (*)
BCTC 1 µM	104,1 ± 1,9	3,49 ± 0,01	106,3 ± 2,3	3,66 ± 0,02 (*,#)
BCTC 10 µM	104,6 ± 5,4	3,47 ± 0,02	98,9 ± 5,2	3,31 ± 0,03 (*,#)
AMTB 1 µM	99,6 ± 5,8	3,70 ± 0,05 (#)	101,5 ± 3,5	3,52 ± 0,04 (*,#)
Capsaicina 10 µM	108,8 ± 2,4	3,44 ± 0,03	101,1 ± 3,5	3,80 ± 0,02 (*)
Vermelho de rutênio 10 µM	90,1 ± 5,6	3,84 ± 0,05 (#)	99,9 ± 3,7	4,40 ± 0,06 (*,#)
Lantânio 100 µM	96,4 ± 2,6	3,98 ± 0,02 (#)	101,4 ± 1,4	3,66 ± 0,05 (*,#)
Magnésio 2,25 mM	106,0 ± 3,2	3,86 ± 0,05 (#)	90,9 ± 5,8	4,13 ± 0,08 (*)
Gadolínio 25 µM	98,3 ± 5,4	3,58 ± 0,04	108,7 ± 4,8	3,62 ± 0,03 (#)

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, **p* < 0,05 (SHR *vs.* WKY), $^{\#}p$ < 0.05 (*vs.* Controle).

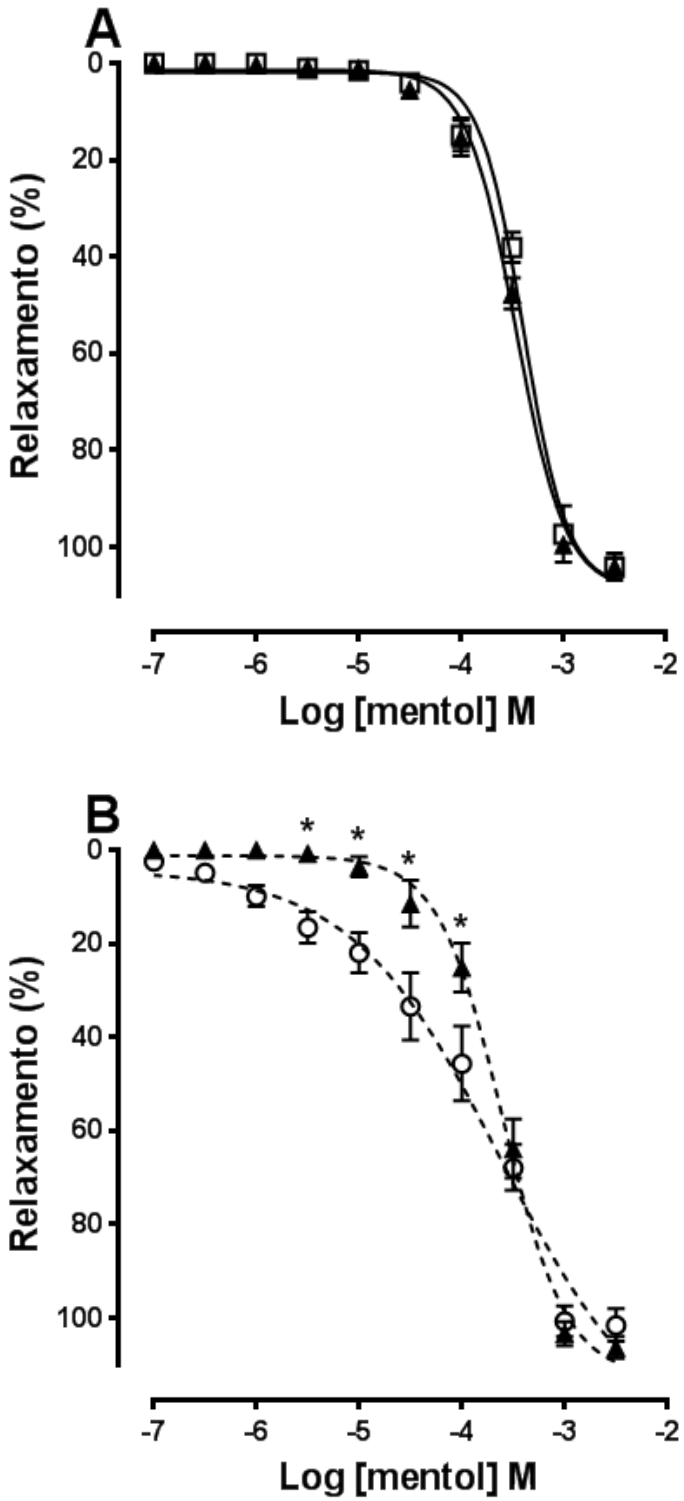


Figura 69. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de BCTC. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou na presença de (▲) 1 μM de BCTC (n = 6) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou na presença de (▲) 1 μM de BCTC (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *$p < 0,05$ (*vs.* Controle).

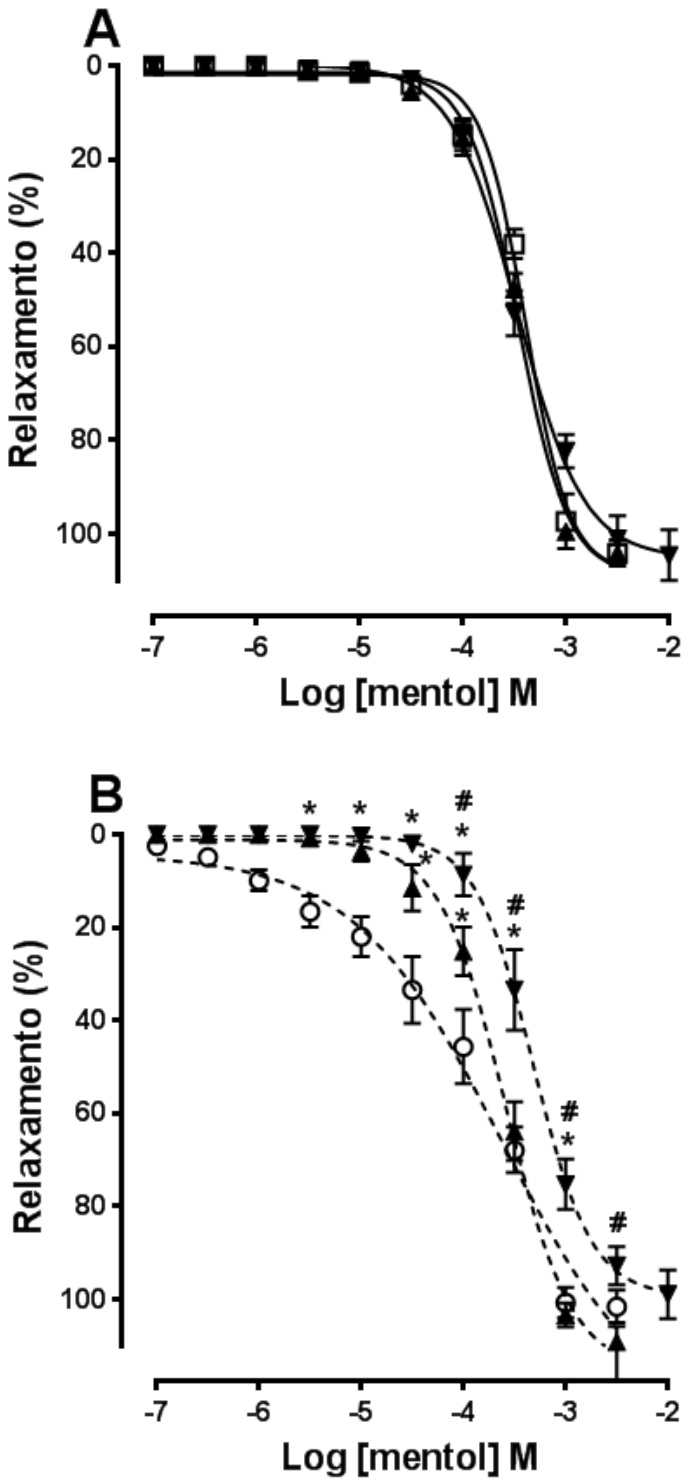


Figura 70. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de BCTC. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou na presença de (▲) 1 μM (n = 6) ou (▼) 10 μM de BCTC (n = 9) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou na presença de (▲) 1 μM (n = 7) ou (▼) 10 μM de BCTC (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0.05 (*vs.* Controle), $^{\#}p$ < 0,05 (10 μM vs. 1 μM de BCTC).

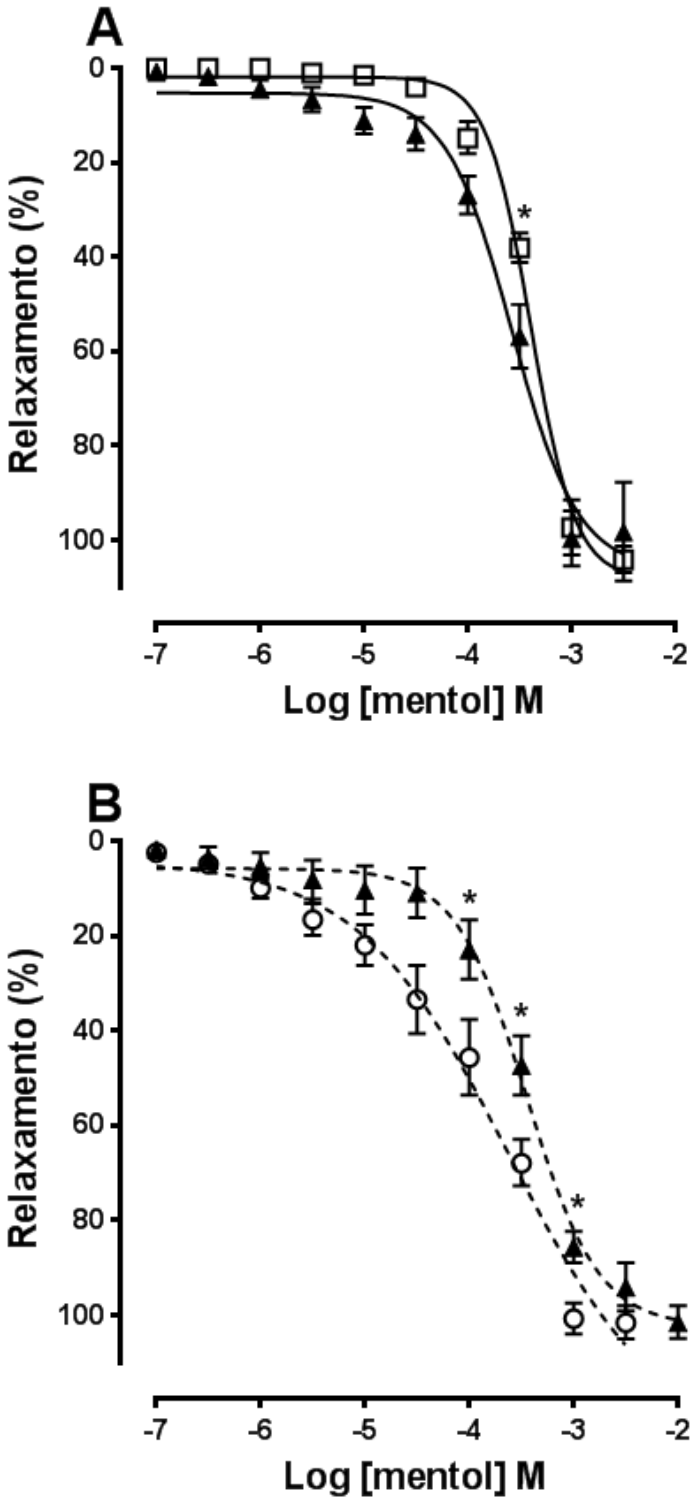


Figura 71. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de AMTB. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou (▲) na presença de 1 μM de AMTB (n = 7) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou (▲) na presença de 1 μM de AMTB (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *$p < 0,05$ (*vs.* Controle).

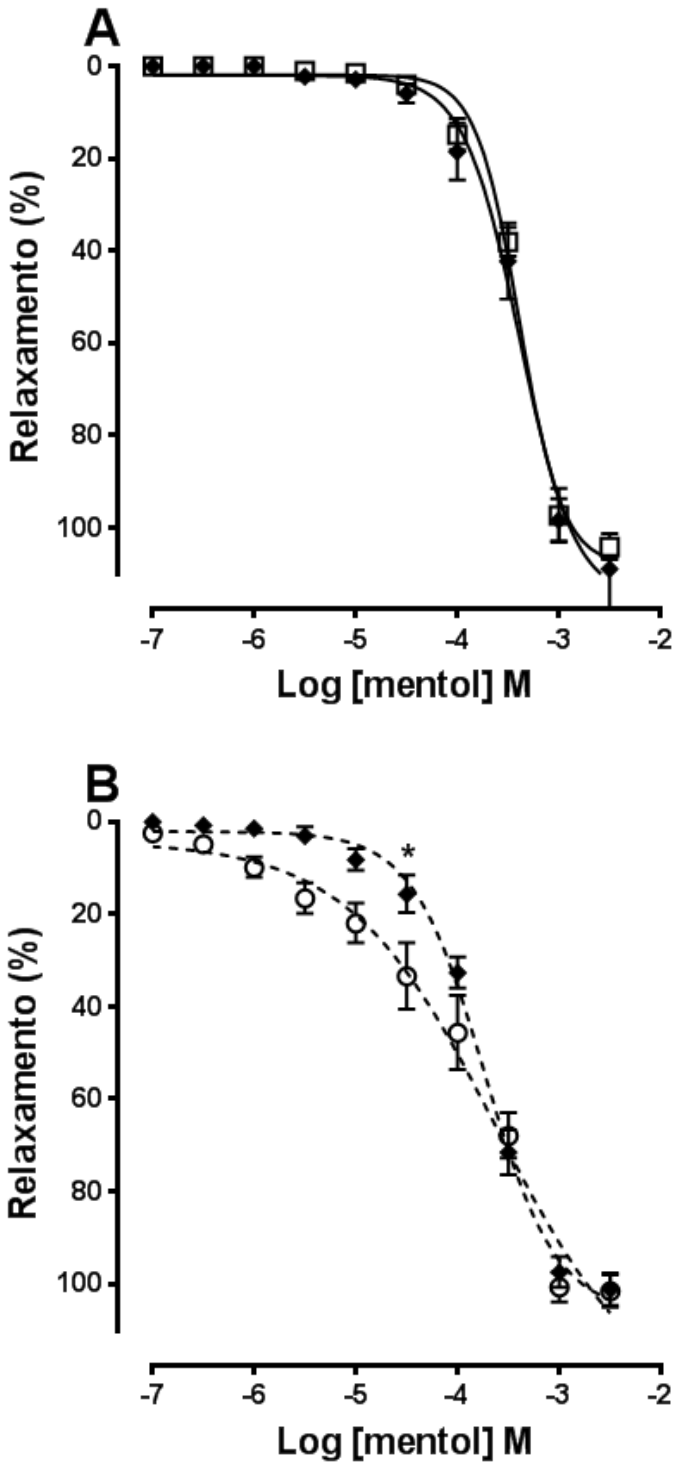


Figura 72. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou após dessensibilização do TRPV1 com capsaicina. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou (◆) após dessensibilização do TRPV1 com 10 μM de capsaicina (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou (◆) após dessensibilização do TRPV1 com 10 μM de capsaicina (n = 6). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Controle).

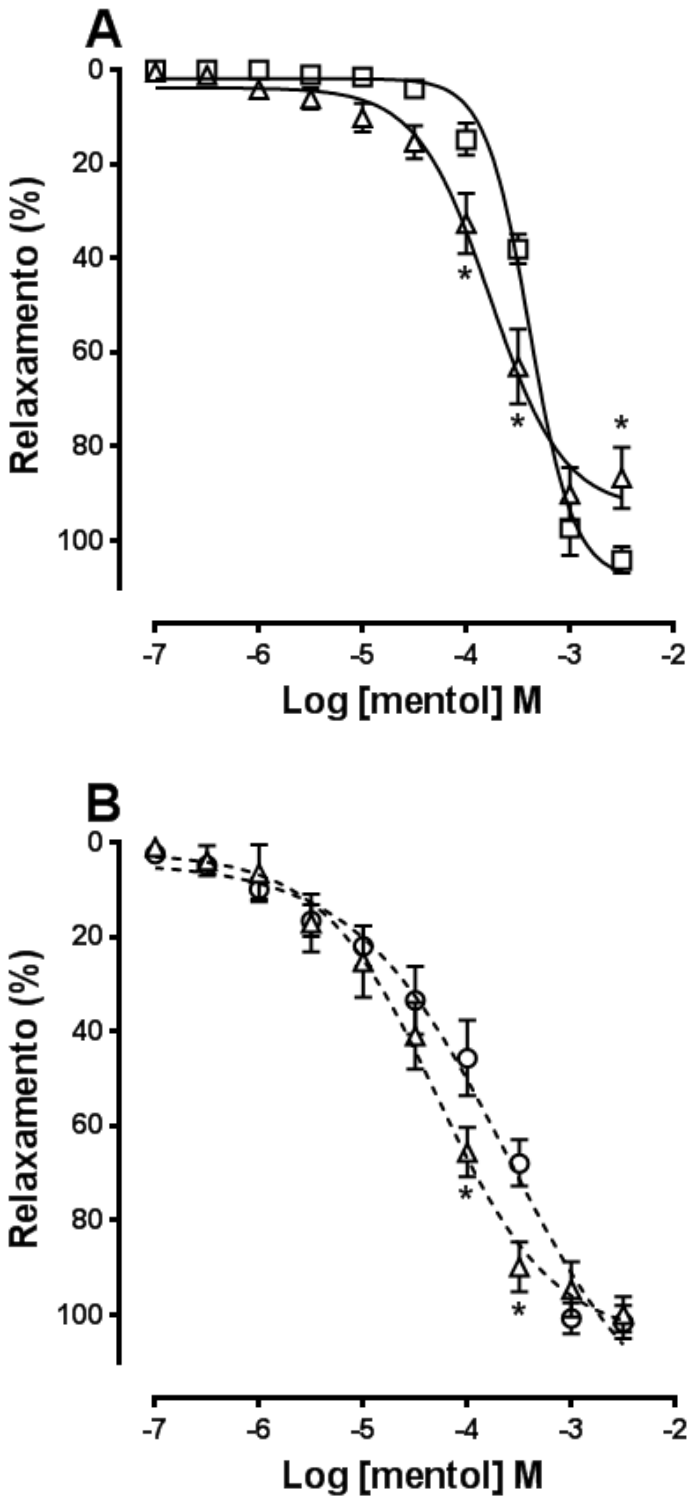


Figura 73. Efeito de mentol na contração induzida por 1 µM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de vermelho de rutênio. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou (△) na presença de vermelho de rutênio (n = 7) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou (△) na presença de 10 µM de vermelho de rutênio (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle).

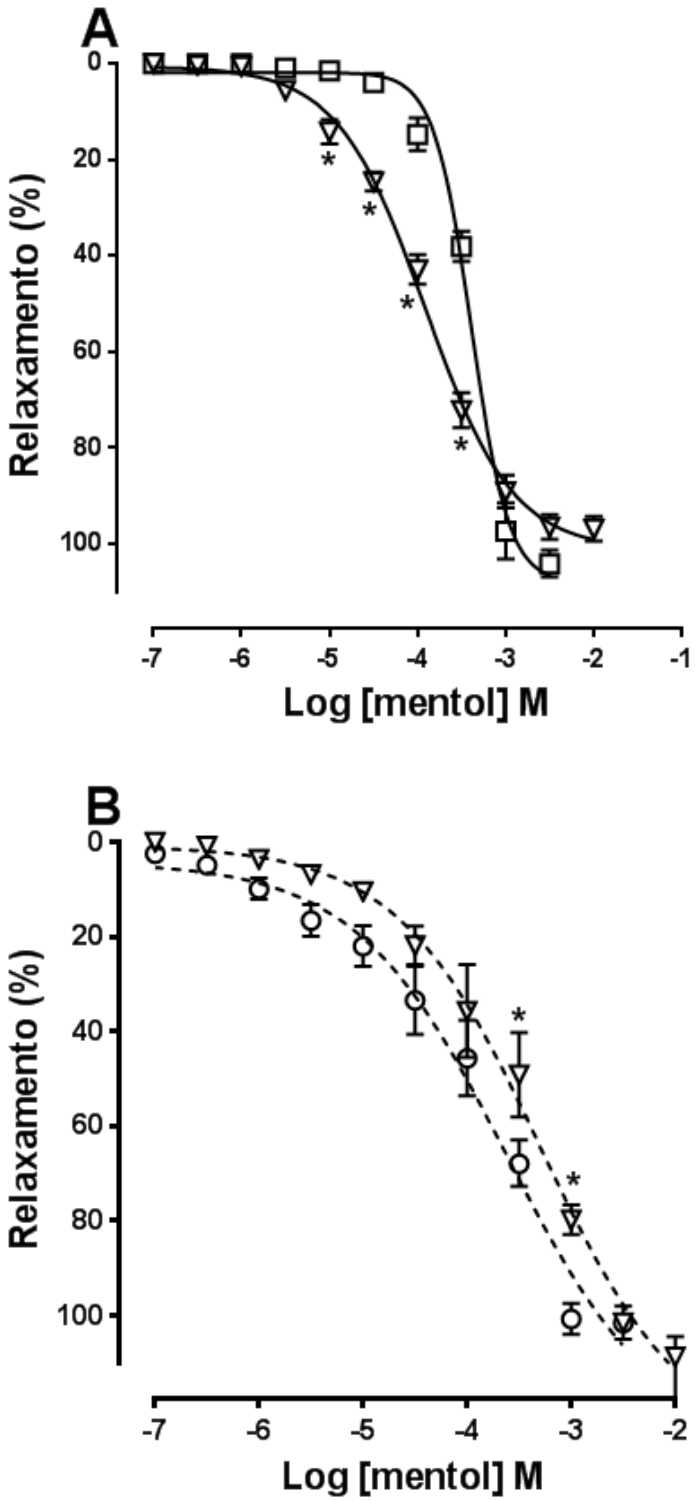


Figura 74. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de La^{3+}. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou (▽) na presença de 100 μM de La^{3+} (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou (▽) na presença de 100 μM de La^{3+} (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle).

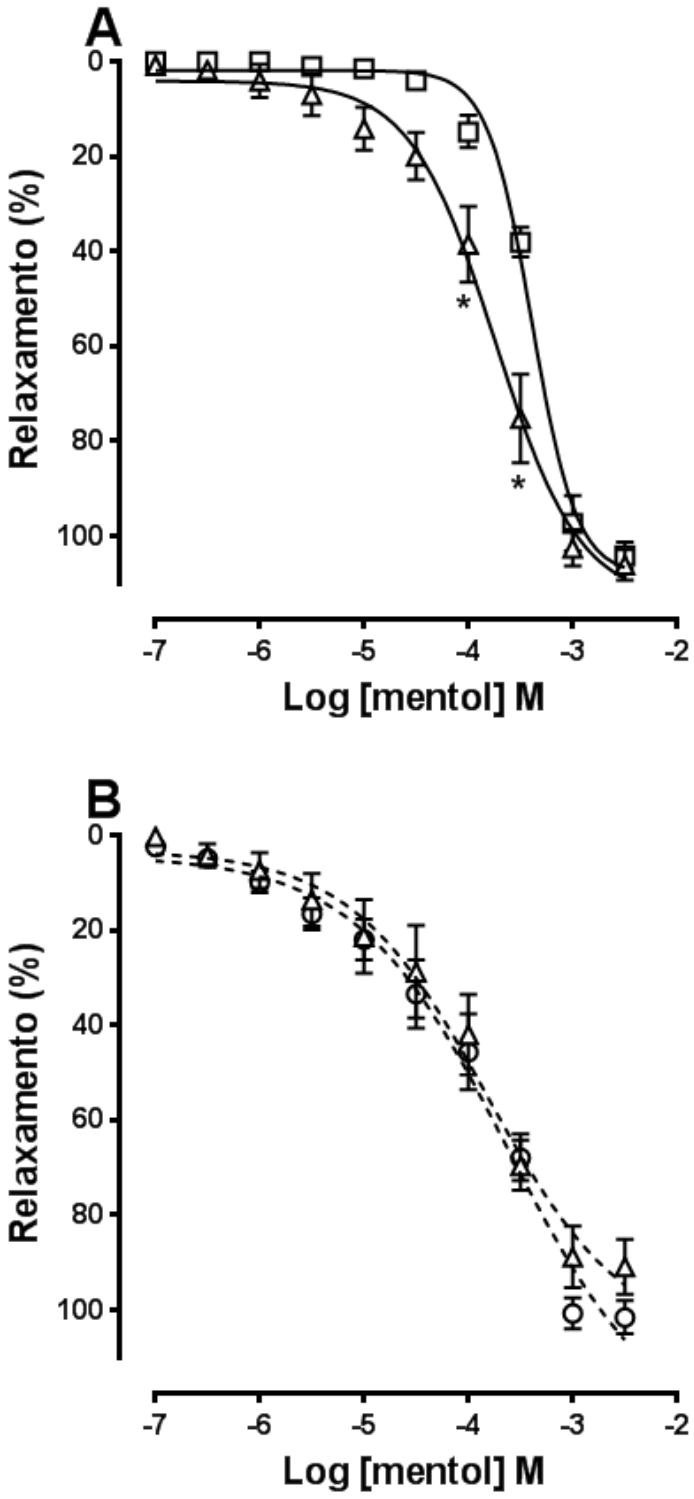


Figura 75. Efeito de mentol na contração induzida por 1 µM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de Mg^{2+}. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou (△) na presença de 2,25 mM de Mg^{2+} (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou (△) na presença de 2,25 mM de Mg^{2+} (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle).

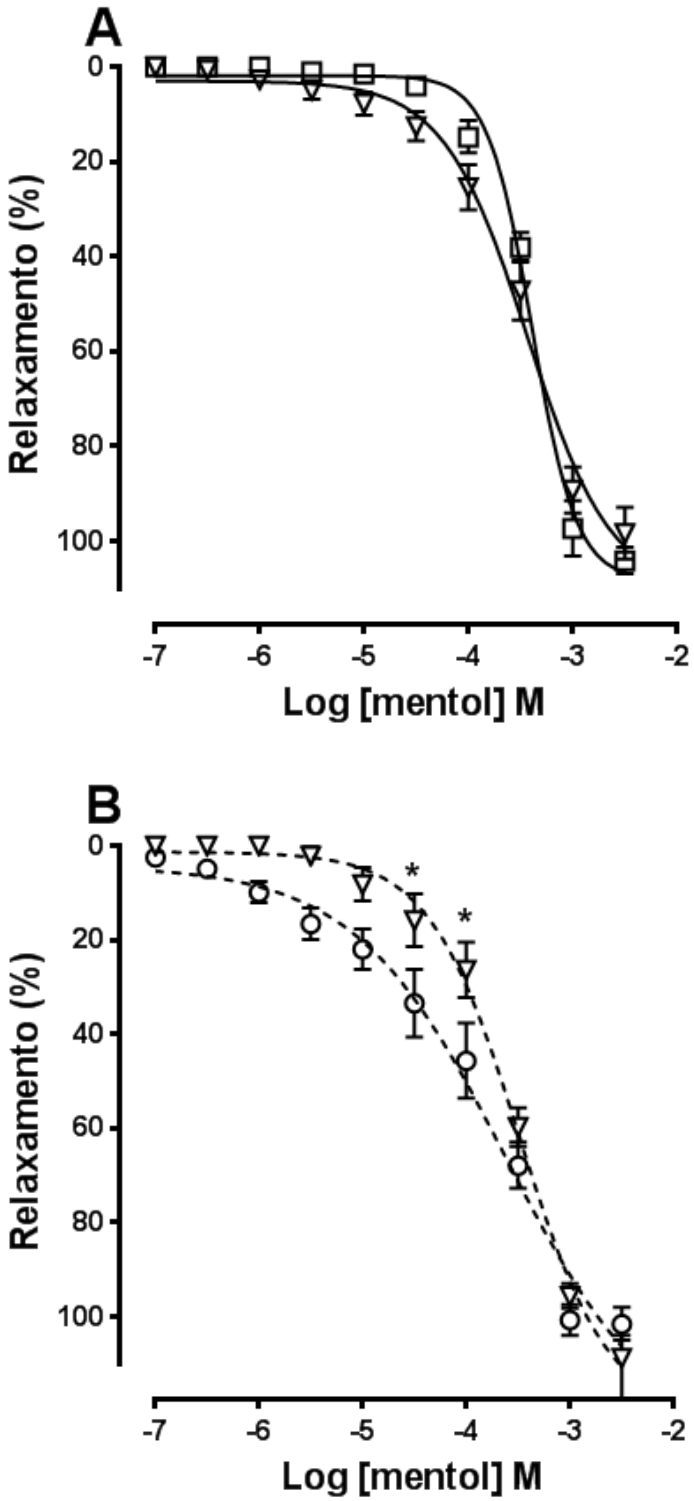


Figura 76. Efeito de mentol na contração induzida por 1 µM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de Gd^{3+}. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou (▽) na presença de 25 µM de Gd^{3+} (n = 5) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou (▽) na presença de 25 µM de Gd^{3+} (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Controle).

Os resultados obtidos mostram que a resposta vasorrelaxante induzida por mentol em anéis de artérias mesentéricas superiores envolve canais TRPM8, e TRPC (provavelmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6) em ratos SHR. Entretanto, em ratos WKY o mentol estaria atuando em outros canais TRP, provavelmente TRPM6 e TRPM7 (Tabela 20).

Tabela 20. Mecanismo envolvido na resposta vasorrelaxante induzida pelo mentol em artéria mesentérica superior de ratos SHR e WKY.

	Mecanismo vasorrelaxante de mentol			
	Ratos WKY		Ratos SHR	
Bloqueador	***p* < 0,05**	**Canais TRP**	***p* < 0,05**	**Canais TRP**
BCTC (1 e 10 µM)	NÃO	~~TRPV1~~, ~~TRPM8~~	SIM	TRPV1, TRPM8
AMTB (1 µM)	NÃO	~~TRPM8~~	SIM	TRPM8
Capsaicina (10 µM)	NÃO	~~TRPV1~~	NÃO	~~TRPV1~~
Vermelho de rutênio (10 µM)	SIM	~~TRPV~~, ~~TRPC3~~, TRPM6, TRPA1	SIM	~~TRPV~~, ~~TRPC3~~, TRPM6, TRPA1
La^{3+} (100 µM)	SIM	~~TRPV~~, ~~TRPC3~~, ~~TRPC6~~, TRPM3, TRPM4, TRPM7	SIM	~~TRPV~~, TRPC3, TRPC6, TRPM3, TRPM4, TRPM7
Mg^{2+} (2,25 mM)	SIM	TRPM3, TRPM6, TRPM7	NÃO	~~TRPM3~~, ~~TRPM6~~, ~~TRPM7~~
Gd^{3+} (25 µM)	NÃO	~~TRPC1~~, ~~TRPC3~~, ~~TRPC6~~, ~~TRPV4~~	SIM	TRPC1, TRPC3, TRPC6, ~~TRPV4~~

Os círculos destacam os canais provavelmente ativados ou inibidos pelo mentol e as barras representam os canais que provavelmente não estão envolvidos no mecanismo da resposta vasorrelaxante induzida pelo mentol.

5.3.2.5 Participação de canais sensíveis a voltagem na resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona ou pelo mentol

A rotundifolona induziu resposta vasorrelaxante significativa em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY, pré-contraídos com KCl (60 mM), sendo esta resposta menos potente quando comparada com aquela observada nas contrações induzidas por FEN em ratos SHR (aproximadamente 0,5 vezes) e em ratos WKY (aproximadamente 0,3 vezes) (Tabela 21, Figura 77).

De forma semelhante, o mentol também induziu resposta vasorrelaxante significativa em anéis de ratos SHR e WKY, pré-contraídos com KCl (60 mM), sendo significativamente menos potente (aproximadamente 0,15 vezes) em ratos SHR, e apresentando resposta máxima significativamente reduzida (aproximadamente 20 %) em ratos WKY, quando comparada com aquela observada nas contrações induzidas por FEN (Tabela 22, Figura 78).

Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre as respostas em ratos SHR e WKY pré-contraídos com KCl (60 mM), tanto para rotundifolona (Tabelas 21) quanto para mentol (Tabela 22).

Tabela 21. Resposta de rotundifolona na contração induzida por 1 µM de FEN e 60 mM de KCl em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, sem endotélio funcional.

	WKY		SHR	
	$E_{máx}$ (%)	pD_2 (µg/mL)	$E_{máx}$ (%)	pD_2 (µg/mL)
FEN 1 µM	100,1 ± 3,2	3,48 ± 0,04	102,1 ± 1,5	3,89 ± 0,05 (*)
KCl 60 mM	98,8 ± 5,6	2,58 ± 0,04 (#)	99,0 ± 0,9	2,62 ± 0,03 (#)

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY), #p < 0.05 (KCl 60 mM *vs.* FEN).

Tabela 22. Resposta de mentol na contração induzida por 1 µM de FEN e 60 mM de KCl em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, sem endotélio funcional.

	WKY		SHR	
	$E_{máx}$ (%)	pD_2 (µg/mL)	$E_{máx}$ (%)	pD_2 (µg/mL)
FEN 1 µM	104,1 ± 2,8	3,42 ± 0,02	101,5 ± 3,5	4,09 ± 0,06 (*)
KCl 60 mM	83,4 ± 6,1 (#)	3,64 ± 0,05 (#)	90,7 ± 4,9	3,60 ± 0,04 (#)

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, *p < 0,05 (SHR *vs.* WKY), #p < 0.05 (KCl 60 mM *vs.* FEN).

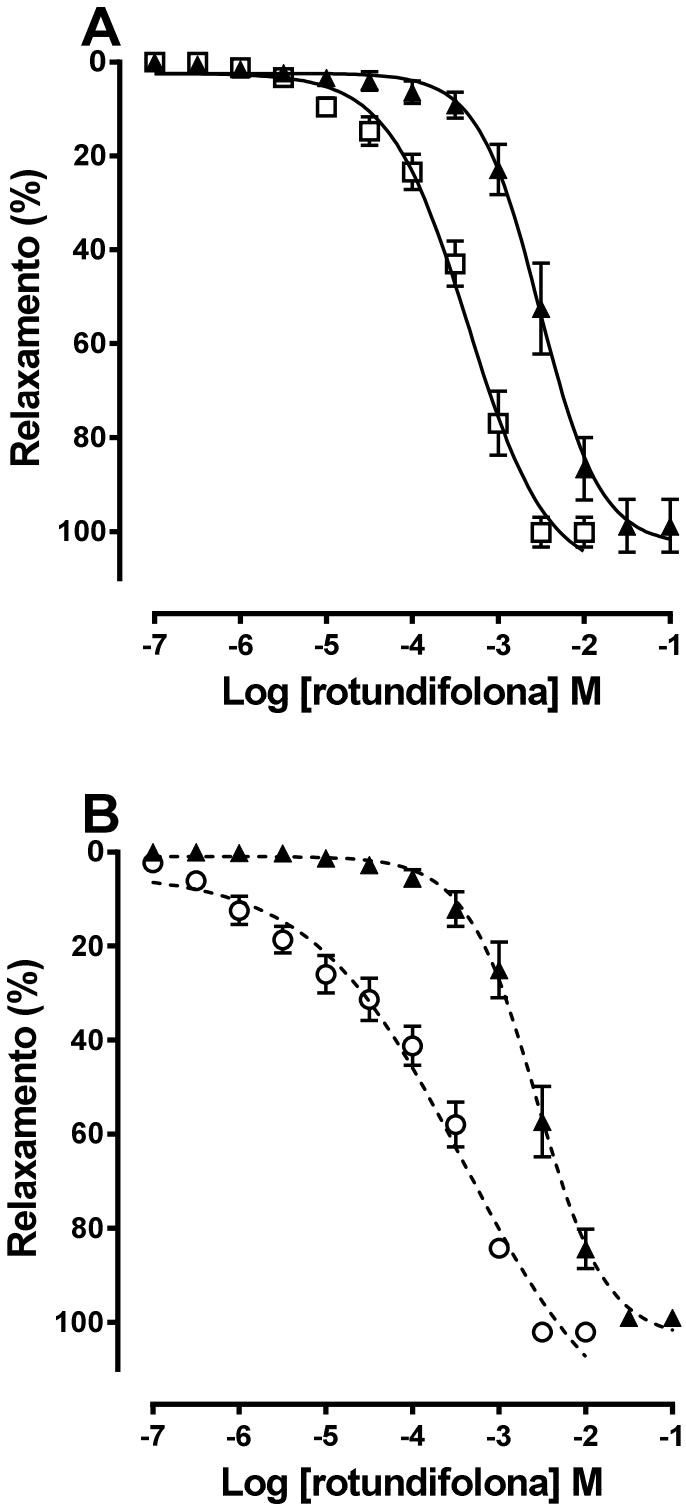


Figura 77. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN ou 60 mM de KCl em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR sem endotélio funcional. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□, ▲) (n = 7 e 14 respectivamente) e em (B) SHR (○, ▲) (n = 6 e 13 respectivamente). Os dados foram expressos como média ± e.p.m.

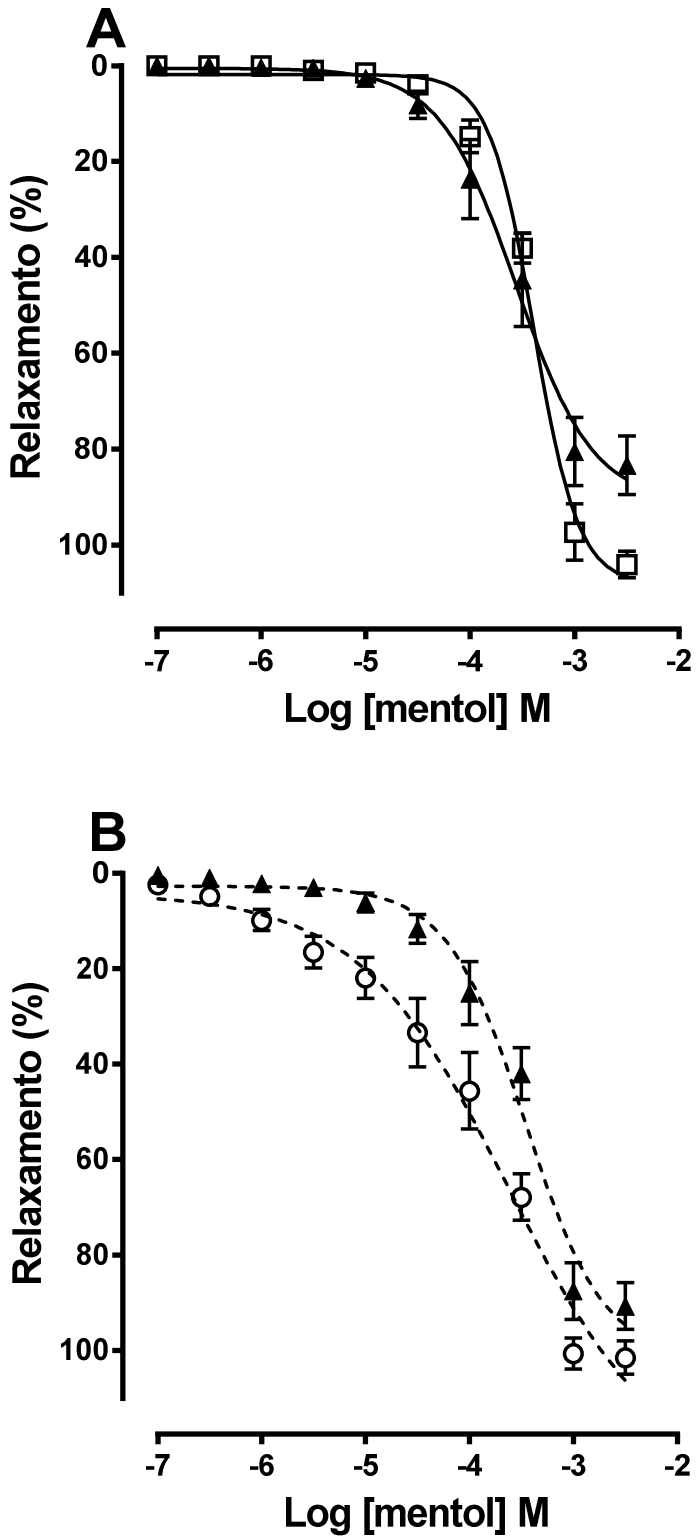


Figura 78. Efeito de mentol na contração induzida por 1 μM de FEN ou 60 mM de KCl em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR sem endotélio funcional. Efeito de mentol em (A) WKY (□, ▲) (n = 5 e 9 respectivamente) e em (B) SHR (○, ▲) (n = 7 e 6 respectivamente). Os dados foram expressos como média ± e.p.m.

5.3.2.6 Participação de canais para potássio sensíveis a cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) na resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona ou pelo mentol

A resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona foi significativamente atenuada na presença de TEA (1 mM), bloqueador de canais BK_{Ca} em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos WKY (aproximadamente 0,1 vezes) e SHR (aproximadamente 0,4 vezes) (Tabela 23, Figura 79). Esses resultados sugerem que o mecanismo da resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona em ratos SHR e WKY envolve a ativação de canais para K^+, provavelmente canais $BK_{Ca.}$

De forma semelhante, a resposta vasorrelaxante induzida por mentol também foi significativamente atenuada (aproximadamente 0,2 vezes) em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos SHR (Tabela 24, Figura 80B). Entretanto, em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos WKY a resposta induzida pelo mentol foi significativamente potencializada (aproximadamente 0,1 vezes) (Tabela 24, Figura 80A). Esses resultados sugerem que o mecanismo da resposta vasorrelaxante induzida por mentol envolve a ativação de canais para K^+, provavelmente canais BK_{Ca} em ratos SHR.

Tabela 23. Resposta de rotundifolona na contração induzida por 1 µM de FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, sem endotélio funcional, na ausência (controle) ou na presença de 1 mM de TEA, bloqueador de canais BK_{Ca}.

	WKY		**SHR**	
	$E_{máx}$ (%)	**pD_2 (µg/mL)**	**$E_{máx}$ (%)**	**pD_2 (µg/mL)**
Controle	100,1 ± 3,1	3,48 ± 0,04	102,1 ± 1,5	3,89 ± 0,05 $^{(*)}$
TEA 1 mM	89,4 ± 4,8	3,12 ± 0,04 $^{(\#)}$	108,9 ± 3,3	2,88 ± 0,04 $^{(*,\#)}$

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, **p* < 0,05 (SHR *vs.* WKY), $^{\#}p < 0.05$ (*vs.* Controle).

Tabela 24. Resposta de mentol na contração induzida por 1 µM de FEN em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY e SHR, sem endotélio funcional, na ausência (controle) ou na presença de 1 mM de TEA, bloqueador de canais BK_{Ca}.

	WKY		**SHR**	
	$E_{máx}$ (%)	**pD_2 (µg/mL)**	**$E_{máx}$ (%)**	**pD_2 (µg/mL)**
Controle	104,1 ± 2,8	3,42 ± 0,02	101,5 ± 3,5	4,09 ± 0,06 $^{(*)}$
TEA 1 mM	97,5 ± 3,8	3,70 ± 0,03 $^{(\#)}$	101,7 ± 3,9	3,56 ± 0,04 $^{(*,\#)}$

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. Teste *t*-student, **p* < 0,05 (SHR *vs.* WKY), $^{\#}p < 0.05$ (*vs.* Controle).

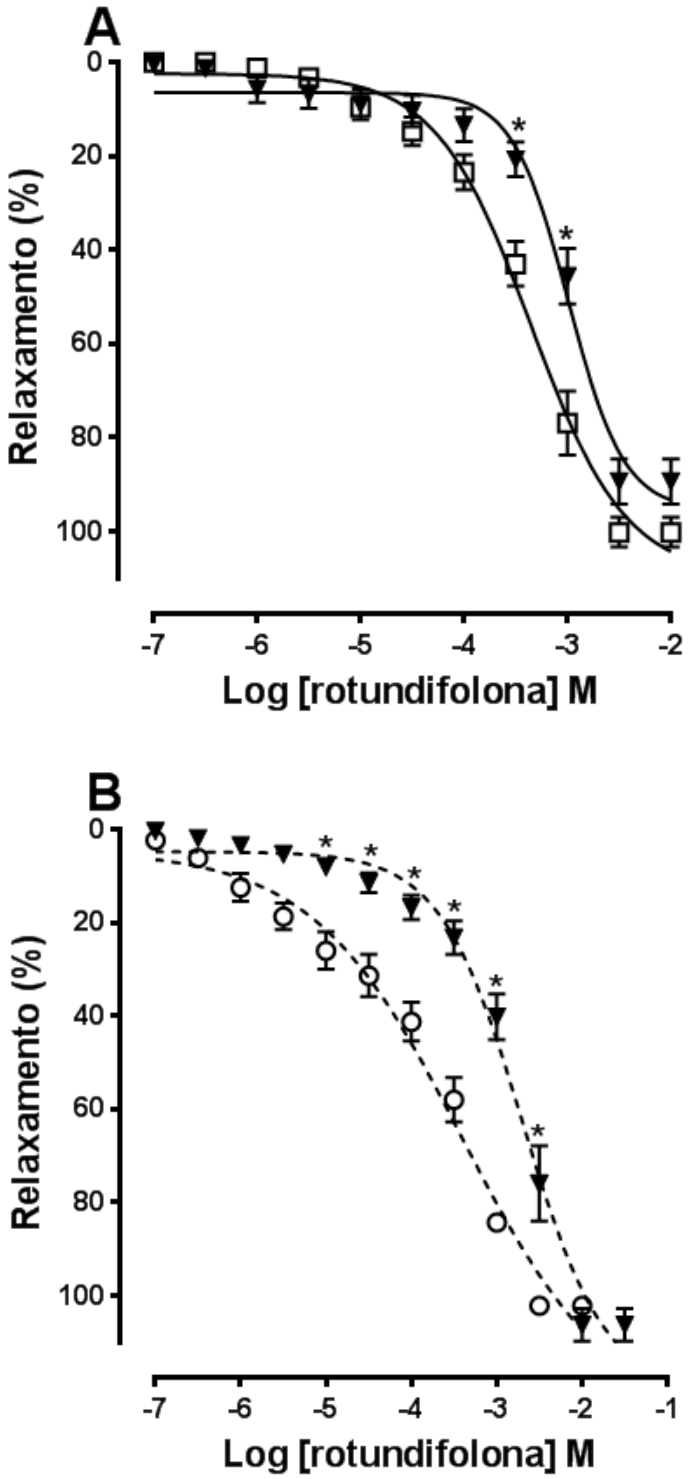


Figura 79. Efeito de rotundifolona na contração induzida por 1 μM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de TEA. Efeito de rotundifolona em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 7) ou (▼) na presença de 1 mM de TEA (n = 6) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 6) ou (▼) na presença de 1 mM de TEA (n = 8). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0.05 (*vs.* Controle).

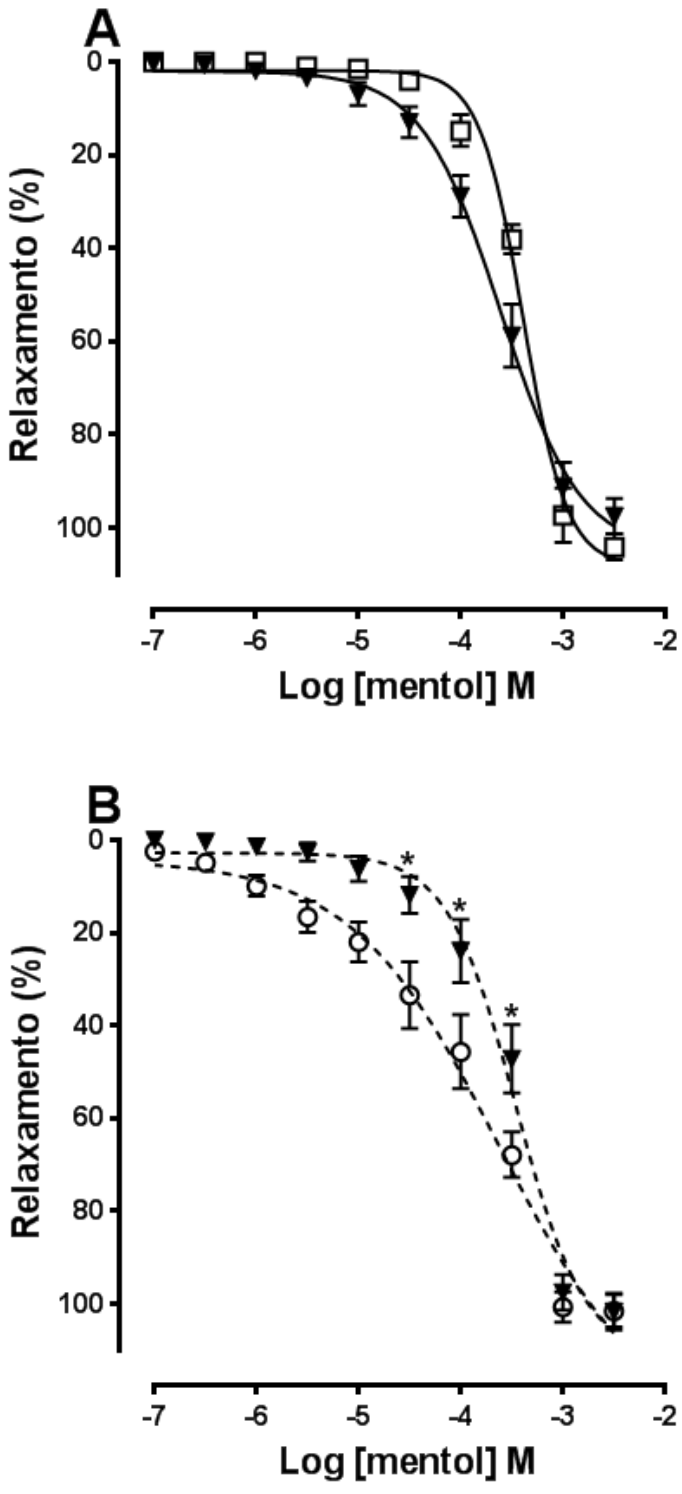


Figura 80. Efeito de mentol na contração induzida por 1 µM de FEN em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional isolada de ratos na ausência ou presença de TEA. Efeito de mentol em (A) WKY (□) na ausência (controle, n = 5) ou (▼) na presença de 1 mM de TEA (n = 12) e em (B) SHR (○) na ausência (controle, n = 7) ou (▼) na presença de 1 mM de TEA (n = 7). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *$p < 0.05$ (*vs.* Controle).

5.3.3 Ensaios em células musculares lisas de aortas de ratos SHR

5.3.3.1 Participação de canais TRPM8 no aumento na $[Ca^{2+}]_i$ induzida pela rotundifolona em células musculares lisas vasculares

Utilizando a citometria de fluxo para a medida da $[Ca^{2+}]_i$ foi observado que as células musculares lisas vasculares ressuspensas em solução de Hank com Ca^{2+} e pré-incubadas com Fluo-4 (Ester AM) apresentaram fluorescência aumentada em relação às células não-marcadas, que corresponde à $[Ca^{2+}]_i$ basal nos miócitos. A incubação com rotundifolona nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} M, por 6 ou 9 min, induziu um aumento significativo na fluorescência do Fluo-4 (Ester AM) em comparação com a fluorescência observada para o veículo (Tabela 25, Figura 81). Resultado semelhante foi observado para o WS-12, um agonista seletivo de canais TRPM8 (Tabela 27, Figura 84).

O aumento na $[Ca^{2+}]_i$ observado em células incubadas com rotundifolona (10^{-3} M) por 6 ou 9 min foi significativamente abolido em células pré-incubadas com BCTC (10 µM), um bloqueador de canais TRPM8 e TRPV1, ou AMTB (1 µM), um bloqueador seletivo de canais TRPM8 (Tabela 26, Figuras 82 e 83).

Além disso, a incubação das células com paraformaldeído não alterou de forma significativa a viabilidade celular avaliada com o 7-AAD, bem como não foi observada autofluorescência nas células tratadas com rotundifolona na ausência do Fluo-4 (Ester AM).

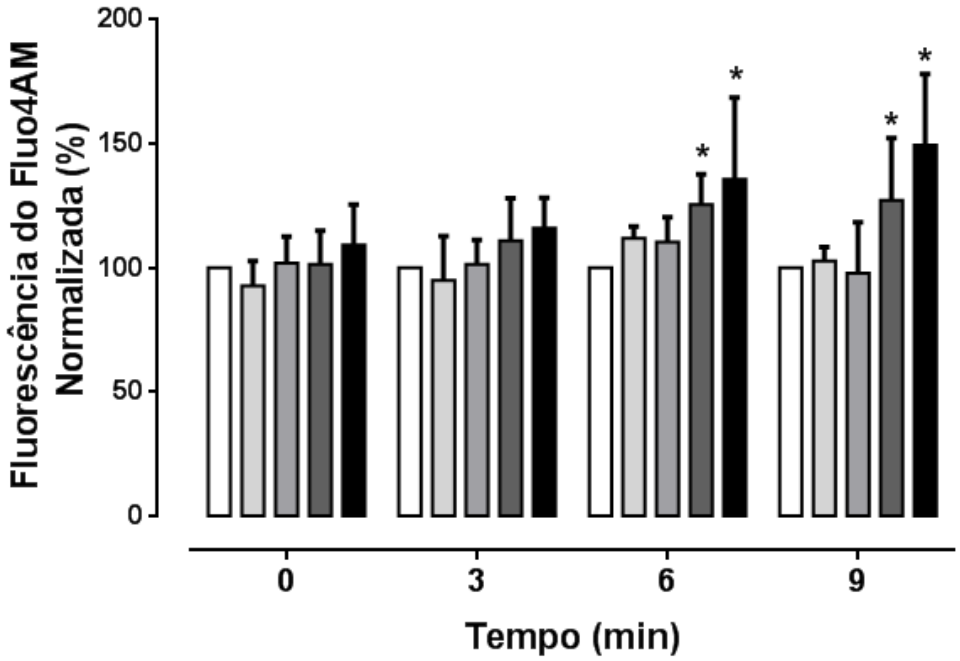


Figura 81. Efeito de rotundifolona na intensidade de fluorescência do Fluo-4/AM em células musculares lisas de aortas de ratos SHR. Medida da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo em miócitos pré-incubados com (□) veículo ou (▫) 10^{-6}, (▪) 10^{-5}, (■) 10^{-4} ou (■) 10^{-3} M de rotundifolona em leitura imediatamente após a adição (0 min) ou após a incubação por 3, 6 ou 9 min (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Veículo).

Tabela 25. Resposta de rotundifolona na $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos de ratos SHR.

	0 min	**3 min**	**6 min**	**9 min**
	$E_{máx}$ (%)	**$E_{máx}$ (%)**	**$E_{máx}$ (%)**	**$E_{máx}$ (%)**
Veículo	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
ROT 10^{-6} M	92,7 ± 4,4	94,8 ± 7,9	111,8 ± 2,1	102,6 ± 2,5
ROT 10^{-5} M	101,8 ± 4,7	101,3 ± 4,3	110,3 ± 4,4	97,7 ± 9,2
ROT 10^{-4} M	101,2 ± 6,1	101,9 ± 7,6	125,5 ± 5,4 (*)	127,1 ± 11,2 (*)
ROT 10^{-3} M	109,2 ± 7,2	115,8 ± 5,4	135,5 ± 14,7 (*)	149,3 ± 12,7 (*)

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Veículo).

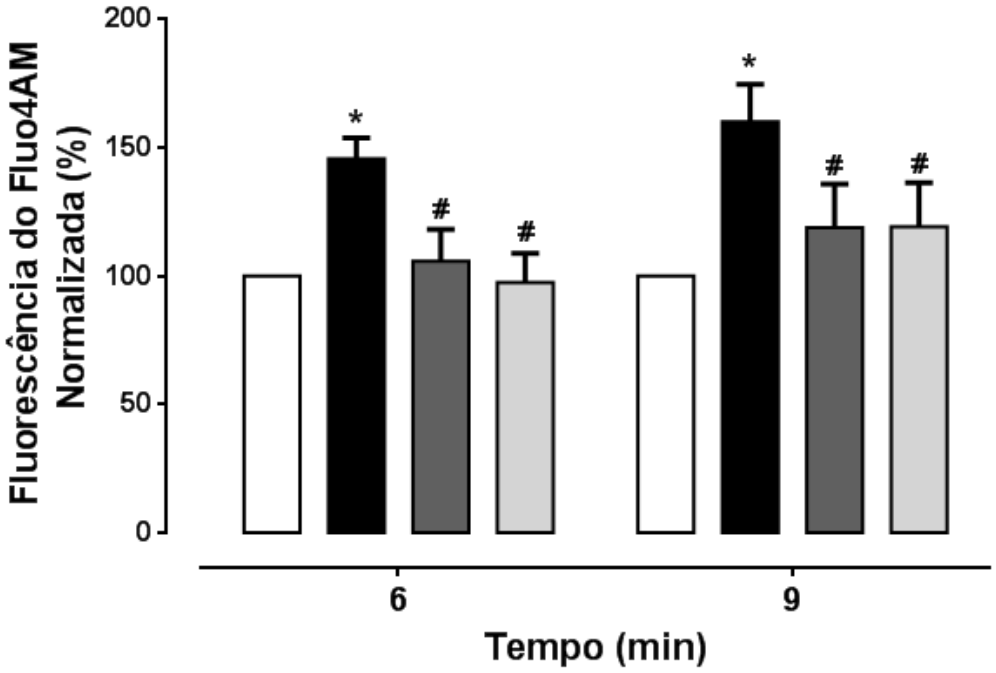


Figura 82. Participação de canais TRPM8 na resposta induzida por rotundifolona na intensidade de fluorescência do Fluo-4 (Ester AM) em células musculares lisas de aortas de ratos SHR. Medida da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo em miócitos, pré-incubados por 6 ou 9 min, com (□) veículo ou 10^{-3} M de rotundifolona na (■) ausência ou na presença de (■) 1 µM de AMTB ou (■) 10 µM de BCTC (n = 4). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Veículo); $^{\#}p$ < 0,05 (BCTC ou AMTB *vs.* Rotundifolona).

Tabela 26. Resposta de rotundifolona na $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos de ratos SHR após a incubação na ausência ou na presença de bloqueadores de canais TRPM8.

	6 min	**9 min**
	$E_{máx}$ (%)	**$E_{máx}$ (%)**
Veículo	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
ROT 10^{-3} M	145,57 ± 8,07 (*)	159,88 ± 14,76 (*)
AMTB 1 µM + ROT 10^{-3} M	105,78 ± 12,30	118,75 ± 17,01
BCTC 10 µM + ROT 10^{-3} M	97,38 ± 11,45	119,08 ± 17,10

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05 (*vs.* Veículo); $^{\#}p$ < 0,05 (BCTC ou AMTB *vs.* Rot).

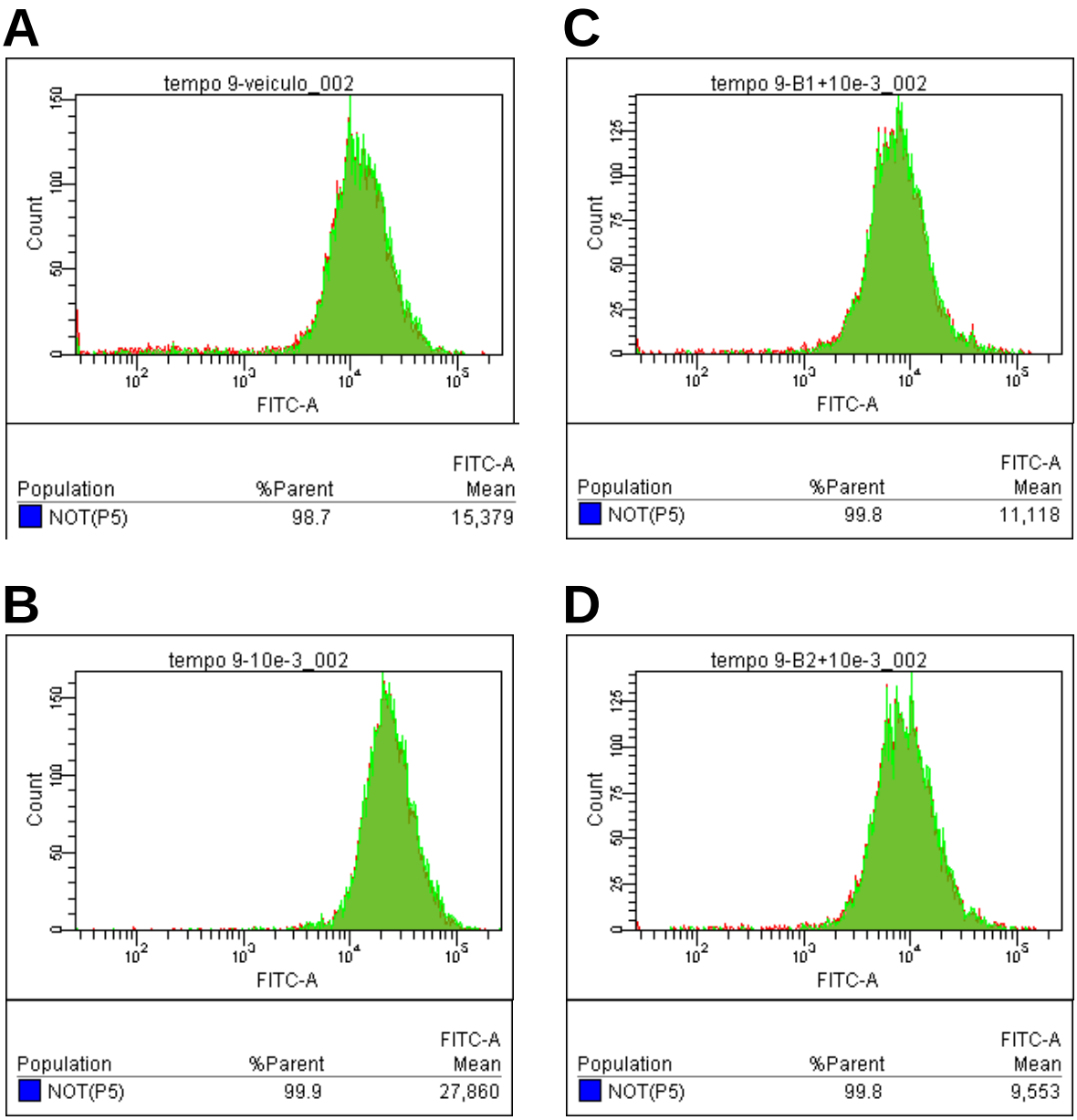


Figura 83. Registro original mostrando a participação de canais TRPM8 na resposta induzida por rotundifolona na intensidade de fluorescência do Fluo-4 (Ester AM) em células musculares lisas de aortas de ratos SHR. Gráficos mostrando histogramas da medida da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo em miócitos, pré-incubados por 9 min, com (A) veículo, (B) 10^{-3} M de rotundifolona, (C) 10^{-3} M de rotundifolona na presença de 1 µM de AMTB e (D) 10^{-3} M de rotundifolona na presença de 10 µM de BCTC.

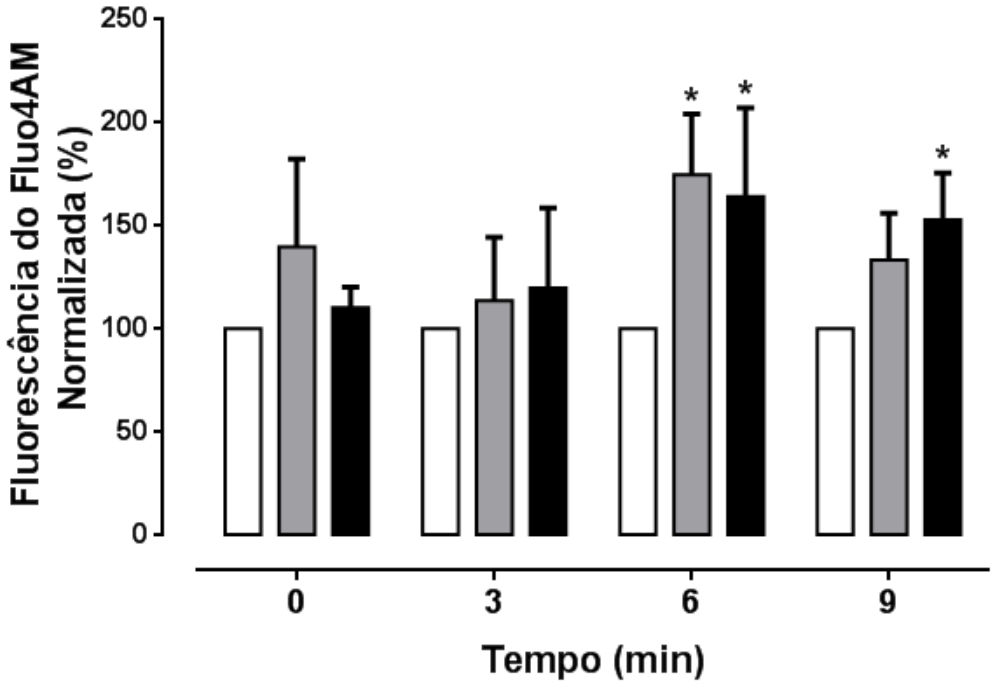


Figura 84. Efeito de WS-12 na intensidade de fluorescência do Fluo-4 (Ester AM) em células musculares lisas de aortas de ratos SHR. Medida da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo em miócitos pré-incubados com (□) veículo ou (■) 10^{-4} ou (■) 10^{-3} M de WS-12 em leitura imediatamente após a adição (0 min) ou após a incubação por 3, 6 ou 9 min (n = 5). Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Veículo).

Tabela 27. Resposta de WS-12 na $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos de ratos SHR.

	0 min	**3 min**	**6 min**	**9 min**
	$E_{máx}$ (%)	**$E_{máx}$ (%)**	**$E_{máx}$ (%)**	**$E_{máx}$ (%)**
Veículo	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
WS-12 10^{-4} M	139,6 ± 19,0	113,5 ± 13,7	174,6 ± 13,1 (*)	133,2 ± 11,3
WS-12 10^{-3} M	110,1 ± 4,4	119,6 ± 17,3	164,0 ± 19,2 (*)	152,7 ± 11,3 (*)

Os dados foram expressos como média ± e.p.m. ANOVA "two way" seguida do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (*vs.* Veículo).

Discussão

6 DISCUSSÃO

O OEMV, o seu componente majoritário, a rotundifolona, e o mentol apresentaram respostas significativas na redução da PA (hipotensão) e da freqüência FC (bradicardia) de ratos WKY e SHR, sendo a resposta induzida por rotundifolona na PAS, PAM e FC, e por mentol na PAS, PAD, PAM e FC mais potentes em ratos SHR (aproximadamente 0,3 e 4 vezes, respectivamente). A potencialização em ratos SHR foi observada também nos efeitos cronotrópico e inotrópico negativos induzidos pelo OEMV (aproximadamente 0,2 vezes), pela rotundifolona (aproximadamente 0,3 vezes) e pelo mentol (aproximadamente 0,2 vezes). Os canais TRPM8 apresentaram expressão aumentada nos átrios e ventrículos de ratos SHR, sendo observada uma maior expressão nos ventrículos esquerdos, seguidos de ventrículos direitos, átrios esquerdos e átrios direitos, podendo exercer participação nas respostas observadas no coração. Além disso, as respostas vasorrelaxantes induzidas pelo OEMV, pela rotundifolona e pelo mentol também foram mais potentes em ratos SHR (aproximadamente 0,4; 0,2 e 0,2 vezes respectivamente) e envolvem canais TRPM8 e TRPC (provavelmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6), sendo observada expressão aumentada de canais TRPM8 em artéria mesentérica superior isolada de rato SHR.

Muitos estudos têm sido conduzidos com a finalidade de caracterizar o modelo de hipertensão presente nos ratos SHR. Além disso, com a descoberta dos canais TRP tem surgido o interesse na investigação de possíveis alterações na expressão desses canais na hipertensão e das implicações que sua ativação ou bloqueio apresentam para o entendimento e o tratamento dessa condição patológica. Entretanto, a maioria dos estudos realizados para avaliar os efeitos de canais TRP utilizam células nas quais é induzida uma super-expressão desses canais, sendo escassos os estudos em organismos íntegros ou tecidos isolados.

Dessa forma este estudo foi desenvolvido com a finalidade de caraterizar as respostas cardiovasculares induzidas pelo OEMV, pela rotundifolona e pelo mentol em um organismo vivo, com todos os mecanismos

de regulação atuantes, e em tecidos e células isoladas onde ocorre a expressão fisiológica dos canais TRP e de proteínas que podem estar associadas a esses canais.

Com isso, torna-se possível uma visão mais ampla sobre o potencial de substâncias que atuam sobre os canais TRP para a terapêutica, bem como sobre o papel dos canais TRP na função cardiovascular e na fisiopatologia da Hipertensão Essencial.

As indicações terapêuticas da hortelã-da-folha-miúda (*Mentha x villosa* Hudson) incluem o uso das folhas como estomáquico, ansiolítico, antidiarréico, contra cólicas menstruais (MATOS, 1994), contra Schistossoma mansoni (BORBA et al., 1990a; BORBA; BARBOSA-FILHO; PADOVANI, 1991; MATOS-ROCHA et al., 2013), no tratamento de afecções parasitárias como amebíase, giardíase e tricomoníase (BORBA et al., 1990a, 1990b; BORBA; MELO, 1988; MORAES et al., 2012) e antimicrobiano contra *S. aureus* e *C. albicans* (ARRUDA et al, 2006).

Além disso, o laboratório de pesquisa industrial da Hebron® desenvolveu o medicamento GIAMEBIL®, o primeiro medicamento fitoterápico feito no Brasil, que chegou ao mercado em 1991, sendo disponibilizado na forma de comprimidos, xarope ou gotas. O Giamebil consiste no extrato fluido/seco potencializado da *Mentha x villosa* Hudson (também conhecida como *Mentha crispa* L.*)* e é para o tratamento de infecções intestinais causadas por *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Tricomona vaginalis* e como antiespasmódico, sem os efeitos colaterais e sem os transtornos dos derivados imidazólicos (MORAES et al., 2012).

A eficácia terapêutica e a segurança do Giamebil® em pacientes com tricomoníase vaginal foi avaliado em um ensaio clínico do tipo randomizado, paralelo e aberto com 60 voluntárias do sexo feminino, sendo 35 procedentes de Fortaleza/Ceará e 25 da cidade de Sinop/Mato Grosso, que apresentaram exame parasitológico positivo da secreção vaginal para tricomoníase. O Giamebil® apresentou eficácia de 90 % e nenhum sinal de toxicidade clínica foi observado no período de tratamento (MORAES et al., 2012). Além disso, o

Giamebi® apresentou eficácia de aproximadamente 50 % em pacientes com *Giardia lamblia* (TELES et al., 2011)

A partir das folhas da *Mentha x villosa* Hudson é obtido o óleo essencial, cujos principais constituintes são os monoterpenos. No OEMV foram detectados 23 compostos químicos, dentre eles limoneno, β-cariofileno, 1,8-cineol (eucaliptol), α e β-pineno, linalol e o componente majoritário o 1,2-epoxi-p-ment-4(8)-en-3-ona também denominado de óxido de piperitenona ou rotundifolona (HIRUMA; ALMEIDA; BARBOSA-FILHO, 1992).

Os monoterpenos são utilizados na terapêutica como antimicrobianos (ÍSCAN et al., 2002), anestésicos, analgésicos (GALEOTTI et al., 2001, 2002; XU; BLAIR; CLAPHAM, 2005), anti-inflamatórios (SANTOS; RAO, 2001), antipruriginosos (UMEZU; SAKATA; ITO, 2001; ANAND, 2003), antiespasmódicos (HILLS; ARONSO, 1991; COELHO-DE-SOUZA et al., 1997; MAGALHÃES et al., 1998) e miorrelaxantes (ALBUQUERQUE et al., 1995).

A avaliação de toxicidade aguda do OEMV e da rotundifolona administrados pela via intraperitoneal (i.p.) mostrou que os valores de DL_{50} (dose que induz a morte de 50 % dos animais em experimentação) foram de 472 (387 – 557) mg/Kg i.p. em camundongos e 410 (355 – 465) mg/kg i.p. em ratos. Nesse estudo a rotundifolona foi testada até a dose de 500 mg/kg i.p. e não foram constatados efeitos letais durante 48 h de observação (HIRUMA; ALMEIDA; BARBOSA-FILHO, 1992).

Outro estudo de toxicidade aguda em camundongos e sub-aguda em ratos para o OEMV e a rotundifolona administrados por via oral (v.o.) mostraram valores de DL_{50} de 550 ± 49 mg/kg v.o. para o OEMV e 400 ± 49 mg/kg v.o. para a rotundifolona. Em relação ao estudo de toxicidade sub-aguda em ratos tanto o OEMV quanto a rotundifolona apresentaram baixa toxicidade, sem alterar significativamente os parâmetros hematológicos e bioquímicos destes animais. Além disso, foi detectado nesse estudo que administração de OEMV (400 mg/kg) ou rotundifolona (355 mg/kg) através da veia caudal dos camundongos induziu a morte de 50 % dos animais nas primeiras 24 h (SOUSA, 1999).

A literatura também mostra que o mentol tem uma baixa toxicidade oral aguda em ratos apresentando DL50 acima de 2000 mg/kg de peso corporal. Os dados mostram uma DL_{50} de 3300 mg/kg por via oral, 750 mg/kg por via intraperitoneal e 1000 – 2500 mg/kg por via subcutânea em ratos (FAO/WHO, 1967). Em humanos a dose letal encontra- se entre 50 – 500 mg/kg (FAO/WHO, 1999).

No presente estudo foi avaliada a resposta induzida pelo OEMV, pela rotundifolona e pelo mentol, administrados por via intravenosa, na pressão arterial e freqüência cardíaca de ratos WKY e SHR. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que tanto o OEMV quanto a rotundifolona e o mentol induziram significativa redução na pressão arterial e na freqüência cardíaca de ratos SHR e WKY de maneira dependente de dose.

A pressão arterial possui um componente cardíaco e um componente vascular. O componente cardíaco é determinado pelo débito cardíaco, que consiste no volume sanguíneo bombeado pelo coração por minuto. Sabendo-se que a quantidade de batimentos por minuto corresponde à freqüência cardíaca, e que o volume de sangue ejetado a cada batimento corresponde ao volume de ejeção sistólica (volume ejetado após a sístole ou contração ventricular), temos que o débito cardíaco é calculado pela multiplicação entre volume de ejeção sistólica e a freqüência cardíaca. Já o componente vascular representa a RVPT, que consiste na resistência ao fluxo sanguíneo nas artérias de menor diâmetro, denominadas de artérias de resistência, e nas arteríolas (LATERZA et al., 2008).

A pressão sistólica representa a participação do componente cardíaco na determinação da pressão arterial enquanto a pressão diastólica representa a participação do componente vascular. Com base na avaliação do tempo que o coração permanece em sístole (contração) e em diástole (relaxamento) a pressão arterial média é calculada como a média ponderada entre a pressão sistólica e a pressão diastólica, na qual a sistólica possui peso 1 e a distólica possui peso 2, ou seja, PAM = 1/3 x PAS + 2/3 x PAD (MAGALHÃES, 2002).

O OEMV, a rotundifolona e o mentol induziram redução significativa tanto na PAS quanto na PAD de ratos SHR e WKY. A redução na PAD foi significativamente maior do que a redução na PAS, o que sugere uma maior ação sobre o componente vascular da pressão arterial, ou seja, na redução da RVPT. Entretanto, o significativo efeito bradicárdico juntamente com a redução na PAS sugere também uma ação significativa sobre o componente cardíaco da pressão arterial.

Os dados ainda mostraram que a diminuição na PAS, PAM e FC induzida por rotundifolona, bem como a redução na PAS, PAD, PAM e FC induzida por mentol foram significativamente maiores em ratos SHR (aproximadamente 0,3 e 4 vezes, respectivamente), enquanto a resposta induzida pelo OEMV não mostrou diferença significativa entre ratos SHR e WKY.

Em contrapartida, o OEMV apresentou uma resposta mais potente na redução da PAD e FC do que a rotundifolona em ratos SHR (aproximadamente 0,7 vezes) e WKY (aproximadamente 1,5 vezes). A maior potência do OEMV no efeito hipotensor e bradicárdico pode ser devido à ação de outras substâncias presente no OEMV que poderiam induzir redução da pressão e freqüência cardíaca ou estariam atuando na potencialização da resposta induzida pela rotundifolona.

Dados da literatura mostram que o eucaliptol (1,8-cineol) induz hipotensão e bradicardia em ratos normotensos não-anestesiados (LAHLOU et al., 2002), efeito inotrópico negativo no músculo papilar do ventrículo esquerdo de rato (SOARES et al., 2005), e relaxamento em aorta isolada de rato (LAHLOU et al., 2002; PINTO et al., 2009). Além disso, o linalol induz hipotensão e taquicardia e α e β-pineno induzem hipotensão e bradicardia em ratos normotensos não-anestesiados (MENEZES et al., 2010) e o limoneno (400 mg/kg v.o.) diminuiu as alterações pulmonares induzidas por monocrotalina em ratos e após 21 dias de tratamento preveniu a hipertensão pulmonar (TOUVAY et al., 1995).

Além disso, os dados obtidos no presente estudo mostraram que a dose de 20 mg/kg de mentol induziu perfil semelhante ao observado para anestésicos como o tiopental, com ausência de movimentos e de sensibilidade à dor (pinçando a pata e a cauda). Dados da literatura mostram que o mentol induz efeitos analgésico (GALEOTTI et al., 2002; FARCO; GRUNDMANN, 2013) e anestésico local (GALEOTTI et al., 2001), apresentando tempos de indução à anestesia e recuperação similares aos da benzocaína (GONÇALVES et al., 2008), e com mecanismo de ação que provavelmente envolve ativação de receptores GABAA (ZHANG et al., 2008; WATT et al., 2008). Além disso, o mentol também prolonga o efeito de outros anestésicos, como o propofol, por inibir a sua metabolização (LI-LIN et al., 2006).

Comparando os resultados obtidos no modelo de HAS essencial utilizando ratos SHR e WKY com os descritos por Silva (2008) em ratos LH e LN, podemos também observar que a rotundifolona foi capaz de induzir uma maior diminuição na PAM ($E_{máx}$ = 57,6 ± 5,3 %) e FC ($E_{máx}$ = 89,7 ± 1,7 %) em ratos SHR em comparação à resposta observada em ratos LH ($E_{máx}$ = 35,6 ± 3,8 % e 77,9 ± 6,6 %, respectivamente). Em ratos WKY também foi observada uma maior diminuição na PAM ($E_{máx}$ = 56,0 ± 2,6 %) e FC ($E_{máx}$ = 88,2 ± 1,5 %) em comparação com a resposta observada em ratos LN ($E_{máx}$ = 39,1 ± 8,9 % e 57,3 ± 16,2 %, respectivamente).

Além disso, os dados obtidos por Silva (2008) mostraram que as respostas induzidas por rotundifolona em ratos LN e LH foram semelhantes, enquanto os dados obtidos no presente estudo demonstram que a rotundifolona apresenta resposta hipotensora e bradicárdica mais potentes em ratos SHR. Desta maneira, embora os níveis de pressão dos ratos LH e SHR sejam semelhantes, os resultados obtidos podem refletir as diferenças nos mecanismos fisiopatológicos de desenvolvimento da hipertensão nos dois modelos.

Diante dessas observações, os resultados obtidos pela medida direta da pressão arterial em ratos SHR e WKY sugerem que o OEMV, a rotundifolona e o mentol provavelmente exercem ação sobre o componente cardíaco e o componente vascular da pressão arterial. As respostas hipotensoras e

bradicárdicas observadas para o OEMV, a rotundifolona e o mentol em ratos SHR consistem em resultados inéditos para essas substâncias nesse modelo de hipertensão e geram a hipótese de que o mecanismo da resposta poderia envolver alvos com expressão ou atividade alterada na HAS essencial.

Alguns estudos têm demonstrado correlação funcional entre a expressão dos canais TRP e as alterações na pressão sanguínea na hipertensão (YAO et al., 2005; FIRTH; REMILARD; YAN, 2007; LIU et al., 2009). Dados na literatura mostram que os canais TRPC estão envolvidos na hipertrofia cardíaca induzida por aumento de pressão (NISHIDA; KUROSE, 2008) e que alterações na freqüência cardíaca podem afetar a expressão de canais TRPC no coração, devido à alteração na duração do potencial de ação cardíaco (WANG et al., 2014).

Além disso, dados anteriores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que canais TRPC e TRPM8 são alvos para a rotundifolona, bem como para outro monoterpeno de estrutura semelhante, o mentol (ALMEIDA, 2012). Dessa forma, sendo verificada a presença de canais TRPM8 no coração, existe a possibilidade dos mesmos estarem sendo ativados para promover a hipotensão e a bradicardia observada.

Diante disso, tornou-se necessário avaliar a expressão de canais TRPM8 nos átrios e ventrículos de ratos SHR e WKY. Os dados obtidos mostraram que o canal TRPM8 encontra-se expresso nos átrios e nos ventrículos de ratos SHR e WKY. Além disso, em ratos SHR a protéica do canal TRPM8 apresenta nível decrescente de expressão no ventrículo esquerdo, no ventrículo direito, no átrio esquerdo e no átrio direito, respectivamente.

Dessa maneira, os resultados obtidos são inéditos e sugerem que esses canais estão expressos no coração, podendo estar relacionados com o processo de contração do músculo cardíaco. Essa hipótese justificaria a maior expressão nos ventrículos, principalmente no ventrículo esquerdo, que possui uma camada muscular mais espessa devido à necessidade de maior força de contração para ejeção sanguínea durante a sístole. Além disso, de forma semelhante aos canais TRPC, os dados obtidos mostram uma expressão

aumentada de canais TRPM8 em ratos SHR em comparação com seus controles normotensos WKY, o que reforça a hipótese de relação entre um maior hipertrofia cardíaca nos animais hipertensos e uma maior expressão de canais TRPM8.

Esses dados também podem sugerir uma relação entre a expressão de canais TRPM8 como outros processos que ocorrem no coração e tecidos de animais hipertensos, assim como tem sido encontrado para outros canais TRP. Dados na literatura mostraram relação entre a expressão de canais TRPC com hipertensão, hipertrofia muscular, angiogênese, aterosclerose, estresse oxidativo, e em processos inflamatórios induzindo aumento da permeabilidade endotelial, aumento da expressão de células de adesão e aumento do recrutamento de células inflamatórias (VAZQUEZ, 2012).

Além dos canais TRPC, tem sido demonstrado relação de canais TRPM8 com a inflamação, sendo observado que a ativação desses canais atenua a resposta inflamatória induzida em colon de camundongos (RAMACHANDRANA et al., 2013).

Com a finalidade de avaliar a ação do OEMV, da rotundifolona e do mentol sobre o componente cardíaco da pressão arterial foram utilizadas preparações de átrios direitos (com atividade espontânea) e esquerdos (estimulado eletricamente), isolados de ratos SHR e WKY.

O OEMV induziu efeitos cronotrópico e inotrópico negativos, de maneira dependente de concentração, tanto em ratos WKY quanto em ratos SHR, culminando na completa inibição de ambos os átrios. A diminuição na força de contração induzida pelo OEMV foi mais potente (aproximadamente 0,2 vezes) em ratos SHR, enquanto a diminuição na freqüência foi semelhante em ratos SHR e WKY.

A rotundifolona também induziu efeitos cronotrópico e inotrópico negativos em ratos WKY e SHR, de maneira dependente de concentração, culminando na completa inibição de ambos os átrios. Entretanto tanto a diminuição na força de contração quanto na freqüência, induzidas pela rotundifolona, foram mais potentes em ratos SHR (aproximadamente 0,3 e 0,2 vezes respectivamente) em relação aos seus respectivos controles WKY.

Já a resposta induzida pelo mentol apresentou-se semelhante à do OEMV, observando-se efeitos cronotrópico e inotrópico negativos, dependentes de concentração, em ratos WKY e SHR, e completa inibição de ambos os átrios. Da mesma forma, a diminuição na força de contração foi mais potente (aproximadamente 0,2 vezes) em ratos SHR, enquanto a diminuição na freqüência foi semelhante em ratos SHR e WKY.

Além disso, a comparação entre os efeitos sobre a força de contração e a frequência mostrou que, nos ratos SHR, o efeito inotrópico negativo induzido pelo OEMV, pela rotundifolona e pelo mentol foi mais potente (aproximadamente 0,2; 0,3 e 0,2 vezes respectivamente) do que o efeito cronotrópico negativo.

Os resultados dos efeitos cardíacos sugerem que o OEMV, a rotundifolona e o mentol podem estar atuando tanto em células autoexcitáveis do nó sinoatrial, quanto nas células musculares envolvidas na contração cardíaca. Além disso, a resposta observada em ratos SHR mostrou uma maior potência do OEMV, da rotundifolona e do mentol, a qual pode ser decorrente da ação dessas drogas sobre alvos com expressão ou atividade alterada na HAS essencial do modelo SHR, tais como os canais TRPC e TRPM8.

Após a investigação da participação do componente cardíaco, foi realizada a avaliação da participação do componente vascular nas respostas observadas. A medida das tensões isométricas em artéria mesentérica superior mostrou que o OEMV, a rotundifolona e o mentol induziram respostas vasorrelaxantes dependente de concentração em anéis sem endotélio e com endotélio vascular funcional de ratos SHR e WKY.

A resposta vasorrelaxante apresentada pela rotundifolona foi semelhante em artérias mesentéricas superiores sem endotélio funcional pré-contraídos com 1 ou 10 µM de FEN, não havendo diferença significativa em ratos SHR e WKY. O mesmo foi observado para a resposta induzida pelo mentol em ratos SHR. Entretanto, em ratos WKY a resposta induzida pelo mentol foi significativamente mais potente em contrações induzidas por 10 µM de FEN.

A diferença encontrada na resposta vasorrelaxante induzida pelo mentol em anéis pré-contraídos por 1 ou 10 µM de FEN pode envolver a sua

participação na mobilização de cálcio intracelular, mais especificamente no bloqueio dos receptores de ryanodina presentes no retículo sarcoplasmático. Essa hipótese pode ser embasada nos achados de GELAL e colaboradores (2003), que mostraram que a administração de uma dose única de mentol puro (100 mg) retardou a absorção e diminuiu o efeito da cafeína sobre a freqüência cardíaca. Outros dados da literatura também mostram que o mentol induz liberação de cálcio do retículo endoplasmático e complexo de Golgi em diversos tipos celulares de forma independente de TRPM8 (MAHIEU et al., 2006).

Por outro lado, o OEMV e a rotundifolona provavelmente não atuam sobre os receptores de ryonodina, de acordo com dados obtidos por Guedes e colaboradores (2002, 2004a) em aorta de ratos Wistar, os quais mostraram que o OEMV e a rotundifolona foram capazes de inibir significativamente as contrações decorrentes de liberação dos estoques intracelulares sensíveis à FEN, mas não causaram inibição significativa nas contrações dependentes de liberação de cálcio dos estoques intracelulares sensíveis à cafeína.

Pelo fato de ter sido observada diferença significativa entre as respostas frente a contrações com 1 ou 10 µM de FEN somente para mentol e apenas em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos WKY, optamos por utilizar a concentração de 1 µM de FEN para os demais protocolos experimentais com artérias mesentéricas superiores.

A comparação das respostas vasorrelaxantes observadas em anéis de artéria mesentérica superior com e sem endotélio vascular funcional mostraram que o OEMV induz resposta vasorrelaxante dependente de concentração, em ratos WKY e SHR que envolve mecanismo independente do endotélio vascular funcional.

De forma semelhante, a rotundifolona induziu resposta vasorrelaxante dependente de concentração e independente de endotélio vascular funcional em ratos SHR, enquanto em ratos WKY, a resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona provavelmente envolve mecanismo dependente e independente do endotélio vascular funcional. Em contrapartida, Silva (2008) mostrou que, tanto em ratos LN quanto em ratos LH, rotundifolona induziu

resposta vasorrelaxante por mecanismo dependente e independente do endotélio vascular funcional.

A comparação entre as respostas induzidas pelo OEMV e pela rotundifolona nos modelos de hipertensão LH e SHR e seus controles normotensos (LN e WKY, respectivamente), mostrou que nos ratos SHR não foi observada a dependência do endotélio vascular funcional para a resposta vasorrelaxante. Essa diferença pode ser explicada pela disfunção endotelial presente nos ratos SHR a partir da 12ª semana de idade (CHAMIOT-CLERC et al., 2001; LORIA et al., 2014).

Por outro lado, a resposta induzida pelo mentol envolve mecanismo dependente e independente do endotélio vascular funcional tanto em ratos WKY quanto em ratos SHR. Entretanto, a resposta observada em anéis sem endotélio vascular funcional foi significativamente mais potente em comparação com aquela observada em anéis com endotélio funcional, sugerindo que a ação no endotélio provavelmente seria contrária à resposta vasorrelaxante induzida pelo mecanismo independente do endotélio vascular.

Além disso, as respostas vasorrelaxantes induzidas pelo OEMV, pela rotundifolona e pelo mentol em anéis sem endotélio funcional foram significativamente mais potentes (aproximadamente 0,4; 0,2 e 0,2 vezes respectivamente) em ratos SHR. Por outro lado, os dados obtidos por Silva (2008) mostraram que tanto a resposta hipotensora e bradicárdica quanto a resposta vasorrelaxante induzidas por rotundifolona em ratos LN e LH foram semelhantes.

Com isso, os dados em conjunto mostram que a potencialização na resposta induzida pelo OEMV, pela rotundifolona e pelo mentol em ratos hipertensos foi observada tanto nas respostas hipotensora e bradicárdica, quanto nos efeitos inotrópico e cronotrópico negativos e vasorrelaxante. Esses achados são inéditos e sugerem que o mecanismo da resposta induzida pelo OEMV, pela rotundifolona e pelo mentol poderia envolver alvos com expressão ou atividade alterada na HAS essencial, podendo apresentar um potencial promissor para o tratamento dessa condição patológica.

A rotundifolona e o mentol são substâncias pertencentes à classe dos monoterpenos que são os componentes majoritários dos óleos essenciais derivados de plantas (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; LAVABRE, 1993) e conhecidos por atuar como agonistas ou antagonistas dos canais TRP (PEIER et al., 2002; MCKEMY; NEUHAUSSER; JULIUS, 2002; BEHRENDT et al., 2004; MOQRICH et al., 2005; XU; BLAIR; CLAPHAM, 2005, XU et al, 2006; MACPHERSON et al., 2006; VOGT-EISELE et al, 2007; PATEL; ISHIUJI; YOSIPOVITCH, 2007).

O mentol tem sido descrito por ativar canais TRPV3 (MACPHERSON, et al., 2006; VOGT-EISELE et al.,2007) bem como canais TRPM8 (CALIXTO et al., 2005). A ativação de canais TRPM8 também foi descrita como parte do mecanismo da ação vasorrelaxante de mentol em artéria caudal de ratos SD (JOHNSON et al., 2009) e em artéria mesentérica superior de ratos SD (ALMEIDA, 2012). No entanto, outros canais provavelmente estariam envolvidos na resposta vasorrelaxante promovida pelo mentol.

Em estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa observamos que o mecanismo da resposta vasorrelaxante induzida pelo mentol em artéria mesentérica superior de ratos SD envolveria a ativação de canais TRPM8 e TRPV1, bem como o bloqueio de canais TRPC (provavelmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6), sendo ainda possível a participação de outros canais TRP (ALMEIDA, 2012).

Além disso, nesse mesmo estudo foi demonstrado que a rotundifolona induziu resposta vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos SD por mecanismo que envolveria a ativação de canais TRPM8 e o bloqueio de canais TRPC (provavelmente canais TRPC1, TRPC3 e TRPC6), sugerindo que a rotundifolona provavelmente apresenta um mecanismo mais seletivo do que o mentol em relação à atuação sobre canais TRP (ALMEIDA, 2012).

Diante dessas premissas, prosseguimos com a avaliação da participação de canais TRP nas respostas vasorrelaxanes induzidas em ratos hipertensos, sendo a resposta avaliada na ausência e na presença de bloqueadores de canais TRP.

O mecanismo da resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona em anéis de artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos SHR e WKY sem endotélio vascular funcional envolvem canais TRPM8 e canais TRPC (provavelmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6), mas provavelmente não envolve a participação de canais TRPV1 ou de outros canais TRPM, tais como TRPM3, TRPM4, TRPM6 e TRPM7. Estes dados corroboram com os dados obtidos em ratos SD (ALMEIDA, 2012).

Além disso, a atenuação da resposta na presença de BCTC (10 µM), La^{3+} (100 µM) e Gd^{3+} (25 µM) foi significativamente maior em ratos SHR (aproximadamente 0,8; 0,2 e 0,2 vezes respectivamente) do que em ratos WKY (aproximadamente 0,4; 0,1 e 0,1 vezes respectivamente), diminuindo a diferença existente na potência entre as respostas nos ratos hipertensos e normotensos. Esses achados sugerem que os canais TRPM8 e TRPC (provavelmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6) provavelmente estariam envolvidos na potencialização observada em ratos SHR.

De forma semelhante ao observado para rotundifolona, o mecanismo da resposta vasorrelaxante induzida por mentol envolve canais TRPM8, e TRPC (provavelmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6) em ratos SHR. Entretanto, em ratos WKY o mentol estaria atuando em outros canais TRP, provavelmente TRPM6 e TRPM7, dificultando a resposta vasorrelaxante nesses animais.

Esses achados ressaltam uma possível diferença na expressão de canais TRPM, corroborando com outros estudos que mostram que em artéria mesentérica de ratos SHR ocorre uma diminuição na expressão do TRPM7 quando comparados com os seus controles normotensos WKY (TOUYZ et al., 2006). Por outro lado, o tratamento crônico com angiotensina II e aldosterona aumenta a expressão do TRPM7 em aorta e artéria mesentérica, estando esse canal envolvido na proliferação em resposta a angiotensina II (YAO et al., 2005; TOUYZ et al., 2006).

Além disso, a atenuação da resposta por BCTC (1 ou 10 µM) e AMTB (1 µM) (aproximadamente 0,1; 0,2 e 0,15 vezes respectivamente), La^{3+} (100 µM) e Gd^{3+} (25 µM) (aproximadamente 0,1 vezes) em ratos hipertensos diminuiu a diferença existente na potência entre as respostas de mentol nos

ratos SHR e WKY, sugerindo que os canais TRPC (provavelmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6), estariam envolvidos na potencialização observada em ratos SHR e sugere que essa potencialização pode ocorrer devido à expressão diferencial entre ratos SHR e WKY.

O papel dos canais TRPC na patogenia da hipertensão essencial foi primeiro descrito por LIU e colaboradores (2005; 2006) em estudo comparando a expressão e função dos TRPC em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (LIU et al., 2005) e em pacientes com hipertensão essencial (LIU et al., 2006). O estudo em humanos avaliou 51 pacientes com hipertensão essencial e 51 indivíduos normotensos pareados por idade e sexo. Em monócitos de pacientes hipertensos foi observada uma expressão aumentada de canais TRPC3 e TRPC5 e conseqüente aumento no influxo de Ca^{2+} sugerindo que esses canais estariam relacionados com a hipertensão essencial (LIU et al., 2006).

Os estudos em ratos mostraram que ocorre uma expressão aumentada de TRPC3 em aorta (LIU et al., 2005; 2009) e em arteríolas mesentéricas de ratos SHR em relação aos normotensos WKY (CHEN et al., 2010), bem como expressão aumentada de TRPC1 e TRPC5 em arteríolas mesentéricas de ratos SHR (CHEN et al., 2010).

Além disso, os canais TRPC3 e TRPC6 apresentam expressão aumentada na hipertensão arterial pulmonar, estando envolvidos na hipertrofia medial da vasculatura pulmonar (YU et al., 2004) e, juntamente com a ouabaina endógena, a bomba de Na^{+} do músculo liso arterial e o trocador Na^{+}-Ca^{2+} do tipo 1, exerce um papel fundamental no mecanismo molecular por meio do qual a retenção de sal conduz à hipertensão (BLAUSTEIN; HAMLYN, 2014).

Visto que o aumento na expressão de canais TRPC, bem como de canais TRPM7 já foi descrito em animais hipertensos, direcionamos a análise para o canal TRPM8, cuja expressão foi descrita em artéria mesentérica de ratos normotensos SD (ALMEIDA, 2012), porém ainda não investigada em artéria mesentérica de ratos hipertensos, principalmente na HAS essencial do modelo SHR.

Dessa forma, realizou-se a análise da expressão do RNAm por meio da técnica de PCR e da proteína por meio da técnica de western blot. Os resultados mostraram que o TRPM8 está expresso em artéria mesentérica superior isolada de ratos, e a comparação da expressão do canal TRPM8 com a da proteína constitutiva actina mostrou que em rato SHR ocorre uma expressão aumentada em relação ao rato normotenso.

Esses achados sugerem que, juntamente com os canais TRPC1, TRPC3, TRPC6 e TRPM7, os canais TRPM8 apresentam expressão alterada na hipertensão, que pode estar envolvida na potencialização da resposta vasorrelaxante induzida pelo OEMV, pela rotundifolona e pelo mentol em artéria mesentérica superior de ratos SHR.

Além da resposta induzida na tensão isométrica em artéria pré-contraída, foi avaliada a resposta induzida por rotundifolona em células musculares lisas vasculares utilizando a técnica de citometria de fluxo, com a finalidade de avaliar o efeito deste monoterpeno sobre a mobilização do cálcio intracelular, que apresenta um papel fundamental na regulação do tônus vascular, e o papel dos canais TRPM8.

Em células musculares lisas vasculares de ratos SHR ressuspensas em solução de Hank com Ca^{2+} e pré-incubadas com Fluo-4/AM a rotundifolona (10^{-4} e 10^{-3} M), após incubação por 6 ou 9 min, induziu um aumento significativo na $[Ca^{2+}]_i$ de forma semelhante ao observado para o WS-12, uma agonista seletivo de canais TRPM8. A resposta observada para rotundifolona foi significativamente abolida em células pré-incubadas com BCTC (10 µM), um bloqueador de canais TRPM8 e TRPV1, ou AMTB (1 µM), um bloqueador seletivo de canais TRPM8, sugerindo o envolvimento dos canais TRPM8 no aumento da $[Ca^{2+}]_{i.}$

Esses resultados corroboram com os dados obtidos por Silva (2008), os quais mostraram que em estudos com microscopia confocal, a rotundifolona ($3x10^{-4}$, 10^{-3} e $3x10^{-3}$ M) aumentou os transientes de Ca^{2+} citosólicos em miócitos de artéria mesentérica de ratos SD carregados com Fluo-4/AM. Estes efeitos foram atenuados na presença de EGTA (2 mM) e capsazepina (20µM),

sugerindo que rotundifolona induz aumento na $[Ca^{2+}]_i$ por estimular o influxo de Ca^{2+} que provavelmente envolve canais TRPM8.

Dados obtidos por meio da técnica de imunocitoquímica mostraram que os canais TRPM8 expressos em miócitos isolados de artéria caudal de ratos SD encontram-se localizados tanto na membrana plasmática quanto na membrana do retículo sarcoplasmático (JOHNSON et al., 2009), e a ativação desses canais poderia estar envolvida com o influxo de cálcio através da membrana e a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (BIDAUX et al., 2007).

Estudos com o mentol, agonista de canais TRPM8, mostraram que esse monoterpeno induz aumento na $[Ca^{2+}]_i$ por influxo de cálcio através da membrana e liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. No entanto evidências mostram que o influxo de cálcio através da membrana envolveria a ativação de canais TRPM8, enquanto a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático e do complexo de golgi ocorre por mecanismo independente de canais TRPM8 (MAHIEU et al., 2006).

Outros achados que reforçam a participação de canais TRPM8 no influxo de cálcio através da membrana foram obtidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. Nesse estudo foi observado que, em artéria mesentérica superior de ratos SD, a rotundifolona (10^{-3} e $3x10^{-3}$ M) e o mentol ($3x10^{-4}$, 10^{-3} e $3x10^{-3}$ M) induziram uma significativa potencialização na diminuição do tônus basal induzida por temperaturas frias (25 e 18 ºC). Essa potencialização foi significativamente abolida na ausência do cálcio extracelular (meio sem cálcio contendo EGTA) bem como na presença de BCTC, não sendo significativamente alterada na presença de vermelho de rutênio ou após a dessensibilização de canais TRPV1 com a capsaicina (ALMEIDA, 2012).

Dessa forma, a potencialização induzida por rotundifolona e mentol na diminuição do tônus basal por temperaturas frias (25 e 18 ºC) provavelmente ocorre por ativação concomitante dos canais TRPM8 por temperatura e agonista, e provavelmente envolve o influxo de cálcio através da membrana plasmática (ALMEIDA, 2012). De forma semelhante, outros estudos evidenciaram a ativação de canais TRPM8 por temperatura e agonistas, bem

como a participação do influxo de cálcio nessas respostas (REID, 2005; MALKIA et al., 2009).

Diante disso, sugere-se que provavelmente a rotundifolona poderia estar induzindo o aumento na $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos vasculares de ratos SHR por ativação de canais TRPM8 presentes na membrana plasmática, com consequente influxo de cálcio. Essa ação de rotundifolona por sua vez pode estar desencadeando a ativação ou inibição de vias de sinalização para promover a resposta vasorrelaxante observada.

Os canais TRP interagem de forma complexa com várias cascatas de sinalização intracelular, tanto acima (*upstream*) quanto abaixo (*downstream*) do nível de ativação do receptor (KLASEN et al., 2012).

De forma semelhante, outros canais TRP apresentam interações com proteínas, incluindo os canais que estariam envolvidos na resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona e mentol. Dados com imunocitoquímica mostraram que os canais TRPC1 e os canais BK_{Ca} estão co-localizados em várias regiões subcelulares, principalmente na membrana plasmática, em células musculares lisas vasculares e que o influxo de cálcio através de canais TRPC1 ativa canais BK_{Ca} induzindo hiperpolarização da membrana (KWAN et al., 2009). Além disso foi observado que os canais TRPC1 interagem com outros canais TRP, tais como TRPC 3, 4, 5, 6 e 7, bem como TRPV4 e 6. Os canais TRPC também interagem com canais Ca_V 1.2 em átrio e ventrículos, sendo observado que a inibição de canais TRPC promove efeitos cronotrópico, dromotrópico e inotrópico negativos, prolongação do intervalo QT e bloqueios atrioventricular de primeiro e segundo grau (SABOURIN et al., 2011).

Além dos canais TRP foram descritos outros alvos para rotundifolona por meio dos quais esse monoterpeno promove resposta vasorrelaxante em aorta isolada de ratos Wistar (GUEDES et al., 2004b) e em artéria mesentérica superior isolada de ratos LN e LH (SILVA, 2008; SILVA et al., 2011). Nesses estudos foi relatado que o mecanismo da ação vasorrelaxante induzida pela rotundifolona envolve o bloqueio de canais Ca_V. Diante disso, prosseguimos

com a avaliação da participação desses canais na resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona e mentol em ratos SHR e WKY.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o mecanismo da resposta vasorrelaxante induzida pela rotundifolona e pelo mentol envolve o bloqueio de canais sensíveis a voltagem, tais como os canais Ca_V e os canais ROCs e SOCs (provavelmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6). Esses canais são ativados nas contrações induzidas tanto por KCl (LIU et al., 2012) quanto por FEN (SANDERS, 2001). Esses achados corroboram com os dados de Guedes e colaboradores (2004b) e com os achados de Silva e colaboradores (2011).

Estudos anteriores realizados no nosso laboratório mostraram que a resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona em artéria mesentérica superior de ratos LN e LH também envolve a ativação de canais BK_{Ca} presentes nas células musculares lisas vasculares (SILVA, 2008; SILVA et al., 2011).

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o mecanismo da resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona em ratos SHR e WKY envolve a ativação de canais para K^+, provavelmente canais BK_{Ca}, corroborando com os dados descritos por Silva e colaboradores (2011) para ratos LN e LH.

De forma semelhante, a resposta vasorrelaxante induzida por mentol em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos SHR envolve a ativação de canais para K^+, provavelmente canais BK_{Ca}. Entretanto, em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos WKY não está claro o envolvimento desses canais na resposta vasorrelaxante.

Além disso, analisando-se as curvas de respostas induzidas por rotundifolona e mentol na presença de BCTC (1 µM) com aquelas obtidas na presença de TEA (1 mM) é possível observar um grau de atenuação semelhante, o que pode sugerir uma relação TRPM8-BK_{Ca}. Dados na literatura têm relatado relações de outros canais TRP com canais de K^+, tais como a correlação TRPC1-BK_{Ca} (KWAN et al., 2009), TRPV4-BK_{Ca} (EARLEY et al., 2005), sendo observado que a ativação desses complexos induz hiperpolarização em células musculares lisas vasculares.

Diante disso, os dados obtidos mostram que a resposta vasorrelaxante independente de endotélio induzida por rotundifolona e mentol envolve canais TRPM8, TRPC (provavelmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6), BK_{Ca} e Ca_V (Figuras 85 e 86) porém o mentol pode estar atuando em outros canais TRP (provavelmente TRPM6 e TRPM7) em ratos WKY (Figura 86).

Mecanismo independente de endotélio da resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona em artéria mesentérica superior de ratos

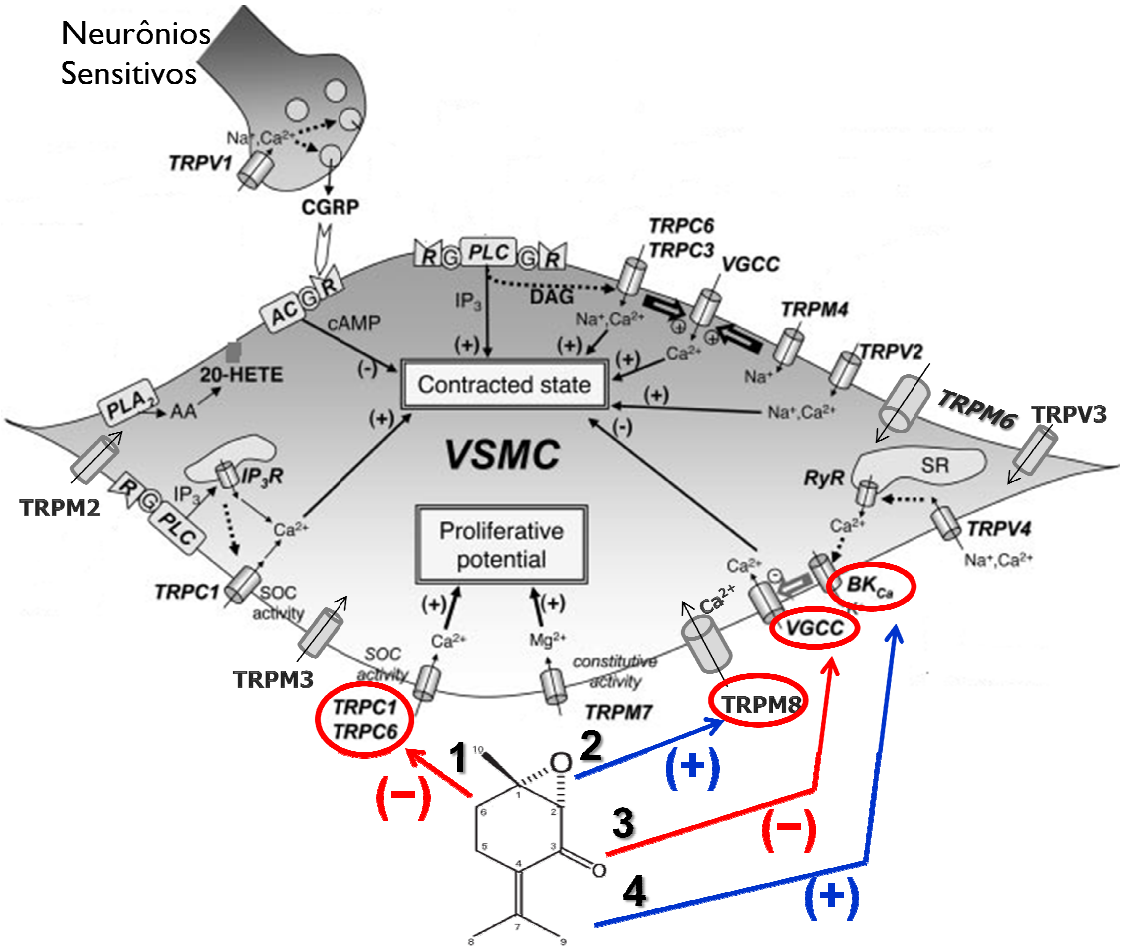


Figura 85. Representação esquemática da provável via de sinalização da resposta vasorrelaxante induzida por rotundifolona em artéria mesentérica superior de ratos SHR e WKY. Os círculos destacam os canais ativados ou bloqueados pela rotundifolona: 1) Bloqueio de canais TRPC (provavelmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6); 2) Ativação de canais TRPM8; 3) Bloqueio de canais Ca_V; 4) Ativação de canais BK_{Ca} (Adaptado de INOUE et al., 2006).

Mecanismo independente de endotélio da resposta vasorrelaxante induzida por mentol em artéria mesentérica superior de ratos

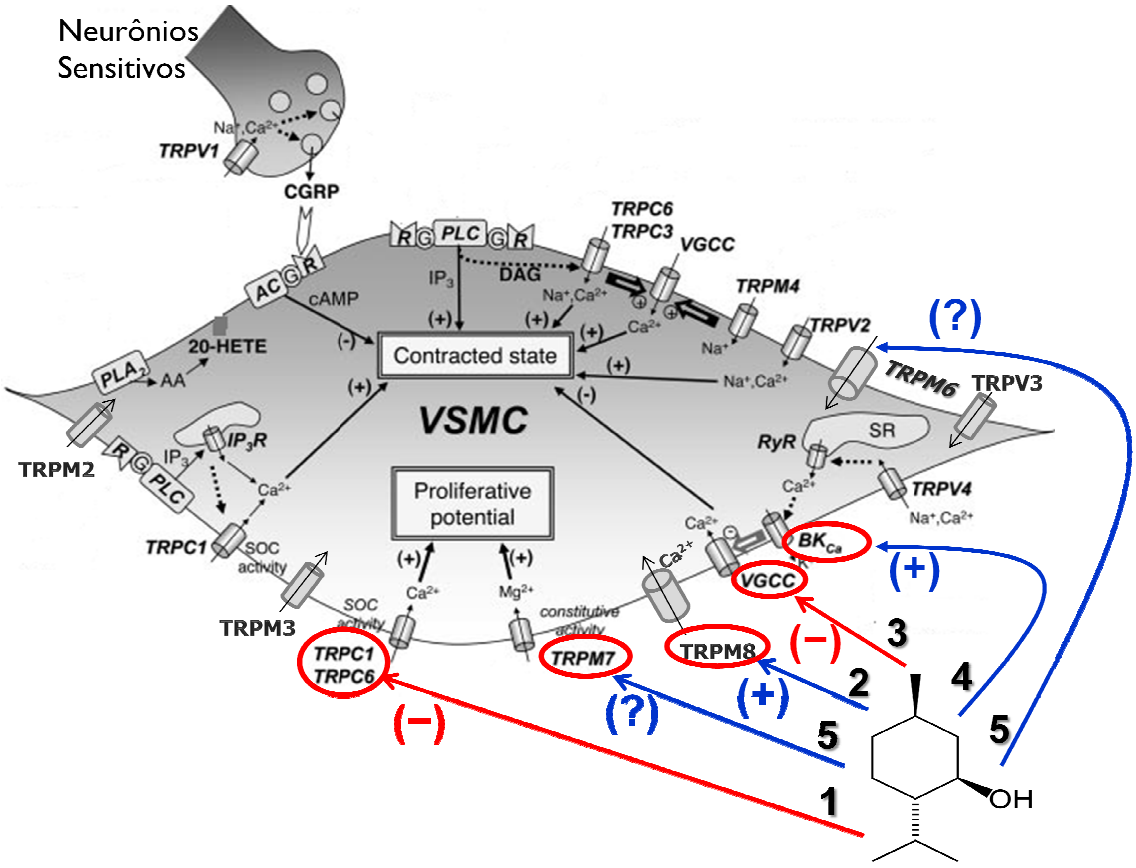


Figura 86. Representação esquemática da provável via de sinalização da resposta vasorrelaxante induzida por mentol em artéria mesentérica superior de ratos SHR. Os círculos destacam os canais ativados ou bloqueados pelo mentol: 1) Bloqueio de canais TRPC (provavelmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6); 2) Ativação de canais TRPM8; 3) Bloqueio de canais Ca_V; 4) Ativação de canais BK_{Ca}; (5) Ativação ou bloqueio de canais TRPM6 e/ou TRPM7 (Adaptado de INOUE et al., 2006).

Conclusão

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que as respostas hipotensora, bradicárdica, inotrópica negativa e vasorrelaxante induzidas por OEMV, rotundifolona e mentol foram significativamente mais potentes em ratos SHR do que em ratos WKY. O mecanismo da resposta vasorrelaxante independente de endotélio induzida por rotundifolona e mentol envolve canais TRPM8, TRPC (provavelmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6), BK_{Ca} e Ca_V, porém o mentol pode estar atuando em outros canais TRP (provavelmente TRPM6 e TRPM7). Os canais TRPM8 mostraram expressão aumentada em ratos SHR. Dessa forma, a ação do OEMV, da rotundifolona e do mentol sobre esses canais, bem como sobre os canais TRPC, pode estar relacionada com a maior potência observada em ratos SHR.

Perspectivas

8 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos vislumbramos a utilização do OEMV, da rotundifolona e do mentol na prevenção e tratamento da hipertensão arterial sistêmica e de alterações renais relacionadas com esta condição patológica, bem como para a melhora dos mecanismos de controle da pressão arterial a curto e longo prazo, além do uso dessas drogas como cardioprotetoras e antiarrítmicas.

Referências

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A. A. C.; SORENSON, A. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of essential oil of Croton zehntneir and of anethole and estragole on skeletal muscles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 41-49, 1995.

ALMEIDA, M. M. Participação de Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) no mecanismo de ação vasorrelaxante de rotundifolona em artéria mesentérica de rato. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal da Paraíba, 2012.

ALMEIDA, R. N.; HIRUMA, C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M. Analgesic effect of rotundifolone in rodents. **Fitoterapia**, v. 67, p. 334 - 338, 1996.

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

AMARAL, R. G. Avaliação da Atividade Antitumoral do Óleo Essencial da *Mentha x villosa* (Lamiaceae). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Sergipe, 2014.

ANAND, P. Capsaicin and menthol in the treatment of itch and pain: recently cloned receptors provide the key. **Gut**, v. 52, p. 1233 -1235, 2003.

ANDERSSON, D. A.; CHASE, H. W.; BEVAN, S. TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 5364 - 5369, 2004.

ANEIROS, E.; DABROWSKI, M. Novel Temperature Activation Cell-Based Assay on Thermo-TRP Ion Channels. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 14, p.662 - 667, 2009.

ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R.; LIMA, E. O.; SOUZA, D. P.; NUNES, X. P.; PEREIRA, M. S. V.; BARBOSA-FILHO, J. M. da CUNHA, E. V. L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x* villosa Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 307 - 313, 2006.

BARBOSA-FILHO, J. M.; BORBA, M. O. P.; ROUSSEL, J. L. et al. Constituintes Químicos do extrato butanólico da Mentha x villosa Hudson (Labiatae). In: **XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, p. 109, 1992.

BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; GLAZER, J. M.; TSURUDA, P. R.; BASBAUM, A. I.; STUCKY, C. L.; JORDT, S-E; JULIUS, D. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. **Nature,** v. 448, p. 204 - 208, 2007.

BAYLIE, R. L.; CHENG, H.; LANGTON, P. D.; JAMES, A. F. Inhibition of the cardiac L-type calcium channel current by the TRPM8 agonist, (-)-menthol. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 61, p. 543 – 550, 2010.

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

BEHRENDT, H-J.; GERMANN, T.; GILLEN, C.; HATT, H.; JOSTOCK, R. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, p. 737 - 745, 2004.

BEM-ISHAY, D.; SALITERNICK, R.; WELNER, A. Separation of two strains of rats with inbred dissimilar sensivity to DOCA-salt hypertension. **Experientia**, v. 28, p. 1321 - 1322, 1972.

BERGDAHL, A.; GOMEZ, M. F.; DREJA, K.; XU, S. Z.; ADNER, M.; BEECH, D. J.; BROMAN, J.; HELLSTRAND, P.; SWARD, K. Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca^{2+} entry dependent on TRPC1. **Circulation Research**, v. 93, p. 839 - 847, 2003.

BEZERRA, M. A. C. *Alpinia speciosa* Schum: Estudo das frações fixas e do óleo essencial. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1994.

BIANCHI, G.; FOX, U.; IMBASCIATI, E. Development of a new strain of spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 14, p. 339 - 347, 1974.

BIDAUX, G.; FLOURAKIS, M.; THEBAULT, S.; ZHOLOS, A.; BECK, B.; GKIKA, D.; ROUDBARAKI, M.; BONNAL, J. L.; MAUROY, B.; SHUBA, Y.; SKRYMA, R.; PREVARSKAYA, N. Prostate cell differentiation status determines transient receptor potential melastatin member 8 channel subcellular localization and function. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 1647 - 1657, 2007.

BIRDER, L. A.; NAKAMURA, Y.; KISS, S.; NEALEN, M. L.; BARRICK, S.; KANAI, A. J.; WANG, E.; RUIZ, G.; DE GROAT, W. C.; APODACA, G.; WATKINS, S.; CATERINA, M. J. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. **Nature Neuroscience**, v. 5, p. 856 – 860, 2002.

BLAUSTEIN, M. P.; HAMLYN, J. M. Signaling Mechanisms that Link Salt Retention to Hypertension: Endogenous Ouabain, the Na+ Pump, the Na+/Ca2+ Exchanger and TRPC Proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1802, 1219 - 1229, 2010.

BLEDNOV, Y. A.; HARRIS, R. A. Deletion of vanilloid receptor (TRPV1) in mice alters behavioral effects of ethanol. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 814 – 820, 2009.

BÖDDING, M.; WISSENBACH, U.; FLOCKERZI, V. Characterisation of TRPM8 as a pharmacophore receptor. **Cell Calcium**, v. 42, p. 618 - 628, 2007.

BORTOLOTTO, L. A.; MALACHIAS, M. V. B. Novos medicamentos na hipertensão resistente. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 16, p. S13 – S15, 2009.

BORBA, M. O. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PADOVANI, I. O. Ultra structural of theactive fractions of Mentha crispa against the Schistossoma mansoni “in vivo”. In: **International Symposium on Schistossomíasis – National Meeting on Schistossomíasis**, Rio de Janeiro, 1991.

BORBA, M. O. P.; KOBAYASHI, S.; ACA, E. B.; MEDEIROS, F. P. Frações ativas de Mentha crispa sobre cultura de Entamoeba histolytica - cepa saw 1627 (Parte II). In: **XI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, João Pessoa, Brasil, 1990b.

BORBA, M. O. P.; KOBAYASHI, S.; ACA, I. S.; BERINO, E.; MEDEIROS, F. P. Frações ativas da Mentha crispa sobre a cultura da Entamoeba histolytica cepa SAW 1627. In: **XI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, João Pessoa, 1988.

BORBA, M. O. P.; MELO, J. F. A. Uso da *Mentha crispa* no tratamento de helmintos e protozoários intestinais. In: **Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Manaus, 1988.

BORBA, M. O. P.; PANDOVAN, P. A.; PANDOVAN, I. P.; SANTANA, J. V.; PADILHA, R. J.; JUNGMAN, P.; SILVA, J. F. Effects of *Mentha crispa* crude extract on Schistosoma mansoni cercaria. An ultra-estrutural study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 235, 1989b.

BORBA, M. O. P.; SANTANA, J. V.; BERINO, E. Effect of *Mentha crispa* crude extract administration on murine experimental schistosomiasis - Clinical and parasitological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 236, 1989a.

BORBA, M. O. P.; SILVA, J. F.; MONTENEGRO, L.; JUGMANN, P.; CAVALCANTI, M. M.; ALBURQUERQUE, P. M. S. Frações ativas da Mentha crispa sobre camundongos albinos swiss infectados com Schistosoma mansoni cepa São Lourenço da Lata (slm) (Parte I). In: **XI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. João Pessoa, Brasil, 1990a

BRAUCHI, S.; ORIO, P.; LATORRE, R. Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 15494 - 15499, 2004.

BUCKINGHAM, J. **Dictionary of natural products.** London: Chapman and Hall, v. 2, p. 2169, 1994.

CALIXTO, J. B.; KASSUYA, C. A. L.; ANDRÉ, E.; FERREIRA, J. Contribution of Natural to the Discovery of the Transient Receptor potential (TRP) Channels Family and their Functions. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 106, p. 179 - 208, 2005.

CARVALHO, J. G. R. **Hipertensão arterial secundária**. Medicina, Ribeirão Preto, v. 29, p. 220-231, 1996.

CATERINA, M. J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A. B.; MARTIN, W. J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K. R.; KOLTZENBURG, M.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v. 288, p. 306 – 313, 2000.

CATERINA, M. J.; ROSEN, T. A.; TOMINAGA, M.; BRAKE, A. J.; JULIUS, D. A. capsaicin receptor homologue with a threshold for noxius heat. **Nature**, v. 398, p. 436 - 441, 1999.

CHAMIOT-CLERC, P.; RENAUD, J. F.; SAFAR, M. E. Pulse Pressure, Aortic Reactivity, and Endothelium Dysfunction in Old Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 37, p. 313 - 321, 2001.

CHEANG, W. S.; LAM, M. Y.; WONG, W. T.; TIAN, X. Y.; LAU, C. W.; ZHU, Z.; YAO, X.; HUANG, Y. Menthol relaxes rat aortae, mesenteric and coronary arteries by inhibiting calcium influx. **European Journal of Pharmacology**, v. 702, p. 79 – 84, 2013.

CHEN, X.; YANG, D.; MA, S.; HE, H.; LUO, Z.; FENG, X.; CAO, T.; MA, L.; YAN, Z.; LIU, D.; TEPEL, M.; ZHU, Z. Increased rhythmicity in hypertensive arterial smooth muscle is linked to transient receptor potential canonical channels. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, p. 2483 - 2494, 2010.

CHENG, X.; JIN, J.; HU, L.; SHEN, D.; DONG, X. P.; SAMIE, M. A.; KNOFF, J.; EISINGER, B.; LIU, M. L.; HUANG, S. M.; CATERINA, M. J.; DEMPSEY, P.; MICHAEL, L. E.; DLUGOSZ, A. A.; ANDREWS, N. C.; CLAPHAM, D. E.; XU, H. TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation. **Cell**, v. 141, p. 331 – 343, 2010.

CHUANG, H. H.; NEUHAUSSER, W. M.; JULIUS, D. The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. **Neuron**, v. 43, p. 859 - 869, 2004.

CHUANG, H. H.; PRESCOTT, E. D.; KONG, H.; SHIELDS, S.; JORDT, S. E.; BASBAUM, A. I.; CHAO, M. V.; JULIUS, D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. **Nature**, v. 411, p. 957 – 962, 2001.

CHUBANOV, V.; WALDEGGER, S.; MEDEROS, Y.; SCHNITZLER, M.; VITZTHUM, H.; SASSEN, M. C.; SEYBERTH, H. W.; KONRAD, M.; GUDERMANN, T. Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 2894 - 2899, 2004.

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

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

CLAPHAM, D. E.; RUNNELS, L. W.; STRUBING, C. The TRP ion channel family. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 387 - 396, 2001.

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; BARATA, E. L.; MAGALHÃES, P. J. C.; LIMA, C. C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of the essential oil of Croton zehntneri, and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. **Phytotherapy Research**, v.11, p. 299 - 304, 1997.

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Selective modulatory effects of the essential oil of Croton zehntneri on isolated smooth muscle preparations of the guinea-pig. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 189 - 194, 1998.

COHEN, A. M.; ROSENMANN, E.; ROSENTHAL, T. The Cohen Diabetic (non-insulin-dependent) Hypertensive Rat Model. Description of the Model and Pathologic Findings. **American Journal of Hypertension**, v. 6, p. 989 - 995, 1993.

COLBURN, R. W.; LUBIN, M. L.; STONE, D. J.; WANG, Y.; LAWRENCE, D.; D'ANDREA, M. R.; BRANDT, M. R.; LIU, Y.; FLORES, C. M.; QIN, N. Attenuated Cold Sensitivity in TRPM8 Null Mice. **Neuron**, v. 54, p. 379 - 386, 2007.

CONRAD, C. H.; BROOKS, W. W.; HAYES, J. A.; SEN, S.; ROBINSON, K. G.; BING, O. H. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. **Circulation**, v. 91, p. 161-70, 1995.

COSTA, A. F. **Farmacognósia.** 3 ed., Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, p. 362, 1975.

CRAVEIRO, A. A.; DE QUEIROZ, D. C. Óleos Essenciais e Química Fina. **Química Nova**, v. 16, p. 224 - 228, 1993.

CRNICH, R.; AMBERG, G. C.; LEO, M. D., GONZALES, A. L.; TAMKUN, M. M.; JAGGAR, J. H.; EARLEY, S. Vasoconstriction resulting from dynamic membrane trafficking of TRPM4 in vascular smooth muscle cells. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 299, p. C682 - C694, 2010.

CUYPERS, E.; YANAGIHARA, A.; KARLSSON, E.; TYTGAT, J. Jellyfish and other cnidarian envenomations cause pain by affecting TRPV1 channels. **FEBS Letters**, v. 580, p. 5728 - 5732, 2006.

DAHL, L. K.; HEINE, M.; TASSINARI, L. Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion. **Nature**, v. 194, p. 480 - 482, 1962.

DANNERT, M. T.; ALSASUA, A.; HERRADON, E.; MARTÍN, M. I.; LÓPEZ-MIRANDA, V. Vasorelaxant effect of win 55,212-2 in rat aorta: New mechanisms involved. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 16 - 23, 2007.

DAVIS, J. B.; GRAY, J.; GUNTHORPE, M. J.; HATCHER, J. P.; DAVEY, P. T.; OVEREND, P.; HARRIES, M. H.; LATCHAM, J.; CLAPHAM, C.; ATKINSON, K., HUGHES, S. A.; RANCE, K.; GRAU, E.; HARPER, A. J.; PUGH, P. L.; ROGERS, D. C.; BINGHAM, S.; RANDALL, A.; SHEARDOWN, S. A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature**, v. 405, p. 183 – 187, 2000.

DHAKA, A.; MURRAY, A. N.; MATHUR, J.; EARLEY, T. J.; PETRUS, M. J.; PATAPOUTIAN, A. TRPM8 Is Required for Cold Sensation in Mice. **Neuron**, v. 54, p. 371 – 378, 2007.

DIETRICH, A.; GOLLASCH, M.; CHUBANOV, V.; MEDEROS, Y. S. M.; DUBROVSKA, G.; HERZ, U.; RENZ, H.; GUDERMANN, T.; BIRNBAUMER, L. Studies on TRPC6deficient mice reveal its nonredundant role in the regulation of smooth muscle tone. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 367, p. 238, 2003.

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

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

DOCHERTY, R. J.; YEATS, J. C.; PIPER, A. S. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, p. 1461 - 1467, 1997.

DONG, Y.; SHI, H-L.; SHI, J-R.; WU, D-Z. Transient receptor potential A1 is involved in cold-induced contraction in the isolated rat colon smooth muscle. **Acta Physiologica Sinica**, v. 62, p. 349 - 356, 2010.

DULBECCO, R.; VOGT, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 99, p. 167 - 182, 1954.

EARLEY, S. Vanilloid and melastatin transient receptor potential channels in vascular smooth muscle. **Microcirculation**, v. 17, p. 237 - 249, 2010.

EARLEY, S.; GONZALES, A. L.; GARCIA, Z. I. A dietary agonist of transient receptor potential cation channel V3 elicits endothelium-dependent vasodilation. **Molecular Pharmacology**, v. 77, p. 612 - 20, 2010.

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

EARLEY, S.; WALDRON, B. J.; BRAYDEN, J. E. Critical Role for Transient Receptor Potential Channel TRPM4 in Myogenic Constriction of Cerebral Arteries. **Circulation Research**, v. 95, p. 922 - 929, 2004.

ECCLES, R. Menthol and related cooling compounds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 618 - 630, 1994.

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

ELLINGSON, J. M.; SILBAUGH, B. C.; BRASSER, S. M. Reduced oral ethanol avoidance in mice lacking transient receptor potential channel vanilloid receptor 1. **Behavior Genetics**, v. 39, p. 62 – 72, 2009.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Toxicological Evaluation of Some Flavouring Substances and Non-Nutritive Sweetening Agents. FAO Nutrition Meetings Report Series nº 44A. Rome: **Food and Agriculture Organization**, 1967.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Safety Evaluation of Certain Food Additives. WHO Food additives Series nº 42. Rome: **Food and Agriculture Organization**, 1999.

FARCO, J. A.; GRUNDMANN, O. Menthol-pharmacology of an important naturally medicinal "cool". **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 124 - 131, 2013.

FERRONI, P.; BASILI, S.; PAOLETTI, V.; DAVI, G. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 16, p. 222 - 233, 2006.

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

FOGAÇA, R. T. H.; CAVALCANTE, A. D. A.; SERPA, A. K. L.; SOUSA, P. J. C.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. The effects of essential oil of Mentha x villosa on skeletal muscle of the toad. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 552 - 557, 1997.

FREISE, F. W. Essential oils from Brazilian Euphorbiaceae. **Perfum Essent. Oil Rec.**, v. 26, p. 219 - 220, 1935.

FREITAS, M. R.; SCHOTT, C.; CORRIU, C.; SASSARD, J.; STOCLET, J-C; ANDRIANTSITOHAINA, R. Heterogeneity of endothelium-dependent vasorelaxation in conductance and resistance arteries from Lyon normotensive and hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 21, p. 1505 – 1512, 2003.

FURCHGOTT, R. F; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373 - 376, 1980.

GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C.; MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BAGHIROLI, L.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of (+) and (-)-menthol. **Planta Medica**, v. 67, p. 174 - 176, 2001.

GALEOTTI, N.; DI CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. Menthol: a natural analgesic compound. **Neuroscience Letters**, v. 322, p. 145 – 148, 2002.

GAZIANO, T. A. Cardiovascular disease in the developing world and its cost-effective management. **Circulation**, v. 112, p. 3547 - 3553, 2005.

GELAL, A.; GUVEN, H.; BALKAN, D.; ARTOK, L.; BENOWITZ, N.L. Influence of menthol on caffeine disposition and pharmacodynamics in healthy female volunteers. **European Journal of Clinical and Pharmacology**, v. 59, p. 417 – 422, 2003.

GEPPETTI, P.; MATERAZZI, S.; NICOLETTI, P. The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, p. 207 - 214, 2006.

GONÇALVES, A. F. N; SANTOS, E. C. C.; FERNANDES, J. B. K.; TAKAHASHI, L. S. Mentol e eugenol como substitutos Mentol e eugenol como substitutos como substitutos da benzocaína na indução a benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 30, p. 339-344, 2008.

GONZALES, A. L.; GARCIA, Z. I.; AMBERG, G. C.; EARLEY, S. Pharmacological Inhibition of TRPM4 Hyperpolarizes Vascular Smooth Muscle. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 299, p. C1195 - C1202, 2010.

GRADILONE, S. A.; MASYUK, A. I.; SPLINTER, P. L.; BANALES, J. M.; HUANG, B. Q.; TIETZ, P. S.; MASYUK, T. V.; LARUSSO, N. F. Cholangiocyte cilia express TRPV4 and detect changes in luminal tonicity inducing bicarbonate secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 19138 –19143, 2007.

GRADIN, K. A.; LI, J-Y; ZHU, H.; SIMONSEN, U. Blunted pancreatic polypeptide-induced vasodilatation in mesenteric resistance vessels from spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 601, p. 118 - 123, 2008.

GRAZIANI, A.; POTESER, M.; ROSKER, C.; GROSCHNER, K. Role of TRP channels in endothelial Pathophysiology - evidence for vascular TRPs as a potential target for drug therapy. **International Congress Series**, v. 1262, p. 137 - 140, 2004

GREEN, B. G.; MCAULIFFE, B. L. Menthol desensitization of capsaicin irritation. Evidence of a short-term anti-nociceptive effect. **Physiology & Behavior**, v. 68, p. 631-639.

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

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

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, I. A. Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolone. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.1881 - 1887, 2004b.

HALL, C. E.; AYACHI, S.; HALL, O. Spontaneous hypertension in rats with hereditary hypothalamic diabetes insipidus (Brattlebaro strain). **Texas Reports on Biology and Medicine**, v. 31, p. 471 - 487, 1973.

HANKS, J. H.; WALLACE, R. E. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 71, p. 196 - 200, 1949.

HARLEY, R. M. Mints. In: **Plants wild and cultivated** (GREEN, P. S. ed.) Kew, Royal Botanic Gardens, p. 126 - 128, 1973.

HARTENECK, C. Function and pharmacology of TRPM cation channels. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 371, p. 307 - 314, 2005.

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

HAWTHORN, M.; FERRANTE, J.; LUCHOWSKI, E.; RUTLEDGE, A.; WEI, X. Y.; TRIGGLE, D. J. The actions of peppermint oil and menthol on calcium channel dependent processes in intestinal, neuronal and cardiac preparations. **Alimentary and Pharmacology Therapeutics**, v. 2, p. 101 – 118, 1988.

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

HELLER, J.; HELLEROVÁ, S.; DOBESKOVÁ, Z.; KUNES, J.; ZICHA, J. The Prague Hypertensive Rat: A New Model of Genetic Hypertension. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 15, p. 807 – 818, 1993.

HERZOG, M.; SCHERER, E. Q.; ALBRECHT, B; RORABAUGH, B.; SCOFIELD, M. A.; WANGEMANN, P. CGRP Receptors in the gerbil Spiral Modiolar artery Mediate a Sustained Vasodilatation via a Transient cAMP-medisted Ca^{2+}- decrease. **The Journal of Membrane Biology**, v. 189, p. 225 - 236, 2002.

HILLS, J. M.; ARONSON, P. I. The mechanism of action of peppermint oil on gastrointestinal smooth muscle. **Gastroenterology**, v. 101, p. 55 - 56, 1991.

HILL, A. J.; HINTON, J. M.; CHENG, H.; GAO, Z.; BATES, D. O.; HANCOX, J. C.; LANGTON, P. D.; JAMES, A. F. A TRPC-like non-selective cation current activated by alpha 1-adrenoceptors in rat mesenteric artery smooth muscle cells. **Cell Calcium**, v. 40, p. 29 - 40, 2006.

HIRUMA, C. A.; ALMEIDA, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M. Óleo essencial de Mentha x villosa Hudson com atividade sobre o Sistema Nervoso Central. **Resumos do XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Curitiba, p. 73, 1992.

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

HSU, C.H.; YANG, C. S.; PATEL, S. R.; STEVENS, M. G. Calcium and vitamin D metabolism in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology**, v. 253, p. F712- 723, 1987.

HUI, K.; GUO, Y.; FENG, Z. P. Biophysical properties of menthol-activated cold receptor TRPM8 channels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, p. 374 - 382, 2005.

IKEDA, H.; SHINO, A.; MATSUO, T.; IWATSUKA, H.; SUZUOKI, Z. A New Genetically Obese-Hyperglycemic Rat (Wistar Fatty). **Diabetes**, v. 30, P. 1045 – 1050, 1981.

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

İŞCAN, G.; KRMER, N.; KÜRKCÜOLU, M.; BAŞER, K. H. C.; DEMRC, F. Antimicrobial Screening of Mentha piperita Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3943 - 3946, 2002.

ITOKAWA, H.; AIYAMA, R.; IKUTA, A. A. Pungent diarylheptanoid from the Alpinia oxyphylla. **Phytochemistry**, v. 20, p. 769 - 771, 1981.

IVORRA, M. D.; LUGNIER, C.; SCHOTT, C.; CATRET, M.; NOGUERA, M. A.; ANSELMI, E.; D'OCON, P. Multiple actions of glaucine on cyclic nucleotide phosphodiesterases, α1-adrenoceptor and benzothiazepine binding site at the calcium channel. **British Journal of Pharmacology**, v. 106, p. 387 - 394, 1992.

JACKSON, W. F. Vascular smooth muscle store-operated Ca^{2+} channels: what a TRP! **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, p. H2592 - H2594, 2006.

JOHNSON, C. D.; MELANAPHY, D.; PURSE, A.; STOKESBERRY, S. A.; DICKSON, P.; ZHOLOS, A. V. Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 296, p. H1868 - H1877, 2009.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Insight Review: Molecular Mechanisms of Nociception. **Nature**, v. 413, p. 203 - 210, 2001.

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

KARASHIMA, Y.; DAMANN, N.; PRENEN, J.; TALAVERA, K.; SEGAL, A.; VOETS, T.; NILIUS, B. Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. **Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 9874 - 9884, 2007.

KATSURA, H.; TSUZUKI, K.; NOGUCHI, K.; SAKAGAMI, M. Differential expression of capsaicin-, menthol-, and mustard oil-sensitive receptors in naive rat geniculate ganglion neurons. **Chemical Senses**, v. 31, p. 681 - 688, 2006.

KAWABE, K.; WATANABE, T. X.; SHIONO, K.; SOKABE, H. Influence on blood pressure of renal isografts between spontaneously hypertensive and normotensive rats, utilizing the F1 hybrids. **Japanese Heart Journal**, v. 19, n. 6, p. 886-894, 1978.

KAWANO, K.; HIRASHIMA, T.; MORI, S.; SAITOH, Y.; KUROSUMI, M.; NATORI, T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka–Long–Evans–Tokushima Fatty (OLETF) strain. **Diabetes**, v. 41, p. 1422 – 1428, 1992.

KIRSCHENLOHR, H. L.; METCALFE, J. C.; GRAINGER, D. J. Cultures of Proliferating Vascular Smooth Muscle Cells from Adult Human Aorta. **Human Cell Culture Protocols - Methods in Molecular Medicine**, v. 2, 1996, p. 319 – 334, 1996.

KIUCHI, F.; IWAKAMI, S.; SHIBUYA, M.; HANAOKA, F.; SANKAWA, U. Inhibition of prostaglandin and leucotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, p. 387 - 391, 1992.

KLASEN, K.; HOLLATZ, D.; ZIELKE, S.; GISSELMANN, G.; HATT, H.; WETZEL, C. H. The TRPM8 ion channel comprises direct Gq protein-activating capacity. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 463, p. 779 – 797, 2012.

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (artemisin) an antimalarial drug from China. **Science**, v. 228, p. 1049 - 1055, 1985.

KLEIN, A. H.; CARSTENS, M. I.; ZANOTTO, K. L.; SAWYER, C. M.; IVANOV, M.; CHEUNG, S.; CARSTENS, E. Self- and cross-desensitization of oral irritation by menthol and cinnamaldehyde (CA) via peripheral interactions at trigeminal sensory neurons. **Chemical Senses**, v. 36, p. 199 – 208, 2011.

KOCHUKOV, M. Y.; MCNEARNEY, T. A.; FU, Y.; WESTLUND, K. N. Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 291, p. C424 - C432, 2006

KONRAD, M.; SCHLINGMANN, K.P.; GUDERMANN, T. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 286, p. F599 - F605, 2004.

KUIJPERS, M. H.; GRUYS, E. Spontaneous hypertension and hypertensive renal disease in the fawn-hooded rat. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 65, p. 181 - 190, 1984.

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

KUNICHIKA, N.; YU, Y.; REMILLARD, C. V.; PLATOSHYN, O.; ZHANG, S.; YUAN, J. X. Overexpression of TRPC1 enhances pulmonary vasoconstriction induced by capacitative Ca^{2+} entry. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, p. L962 - L969, 2004.

KWAN, H. Y.; SHEN, B.; MA, X.; KWOK, Y. C.; HUANG, Y.; MAN, Y. B.; YU, S.; YAO, X. TRPC1 associates with BK(Ca) channel to form a signal complex in vascular smooth muscle cells. **Circulation Research**, v. 104, p. 670 – 678, 2009.

LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, R. F.; LEAL-CARDOSO, J. H.; TOSCANO, C. F. Cardiovascular Effects of the Essential Oil of Mentha x villosa and Main Constituent, Piperitenone Oxide, in Normotensive Anaestheside Rats: Role of the Autonomic Nervous System. **Planta Medica**, v. 67, p. 638 - 643, 2001.

LAHLOU, S., FIGUEIREDO, A. F., MAGALHÃES, P. J.; LEAL-CARDOSO, J. H. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 80, p. 1125 -1131, 2002.

LARGE, W. A. Receptor-operated Ca^{2+}-permeable nonselective cation channels in vascular smooth muscle: a physiologic perspective. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, v. 13, p. 493 - 501, 2002.

LARGE, W. A.; SALEH, S. N.; ALBERT, A. P. Role of phosphoinositol 4,5-bisphosphate and diacylglycerol in regulating native TRPC channel proteins in vascular smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 45, p. 574 - 582, 2009.

LASHINGER, E.S.; STEIGINGA, M.S.; HIEBLE, J.P.; LEON, L.A.; GARDNER, S.D.; NAGILLA, R., DAVENPORT, E.A.; HOFFMAN, B.E.; LAPING, N.J.; SU, X. AMTB, a TRPM8 channel blocker, evidence in rats for activity in overactive bladder and painful bladder syndrome. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 295(3), p. F803 – 810, 2008.

LATERZA, M. C.; AMARO, G.; NEGRÃO, C. E.; RONDON, M. U. P. B. Exercício Físico Regular e Controle Autonômico na Hipertensão Arterial. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**, v. 21, p. 320 – 328, 2008.

LATORRE, R.; BRAUCHI, S.; ORTA, G.; ZAELZER, C.; VARGAS, G. ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. **Cell Calcium**, v. 42, p. 427–438, 2007.

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

LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**. 2 ed. Rio de Janeiro, Record, 1993.

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

LEE, C-H; POBURKO, D.; SAHOTA, P.; SANDHU, J.; RUEHLMANN, D. O.; BREEMEN, C. V. The mechanism of phenylephrine-mediated $[Ca^{2+}]_i$ oscillations underlying tonic contraction in the rabbit inferior vena cava. **Journal of Physiology**, v. 534, p. 641 - 650, 2001.

LI-LIN, A.; SHANGARI, N.; CHAN, T. S.; REMIREZ, D.; O'BRIEN, P. J. Herbal monoterpene alcohols inhibit propofol metabolism and prolong anesthesia time. **Life Science**, v. 79, p. 21 - 29, 2006.

LIEDTKE, W.; FRIEDMAN, J. M. Abnormal osmotic regulation in trpv4/mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 13698 – 13703, 2003.

LIN, M. J.; LEUNG, G. P.; ZHANG, W. M.; YANG, X. R.; YIP, K. P.; TSE, C. M.; SHAM, J. S. K. Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca^{2+} channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. **Circulation Research**, v. 95, p. 496 - 505, 2004.

LIU, D.; SCHOLZE, A.; ZHU, Z.; KREUTZ, R.; WEHLAND-VON-TREBRA, M.; ZIDEK, W.; TEPEL, M. Increased Transient Receptor Potential Channel TRPC3 Expression in Spontaneously Hypertensive Rats. **American Journal of Hypertension**, v. 18, p. 1503-1507, 2005.

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

LIU, D.; YANG, D.; HE, H.; CHEN, X.; CAO, T.; FENG, X.; MA, L.; LUO, Z.; WANG, L.; YAN, Z.; ZHU, Z.; TEPEL, M. Increased Transient Receptor Potential Canonical Type 3 Channels in Vasculature From Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 53, p. 70 - 76, 2009.

LIU, X-R.; ZHANG, M-F.; YANG, N.; LIU, Q.; WANG, R-X.; CAO, Y-N.; YANG, X-R.; SHAM, J. S. K.; LIN, M-J. Enhanced store-operated Ca2 entry and TRPC channel expression in pulmonary arteries of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 302, p. C77 - C87, 2012.

LORIA, A. S.; BRINSON, K. N.; FOX, B. M.; SULLIVAN, J. C. Sex-specific alterations in NOS regulation of vascular function in aorta and mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats compared to Wistar Kyoto rats. **Physiological Reports**, v. 2, p. 1 – 14, 2014.

LOTUFO, P. A. Epidemiologia da hipertensão arterial no Brasil. In: NOBRE, F.; SERRANO JR, C.V. **Tratamento de cardiologia** SOCESP. São Paulo, SP: Manole, p. 395 – 404, 2005.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **The journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265 - 275, 1951.

LUZ, A. I.; ZOGHBI, M. G.; RAMOS, L. S.; MAIA, J. G.; SILVA, M. L. Essential oils of the some Amazonian zingiberaceae, Genera Alpinia and Rengalnine. **Journal of Natural Products**, v. 47, p. 907 - 908, 1984.

LYALL, V.; HECK, G. L.; VINNIKOVA, A. K.; GHOSH, S.; PHAN, T. H.; ALAM, R. I.; RUSSELL, O. F.; MALIK, S. A.; BIGBEE, J. W.; DESIMONE, J. A. The mammalian amiloride-insensitive nonspecific salt taste receptor is a vanilloid receptor-1 variant. **The Journal of Physiology**, v. 558, p. 147 – 159, 2004.

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

MACPHERSON, L. J.; HWANG, S. W.; MIYAMOTO, T.; DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A.; STORY, G. M. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 32, p. 335 - 343, 2006.

MAGALHÃES, L. B. N. C. O significado clínico-epidemiológico da pressão diastólica baixa na elevação da pressão de pulso ou Importância da pressão de pulso no risco cardiovascular. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 9, p. 301 – 303, 2002.

MAGALHÃES, P. J. C.; CRIDDLE, D. N.; TAVARES, R. A.; MEIO, E. M.; MOTA, T. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Intestinal myorelaxant and antiespasmodic effects of the essential oil of Croton nepetaefolius and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 172 - 177, 1998.

MAHIEU, F.; OWSIANIK, G.; VERBERT, L.; JANSSENS, A.; SMEDT, H.; NILIUS, B.; VOETS, T. TRPM8-independent Menthol-induced Ca^{2+} Release from Endoplasmic Reticulum and Golgi. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 3325 - 3336, 2007.

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

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

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas,** 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1994.

MATOS-ROCHA, T. J.; CAVALCANTI, M. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LÚCIO, A. S. S. C.; VERAS, D. L.; FEITOSA, A. P. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; ALMEIDA, R. N.; MARQUES, M. O. M.; ALVES, L. C.; BRAYNER, F. A. In Vitro Evaluation of Schistosomicidal Activity f Essential Oil of Mentha x villosa and Some of Its Chemical Constituents in Adult Worms of *Schistosoma mansoni.* **Planta Medica**, v. 79, p. 1307 – 1312, 2013.

MCCUNE, S. A.; BAKER, P. B.; STILLS, J. H. F. SHHF/Mcc-cp rat: model of obesity, non-insulin-dependent diabestes, and congestive heart failure. **Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) Journal**, v. 32, p. 23 - 27, 1990.

MCKEMY, D. D. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. **Molecular Pain**, v. 1, p. 16, 2005.

MCKEMY, D. D. Therapeutic Potential of TRPM8 Modulators. **The Open Drug Discovery Journal**, v. 2, p. 81 - 88, 2010.

MCKEMY, D. D.; NEUHAUSSER, W. M.; JULIUS, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature (Lond),** v. 416, p. 52 - 58, 2002.

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

MCNEILL, J. R.; JURGENS, T. M. A systematic review of mechanisms by which natural products of plant origin evoke vasodilatation. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.84, p.803-821, 2006.

MENDONÇA, V. L. M. Estudo farmacológico e toxicológico de *Alpinia speciosa* Schum. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 152, 1989.

MENDONÇA, V. L. M; OLIVEIRA, C. L. A; CRAVEIRO, A. A; RAO, V. S; FONTELES, M. C. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 93 - 97, 1991.

MENEZES, I. A. C., BARRETO, C. M. N., ANTONIOLLI, A. R., SANTOS, M. R. V.; SOUSA, D. P. Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. **Journal of Biosciences**, v. 65, p. 562 - 566, 2010

MINKE, B. TRP channels and Ca^{2+} signaling. **Cell Calcium**, v. 40, p. 261 - 275, 2006.

MINKE, B.; COOK, B. TRP Channel Proteins and Signal Transduction. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 429 - 472, 2002.

MION-JÚNIOR, D.; SILVA, G. V.; ORTEGA, K. C.; NOBRE, F. A importância da medicação anti-hipertensiva na adesão ao tratamento. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.13, p. 55 - 58, 2006.

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

MONTELL, C.; RUBIN, G. M. Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. **Neuron,** v. 2, p. 1313 - 1323, 1989.

MONTELL, C.; BIRNBAUMER, L.; FLOCKERZI, V. The TRP channels, a remarkably functional family. **Cell Calcium,** v. 108, p. 595 - 598, 2002.

MONTELL, C. The TRP superfamily of cation channels. **Science Signaling – The Signal Transduction Knowledge Environment**, v. 272, p. 1 - 24, 2005.

MOQRICH, A.; HWANG, S. W.; EARLEY, T. J.; PETRUS, M. J.; MURRAY, A. N.; SPENCER, K. S.; ANDAHAZY, M.; STORY, G. M.; PATAPOUTIAN, A. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. **Science**, v. 307, p. 1468 - 1472, 2005.

MORAES, M. E.; CUNHA, G. H; BEZERRA, M. M.; FECHINE, F. V.; PONTES, A. V.; ANDRADE, W. S.; FROTA-BEZERRA, F. A.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, P. P. Efficacy of the Mentha crispa in the treatment of women with Trichomonas vaginalis infection. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 286, p. 125 – 130, 2012.

MULVANY, M. J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. **Physiological Reviews,** v. 70, p. 921 - 961, 1990.

MURAKI, K.; IWATA, Y.; KATANOSAKA, Y.; ITO, T.; OHYA, S.; SHIGEKAWA, M.; IMAIZUMI, Y. TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. **Circulation Research**, v. 93, p. 829 - 838, 2003.

MUSTAFA, S.; ORIOWO, M. A. COOLING-INDUCED CONTRACTION OF THE RAT GASTRIC FUNDUS: MEDIATION VIA TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL (TRP) CATION CHANNEL TRPM8 RECEPTOR AND RHO-KINASE ACTIVATION. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, p. 832 - 838, 2005.

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

NASA, Y.; ICHIARA, K.; YOSHIDA, R. Positive inotropic and negative chronotropic effects of (-)-cis-diltiazem in rat isolated atria. **British Journal of Pharmacology**, v. 105, n. 3, p. 696 - 702, 1992.

NILIUS, B.; VOETS, T. TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 451, p. 1 - 10, 2005.

NISHIDA, M.; KUROSE, H. Roles of TRP channels in the development of cardiac hypertrophy. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 378, p. 395 – 406, 2008.

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

OLIVE, J.L.; HOLLIS, B.; MATTSON, E.; TOPP, R. Vascular conductance is reduced after menthol or cold application. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v. 20, p. 372 – 376, 2010.

OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F.; DA 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.; MUKHERJEE, R. Hyotensive and spasmolytic effect of normacusine B from Strychnos atlântica roots. **Phytomedicine**, v. 3, p. 45 – 49, 1996.

PALMER, C. P.; AYDAR, E.; DJAMGOZ, M. B. A microbial TRP-like polycystic-kidney-disease-related ion channel gene. **Biochemical Journal**, v. 387, p. 211 - 219, 2005.

PATEL, T.; ISHIUJI, Y; YOSIPOVITCH, G. Menthol: a refreshing look at this ancient compound. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.57, p. 873 - 881, 2007.

PEIER, A. M.; MOQRICH, A.; HERGARDEN, A. C.; REEVE, A. J.; ANDERSSON, D. A.; STORY, G. M.; EARLEY, T. J.; DRAGONI, I.; MCINTYRE, P.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell,** v. 108, p. 705 - 715, 2002.

PEPPIATT-WILDMAN, C. M.; ALBERT, A. P.; SALEH, S. N.; LARGE, W. A. Endothelin-1 activates a Ca^{2+}-permeable cation channel with TRPC3 and TRPC7 properties in rabbit coronary artery myocytes. **The Journal of Physiology (Lond.)**, v. 580, p. 755 - 764, 2007.

PHELPS, C. B.; GAUDET, R. The Role of the N Terminus and Transmembrane Domain of TRPM8 in Channel Localization and Tetramerization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 36474 - 36480, 2007.

PINTO, N. V.; ASSREUY, A. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CECCATTO, V. M.; MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of Alpinia zerumbet and its main constituent 1,8-cineole in rats. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1151 - 1155, 2009.

PRUDENT, D.; PERINEAU, F.; BESSIERE, J. M.; MICHE, G.; BRAVO, R. Chemical analysis, bacteriostatic and fungistatic properties of the essential oil of the automan from Martinique (*Alpinia speciosa* K. Schum). **Journal of Essential Oil Research**, v. 5, p. 255 - 264, 1993.

PSATY, B. M.; LUMLEY, T.; FURBERG, C. D.; SCHELLENBAUM, G.; PAHOR, M.; ALDERMAN, M. H. Heatlth outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: a network meta-analysis. JAMA, **Journal of the American Medical Association**, v. 17, p. 2534-2544, 2003.

RAMACHANDRANA, R.; HYUNA, E.; ZHAOC, L.; LAPOINTEA, T. K.; CHAPMANA, K.; HIROTAA, C. L.; GHOSHD, S.; MCKEMYE, D. D.; VERGNOLLEA, N.; BECKD, P. L.; ALTIERA, C.; HOLLENBERG, M. D. TRPM8 activation attenuates inflammatory responses in mouse models of colitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 7476 - 7481, 2013.

RATZ, P. H.; BERG, K. M. 2-Aminoethoxydiphenyl borate inhibits KCl-induced vascular smooth muscle contraction. **European Journal of Pharmacology**, v. 541, p. 177 - 183, 2006.

READING, S. A.; EARLEY, S.; WALDRON, B. J.; WELSH, D. G.; BRAYDEN, J. E. TRPC3 mediates pyrimidine receptorinduced depolarization of cerebral arteries. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, p. H2055 - H206, 2005.

REID, G. ThermoTRP channels and cold sensing: what are they really up to? **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 451, p. 250 - 263, 2005.

REUBISH, D. S.; EMERLING, D. E.; DEFALCO, J.; STEIGER, D.; VICTORIA, C. L.; VINCENT, F. Functional assessment of temperature-gated ion-channel activity using a real-time PCR machine. **Biotechniques**, v. 47, p. iii - ix, 2009.

ROSKER, C.; GRAZIANI, A.; LUKAS, M.; EDER, P.; ZHU, M. X.; ROMANIN, C.; GROSCHNER, K. Ca(2+) signaling by TRPC3 involves Na(+) entry and local coupling to the Na(+)/Ca(2+) exchanger. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 13696 - 13704, 2004.

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

RUSSELL, J. C.; AHUJA, S. K.; MANICKAVEL, V.; RAJOTTE, R. V.; AMY, R. M. Insulin resistance and impaired glucose tolerance in the atherosclerosis prone LA/N-corpulent rat. **Arteriosclerosis**, v. 7, p. 620 - 626, 1987.

SABNIS, A. S.; SHADID, M.; YOST, G. S.; REILLY, C. A. Human Lung Epithelial Cells Express a Functional Cold-Sensing TRPM8 Variant. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 39, p. 466 - 474, 2008.

SABOURIN, J.; ROBIN, E.; RADDATZ, E. A key role of TRPC channels in the regulation of electromechanical activity of the developing heart. **Cardiovascular Research**, v. 92, p. 226 – 236, 2011.

SAITO, M.; HANSON, P. I.; SCHLESINGER, P. Luminal chloride-dependent activation of endosome calcium channels: patch clamp study of enlarged endosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 27327 – 27333, 2007.

SALEH, S. N.; ALBERT, A. P.; PEPPIATT-WILDMAN, C. M.; LARGE, W. A. Diverse properties of store-operated TRPC channels activated by protein kinase C in vascular myocytes. **The Journal of Physiology (Lond)**, v. 586, p. 2463 - 2476, 2008.

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

SANTANA, C. F.; ALMEIDA, E. R.; SANTOS, E. R.; SOUZA, L. A. Action of *Mentha crispa* hydroethanolic extract in patients bearing intestinal protozoan. **Fitoterapia**, v. 63, p. 409 – 410, 1992.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. 1,8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 46, p. 331 - 337, 2001.

SASSARD, J.; MING, L.; KIAO-LING, L. Lyon genetically hypertensive rats: an animal model of “low rennin hypertension”. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, p. 1 – 6, 2003.

SASSOLAS, A.; VICENT, M.; BENZONI, D.; SASSARD, J. Plasma lipids in genetically hypertensives rats of the Lyon strain. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 3, p. 1008 – 1014, 1981.

SCHLEIFFER, R.; PERNOT, F.; BERTHELOT, A.; GAIRARD, A. Low calcium diet enhances development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 6, p. 783-793, 1984.

SHE, G.; XU, C.; LIU, B. New monocyclic monoterpenoid glycosides from Mentha haplocalyx Briq. **Chemistry Central Journal**, v. 6, p. 37, 2012.

SHIBATA, H.; GHISHAN, F. K. Intestinal calcium transport in spontaneously hypertensive rats (SHR) and their genetically matched WKY rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 194, p. 26 - 31, 1990.

SIDELL, N.; VERITY, M. A.; NORD, E. P. Menthol blocks dihydropyridine-insensitive Ca2+ channels and induces neurite outgrowth in human neuroblastoma cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 142, p. 410 - 419, 1990.

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

SILVA, D. F.; ARAUJO, I. G. A.; ALBUQUERQUE, J. G. F.; PORTO, D.L.; DIAS, K. L. G.; CAVALCANTE, K. V. M.; VERAS, R. C.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; Araújo, D. A. M.; CRUZ, J. S.; CORREIA, N. A.; MEDEIROS, I. A. Rotundifolone-induced relaxation is mediated by BK_{Ca} channel activation and Ca_v channel inactivation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, p. 465 - 475, 2011.

SIMMONDS, M. S. J. Novel drugs from botanical sources. **Drug Discovery Today,** v. 8, p. 721 - 722, 2003.

SMIRK, F. H.; HALL, W. H. Inherited hypertension in rats. **Nature,** v. 18, p. 727 – 728, 1958.

SOARES, M. C.; DAMIANI, C. E.; MOREIRA, C. M.; STEFANON, I.; VASSALLO, D. V. Eucalyptol, an essential oil, reduces contractile activity in rat cardiac muscle. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 453 - 461, 2005.

Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, p. 1 – 51, 2010.

SOKABE, T.; TSUJIUCHI, S.; KADOWAKI, T.; TOMINAGA, M. Drosophila Painless Is a Ca^{2+}-Requiring Channel Activated by Noxious Heat. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 9929 - 9938, 2008.

SOUSA, P. J. C.; MAGALHÃES, P. J. C.; LIMA, C. C.; OLIVEIRA, V. S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of piperitenone oxide on the intestinal smooth muscle of guinea pig. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p, 787 - 791, 1997.

SOUSA, P. J. C. Estudos Farmacológicos do óleo essencial de Mentha x villosa e seu principal constituinte, óxido de piperitenona, em músculos lisos gastrointestinais de cobaia e pressão arterial de rato. **Tese (Doutorado em Farmacologia)** – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

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

TELES, N. S. B.; FECHINE, F. V.; VIANA, F. A. C.; VIANA, I. O. L.; NASCIMENTO, D. F.; LEITE, A. L. A. S.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Evaluation of the therapeutic efficacy of *Mentha crispa* in the treatment of giardiasis. **Contemporary Clinical Trials**, v. 32, p. 809 – 813, 2011.

THEBAULT, S.; LEMONNIER, L.; BIDAUX, G.; FLOURAKIS, M.; BAVENCOFFE, A.; GORDIENKO, D.; ROUDBARAKI, M.; DELCOURT, P.; PANCHIN, Y.; SHUBA, Y.; SKRYMA, R.; PREVARSKAYA, N. Novel Role of Cold/Menthol-sensitive Transient Receptor Potential Melastatine Family Member 8 (TRPM8) in the Activation of Store-operated Channels in LNCaP Human Prostate Cancer Epithelial. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 39423 - 39435, 2005.

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

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, p. 215 - 242, 2005.

TOPP, R.; WINCHESTER, L.; MINK, A. M.; KAUFMAN, J. S.; JACKS, D. E. Comparison of the effects of ice and 3.5% menthol gel on blood flow and muscle strength of the lower arm. **Journal of Sport Rehabilitation**, v. 20, p. 355 – 66, 2011.

TOUVAY, C.; VILAIN, B.; CARRÉ, C.; MENCIA-HUERTA, J. M.; BRAQUET, P. Effect of limonene and sobrerol on monocrotaline-induced lung alterations and pulmonary hypertension. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 107, p. 272 - 274, 1995.

TOUYZ, R. M. Magnesium and hypertension, **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 15, p. 141 - 144, 2006.

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

TSAVALER, L.; SHAPERO, M. H.; MORKOWSKI, S.; LAUS, R. *Trp-p8*, a Novel Prostate-specific Gene, Is Up-Regulated in Prostate Cancer and Other Malignancies and Shares High Homology with Transient Receptor Potential Calcium Channel Proteins. **Cancer Research**, v. 61, p. 3760 - 3769, 2001.

UMEZU, T.; SAKATA, A.; ITO, H. Ambulation-promoting effect of peppermint oil and identification of its active constituents. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 69, p. 383 – 390, 2001.

UTZ, J.; ECKERT, R.; TRAUTWEIN, W. Changes of intracellular calcium concentrations by phenylephrine in renal arterial smooth muscle cells. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 438, p. 725 - 731, 1999.

VALENZANO, K. J.; GRANT, E.; HACHICHA, M.; HODGES, D.; LIMBERIS, J.; MALIK, S.; ROTSHTEYN, Y.; SCHMID, L.; SUN, Q.; TAFESSE, L.; WHITTEMORE, E. BCTC (N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3–chloropyridin-2-yl)tetrahydro-pyrazine–1(2H)-carbox–amide), a novel, orally- effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: I. In vitro characterization and pharmacokinetic properties. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, p. 377 - 386, 2003.

VAZQUEZ, G. TRPC Channels as Prospective Targets in Atherosclerosis: terra incognita. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 157 - 166, 2012.

VENKATACHALAM, K.; MONTELL, C. TRP Channels. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, p. 387 - 417, 2007.

VILLALBA, N.; STANKEVICIUS, E.; GARCIA-SACRISTÁN, A.; SIMONSEN, U.; PRIETO, D. Contribution of both Ca^{2+} entry and Ca^{2+} sensitization to the α1-adrenergic vasoconstriction of rat penile small arteries. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, p. H1157 - H1169, 2007.

VOETS, T.; DROOGMANS, G.; WISSENBACH, U.; JANSSENS, A.; FLOCKERZI, V.; NILIUS, B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. **Nature**, v. 430, p. 748 - 754, 2004.

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

WANG, Y.; CHEN, M-S.; LIU, H-C.; XIAO, J-H.; WANG, J-L. The Relationship between Frequency Dependence of Action Potential Duration and the Expression of TRPC3 in Rabbit Ventricular Myocardium. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 33, p. 646 – 656, 2014.

WATT, E. E.; BETTS, B. A.; KOTEY, F. O.; HUMBERT, D. J.; GRIFFITH, T. N.; KELLY, E. W.; VENESKEY, K. C.; GILL, N.; ROWAN, K. C.; JENKINS, A.; HALL, A. C. Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABA(A) receptor with the intravenous agent, propofol. **European Journal of Pharmacology**, v. 590, p. 120 – 126, 2008.

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

WIBO, M.; DEROTH, L.; GODFRAIND, T. Pharmacologic Relevance of Dihydropyridine Binding Sites in Membranes From Rat Aorta: Kinetic and Equilibrium Studies. **Circulation Research**, v. 62, p. 91 - 96, 1988.

WISE, P. M.; BRESLIN, P. A. S.; DALTON, P. Sweet taste and menthol increase cough reflex thresholds, **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 25, p. 236 – 241, 2012.

WU, L.-J.; SWEET, T.-B.; CLAPHAM, D. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics - Pharmacological Reviews**, v. 62, p. 381 – 404, 2010.

XU, H.; BLAIR, N. T.; CLAPHAM, D. E. Camphor Activates and Strongly Desensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 Channel in a Vanilloid-Independent Mechanism. **The Journal of Neuroscience,** v. 25, p. 8924 - 8937, 2005.

XU, H. X.; DELLING, M., JUN, J. C.; CLAPHAM, D. E. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP Channels. **Nature Neuroscience**, v. 9, p. 628 - 635, 2006.

YANG, F.; CUI, Y.; WANG, K.; ZHENG, J. Thermosensitive TRP channel pore turret is part of the temperature activation pathway. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 7083 – 7088, 2010.

YANG, X-R.; LIN, M-J.; MCINTOSH, L. S.; SHAM, J. S. K. Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloidrelated channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 290, p. L1267 - L1276, 2006.

YANG, Z-H.; WANG, X-H.; WANG, H-P.; HU, L-Q. Effects of TRPM8 on the proliferation and motility of prostate cancer PC-3 cells **Asian Journal of Andrology**, v. 11, p. 157 - 165, 2009.

YAO, G.; HE, Y.; SAVOIA, C.; TOUYZ, R. M. Transient Receptor Potential Melastatin 7 Ion Channels Regulate Magnesium Homeostasis in Vascular Smooth Muscle Cells. **Circulation Research**, v. 96, p. 207 - 215, 2005.

YIN, J.; KUEBLER, W. M. Mechanotransduction by TRP channels: general concepts and specific role in the vasculature. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 56, p. 1 - 18, 2010.

YOUNG, E. W.; PATEL, S. R.; HSU, C. H. Plasma 1,25 (OH) 2D3 response to parathyroid hormone, cyclic adenosine monophosphate, and phosphorus depletion in the spontaneously hypertensive rat. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 108, p. 562-566, 1986.

YU, Y.; FANTOZZI, I.; REMILLARD, C. V.; LANDSBERG, J. W.; KUNICHIKA, N.; PLATOSHYN, O.; TIGNO, D. D.; THISTLETHWAITE, P. A.; RUBIN, L. J.; YUAN, J. X-J. Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 13861 - 13866, 2004.

ZHANG, X-B.; JIANG, P.; GONG, N.; HU, X-L.; FEI, D.; XIONG, Z-Q.; XU, L.; XU, T-L. A-type GABA receptor as a central target of TRPM8 agonst menthol. **Plos One**, v. 3, p. 1 – 11, 2008.

ZUKER, C. S. A cool ion channel. **Nature**, v. 416, p. 27 - 28, 2002.

ZUCKER, L. M.; ZUCKER, T. F. Fatty, a new mutation in the rat. **The Journal of Heredity**, v. 52, p. 275 - 278, 1961.

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

Anexo

PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

CERTIDÃO

João Pessoa, 15 de março de 2011

CEPA Nº. 1201/11

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Prof. Dr. ISAC ALMEIDA DE MEDEIROS

Departamento/Setor: LTF

Ref.: Avaliação da Ação de Rotundifolona e Mentol Sobre Canais Potencial Receptor Transiente Melastatina 8 – TRPM8 em artéria mesentérica e aorta de rato.

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Número de animais: 500 ratos (WKY e SHR)

Período:2º semestre de 2011 até 2º semestre de 2013.

Atenciosamente,

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

LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA • UFPB • CAIXA POSTAL 5009 • CEP 58051-970
JOÃO PESSOA • PARAÍBA • BRASIL • **FAX**: (083) 216-7502 - 216-7511
FONE: (083) 216-7173 - 216-7125 • **Home Page:** http://www.ltf.ufpb.br