

THAIS JOSY CASTRO FREIRE DE ASSIS

**ESTUDO DO EFEITO VASORELAXANTE
DE UMA PIRONA OBTIDA DE *Aniba
panurensis* EM ARTÉRIA MESENTÉRICA
SUPERIOR ISOLADA DE RATO**

**Recife - PE
2007**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
THAIS JOSY CASTRO FREIRE DE ASSIS

**ESTUDO DO EFEITO VASORELAXANTE
DE UMA PIRONA OBTIDA DE *Aniba
panurensis* EM ARTÉRIA MESENTÉRICA
SUPERIOR ISOLADA DE RATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia**.

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

**Recife - PE
2007**

Assis, Thais Josy Castro Freire de

Estudo do efeito vasorelaxante de uma pirona obtida de *Aniba panurensis* em artéria mesentérica superior isolada de rato. / Thais Josy Castro Freire de Assis. – Recife: O Autor, 2007.

95 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Fisiologia, 2007.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Sistema cardiovascular – animais 2. Artéria mesentérica – rato 3. Efeito vasorelaxante – pirona-198 4. Estiril – pirona I. Título.

591.1

CDU (2.ed.)

UFPE

571.1

CDD (22.ed.)

CCB – 2007-137

THAIS JOSY CASTRO FREIRE DE ASSIS

**ESTUDO DO EFEITO VASORELAXANTE DE
UMA PIRONA OBTIDA DE *Aniba panurensis* EM
ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA
DE RATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia**.

Aprovado em: _____ / _____ / _____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dra. Éurica Adélia Nogueira Ribeiro
Universidade Federal de Alagoas

Prof^ª. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
Universidade Federal da Paraíba

Dedicatória

**Aos meus pais, Assis e Fátima,
por serem os meus exemplos
de dignidade, trabalho, amor e fé.**

Agradecimientos

AGRADECER significa reconhecer, ser grato, perceber que por mais solitário que seja esse momento ele só existe porque várias pessoas, cada uma com sua peculiaridade, contribuíram de forma significativa e especial para este momento.

Agradecimento maior a **Deus e aos meus Pais**. A Deus por me conceder a dádiva de existir, e por ser o meu porto seguro, a quem me recolho e entrego minha existência. E aos meus pais, **Assis e Fátima**, que com muito amor, muito trabalho e fé, comemoram hoje junto a mim a concretização de mais um sonho. São eles os merecedores plenos desse mérito.

As minhas irmãs, **Cibelle e Priscilla**, por serem grandes companheiras, leais e fiéis, que sempre compartilharam comigo todos os meus sonhos.

Ao meu esposo, **Samyr Sampaio**, amor de minha vida, pelo companheirismo, dedicação e apoio incondicional.

A toda a **minha família**, que soube entender a minha ausência e que sempre partilhou comigo todas as minhas conquistas.

A **UFPE** e ao **LTF** por terem me recebido e disponibilizado a realização deste estudo.

Ao Prof. **Isac Almeida de Medeiros**, minha gratidão e carinho, que em mim acreditou e por isso chegamos até aqui.

Ao Professor **José Maria Barbosa Filho**, pela disponibilização da substância e por toda atenção sempre a mim referida.

Ao Professor **Mauricy Motta**, pela delicadeza de pessoa e por ter sido o ponto de partida desta caminhada.

Aos **professores** do programa de Pós-graduação em Fisiologia da UFPE por todos os ensinamentos compartilhados.

Aos relatores, **Prof. Márcio Roberto V. Santos e Prof. João Xavier Júnior**, pela colaboração, pelos conselhos e sugestões, acima de tudo pelo carinho com que aceitaram o meu pedido.

A **Comissão examinadora** que certamente enriquecerá a elaboração deste trabalho.

Ao amigo **José Crispim Duarte** (Crispa) pela grande amizade e dedicação, por estar sempre disposto a ajudar e ensinar.

A **Sr. Luís Cordeiro e todos os funcionários do LTF** que cuidam de forma tão amorosa dessa instituição, a eles grande respeito.

A **Márcio Marques e todos os funcionários do Departamento de Fisiologia**, pela amizade, dedicação e apoio.

As minhas amigas **Aldeídia Oliveira e Raline dos Anjos**, pela amizade construída com respeito e carinho, além de muito me orientarem ao longo de toda esta caminhada.

A **todos do laboratório de farmacologia cardiovascular**: agradeço aos alunos de Iniciação científica: **Valéria Lopes**, pela amizade e por todos os conhecimentos compartilhados; **Abrahão Filho**, pela dedicação e pelo companheirismo, **Couras, Camila, Thiago, Carminha, Ericelle, Nathália, Karol, George, Renata, Dayane, Brunna, Mônica**, por todo empenho, por todos os ensinamentos e por todo carinho.

Aos colegas da Pós-graduação: **Ápio, Júnior, Rodrigo, Thais, Nayara, Islânia, Socorro, Robson, Karla, Darizy, Horacinna, Alessandra, Aurilene**, agradeço pela amizade e por todos os ensinamentos comigo compartilhados.

Andréa Maria, companheira do mestrado, agradeço por ter vivido e dividido comigo tantos momentos marcantes desta fase.

As minhas amigas de turma: **Leillyane, Neciula, Karine, Izabel e Helane**, pela amizade construída, pelos estudos intermináveis e por todos os inesquecíveis momentos vividos aqui.

A todos aqueles que entenderam a minha ausência, que se fez necessária para que hoje eu pudesse escrever essas linhas.

Resumo

RESUMO

Estudo do efeito vasorelaxante de uma pirona obtida de *Aniba panurensis* em artéria mesentérica superior isolada de rato. ASSIS, T.J.C.F., Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia – Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

A 6 – [(E) – estiril] – piran – 2 - ona (pirona-198) é uma estiril-pirona natural isolada a partir do extrato clorofórmico dos frutos de *Aniba panurensis*, espécie constituinte da família Lauraceae. Com a ausência de estudos sobre os efeitos da 6 – [(E) – estiril] – piran – 2 - ona (pirona-198) no sistema vascular, objetivou-se então investigar os efeitos desta pirona sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar. Em anéis pré-contraídos com fenilefrina (FEN), pirona-198 foi capaz de induzir vasorelaxamento dependente de concentração ($CE_{50} = 1,1 \pm 0,69 \times 10^{-5} \text{ M}$) e esse efeito não foi alterado após a remoção do endotélio funcional ($CE_{50} = 1,57 \pm 0,35 \times 10^{-5} \text{ M}$). Este efeito vasorelaxante induzido pela pirona-198 não foi significativamente alterado em soluções contendo KCl 20 mM. Em anéis pré-contraídos com KCl 80 mM, pirona-198 induziu um efeito relaxante significativo ($p < 0,001$; $CE_{50} = 1,2 \pm 0,15 \times 10^{-4} \text{ M}$ (endotélio intacto); $CE_{50} = 2,0 \pm 0,38 \times 10^{-4} \text{ M}$ (endotélio removido)), que foi menos potente do que em anéis pré-contraídos com FEN. Os efeitos da pirona sobre o influxo de cálcio foi avaliado, em que concentrações de pirona-198 (10^{-7} – 10^{-4} M) não foram capazes de inibir a curva concentração resposta para o CaCl_2 , entretanto, na maior concentração (10^{-3} M), ela foi capaz de diminuir significativamente a resposta máxima ($p < 0,001$). Em uma solução despolarizante livre de cálcio, pirona-198 (10^{-8} - 10^{-3} M) antagonizou as contrações transientes induzidas por FEN ($10 \mu\text{M}$; $p < 0,001$). Pirona-198 (10^{-4} - 10^{-3} M) antagonizou as contrações transientes induzidas por 20 mM de cafeína ($p < 0,001$). As contrações induzidas por ortovanadato de sódio (10^{-5} - $3 \times 10^{-3} \text{ M}$) foram significativamente inibidas por altas concentrações de pirona-198 (10^{-4} e 10^{-3} M). Esses resultados sugerem que a pirona-198 exerce um efeito relaxante independente do endotélio funcional que parece ser decorrente da possível interação com a via de sinalização estimulada a partir da ativação de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), que envolve a mobilização de cálcio pelos receptores sensíveis a IP_3 e interação com a via da RhoA – Rho – cinase. Outro mecanismo de ação sugerido para a atividade vasorelaxante da pirona-198 que se adiciona aos anteriores, é o bloqueio do influxo transmembranar de cálcio através de canais de cálcio dependentes de voltagem, adicionado a inibição da mobilização de cálcio intracelular mediada pelos receptores de rianodina.

Palavras-chave: 6 – [(E) – estiril] – piran – 2 – ona (pirona-198) , artéria mesentérica, GPCRs, RhoA / Rho cinase

Abstract

ABSTRACT

Study of vasorelaxant effect of one pyrone obtained from *Aniba panurensis* in isolated superior mesenteric artery rat. ASSIS, T.J.C.F., Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia – Universidade Federal de Pernambuco.

6 - [(E) – styryl] – pyron – 2 - one (pyrone-198) is a natural styrylpyrone isolated from the ethanolic extract of the green fruits of *Aniba panurensis* (Lauraceae). The pyrones demonstrate a whole spectrum of bioactivity and have been shown to be antifungal, antibiotic, cytotoxic and phytotoxic. The aim of this study is to investigate the effects of this pyrone on isolated rat superior mesenteric rings. Rat superior mesenteric rings (1-2 mm) were suspended by cotton threads for isometric tension recordings in Tyrode's solution, 37 °C, gassed with 95% O₂ and 5% CO₂, resting tension 0.75 g. In mesenteric rings pyrone-198 (10⁻¹⁰–10⁻³ M) induced relaxation of phenylephrine (10 μM) induced tone (EC₅₀=1.1 ± 0.69 × 10⁻⁵ M) and this effect was unaltered after endothelium removal (EC₅₀=1.57 ± 0.35 × 10⁻⁵ M). This vasorelaxant effect induced by pyrone-198 was insignificantly altered in the presence of KCl 20 mM. In rings pre-contracted with KCl 80 mM pyrone-198 induced relaxant effect (EC₅₀=2,0 ± 0,38 × 10⁻⁴ M). Pyrone-198 (10⁻⁷–10⁻⁴ M) was not able to inhibit the concentration-response curves to CaCl₂, however, at a high concentration (10⁻³ M) it was able to significantly decrease the maximal response. In depolarizing nominally without calcium solution, pyrone-198 (10⁻⁸-10⁻³ M) antagonized transient contractions induced by Phe (10 μM). Pyrone-198 (10⁻⁴-10⁻³ M) slightly antagonized the transient contractions induced by 20 mM caffeine. Sodium orthovanadate (10⁻⁵-3 × 10⁻³ M)-induced contractions were significantly inhibited by higher concentrations of pyrone-198 (10⁻⁴ and 10⁻³ M). These results suggest that pyrone-198 exerts an endothelium-independent relaxant effect that seems to involve the calcium influx by voltage operated calcium channels and inhibition of Ca²⁺ release from intracellular IP₃ and ryanodine-sensitive calcium stores. They further suggest that pyrone -198 -induced response seems to be mediated by a pathway related to G-protein coupled receptors signalling.

Key Words: 6 – [(E) – styryl] – pyron – 2 – one, mesenteric artery , GPCRs, RhoA/ Rho cinase.

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de ciclo de nucleotídeo guanina	35
Figura 2: <i>Laurus nobilis</i>	38
Figura 3: <i>Aniba panurensis</i>	41
Figura 4: Estrutura química da 6 – [(E) – estiril]- piran- 2 – ona	41
Figura 5: Rato wistar (<i>Rattus novergicus</i>).....	46
Figura 6: Aparato utilizado para estudos <i>in vitro</i>	53
Figura 7: Mecanismos de contração do músculo liso vascular e possíveis vias de interação da pirona-198.....	81

Lista de gráficos

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Curva concentração-resposta para pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, tanto na presença como na ausência do endotélio funcional, pré-contraídos com FEN (intacto: 10 μ M; removido: 1nM - 10 μ M)..... 65
- Gráfico 2:** Curva concentração-resposta para pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, na presença do endotélio funcional (A) pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M) e desprovidos do endotélio funcional (B), pré-contraídos com fenilefrina (1nM - 10 μ M) na ausência e na presença de KCl 20 mM67
- Gráfico 3:** Curvas concentração-resposta para pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, na presença (A) e na ausência (B) do endotélio funcional, pré-contraídos com FEN ou com KCl 80 mM69
- Gráfico 4:** Curvas concentração-resposta para CaCl_2 em solução despolarizante KCl 60 mM nominalmente sem cálcio, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, desprovidos do endotélio funcional e na presença de concentrações isoladas de pirona-198..... 70
- Gráfico 5:** Efeito das concentrações isoladas de pirona-198 sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 μ M) em solução livre de cálcio, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, desprovidos de endotélio funcional 71
- Gráfico 6:** Efeito das concentrações isoladas de pirona-198 sobre as contrações transientes induzidas por CAF (20 mM) em solução livre de cálcio, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, desprovidos de endotélio funcional 72

Gráfico 7: Efeito das concentrações isoladas de pirona-198 sobre as contrações induzidas por ortovanadato de sódio em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, desprovidos de endotélio funcional..... 73

Lista de esquemas

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1:** Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito relaxante induzido por pirona-198 (10^{-10} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN..... 54
- Esquema 2:** Representação esquemática do protocolo experimental para estudo da participação dos canais para K^+ no vasorelaxamento induzido por pirona-198 (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis com e sem endotélio funcional incubados com 10 mL de Tyrode KCl 20 mM..... 55
- Esquema 3:** Representação esquemática do protocolo experimental para estudo da participação dos canais de Ca^+ no efeito vasorelaxante induzido por pirona-198 em anéis com e sem endotélio funcional incubados com 10 mL de KCl 80 mM. 57
- Esquema 4:** Representação esquemática do protocolo experimental para estudo da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito vasorelaxante de concentrações isoladas de pirona-19859
- Esquema 5:** Representação esquemática do protocolo experimental para estudo da avaliação dos efeitos de concentrações isoladas de pirona-198 sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 μ M) ou CAF (20 mM)...... 61
- Esquema 6:** Representação esquemática do protocolo experimental para estudo da avaliação dos efeitos de concentrações isoladas de pirona-198 sobre as contrações induzidas por Ortovanadato de sódio 62

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da Solução de Tyrode para anéis de artéria mesentérica superior.....	48
Tabela 2: Composição da Solução de Tyrode livre de cálcio para anéis de artéria mesentérica superior.....	48
Tabela 3: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 20 mM	49
Tabela 4: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 60 mM	49
Tabela 5: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 60 mM nominalmente sem Cálcio	50
Tabela 6: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 80 mM	50

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i	Concentração de íons cálcio intracelular
ACh	Acetilcolina
ADP	Difosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
APG	Angiosperm Phylogeny Group
ATP	Trifosfato de adenosina
cADPR	ADP-ribose cíclica
CAF	Cafeína
CaM	Calmodulina
Ca_v	Canais de cálcio dependentes de voltagem
CE₅₀	Concentração molar de uma substância necessária para atingir 50 % do efeito máximo
CICR	Liberação de cálcio induzida pelo cálcio
DAG	1,2 – diacilglicerol
DC	Débito cardíaco
DS	Débito sistólico
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EGTA	Ácido tetraacético (N, N, N', N') bis beta amino étil éster etilenoglicol
E_{máx}	Efeito máximo
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
GDP	Difosfato de guanosina
GEF	Fator de troca de nucleotídeos guanina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GTP	Trifosfato de guanosina
GMPc	Monofosfato cíclico de Guanosina
IP₃	1,4,5 – trifosfato de inositol
L	Lavagem com solução de Tyrode
Log	Logaritmo na base 10

MCCL	Cinase da cadeia leve de miosina
MP	Membrana plasmática
MYPT-1	Subunidade regulatória da miosina fosfatase de cadeia leve
NAPRALERT	Natural Products Alert
NO	Óxido nítrico
PA	Pressão arterial
PGI₂	Prostaciclina
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5 – bifosfato
PIRONA-198	6 – [(E) – ESTIRIL] – PIRAN – 2 – ONA
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
PKC	Proteína cinase dependente de cálcio
PKG	Proteína cinase dependente de GMPc
PLC	Fosfolipase C
RPT	Resistência periférica total
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptores de rianodina
SERCA	Ca ²⁺ - ATPase do retículo sarcoplasmático
SN	Sistema nervoso
Ty	Solução de Tyrode

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 OBJETIVOS	43
2.1 Geral	44
2.2 Específicos	44
3 MATERIAL	45
3.1 Animais	46
3.2 Drogas utilizadas	47
3.3 Soluções nutritivas	47
4 METODOLOGIA	51
4.1 Estudos farmacológicos	52
4.1.1 Preparações com anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio funcional	52
4.2 Protocolos experimentais.....	53
4.2.1 Efeito da pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	53
4.2.2 Verificação da participação dos canais para K ⁺ na resposta relaxante induzida pela pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, incubados numa solução despolarizante com KCl 20 mM	55

4.2.3 Verificação da participação dos canais de Ca^{2+} na resposta relaxante induzida pela pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, incubados numa solução despolarizante com KCl 80 mM	56
4.2.4 Verificação do efeito induzido pela pirona-198 sobre o influxo de cálcio em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	58
4.2.5 Verificação da resposta induzida pela pirona-198 sobre contrações transientes induzidas por FEN (10 μM) ou CAF (20 mM) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	60
4.2.6 Verificação do efeito induzido pela pirona-198 sobre contrações induzidas por Na_3VO_4 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	62
4.3 Análise estatística.....	63
5 RESULTADOS.....	64
5.1 Efeito da pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem endotélio funcional, pré-contraídos com FEN.....	65
5.2 Efeito da pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN na presença de KCl 20 mM	66
5.3 Efeito da pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com KCl 80 mM	68

5.4 Efeito da pirona-198 sobre as contrações induzidas por CaCl_2 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	70
5.5 Efeito da pirona-198 sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	71
5.6 Efeito da pirona-198 sobre as contrações transientes induzidas por CAF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	72
5.7 Efeito da pirona-198 sobre as contrações induzidas por Na_3VO_4 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, desprovidos de endotélio funcional.....	73
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÕES	82
8 PERSPECTIVAS	84
REFERÊNCIAS	86

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O Sistema Cardiovascular garante a homeostase do organismo, isto é, ele regula o “milieu intérieur” (meio interno). Ele transporta e distribui substâncias essenciais para os tecidos, assim como remove os produtos provenientes do metabolismo, contribui para o controle da temperatura, para a comunicação humoral através dos tecidos e ajusta o suprimento de oxigênio e nutrientes em diferentes situações fisiológicas (SIEGEL, 1996).

A homeostase do Sistema cardiovascular depende da manutenção do fluxo sanguíneo, da pressão arterial, do débito cardíaco, da resistência vascular periférica total e de todas as outras variáveis envolvidas em condições normais.

O fluxo sanguíneo regional e a perfusão dos capilares são influenciados por vários fatores intrínsecos, como o fator miogênico, metabolismo tecidual (fatores metabólicos ou químicos), mediadores de ação local e fatores físicos (AIRES, 1999).

O mecanismo de auto-regulação miogênica está dentre os fatores que regulam o tônus basal do músculo liso, em que o tono miogênico se refere à habilidade do músculo vascular liso alterar seu estado de contratilidade em resposta às mudanças na pressão intraluminal, e exercendo assim, um importante papel na regulação do fluxo sanguíneo na vasculatura de resistência (YEON et al., 2002).

O aumento do metabolismo tecidual é sempre acompanhado por queda acentuada da resistência local e por grande aumento do fluxo sanguíneo, proporcional à quarta potência do raio das arteríolas. Essa vasodilatação pode ser explicada através de acúmulo de produtos derivados do metabolismo ou pela queda da concentração de nutrientes essenciais (AIRES, 1999).

Substâncias parácrinas e autócrinas também controlam o fluxo sanguíneo através da contração do músculo liso. O endotélio vascular desempenha um importante efeito regulador ou modelador do tônus vascular, funcionando como sensor das alterações hemodinâmicas, sinais humorais ou estímulos químicos da corrente sanguínea e transmitindo para as células musculares lisas adjacentes (BATLOUNI; RAMIRES, 1994). Esse papel chave do endotélio na regulação do tônus vasomotor se faz através da produção tônica e liberação de NO (óxido nítrico),

PGI₂ (prostaglandinas) e EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio), além da liberação de fatores vasoconstrictores (endotelinas) (LEDOUX et al., 2006).

O Sistema nervoso simpático e mecanismos hormonais são fatores extrínsecos que regulam o fluxo sanguíneo. A regulação neural da contração do músculo liso se faz através do sistema nervoso central, que modula o estado contrátil da musculatura lisa vascular via nervos autônomos e sistema endócrino. A função simpática vasoconstrictora constitui o elemento mais importante que o sistema nervoso (SN) dispõe para regular a resistência periférica e a perfusão tecidual, onde ela realiza os ajustes dos tônus dos vasos de resistência (BERNE; LEVY, 2004). O sistema endócrino contribui para a regulação do tônus vascular através dos hormônios circulantes, como por exemplo as catecolaminas adrenais, angiotensina II, vasopressina e fator natriurético atrial (AIRES, 1999).

Além da regulação do fluxo sanguíneo, a manutenção da homeostase do sistema cardiovascular envolve o controle da pressão arterial (PA), do débito cardíaco (DC) e da resistência vascular periférica (RVP).

A PA é gerada e mantida pela interação entre força propulsora cardíaca, capacidade de dilatação elástica da aorta e a resistência ao fluxo de sangue, exercida predominantemente, pelas arteríolas e artérias de pequeno calibre (SILVERTHORN, 2003).

Assim, a PA é função do débito cardíaco e da resistência das arteríolas, logo ela pode ser descrita pela relação:

$$PA = \text{DÉBITO CARDÍACO (DC)} \times \text{RESISTÊNCIA PERIFÉRICA TOTAL (RPT)}$$

O débito cardíaco (DC) representa a quantidade de sangue que cada ventrículo lança na circulação (pulmonar ou sistêmica) em determinada unidade de tempo, de forma que essa quantidade de sangue ejetada em cada contração é denominada de débito sistólico. Desta forma, o débito cardíaco pode ser calculado através do produto entre o débito sistólico e a frequência cardíaca.

$$DC = \text{DÉBITO SISTÓLICO (DS)} \times \text{FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC)}$$

A resistência hemodinâmica é a oposição imposta ao fluxo de sangue pelos vasos, e é determinada basicamente pelo atrito interno das camadas dos vasos (shear stress) e por fatores dimensionais destes. Como descrito pela equação de Poiseuille¹, o diâmetro individual dos vasos é o fator dimensional mais importante, portanto a regulação do fluxo sangüíneo é alcançada muito mais efetivamente por mudanças no raio do vaso do que alterações na pressão (BELLONI, 1999).

Embora todos os vasos promovam resistência ao fluxo sangüíneo, são as pequenas artérias e arteríolas terminais que são designadas às verdadeiras “artérias de resistência” controlando o fluxo e a pressão (SIEGEL, 1996) durante alterações de demanda (CHRISTENSEN; MULVANY, 2001). Assim, a utilização da artéria mesentérica é uma ótima estratégia para o estudo de drogas vasodilatadoras, já que a artéria mesentérica é um modelo de musculatura lisa vascular.

Assim, todos esses fatores atuam de forma sinérgica para manter em homeostase o sistema cardiovascular, e este estado homeostático está intimamente relacionado com o tônus muscular liso, que é considerado o maior regulador da resistência vascular e da pressão arterial sangüínea (KHALIL, 2001).

O Tônus muscular liso é determinado pelo estado contrátil das células do músculo liso vascular, regulado pela concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), sendo o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ o evento chave no processo de ativação do aparato contrátil das células musculares lisas (KATOUE et al., 2006).

O processo de contração neste tecido pode ser evocado por dois diferentes mecanismos: acoplamento farmacomecânico, que se caracteriza pela entrada de cálcio, que causa contração do músculo liso, sem que haja uma mudança significativa no potencial de membrana; e pelo acoplamento eletromecânico que envolve a entrada de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (FILIPEANU et al., 1995). Independente do estímulo, as células musculares lisas usam o ciclo de pontes cruzadas entre a actina e a miosina para desenvolver força e os íons cálcio atuam iniciando a contração muscular (WEBB, 2003).

¹ Equação de Poiseuille : $Q = \pi (P_i - P_o) r^4 / 8 \eta l$: Q = fluxo; $(P_i - P_o)$ = diferença de pressão; r^4 = quarta potência do raio; l = comprimento; η = viscosidade)

O influxo transmembranar de cálcio do meio extracelular através da membrana plasmática ocorre através de canais de cálcio dependentes de voltagem, canais de cálcio operados por receptor e canais de cálcio operados por estoque. Posteriormente, ocorre a ativação da via intracelular de cálcio, onde o músculo liso exibe dois sistemas de liberação de cálcio localizados na membrana do retículo sarcoplasmático (RS) (HALL, 2006).

Um dos sistemas de liberação de cálcio ocorre através dos receptores sensíveis ao 1,4,5 – trifosfato de inositol (IP_3) em resposta a interação deste com o IP_3 (GALIANO et al., 2004), e o outro sistema de liberação se faz através dos receptores de rianodina (RyR), que liberam cálcio através da sua abertura induzida por cálcio, responsável pelo mecanismo conhecido como liberação de cálcio induzida por cálcio (CICR) (MEISSNER, 2004). Por ser hidrossolúvel, o IP_3 difunde-se pelo citoplasma carregando o sinal da superfície celular para a superfície do RS. No RS o IP_3 liga-se a uma proteína canal de cálcio sensível ao inositol, de forma que esta ligação induz a sua abertura permitindo a saída de cálcio para o citosol. Em geral, o aumento de cálcio intracelular gerado por IP_3 pode ser responsável pelo componente fásico da resposta contrátil a agonistas (MISTRY; GARLAND, 1999).

O efetivo acoplamento entre o influxo de Ca^{2+} extracelular e a liberação de Ca^{2+} intracelular é mediado por uma íntima interação entre componentes da membrana plasmática (MP) e do RS (MA; PAN, 2003).

A contração do músculo liso vascular é largamente direcionada pelo influxo de cálcio dependente de voltagem (ZHANG et al., 2005), de forma que o cálcio que entra na célula serve como um segundo mensageiro da sinalização elétrica, iniciando a multiplicidade das funções celulares (GAZULLA; TINTORÉ, 2006).

A contração muscular estimulada por agonistas ocorre por ligação deste com receptores de sete alças transmembranares acoplados a uma proteína G heterotrimérica, estimulando assim a atividade da fosfolipase C (PLC). Esta enzima é específica para o lipídio de membrana fosfatidilinositol 4,5 – bifosfato (PIP_2) para que cataliza a formação de dois potentes segundos mensageiros: IP_3 e 1,2 – diacilglicerol (DAG) (HALL et al., 2006).

O DAG, juntamente com o cálcio, ativa a proteína cinase C (PKC), que fosforila proteínas alvo específicas. Em muitos casos, a PKC tem efeitos que promovem contração como fosforilação de canais de cálcio do tipo L ou outras proteínas que regulam o ciclo de pontes cruzadas (WEBB, 2003).

Por ser hidrossolúvel, o IP_3 difunde-se pelo citoplasma carregando o sinal da superfície celular para a superfície do RS. No RS o IP_3 liga-se a uma proteína canal de cálcio sensível ao inositol, de forma que esta ligação induz a sua abertura permitindo a saída de cálcio para o citosol. Em geral, o aumento de cálcio intracelular elucidado por IP_3 pode ser responsável pelo componente fásico da resposta contrátil a agonistas (MISTRY; GARLAND, 1999).

Os receptores de rianodina que estão envolvidos no processo de amplificação do sinal através do mecanismo de liberação de cálcio induzida por cálcio (CICR) são conhecidos por serem ativados por segundos mensageiros, como o cálcio, ADP-ribose cíclico (cADPR) ou cafeína, aplicada exogenamente (HISHINUMA; SAITO, 2006).

Esse aumento na concentração intracelular de cálcio faz com que esse íon se ligue a uma pequena proteína citosólica denominada calmodulina (CaM), que interage com o cálcio. O complexo cálcio-calmodulina ativa a miosina cinase de cadeia leve (MCCL). Esta cinase ativada fosforila as cadeias protéicas regulatórias leves da miosina, possibilitando a interação molecular da miosina com a actina e assim iniciando o ciclo de pontes cruzadas (CHITALEY et al., 2001). A fosforilação /desfosforilação da cadeia regulatória leve de miosina, respectivamente catalizada pela miosina cinase de cadeia leve e pela miosina fosfatase, é o evento chave na regulação da contração do músculo liso (PFITZER, 2001).

Porém, a contratilidade do músculo liso vascular não é dependente apenas da concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), que resultará em um aumento na fosforilação da cadeia leve de miosina (KHALIL, 2001), mas também depende da sensibilidade do aparato contrátil ao cálcio (NOBE; PAUL, 2001). Outras vias têm sido descritas por atuarem como reguladoras da contratilidade do músculo liso por controlar a fosforilação da cadeia leve de miosina independente do aumento do cálcio intracelular (JEON et al., 2006).

Agonistas induzem sensibilização ao cálcio por inibição da miosina fosfatase através da ativação de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) que ativam fatores de troca de nucleotídeos (GEFs) que catalizam a troca de GDP por GTP (STEVENSON et al., 2004). RhoGEFs recebem sinais *upstream* que disparam a cascata de transdução envolvendo pequenas proteínas ligadas a GDP e por essa razão são os principais reguladores da atividade da RhoA. Os RhoGEFs contêm uma região que se liga a subunidade α ativada de proteínas G, de forma que esta ligação estimula GEFs que ativam RhoA, conectando assim o sinal modulado por pequenas e grandes proteínas GTPases (TEIXEIRA; WEBB, 2005). Subunidades α de proteínas G heterotriméricas, como $G_{\alpha 12}$, $G_{\alpha 13}$ e $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ ativam famílias de Rho GEFs (SIDEROVSKI; WILLARD, 2005), sendo estas os ativadores *upstream* da RhoA (SOMLYO; SOMLYO, 1998b).

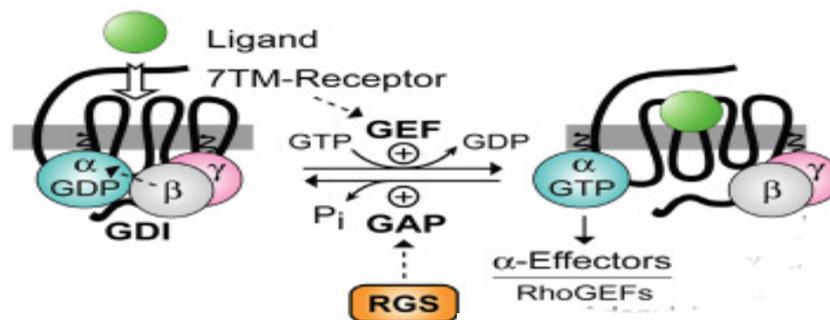


Figura 1: Modelo de ciclo de nucleotídeo guanina regulando a ativação mediada por receptor sete alças transmembrana da via de sinalização acoplada a proteína G heterotrimérica. Fonte: International Journal of Biological Sciences

A RhoA ativada vai interagir com vários efetores, dentre eles a Rho cinase, esta fosforila a miosina fosfatase e assim inativando-a (SEASHOLTZ; BROWN, 2004). Sendo esta cinase considerada a molécula chave na sensibilização mediada por receptores acoplados a proteína G no músculo liso vascular (KUREISHI et al., 1997). Esta inibição é o fator responsável pelo qual a RhoA promove sensibilização ao cálcio pelo aparato contrátil em contrações induzidas por agonistas, sendo

responsável pelo aumento sustentado da tensão induzido por vasoconstrictores (SAUZEAU et al., 2000).

O relaxamento da musculatura lisa, processo inverso, é iniciado por diminuição na $[Ca^{2+}]$; que ocorre através do bombeamento de cálcio de volta para o RS por ação da SERCA, além da extrusão de cálcio da célula via Ca^{2+} -ATPase e trocador Na^+/Ca^{2+} da MP. A diminuição na $[Ca^{2+}]$ citosólico causa dissociação do complexo cálcio-calmodulina e a miosina de cadeia leve será desfosforilada por ação da miosina fosfatase (SALAMANCA; KHALIL, 2005).

A diminuição da sensibilidade da maquinaria contrátil ao cálcio pode ocorrer através das ações do AMPc e do GMPc. A ativação da PKA representa um dos mecanismos pelo qual o relaxamento é induzido no músculo liso, em adição, um importante papel também têm sido atribuído a proteína cinase dependente de GMPc, ambas reduzindo os níveis de cálcio intracelular (RASCADO; BENDHACKT, 2005).

A ativação da PKG leva a desfosforilação da cadeia leve de miosina por ação direta ou indireta, por induzir mudanças morfológicas consistentes na inibição da via da RhoA. A fosforilação da RhoA contribui para a ação vasodilatadora da via NO/GMPc através da inibição da sensibilização ao cálcio mediada pela Rho-cinase. A regulação da RhoA dependente do NO pode assim ser um componente crucial para determinar a ação do endotélio na parede arterial normal e em condições patológicas, associadas com disfunção endotelial e diminuição da biodisponibilidade do NO (LOIRAND et al., 2006).

O estado contrátil do músculo liso controla o tamanho do lúmen do vaso, de forma que um aumento anormal no tono do músculo liso estará então envolvido na patogênese de doenças vasculares como hipertensão e aterosclerose (SOMLYO, 1997a *apud* SAUZEAU et al., 2000).

É cada vez mais sugerido que alterações na regulação do cálcio em células musculares cardíacas possam estar criticamente envolvidas em processos patológicos, como exemplo, disfunções e arritmias, além de ser um importante fator no aumento da reatividade vascular associada com a hipertensão (BERS, 2000).

A atividade da RhoA embora seja requerida em condições fisiológicas, a superativação sustentada leva a conseqüências patológicas no sistema cardiovascular, atingindo principalmente as células musculares lisas. Estudos sugerem que a ativação da via de transdução de sinal Rho / Rho cinase seja um dos principais mecanismos de vasoconstricção na hipertensão arterial, além de atuar na hipertrofia de miócitos cardíacos, hipertrofia e hiperplasia de células musculares lisas, inflamação vascular e aterogênese. Sendo estes efeitos observados em experimentações utilizando fasudil, um inibidor da Rho cinase, que se mostrou redutor do desenvolvimento de lesões vasculares em ratos espontaneamente hipertensos (JALIL et al., 2005).

As doenças cardiovasculares compreendem um grupo de doenças do coração (cardiomiopatia, disfunção isquêmica do coração, insuficiência cardíaca congestiva) e dos vasos sanguíneos (doença arterial coronariana, hipertensão e aterosclerose) (KUMAR et al., 2007). As maiores doenças arteriais como aterosclerose e hipertensão são caracterizadas pela hipertrofia e hiperplasia das células musculares lisas, associadas com acúmulo de matriz extracelular na camada média do vaso, levando ao aumento da espessura da parede do vaso, de tal forma que a perda da capacidade de regular o tônus e o crescimento das células musculares lisas são fatores comuns nessas patologias (LOIRAND et al., 2006).

A mortalidade das doenças cardiovasculares permanece alta, destacando a necessidade para o desenvolvimento de agentes terapêuticos que promovam qualidade de vida e prolongada sobrevivência destes pacientes.

Mecanismos e vias de sinalização que estão envolvidas nas mudanças estruturais patológicas e funcionais das paredes dos vasos são objetos de intensiva pesquisa, pois podem permitir a identificação de potenciais alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas (LOIRAND et al., 2006).

Aliar o conhecimento popular ao científico em busca de novos medicamentos fitoterápicos é um dos principais caminhos para o sucesso de pesquisas na área de plantas medicinais (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002), que tem por objetivo avaliar a atividade biológica de plantas e seus constituintes químicos em sistemas, órgãos e

tecidos com o intuito de descobrir substâncias que possam ser potencialmente utilizadas na terapêutica e/ou como ferramentas farmacológicas.

Uma família bastante estudada na área de pesquisas com plantas medicinais é a família Lauraceae, que segundo a Angiosperm Phylogeny Group – APG (Grupo de Filogenia Angiospermática) é representada por mais de 2000 espécies em 40 gêneros. No Brasil, há aproximadamente 19 gêneros e 400 espécies, inúmeras dessas espécies são encontradas principalmente na Amazônia. Possui distribuição pantropical, sendo bem representada na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar, com pouca expressão no sul da África (ROHWER, 1993 *apud* QUINET, 2005). Habitam, em sua maior parte, as florestas pluviais, bem como as restingas e os cerrados, estando ainda presente em outros ecossistemas. São árvores ou arbustos geralmente aromáticos, monóicos, dióicos ou gimnodióicos, e apenas o gênero *Cassita* se apresenta como gênero produtor de espécies trepadeiras (BARROSO, 2002).

Os antigos gregos e romanos utilizavam as folhas de *Laurus nobilis*, o loureiro (Fig.2) para confeccionar coroas, com as quais se homenageavam guerreiros e atletas vitoriosos. Assim, o nome da família Lauraceae deriva de *lauer* = "verde", e *laus* = "louvor", que significa coroar ou cingir de louros.



Figura 2: *Laurus nobilis*
Fonte: Wikipédia

Dentre as várias espécies que constituem essa família podemos citar *Ocotea*, *Aniba* e *Nectandra* que possuem grande valor medicinal, além de *Cinnamomum*, *Cryptocarya*, *Laurus* e *Sassafrás* importantes fontes de compostos aromáticos e

flavorizantes (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). A culinária também utiliza várias espécies da família Lauraceae, tal como o fruto de *Persea americana* (abacate), o *Laurus nobilis* (louro) utilizado como condimento, e outras especiarias tais como as “canelas” *Cinnamomum zeylanicum* Breyne e *C. Cassia* (Nees) (MARQUES, 2001).

Em virtude da boa qualidade da madeira e dos óleos essenciais das plantas deste gênero, eles alcançam um alto valor no comércio, o que justifica sua intensa exploração ao longo dos anos, colocando em risco a preservação de suas espécies (QUINET, 2005). A madeira das espécies dessa família são bastante utilizadas na marcenaria, construção civil e fabricação de papel. A produção de óleos essenciais provêm das espécies aromáticas pertencentes aos gêneros *Aniba*, *Nectandra*, *Ocotea*, *Licaria* e *Dicypellium* (ZOGHBI).

As Lauráceas destacam-se entre as demais famílias também pela sua importância medicinal. Segundo DI STASI (2002), na medicina popular o louro (*Laurus nobilis*) é utilizado para combater problemas hepáticos e intestinais, sendo considerado digestivo. As folhas do abacateiro (*Persea americana*) são utilizadas por possuírem funções diuréticas, analgésicas, especialmente contra diarreia e cálculo renal, ao passo que a infusão das folhas, além de atuar como diurético e analgésico, é também usada contra febres. Outra espécie utilizada na medicina popular é o *Cinnamomum zeylanicum* Blume, conhecido como canela, com ações aromáticas e tônicas, antiespasmódica, estimulante, além de ação antifúngica (LIMA, 2006).

Vários efeitos biológicos das espécies dessa família são relatados na literatura científica, efeitos tais como atividade anticonvulsivante do óleo essencial de *Laurus nobilis* (SAYYAH et al., 2002), efeitos depressivos centrais de *Ocotea duckei* (MORAIS, 1998), ação hipotensora da reticulina proveniente da *Ocotea duckei* em ratos normotensos (DIAS et al., 2004). Com extrato de *Cinnamomum camphora* são relatadas ações como atividade anti-inflamatória e antioxidante (LEE et al., 2006), no extrato aquoso de *Persea americana* Mill ação analgésica e anti-inflamatória (ADEYEMI et al., 2002), efeito anti-diabético (KIM et al., 2006) e inibição da xantina oxidase pela *Cinnamomum cassia* (KONG et al., 2000), ação antinociceptiva e remoção de radicais livres por alcalóides de *Lindera angustifolia*

Chen (ZHAO, 2006), entre outros.

Dentre os vários gêneros que constitui a família Lauraceae, estar o gênero *Aniba*, reconhecido como um dos principais gêneros da família Lauraceae, constituído de 41 espécies de arbustos e árvores, e que se apresenta na diversidade na Amazônia Central e Guiana. É um gênero que se estende nos Andes, nas montanhas do norte da Venezuela, nas pequenas Antilhas e no leste e sul do Brasil (MELO et al., 2005).

Estudos científicos comprovam atividades biológicas referentes às espécies do gênero *Aniba*, tais como o efeito ansiolítico (MELO et al., 2005) e efeitos antidepressivos (SOUSA et al., 2004) de *Aniba riparia*, efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *Aniba canelilla* (LAHLOU et al., 2005), atividade antibiótica da *Aniba riparia* contra *Candida albicans*, *Klebsiela pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* (MARQUES, 2001).

Há várias décadas, estudiosos se dedicam ao estudo do gênero *Aniba*, que possui entre seus constituintes neolignanais, flavonóides e pironas (ROSSI, 1997). A existência de pironas é marcante no gênero *Aniba*, aonde estudos do químico Otto Gottlieb nos anos 70 já afirmavam que todas as espécies até aquele momento estudadas possuíam pironas como elementos constituintes (GOTTLIEB, 1972a). De fato tem sido relatado na literatura a presença destas substâncias nas espécies de *Aniba gigantifolia* e *Aniba guianensis* (SUARÉZ, 1973), *Aniba henrigeri*, *A. coto*, *A. pseudocoto*, *A. duckei*, *A. roseadora*, *A. firmula*, *A. parviflora*, *A. fragrans* (VON BÜLLON, 1968) *Aniba panurensis* (MOTIDOME et al., 1982), *A. kappleri* (SANTOS, 1981).

Aniba panurensis objeto de nosso estudo (Fig.3), tem por sinônimos *Aniba gonggrijpii*, *Aniba mas*, *Aydendron panurense*. É conhecida popularmente por louro amarelo (VIEIRA, 2006). Poucas informações científicas a respeito dessa espécie e de suas respectivas características foram encontradas, de forma que em um levantamento realizado no banco de dados NAPRALERT (Natural Products Alert), foi relatada apenas uma referência sobre esta espécie de *Aniba*, mencionando a atividade antimicrobiana de um alcalóide indolizínico isolado de *Aniba panurensis* com ação sobre *Candida albicans* (KLAUSMEYER et al., 2004).



Figura 3: *Aniba panurensis*

Fonte: Wikipédia

Dos frutos de *Aniba panurensis* foi identificada uma pirona natural, a 6 – [(*E*) – estiril] – piran- 2 – ona, possuindo o peso molecular de 198. Os frutos verdes de *Aniba panurensis* foram extraídos com etanol e o solvente, eliminado de maneira usual. O resíduo foi dissolvido com etanol a 60% e submetido à partição com hexano e posteriormente clorofórmio. O fracionamento cromatográfico do extrato clorofórmico conduziu ao isolamento de duas estirilpironas, dentre elas a 6 – [(*E*) – estiril] – piran – 2 - ona (pirona-198), nosso objeto de estudo (BARBOSA-FILHO, 1986). Possuindo ela então a seguinte estrutura química:

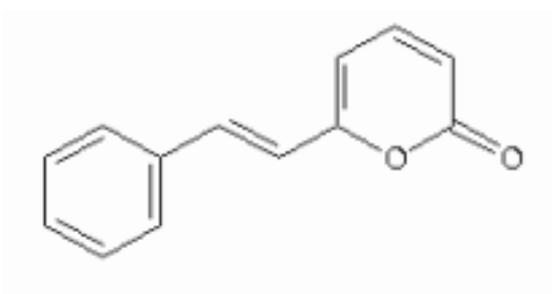


Figura 4: Estrutura química da 6 – [(*E*) – estiril] - piran- 2 – ona (pirona-198)

Já tendo sido esta estrutura também identificada em *Aniba parviflora* (REZENDE et al., 1971), como na própria *Aniba panurensis* e *Aniba permollis* (MOTIDOME et al., 1982).

Devido às poucas informações a respeito dos efeitos biológicos da *Aniba panurensis* e da 6 – [(E) – estiril] – piran – 2 - ona (pirona), adicionada a ausência, até então, de trabalhos com esta pirona no sistema cardiovascular, é valioso um estudo funcional para avaliar seus efeitos, para isso o uso de artéria mesentérica superior de rato, um vaso de resistência que reflete bem as variações da resistência vascular global (MULVANY; AALKAJAER, 1990).

Objetivos

2.0 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Contribuir para a farmacologia da Família Lauraceae, em particular para a espécie *Aniba panurensis*;

- Investigar o efeito vasorelaxante da 6 – [(E) – ESTIRIL] – PIRAN – 2 - ONA (pirona-198) sobre artéria mesentérica superior isolada de rato;

2.2 Específicos

- Avaliar o (s) mecanismo(s) de ação implicado(s) no efeito da 6 – [(E) – ESTIRIL] – PIRAN – 2 - ONA (pirona-198) sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato;

- Estudar a participação dos canais para potássio na resposta relaxante induzida pela pirona-198;

- Observar a influência dos canais de cálcio dependentes de voltagem na resposta relaxante induzida pela pirona-198;

- Elucidar a influência dos estoques intracelulares de cálcio sensíveis à fenilefrina e cafeína na resposta relaxante induzida pela pirona-198;

- Avaliar a participação da pirona-198 sobre a via da RhoA / Rho cinase.

Material

3 MATERIAL

3.1 Animais

Foram utilizados em todos os experimentos ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) (Figura 5), pesando entre 250 e 300g, provenientes do Biotério Professor Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Professor Delby Fernandes de Medeiros - LTF da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).] Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro das 06:00 às 18:00 horas), alimentação e água *ad libitum*.

Este projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa Animal – LTF/UFPB (CEPA N^o. 0211/06).



Figura 5: Rato wistar (*Rattus norvegicus*)

3.2 Drogas utilizadas

Foram utilizadas durante os experimentos as seguintes drogas: cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN), cloridrato de acetilcolina (ACh), ácido tetraacético (*N, N, N', N'*) bis beta amino étil éster etilenoglicol (EGTA), cafeína (CAF) (todas da marca Sigma, Ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) da MP Biomedicals.

A 6 - [(*E*) - estiril] - piran- 2 - ona (pirona-198) foi solubilizada em cremofor:água para obter uma “solução-mãe” de 10^{-1} M.

Para as preparações das soluções estoques, as drogas foram todas dissolvidas em água destilada, exceto o EGTA, que foi dissolvido em bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 5%. Todas as soluções eram mantidas a 0° C e somente diluídas a concentrações menores no momento do experimento, caso necessário.

3.3 Soluções nutritivas

Para as preparações das soluções nutritivas foram utilizadas as seguintes substâncias: Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Vetec), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (Reagen), bicarbonato de sódio (NaHCO_3) proveniente da marca Sigma e fosfato de sódio mono-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), marca Merck.

Na solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 20, 60 ou 80 mM, a concentração de sódio foi equimolarmente substituída. As tabelas a seguir mostram as composições das soluções nutritivas.

Tabela 1: Composição da Solução de Tyrode para anéis de artéria mesentérica

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl₂. 2H₂O	2,0
MgCl₂. 6H₂O	1,0
NaHCO₃	10,0
NaH₂PO₄. H₂O	0,42
Glicose	5,6

Fonte: TANAKA et al., 1999.

Tabela 2: Composição da Solução de Tyrode nominalmente sem cálcio para anéis de artéria mesentérica

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl₂. 2H₂O	0,0
MgCl₂. 6H₂O	1,0
NaHCO₃	10,0
NaH₂PO₄. H₂O	0,42
Glicose	5,6
EGTA	1,0

Fonte: TANAKA et al., 1999.

Tabela 3: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 20 mM

Substância	Concentração (mM)
NaCl	142,3
KCl	20,0
CaCl₂ . 2H₂O	2,0
MgCl₂ . 6H₂O	1,0
NaHCO₃	10,0
NaH₂PO₄ . H₂O	0,42
Glicose	5,6

Fonte: TANAKA et al., 1999

Tabela 4: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 60 mM

Substância	Concentração (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
CaCl₂.2H₂O	2,0
MgCl₂ . 6H₂O	1,0
NaHCO₃	10,0
NaH₂PO₄ . H₂O	0,42
Glicose	

Fonte: TANAKA et al., 1999.

Tabela 5: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 60 mM nominalmente sem cálcio

Substância	Concentração (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
CaCl₂.2H₂O	0,0
MgCl₂. 6H₂O	1,0
NaHCO₃	10,0
NaH₂PO₄ . H₂O	0,42
Glicose	5,6

Fonte: TANAKA et al., 1999.

Tabela 6: Composição da solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 80 mM

Substância	Concentração (mM)
NaCl	82,3
KCl	80,0
CaCl₂. 2H₂O	2,0
MgCl₂. 6H₂O	1,0
NaHCO₃	10,0
NaH₂PO₄ . H₂O	0,42
Glicose	5,6

Fonte: TANAKA et al., 1999.

4. METODOLOGIA

4.1 Estudos farmacológicos

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

Os ratos eram sacrificados por concussão cerebral seguida de deslocamento cervical e posterior secção dos vasos cervicais. Através de uma incisão no abdome do animal, era retirada a artéria mesentérica superior. Anéis do primeiro segmento da artéria (1-2 mm) eram obtidos e livres de tecido conectivo e adiposo. Os anéis eram mantidos em cubas contendo 10 mL da solução de Tyrode (Tabela 1, p.48) na temperatura de 37°C e gaseificados com carbogênio (95 % de O₂ e 5 % de CO₂).

Os anéis obtidos foram suspensos por linhas de algodão fixados a um transdutor de força (FORT 10, WPI, Sarasota, EUA) acoplado a um sistema de aquisição (Miobath – 4, WPI, Sarasota, EUA) para o registro das tensões isométricas (Figura 6). Cada anel era submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de 60 minutos. Durante este tempo, a solução de Tyrode era substituída a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Em todos os protocolos experimentais, após o período de estabilização, a viabilidade do tecido e a integridade do endotélio era verificada por uma pré-contracção do tecido com FEN (10 µM) e em adição ACh (10 µM). Os tecidos nos quais a ACh relaxou o tônus induzido pela FEN por mais que 80% foram designados com endotélio funcional e nos tecidos no qual a ACh causou relaxamento menor que 10% foram designados anéis desprovidos de endotélio funcional (BROCHET; LANGTON, 2006). Quando necessário, o endotélio foi removido por fricção da superfície luminal do vaso com uma haste de metal.

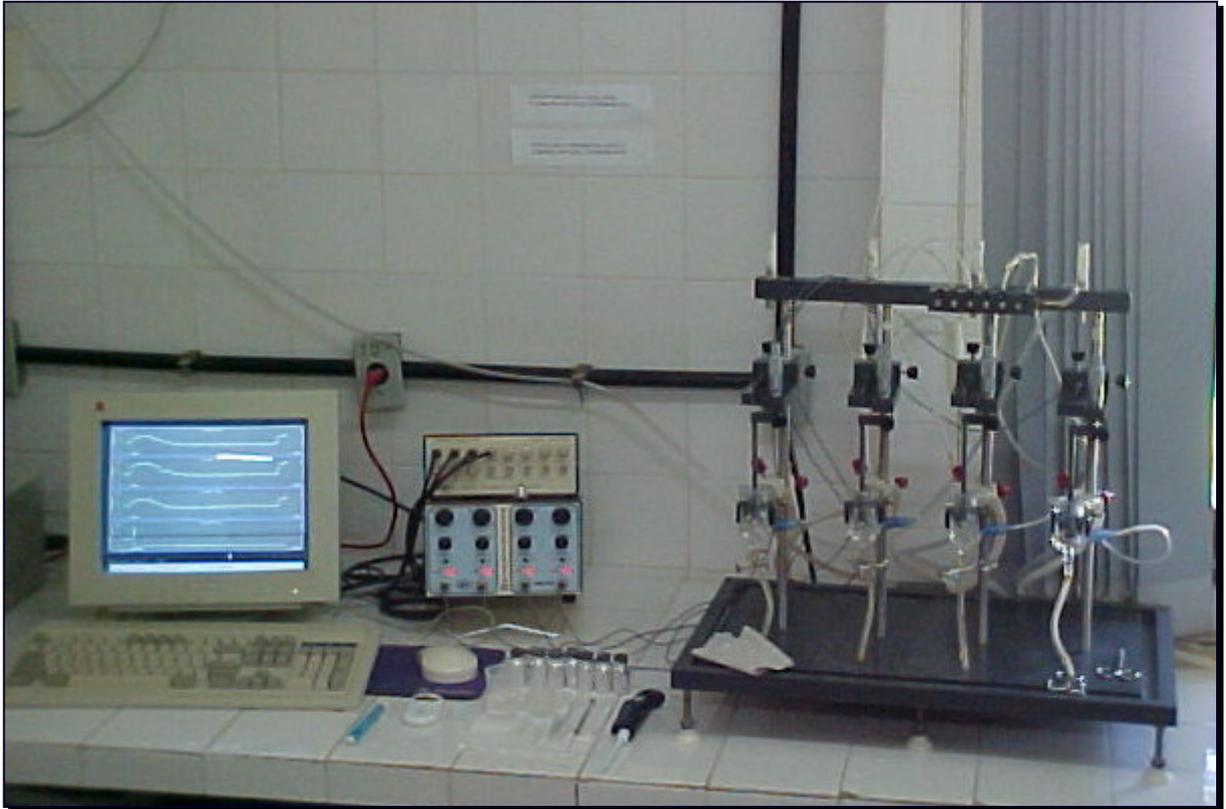


Figura 6: Aparato utilizado para estudos *in vitro*

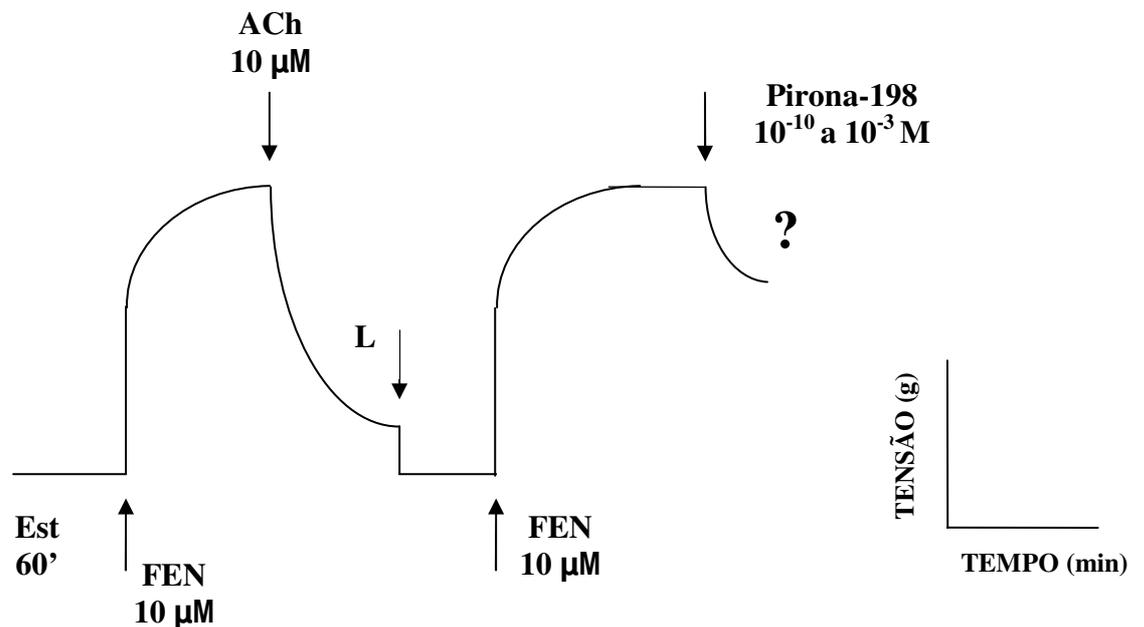
4.2 Protocolos experimentais

4.2.1 Efeito da pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

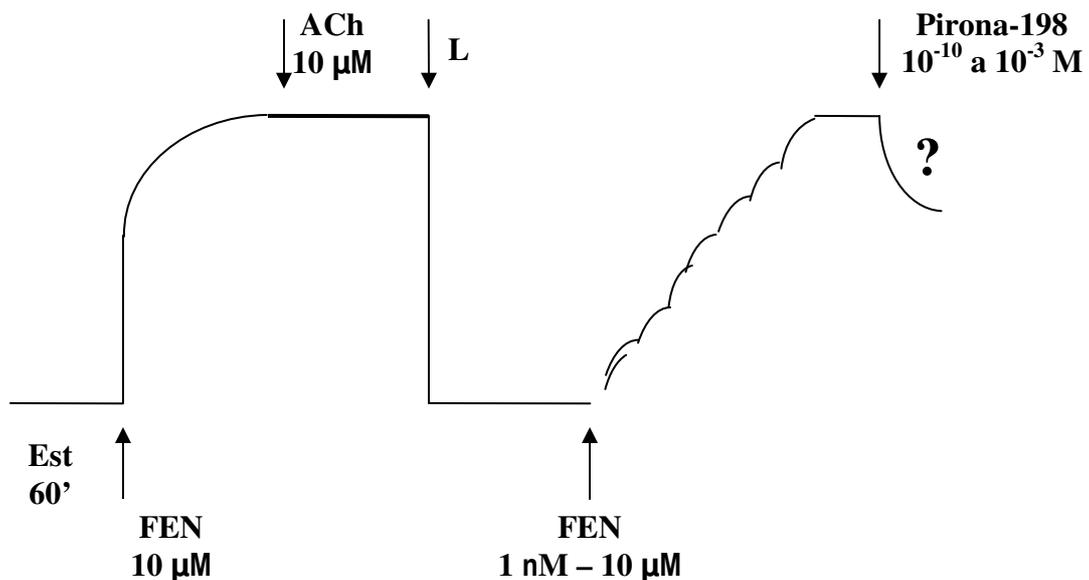
Após a verificação da presença ou ausência do endotélio funcional como descrito no item 4.2, eram realizadas três trocas do meio nutritivo a cada dez minutos, com um tempo total de 30 minutos, com o intuito de o tecido voltar a sua tensão de base de 0,75g (Item 4.1) Passado os 30 minutos de uma nova estabilização, nos anéis com endotélio funcional (maior que 80 %), foi induzida uma segunda contração com FEN (10 μ M), após um período de 30 minutos, na fase tônica da contração, a pirona-198 foi adicionada em concentrações cumulativas (10^{-10} a 10^{-3} M) (Esquema 1A).

Nos anéis desprovidos de endotélio funcional, a segunda contração era induzida com FEN em concentrações cumulativas (1 nM a 10 μ M), com o intuito de igualar a magnitude da contração com FEN nos anéis com e sem endotélio (AU et al., 2004). (Esquema 1B).

A) COM ENDOTÉLIO



B) SEM ENDOTÉLIO



Esquema 1: Representação esquemática do protocolo experimental para estudo do efeito relaxante induzido por pirona-198 (10^{-10} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN, com e sem endotélio funcional (L= lavagem).

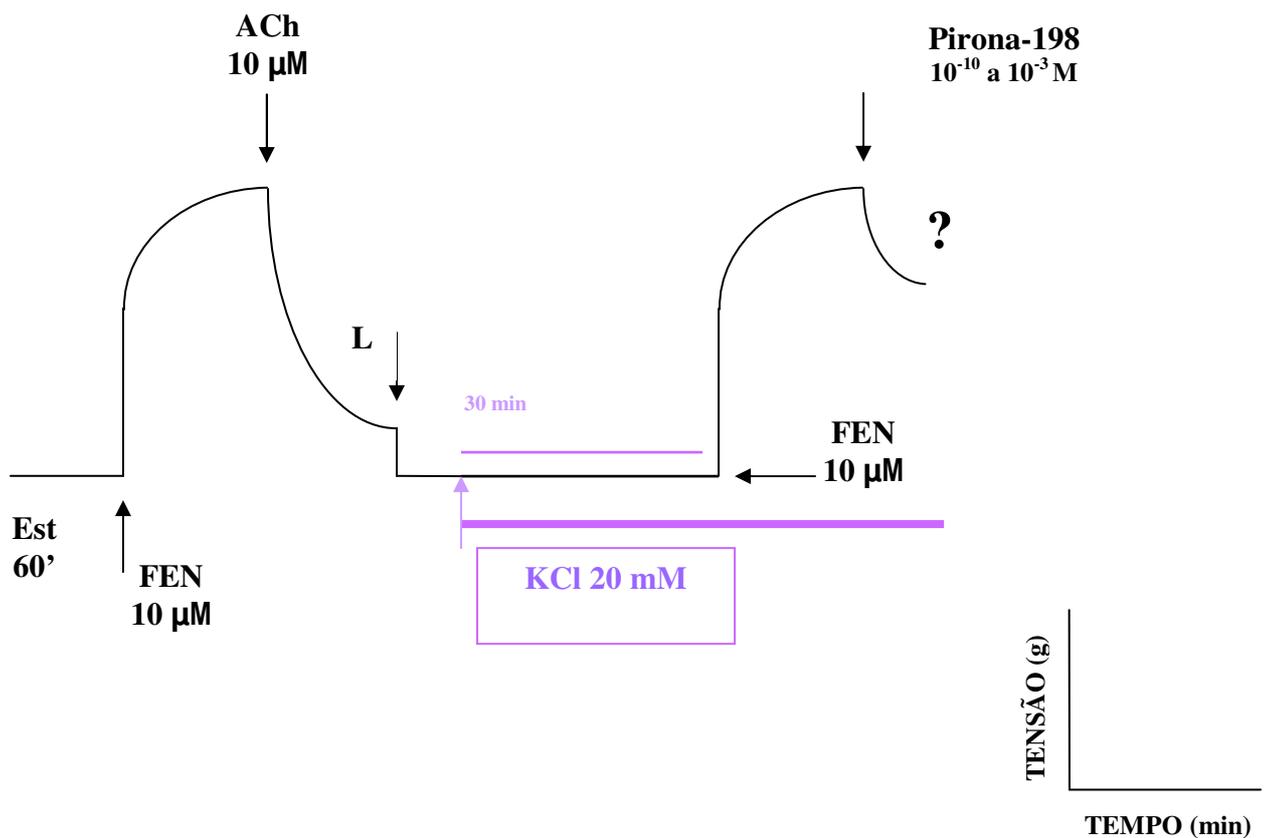
4.2.2 Verificação da participação dos canais para K^+ na resposta relaxante induzida pela pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato incubados numa solução despolarizante com KCl 20 mM.

Após a verificação da presença ou ausência do endotélio funcional, como descrito no item 4.2, a solução de Tyrode presente nas cubas foi substituída pela solução despolarizante de Tyrode com KCl 20 mM (Tabela 3, p.49) e as preparações permaneciam nesta solução até o fim do experimento.

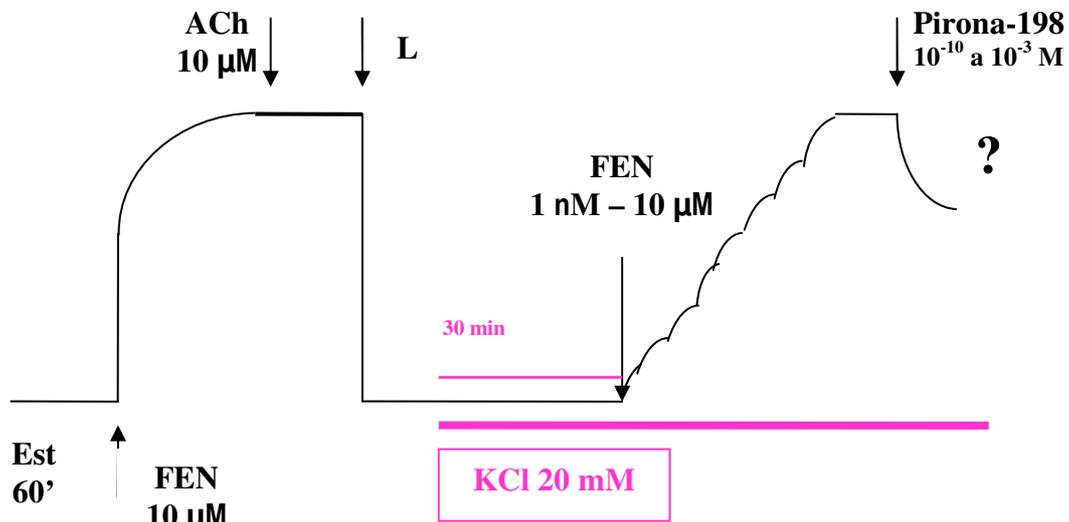
Este procedimento impede parcialmente o efluxo de K^+ e atenua relaxamentos mediados pela abertura de canais para K^+ (CLARK; FUCHS, 1997). Após o período de incubação do KCl 20 mM por 30 minutos, uma nova curva de contração induzida pela FEN (intacto: $10 \mu\text{M}$; removido: $1 \text{ nM} - 10 \mu\text{M}$) foi obtida.

Após o período tônico da contração, passados trinta minutos, as concentrações cumulativas de pirona-198 foram então adicionadas ao meio, obtendo-se assim uma nova curva concentração-resposta, que posteriormente foi comparada com a curva controle (Esquema 2A e 2B).

A



B



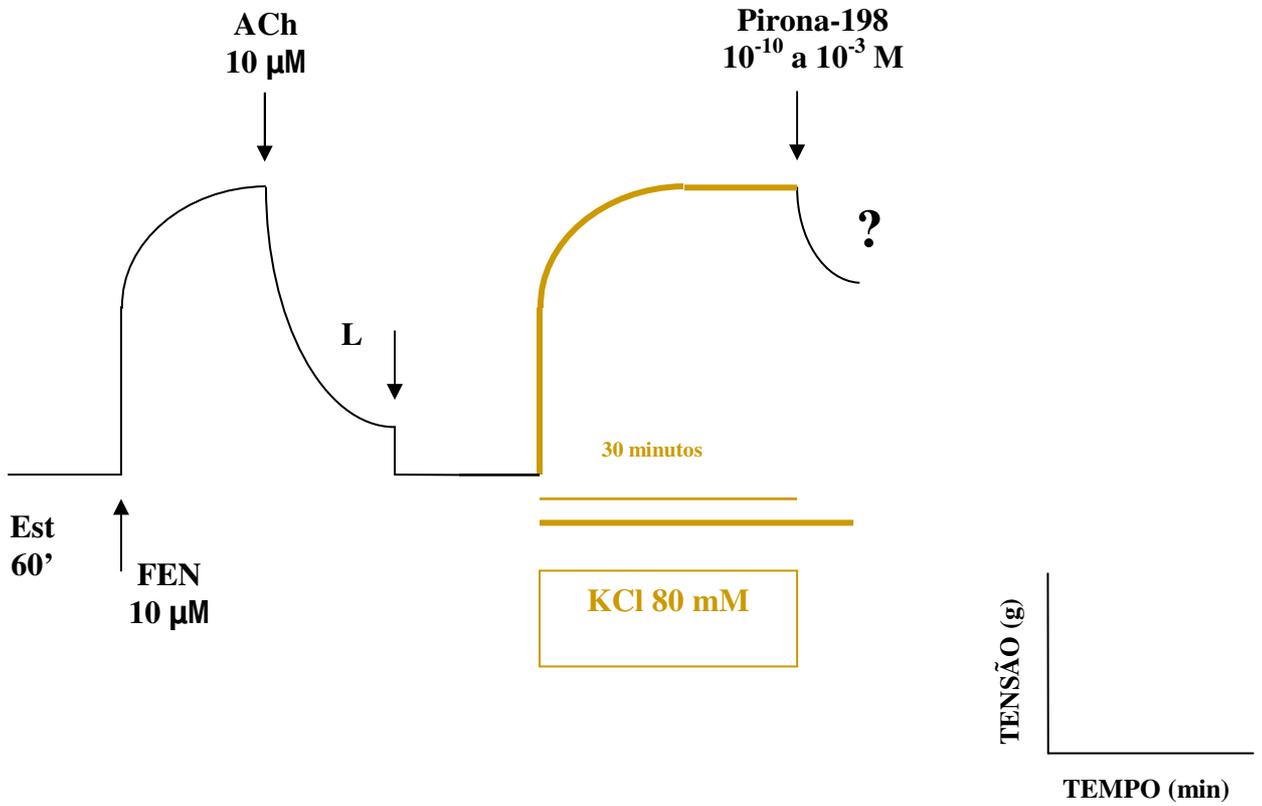
Esquema 2: Representação esquemática do protocolo experimental para estudo da participação dos canais para K^+ no vasorelaxamento induzido por pirona-198 ($10^{10} - 10^{-3} M$) em anéis com (A) e sem endotélio funcional (B) incubados com 10 mL de Tyrode KCl 20 mM (L = Lavagem).

4.2.3 Verificação da participação dos canais de Ca^{2+} na resposta relaxante induzida pela pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato incubados numa solução despolarizante com KCl 80 mM.

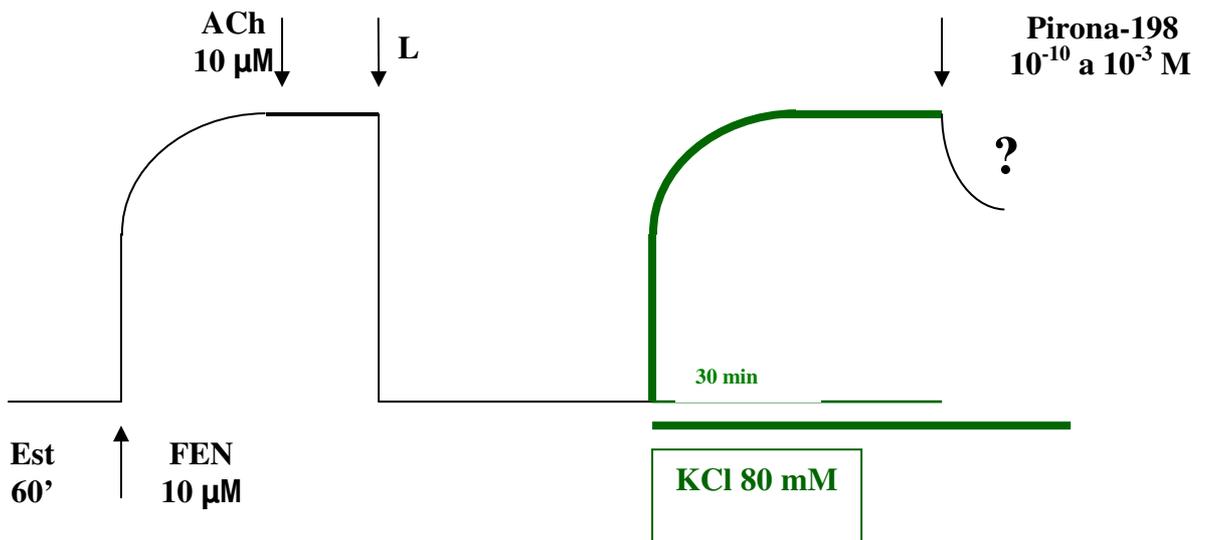
O protocolo realizado com solução de Tyrode em altas concentrações de potássio (80 mM) gera uma despolarização que induz uma contração por aumento do influxo de Ca^{2+} extracelular através de canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L e T (OLIVEIRA et al., 2006).

Este protocolo foi realizado em anéis na presença e ausência do endotélio funcional, como descrito no item 4.1. Após o período de estabilização, o líquido nutritivo de Tyrode normal foi substituído pela solução despolarizante de KCl 80 mM, onde esta permaneceu até o término do experimento. Ao fim dos trinta minutos de incubação da solução de KCl 80 mM, concentrações cumulativas de pirona-198 foram adicionadas (Esquema 3). Os anéis incubados com KCl 80 mM foram posteriormente comparados com os anéis pré-contraídos com fenilefrina.

A



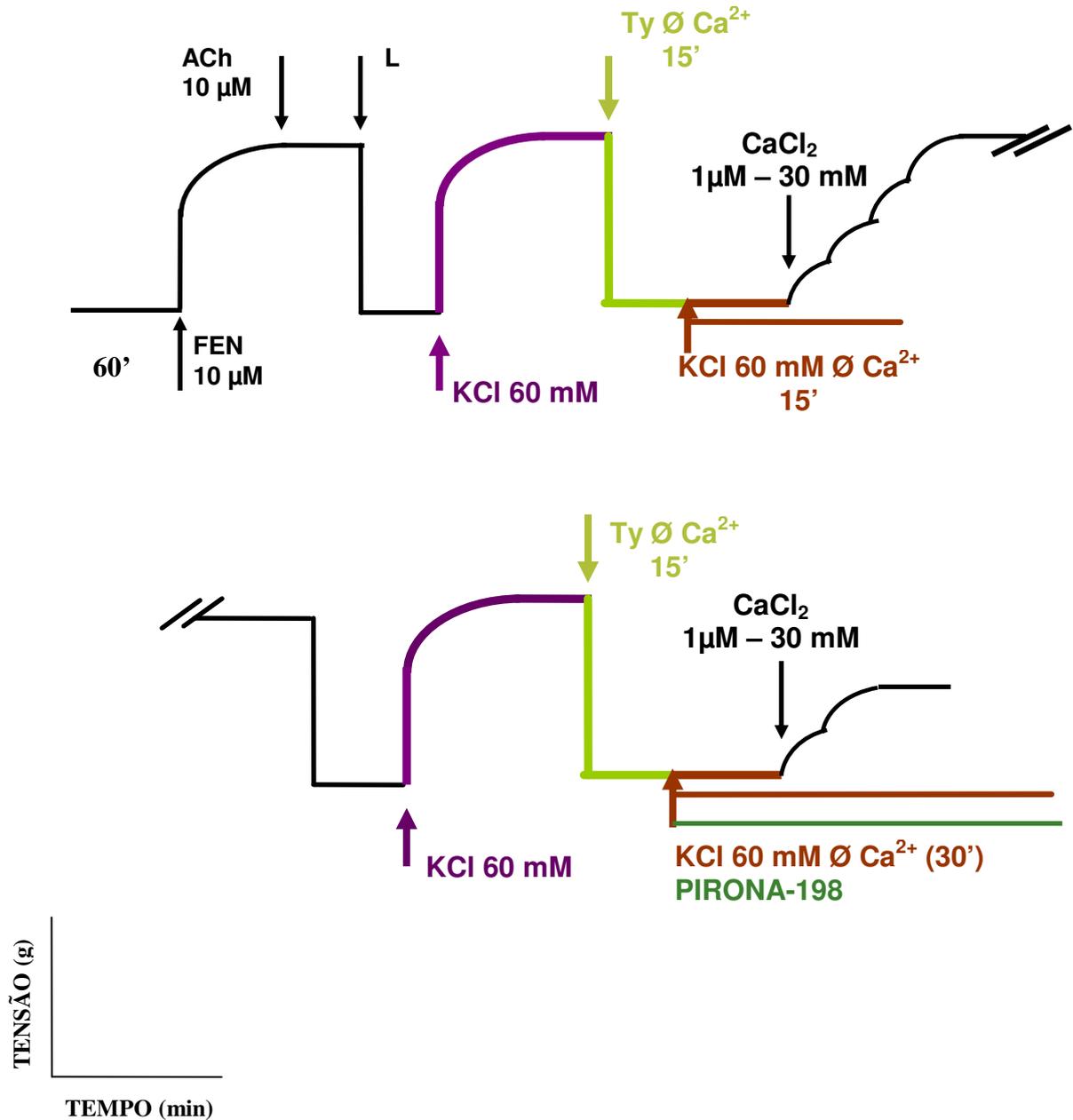
B



Esquema 3: Representação esquemática do protocolo experimental para estudo da participação dos canais de Ca⁺ no efeito vasorelaxante induzido por pirona-198 (10⁻¹⁰ a 10⁻³ M) em anéis com e sem endotélio funcional incubados com 10 mL de KCl 80 mM (L= Lavagem).

4.2.4 Verificação do efeito induzido pela pirona-198 sobre o influxo de cálcio em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

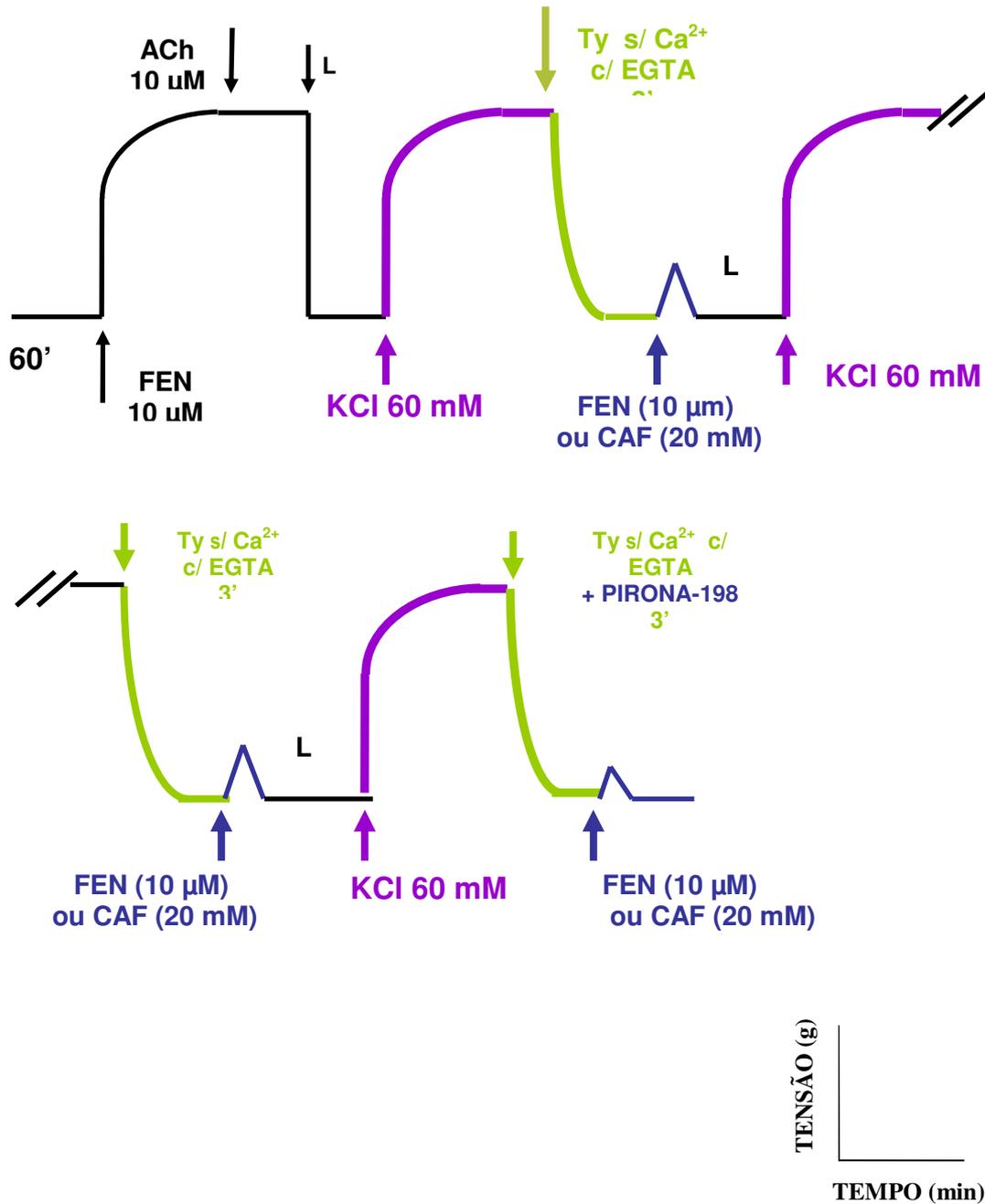
Após seguir o procedimento inicial semelhante aos protocolos anteriores (item 4.1 e 4.2) e ser feita a verificação da ausência do endotélio nestes anéis, a avaliação da participação da pirona no influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) foi realizada da seguinte forma: após um breve período de estabilização após a lavagem, a solução de Tyrode foi substituída por uma solução despolarizante de Tyrode com cloreto de potássio a 60 mM (Tabela 4, p.49). Com essa solução despolarizante, foi obtida uma curva de contração padrão, conseqüente a uma despolarização da membrana plasmática com abertura dos canais de cálcio operados por voltagem. Na fase tônica desta contração, novamente os anéis tiveram seu líquido nutritivo substituído pela solução de Tyrode nominalmente sem cálcio (Tabela 2, p.48), sendo esta mantida por 15 minutos. Com essa troca de solução, o meio agora se mantém livre de cálcio. Após esse período, o meio foi novamente trocado por uma solução despolarizante de Tyrode com KCl 60 mM nominalmente sem cálcio (Tabela 5, p.50) e mantido por 15 minutos, em seguida, contrações isométricas foram obtidas pela adição cumulativa de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) nas concentrações de 1 μ M a 30 mM. Este procedimento foi repetido, porém a geração da curva cumulativa concentração - resposta de $CaCl_2$ (1 μ M a 30 mM) foi obtida na presença de concentrações isoladas de pirona (10^{-10} a 10^{-3} M), por um período de incubação de 30 minutos. (Esquema 4). A curva de $CaCl_2$ na presença de pirona foi comparada com a curva concentração - resposta controle, e sua resposta máxima foi dada como 100 %.



Esquema 4: Representação esquemática do protocolo experimental para estudo da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito vasorelaxante de concentrações isoladas de pirona (L= Lavagem; Ty: Tyrode).

4.2.5 Verificação da resposta induzida pela pirona-198 sobre contrações transientes induzidas por FEN (10 μ M) ou Cafeína (20 mM) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

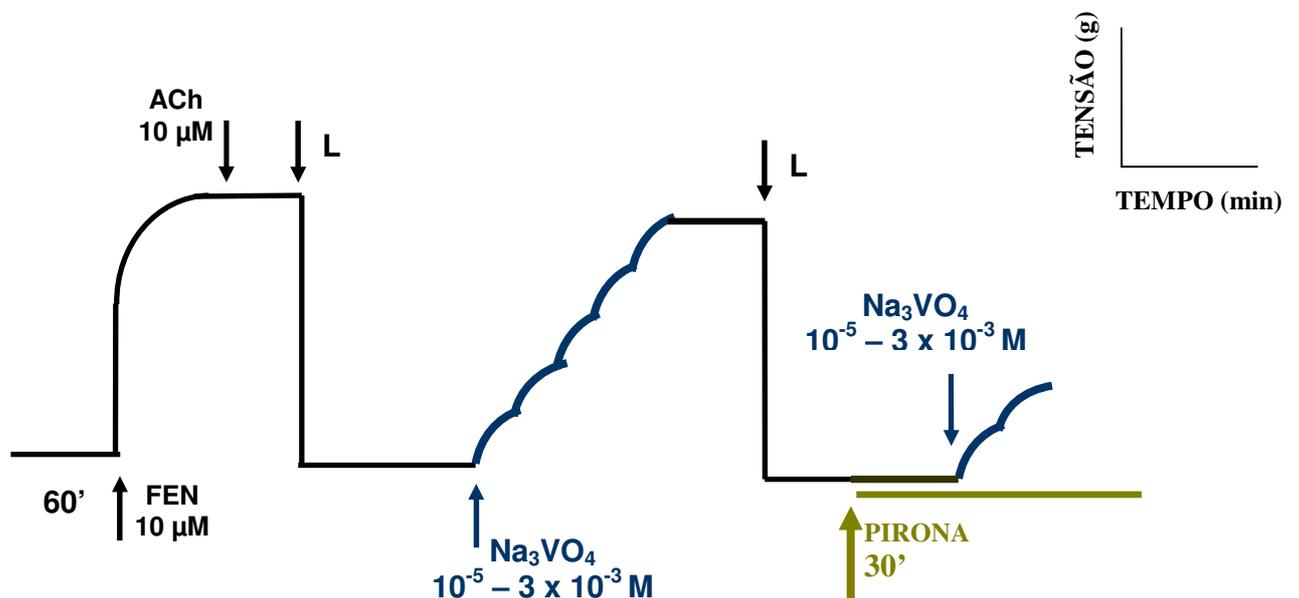
Após todo o período inicial (ver item 4.1 e 4.2), os anéis foram expostos a solução despolarizante KCl 60 mM (Tabela 4, p.49) sendo este meio posteriormente substituído por uma solução de Tyrode livre de cálcio adicionado de EGTA, um quelante de cálcio. Decorridos 3 minutos, era adicionada ao meio FEN (10 μ M) ou cafeína (20 mM) e uma resposta contrátil era então obtida. Este procedimento foi repetido, porém as contrações transientes induzidas por adição de fenilefrina ou cafeína agora eram obtidas após as concentrações isoladas de pirona-198 (10^{-10} a 10^{-3} M) serem incubadas por 3 minutos (Esquema 5).



Esquema 5: Representação esquemática do protocolo experimental para estudo da avaliação dos efeitos de concentrações isoladas de pirona-198 sobre as contrações transientes induzidas por FEN (10 µM) ou CAF (20 mM) (L= Lavagem; Ty = Tyrode).

4.2.6 Verificação do efeito induzido pela pirona-198 sobre contrações induzidas por Na_3VO_4 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

A participação de concentrações isoladas de pirona-198 sobre o mecanismo de sensibilização ao cálcio pelo aparato contrátil, foi avaliada utilizando ortovanadato de sódio, um inibidor da miosina fosfatase (MASUI e WAKABAYASHI, 2000). Após verificação da ausência do endotélio funcional (item 4.2), foi obtida uma curva concentração-resposta para o ortovanadato de sódio ($10^{-5} - 3 \times 10^{-3} \text{ M}$) (ZHOU *et al.*, 1997). As preparações foram lavadas com solução de Tyrode por 30 minutos. Após um período para estabilização do tônus basal, concentrações isoladas de pirona-198 foram incubadas por um período de 20 minutos, decorrido esse tempo, uma nova curva concentração-resposta foi obtida (Esquema 6). A curva de Na_3VO_4 na presença de pirona foi comparada com a curva concentração-resposta controle, e sua resposta máxima foi caracterizada como 100 %.



Esquema 6: Representação esquemática do protocolo experimental para estudo da avaliação dos efeitos de concentrações isoladas de pirona-198 sobre as contrações induzidas por Ortovanadato de sódio (L= Lavagem).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). As curvas concentração-resposta foram analisadas por regressão não-linear e, através desta, foram calculados os valores de CE_{50} (concentração molar de uma substância necessária para atingir 50% do efeito máximo).

As diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste “*t*” de *Student* para amostras independentes. Este procedimento comparou as médias de dois grupos de casos, e pela análise de variância ANOVA “One Way” seguida do pós-teste Newman - Keuls quando o número de casos foi superior a dois. Diferenças cujos valores de *p* foram menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados significativos.

Nos experimentos da curva de $CaCl_2$ e ortovanadato de sódio, as curvas concentração-resposta na presença de pirona foram comparadas com a curva concentração-resposta controle, nas quais a resposta máxima foi dada como 100 %.

Para todos esses procedimentos foi utilizado o programa estatístico GraphPad PrismTM software, version 3.02 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina.

A administração cumulativa de pirona-198 (10^{-10} a 10^{-3} M) induziu um relaxamento dependente de concentração, tanto na presença ($CE_{50} = 1,1 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M) quanto na ausência do endotélio funcional ($CE_{50} = 1,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) pré-contraídos com FEN. Após a lavagem das preparações, as respostas dos tecidos para $10 \mu\text{M}$ de FEN não foram significativamente alteradas em relação às curvas iniciais do protocolo, indicando que o efeito de pirona-198 é reversível (dados não mostrados) e apresentando um tempo médio de relaxamento de 90 minutos.

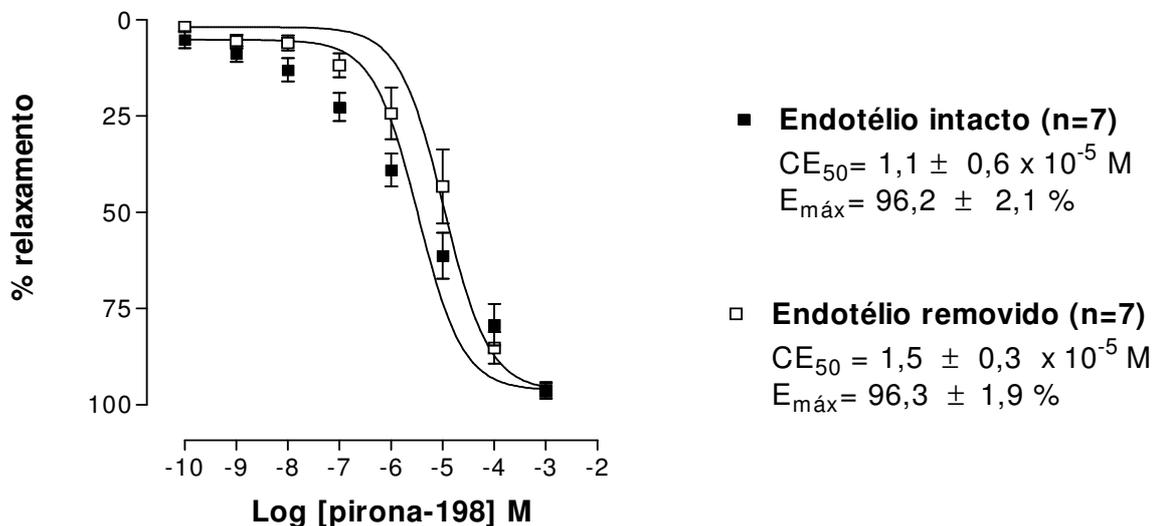


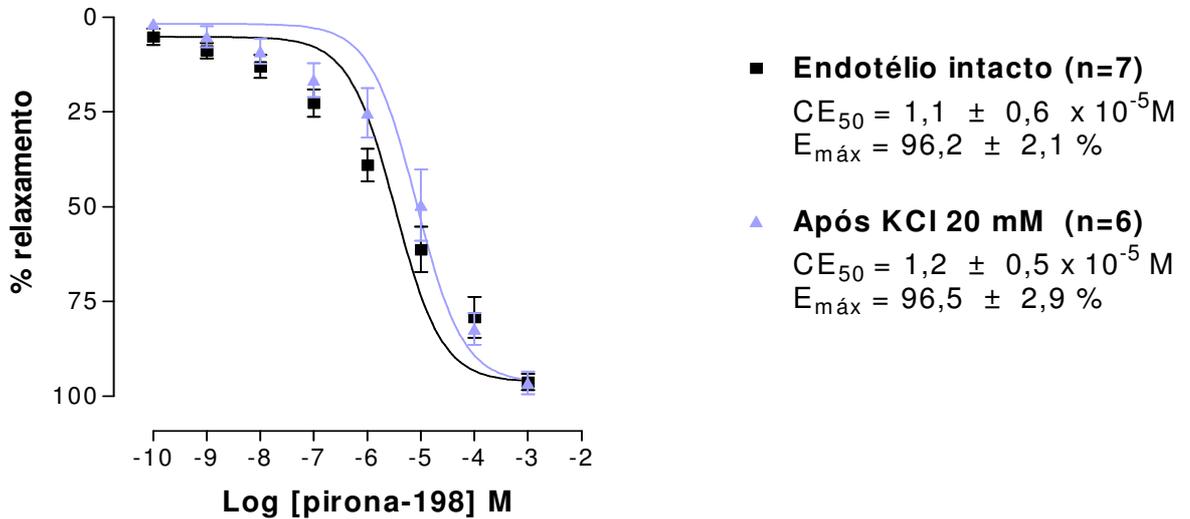
Gráfico 1: Curva concentração-resposta para pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, tanto na presença como na ausência do endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina (intacto: $10 \mu\text{M}$; removido: $1\text{nM} - 10 \mu\text{M}$).

5.2 Efeito da pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN na presença de KCl 20 mM

A curva concentração-resposta para pirona-198 obtida na presença de KCl 20 mM não foi alterada quando comparada com a curva concentração-resposta da pirona em anéis com e sem endotélio funcional na ausência de KCl 20 mM, como mostrado pelos valores de CE_{50} e $E_{máx}$.

Os valores de CE_{50} e $E_{máx}$ após KCl 20 mM ($CE_{50} = 1,2 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M; $E_{máx} = 96,5 \pm 2,9$ %) na presença do endotélio funcional não foi significativamente alterada em relação ao controle ($CE_{50} = 1,1 \pm 0,69 \times 10^{-5}$ M; $E_{máx} = 96,2 \pm 2,1$ %). O mesmo ocorrendo em anéis desprovidos do endotélio funcional, onde a CE_{50} e $E_{máx}$ na ausência ($CE_{50} = 1,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M; $E_{máx} = 96,3 \pm 1,9$ %) e na presença de KCl 20 mM ($CE_{50} = 3,2 \pm 1,1 \times 10^{-5}$ M; $E_{máx} = 100 \pm 0$ %) não foram significativamente diferentes.

A



B

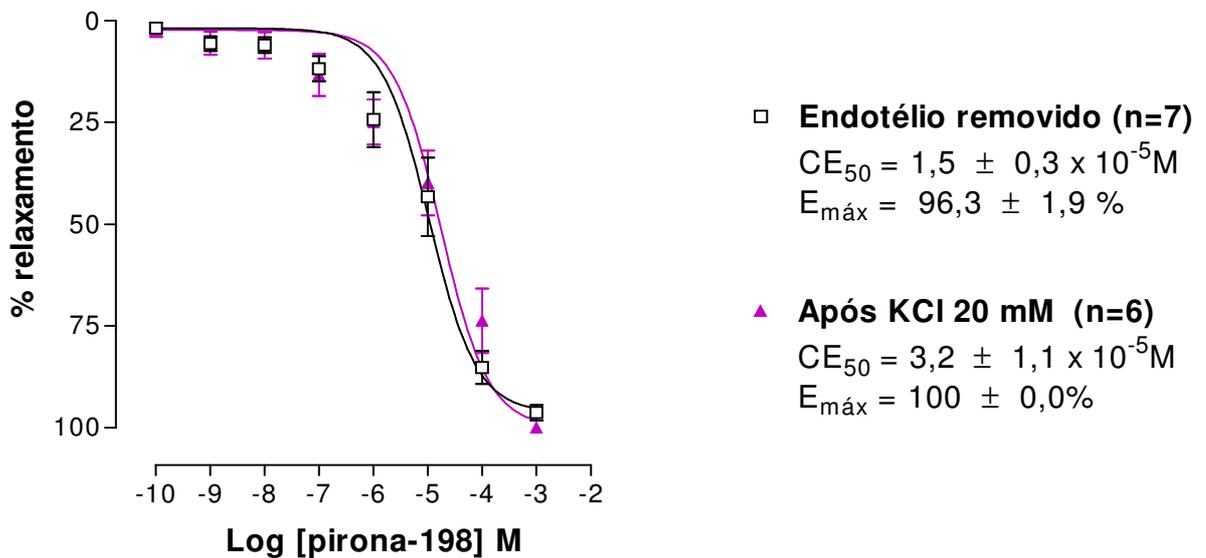


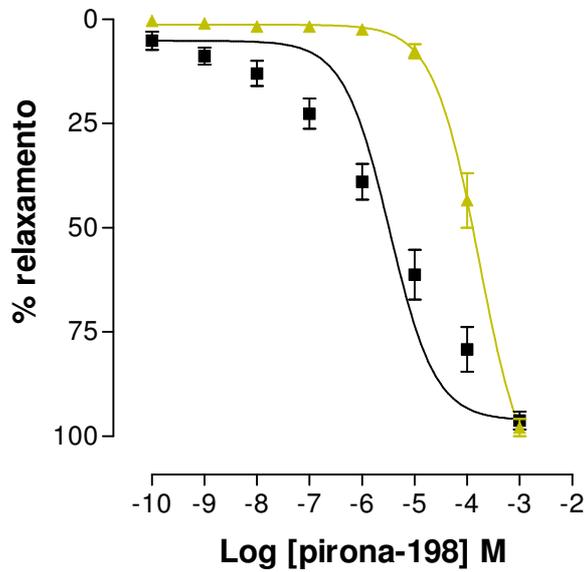
Gráfico 2: Curva concentração-resposta para pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, na presença do endotélio funcional (A) pré-contraídos com fenilefrina (10 μM) e desprovidos do endotélio funcional (B), pré-contraídos com fenilefrina (1nM - 10 μM) na ausência e na presença de KCl 20 mM.

5.3 Efeito da pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com KCl 80 mM.

A administração cumulativa de pirona-198 (10^{-10} a 10^{-3} M) induziu um relaxamento dos anéis pré-contraídos com KCl 80 mM, tanto em anéis com ($CE_{50} = 1,2 \pm 0,1 \times 10^{-4}$ M) e sem endotélio funcional ($CE_{50} = 2,0 \pm 0,3 \times 10^{-4}$ M), sendo significativamente diferente quando comparados aos anéis com e sem endotélio funcional contraídos com FEN ($p < 0,001$). E tendo a curva concentração-resposta deslocada para a direita quando comparada com a curva concentração-resposta controle.

A observação dos valores de CE_{50} tanto em anéis com e sem endotélio funcional, mostra que a pirona-198 apresentou um efeito de maior potência quando o agente contracturante utilizado foi a FEN.

A



■ Endotélio intacto (n=7)

$$CE_{50} = 1,1 \pm 0,6 \times 10^{-5} \text{ M}$$

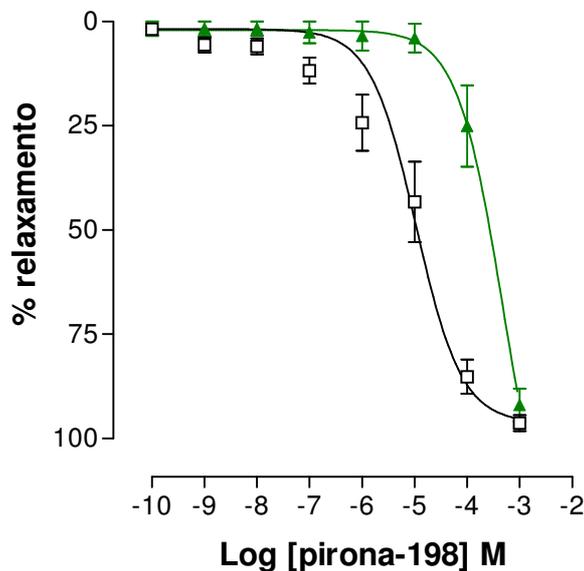
$$E_{m\acute{a}x} = 96,2 \pm 2,1\%$$

▲ Após KCl 80 mM (n=6)

$$EC_{50} = 1,2 \pm 0,1 \times 10^{-4} \text{ M}^{***}$$

$$E_{m\acute{a}x} = 97,9 \pm 2,0 \%$$

B



□ Endotélio removido (n=7)

$$CE_{50} = 1,5 \pm 0,3 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$E_{m\acute{a}x} = 96,3 \pm 1,9 \%$$

▲ Após KCl 80 mM (n=6)

$$CE_{50} = 2,0 \pm 0,3 \times 10^{-4} \text{ M}^{***}$$

$$E_{m\acute{a}x} = 92 \pm 3,9 \%$$

Gráfico 3: Curvas concentração-resposta para pirona-198 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, na presença (A) e na ausência do endotélio funcional (B), pré-contraídos com FEN ou com KCl 80 mM. *** $p < 0,001$: KCl 80 mM *versus* endotélio intacto e removido.

5.4 EFEITO DA PIRONA SOBRE AS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR CaCl_2 EM ANÉIS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA DE RATO.

A administração de concentrações crescentes de CaCl_2 em uma solução despolarizante de KCl 60 mM nominalmente sem cálcio promoveu uma contração dependente de concentração ($\text{CE}_{50} = 2,9 \pm 0,4 \times 10^{-4}$ M; $E_{\text{máx}} = 100$ %). A pirona-198 na concentração de 10^{-7} – 10^{-4} M não deslocou a curva de CaCl_2 (**10^{-7} M**: $\text{CE}_{50} = 1,8 \pm 0,36 \times 10^{-4}$ M; $E_{\text{máx}} = 100$ %; **10^{-6} M**: $\text{CE}_{50} = 1,8 \pm 0,6 \times 10^{-4}$ M; $E_{\text{máx}} = 100$ %; **10^{-5} M**: $\text{CE}_{50} = 1,2 \pm 0,5 \times 10^{-4}$ M; $E_{\text{máx}} = 93,1 \pm 2,4$ %; **10^{-4} M**: $\text{CE}_{50} = 5,0 \pm 1,8 \times 10^{-4}$ M; $E_{\text{máx}} = 90,3 \pm 4$ %). Apenas na presença da maior concentração isolada de pirona (10^{-3} M) a contração induzida por CaCl_2 foi atenuada, tendo a sua curva concentração-resposta deslocada para a direita ($\text{CE}_{50} = 2,3 \pm 0,8 \times 10^{-3}$ M) e tendo sua resposta máxima reduzida ($E_{\text{máx}} = 22,4 \pm 4,3$ %).

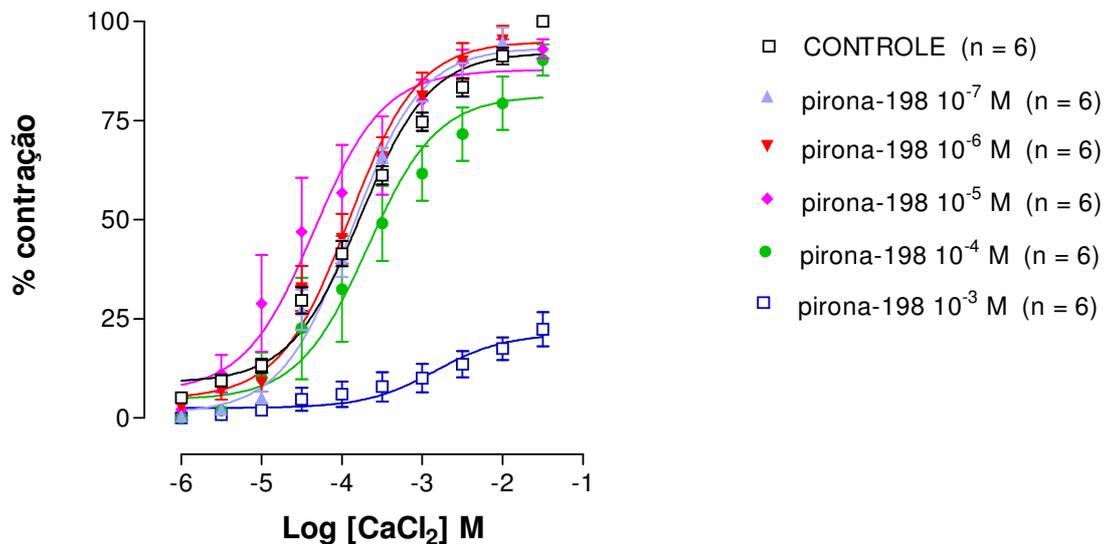


Gráfico 4: Curvas concentração-resposta para CaCl_2 em solução despolarizante KCl 60 mM nominalmente sem cálcio, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, desprovidos do endotélio funcional e na presença de concentrações isoladas de pirona-198 (10^{-7} a 10^{-3} M). *** $p < 0,001$ versus controle.

5.5 Efeito da pirona-198 sobre as contrações induzidas por FEN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

Exceto as concentrações de 10^{-10} ($E_{\text{máx}} = 100 \pm 4,3 \%$) e 10^{-9} M ($E_{\text{máx}} = 100 \pm 5,3 \%$), todas as outras concentrações de pirona-198 testadas (10^{-8} M: $E_{\text{máx}} = 78,8 \pm 7,0 \%$; 10^{-7} M: $E_{\text{máx}} = 59,2 \pm 7,1 \%$; 10^{-6} M: $E_{\text{máx}} = 44,5 \pm 7,2 \%$; 10^{-5} M: $E_{\text{máx}} = 42,3 \pm 2,7 \%$; 10^{-4} M: $E_{\text{máx}} = 36,8 \pm 9,0 \%$; 10^{-3} M: $E_{\text{máx}} = 36,5 \pm 8,0 \%$), foram capazes de atenuar significativamente a magnitude das contrações induzidas por FEN ($10 \mu\text{M}$) ao serem comparadas com o controle ($E_{\text{máx}} = 100 \pm 0,4 \%$).

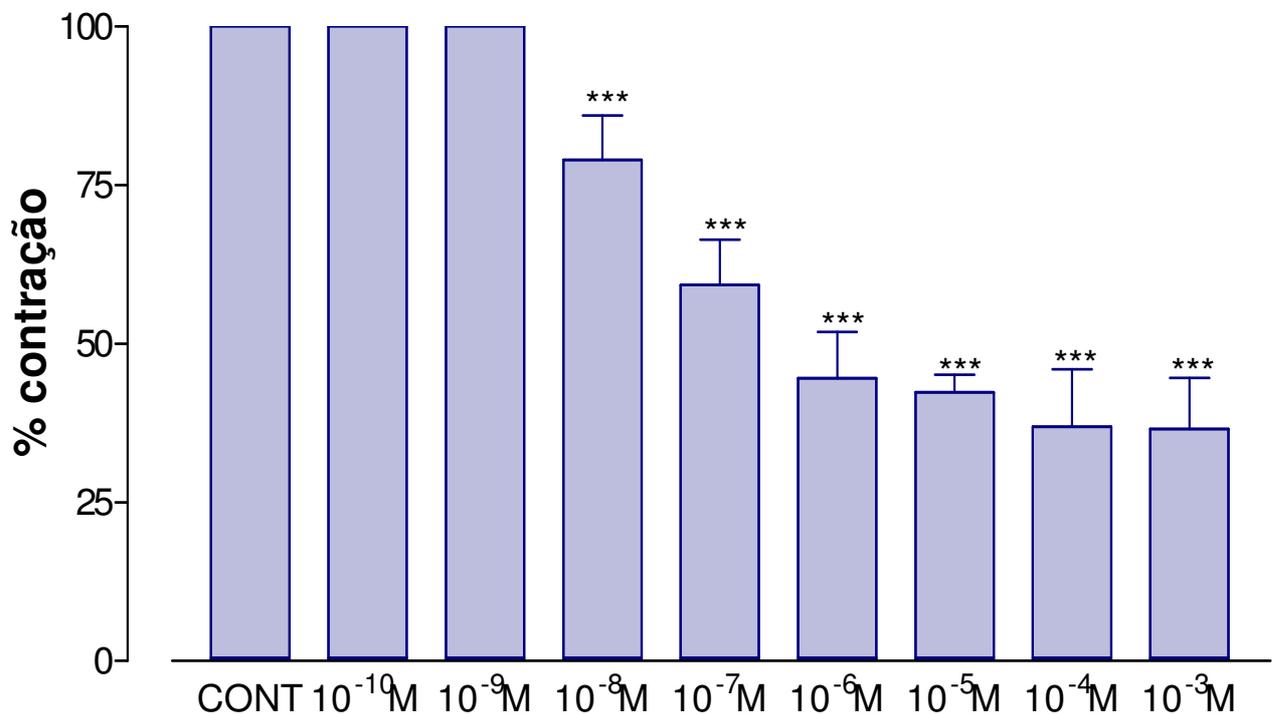


Gráfico 5: Efeito das concentrações isoladas de pirona-198 sobre as contrações transientes induzidas por FEN ($10 \mu\text{M}$) em solução despolarizante de KCl 60 mM livre de cálcio em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, desprovidos de endotélio funcional. *** $p < 0,001$ versus controle.

5.6 EFEITO DA PIRONA SOBRE AS CONTRAÇÕES TRANSIENTES INDUZIDAS POR CAF EM ANÉIS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA DE RATO.

Nas concentrações de pirona-198 (10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3}) testadas, foi observada que nos anéis incubados com as duas maiores concentrações de pirona, houve uma diminuição da magnitude das contrações transientes induzidas pela cafeína (20 mM). O efeito da concentração de 10^{-5} M não foi significativamente alterada ($E_{\text{máx}} = 98,8 \pm 0,7 \%$), porém a concentração de 10^{-4} ($E_{\text{máx}} = 66,7 \pm 7,4\%$) e 10^{-3} M ($E_{\text{máx}} = 66,4 \pm 6,9 \%$) foram capazes de atenuar a contração produzida pela mobilização de cálcio através da estimulação com cafeína, quando comparados ao controle ($E_{\text{máx}} = 100 \pm 0,3 \%$). Este efeito não se apresentou de forma dependente de concentração.

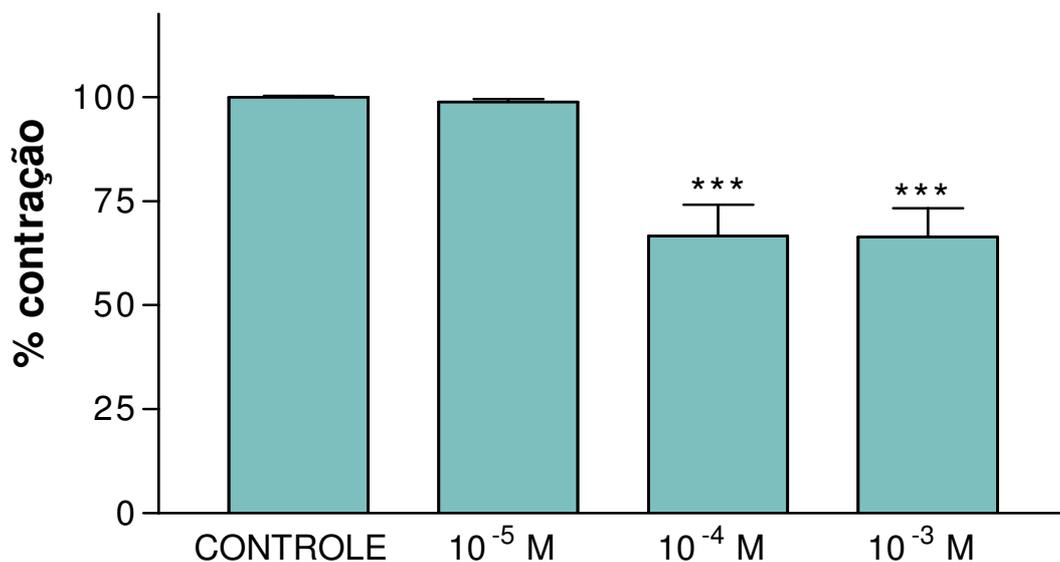


Gráfico 6: Efeito das concentrações isoladas de pirona-198 sobre as contrações transientes induzidas por CAF (20 mM) em solução despolarizante de KCl 60 mM livre de cálcio em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, desprovidos de endotélio funcional. *** $p < 0,001$ versus controle.

5.7 EFEITO DA PIRONA SOBRE AS CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR Na_3VO_4 EM ANÉIS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR ISOLADA DE RATO DESPROVIDOS DE ENDOTÉLIO FUNCIONAL.

A magnitude das contrações induzidas pelo ortovanadato de sódio (10^{-5} - 3×10^{-3} M) foi significativamente diminuída nos anéis incubados com concentrações isoladas de pirona-198 testadas. Os valores de CE_{50} e $E_{\text{máx}}$ dos anéis incubados com a concentração de 10^{-4} M ($\text{CE}_{50} = 1,6 \pm 0,2 \times 10^{-3}$ M; $E_{\text{máx}} = 56,1 \pm 6,9$ %) e de 10^{-3} M ($\text{CE}_{50} = 1,3 \pm 0,2 \times 10^{-3}$ M; $E_{\text{máx}} = 30,6 \pm 7,7$ %) foram significativamente diferentes quando comparados ao controle ($\text{CE}_{50} = 6,7 \pm 1,4 \times 10^{-4}$ M; $E_{\text{máx}} = 100 \pm 0,0$ %). A concentração de 10^{-5} M não alterou significativamente as contrações induzidas por Na_3VO_4 ($\text{CE}_{50} = 5,9 \pm 1,7 \times 10^{-4}$ M; $E_{\text{máx}} = 91,3 \pm 8,7$ %).

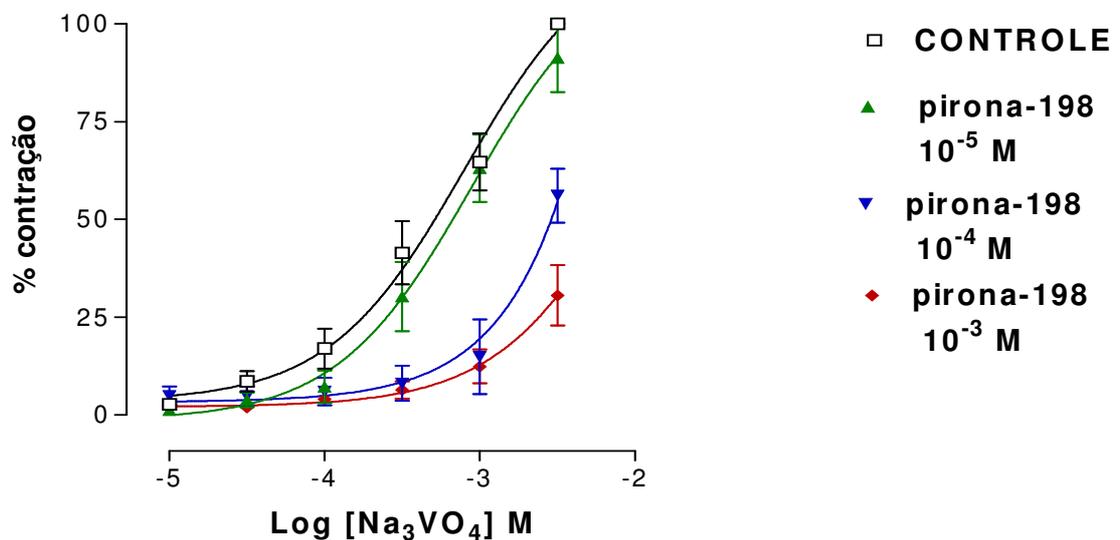


Gráfico 7: Efeito das concentrações isoladas de pirona-198 sobre as contrações induzidas por Na_3VO_4 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, desprovidos de endotélio funcional.

*** $p < 0,001$ versus controle.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Devido à ausência, até então de trabalhos que elucidam efeitos biológicos da *Aniba panurensis*, tal como os efeitos produzidos pela 6 – [(*E*) – estiril] – piran – 2 – ona no sistema cardiovascular, um objetivo de suma importância foi cumprido neste trabalho, o de contribuir com informações relevantes a respeito desta espécie e de seus constituintes, mostrando pela primeira vez evidências farmacológicas do efeito vasorelaxante da pirona-198. Aumentando assim a quantidade de informações em torno desta e contribuindo consideravelmente para a pesquisa na área de plantas medicinais.

Sendo assim, diante destes fatos, resolvemos então avaliar o efeito desta pirona sobre o tônus muscular liso, através da utilização de artéria mesentérica superior, esta que reflete bem as variações da resistência vascular periférica.

Demonstramos pela primeira vez que a 6 – [(*E*) – estiril] – piran – 2 – ona, a pirona-198, exerce sobre o tônus muscular liso uma ação vasorelaxante que se apresentou de forma independente do endotélio funcional e de forma dependente de concentração (Gráfico 1). Sendo o tônus muscular liso o maior determinante da resistência ao fluxo sanguíneo na circulação, e que tem sua regulação dependente de uma intrínseca relação entre estímulos vasodilatadores e vasoconstrictores de hormônios circulantes, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio e pressão sanguínea (JACKSON, 2000).

Diante destes resultados, resolvemos então investigar uma possível participação dos canais para potássio no efeito relaxante induzido pela pirona, já que a regulação da contração muscular lisa é dependente do potencial de membrana e o potássio é o principal regulador deste potencial, possuindo então uma importante ação sobre o tônus vascular (JACKSON, 2000). De forma que, flutuações em suas concentrações extracelulares podem ser um importante modulador da resistência periférica local e do fluxo sanguíneo (BROCHET; LANGTON, 2006), já que concentrações externas de potássio atuam modulando o nível de polarização da membrana de células musculares lisas (IBRAHIM et al., 1998). Uma resposta vasorelaxante de anéis incubados com solução despolarizante de KCl 20 mM pode

refletir então uma possível participação dos canais para potássio nesta resposta (CLARK; FUCHS, 1997).

Neste estudo, demonstramos que a resposta vasorelaxante da pirona em um meio contendo solução despolarizante de KCl 20 mM não foi alterada quando comparada aos anéis de artéria mesentérica contraídos com FEN, tanto na presença como na ausência do endotélio funcional. Sugerindo assim, a não participação desses canais no efeito desta pirona (Gráfico 2A e 2B).

Quando a concentração externa de potássio é elevada (80 mM), desencadeia então uma despolarização da membrana celular, eliminando o efeito dos fatores hiperpolarizantes e promovendo a abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (tipo L e T), o que resulta em uma alta concentração de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ sustentada (BUUS *et al.*, 2006). Este fluxo de cálcio através de canais de cálcio dependente de voltagem está intimamente relacionado com a contração no músculo liso, de forma que sua regulação se dá por ação hiperpolarizante de vários subtipos de canais para potássio, atuando assim na modulação do grau de contração da célula muscular lisa (VENKATESWARLU *et al.*, 2002).

Assim, existe uma estreita relação entre potencial de membrana, influxo de cálcio, concentração de cálcio intracelular e manutenção da força do músculo liso (COX, 1996a), de forma que fatores que regulam o potencial de membrana têm efeito direto na contração e na resistência vascular (COX, 2002b).

Assim, nos anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com uma solução despolarizante de KCl 80 mM, observou-se uma contração que sabe-se ser proveniente da abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) (OLIVEIRA *et al.*, 2006). O resultado obtido foi um relaxamento significativo induzido pelas duas maiores concentrações utilizadas (10^{-4} e 10^{-3} M), acompanhado de um aumento nos valores de CE_{50} tanto na presença ($CE_{50} = 1,2 \pm 0,15 \times 10^{-4}$ M) como na ausência do endotélio funcional ($CE_{50} = 2,0 \pm 0,38 \times 10^{-4}$ M) quando comparado aos anéis contraídos com FEN (intacto: $CE_{50} = 1,10 \pm 0,69 \times 10^{-5}$ M; removido: $CE_{50} = 1,57 \pm 0,35 \times 10^{-5}$ M).

Apesar deste relaxamento significativo, a curva concentração-resposta da pirona foi deslocada para a direita, mostrando que esta substância apresenta uma maior capacidade de relaxamento em contrações induzidas por FEN (Gráfico 3).

Os resultados observados nos anéis mesentéricos pré-contraídos com KCl 80 mM sugerem que a pirona possui uma discreta atividade sobre o influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem. Sendo esses dados reforçados pelos resultados obtidos nos experimentos realizados com a adição cumulativa de CaCl_2 , de forma que esta foi realizada em um meio despolarizante e livre de cálcio (KCl 60 mM nominalmente sem cálcio), aonde apenas a concentração isolada de pirona (10^{-3} M) foi capaz de atenuar a curva de contração obtida pelo CaCl_2 (Gráfico 4).

Nos vasos sangüíneos, as respostas contratéis dentro do músculo liso podem ser mediadas por influxo do cálcio extracelular através de canais de cálcio dependentes de voltagem, pela liberação de cálcio induzida por cálcio (CICR) pelos canais de rianodina ou liberação de cálcio pelos receptores de IP_3 , estoques localizados no retículo sarcoplasmático (GRAYSON et al., 2004).

Na ausência de cálcio extracelular são observadas apenas as contrações transientes, provenientes dos estoques intracelulares, visto que o influxo de cálcio é requerido para a manutenção da fase tônica da contração do músculo liso (WANG et al., 2002). Em muitas células, o estímulo com agonista resulta em um transiente aumento na concentração de cálcio citosólico por induzirem um aumento na produção de IP_3 (PATEL et al., 1999).

Nas contrações transientes induzidas por fenilefrina, concentrações isoladas de pirona (10^{-8} a 10^{-3} M), como visualizado no gráfico 5, atenuaram significativamente a resposta máxima induzida pela fenilefrina (10 μM), indicando uma possível participação importante da pirona sobre a mobilização de cálcio pelos receptores sensíveis ao IP_3 .

No músculo liso, o influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem na membrana plasmática promove abertura dos canais de RyR, levando a amplificação do sinal global de cálcio (McGEOWN, 2004). Essa liberação de cálcio pode também ser obtida pela aplicação exógena de cafeína, que se liga

aos receptores de rianodina (RyR) com alta afinidade, produzindo contrações transientes resultantes desta liberação, sendo ela utilizada como ferramenta farmacológica para o estudo deste receptor (SEI et al., 2001).

Sobre as contrações transientes provenientes dos receptores de rianodina, as duas maiores concentrações isoladas de pirona atenuaram significativamente a resposta máxima induzida pela cafeína (Gráfico 6), sugerindo uma participação da pirona sobre a liberação de cálcio através dos receptores de rianodina presentes na membrana do retículo sarcoplasmático.

É importante correlacionar os resultados obtidos nos protocolos de KCl 80 mM, influxo de cálcio e cafeína, sabendo-se que esses protocolos envolvem o influxo de cálcio através de canais de cálcio dependentes de voltagem e a liberação deste íon proveniente de estoques intracelulares através de canais de cálcio sensíveis a essa variação de cálcio proveniente do meio externo. Desta forma, os resultados obtidos nestes experimentos apresentam uma resposta vasorelaxante da pirona obtida apenas com as duas maiores concentrações (10^{-4} e 10^{-3} M), e a sua capacidade de inibir a contração induzida por esses agentes contracturantes foi de magnitude similar nesses protocolos, demonstrando uma coerência na resposta desta substância sobre o envolvimento do influxo de cálcio e da liberação de cálcio induzida pelo mesmo nos receptores de RyR.

O aumento na concentração citoplasmática de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$), via liberação de cálcio pelos estoques intracelulares e/ou pela entrada de cálcio do espaço extracelular através de canais de cálcio, é o fator determinante para a contração do músculo liso (HARNETT; BIANCANI, 2003), pelo fato dele promover a fosforilação da cadeia leve de miosina, aceita como um importante mecanismo pelo qual a contratilidade do músculo é regulada (PFITZER, 2001). Porém, é bem estabelecido que a fosforilação da cadeia leve de miosina e a tensão pode ser estabelecida independente de mudanças na $[Ca^{2+}]_i$ (CARIO-TOUMANIANTZ et al., 2003).

Numerosos agonistas medeiam contrações no músculo liso não somente por produzirem aumento na concentração intracelular de cálcio, mas também por aumentarem a sensibilidade dos miofilamentos do músculo liso a esse íon (FUKATA et al., 2001).

A ativação de receptores acoplados a proteína G podem, em adição a liberação de cálcio pela via de sinalização do IP_3 , promover contração do músculo liso por aumento da sensibilidade ao cálcio sem alterações na $[Ca^{2+}]_i$ (SOMLYO; SOMLYO, 1998b).

Agonistas que se ligam a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) produzem contração por aumentarem a concentração de cálcio citosólica tal como por aumentar a sensibilidade ao cálcio pelo aparato contrátil. O mecanismo de sensibilização ao cálcio mediado por GPCRs ocorre através da inibição da miosina fosfatase, sendo este o mecanismo primário na sensibilização da maquinaria contrátil (SOMLYO e SOMLYO, 2000c), onde a Rho - GTPase, e seu alvo, Rho cinase, estão envolvidas neste mecanismo (UEHATA et al., 1997). A ativação da RhoA através de GPCRs está relacionada com uma variedade de processos regulatórios fisiológicos (VOGT et al., 2003).

Quando as células musculares são estimuladas por esses agonistas, a GDP-Rho é convertida para GTP-Rho através da ativação dos fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs), que estimulam a reação de troca de GTP-GDP (FUKATA et al., 2001). A ativação da via RhoA / Rho – cinase resultará na inibição da miosina fosfatase, constituindo esse mecanismo a base molecular para a sensibilização ao cálcio, que potencializará a fosforilação da miosina de cadeia leve e, conseqüentemente a contração muscular em uma dada concentração de cálcio (SAKURADA et al., 2001).

Diante destas informações, resolveu-se, então, investigar um possível envolvimento da pirona-198 no mecanismo de sensibilização do aparato contrátil, baseando-se nos resultados obtidos. Estes mostraram que a pirona apresenta um potente efeito vasorelaxante em anéis pré-contraídos com FEN e adicionalmente, um efeito extremamente significativo sobre a mobilização de cálcio pelos estoques intracelulares através dos receptores de IP_3 . Como a fenilefrina é um agonista que produz seu efeito a partir da interação com GPCRs e que atua na sensibilização do aparato contrátil e somado a melhor potência da pirona quando o agente contracturante foi a FEN, resolvemos então investigar o envolvimento desta pirona no mecanismo de sensibilização da maquinaria contrátil.

Sabendo-se então que a via de sensibilização do aparato contrátil através de GPCRs envolve a ativação da RhoA e conseqüente inativação da miosina fosfatase, fizemos uso do ortovanadato de sódio, conhecido por ser inibidor da miosina fosfatase, que tem como mecanismo de ação a estimulação da via da RhoA / Rho cinase. Ele atua na translocação da RhoA citosólica, aumentando a sua fração acoplada a membrana e então estimulando a sua ativação (MORI; TSUSHIMA, 2004). Esta ativação da via da RhoA resulta então na inibição da miosina fosfatase, sendo este o mecanismo pelo qual o ortovanadato induz contração em células musculares lisas (SHAH; SING, 2006).

Os resultados obtidos sobre o envolvimento da pirona em mecanismos de sensibilização ao cálcio a partir da utilização de ortovanadato de sódio demonstraram que concentrações isoladas de pirona-198 (10^{-4} e 10^{-3} M) atenuaram significativamente as contrações induzidas pelo adicionamento cumulativo de vanadato.

Sabendo que a ativação da RhoA primariamente contribui com a contração induzida por vanadato (MORI; TSUSHIMA, 2004), podemos então sugerir a partir desses resultados que o mecanismo de ação da pirona possivelmente envolve a via de sinalização da RhoA / Rho –cinase a partir de sua estimulação por GPCRs.

Finalmente, baseando-se na observação de que a pirona-198 apresentou envolvimento nos efetores *downstream* da ativação de GPCRs, fato observado nos resultados obtidos com IP_3 e vanadato, podemos então sugerir que a pirona-198 possua uma interação com a via de sinalização envolvida quando GPCRs são estimulados.

Assim, diante de todos esses resultados obtidos, uma forma de melhor visualizar as possíveis vias de interação da pirona-198 no mecanismo de contração do músculo liso é através de uma figura esquemática que indica os possíveis locais de atuação da pirona na célula muscular lisa (Fig. 7).

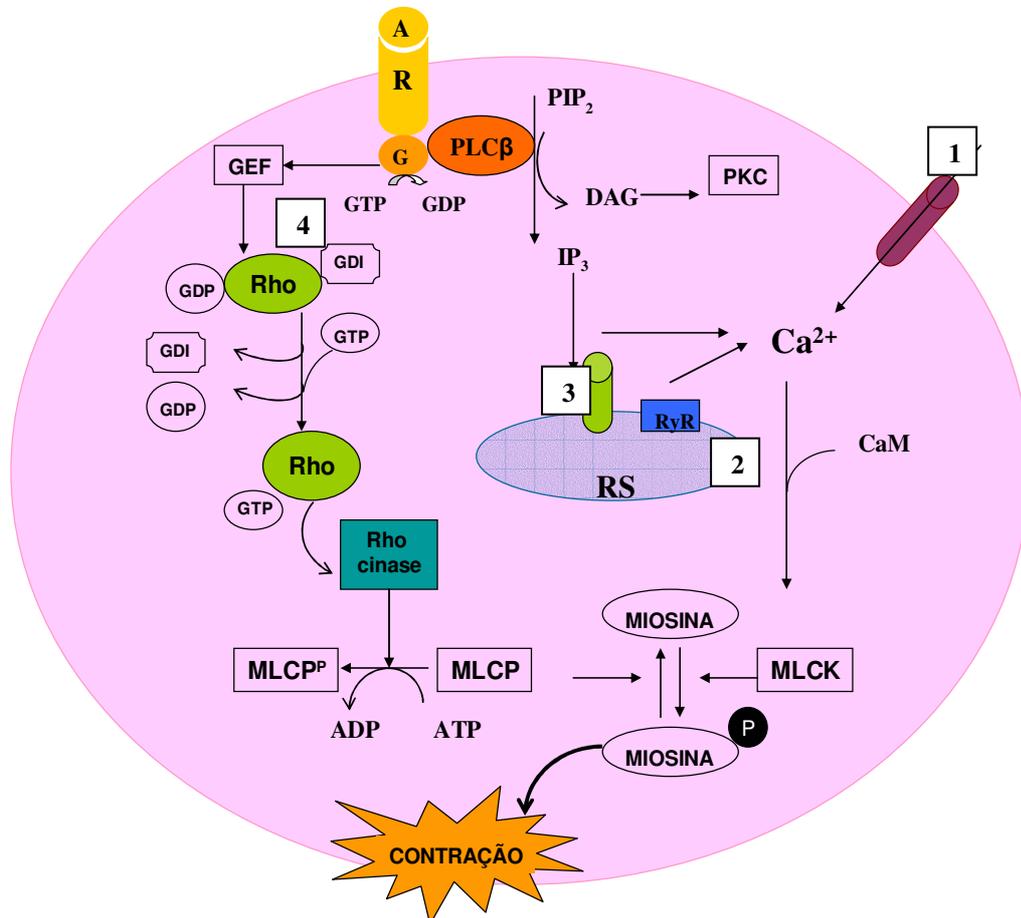


Figura 7: Mecanismos de contração do músculo liso vascular e possíveis vias de interação da pirona-198. Os mecanismos de ação sugeridos para pirona envolve a inibição do influxo de cálcio através de canais de cálcio dependentes de voltagem (1), atenuação da liberação de cálcio pelos receptores de rianodina (2), interação com a via de sinalização ativada por GPCRs, através da diminuição da liberação de cálcio produzida pelos receptores sensíveis a (IP_3) (3) e interação com a via da RhoA – Rho cinase (4). PIP_2 : fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; DAG: 1,2 – diaciglicerol; IP_3 : Inositol 1,4,5 – trifosfato; MLCP: miosina fosfatase da cadeia leve; MLCK: miosina cinase da cadeia leve de miosina; RS: retículo sarcoplasmático; PLC: fosfolipase C; PKC: proteína cinase C; GEF: fator de troca de guanina.

Conclusão

7 CONCLUSÕES

De acordo com o conjunto de resultados obtidos neste estudo conclui-se que:

1. A 6 – [(E) – ESTIRIL] – PIRAN – 2 - ONA (pirona-198) exerce efeito vasorelaxante independente do endotélio funcional sobre anéis de artéria mesentérica superior de rato.
2. Esse efeito parece ser decorrente da possível interação com a via de sinalização estimulada a partir da ativação de GPCRs, que envolve a liberação de cálcio pelos receptores sensíveis a IP_3 e interação com a via da RhoA – Rho – cinase.
3. Outro mecanismo de ação sugerido para a atividade vasorelaxante da pirona que se adiciona aos anteriores, é a atenuação do influxo transmembranar de cálcio através de canais de cálcio dependentes de voltagem, adicionado a atenuação da liberação de cálcio dos estoques intracelulares através receptores de rianodina.

Perspectivas

8 PERSPECTIVAS

Diante desses resultados faz-se necessária a continuação dos estudos com pirona-198, de forma que algumas perspectivas podem ser importantes, tais como:

- Caracterizar os efeitos da pirona-198 sobre a PA e FC em animais normotensos e hipertensos;
- Avaliar melhor a interação da pirona com a via da RhoA / Rho–cinase;
- Elucidar a participação da pirona na via de sinalização estimulada por GPCRs:
- Avaliar a possível participação da pirona em outras vias de sensibilização do aparato contrátil

Referências

REFERÊNCIAS

- ADEYEMI, O. O; OKPO, S. O; OGUNTI, O. O. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea Americana* Mill. **Fitoterapia**, v.73, p.375-380, 2002.
- AIRES, M.M. **Fisiologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- ALTURA, B.M; ALTURA, B.T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal Physiology**, v.219, p.1698-1705, 1970.
- AU, A.L.S; KWOK, C.C; LEE, A.T.C; KWAN, Y.W; LEE, M.M.S; ZHANG, R.Z; NGAI, S.M; LEE, S.M.Y; HEC, GW; FUNG, K.P. Activation of iberiotoxin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ channels of porcine isolated left anterior descending coronary artery by diosgenin. **European Journal of Pharmacology**, v.502, p. 123-133, 2004.
- BARBOSA-FILHO, J.M. **Constituintes químicos dos gêneros: *Aniba, Licaria e Nectandra* (LAURACEAE). Aspectos quimiotaxonômicos, analíticos, sintéticos e biológicos**. (Tese (Doutorado)). USP, São Paulo, 1986. 470p.
- BARROSO, G.M; GUIMARÃES, E.F; ICHASO, C.L.F; COSTA, C.G; PEIXOTO, A.L. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. 2 ed, v.1, Editora UFV, 2002.
- BATLOUNI, M; RAMIRES, J.A. Importância do endotélio na doença arterial coronária e na aterogênese. **Arq. Bras. Cardiol**, v.62, n.4, 1994.
- BELLONI, F.I. Teaching the principles of hemodynamics. **Advances in Physiology education**, v.22, n.1, 1999.
- BERNE, R.M; LEVY, M.N; KOEPPEN, B.M; STANTON, B.A. **Fisiologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- BERS, D.M. calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. **Circulation Research**, v.87, p.275-281, 2000.
- BROCHET, D.X.P; LANGTON, P.D. Dual effect of initial [K] on vascular tone in rat mesenteric arteries. **Plufgers Arch – European Journal Physiology**, 2006.
- BUUS, N.H; SIMONSEN, U; PILEGAARD, H.K; MULVANY, M.J. Intracellular smooth muscle [Ca²⁺] in acetylcholine and nitric oxide-mediated relaxation of human small arteries. **European Journal of Pharmacology**, v.535, p.243-247, 2006.
- CARIO-TOUMANIANTZ, C; REILLAUDOUX, G; SAUZEAU, V; HEUTTE, F; VAILLANT, N; FINET, M; CHARDIN, P; LOIRAND, G; PACAUD, P. Modulation of RhoA-Rho kinase-mediated Ca²⁺ sensitization of rabbit myometrium during pregnancy – role of Rnd3. **Journal Physiology**, v. 552, n.2, p. 403-413, 2003.

CHITALEY, K; WEBER, D.S; WEBB, C. RhoA / Rho - kinase, Vascular Changes, and Hypertension. **Current Hypertension Reports**, n.3, p.139-144, 2001.

CHRISTENSEN, K.L; MULVANY, M.J. Location of resistance arteries. **Journal of Vascular Research**, n.38, p. 1-12, 2001.

CLARK, S.G; FUCHS, L.C. Role of nitric oxide and Ca^{2+} - dependent K^+ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **Journal Pharmacology Experiments Therapeutics**, v.282, n.3, p. 1473-1479, 1997.

COX, R.H. Comparasion of K^+ channel prproperties in freshly isolated myocytes from thoracic aorta of WKY and SHR. **American Journal of Hypertension**, v.9, n.3, p. 884-894, 1996b.

COX, R.H. Changes in the espression and function of arterial potassium channels during hypertension. **Vascular Pharmacology**, v.38, p.13-23, 2002.

DIAS, K.L.G; DIAS, C.S; BARBOSA-FILHO, J.M; ALMEIDA, R.N; CORREIA, N.A; MEDEIROS, I.A. Cardiovascular effects induced by reticuline in normotensive rats. **Planta Médica**, v.70, p.1-6, 2004.

DI STASI, L.C; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**, Editora Unesp: São Paulo, 2002.

FILIPÉANU, C.M; BRAILOIU, E; HUHUREZ, G; SLATINEANU, S; BALTATU, O; BRANISTEANU, D.D. Multiple effects of tyrosine kinase inhibitors on vascular smooth muscle contraction. **European Journal of Pharmacology**, v.281, p.29-35, 1995.

FUKATA, Y; AMANO, M; KAIBUCHI, K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.22, n.1, 2001.

GALIANO, M; GASPARRE,G; LIPPE, C; CASSANO, G. Inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors mobilize calcium from a common functional pool in human U373 MG cells. **Cell Calcium**, v.36, p. 359-365, 2004.

GAZULLA, J; TINTORÉ, M. The P/Q-type voltage-dependent calcium channel as pharmacological target in spinocerebellar ataxia type 6: Gabapentin and pregabalin may be of therapeutic benefit. **Medical Hypotheses**, 2006.

GOTTLIEB, O.R. Químio-sistemática: um método para a busca de óleos essenciais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.44, p. 9-21, 1972a. Suplemento.

GOTTLIEB, O.R; BITTENCOURT, A.M; MORS, W.B; MAGALHÃES, M.T. 6-Esteril- α - pironas. (A química do gênero *Aniba*). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.36; p.29-30,1964b.

GRAYSON, T.H; HADDOCK, R.E; MURRAY, T.P; WOJCIKIEWICZ, R.J.H; HILL, C.E. Inositol 1,4,5-triphosphate receptor subtypes are differentially distributed between smooth muscle and endothelial layers of rat arteries. **Cell Calcium**, v.36, p.447-458, 2004.

HALL, J; JONES, T.H; CHANNER, K.S; JONES, R.D. Mechanisms of agonist-induced constriction in isolated human mesenteric arteries. **Vascular Pharmacology**, v.44, p. 427-433, 2006.

HARNETT, K.M; BIANCANI, P. Calcium-dependent and calcium-independent contractions in smooth muscles. **The American Journal of Medicine**, v.115, p. 24-30, 2003.

HISHINUMA, S; SAITO. M. Differential roles of ryanodine- and thapsigargin-sensitive intracellular Ca^{2+} stores in excitation-contraction coupling in smooth muscle of guinea-pig taenia caeci. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.33, p.1138-1143, 2006.

IBRAHIM, B; GUIET-BARA,A; BARA,M. Involvement of external potassium in membrane potential of smooth muscle cells of human allantochoorial placental vessels. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v.45, p.131-134, 1998.

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

JALIL, J; LAVANDERO,S; CHIONG,M; OCARANZA,M.P. Rho/Rho kinase signal transduction pathway in cardiovascular disease and cardiovascular remodeling. **Revist Esp.Cardiology**, v.58, n.8, p.951-961, 2005.

JEON, S.B; JIN, F; KIM, J.I; KIM, S.H; SUK, K; CHAE, S.C; JUN, J.E; PARK, W.H; KIM, I.K. A role for Rho kinase in vascular contraction evoked by sodium fluoride. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.343, p.27-33, 2006.

KATOUE, M.G; KHAN,I; ORIOWO, M.A. Pregnancy-induced modulation of calcium mobilization and down-regulation of Rho-kinase expression contribute to attenuated vasopressin-induced contraction of the rat aorta. **Vascular Pharmacology**, v.44, p. 170-176, 2006.

KHALIL, R.A. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction in Hypertension. **High Blood Pressure Council Newsletter**, v.2, n.1. Spring, 2001.

- KIM, S.H; HYUN, S.H; CHOUNG, S.Y. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p.119-123, 2006.
- KLAUSMEYER, P; CHMURNY, G.N; McCLOUD, T.G; TUCKER, K.D; SHOCMAKER, R.H. A novel antimicrobial indolizinium alkaloid from *Aniba panurensis*. **Journal of Natural Products**, v.67, p.1732-1735, 2004.
- KONG, L.D; CAI, Y; HUANG, W.W; CHENG, C.H.K; TAN, R.X. Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p.199-207, 2000.
- KUMAR, R; SINGH, V.P; BAKER, K.M. Kinase inhibitors for cardiovascular disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.42, p.1-11, 2007.
- KUREISHI, Y; KOBAYASHI, S; AMANO, M; KIMURA, K; KANAIDE, H; NAKANO, T; KAIBUCHI, K; ITO, M. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 19, p. 12257-12260, 1997.
- LAHLOU, S; MAGALHÃES, P.J.C; SIQUEIRA, R.J.B; FIGUEIREDO, A.F; INTERAMINENSE, L.F.L; MAIA, J.G.S; SOUSA, P.J.C. Cardiovascular effects of the essential oil of *Aniba canelilla* bark in normotensive rats. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v.46, n.4, p.412-421, 2005.
- LEDOUX, J; WERNER, M.E; BRAYDEN, J.E; NELSON, M.T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology**, v.21, p.69-79, 2006.
- LIMA, I.O.L; OLIVEIRA, R.A.G; LIMA, E.O; FARIAS, N.M.P; SOUZA, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Cândida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.2, p.197-201, 2006.
- LOIRAND, G; GUILLUY, C; PACAUD, P. Regulation of Rho proteins by phosphorylation in the cardiovascular system. **Trends Cardiovascular Medicine**, v.17, n.6, 2006.
- MA, J; PAN, Z. Retrograde activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**, v.33, p.375-384, 2003.
- MARQUES, C.A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v.8, n.1, p.195-206, 2001.
- McGEOWN, J.G. Interactions between inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and ryanodine receptors in smooth muscle: one store or two? **Cell Calcium**, v.35, p.613-619, 2004.

- MEISSNER, G. Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. **Cell Calcium**, v.35, p.621-628, 2004.
- MELO, C.T.V; MONTEIRO, AP; LEITE, C.P; ARAÚJO, F.L.O; LIMA, V.T.M; BARBOSA-FILHO, J.M; FRANÇA FONTELES, M.M; VASCONCELOSS.M.M; BARROS VIANA, G.S; SOUSA, F.C.F. Anxiolytic-like effects of (*O*- Methyl)-N- 2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biology Pharmacology Bull**, v.29, n.3, p.451-454, 2005.
- MISTRY, D.K; GARLAND, C.J. The influence of phenylephrine on outward potassium currents in single smooth muscle cells from the rabbit mesenteric artery. **General Pharmacology**, v.33, p.389-399, 1999.
- MORAIS, L.C.S.L; BARBOSA-FILHO, J.M; ALMEIDA, R.N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.62, p.57-61, 1998.
- MORI, M; TSUSHIMA, H. Vanadate activates RhoA translocation in association with contracting effects in ileal longitudinal smooth muscle of guinea pig. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.95, p. 443-451, 2004.
- MOTIDOME, M; GOTTLIEB, R.O; KUBITZKI, K. The chemistry of brazilian lauraceae. LXXI. Styrylpyrones of *Aniba panurensis* and *A. permollis*. **Acta Amazônica**, v.12, p.667-668, 1982.
- NOBE, K; PAUL, R.J. Distinct pathways of Ca²⁺ sensitization in porcine coronary artery: effects of rho-relates kinase and protein kinase C inhibition on force and intracellular Ca²⁺. **Circulation Research**, v. 88, p. 1283-1290, 2001.
- OLIVEIRA, A.P; FURTADO, F.F; SILVA, M.S; TAVARES, J.F; MAFRA, R.A; ARAÚJO, D.A.M; CRUZ, J.S; MEDEIROS, I.A. calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). **Vascular Pharmacology**, v.44, p.338-344, 2006.
- PATEL, S; JOSEPH, S.K; THOMAS, A.P. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. **Cell Calcium**, v.25, n.3, p. 247-264, 1999.
- PFITZER, G. Signal transduction in smooth muscle invited: Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. **Journal Appl. Physiology**, v.91, p.497-503, 2001.
- QUINET, A; ANDREATA, R.H.P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v.53, n.82, 2002.
- QUINET, A. Sinopse taxionômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.19, n.3. São Paulo, 2005.

- RASCADO, R.R; BENDHACKT, L.M. Activation of α_2 -adrenoceptors is necessary to induce nitric oxide release in isoprenaline-induced relaxation. **Vascular Pharmacology**, v. 42, p. 63–68, 2005.
- REZENDE, C.M.A da M; VON BÜLLON, M.V; GOTTLIEB, O.R; PINHO, S.L.V. Constituição e fotoquímica de esteril-pironas da *Aniba parviflora* (A química de lauráceas brasileiras, 16). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.43, p.121-122, 1971.
- ROHWER, J.G. The families and genera of vascular plants. v.2, p. 366-391, 1993.
- ROSSI, M.H; YOSHIDA, M; MAIS, J.G.S. Neolignans, styrylpyrones and flavonoids from *Aniba* species. **Phytochemistry**, v..45, n.6, p.1263-1269, 1997.
- SAKURADA, S; OKAMOTO, H; TAKUWA, N; SUGIMOTO, N; TAKUWA, Y. Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle. **American Journal Cell Physiology**, v. 281, p. 571-578, 2001.
- SALAMANCA, D.A; KHALIL, R.A. Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth function in hypertension. **Biochemical Pharmacology**, v.70, p. 1537-1547, 2005.
- SANTOS, M.M. **Análise da constituição química da madeira de *Aniba kappleri***. (Dissertação (Mestrado)). UFMG, Belo Horizonte, 1981. 94p.
- SAUZEAU, V; Le JEUNE, H; CARIO-TOUMANIANTZ, C; SMOLENSKI, A; LOHMANN, S.M; BERTOGLIO, J; CHARDIN, P; PACAUDI, P; LOIRAND, G. Cyclic GMP-dependente protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca^{2+} sensitization of contraction in vascular smooth muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.28, p.21722-21729, 2000.
- SAYYAH, M; VALIZADEH, J; KAMALINEJAD, M. Anticonvulsivant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole – and maximal electroshock-induced seizures. **Phytomedicine**, v.9, p.212-216, 2002.
- SEASHOLTZ, T; BROWN, J.H. Rho signaling in vascular diseases. **Molecular Interventions**, v.4, p. 349-354, 2004.
- SEI, Y; GALLAGHER, K.L; DALY, J.W. Multiple effects of caffeine on Ca^{2+} release and influx in human B lymphocytes. **Cell Calcium**, v. 29, n.3, p.149-160, 2001.
- SHAH, D.I; SINGH, M. Inhibition of protein tyrosine phosphatase improves vascular endothelial dysfunction. **Vascular Pharmacology**, v.44, p.177-182, 2006.
- SIDEROVSKI, D; WILLARD, F. The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. **International Journal of Biological Sciences**, v.1, p. 51-66, 2005.

SIEGEL, G. **Comprehensive Human Physiology**, v. 2. Berlin: Springer-Verlag, 1996.

SILVERTHORN, D.U. **Fisiologia Humana: uma abordagem integrada**. 2ª ed. São Paulo: Manole, 2003.

SOUSA, F.C. F; MELO, C.T.; V; LIMA, V.T.M; GUTIERREZ, S.J.C; PEREIRA, B.A; BARBOSA-FLIHO, J.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.F.; VIANA, G.S.B. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III form *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.78, p.27-33, 2004.

SOMLYO, A.P. *Nature*, v.389, p.908-911, 1997a.

SOMLYO, A.P; SOMLYO, A.V. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.164, n.4, p. 437-448, 1998b.

SOMLYO, A.P; SOMLYO, A.V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **Journal of Physiology**, v. 522, n.2, p. 177-185, 2000c.

STEVENSON, A.S; MATTHEW, J.D; ETO, M; LUO, S; SOMLYO, A.P; SOMLYO, A.V. Uncoupling of GPCR and RhoA-induced Ca^{2+} - sensitization of chicken amnion smooth muscle lacking CPI-17. **FEBS Letters**. v. 578, p. 73-79, 2004.

SUÁRÉZ, A.M.P. **Uma neoglinana biciclo [3.2.1] octânica e feniletidildihidropironas de duas espécies amazônicas do gênero *Aniba***. (Tese (Doutorado)). USP, São Paulo, 1973. 98p.

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

TEIXEIRA, C.E; WEBB, R.C. Targeting the vascular RhoA-Rho-kinase signaling pathway in hypertension. **Drug Discovery Today: therapeutic strategies**. v.2, n.3, 2005.

UEHATA, M; ISHIZAKI, T; SATOH, H; ONO, T; KAWAHARA, T; MORISHITA, T; TAMAKAWA, H; YAMAGAMI, K; INUI, J; MAEKAWA, M; NARUMIYA, S. calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature**. V.389, p. 990-994, 1997.

VENKATESWARLU, K; GIRALDI, A; ZHAO, W; WANG, HZ; MELMAN, A; SPEKTOR, M; CHRIST, G.J. Potassium channels and human corporeal smooth muscle cell tone: diabetes and relaxation of human corpus cavernosum smooth muscle by adenosine

triphosphate sensitive potassium channel openers. **The Journal of Urology**, v.168, p.355-361, 2002.

VIEIRA, I.C. G; SALOMÃO, R.P; ROSA, N.A. **O Renascimento da Floresta no rastro da agricultura**. Disponível em: http://www.bio2000.hpg.ig.com.br/artigo_05.htm. Acesso em 30 de agosto de 2006.

VOGT, S; GROSSE, R; SCHLTZ, G; OFFERMANN, S. Receptor-dependent RhoA activation in G₁₂/G₁₃ – deficient cells: genetic evidence for an involvement of G_q/G₁₁. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 31, p. 28743-28749, 2003.

VON BÜLOW, M.V. **Estudo químico da *Aniba gardineri* (Meissn) Mez.** (Tese (Doutorado)). UFRRJ, Rio de Janeiro, 1968. 108p.

YEON, DS; KIM, JS; AHN,DS; KWON, SC; KANG, BS; MORGAN, K.G; LEE, YH. Role of protein kinase C- or RhoA-induced Ca²⁺ sensitization in stretch-induced myogenic tone. **Cardiovascular Research**, v.53, p,431-438, 2002.

WANG, G.J; WUB, XC; LIN, YL; REN,J; SHUM, A.YC; WU, YY; CHEN, CF. Ca²⁺ channel blocking effect of iso-S-petasin in rat aortic smooth muscle cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 445, p.239– 245, 2002.

WEBB, R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, n.4, p.201-206, 2003.

ZHANG, Y; GAO, YJ; ZUO, J; LEE, R.M.K.W; JANSSEN, L.J. Alteration of arterial smooth muscle potassium channel composition and BK_{Ca} current modulation in hypertension. **European Journal of Pharmacology**, v.514, p.11-119, 2005.

ZHAO,Q; ZHAO,Y; WANG,K. Antinociceptive and free radical scavenging activities of alkaloids isolated from *Lindera angustifolia* Chen. **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, p.408-413, 2006.

ZHOU, Q; SATAKE, N; SHIBATA, S. The contractile mechanism of Sodium metavanadate in isolated rat aortae. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.30, n.1, p. 84-89, 1997.

ZOGHBI, M.G.B; ANDRADE, E.H.A; SANTOS, A.S; da SILVA,M.H.L; MAIS,J.G.S. Constituintes voláteis de espécies de Lauraceae com ocorrência na Floresta Nacional de Cuxianã – Melgaço – PA. Museu Paraense Emilio Goeldi; [s.d], 297.

