



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**OLÍVIA ALVES DA COSTA SOUSA NETA**

**Avaliação da participação dos canais para cálcio e potássio no mecanismo de ação do alcaloide isoquinolínico, 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (MTHP), em aorta isolada de ratos sem endotélio funcional**

**JOÃO PESSOA - PB**

**2016**

**OLIVIA ALVES DA COSTA SOUSA NETA**

**Avaliação da participação dos canais para cálcio e potássio no mecanismo de ação do alcaloide isoquinolínico, 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (MTHP), em aorta isolada de ratos sem endotélio funcional**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal da Paraíba como um dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos

**JOÃO PESSOA - PB**

**2016**

S725p Sousa Neta, Olívia Alves da Costa.  
Avaliação da participação dos canais para cálcio e potássio no mecanismo de ação do alcaloide isoquinolínico, 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (MTHP), em aorta isolada de ratos sem endotélio funcional / Olívia Alves da Costa Sousa Neta.- João Pessoa, 2016.  
62f. : il.  
Orientador: Rafael de Almeida Travassos  
Trabalho de Conclusão de Curso - TCC (Graduação) - UFPB/CB  
1. Biotecnologia. 2. MTHP. 3. Endotélio funcional - ausência. 4. Canais para potássio. 5. Canais para cálcio.

UFPB/BC

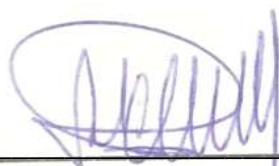
CDU: 60(043.2)

**OLIVIA ALVES DA COSTA SOUSA NETA**

**Avaliação da participação dos canais para cálcio e potássio no mecanismo de ação do alcaloide isoquinolínico, 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina (MTHP), em aorta isolada de ratos sem endotélio funcional**

Aprovada em: 18/11/2016

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos**  
(Universidade Federal da Paraíba)  
**Orientador**



---

**Prof. Me. Márcio Edivandro Pereira dos Santos**  
(Instituto Federal do Piauí - IFPI)  
**Examinador Externo**



---

**Prof. Dra. Maria do Socorro da França Falcão**  
(Universidade Federal da Paraíba)  
**Examinadora Interna**

**Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, em especial à dona Graça, e aos que, de alguma forma, sempre me estimularam e apoiaram a continuar na caminhada até aqui.**

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo reforço espiritual e graças derramadas, pois de nada adianta minha luta sem Ele.

Aos **meus pais**, pelo apoio moral e sentimental em dias difíceis desses quatro anos de graduação, pelo amor e confiança incondicionais depositados em mim desde a infância e pelo esforço que fizeram para que eu chegasse até aqui. Vocês são a maior motivação do meu prosseguir.

Ao querido professor, orientador e amigo, **Rafael de Almeida Travassos**, por ter aceitado o desafio de seguir me orientando na última etapa do curso; pela confiança em mim, pelos ensinamentos e incentivo, pelas conversas e paciência dentro e fora do laboratório. Desejo-te o que há de melhor na vida e não tenho dúvidas de que foi a escolha certa. Obrigada por ter me despertado o amor pela docência e apresentado a Farmacologia.

Aos companheiros do **Laboratório de Farmacobiotechnologia (FARMABIO)** pelo acompanhamento, diálogos tidos e amizade. Vocês fazem parte deste trabalho.

Ao professor **Valdir de Andrade Braga** por ceder o laboratório (LACONCHA) para realização dos experimentos.

Ao querido professor de graduação e orientador por dois anos na iniciação científica, **Enéas Ricardo de Moraes Gomes**. Passar todo esse tempo me ajudou profissionalmente e pessoalmente. Sempre lembrarei seus conselhos e visões quanto à sociedade acadêmica.

Ao maior exemplo de pessoa ética que já conheci e primeiro contato com o mundo universitário, **Lindomar José Pena**, ex-professor de graduação. Foram suas atitudes que mais influenciaram minha postura moral, ética, pessoal e profissional. A você, minha admiração sem tamanho.

Ao professor **Ian Porto Gurgel do Amaral**, pois foi em uma das suas aulas que descobri o amor e o potencial da biotecnologia. À professora **Sildivane Valcácia Silva**, pois foi com ela que tive reacendido o desejo de me dedicar cada vez mais. Ao professor **Jailson José Gomes da Rocha** pela ajuda nos empreendimentos e pelas risadas proporcionadas, deixando mais leve alguns momentos de desespero. À professora **Fabiola Cruz Nunes** pela compreensão e carinho desde o primeiro semestre de curso, não vou esquecer o que fez por mim quando eu tanto precisei.

Aos demais **Professores da Biotecnologia**, que exerceram seu papel com excelência, fizeram refletir social e academicamente e mudaram todo o conceito pré-estabelecido de professores universitários. Os defenderei sempre.

Às amigas de curso e irmãs da vida, **Palloma Farias, Elizanete Maciel, Arauana Lima e Ludmilla Christine**, pelo convívio diário, companheirismo de todas as manhãs e tardes, pelas horas de estudo em conjunto, pelo socorro nos momentos em que precisei de ajuda (emocional e fisicamente) e pela torcida que sei que é verdadeira. Vocês me deram suporte em vários aspectos que me ajudaram a continuar firme, sem desistir. Jamais esquecerei de vocês.

À **Atalia Flôr e Lucas Lima** pela ajuda para a conclusão deste trabalho; À **Aline Lima** por ceder um material para os experimentos finais, pelo carinho e amizade de sempre. Vocês foram imprescindíveis para que eu pudesse chegar ao fim.

À **Amanda Freire, Paloma Silva e Hyago Rique** por todas as vezes que se fizeram presentes quando necessitei de suporte emocional (de maneira singela ou não).

Ao **Rotaract Club João Pessoa Bancários**, em especial ao “VALE”, pela ajuda no meu crescimento pessoal, confiança, incentivo e amizade. Vocês mudaram minha história em João Pessoa.

Aos membros da banca, **Profa. Maria do Socorro da França Falcão** e **Prof. Márcio Edivandro Pereira dos Santos**, pela disponibilidade em contribuir com este trabalho.

À **Universidade Federal da Paraíba** por possibilitar minha formação profissional.

A todos que pontualmente não citei, mas que de maneira direta/indiretamente contribuíram com esta conquista.

***Gratidão por fazerem parte da minha sorte e destino.***



***“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.”***

**Martin Luther King**

## RESUMO

Os produtos naturais mostram-se como fonte proveitosa e interessante de inspiração para o desenvolvimento de novos medicamentos, sendo a síntese laboratorial bem elaborada e cuidadosa. Os alcaloides isoquinolínicos são compostos naturais ativos e que detêm grande capacidade terapêutica, nesta classe encontra-se o alcaloide isoquinolínico, 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina (MTHP), mas sendo este totalmente sintético. De acordo com alguns estudos prévios, foi demonstrado atividade relaxante do MTHP em artéria mesentérica de ratos normotensos por meio da via NO-GMP<sub>c</sub> e produtos das cicloxigenases, além disso, o composto induziu vasorelaxamento em aorta com endotélio funcional por modulação positiva de canais para K<sup>+</sup>, bloqueio de canais para Ca<sup>2+</sup> e por fatores relaxantes derivados do endotélio. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato na ausência de endotélio funcional. As contrações isométricas foram monitoradas e os parâmetros de potência e eficácia relativa foram determinados a partir de curvas concentrações-resposta cumulativas. O MTHP relaxou de maneira significativa e dependente de concentração os anéis aórticos pré contraídos com KCl a 80 mM com E<sub>máx</sub>=100% e sem redução da potência quando comparado à curva de relaxamento com anéis pré contraídos por FEN 3 x 10<sup>-7</sup> M. No entanto, na curva de relaxamento obtida pelo MTHP em anéis aórticos pré contraídos com S-(-)-Bay K8644 notou-se a redução da potência em 2,6 vezes quando comparada à curva de relaxamento obtida com anéis pré contraídos com FEN e 80 mM KCl, sugerindo a participação dos Ca<sub>v</sub>1. Já na análise feita para os canais para K<sup>+</sup>, foi possível observar que o MTHP relaxou significativamente e dependente de concentração na ausência e presença do bloqueador não seletivo desses canais, TEA<sup>+</sup> 5 mM, mas que teve sua potência reduzida 3,3 vezes quando comparada à curva sem o bloqueador, sugerindo a participação destes no mecanismo do MTHP. Na presença de cloreto de bário e glibenclamida, a potência relaxante do MTHP não foi alterada, descartando os K<sub>ir</sub> e K<sub>ATP</sub> no mecanismo de ação. No entanto, na presença de 1 mM de TEA<sup>+</sup>, de apamina e 4-AP, sua potência foi atenuada cerca de 4, 3,3 e 2,6 vezes, respectivamente, sugerindo a participação dos BK<sub>Ca</sub>, SK<sub>Ca</sub> e K<sub>v</sub> no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP. Todos esses eventos levam a uma redução da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> e consequente relaxamento do musculo liso vascular.

**Palavras-chave:** MTHP, ausência de endotélio funcional, canais para potássio, canais para cálcio.

## ABSTRACT

The natural products are essential for the development of new medicines, being a well elaborated and careful synthetic laboratory. The isoquinolinic alkaloids are active natural compounds with high therapeutic capacity, in this class the sintetic isoquinolinic alkaloid, 1-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl) -7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (MTHP), but this being totally synthetic. According to some previous studies, MTHP relaxing activity in the mesenteric artery of normotensive rats was demonstrated by means of the NO-cGMP pathway and cyclooxygenases products and also in the functional endothelium aorta by positive modulation of potassium channel and blocking of calcium channels and by endothelium-derived relaxing factors. Thus, the objective of this study was to evaluate the mechanism of vasorelaxant action of MTHP in rat-isolated aorta in the absence of functional endothelium. Isometric contractions were monitored and parameters of potency and relative efficacy were determined from cumulative concentration-response curves. The MTHP relaxed significantly and concentration-dependent aortic rings in the absence of functional endothelium pre-contracted with 80 mM KCl, the potency relaxing potency of MTHP not changed when compared to the relaxation curve with rings pre-contracted by  $3 \times 10^{-7}$  M PHE. However, in the relaxation curve obtained by the MTHP in a pre-contracted aortic rings with S(-)-Bay K8644, its potency was decreased about 2.6 times. In the analysis done for the potassium channels, MTHP significantly relaxed and concentration-dependent manner in the absence and presence of the non-selective blocker of these channels, TEA<sup>+</sup> 5 mM, the potency relaxing potency of MTHP was decreased about 3.3 times, suggesting the involvement of potassium channels on the vasorelaxant action mechanism. In the presence of barium chloride and glibenclamide, the relaxing potency of MTHP was not altered, discarding K<sub>ir</sub> and K<sub>ATP</sub> in the mechanism of action. However, in the presence of 1 mM TEA<sup>+</sup>, apamine and 4-AP, its potency was attenuated approximately 4.3, 2.6 and 2.6 times, respectively, suggesting the participation of BK<sub>Ca</sub>, SK<sub>Ca</sub> and K<sub>V</sub>, in the mechanism of action vasorelaxation of MTHP. All these events lead to a reduction of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and consequent relaxation of the vascular smooth muscle.

**Key-words:** MTHP, absence of functional endothelium, potassium channels, calcium channels.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Núcleos isoquinolínico (A), tetrahydroisoquinolínico (B) e tetrahydroisoquinolínico substituído (C) ..... 19
- Figura 2** - Reação de Pictet-Spengler - síntese do 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi 1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina (MTHP)..... 211
- Figura 3** - Efeito vasorelaxante (A) e valores de  $CE_{50}$  (B) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN (■) ou 80 mM de KCl (■), em aorta isolada de rato sem endotélio funcional ..... 34
- Figura 4** – Efeito vasorelaxante (A) e valores de  $CE_{50}$  (B) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN (■), 80 mM de KCl (■) ou  $3 \times 10^{-7}$  M de S-(-)-Bay K8644 (■), em aorta isolada de rato sem endotélio funcional ..... 36
- Figura 5** - Efeito vasorelaxante (A) e valores de  $CE_{50}$  (B) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 5 mM de TEA<sup>+</sup>, em aorta isolada de rato sem endotélio funcional..... 38
- Figura 6** - Efeito vasorelaxante (A) e valores de  $CE_{50}$  (B) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na ausência (■) e na presença de  $3 \times 10^{-5}$  M BaCl<sub>2</sub> (■), em aorta isolada de rato sem endotélio funcional ..... 40
- Figura 7** – Efeito vasorelaxante (A) e valores de  $CE_{50}$  (B) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na ausência (■) e na presença de  $10^{-5}$  M de glibenclamida (■), em aorta isolada de rato com endotélio funcional .. 41
- Figura 8** - Efeito vasorelaxante (A) e valores de  $CE_{50}$  (B) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 1 mM de TEA<sup>+</sup>, em aorta isolada de rato sem endotélio funcional..... 42

**Figura 9** - Efeito vasorelaxante (A) e valores de  $CE_{50}$  (B) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de  $5 \times 10^{-8}$  M de apamina, em aorta isolada de rato sem endotélio funcional ....43

**Figura 10** - Efeito vasorelaxante (A) e valores de  $CE_{50}$  (B) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 1 mM de 4-AP, em aorta isolada de rato sem endotélio funcional .....44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição da Solução de Krebs.....	28
<b>Tabela 2</b> - Solução de Krebs despolarizante com 80 mM de KCl.....	28
<b>Tabela 3</b> – Valores $CE_{50}$ (M) e $E_{max}$ (%) do MTHP na ausência (controle) e na presença de bloqueadores de canais para potássio em aorta de rato sem endotélio funcional.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACh</b>	acetilcolina
<b>[(Ca<sup>2+</sup>)<sub>4</sub>-CaM]</b>	Complexo cálcio-calmodulina
<b>4-AP</b>	4-aminopiridina
<b>AC</b>	Ciclase de adenilil
<b>AMP</b>	Monosfato cíclico de adenosina
<b>BK<sub>Ca</sub></b>	Canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>Ca<sub>v</sub></b>	Canais de cálcio dependentes de voltagem
<b>Ca<sub>v</sub>L</b>	Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L
<b>CE50</b>	Concentração de uma substância necessária para produzir 50% de seu efeito máximo
<b>CICR</b>	Liberação de cálcio induzida por cálcio
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração de uma substância necessária para inibir 50% do seu efeito máximo
<b>CG<sub>s</sub></b>	ciclase guanilil solúvel
<b>COX</b>	ciclo-oxigenase
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>EDRF</b>	fatores relaxantes dependentes do endotélio
<b>e.p.m</b>	erro padrão da média
<b>E<sub>max</sub></b>	efeito máximo
<b>Gi/o</b>	proteína G <sub>i</sub> ou proteína G <sub>o</sub>
<b>G<sub>q/11</sub></b>	proteína G <sub>q</sub> ou proteína G <sub>11</sub>
<b>G<sub>s</sub></b>	proteína G <sub>s</sub>
<b>IICR</b>	Liberação de cálcio induzida por IP <sub>3</sub>
<b>IP<sub>3</sub></b>	1,4,5-trisfosfato de inositol
<b>IP<sub>3</sub>R</b>	receptor de IP <sub>3</sub>
<b>K<sub>ATP</sub></b>	canais de potássio sensíveis ao ATP
<b>Kir</b>	canais de potássio retificadores de entrada
<b>K<sub>v</sub></b>	canais de potássio dependentes de voltagem
<b>MLC</b>	cadeia leve da miosina
<b>MLCK</b>	cinase da cadeia leve da miosina
<b>MTHP</b>	1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina

<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>NOS</b>	sintase do óxido nítrico
<b>PGI<sub>2</sub></b>	prostaglandina I <sub>2</sub>
<b>PKA</b>	proteína cinase dependente de AMPc
<b>PKG</b>	proteína cinase dependente de GMPc
<b>PLC</b>	fosfolipase C
<b>PMCA</b>	Ca <sup>2+</sup> -ATPase da membrana plasmática
<b>RyR</b>	receptor de rianodina
<b>RS</b>	retículo sarcoplasmático
<b>SK<sub>Ca</sub></b>	canais de potássio ativados por cálcio de pequena condutância
<b>TEA<sup>+</sup></b>	íon tetraetilamônio

**OBS:** as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções que seguem o Sistema Internacional de Unidades (S.I.).



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 Produtos naturais como embasamento para síntese orgânica de moléculas bioativas.....	17
1.2 Alcaloides isoquinolínicos .....	18
1.3 Contração, relaxamento e disfunção endotelial na musculatura lisa vascular.....	21
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
2.1 Gerais .....	26
2.2 Específicos .....	26
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>27</b>
3.1.1 Substância teste .....	27
3.1.2 Animais .....	27
3.1.3 Substâncias e reagentes .....	27
3.1.4 Soluções nutritivas.....	28
3.1.5 Equipamentos.....	29
<b>3.2 Métodos</b> .....	<b>29</b>
3.2.1 Preparação da substância estoque .....	29
3.2.2 Avaliação do efeito vasorelaxante do MTHP sobre os canais para $Ca^{2+}$ em aorta isolada de rato sem endotélio funcional.....	29
3.2.2.1 Efeito vasorelaxante do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 80 mM de KCl em aorta isolada de rato sem endotélio funcional .....	29
3.2.2.2 Efeito do MTHP nas contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644 em aorta isolada de rato sem endotélio funcional.....	30
3.2.3 Avaliação da participação dos canais para $K^+$ no mecanismo de ação vasorrelaxante do MTHP em aorta isolada de rato sem endotélio vascular .....	31
3.2.3.1 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina na ausência e na presença de TEA <sup>+</sup> .....	31
3.2.3.2 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio.....	31
<b>3.3 Análise Estatística</b> .....	<b>32</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>

<b>4.1 Avaliação do efeito vasorelaxante do MTHP sobre os canais para Ca<sup>2+</sup> em aorta isolada de rato sem endotélio funcional</b> .....	33
4.1.1 Efeito vasorelaxante do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 80 mM de KCl em aorta isolada de rato sem endotélio funcional .....	33
4.1.2 Efeito do MTHP nas contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644 em aorta isolada de rato sem endotélio funcional.....	35
<b>4.2 Avaliação da participação dos canais para K<sup>+</sup> no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato sem endotélio vascular</b> ....	37
4.2.1 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina na ausência e na presença de TEA <sup>+</sup> .....	37
4.2.2 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio.....	39
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	50
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	51
<b>ANEXO A – Certidão 0605/13 da Comissão de Ético no Uso de Animais da UFPB</b> .....	61
<b>ANEXO B – Certificado de dilatação de prazo da certidão 0605/13</b> .....	62

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Produtos naturais como embasamento para síntese orgânica de moléculas bioativas

O estudo intensivo sobre as plantas serviu para investigação dos seus produtos e suas atividades. Através dele teve-se também o desenvolvimento da química orgânica e, conseqüentemente, o advento da farmacologia, devido o isolamento dos metabólitos e descrição estrutural a partir das análises. Dos estudos iniciais foi possível estabelecer alguns princípios ativos que são utilizados de base até hoje, como, por exemplo, a morfina (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Com o aparecimento de antibióticos feitos a partir de fermentação microbiana (penicilina, em 1928, por Alexander Fleming) junto com a produção de medicamentos por via sintética pela indústria farmacêutica, proporcionados pelo desenvolvimento de tecnologias no século XX, houve o decaimento no interesse por uso de plantas medicinais e o conseqüente investimento em fármacos de origem vegetal (MONTANARI; BOLZANI, 2001; VIEGAS-JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Apesar da importância encontrada nos produtos naturais, a produção sintética de novos fármacos se consolidou devido a alguns fatores que limitam a utilização daqueles, como o alto custo que é empregado, a dificuldade, e o tempo para a obtenção, além ainda da pequena quantidade e a preocupação com questões ambientais (LAM, 2007).

No entanto, nos últimos anos o cenário vem sofrendo mudança ao proporcionar a fito-pesquisa, chamando atenção da indústria e, estimulando, assim, a fabricação de medicamentos. Novos avanços tecnológicos nesta área estão sendo desenvolvidos a fim de abordar as limitações encontradas e ajudar a pesquisa de produtos naturais (LAM, 2007).

De acordo com Calixto (2015), aproximadamente 30% de todas as drogas com cunho terapêutico existentes são produtos naturais ou derivadas deles e esse sucesso decorre de alguns fatores, como a heterogeneidade química, por exemplo, gerando alta diversidade de moléculas e, conseqüentemente, de produtos farmacológicos (FEHER; SCHMIDT, 2003).

No período de 1981 a 2010, foi feita uma análise a cerca dos medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA, constatando-se que, do total dessas drogas, 34% foram produtos naturais ou derivados (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Complementar a isto, a partir de outra pesquisa, neste mesmo tempo, apenas 36% de 1073 novas drogas não possuem embasamento natural (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Contudo, ao produzir medicamentos com traços naturais é preciso ter cuidado, uma vez que a natureza desenvolve com maestria os seus produtos e a mudança deles pode acarretar problemas. A preocupação da indústria farmacêutica com produtos *quirais*, por exemplo, intensificou-se depois dos graves efeitos devido o uso de drogas terapêuticas. A partir daí, deu-se início a “busca racional de drogas”, onde é feito um planejamento racional do fármaco (MONTANARI; BOLZANI, 2001). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a ANVISA, é o órgão máximo na verificação de fármacos.

Considerando a importância dos produtos naturais como base inspiradora no desenvolvimento de novos fármacos, podemos destacar a síntese laboratorial ajudando na criação de novas alternativas (STÖCKIGT et al., 2011). Esta prática é recorrente e eficaz na produção novos fármacos.

## 1.2 Alcaloides isoquinolínicos

Os alcaloides correspondem a uma classe de substâncias químicas (metabólitos secundários) com distribuição abundante na natureza, derivadas de diversos organismos, incluindo fungos, bactérias, plantas e outros, além de se apresentarem com estruturas variadas e importantes atividades farmacológicas (BHADRA, KUMAR 2011).

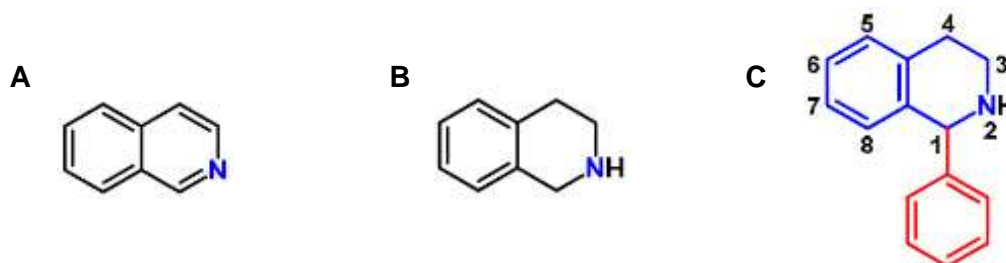
A origem do termo “alcaloide” é proveniente do árabe álcali que significa básico. O conceito para tal classe é de difícil estabelecimento, devido o grupo heterogêneo que a compõe. A definição mais aceita é a sugerida em 1983, por Pelletier, onde diz que “um alcaloide é um composto cíclico orgânico que contém nitrogênio no seu estado de oxidação negativo e de distribuição limitada em organismos vivos” (PELLETIER, 1983 apud ROBERTS; WINK, 1998).

Dentro deste meio de moléculas há subdivisões que classificam melhor determinados grupos pelo tipo de biossíntese que foi gerado, como os alcaloides

indólicos, provenientes do triptofano, alcaloides tropânicos provenientes da ornitina e os isoquinolínicos, provenientes da fenilalanina e tirosina (ROBERTS; WINK, 1998).

Os isoquinolínicos são os mais abrangentes no reino vegetal, onde compreendem cerca de 400 membros. Os anéis isoquinolínico, tetrahydroisoquinolínico e tetrahydroisoquinolínico 1-substituído são estruturas geralmente encontradas em uma variedade de produtos naturais e em compostos biologicamente ativos, respectivamente representados na Figura 1 (GRUNDON, 1976; AMAT et al., 2010; AWUAH; CAPRETTA, 2010).

**Figura 1** - Núcleos isoquinolínico (A), tetrahydroisoquinolínico (B) e tetrahydroisoquinolínico substituído (C)



**Fonte:** Cordeiro (2012).

O primeiro passo para a formação destes alcaloides é decorrente da rota do ácido chiquímico a partir de carboidratos, sendo este o responsável pela formação dos aminoácidos aromáticos L-fenilalanina e L-tirosina, precursores desta classe. Em sua maioria, são provenientes dos benzilisoquinolínicos, e a biossíntese desse esqueleto possui início na reação de condensação de duas unidades fenólicas, todas derivadas do L-tirosina, a dopamina e o 3,4-di-hidróxi-fenilacetaldeído (AMAT et al., 2010).

Seus efeitos têm ações antimalárica, antitumoral (QUINN; IRANSHAHI, 2014) e antimicrobiana (SHOKEEN et al., 2005), além de outros efeitos farmacológicos, como analgésicos (CORDELL et al., 2001), antidepressivos, anti-inflamatório (KUROKI; CHI; LIU, 2004; CHAEA et al., 2007; LUO et al., 2010), contra cólicas estomacais, intestinais e menstruais, relaxante muscular, anti-hipertensivo (CORDELL, 1983; DONG et al., 1992; CHUEH et al., 1995; SILVA et al., 2009) e mais uma variedade de ações biológicas.

Pontualmente, a berberina pode ser considerada um dos mais potentes alcaloides isoquinolínicos devido a suas diversas ações, dentre elas, tem-se efeitos

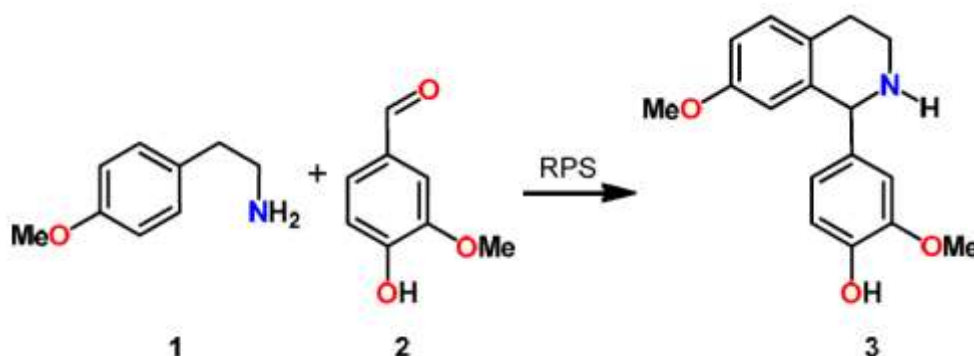
anti-inflamatórios pela inibição de prostaglandina ( $PGE_2$ ) e expressão de cicloxigenase 2 ( $COX_2$ ) *in vivo* e *in vitro* (KUROKI; CHEN; LIU, 2004), efeito hipotensor associado à diminuição de pressão sanguínea acompanhado de bradicardia (CHUN; YIP; LAU, 1979), hepatoproteção, por inibição de correntes de potássio e cálcio em hepatócitos (WANG et al., 2003; TSAI; TSAI, 2004), efeitos neuroprotetores contra danos isquêmicos em ratos (CUI et al., 2009), regulação dos níveis de colesterol (KONG et al., 2004), dentre outros. Alguns outros exemplos desta classe e suas determinadas funções são: YS-S1 e a norisoboldina, com atividade anti-inflamatória (CHAEA et al., 2007; LUO et al., 2010); a DL-tetrahidropalmatina e a discretamina, com efeito hipotensor (CHUEH et al., 1995; SILVA et al., 2009); a morfina como analgésico (STEIN et al., 1991) e glaucina, como antitussígeno e broncodilatadora (UJVÁRY, 2014).

Estando ciente das ações que estas moléculas exercem têm-se a comprovação da importância delas e um interesse significativo para o desenvolvimento de novas drogas (STÖCKIGT et al., 2011).

Especificamente, o 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (MTHP) é proveniente de obtenção sintética através da reação de Pictet-Spengler utilizando uma 4-metoxifeniletilamina (**1**) e uma vanilina (**2**), obtendo-se como produto final uma isoquinolina inédita, a substância teste do presente estudo (**3**) (Figura 2) (CORDEIRO, 2012).

Pelos ensaios biológicos feitos por Cordeiro e colaboradores (2012), têm-se efeitos comprovados de ações biológicas promovidas pelo MTHP. No sistema imunológico foi observada uma redução significativa na liberação de interleucinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6) e do TNF- $\alpha$  em camundongos com peritonite induzida por zimosan, indicando ação anti-inflamatória e em ratos normotensos não anestesiados, a atividade hipotensora foi observada e atribuída ao relaxamento pela via do NO/GMPc e produtos das cicloxigenases. Já Travassos (2015), ao estudar o mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato na presença de endotélio funcional, observou que isso acontecia por uma modulação positiva de canais para potássio, bloqueio de canais para cálcio dependentes de voltagem tipo L e pelo envolvimento de fatores relaxantes do endotélio, tais como a modulação positiva da sintase do óxido nítrico (NOS), da ciclase de guanilil solúvel (CGs) e de cicloxigenases (COXs).

**Figura 2** - Reação de Pictet-Spegler - síntese do 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MTHP).



Fonte: Cordeiro (2012).

### 1.3 Contração, relaxamento e disfunção endotelial na musculatura lisa vascular

O músculo liso está presente em basicamente todos os órgãos do corpo, podendo ser encontrado nos mais variados locais, desde o sistema reprodutor até as paredes dos tubos de vasos sanguíneos (WEBB, 2003). As atividades exercidas são controladas pelo Sistema Nervoso Autônomo (SNA) e influenciam comandos, como respiração, contratilidade uterina e controle da pressão arterial, por isso desbalanços nos mecanismos de contração e relaxamento estão envolvidos diretamente com patologias variadas (STOTT; JEPPE; GREENWOOD, 2014).

A contração acontece com o aumento da concentração de cálcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  e consequente interação da actina com a miosina. Esse íon pode ser proveniente de duas fontes: extracelular, pelo influxo de cálcio por canais dependentes de voltagem presentes na membrana plasmática, e intracelular, advinda dos estoques internos, principalmente, liberado pelo Retículo Sarcoplasmático (RS) (MA; PAN, 2003). Além desse fator, para acontecer esse evento no músculo liso é necessário que a cadeia leve da miosina seja fosforilada, diferentemente do que acontece no músculo esquelético, onde a actina é fosforilada (HOROWITZ et al., 1996; WEBB, 2003)

Majoritariamente, a principal entrada do cálcio vindo do meio externo são os canais para cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ) (CATTERALL, 2000). O influxo de cálcio no músculo liso visceral é controlado por potencial de membrana, uma vez

que este determina a abertura dos  $Ca_v$ . Os  $Ca_v1.2$  são os principais no músculo liso vascular (CATTERALL, 2011).

Neste músculo, o mecanismo de contração pode ser dividido em duas classes, tanto pelo acoplamento eletromecânico (despolarização da membrana) quanto pelo farmaco-mecânico, podendo ser independente dessa despolarização através de um agonista ligado ao receptor (SOMLYO, 1994; ZHU, et. a., 2007).

A contratilidade está associada com a interação dos receptores de membrana com uma proteína G, a Gq/11. Quando ligados, é capaz de ativar a fosfolipase C (PLC) promovendo hidrólise do 4,5-bifosfato de fosfatidil inositol ( $PIP_2$ ) em diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-trisfosfato de inositol ( $IP_3$ ). Este possui receptor no retículo sarcoplasmático (RS) o receptor de  $IP_3$  ( $IP_3R$ ) que, uma vez ligado, promove a liberação de cálcio induzida por  $IP_3$  (IICR) (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). Além disso, há receptores de rianodina (RyR) no RS que são ativados por cálcio e assim promovem liberação de cálcio induzida por cálcio (CICR) (SANDERS, 2001; McFADZEAN; GIBSON, 2002; McHALE et al., 2006).

Após a liberação desse íon dos estoques, o primeiro alvo será a Calmodulina (CaM), uma proteína ligante de  $Ca^{2+}$  no músculo liso. A associação é feita por quatro íons cálcio para cada CaM e isso gera uma mudança conformacional nesta proteína e conseqüente interação com a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). Esta associação resulta numa alteração conformacional no complexo [ $(Ca^{2+})_4$ -CaM-MLCK] expondo o sítio catalítico da MLCK. Todos estes eventos culminam na ativação da MLCK e a fosforilação do aminoácido Ser<sup>19</sup> da subunidade regulatória da cadeia leve da miosina de 20 kDa (MLC20). Esta última fosforilação é o fator determinante para a produção da força na musculatura lisa e permite a ligação da actina e miosina, resultando na contração (REMBOLD, 1996; OGUT; BROZOVICH, 2003).

Além do íon  $Ca^{2+}$ , que está envolvido em apoptose, proliferação celular e outras atividades biológicas, o íon de potássio ( $K^+$ ) é participante do mecanismo descrito, uma vez que está diretamente ligado com a modulação do potencial de ação da membrana e isso tem resposta direta nos canais para cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ). Dessa maneira, a contração é dependente do balanço entre o aumento da condutância ao íon  $K^+$ , levando à hiperpolarização, e a diminuição da mesma, levando à despolarização da membrana e conseqüente fechamento ou



abertura dos  $Ca_v$ , respectivamente (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996; CARAFOLI, 2002).

No músculo liso vascular, os canais para  $K^+$  que fazem regulação são vários, entre eles estão os abertos por voltagem ( $K_v$ ), retificadores de entrada ( $K_{ir}$ ), sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) e os sensíveis ao cálcio de baixa condutância ( $SK_{Ca}$ ) e de grande condutância ( $BK_{Ca}$ ), sendo este último o principal responsável pela repolarização ou hiperpolarização do miócito (THORNELOE; NELSON, 2005; LEDOUX et al., 2006; STOTT; JEPPE; GREENWOOD, 2014).

Já o relaxamento pode acontecer tanto pelo cessar de uma substância quanto pela ação dela acometendo a inibição do estímulo contrátil. Em ambos os casos necessariamente há a redução dos níveis intracelulares de cálcio (WEBB, 2003). Além disso, outro fator que também interfere na modulação desta resposta e que tem grande importância é o endotélio, produzindo os chamados fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF) na musculatura lisa vascular e modulando o tônus vascular (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; FURCHGOTT, 1983; MONCADA; HIGGS, 1993). Porém, podemos dizer que fármacos que modulam a atividade dos canais para cálcio e para potássio consistem em um mecanismo de vaso relaxamento independente do endotélio.

Um dos mais comentados EDRF é o Óxido Nítrico (NO). Sua produção acontece a partir da oxidação da L-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS). Há três isoformas da NOS, a endotelial (e)NOS, neuronal (nNOS) e induzível (iNOS), sendo a eNOS a principal presente no endotélio (MONCADA; HIGGS, 1993). Como o NO é lipossolúvel, difunde-se do endotélio para a musculatura ativando a ciclase guanilil solúvel (CGs) citoplasmática, que metaboliza trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (FURCHGOTT, 1983). O aumento deste mensageiro leva ao aumento da atividade da proteína cinase G (PKG), auxiliando no relaxamento do músculo liso vascular.

Outros EDRF's são constitutivamente produzidos, como os eicosanoides que, ao se ligarem em seus receptores acoplados à proteína  $G_s$  no músculo liso vascular, ativam a adenilil cicase (AC) e convertem ATP em monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Os níveis aumentados de AMPc resultam na ativação da proteína cinase A (PKA), auxiliando também no relaxamento vascular (TRIGGLE; DING, 2011).

Desbalanços na regulação promovida pelo endotélio, conseqüentemente, podem desenvolver um complexo de patologias relacionadas ao sistema

cardiovascular, como, por exemplo, doença da artéria coronária, diabetes, entre outras (RAJENDRAN et. al, 2013). De acordo com Lerman e Burnett (1992), a disfunção endotelial é caracterizada pela redução da viabilidade dos vasodilatadores fisiológicos e/ou o aumento de moléculas constrictoras, ambas provindas do endotélio (*apud* HADI; CARR; AL SUWAIDI, 2005). Adicionalmente, Rajendran e colaboradores (2013) definiram que a disfunção endotelial é caracterizada pela mudança nas ações do endotélio em direção à vasodilatação reduzida, um estado pró-inflamatório e propriedades pró-trombóticas.

A primeira correlação entre esse problema e os riscos/doenças cardiovasculares foi feita em 2003 a partir de estudos envolvendo a circulação coronária humana. Com os dados em mãos foi possível concluir que a disfunção endotelial prediz, sim, risco cardiovascular a longo prazo e tem papel importante quanto à aterosclerose, no entanto, a presença de camada endotelial não é substituta para redução do risco, visto que outros fatores também podem acarretá-lo (QUYYUMI, 2003; QUYYUMI; PATEL, 2010; RAJENDRAN et. al, 2013).

A partir dos diferentes fatores que levam à disfunção endotelial foi possível o desenvolvimento de uma classificação, realizada por Evora e colaboradores (2000), abrangendo desde causas genéticas até estilos de vida, como, por exemplo, sedentarismo e tabagismo, e ajudando a melhor compreensão do distúrbio. Porém, independentemente da causa primária, quando o quadro de alguma patologia é decorrente do mau funcionamento endotelial, há consigo a procura e o surgimento de alternativas com o intuito de amenizar essa alteração na homeostase ou tentar suprir a falta de funções normais do organismo.

Algumas dessas alternativas já são estudadas e descritas na literatura sendo associadas com diferentes doenças e causas primárias que levaram ao desenvolvimento das mesmas. A melhoria na produção de NO a partir de diferentes estimuladores é uma das abordagens mais discutidas, como, por exemplo, a suplementação com L-arginina para pacientes com diabetes (PIEPER; PELTIER, 1995) ou idade avançada (CHAUHAN et al., 1996; BODE-BOGER et. al., 2003) relacionadas com a disfunção endotelial (CATRAVAS; YETICK-ANACAK, 2006).

A partir de buscas relacionadas à disfunção endotelial foi possível notar a existência de sua relação com o desenvolvimento da hipertensão arterial (TADDEI, S. et. al., 2001; THUILLEZ, C.; RICHARD, V., 2005 e QUYYUMI; PATEL, 2010). A hipertensão se mostra como uma das principais causas de mortalidade, sendo o

maior fator de risco de doenças cardiovasculares e infarto, de acordo com dados do estudo da American Heart Association, Heart Disease and Stroke Statistics (2015) durante o período de 2001 a 2011. Ademais, neste mesmo estudo também foi constatado que a taxa de morte por hipertensão aumentou cerca de 13%.

A pressão alta é caracterizada pela alteração crônica no produto do débito cardíaco e resistência vascular periférica total, ou seja, dependente, por conseguinte, da modulação do tônus vascular (SANJULIANI, 2002). Dessa maneira, já sabendo que a hipertensão é bem corriqueira em quadros de disfunção endotelial e que artéria aorta, foco do trabalho, é um dos principais contribuintes para o balanço do tônus vascular, dependente especialmente do endotélio para o vasorelaxamento, se faz lógica a afirmativa de que qualquer perturbação prolongada na camada edotelial dessa artéria seja possível promover a doença citada. Além disso, a manipulação de aorta de ratos é mais simples para estudar a função vascular, se mostrando como alternativa barata e rápida para a investigação. (LOWE, H. C.; JAMES, B.; KHACHIGIAN, L. M., 2005; OYAMADA, S. et. al., 2011, apud RAMESHRAD, et. al. 2016).

Ainda não se sabe com plena certeza se essa instabilidade é a causa ou um efeito proveniente da hipertensão, porém é constatado tal associação e o comprometimento da saúde do paciente (DHARMASHANKAR; WIDLANSKY, 2010; VITA, et. al., 1990; PANZA, et. al., 1993).

Diante dessa premissa, o desafio, portanto, é a procura de novos fármacos e novos locais de ação que produzam real impacto na saúde de quem lida com tais patologias, logo, a justificativa para se estudar o MTHP em aorta isolada de rato sem endotélio funcional parte do principio da tentativa de mostrar uma alternativa para obtenção de uma nova droga que possa ser usada na terapêutica no futuro ou sirva de ferramenta farmacológica para ajudar a compreender melhor os mecanismos envolvidos na regulação da contração e do relaxamento da musculatura lisa vascular.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Gerais

Investigar a participação dos canais para cálcio e potássio no mecanismo de ação do alcaloide isoquinolínico 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (MTHP) em aorta isolada de rato sem endotélio vascular funcional.

### 2.2 Específicos

Elucidar a participação de canais iônicos no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta de rato sem endotélio funcional avaliando:

- a) O envolvimento dos canais para cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_V$ );
- b) A participação dos canais para potássio e seus subtipos:
  - Canais para potássio retificadores de entrada ( $K_{ir}$ ),
  - Canais para potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ),
  - Canais para potássio sensíveis de grande condutância ao cálcio ( $BK_{Ca}$ ),
  - Canais para potássio sensíveis de pequena condutância ao cálcio ( $SK_{Ca}$ ),
  - Canais para potássio dependente de voltagem ( $K_V$ ).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Substância teste

O alcaloide isoquinolínico 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina (MHTP), foi cedido pelo Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues, do Departamento de Biotecnologia do Centro de Biotecnologia da UFPB.

##### 3.1.2 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* pesando entre 250 e 350 g, provenientes do Biotério “Prof. Thomas George” localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos – IPeFarM/UFPB.

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob controle alimentar à base de ração tipo *pellets* (Purina) com acesso à água *ad libitum*, com ventilação e temperatura ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) controladas e constantes. Todos os procedimentos para os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB (CEUA/UFPB), certidão é 0605/13 (Anexo A e B).

##### 3.1.3 Substâncias e reagentes

O cloridrato de L(-)-fenilefrina (FEN); cloridrato de acetilcolina (ACh); 4-aminopiridina (4-AP); cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2$ ); cloreto de tetraetilamônio ( $\text{TEA}^+$ ); apamina; cloridrato de glibenclamida foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

O S-(-)-1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-3-ácido piridinecarboxílico (BAY K8644) foi obtido da Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, Molecular Probes<sup>®</sup> (EUA).

A glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), o fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), o cloreto de sódio (NaCl), o sulfato de magnésio hepta-hidratado ( $\text{MgSO}_4$ ), o cloreto de cálcio di-hidratado ( $\text{CaCl}_2$ ), o bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e o cloreto de potássio (KCl)

foram obtidos da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) foi obtida da White Martins (Brasil).

A glibenclamida foi dissolvida com DMSO e o S-(-)-Bay K8644 foi dissolvido em etanol absoluto. As demais soluções estoques foram dissolvidas em água destilada. As concentrações utilizadas de DMSO e etanol absoluto nas soluções não apresentaram qualquer efeito sobre as preparações controle (dados não demonstrados).

#### 3.1.4 Soluções nutritivas

Nos experimentos eram utilizadas soluções nutritivas aeradas com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>). O pH era ajustado para valores entre 7,2 e 7,4 com solução de HCl ou NaOH (1M) e mantidas à temperatura constante de 37 ± 1°C. As composições estão descritas nas tabelas abaixo:

**Tabela 1** - Composição da Solução de Krebs

<b>Composição</b>	<b>Concentração (mM)</b>
NaCl	118,0
KCl	4,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,1
MgSO <sub>4</sub>	5,7
CaCl <sub>2</sub>	2,5
NaHCO <sub>3</sub>	25,0
Glicose	11,0

**Tabela 2** - Solução de Krebs despolarizante com 80 mM de KCl

<b>Composição</b>	<b>Concentração (mM)</b>
NaCl	42,6
KCl	80,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,1
MgSO <sub>4</sub>	5,7
CaCl <sub>2</sub>	2,5
NaHCO <sub>3</sub>	25,0
Glicose	11,0

### 3.1.5 Equipamentos

Para o registro das contrações isométricas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (10 mL) e conectados a transdutores de força isométricos modelo TRI201AD Panlab (Cornellà, BCN, Espanha) acoplados a um amplificador Quad Bridge modelo Powerlab 4/35 ADInstruments. Este, por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição de dados com o software LabChart® 7 Pro versão 7.3.1 para aquisição e análise dos dados. O sistema continha uma bomba termostática modelo LE 13206 Panlab Harvard Apparatus, que controlava a temperatura das cubas.

Os valores de pH foram aferidos através de um pHmetro digital modelo PG2000 GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil). As substâncias foram pesadas em balança analítica modelo FA-2104N CETALC (São Paulo, SP, Brasil) e os animais em balança semianalítica GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil).

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Preparação da substância estoque

Para a obtenção e uso do alcaloide isoquinolínico MHTP, este foi dissolvido em dimetilsufóxido (DMSO), formando uma solução de concentração de  $10^{-1}$  M (solução estoque) e estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sendo diluída em água destilada de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. A concentração final de DMSO nas cubas não ultrapassou 1% (v/v) e nessa concentração não possui efeito relaxante significativo em aorta isolada de rato (dados não mostrados).

### 3.2.2 Avaliação do efeito vasorelaxante do MHTP sobre os canais para $\text{Ca}^{2+}$ em aorta isolada de rato sem endotélio funcional

#### 3.2.2.1 Efeito vasorelaxante do MHTP sobre as contrações tônicas induzidas por 80 mM de KCl em aorta isolada de rato sem endotélio funcional

Os ratos eram eutanasiados por guilhotina, seguindo as diretrizes estabelecidas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

(CONCEA), e a aorta, dissecada. Em seguida, eram obtidos os anéis aórticos de 2 a 4 mm livres de tecido conjuntivo e adiposo a partir da aorta torácica. Como o trabalho requer a ausência de camada endotelial, esta era removida de maneira mecânica a partir do contato da parede interna com as hastes metálicas.

Para a medição e avaliação das respostas isométricas, estes anéis eram suspensos por hastes em cubas individuais de vidro (10 mL) para banho isolado de órgãos contendo solução de Krebs normal a 37° C, aerada com carbogênio (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>), onde permaneciam por um período de uma hora de estabilização, sob tensão de repouso de 1g e renovação da solução nutritiva a cada 15 min para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA, ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização, era induzida uma contração com fenilefrina (FEN) em uma concentração de  $3 \times 10^{-7}$  M. A presença de camada endotelial era verificada pela adição de acetilcolina (ACh) na concentração de  $10^{-6}$  M durante a resposta de fase tônica da contração induzida por FEN. O endotélio vascular era considerado ausente quando não houvesse relaxamento ou este fosse inferior a 10%. (AJAYA; GILANI; MUSTAFAA, 2003). Todos os protocolos experimentais foram realizados na ausência de endotélio funcional.

Após 30 minutos decorridos da primeira contração, uma segunda resposta contrátil era induzida por soluções de Krebs despolarizantes com 80 mM de KCl (SORDI et al., 2011). Após a formação do componente tônico da contração o MTHP ( $10^{-8}$  a  $10^{-3}$  M) era adicionado cumulativamente a cuba. O relaxamento foi expresso como a porcentagem reversa da contração inicial induzida por 80 mM de KCl. O relaxamento foi obtido como descrito anteriormente e a potência relaxante da substância era avaliada comparando-se os valores de CE<sub>50</sub>.

### 3.2.2.2 Efeito do MTHP nas contrações tônicas induzidas por S(-)-Bay K8644 em aorta isolada de rato sem endotélio funcional

Após o período de estabilização, os anéis aórticos, sem endotélio funcional, eram obtidos e montados como descrito no item 3.2.2.1. Após 30 minutos decorridos da primeira contração induzida por FEN a aorta era parcialmente despolarizada pela adição de 10 mM de KCl (por 10 minutos), concentração capaz de potencializar o efeito de ativadores de canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca<sub>v</sub>) (ZHENG et al., 1991). Em seguida, uma contração era induzida pela adição de  $3 \times 10^{-7}$  M de



S-(-)-Bay K8644, um ativador dos  $Ca_v1.2$  por se ligar em sua subunidade  $\alpha 1$  (FERRANTE et al., 1989). Após a formação do componente tônico da contração era adicionado cumulativamente a cuba concentrações crescentes do MTHP ( $10^{-8}$  a  $10^{-3}$  M). O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo S-(-)-Bay K8644.

### **3.2.3 Avaliação da participação dos canais para $K^+$ no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato sem endotélio vascular**

#### **3.2.3.1 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina na ausência e na presença de $TEA^+$**

Após o período de estabilização, os anéis aórticos, sem endotélio funcional, eram obtidos e montados como descrito no item 3.2.2.1. Depois da constatação de ausência do endotélio, eram feitas três lavagens para que as substâncias aplicadas não interferissem no processo e, após isso, os anéis eram incubados com 5 mM de  $TEA^+$  por 10 minutos. Nessa concentração,  $TEA^+$  é um bloqueador não seletivo dos canais para potássio (NIU et al., 2008).

Depois de transcorrido o tempo necessário para o bloqueio de todos os tipos de canais para potássio era induzida uma nova contração com  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN e com a formação do componente tônico era adicionado o MTHP de forma cumulativa ( $10^{-8}$  a  $10^{-3}$  M). O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pela FEN, tendo o relaxamento máximo quando a tensão registrada era reduzida aos níveis basais.

#### **3.2.3.2 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio**

Após o período de estabilização, os anéis aórticos, sem endotélio funcional, eram obtidos e montados como descrito no item 3.2.2.1. Antes da obtenção da segunda contração induzida por FEN, os anéis eram incubados, em experimentos distintos, com  $TEA^+$  1 mM por 30 minutos, que nessa concentração é um bloqueador seletivo dos  $BK_{Ca}$  (NEVALA et al., 2001), apamina ( $5 \times 10^{-8}$  M por 30 minutos), um

bloqueador seletivo dos  $SK_{Ca}$  (ISHIDA et al., 1999), glibenclamida ( $10^{-5}$  M por 30 minutos), um bloqueador seletivo dos canais  $K_{ATP}$  (ERSOY et al., 2008), 4-Aminopiridina (1 mM por 15 min), bloqueado seletivo dos  $K_v$  e  $BaCl_2$  ( $3 \times 10^{-5}$  M por 30 min), bloqueador seletivo dos  $K_{ir}$ .

Após os tempos necessários para o bloqueio de cada subtipo de canal para potássio era induzida uma contração com  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN e após a formação do componente tônico dessa contração era adicionado o MTHP ( $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  M) de forma cumulativa. O relaxamento produzido pelo MTHP foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista.

### 3.3 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como a média  $\pm$  o e.p.m. e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” de *Student* não pareado, onde valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

As curvas concentração-resposta do MTHP foram ajustadas por uma regressão não-linear descrita pela equação:

$$Y = \min + (\max - \min) / (1 + 10^{((\text{Log}(\text{CE}_{50} - X) * S)})$$

Onde “X” é o logaritmo na base 10 da concentração molar da substância testada, “Y” é a resposta relaxante da substância testada em percentagem, “min” é o menor efeito assumido para “Y”, “max” é o maior efeito assumido para “Y” e “S” é o valor da constante de Hill (MOTULSKY; CHRISTOPOULOS, 2003).

A partir dessa equação, foram calculados os valores de  $CE_{50}$  (concentração molar de uma substância em que ela é capaz de causar 50% de seu efeito máximo), servindo como parâmetro de potência relativa de uma substância, e o  $E_{\max}$  (valor médio, em percentagem, do efeito máximo obtido por uma substância em relação ao maior valor possível num dado tecido), servindo como parâmetro de eficácia relativa entre duas substâncias (NEUBIG et al., 2003).

## 4 RESULTADOS

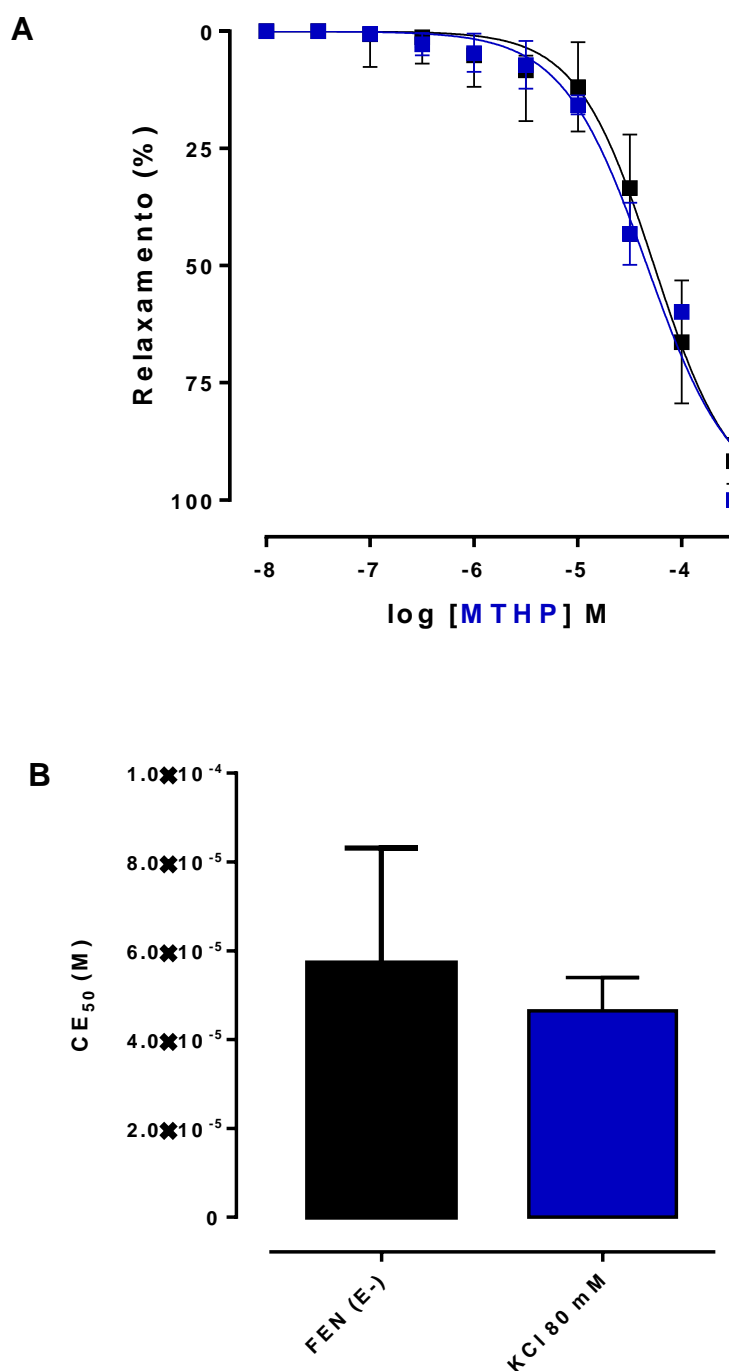
### 4.1 Avaliação do efeito vasorelaxante do MTHP sobre os canais para $\text{Ca}^{2+}$ em aorta isolada de rato sem endotélio funcional

#### 4.1.1 Efeito vasorelaxante do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por 80 mM de KCl em aorta isolada de rato sem endotélio funcional

O MTHP (de  $10^{-8}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M), adicionado de maneira cumulativa a cuba, relaxou os anéis de aorta de rato sem endotélio pré-contraídos com elevadas concentrações de KCl (80 mM) ( $\text{CE}_{50} = 4,6 \pm 0,7 \times 10^{-5}$  M,  $n = 3$ ), com eficácia máxima ( $E_{\text{max}}$ ) de 100%.

A potência relaxante do MTHP em anéis aórticos sem endotélio funcional ( $\text{CE}_{50} = 5,7 \pm 1,1 \times 10^{-5}$  M,  $n = 5$ ) não foi alterada quando o órgão era pré-contraído com  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN, como podemos observar pelos valores de  $\text{CE}_{50}$  que não apresentam diferença significativa entre si (Figura 3, A e B).

**Figura 3** - Efeito vasorelaxante **(A)** e valores de  $CE_{50}$  **(B)** do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN (■) ou 80 mM de KCl (■), em aorta isolada de rato sem endotélio funcional



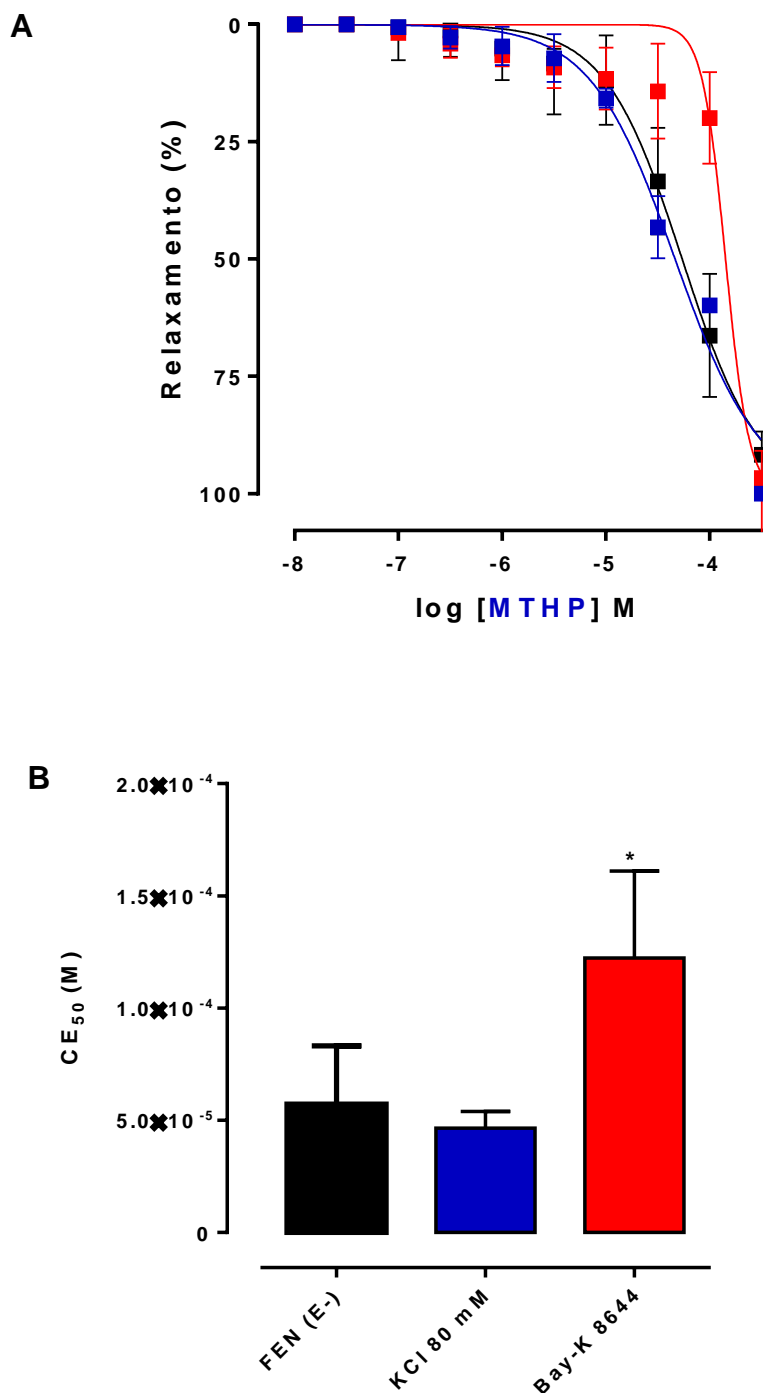
Os símbolos e as barras verticais **(A)** e as colunas e as barras verticais **(B)** representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t*, não pareado, (FEN (E-) vs. 80 mM KCl,).

#### 4.1.2 Efeito do MTHP nas contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644 em aorta isolada de rato sem endotélio funcional

O MTHP ( $10^{-8}$  a  $10^{-3}$  M,  $n = 3$ ) relaxou de maneira significativa e dependente de concentração a aorta isolada de rato sem endotélio funcional pré-contraída com  $3 \times 10^{-8}$  M de S-(-)-Bay K8644 ( $CE_{50} = 1,2 \pm 0,2 \times 10^{-4}$  M), um ativador dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 1 ( $Ca_v1$ ), com eficácia máxima ( $E_{max}$ ) de  $96,8 \pm 3,2\%$ .

A potência relaxante do MTHP foi reduzida cerca de 2,6 vezes ( $p < 0,0277$ ) quando comparada ao relaxamento induzido pelo alcaloide quando a aorta era pré-contraída com FEN ( $CE_{50} = 5,7 \pm 1,1 \times 10^{-5}$  M,  $n = 5$ ) e por elevadas concentrações (80 mM) de KCl ( $CE_{50} = 4,6 \pm 0,7 \times 10^{-5}$  M,  $n = 3$ ) na ausência de endotélio funcional (Figura 4, A e B).

**Figura 4** – Efeito vasorelaxante (A) e valores de  $CE_{50}$  (B) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN (■), 80 mM de KCl (■) ou  $3 \times 10^{-7}$  M de S-(-)-Bay K8644 (■), em aorta isolada de rato sem endotélio funcional



Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t*, não pareado, \*  $p < 0,0277$  (FEN (E-), 80 mM KCl vs. S-(-)-Bay K8644),  $n = 5$ .

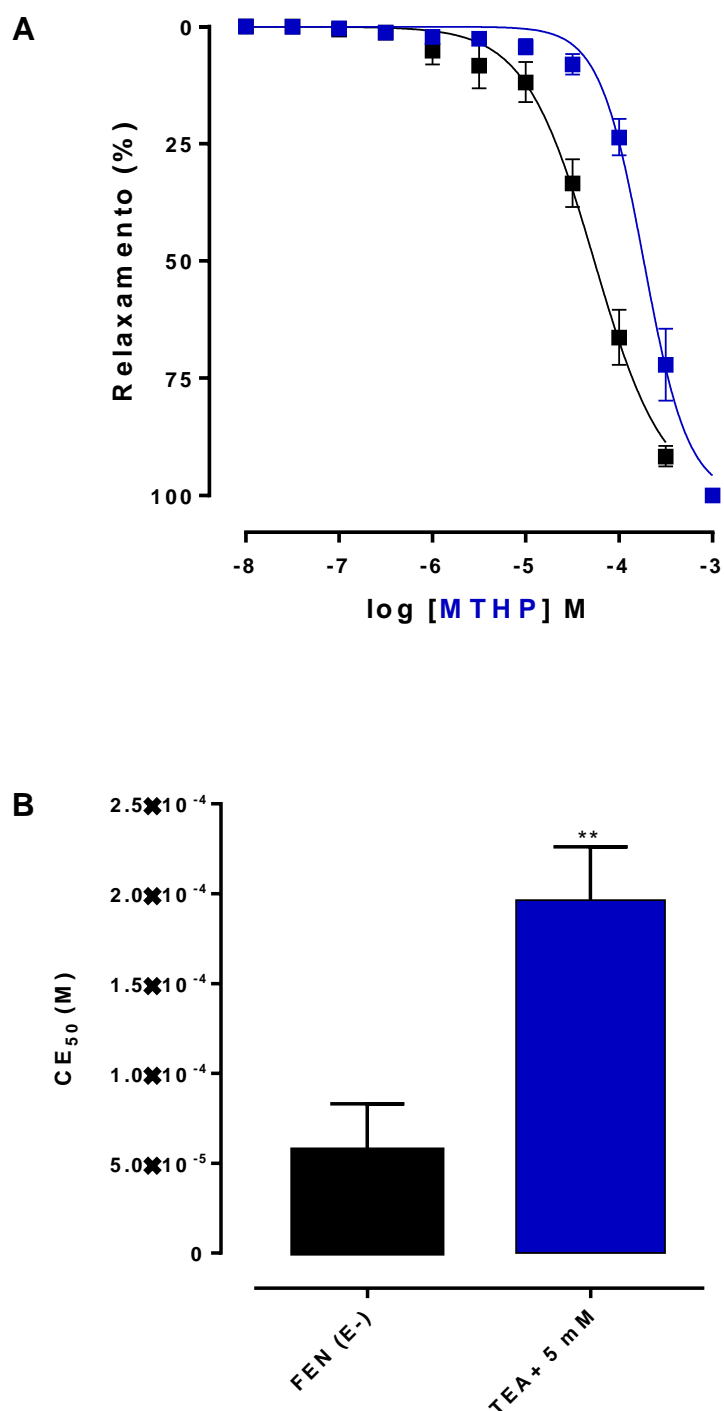
## 4.2 Avaliação da participação dos canais para K<sup>+</sup> no mecanismo de ação vasorelaxante do MTHP em aorta isolada de rato sem endotélio vascular

### 4.2.1 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina na ausência e na presença de TEA<sup>+</sup>

O MTHP ( $10^{-8}$  a  $10^{-3}$  M,  $n = 5$ ) relaxou a aorta de rato sem endotélio funcional pré-contraída com  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN de maneira significativa e dependente de concentração tanto na ausência (curva controle) ( $CE_{50} = 5,7 \pm 1,1 \times 10^{-5}$  M,  $n = 5$ ) como na presença de 5 mM de TEA<sup>+</sup> ( $CE_{50} = 1,9 \pm 0,3 \times 10^{-4}$  M,  $n = 5$ ), onde nessa concentração é um bloqueador não seletivo dos canais para potássio, com eficácia máxima ( $E_{max}$ ) 100%, respectivamente.

A potência relaxante do MTHP foi reduzida cerca de 3,3 vezes ( $p < 0,0023$ ) quando comparada ao relaxamento na ausência de 5 mM de TEA<sup>+</sup> (Figura 5, A e B; Tabela 3).

**Figura 5** Efeito vasorrelaxante (A) e valores de  $CE_{50}$  (B) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 5 mM de  $TEA^+$ , em aorta isolada de rato sem endotélio funcional



Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t*, não pareado, \*\*  $p < 0,0023$  (FEN (E-) vs.  $TEA^+$  5 mM),  $n = 5$ .



#### 4.2.2 Efeito do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina, na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de potássio

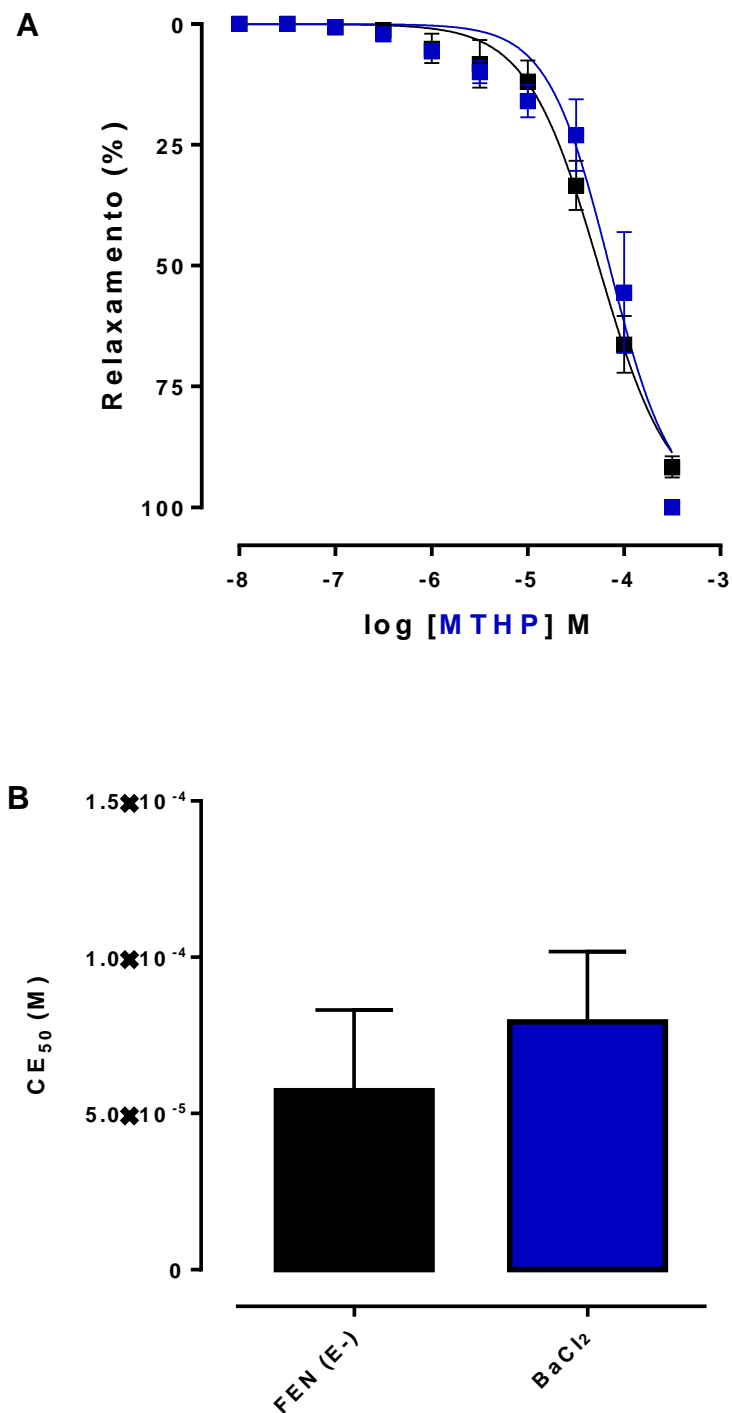
O MTHP ( $10^{-8}$  a  $10^{-3}$  M) relaxou a aorta de rato sem endotélio funcional pré-contraída com  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN de maneira significativa e dependente de concentração tanto na ausência (curva controle) como na presença de 1 mM de 4-AP (bloqueador seletivo dos  $K_V$ ),  $10^{-5}$  M de glibenclamida (bloqueador seletivo dos  $K_{ATP}$ ), 1 mM de  $TEA^+$  (bloqueador seletivo dos  $BK_{Ca}$ ),  $5 \times 10^{-8}$  M de apamina (bloqueador seletivo dos  $SK_{Ca}$ ) e  $3 \times 10^{-5}$  M de  $BaCl_2$  (bloqueador seletivos dos  $K_{ir}$ ).

Na presença de  $3 \times 10^{-5}$  M de  $BaCl_2$  e  $10^{-5}$  M de glibenclamida a curva de relaxamento do MTHP em aorta de rato pré-contraída com  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN sem endotélio funcional não foi alterada. Por outro lado, na presença de 1 mM de  $TEA^+$ ,  $5 \times 10^{-8}$  M de Apamina e 1 mM de 4-AP a curva de relaxamento do MTHP foi desviada para a direita de maneira significativa.

A potência relaxante do MTHP ( $CE_{50} = 5,7 \pm 1,1 \times 10^{-5}$  M,  $n = 5$ ) não foi alterada na presença de  $BaCl_2$  ( $CE_{50} = 7,9 \pm 2,2 \times 10^{-5}$  M) (Figura 6, A e B; Tabela 3) ou de glibenclamida ( $CE_{50} = 8,2 \pm 1,7 \times 10^{-5}$  M) (Figura 7, A e B; Tabela 3), como podemos observar pelos valores de  $CE_{50}$  que não apresentam diferença significativa entre si.

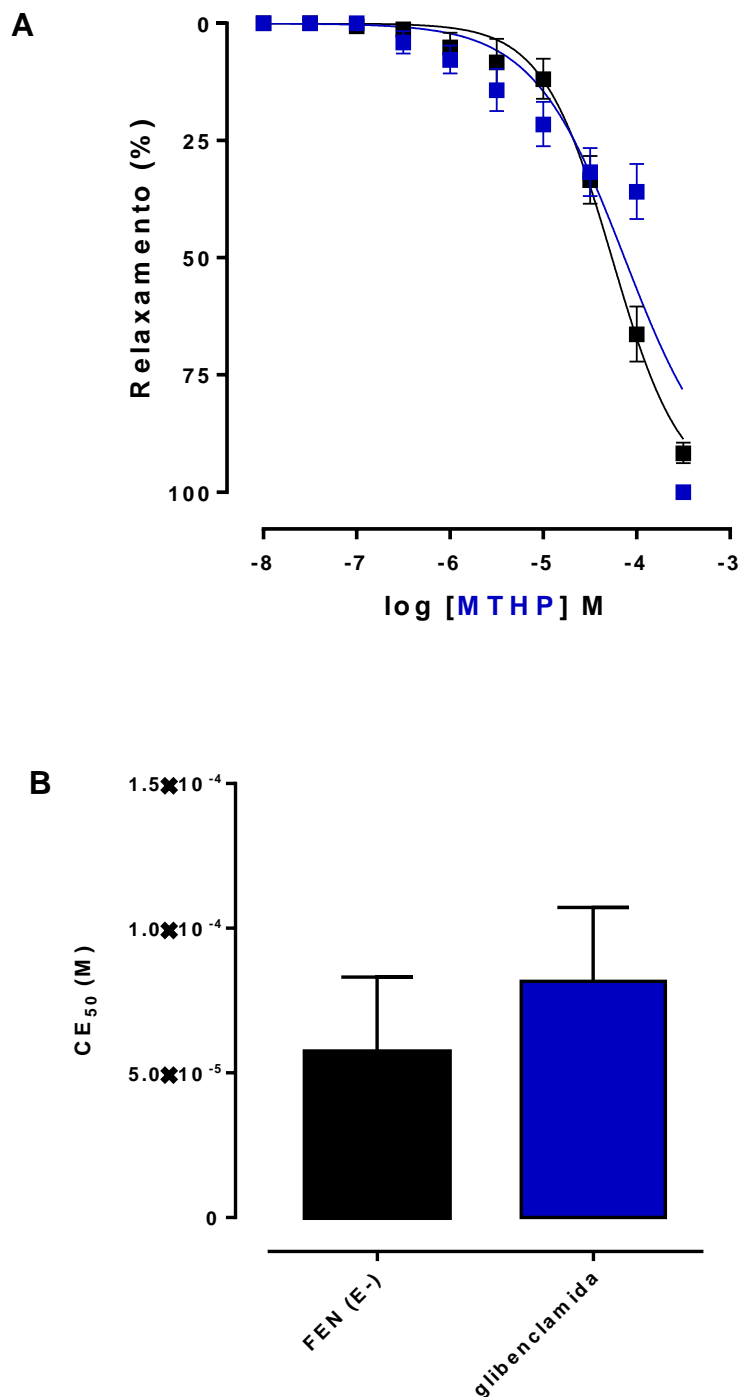
Por outro lado, sua potência foi atenuada de maneira significativa cerca de 4 vezes na presença de 1 mM de  $TEA^+$  ( $CE_{50} = 2,3 \pm 0,5 \times 10^{-4}$  M) (Figura 8, A e B; Tabela 3), cerca de 3,3 vezes na presença de  $5 \times 10^{-8}$  M de apamina ( $CE_{50} = 1,9 \pm 0,3 \times 10^{-4}$  M) (Figura 9, A e B; Tabela 3) e cerca de 2,6 vezes na presença de 1 mM de 4-AP ( $CE_{50} = 1,5 \pm 0,3 \times 10^{-4}$  M) (Figura 10, A e B; Tabela 3).

**Figura 6** - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de  $CE_{50}$  (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na ausência (■) e na presença de  $3 \times 10^{-5}$  M  $BaCl_2$  (■), em aorta isolada de rato sem endotélio funcional



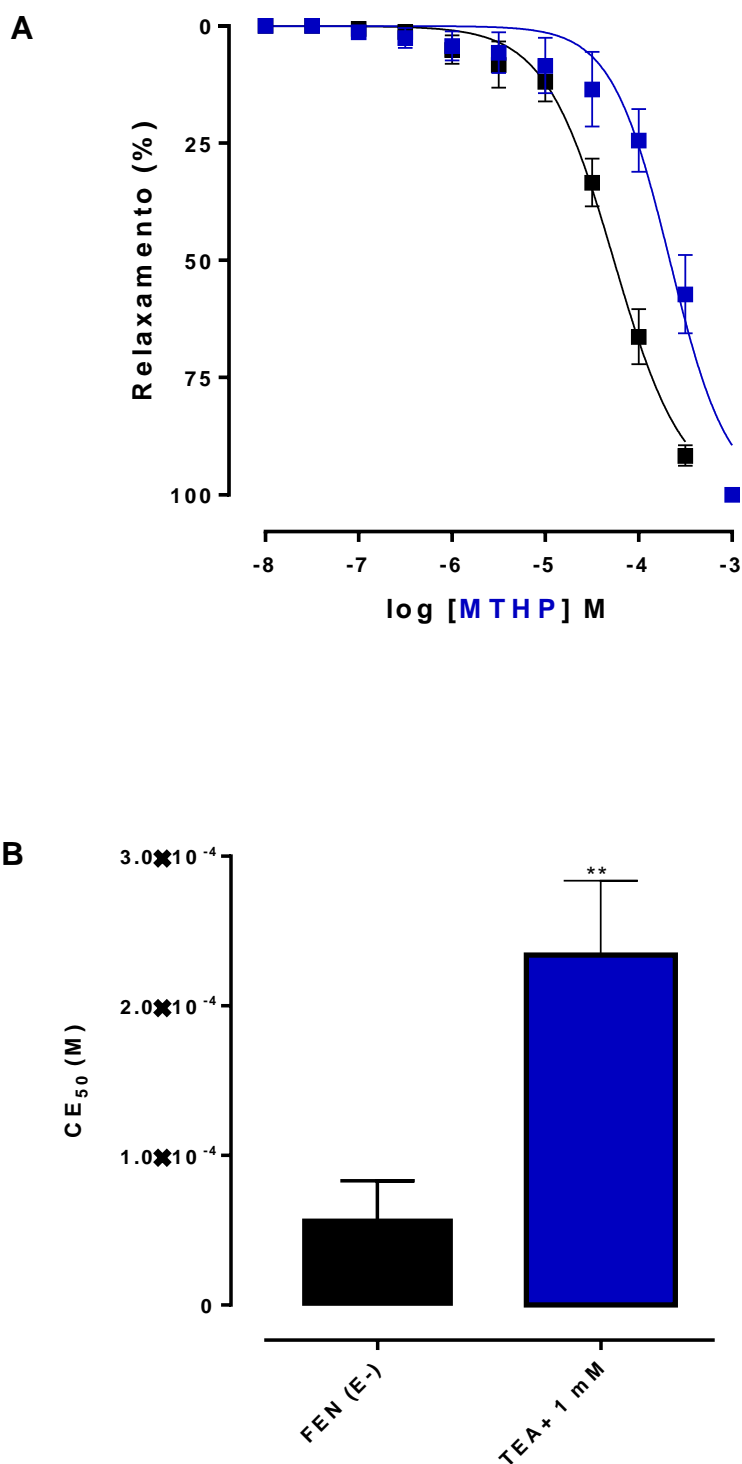
Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t*, não pareado,  $p = 0,3661$  (FEN (E-) vs.  $BaCl_2$ ),  $n = 3$ .

**Figura 7** – Efeito vasorelaxante (A) e valores de  $CE_{50}$  (B) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na ausência (■) e na presença de  $10^{-5}$  M de glibenclamida (■), em aorta isolada de rato com endotélio funcional



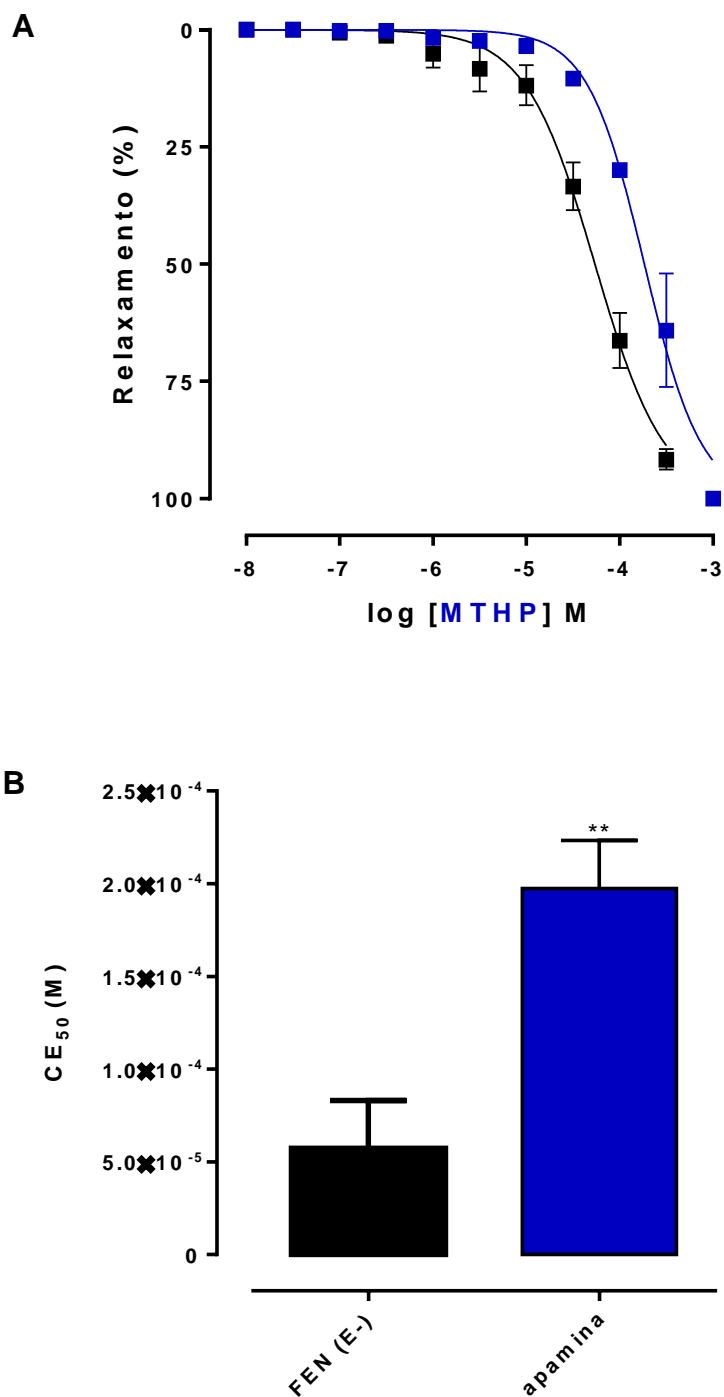
Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t*, não pareado,  $p = 0,3513$  (FEN (E-) vs. glibenclamida),  $n = 3$ .

**Figura 8** Efeito vasorelaxante (A) e valores de  $CE_{50}$  (B) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 1 mM de  $TEA^+$ , em aorta isolada de rato sem endotélio funcional



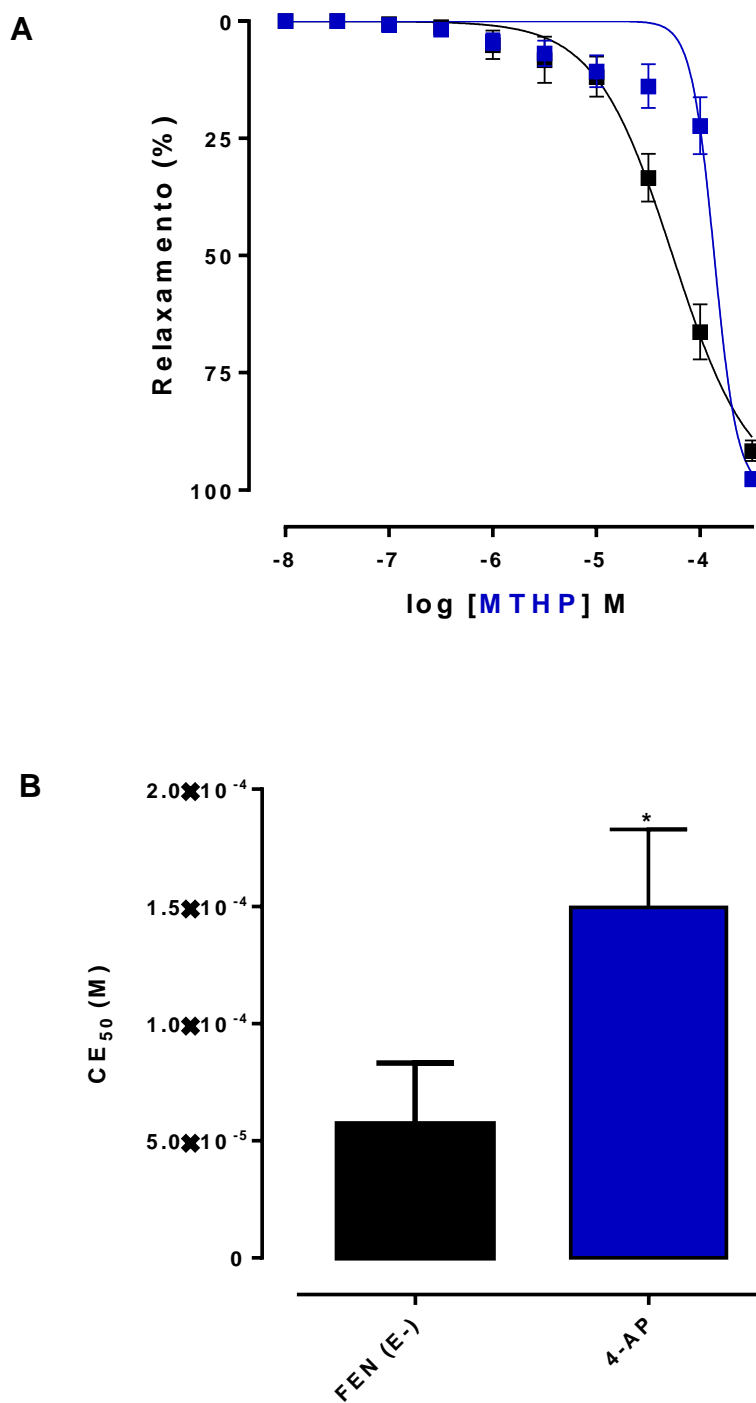
Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t*, não pareado, \*\*  $p < 0,0086$  (FEN (E-) vs.  $TEA^+$  1 mM),  $n = 5$ .

**Figura 9** - Efeito vasorelaxante (**A**) e valores de  $CE_{50}$  (**B**) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de  $5 \times 10^{-8}$  M de apamina, em aorta isolada de rato sem endotélio funcional



Os símbolos e as barras verticais (**A**) e as colunas e as barras verticais (**B**) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t*, não pareado, \*\*  $p < 0,0011$  (FEN (E-) vs. apamina),  $n = 5$ .

**Figura 10** - Efeito vasorelaxante (A) e valores de  $CE_{50}$  (B) do MTHP sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na ausência (■) e na presença (■) de 1 mM de 4-AP, em aorta isolada de rato sem endotélio funcional



Os símbolos e as barras verticais (A) e as colunas e as barras verticais (B) representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t*, não pareado,  $p < 0,0315$  (FEN (E-) vs. 4-AP),  $n = 5$ .

**Tabela 3** – Valores  $CE_{50}$  (M) e  $E_{max}$  (%) do MTHP na ausência (controle) e na presença de bloqueadores de canais para potássio em aorta de rato sem endotélio funcional

<b>Condição Experimental</b>	<b><math>CE_{50}</math> (M)</b>	<b><math>E_{max}</math> (%)</b>
Controle	$5,7 \pm 1,1 \times 10^{-5}$	$91,7 \pm 2,2$
TEA <sup>+</sup> 5 mM	$1,9 \pm 0,3 \times 10^{-4}$ *	100
BaCl <sub>2</sub>	$7,9 \pm 2,2 \times 10^{-5}$	100
Glibenclamida	$8,2 \pm 1,7 \times 10^{-5}$	100
TEA <sup>+</sup> 1 mM	$2,3 \pm 0,5 \times 10^{-4}$ **	100
Apamina	$1,9 \pm 0,3 \times 10^{-4}$ ***	100
4-AP	$1,5 \pm 0,3 \times 10^{-4}$ ****	100

Teste *t*, não pareado, \*  $p < 0,0027$ , \*\*  $p < 0,0086$ , \*\*\*  $p < 0,0011$ , \*\*\*\*  $p < 0,0305$  (controle vs. bloqueadores).

## 5 DISCUSSÃO

A produção de medicamentos é resultado da pesquisa elaborada e cuidadosa. Grande parte dessas drogas é obtida a partir do embasamento natural e manipulação química por meio de um planejamento, conhecido pela “busca racional de drogas”. Aproveitando a biodiversidade nacional, o Brasil se mostra como um ótimo cenário para criação de novos produtos provenientes de síntese laboratorial, mas com inspiração natural (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Nesse contexto, o alcaloide isoquinolínico 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (MTHP) se comporta como uma nova molécula obtida exclusivamente por síntese orgânica (CORDEIRO, 2012) e é objeto desse estudo a fim de investigar sua funcionalidade em desregulações no tônus vascular, mais especificamente, na disfunção endotelial.

O endotélio apresenta-se como uma das chaves regulatórias para a homeostase vascular e uma disfunção nesta camada é capaz de promover modificações na circulação e sinalização celular, por exemplo, gerando doenças (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007). Uma das maiores associações feitas entre esta perda e alguns problemas de saúde é o desenvolvimento da hipertensão arterial.

A hipertensão é uma doença de caráter cardiovascular que possui alta incidência na população e representa fator de risco para outras de mesmo cunho. Também é um dos maiores problemas de saúde pública e responsável por uma determinada taxa de internações e custos médicos (FUCHS, 2004). Dessa maneira, fármacos que regulem a musculatura lisa dos vasos sanguíneos possivelmente podem se tornar drogas com potencial terapêutico.

Uma das abordagens para o tratamento de algumas doenças é a modulação de canais participantes na resposta de efeitos fisiológicos de células e alternativas que consigam influenciar nestes pontos podem ser bastante eficazes. Quanto à regulação do tônus vascular, a participação dos canais para cálcio e potássio é efetiva no relaxamento e na contração da célula muscular lisa.

Necessariamente, para haver contração ou relaxamento é preciso haver um aumento ou redução, respectivamente, de cálcio intracelular, logo, este evento acontece também por modulação dos  $Ca_v$ . É possível ter substâncias que ajam diretamente neste ponto, como é o caso de agonistas farmacológicos. (WEBB, 2003)



A família dos  $Ca_v$  é composta por 10 membros divididos em subfamílias. A subfamília  $Ca_v-1$  ou do tipo L são os principais envolvidos no processo de contração e necessitam de grande variação no potencial de membrana para serem ativados, o que justifica o “L” do inglês “*large*”; a subfamília dos  $Ca_v-2$  também necessita de grande despolarização, porém, diferentemente dos  $Ca_v-1$ , não são sensíveis a di-hidropiridina e são expressos principalmente nos neurônios; a subfamília  $Ca_v-3$  ou do tipo T são ativados por mudanças pequenas na despolarização e são transitórios, o que justifica o “T” do inglês “*transiente*”, sendo expressos em diversos tipos de células (CATTERALL, 2011).

Nas células musculares lisas temos a presença dos  $Ca_v-L$  se comportando como importantes alvos de bloqueadores usados na terapêutica (WATERMAN, 2000). Para verificarmos a hipótese de que o MTHP poderia bloquear o influxo de cálcio através de  $Ca_v$ , provocando um efeito vaso relaxante, pré contraímos os anéis aórticos livres de endotélio com 80 mM KCl ou S-(-)-Bay-K 8644. Este último é um agonista direto que consegue ativar os  $Ca_v-1$  pela ligação na subunidade  $\alpha_1$  do canal, mesma subunidade para seus bloqueadores, já a utilização de 80 mM KCl baseia-se em propriedades eletroquímicas da célula, onde nesta concentração extracelular elevada de  $K^+$  é capaz de reduzir de maneira intensa o efluxo desse íon levando à despolarização, abrindo os  $Ca_v$  (GURNEY, 1994).

Observando os resultados podemos notar que a curva de relaxamento provocada pelo MTHP em anéis controlados com KCl não foi alterada de forma significativa quando comparada à curva de relaxamento gerada em anéis pré contraídos por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN (Figura 3). Este dado sugere, portanto, que há um mecanismo em comum para estes dois estimulantes contráteis, estando envolvido no efeito vaso relaxante do MTHP. Tendo em mente as informações sobre o modo de ação da FEN e do KCl podemos sugerir uma possível participação do  $Ca_v$  no mecanismo de ação do MTHP.

A fim de constatar tal afirmação, utilizamos, então, o ativador dos  $Ca_v-1$ : S-(-)-Bay-K 8644. Ao assumir que o MTHP se comporta como um bloqueador destes canais esperava-se diferença entre as curvas de relaxamento entre KCl e S-(-)-Bay-K 8644, tendo este sua curva deslocada para a direita de maneira significativa, com diminuição da potência (Figura 4).

Pelos dados obtidos foi possível ver que o MTHP relaxou significativamente e dependente de concentração os anéis pré contraídos com S-(-)-Bay-K 8644, porém

sua potência foi reduzida cerca de 2,6 vezes quando comparado com a curva de relaxamento contraído por FEN e 80 mM de KCl, confirmando o que era acreditado (Figura 4).

Na literatura também já é bem estabelecido a participação dos canais para  $K^+$  para a regulação do potencial de membrana, sendo uma resposta direta no balanço entre o aumento da condutância ao íon, levando a uma repolarização/hiperpolarização, e a diminuição da mesma, levando a uma despolarização. Sem a função endotelial ativa, estes canais surgem como uma nova alternativa para promover o relaxamento através da regulação do potencial de ação, já que este mecanismo é capaz de exercer ação sobre o influxo do íon  $Ca^{2+}$  a partir da abertura e fechamento dos seus canais dependentes de voltagem, os  $Ca_v$  (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996; THORNELOE; NELSON, 2005).

Para verificarmos se o MTHP estaria modulando de forma positiva os canais para  $K^+$  na sua resposta vaso relaxante em aorta de rato sem endotélio funcional, utilizamos como ferramenta farmacológica o  $TEA^+$ , onde na concentração de 5 mM é um bloqueador não seletivo desses canais (NIU, et. al., 2008). Observou-se que a curva de relaxamento obtida pelo MTHP foi deslocada para a direita na presença do bloqueador com uma potência reduzida de 3,3 vezes quando comparada ao relaxamento sem o bloqueador (Figura 5), sugerindo, assim, a participação desses canais no efeito relaxante do alcaloide.

Sabendo da presença de vários tipos de canais para  $K^+$  na musculatura vascular, como os abertos por voltagem ( $K_v$ ), os retificadores de entrada ( $K_{ir}$ ), os sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) e os sensíveis ao cálcio de baixa condutância ( $SK_{Ca}$ ) e de alta condutância ( $BK_{Ca}$ ) (THORNELOE; NELSON, 2005; LEDOUX et al., 2006; STOTT; JEPPE; GREENWOOD, 2014), surgiu a necessidade de verificar o efeito do MTHP sobre os canais para  $K^+$ .

Para verificar quais canais estariam participando, utilizamos os bloqueadores  $3 \times 10^{-5}$  M  $BaCl_2$ ,  $10^{-5}$  M Glibenclamida, 1 mM  $TEA^+$ ,  $5 \times 10^{-8}$  M Apamina e 1 mM 4-aminopiridina para seus respectivos canais, os  $K_{ir}$ ,  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$ ,  $SK_{Ca}$  e  $K_v$ .

Analisando os resultados, percebemos que as curvas de relaxamento obtidas pelo MTHP na presença e na ausência dos bloqueadores  $BaCl_2$  (Figura 6) e Glibenclamida (Figura 7) não possuíram diferença significativa e não houve alteração da potência. Uma vez que a curva manteve-se sem alterações nos dois casos, isso sugere que o mecanismo de ação não depende dos canais bloqueados,

uma vez que o relaxamento acontece de maneira igual, apontando para outros canais. Ou seja, sugere-se que os canais  $K_{ir}$  e  $K_{ATP}$  não estão envolvidos no mecanismo vasorelaxante do MTHP.

Por outro lado, ao utilizarmos os bloqueadores 1 mM TEA<sup>+</sup>,  $5 \times 10^{-8}$  M Apamina, e 4-aminopiridina, percebemos que houve o deslocamento para a direita das curvas de relaxamento a partir do MTHP quando comparado às curvas na ausência dos mesmos. As potências foram respectivamente reduzidas 4 (Figura 8), 3,3 (Figura 9) e 2,6 (Figura 10) vezes com os bloqueadores. Estes dados nos dão suporte para sugerir que o mecanismo de ação do MTHP pode envolver a modulação positiva dos canais  $BK_{Ca}$ ,  $SK_{Ca}$  e  $K_v$ .

Em conjunto, os resultados mostrados fornecessem subsídio, em parte, para a caracterização do mecanismo de ação relaxante do MTHP em aorta de ratos normotensos na ausência de endotélio funcional. Estes eventos envolvem a modulação negativa de canais para cálcio e a modulação positiva de canais para potássio, em especial os  $BK_{Ca}$ ,  $SK_{Ca}$  e  $K_v$ .

## 6 CONCLUSÕES

A partir do que foi exposto podemos concluir que o efeito relaxante induzido pelo MTHP em aorta isolada de rato sem endotélio funcional envolve o bloqueio do influxo de cálcio, provavelmente através da modulação negativa dos canais de cálcio operados por voltagem ( $Ca_v$  tipo L). Além disso, também há uma possível participação de alguns canais para potássio (sensíveis ao cálcio de grande condutância ( $BK_{Ca}$ ), dos sensíveis ao cálcio de baixa condutância ( $SK_{Ca}$ ) e dos dependentes de voltagem ( $K_v$ ) ) sendo modulados positivamente no mecanismo de relaxamento do MTHP.

No entanto, não podemos descartar o envolvimento de outras vias intracelulares, ainda não investigadas, sendo, assim, necessários maiores estudos para uma confirmação e visão total do mecanismo de ação do alcaloide em questão.

## REFERÊNCIAS

AARONSON, P. I.; SARWAR, U.; GIN, S.; ROCKENBAUCH, U.; CONNOLLY, M.; TILLET, A.; WATSON, S.; LIU, B.; TRIBE, R. M. A role for voltage-gated, but not Ca<sup>2+</sup>-activated, K<sub>p</sub> channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 815–824. 2006.

AJAYA, M.; GILANIB, A. H.; MUSTAFAA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 74, p. 603–612, 2003.

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

AMAT, M.; ELIAS, V.; LLOR, N.; SUBRIZI, F.; MOLINS, E.; BOSCH, J. A. General Methodology for the Enantioselective Synthesis of 1-Substituted Tetrahydroisoquinoline Alkaloids. **European Journal of Organic Chemistry**, v.21, p.4017–4026, 2010.

ARUN LAKSHANA, O; SCHILD, H.O. Some Quantitative uses of drug antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v.14, n.1, p.48-58, 1959

AWUAH, E.; CAPRETTA, A. Strategies and synthetic methods directed toward the preparation of libraries of substituted isoquinolines. **Journal of Organic Chemistry**, v. 75, n. 16, p. 5627–5634, 2010.

BERNATOVA, I. Endothelial Dysfunction in Experimental Models of Arterial Hypertension: Cause or Consequence? **Biomed Research International**. 2014

BHADRA, K. KUMAR, G. S. Therapeutic Potential of Nucleic Acid-binding Isoquinoline Alkaloids: Binding Aspects and Implications for Drug Design. **Medicinal Research Reviews**, v.31, n.6 p.821-862, 2011

BODE-BOGER, S.M; MUKE, J.; SURDACKI, A.; BRABANT, G.; BOGER, R.H; FROLICH, J.C. Oral L-arginine improves endothelial function in healthy individuals older than 70 years. **Vascular Medicine**. v,8, 2003

BUNTING, G.; GRYGLEWSKI, R.; MONCADA, S.; VANE, JR.; Arterial walls Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. **Prostaglandins**, v. 12, n.6, 897-913, 1976

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 131–134, 2005.

CARAFOLI, E. Calcium signaling: a tale for all seasons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 3, p. 1115–1122, 2002.

CATRAVAS, J. D; YETIK-ANACAK, G. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. **Vascular Farmacology**, v.45, p. 268–276, 2006

CATTERALL, W. A. Structure and regulation of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. **Annual Review of Cell & Developmental Biology**, v. 16, p. 521-555, 2000.

CATTERALL, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels, **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, p. 1-24, 2011.

CHAEA, H.-J., KIM, H.-R., KANG, Y. J., HYUN, K. C., KIM, H. J., SEO, H. G., LEE, J. H. et al. Heme oxygenase-1 induction by (S)-enantiomer of YS-51 (YS-51S), a synthetic isoquinoline alkaloid, inhibits nitric oxide production and nuclear factor- $\kappa$ B translocation in ROS 17/2.8 cells activated with inflammatory stimulants. **International Immunopharmacology**, v.12, p.1559-1568, 2007

CHAUHAN, A; MORE, R.S; MULLINS, P.A; TAYLOR, G; PETCH, MC.; SCHOFIELD, P.M. Aging-Associated Endothelial Dysfunction in Humans Is Reversed by L-Arginine. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 28, n. 7, 1996

CHUEH, F.Y.; HSIEH, M.T.; CHEN, C.F.; LIN, M.T. Hypotensive and bradycardic effects of dl-tetrahydropalmatine mediated by decrease in hypothalamic serotonin release in the rat. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.69, p. 177-180, 1995

CHUN, Y. T.; YIP, T. T.; LAU, K. L. A biochemical study on the hypotensive effect of berberine in rats. **General Pharmacology: Vascular System**, v.10, p.177-182,1979.

CORDEIRO, M. B. Aplicação da reação de Pictet-Spengler na síntese de alcaloides fenil tetra hidroisoquinolínicos inéditos. 2012. 111f. Dissertação (Mestrado em

Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012

CORDELL, G.A. Introduction to Alkaloids: A biogenic Approach. Willey, New York, 1983

CORDELL, G. A., QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research: PTR**, v.15, p. 183-205, 2001.

CUI, H.-S; MATSUMOTO, K; MURAKAMI, Y; HORI, H; ZHAO, Q; OBI, R. Berberine exerts neuroprotective actions against in vitro ischemia-induced neuronal cell damage in organotypic hippocampal slice cultures: involvement of B-cell lymphoma 2 phosphorylation suppression. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 32, n. 1, p. 79–85, 2009.

DEANFIELD, J.E.; HALCOX, J.P.; RABELINK, T.J.; Endothelial function and dysfunction - testing and clinical relevance. **Circulation**, v.115, p. 1285-1295, 2007

DONG, H.; LEE, C.-M.; HUANG, W.-L.; PENG, S.-X. Cardiovascular effects of substituted tetrahydroisoquinolines in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.107, p.262-268,1992.

DHARMASHANKAR, K.; WIDLANSKY, M.E. Vascular Endothelial Function and Hypertension: Insights and Directions. **Current Hypertension Reports**. v.12, n.6, 2010

ERSOY, S. ORHAN, I. TURAN, N.N. SAHAN, G. ARK, M. TOSUN F. Endothelium-dependent induction of vasorelaxation by *Melissa officinalis* L. ssp. *officinalis* in rat isolated thoracic aorta. **International Journal of Phytomedicine**, v. 15; p. 1087-1092, 2008.

EVORA, P. R. B.. An open discussion about endothelial dysfunction: is it timely to propose a classification? **International Journal of Cardiology**, v. 73, n. 3, p. 289-292, 2000

FEHER, M.; SCHMIDT, J. M. Property distributions: Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, n. 1, p. 218–227, 2003.

FERRANTE, J.; LUCHOWSKI, E.; RUTLEDGE, A.; TRIGGLE, D.J. Binding of a 1,4-dihydropyridine calcium channel activator, S(-)-Bay K8644, to cardiac preparations. **Biochemical and Biophysics Research Communications**, v. 158, n. 1, p. 149-154, 1989.

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, p. 32–39, 2001.

FURCHGOTT, R.F; ZAWADZKI, J.V. The Obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** (Lond.) 288: 373–376, 1980.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circulation research**, v. 53, n. 5, p. 557–573, 1983.

GRUNDON, M. F. The Alkaloids. **Royal Society of Chemistry**, 1976

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 242-251, 1994.

HADI, AR.; CARR, C.S.; AL-SUWAIDI, J.; Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy and outcome. **Vascular Health and Risk Management**. v.1, n.3, 183-198, 2005

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HOROWITZ, A; MENICE, C. B; LAPORTE, R; MORGAN, K. G. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiological reviews**, v. 76, n. 4, p. 967–1003, 1996.

HUANG, Y. Hydroxylamine-induced relaxation inhibited by K<sup>+</sup> channel blockers in rat aortic rings. **European Journal of Pharmacology**, v. 349, n. 1, p. 53-60, 1998.

IRANSHAHY, M.; QUINN, R. J.; IRANSHAHI, M. Biologically active isoquinoline alkaloids with drug-like properties from the genus *Corydalis*. **RSC Advances**, v. 4, n. 31, p. 15900, 2014.



ISHIDA, K.; KINOSHITA, H.; KOBAYASHI, S.; SAKABE, T. Thiopentone inhibits endothelium-dependent relaxations of rat aortas regulated by endothelial Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels. **European Journal of Pharmacology**, v. 371, n. 2-3, p.179-185, 1999.

KILPATRICK, G. J.; SMITH, T. W. Morphine-6-glucuronide: Actions and mechanisms. **Medicinal Research Reviews**, v. 25, n. 5, p. 521–544, 2005.

KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In BÁRÁNY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**, p. 203-219, 1996.

KONG, W; WEI, J; ABIDI, P; LIN, M; INABA, S; LI, C; WANG, Y; WANG, Z; SIL, S; PAN, H; WANG, S; WU, J; WANG, Y; LI, Z; LIU, J; JIANG, J-D. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. **Nature medicine**, v. 10, n. 12, p. 1344–1351, 2004.

KUO, C. L.; CHI, C. W.; LIU, T. Y. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. **Cancer Letters**, v. 203, n. 2, p. 127–137, 2004.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 279–289, 2007.

LATORRE, R.; OBERHAUSER, A.; LABARCA, P.; ALVAREZ, O. Varieties of calcium-activated potassium channels. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 385-399, 1989.

LEDOUX, J.; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium- Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. **Physiology**, v. 21, p. 69-78, 2006.

LERMAN, A.; BURNETT, JC. Intact and altered endothelium in regulation os vasomotion. **Circulation**. v.86, 1992

LOWE, H. C.; JAMES, B.; KHACHIGIAN, L. M., A novel model of in-stent restenosis: rat aortic stenting, **Heart** v. 91 n.3, p.393–395, 2005.

LUO, Y., LIU, M., DAI, Y., YAO, X., XIA, Y., CHOU, G.; WANG, Z. Norisoboldine Inhibits the Production of Pro-inflammatory Cytokines in Lipopolysaccharide-

Stimulated RAW 264.7 Cells by Down-Regulating the Activation of MAPKs but Not NF- $\kappa$ B. **Inflammation**, v.33, p. 389-397, 2010.

MA, J.; PAN, Z. Retrograde activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**, v. 33, n. 5-6, p. 375–384, 2003.

MCHALE, N.; HOLLYWOOD, M.; SERGEANT, G; THORNBURY, K. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. **J Physiol**. 2006;570:23–28.

McFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1-13, 2002.

MONCADA, S., AND HIGGS, E. A.: The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.** 329: 2002–2012, 1993.

MONTANARI, C. AL.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 105–111, 2001.

MOZAFARIAN, D. et. al. Heart Disease and Stroke Statistics. **Circulation**, 2015.

MURRAY M. A.; BERRY J. L.; COOK S. J.; FOSTER R. W.; GREEN K. A.; SMALL R. C. Guinea-pig isolated trachealis: the effects of charybdotoxin on mechanical activity, membrane potential changes and the activity of plasmalemmal K(+)-channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 103, p.1814-1818, 1991.

NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, n. 55, p. 597–606, 2003.

NEVALA, R.; PAUKKU, K.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Calcium-sensitive potassium channel inhibitors antagonize genistein- and daidzein-induced arterial relaxation in vitro. **Life Sciences**, v. 69, p. 1407–1417, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

NIU, LONG-GANG; ZHANG, MING-SHENG; LIU, YU; XUE, WEN-XIN; LIU, DAN-BING; ZHANG, JUN; LIANG, YUE-QIN. Vasorelaxant effect of taurine is diminished by tetraethylammonium in rat isolated arteries. **European Journal of Pharmacology**. v. 580, p. 169-174, 2008.

OGUT, O.; BROZOVICH, F.V. Regulation of force in vascular smooth muscle. **J. Mol. Cell Cardiol**. v.35, 2003.

PANZA, J.A.; CASINO, P.R.; KILCOYNE, C.M.; QUYYUMI, A.A. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. **Circulation**. v. 87, 1993

PIEPER, G.M; PELTIER, B.A. Amelioration by L-Arginine of a Dysfunctional Arginine/Nitric Oxide Pathway in Diabetic Endothelium. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v, 25, 1995

QUINN RJ, IRANSHAHI M. Biologically active isoquinoline alkaloids with drug-like properties from the genus *Corydalis*. **RSC Adv** 2014;4:15900–13

QUYYUMI, A.A Prognostic value of endothelial function. **American Journal of Cardiology**. 2003

QUYYUMI, A.A.; PATEL, R.S.. Endothelial dysfunction and hypertension - cause or effect? **Hypertension**. v.55, n.5, 2010

RAMESHARD, M.; BABAEI, H.; AZAMI, Y.; FOULADI, D. F. Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies. **Life Sci** . v. 145, p. 190-204, 2016.

RAJENDRAN, P.; RENGARAJAN, T.; THANGAVEL, J.; NISHIGAKI, Y.; SAKTHISEKARAN, D.; SETHI, G.; NISHIGAKI, I. The Vascular Endothelium and Human Diseases. **International Journal of Biological Sciences**. v.9, 2013.

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

ROBERTS, M. F.; WINK, M. **Introduction Alkaloids: Biochemistry, ecology and medicinal applications**, 1998.

SANJULIANI, A. F. Fisiopatologia da hipertensão arterial: conceitos teóricos úteis para a clínica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do estado do Rio de Janeiro**, v.15, n.4, 2002

SANDERS, K. M. Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1438-1449, 2001.

SHOKEEN, P; RAY, K; BALA, M; TANDON, V. Preliminary studies on activity of *Ocimum sanctum*, *Drynaria quercifolia*, and *Annona squamosa* against *Neisseria gonorrhoeae*. **Sexually transmitted diseases**, v. 32, n. 2, p. 106–111, 2005.

SILVA, D. F; PORTO, D. L.; ARAÚJO, I. G. A.; DIAS, K. L. G.; CAVALCANTE, K. V. M.; VERAS, R. C.; TAVARES, J. F. *et al.* Endothelium-derived nitric oxide is involved in the hypotensive and vasorelaxant effects induced by discretamine in rats. **Pharmazie**, v.64, p. 327-331,2009.

STEIN, C; COMISEL, K; HAIMERL, E; YASSOUDIRIS A; LEHRBERGER, K; HERZ, A; PETTER, K. Analgesic Effect of Intraarticular Morphine After Arthroscopic Knee Surgery. **The New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 16, p. 1123–1126, 1991.

STÖCKIGT, J.; ANTONCHICK, A. P.; WU, F.; WALDMANN, H. The Pictet- Spengler Reaction in Nature and in Organic Chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, p.8538-8564, 2011.

STORY, L.; KENNEDY, S. Animal studies in endometriosis: a review. **ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 45, n. 2, p. 132–138, 2004.

STOTT, J. B.; JEPPE, T. A.; GREENWOOD, I. A. KV7 potassium channels: A new therapeutic target in smooth muscle disorders. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 4, p. 413–424, 2014.

TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; SUDANO, I.; SALVETTI, A. Endothelial dysfunction in hypertension. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.38, 2001

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, p. 215–242, 2005.

THUILLEZ, C; RICHARD, V. Targeting endothelial dysfunction in hypertensive subjects. **Journal of Human Hypertension**. v.19, 2005

TRAVASSOS, R.A. Mecanismos de sinalização endotelial e modulação de canais para cálcio e potássio na atividade relaxante do alcaloide sintético 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquilina em aorta isolada de rato . 2015. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa. 2015

TRIGGLE, C.R; DING H. The Endothelium in compliance and resistance vessels. *Front Biosci.*, (Schol Ed), v.1 (3), p.730-44, 2011

TSAI, P.-L.; TSAI, T.-H. Hepatobiliary excretion of berberine. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 4, p. 405–412, 2004.

UJVÁRY, I. Psychoactive natural products: overview of recent developments. **Ann ist super sanita**, v. 50, n. 1, p. 12–27, 2014.

VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**. v. 143, p. 299-330, 1963.

VIEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VITA, J.A; TREASURE, C.B; NABEL, E.G.; MCLENACHAN, J.M; FISH, D.; YEUNG A.C.; VEKSHTEIN, V.I.; SELWYN, S.P; GANZ, P. Coronary Vasomotor Response to Acetylcholine Relates to Risk Factors for Coronary Artery Disease. **Circulation**. v, 81, 1990

WANG, F; ZHOU, H-Y; CHENG, L; ZHAO, G; ZHOU, J; FU, L-Y; YAO, W-X. Effects of palmatine on potassium and calcium currents in isolated rat hepatocytes. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 9, n. 2, p. 329–333, 2003.

WATERMAN, S. A. Voltage-gated calcium channels in autonomic neuroeffector transmission. **Progress in Neurobiology**, v. 60, n. 2, p. 181-210, fev 2000.

WEBB, R. C. Relaxation Smooth Muscle Contraction and Relaxation. **Advances in physiology education**, v. 27, p. 201–206, 2003.

WEKSLER, B.B.; MARCUS, A.J.; JAFFE, E.A.; Synthesis of prostaglandin I<sub>2</sub> (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. Proceedings of the


National Academy of Sciences of the United States of America. v.74, n.9, 3922-3926, 1977.

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium signalling in smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3-4 SPEC. ISS., p. 397–407, 2005.


WRAY, S.; KUPITTAYANANT, S.; SHMIGOL, A.; SMITH, R. D.; BURDYGA, T. V. The physiological basis of uterine contractility: a short review. **Experimental Physiology**, v. 86, p. 239–246, 2001.

ZHENG, W.; RAMPE, D.; TRIGGLE, D.J. Pharmacological, radioligand binding, and electrophysiological characteristics of FLP 64176, a novel nondihydropyridine Ca<sup>2+</sup> channel activator, in cardiac and vascular preparations. **Molecular Pharmacology**, v. 40, p. 734-741, 1991.

## ANEXO A – Certidão 0605/13 da Comissão de Ético no Uso de Animais da UFPB



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



**CERTIDÃO (2ª VIA)**

João Pessoa, 09 de agosto de 2015.  
CEUA nº **0605/13**.

Ilmo(a)s: **Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo e Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos**  
Departamento de Biotecnologia – CBIotec – UFPB

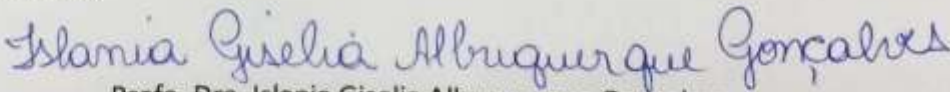
A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba analisou e **APROVOU** a execução do projeto **BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS SINTÉTICOS COM ATIVIDADE MODULADORA SOBRE CANAIS IÔNICOS EM MUSCULATURA LISA**.

Com previsão de empregar **188 ratos Wistar, 08 camundongos Swiss machos e 08 camundongos Swiss femeas**,

Animais do **Biotério Prof. Thomas George**;

Para serem utilizados no período de **junho/2013 a julho/2016**.

Atenciosamente,

  
Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA  
Universidade Federal da Paraíba  
[www.ufpb.br/ceua/](http://www.ufpb.br/ceua/) - [ceua@ufpb.br](mailto:ceua@ufpb.br)

## ANEXO B – Certificado de dilatação de prazo da certidão 0605/13



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS COM ATIVIDADE MODULADORA SOBRE CANAIS IÔNICOS EM MUSCULATURA LISA”, protocolo nº 00605/13 sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Rafael de Almeida Travassos – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2013 – 2016
Espécie/linhagem	Ratos Wistar e camundongos Swiss
Número de animais	188 ratos machos e 08 camundongos machos e 08 fêmeas
Idade/Peso	230 e 20-35 g
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério Thomas George – UFPB

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra  
CEUA-UFPB