

Efeito vasodilatador do extrato metanólico de *Erythroxylum caatingae* Plowman sobre anéis mesentéricos de ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

Vasorelaxant effect of methanol extract of Erythroxylum caatingae Plowman on mesenteric rings from spontaneously hypertensive rats (SHR)

Milena Ramos Reis¹; Jamile M. de Albuquerque²; Josean F. Tavares³; Darizy F. Silva⁴

¹Doutoranda em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas – ICS/UFBA; ²Bolsista de Iniciação Científica – ICS/UFBA; ³Professor Adjunto de Métodos Espectroscópicos Aplicados na análise de Fármacos – UFPB; ⁴Professora Adjunta de Farmacologia – ICS/UFBA

Resumo

Introdução: *Erythroxylum caatingae* Plowman (ETC) tem revelado a presença de diversos alcalóides com atividade biológica. **Objetivo:** Avaliar a potencial ação anti-hipertensiva do extrato metanólico da espécie ETC sobre anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). **Metodologia:** Para isto, foram realizados ensaios farmacológicos *in vitro*, e o efeito vasodilatador de ETC (0,01-300 µg/mL) foi observado. **Resultados:** Em anéis mesentéricos isolados, com endotélio funcional intacto e pré-contraídos com fenilefrina (FEN) (1 µM), ETC induziu relaxamento ($CE_{50} = 14.49 (20.5 - 29.2) \mu\text{g/mL}$; $E_{\text{máx}} = 110,11 \pm 2.4 \%$; $n = 7$), de maneira dependente da concentração do extrato e este efeito não foi atenuado após remoção do endotélio vascular ($CE_{50} = 27.41 (21.1 - 35.6) \mu\text{g/mL}$; $E_{\text{máx}} = 116.7 \pm 8.0 \%$; $n = 7$; $p < 0.05$). Estes resultados sugerem que a resposta vasodilatadora induzida por ETC independe dos fatores vasoativos liberados pelo endotélio. Por isso, os experimentos subsequentes foram realizados com preparações na ausência da camada endotelial. Em anéis pré-contraídos com serotonina, ETC apresentou aumento na potência farmacológica, quando comparado aos anéis pré-contraídos com a FEN ($CE_{50} = 9.22 (5.8 - 14.6) \mu\text{g/mL}$; $n = 11$; $p < 0.001$), entretanto, não houve diferença significativa em relação ao seu efeito máximo ($E_{\text{máx}} = 112.97 \pm 3.5 \%$; $n = 11$; $p < 0.05$). Enquanto que, em anéis pré-contraídos com solução despolarizante de KCl (60 mM), a curva concentração-resposta para ETC não foi significativamente diferente à obtida em anéis pré-contraídos com FEN ($CE_{50} = 20.76 (16.2 - 26.6) \mu\text{g/mL}$; $E_{\text{máx}} = 106.94 \pm 3.6 \%$; $n = 8$; $p < 0.05$). **Conclusão:** Tomados juntos, estes dados sugerem que ETC promove vasodilatação em anéis mesentéricos de animal SHR, independente da presença do endotélio vascular, e estes efeitos são mais potentes em tónus contraído por ativação de receptores serotoninérgicos, quando comparados a outros vasoconstrutores. **Palavras-chave:** Plantas Medicinais. *Erythroxylum caatingae*. Artérias Mesentéricas. Ratos Endogâmicos SHR.

Abstract

Introduction: *Erythroxylum caatingae* Plowman (ETC) has revealed the presence of several alkaloids with biological activity. **Objective:** Evaluate the potential antihypertensive action of methanol extract from ETC species in superior mesenteric artery rings isolated from spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods:** Pharmacological tests were performed *in vitro* and the vasorelaxant effect of ETC (0.01-300 µg/mL) was observed. **Results:** In isolated mesenteric rings with a functional and intact endothelium, pre-contracted with phenylephrine (PHE) (1 µM), ETC induced relaxation [$EC_{50} = 14.49 (20.5 - 29.2) \mu\text{g/mL}$; $MR = 110.11 \pm 2.4\%$, $n = 7$] in a concentration dependent manner. This effect was not attenuated after removal of the vascular endothelium [$EC_{50} = 27.41 (21.1 - 35.6) \mu\text{g/mL}$; $MR = 116.7 \pm 8.0\%$, $n = 7$, $p < 0.05$]. These results suggest that the vasodilator response induced by ETC is independent of endothelium derived vasoactive factors. Therefore, subsequent experiments were performed in endothelium removed mesenteric rings. In rings pre-contracted with serotonin, ETC had an increased pharmacological potency when compared to rings pre-contracted with PHE [$EC_{50} = 9.22 (5.8 - 14.6) \mu\text{g/mL}$, $n = 11$, $p < 0.001$], but not significant difference with respect to its maximum effect ($MR = 112.97 \pm 3.5\%$, $n = 11$, $p < 0.05$). In rings pre-contracted with a depolarizing solution of KCl (60 mM), the concentration-response curve for ETC was not significantly different to that obtained in rings pre-contracted with PHE [$EC_{50} = 20.76 (16.2 - 26.6) \mu\text{g/mL}$, $MR = 106.94 \pm 3.6\%$, $n = 8$, $p < 0.05$]. **Conclusion:** Taken together, these findings suggest that ETC promotes vasodilation in mesenteric rings from SHR animals, independent of the presence of the vascular endothelium, and these effects have a more potent impact on vascular tone of upon activation serotonin receptors, when compared to other vasoconstricting agents.

Keywords: Plants, Medicinal. *Erythroxylum caatingae*. Mesenteric Arteries. Rats, Inbred SHR.

Recebido em 29/06/2012; revisado em 20/08/2012.

Correspondência / Correspondence: Secretaria do Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia. Av. Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP 40.110-100. Salvador, Bahia, Brasil. Tel.: (55) (71) 3283-8959, Fax: (55) (71) 3283-8894. E-mail - ppgorgsistem@ufba.br

1 INTRODUÇÃO

A Hipertensão Arterial (HA) é um dos mais importantes problemas de saúde pública, que acomete uma grande parte da população mundial (ELLIOTT, 2007). Nos últimos 20 anos, inquéritos populacionais em cidades brasileiras apontaram uma prevalência desta

enfermidade acima de 30%. Dentre os fatores de risco para HA podem ser destacados o consumo excessivo de sal, tabagismo, diabetes *mellitus*, obesidade, sedentarismo e ingestão de álcool (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010).

A HA é uma condição clínica caracterizada por níveis elevados e sustentados de Pressão Arterial (PA), e" 140/90 mmHg (MACMAHON et al., 1990). É uma das principais alterações observadas durante o estado hipertensivo é o aumento no tônus vascular (estado de contratilidade do músculo liso arterial), que pode ser resultado de mudanças na estrutura e na função dos vasos sanguíneos (TAHVANAÏMEN et al., 2006). Por isso, drogas que causem relaxamento vascular são importantes para a terapia da HA.

Apesar da diversidade terapêutica para o tratamento da HA, estudos apontam que, no Brasil, apenas 20% a 40% das pessoas portadoras de hipertensão têm um controle efetivo da PA (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010). Mais de 200 drogas são empregadas no tratamento da HA, porém, menos de 1/3 dos pacientes tratados alcançam níveis de pressão sanguínea desejados, e quase 50% suspendem o tratamento dentro de seis meses devido à baixa eficácia e aos efeitos colaterais (COGOLLUDO; VIZCAÍNO-PÉREZ; TAMARGO, 2005), demonstrando que os percentuais de controle da PA são muito baixos, o que impulsiona a pesquisa em busca e desenvolvimento de novos fármacos com atividade anti-hipertensiva.

Diversas moléculas isoladas de produtos naturais, tanto de origem animal como vegetal, têm revelado atividade terapêutica em diversas patologias, incluindo as enfermidades cardiovasculares. Isto é possível devido à elevada biodiversidade brasileira, que permite a obtenção de novos princípios ativos (MCNEILL; JURGENS, 2006). O reino vegetal tem fundamental importância na medicina popular, já que as plantas são amplamente utilizadas pela população para fins medicinais (CRAVO, 1999).

Os metabólitos secundários são substâncias ativas sintetizadas pelas plantas, importantes para sua sobrevivência no meio ambiente, os quais têm sido explorados pelo homem como fontes de novos compostos medicinais. Um importante grupo destes metabólitos são os alcalóides, que possui grande diversidade estrutural e representa cerca de 20% das substâncias naturais descritas. A reserpina e a protoveratrina A são exemplos de alcalóides isolados de plantas que possuem atividade anti-hipertensiva (HENRIQUES et al., 1999).

Os alcalóides tropânicos são importantes devido ao seu amplo espectro de propriedades farmacológicas, incluindo ação anti-hipertensiva (KHATTAK et al., 2002). A espécie de planta *Erythroxylum caatingae* Plowman tem revelado a presença de diversos alcalóides com atividade biológica, em especial os alcalóides tropânicos (AGUIAR et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011). No Brasil, esta espécie possui distribuição restrita à região nordeste, somente registrada para os Estados da Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte (LOIOLA et al., 2007). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade vasodilatadora do extrato metanólico de *Erythroxylum caatingae* (ETC)

sobre artéria mesentérica superior isolada de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), com a finalidade de avaliar um provável potencial anti-hipertensivo desta espécie.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Para todos os protocolos experimentais foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR), pesando entre 260-290 gramas, os quais foram provenientes do Biotério do Laboratório de Neurociências, da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Estes animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas (6 – 18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água. Todos os animais serão eutanasiados seguindo as normas de cuidados com animais do Comitê de Ética em Pesquisa Animal/ UFPB (Protocolo nº 0105/10).

2.2 Drogas utilizadas

Durante a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes drogas: cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN), cloridrato de acetilcolina (ACh) e cloridrato de serotonina (5-HT), todas obtidas da Sigma-Aldrich.

2.3 Coleta do material e obtenção do extrato metanólico de ETC

O caule de ETC foi coletado em Picuí, PB, Brasil. O material botânico foi identificado por Maria de Fátima Agra e uma exsiccata AGRA 5666 encontra-se catalogada no Herbário JPB/UFPB. O pó do caule seco e pulverizado foi submetido à maceração exaustiva com metanol durante 72 horas. Esse processo foi repetido por 4 vezes obtendo-se o extrato metanólico bruto. A solução extrativa foi concentrada em rotavapor sob pressão reduzida a uma temperatura de 35°C e então foi obtido o extrato metanólico bruto (500 g).

2.4 Preparações dos tecidos vasculares

Os ratos foram eutanasiados em câmara de CO_2 . Através de uma incisão no abdome do animal, retirou-se a artéria mesentérica superior. Anéis do primeiro segmento da artéria (1 - 2 mm) foram obtidos livres de tecido conjuntivo e adiposo (SILVA et al., 2011). Os anéis foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode, a 37°C e gaseificada com uma mistura de 95 % de O_2 e 5% de CO_2 (carbogênio). Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (DATAQ®, 2008, Insight, Brasil) acoplado a um sistema de aquisição (WinDaq/XL, DI 148-U, Insight, Brasil) para o registro das tensões isométricas. Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de 60 minutos de estabilização. Durante este tempo, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 min. para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

A presença de endotélio funcional foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de $1 \mu\text{M}$ de ACh. Foram considerados com endotélio presente, os anéis com relaxamento superior a 80% sobre a pré-contracção com $1 \mu\text{M}$ de FEN. Já os anéis com

relaxamentos inferiores a 10%, foram considerados com endotélio ausente. Os anéis sem endotélio vascular foram obtidos a partir do atrito entre as paredes internas do vaso com uma haste de metal (COX et al., 1989). Anéis com relaxamentos entre 10% e 80% foram descartados.

2.5 Protocolos Experimentais

2.5.1 Efeito de ETC em anéis mesentéricos pré-contraídos com FEN

Após um período de 60 minutos de estabilização das preparações, concentrações crescentes de ETC (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 e 300 µg/mL) foram adicionadas cumulativamente aos anéis pré-contraídos com FEN (1 µM). O efeito vasodilatador de ETC foi avaliado em anéis com o endotélio funcional intacto e anéis com o endotélio funcionalmente removido, e duas curvas concentração-resposta foram construídas, para então serem analisados os valores de da CE_{50} e efeito máximo ($E_{máx}$) de cada curva. A reversibilidade do extrato foi sistematicamente observada (dados não mostrados), para assegurar que o relaxamento não foi devido a danos na contractilidade e responsividade do tecido.

2.5.2 Efeito de ETC em anéis mesentéricos pré-contraídos com diferentes vasocontracturantes

Após um período de 60 minutos de estabilização das preparações, e após a confirmação da ausência do endotélio funcional como descrito no item 2.4, concentrações crescentes de ETC (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 e 300 µg/mL) foram adicionadas cumulativamente aos anéis pré-contraídos com 5-HT (1 µM) ou KCl (60 mM), separadamente. O efeito vasodilatador de ETC foi avaliado e duas curvas concentração-resposta foram construídas, para então serem analisados os valores de da CE_{50} e efeito máximo ($E_{máx}$) de cada curva.

2.5.3 Participação de canais para K^+ na resposta vasodilatadora induzida por ETC

Após a confirmação da ausência do endotélio funcional como descrito no item 2.4, a solução de Tyrode das cubas foi substituída pela solução despolarizante de Tyrode com KCl (20 mM) e as preparações permaneceram nesta solução até o final do experimento. Decorridos 30 minutos da incubação da solução de KCl (20 mM), foi induzida uma nova contração tônica com FEN (1 µM) e, em seguida, uma curva concentração-resposta para ETC (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 e 300 µg/mL) foi obtida.

2.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m) ou média ± intervalo de confiança (IC). As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando o $p < 0,05$. O teste t de Student não pareado foi utilizado nas análises estatísticas entre duas variáveis. Para as análises de mais de duas variáveis foi utilizado o teste ANOVA "one-way", seguida do pós-teste de Bonferroni. Nas curvas concentração-resposta, os valores de $E_{máx}$ (efeito máximo em porcentagem de relaxamento) e de CE_{50} (concentração responsável por induzir 50% do $E_{máx}$) foram obtidas por

regressão não linear. Os dados foram analisados no programa estatístico GraphPad Prism 5.0* (EUA).

3 RESULTADOS

3.1 Efeito vasodilatador induzido por ETC em anéis mesentéricos de animais SHR

A Figura 1 mostra a adição cumulativa de ETC (0,01-300 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica isolada de animais SHR, com endotélio funcional íntegro e pré-contraídos com FEN (1 µM), um agonista do receptor α_1 -adrenérgico. Pode-se observar que ETC induziu um relaxamento vascular dependente de concentração, com ($CE_{50} = 14.49$ (20.5 – 29.2) µg/mL; $E_{máx} = 110,11 \pm 2.4 \%$; $n = 7$). Após a remoção do endotélio vascular, o efeito vasorelaxante de ETC não foi alterado significativamente ($CE_{50} = 27.41$ (21.1 – 35.6) µg/mL; $E_{máx} = 116.7 \pm 8.0 \%$; $n = 7$; $p < 0.05$).

No final dos experimentos, a reversão do relaxamento produzido por ETC foi conseguida após 30 minutos de sua remoção das cubas por meio da troca de solução de Tyrode e verificação da reposta contrátil do tecido a FEN (1 µM), a qual induziu contrações de magnitude similar às induzidas antes da adição do composto em estudo. A reversibilidade foi sistematicamente observada, para assegurar que o relaxamento não foi devido a danos na contractilidade e responsividade tecidual.

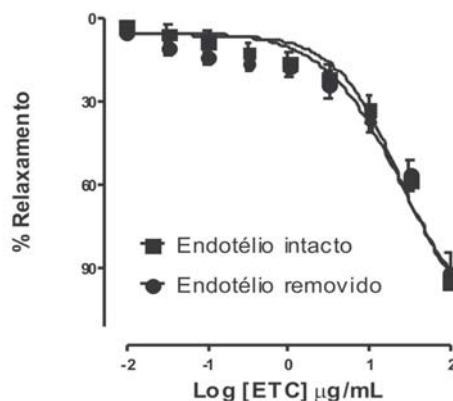


Figura 1– Efeito vasodilatador induzido por ETC. A) Registro original de um n representativo, ilustrando o relaxamento induzido por ETC; B) Curva concentração-resposta para o efeito vasodilatador induzido por concentrações crescentes de ETC (0,01-300 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animal SHR, com o endotélio intacto (%) ou endotélio removido (í%), pré-contraídos com FEN (1 µM). Os valores estão expressos com média ± e.p.m. de 7 experimentos para cada concentração.

3.2 Efeito de ETC sobre anéis pré-contraídos com 5-HT e KCl (60 mM)

A Figura 2 mostra que em anéis pré-contraídos com 5-HT (1 µM), ETC apresentou aumento na potência farmacológica, quando comparado aos anéis pré-contraídos com a FEN ($CE_{50} = 9.22$ (5.8 – 14.6) µg/mL; $n = 11$; $p < 0.001$), entretanto não houve diferença significativa em relação à resposta máxima ($E_{máx} = 112.97 \pm 3.5 \%$; $n = 11$; $p < 0.05$). Enquanto que, em anéis pré-contraídos com solução despolarizante de KCl (60 mM), a curva

concentração-resposta para ETC (0,01-300 $\mu\text{g/mL}$) não foi significativamente diferente à obtida em anéis pré-contraídos com FEN ($CE_{50} = 20.76 (16.2 - 26.6) \mu\text{g/mL}$; $E_{\text{máx}} = 106.94 \pm 3.6 \%$, $n = 8$; $p < 0.05$).

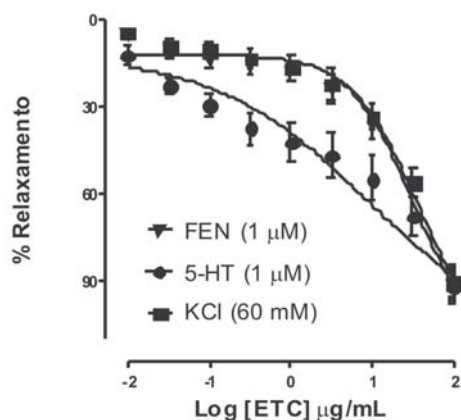


Figura 2 – Efeito vasodilatador induzido por ETC frente à diferentes estímulos contráteis. Curva concentração-resposta para o efeito vasodilatador induzido por concentrações crescentes de ETC (0,01-300 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animal SHR, com o endotélio funcional removido, em anéis pré-contraídos com: FEN (1 μM) (1%); 5-HT (1 μM) (¼%); ou KCl (60 mM) (1%). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. de 7, 11 e 8 experimentos para cada concentração, respectivamente.

3.3 Influência dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora induzida por ETC

Na Figura 3 pode ser observado que em anéis pré-contraídos com FEN (1 μM), na presença de uma solução de Tyrode com KCl (20 mM), a despolarização induzida pelo aumento da concentração de K^+ extracelular [K^+]_e para 20 mM, não induziu mudança significativa na curva concentração-resposta de ETC ($CE_{50} = 10.91 (6.9 - 17.1) \mu\text{g/mL}$; $E_{\text{máx}} = 108,77 \pm 5.9 \%$, $p < 0,001$).

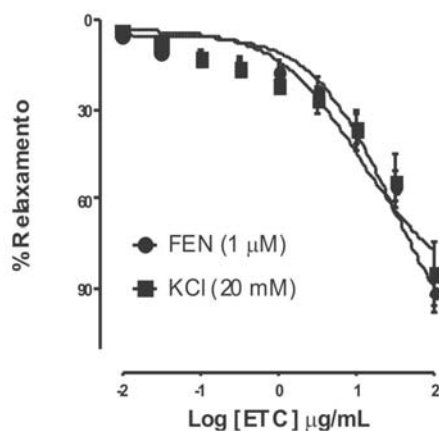


Figura 3 – Influência dos canais para K^+ no relaxamento induzido por ETC. Curva concentração-resposta para ETC (0,01-300 $\mu\text{g/mL}$) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN (1 μM), na presença de KCl (20 mM) (%). Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 experimentos.

4 DISCUSSÃO

O intuito deste estudo foi investigar o potencial vasodilatador do extrato metanólico de ETC, para isso, foram utilizados anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais SHR. As principais contribuições deste trabalho foram que o extrato de ETC induz relaxamento em anéis mesentéricos, demonstrando que esta espécie contém princípios ativos que apresentam interessante ação cardiovascular e, futuramente, podem ser isolados e identificados novos compostos desta espécie que sejam responsáveis pela ação vasodilatadora de ETC. Além disso, a resposta vasodilatadora induzida por ETC envolve uma via de sinalização intracelular que parece influenciar na concentração de Ca^{2+} citosólica.

O gênero *Erythroxylum* é conhecido por possuir alcalóides tropânicos como um dos seus principais constituintes (OLIVEIRA et al., 2011). A espécie *Erythroxylum pungens* revelou atividade vasodilatadora em anéis mesentéricos de ratos normotensos, por inibir o influxo de Ca^{2+} na célula vascular (OLIVEIRA et al., 2012). Devido a ausência de relatos na literatura sobre a atividade farmacológica da espécie ETC no sistema cardiovascular, é interessante o estudo sobre as ações deste extrato em tecido vascular isolado.

Então, o efeito de ETC foi avaliado em preparações de anéis de artéria mesentérica superior isolada de animal SHR. Em anéis com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN, ETC demonstrou uma ação vasodilatadora, dependente da concentração do extrato, como pode ser observado na Figura 1. Durante o protocolo experimental foi evidenciado que o tempo necessário para que fossem obtidas as respostas máximas para cada concentração de ETC variou entre 9 a 11 min. No final dos experimentos, a reversão do relaxamento produzida por ETC foi conseguida após 30 minutos de sua retirada das cubas por meio da troca de solução de Tyrode e verificação da reposta do tecido a FEN (1 μM), a qual induziu contrações de magnitude similar às induzidas antes da adição do composto em estudo. Isto sugere, em parte, que os princípios ativos presentes em ETC parecem induzir atividade relaxante se ligando a alvos biológicos de forma reversível.

Sabe-se que a camada endotelial vascular libera diversos fatores vasodilatadores e vasoconstritores que regulam o tônus do músculo liso vascular e, conseqüentemente, o fluxo sanguíneo local e a pressão arterial, desempenhando um importante papel na manutenção da homeostasia vascular (CAVALCANTE, 2009; REES; PALMER; MONCADA, 1989). Uma variedade de substâncias químicas (endógenas e exógenas) exerce atividade vasodilatadora por meio da participação funcional do endotélio (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; COHEN; VANHOUTTE, 1995; CHAUHAN et al., 2002).

Devido à importância da camada endotelial e sua influência na contratilidade vascular, o efeito de ETC foi investigado em anéis mesentéricos com endotélio ausente e pré-contraídos com FEN. Após a remoção do endotélio vascular, tanto a potência como a eficácia de ETC não foram alteradas significativamente em nenhuma das concentrações do extrato testadas (Figura 1). Estes dados sugerem que o efeito vasodilatador de ETC, em anéis de artéria mesentérica

superior isolada de animais SHR, provavelmente não envolve fatores vasoativos liberados pelo endotélio funcional. É possível que esta resposta seja devido à ação direta do extrato de ETC sobre o músculo liso arterial. Por isso, todos os experimentos posteriores foram realizados em anéis com endotélio funcional removido.

A FEN é um agonista seletivo dos receptores α_1 -adrenérgicos, os quais estão acoplados à proteína $G_{q/11}$. Quando ativados, estes receptores promovem a ativação da fosfolipase C do subtipo β (PLC β), enzima que catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP $_2$) em IP $_3$ e DAG. Por sua vez, o IP $_3$ promove liberação de Ca $^{2+}$ intracelular, enquanto que o DAG, juntamente com o Ca $^{2+}$ ativa a proteína cinase dependente de Ca $^{2+}$ (PKC). A PKC promove a fosforilação de enzimas envolvidas no processo de contração, provocando, assim, a contração muscular e sua manutenção (LAPORTE et al., 2004; THORNEOLE; NELSON, 2005).

Para avaliar a hipótese de que a resposta vasodilatadora de ETC seria devido a um antagonismo do extrato sobre o receptor α_1 -adrenérgico, foram utilizados anéis pré-contraídos com serotonina (5-HT), outro agonista com ação em receptores distintos dos α_1 -adrenérgico, um agonista do receptor serotoninérgico 5-HT $_2$. Este receptor também é acoplado à proteína $G_{q/11}$, e quando ativado na célula muscular lisa, provoca liberação de IP $_3$ e DAG, provocando contração no MLV também por aumentar os níveis de Ca $^{2+}$ intracelular (PYTLIAK et al., 2011).

Interessantemente, nestas condições experimentais, observou-se que ETC também foi capaz de atenuar as contrações induzidas por 5-HT, porém a potência farmacológica do extrato foi significativamente maior quando comparado aos anéis pré-contraídos com FEN, não havendo diferença significativa em relação à eficácia do extrato (Figura 2). Estes dados demonstram que a resposta vasodilatadora induzida por ETC parece não apresentar seletividade quanto ao receptor metabotrópico ativado.

Então, com a finalidade de observar o efeito de ETC frente às contrações geradas por estímulos independentes da ativação de receptor na membrana plasmática, foram utilizadas preparações pré-contraídas com solução despolarizante de KCl (60 mM). A literatura relata que contrações induzidas por altas concentrações extracelulares de K $^+$ são mediadas por uma despolarização de membrana e conseqüente aumento do influxo de Ca $^{2+}$ através dos canais de Ca $^{2+}$ dependentes de voltagem (Ca $_v$) (GODFRAIND; KABA, 1969; SANTOS, 2007). Além disso, essa contração sustentada gerada por alta concentração de K $^+$ externo, também pode ser mediada por liberação de Ca $^{2+}$ do retículo sarcoplasmático (KOBAYASHI; KANAIDE; NAKAMURA, 1985 e 1986; RATZ; BERG, 2007), isto provoca a entrada de mais íon Ca $^{2+}$ através de canais operados por estoque (SOC) e/ou canais potencial receptor transiente (TRP) (AY et al., 2004; FELLNER; ARENDSHORST, 2000; USACHEV; THAYER, 1999).

A Figura 2 mostra que tanto a potência quanto a eficácia farmacológica de ETC frente à contração induzida por KCl (60mM) não foram significativamente

alteradas, em relação ao efeito vasodilatador em anéis pré-contraídos com FEN. Estes resultados demonstram que a ação de ETC parece influenciar uma via de sinalização comum aos três agentes vasocontracturantes utilizados, provavelmente por alterar a concentração de Ca $^{2+}$ citosólica.

Outra importante via de sinalização celular que pode ser ativada diretamente no músculo liso vascular para promover relaxamento é a ativação de canais para K $^+$. A ativação e conseqüente abertura destes canais, na célula lisa vascular, resultam em difusão do íon K $^+$ para fora da célula, pois a concentração de K $^+$ no meio intracelular é mais elevada em relação ao meio extracelular (KO et al., 2008; LAWSON, 2000). O efluxo desses íons induz uma mudança do potencial de membrana para valores mais negativos (repolarização ou hiperpolarização), o que gera vasodilatação, devido ao bloqueio dos Ca $_v$ (NELSON; QUAYLE, 1995; HADDY et al., 2006).

Então, a fim de descartar a possibilidade do efeito de ETC envolver a ativação direta de canais para K $^+$, a concentração deste íon no meio extracelular foi alterada de 4 para 20 mM. Nesta concentração, o KCl (20 mM) reduz o gradiente eletroquímico para o efluxo do K $^+$, e este bloqueio parcial do efluxo de K $^+$ ocorre porque o potencial de equilíbrio do K $^+$ (em torno de -84 mV a -52 mV) é deslocado para valores mais próximos do potencial de membrana no repouso dos miócitos (em torno de -60 a -40 mV), atenuando relaxamentos mediados por abertura de canais para K $^+$ (CLARK; FUCHS, 1997; CAMPBELL et al, 1996; EDWARDS et al., 2010).

Nestas condições experimentais, utilizando anéis pré-contraídos com FEN, na presença de 20 mM de KCl extracelular, a curva concentração-resposta para ETC não foi significativamente modificada (Figura 3). Estes dados sugerem que o extrato de ETC parece não exercer seu efeito vasodilatador por ativação dos canais para K $^+$ no MLV.

5 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que ETC promove vasodilatação em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animal SHR, de maneira independente da presença do endotélio vascular. Os efeitos vasculares induzidos por este extrato são mais potentes em situação de tônus contraído induzido por ativação de receptores serotoninérgicos, quando comparados a outros vasocontracturantes, demonstrando certa seletividade pela sinalização celular serotoninérgica. Além disso, ETC parece induzir diminuição da concentração de Ca $^{2+}$ no meio intracelular na célula muscular lisa vascular, mas novos ensaios serão necessários para confirmar tal hipótese.

6 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo apoio financeiro.

7 REFERÊNCIAS

AGUIAR, J. S. et al. Antimicrobial, antiproliferative and proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. *Int. J. Mol. Sci.*, Basel, v. 13, n. 4, p. 4124-4140, 2012.

- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 219, n. 6, p. 1698-1705, 1970.
- AY, B. et al. Store-operated Ca^{2+} entry in porcine airway smooth muscle. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, Stanford, v. 286, n. 5, p. 909-917, 2004.
- CAMPBELL, W. B. et al. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circ. Res.**, Dallas, v. 78, n. 3, p. 415-423, 1996.
- CHAUHAN, S. et al. NO contributes to EDHF-like responses in rat small arteries: a role for NO stores. **Cardiovasc. Res.**, London, v. 57, n. 1, p. 207-216, 2003.
- COGOLLUDO, A.; VIZCAÍNO-PÉREZ, F.; TAMARGO, J. New insights in the pharmacological therapy of arterial hypertension. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, Cambridge, v. 14, n. 5, p. 423 - 427, 2005.
- EDWARDS, G; FÉLÉTOU, M; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. **Eur. J. Physiol.**, Cambridge, v. 459, n. 6, p. 863-879, 2010.
- HADDY, F. J.; VANHOUTTE, P. M.; FELETOU, M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, Bethesda, v. 290, n. 3, p.546-552, 2006.
- KHATTAK, K. F., et al. New Alkaloids from *Erythroxylum moonii*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 65, n. 6, p. 929-931, 2002.
- KO, E. A. et al. Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth muscle cells. **J Smooth Muscle Res.**, Hirosaki, v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008.
- MCNEILL, J. R.; JURGENS, T. M. A systematic review of mechanisms by which natural products of plant origin evoke vasodilatation. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v. 84, n. 8-9, p. 803 - 821, 2006.
- OLIVEIRA, S. L. et al. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman. **Chem. Biodivers.**, Zürich, v. 8, n. 1, p. 155-165, 2011.
- OLIVEIRA, A. C. et al. *Erythroxylum pungens* elicits vasorelaxation by reducing intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells of rats. **Rev. Bras. Farmacogn.**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 436-442, 2012.
- PYTLIAK, M. et al. Serotonin Receptors – From Molecular Biology to Clinical Applications. **Physiol. Res.**, Praha, v. 60, n. 1, p. 15-25, 2011.
- RATZ, P. H; BERG, K. M. 2-Aminoethoxydiphenyl borate inhibits KCl-induced vascular smooth muscle contraction. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 541, n. 3, p. 177-183, 2006.
- SANTOS, M. R. V. et al. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**, Milano, v. 78, n. 3, p. 186-191, 2007.
- SILVA, D. F. et al. Rotundifolone-induced relaxation is mediated by BK_{Ca} channel activation and Ca_v channel inactivation. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v. 109, n. 6, p. 465-475, 2011.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 8-11, 2010.
- TAHVANAINEN, A. et al. Increased wall tension in response to vasoconstrictors in isolated mesenteric arterial rings from patients with high blood pressure. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v. 99, n. 6, p. 440-449, 2006.
- THORNEOLE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v. 83, n. 3, p. 215-242, 2005.
- USACHEV, Y. M., THAYER, S. A. Ca^{2+} influx in resting rat sensory neurons that regulates and is regulated by ryanodine-sensitive Ca^{2+} stores. **J. Physiol.**, London, v. 519, n. 15, p. 115-130, 1999.