



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG

Coordenadoria Geral de Pesquisa – CGP

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bloco 06 – Bairro Ininga

Cep: 64049-550 – Teresina-PI – Brasil – Fone (86) 215-5564 – Fone/Fax (86) 215-5560

E-mail: pesquisa@ufpi.br; pesquisa@ufpi.edu.br

**EFEITO VASORELAXANTE DO MONOTERPENO α -TERPINEOL EM ARTÉRIA
MESENTÉRICA DE RATOS HIPERTENSOS L-NAME**

Edson Santos Ferreira Filho (bolsista do PIBIC/UFPI), Nelma Neylanne Pinho Muniz Oliveira (colaboradora, NPPM/CCS/UFPI), José Couras da Silva Filho (colaborador, NPPM/CCS/UFPI), Marco Philipe Teles Reis Ponte (colaborador, NPPM/CCS/UFPI), Daniel Dias Rufino Arcanjo (colaborador, Depto. Biofísica e Fisiologia/CCS/UFPI), Rita de Cássia Meneses Oliveira (co-orientadora, Depto. Biofísica e Fisiologia /CCS/UFPI), Aldeídia Pereira de Oliveira (orientadora, UFPI-CAFS)

INTRODUÇÃO.

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. Condição de alta prevalência e baixas taxas de controle, é um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública¹. Estudos com modelos animais têm-se mostrado bastante úteis no entendimento e tratamento de doenças cardiovasculares. O monoterpeneo α -terpineol é encontrado em uma grande variedade de plantas² e possui diversas atividades biológicas: antimicrobiana³, vasorelaxante^{4,5} e hipotensora em animais normotensos⁵. No entanto, sua atuação sobre o sistema cardiovascular de animais hipertensos ainda é desconhecida. Dessa forma, o objetivo deste estudo é investigar o efeito do monoterpeneo α -terpineol sobre a musculatura lisa vascular de anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos L-NAME, elucidando os possíveis mecanismos de ação envolvidos nas respostas obtidas.

METODOLOGIA.

Todos os protocolos foram aprovados pelo CEEA da UFPI (Protocolo nº 083/2010). Foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), pesando 250-300 g, provenientes do Biotério do NPPM/UFPI, mantidos sob condições controle de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à alimentação e água. A hipertensão arterial foi induzida com N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, 50 mg/kg) adicionado à água de beber dos animais durante sete dias, tempo suficiente para instalação da hipertensão arterial⁶. Após eutanásia, a artéria mesentérica superior foi retirada e seccionada em anéis (1-2 mm) livres de tecido conectivo e adiposo. Daí, foram mantidos em solução de Tyrode (pH 7,4; 37 °C), aerados por carbogênio (95% O₂ + 5% CO₂), suspensos em hastes de aço inoxidável e linhas de algodão e fixados a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição (AECAD 1604, AQCAD 1.4.6, AVS Projetos, SP) para registro das tensões isométricas. Após estabilização (0,75 gf, 60 min), verificou-se a presença do endotélio por meio da adição cumulativa de acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M), sobre a pré-contracção com fenilefrina (10

μM); para um relaxamento superior a 60% foram considerados anéis com endotélio; relaxamento inferior a 10%, sem endotélio^{7,8}. Depois disso, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (10 μM) ou KCl (80 mM). Na fase tônica da contração, foram administradas concentrações cumulativamente crescentes de α -terpineol (10^{-10} – 10^{-2} M) para obter curvas concentrações-resposta. Para avaliar a resposta contrátil da fenilefrina na presença de concentrações isoladas do monoterpene, obteve-se uma primeira curva controle com a fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M); em seguida, as preparações foram lavadas e, ao retorno dos valores do tônus basal, incubaram-se, por 30 minutos, separadamente, concentrações de α -terpineol (10^{-4} M, 3×10^{-4} M, 10^{-3} M, 3×10^{-3} M, 10^{-2} M) e, depois, as preparações foram novamente submetidas a uma adição cumulativa de fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) para obtenção de uma segunda curva concentração-resposta. Em seguida, fizeram-se experimentos de adição cumulativa de CaCl_2 (10^{-6} – 3×10^{-2} M) na presença de concentrações isoladas de α -terpineol (10^{-4} M, 3×10^{-4} M, 10^{-3} M, 3×10^{-3} M). O envolvimento de canais para cálcio também foi verificado com a adição de α -terpineol (10^{-10} – 10^{-2} M) sobre a pré-contração com S(-)-Bay K 8644 (10^{-7} M), ativador de canais de cálcio sensíveis a voltagem do tipo L (Ca_vL). Ainda, verificou-se o envolvimento de canais para potássio no efeito vasorelaxante de α -terpineol com a realização de protocolos em solução de Tyrode KCl 20 mM. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. Utilizou-se teste “t” de Student para avaliar a significância entre as médias. Os valores de pD_2 – cologarítmo da concentração que promove 50% da resposta máxima – foram obtidos através de regressões não-lineares das curvas traçadas a partir dos valores percentuais das respostas obtidas pelas substâncias testadas para os experimentos *in vitro*. As diferenças entre os valores foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Em todos estes procedimentos, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.03.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

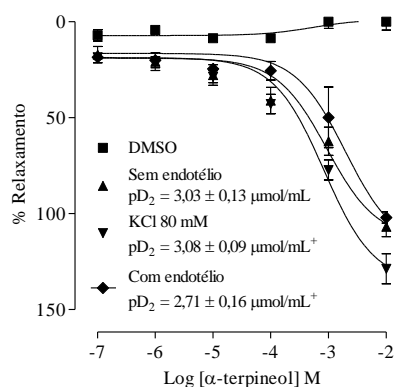


FIGURA 1 - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante de α -terpineol em anéis obtidos de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos L-NAME com (\blacklozenge) ou sem (\blacktriangle) endotélio funcional após contração por fenilefrina e por KCl 80 mM (\blacktriangledown) em anéis sem endotélio. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos. [†] $p > 0,05$ versus “sem endotélio”.

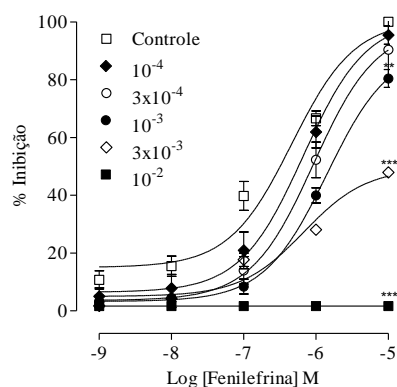


FIGURA 2 - Curvas concentração-resposta para fenilefrina na presença de concentrações isoladas do monoterpene α -terpineol: Controle (\square); 10^{-4} M (\blacklozenge); 3×10^{-4} M (\circ); 10^{-3} M (\bullet); 3×10^{-3} M (\diamond); 10^{-2} M (\blacksquare) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio funcional. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m de 5 experimentos, respectivamente. ^{**} $p < 0,01$; ^{***} $p < 0,001$ versus controle.

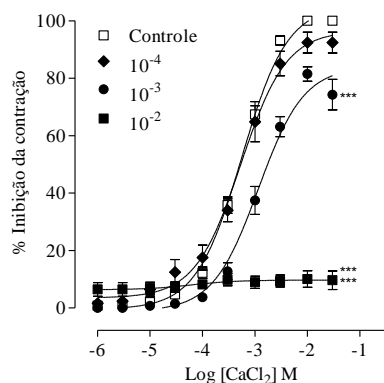


FIGURA 3 - Curvas concentração-resposta para CaCl_2 na presença de concentrações isoladas do monoterpene α -terpineol: Controle (\square); α -terpineol 10^{-4} M (\blacklozenge); α -terpineol 3×10^{-4} M (\circ); α -terpineol 10^{-3} M (\bullet); α -terpineol 3×10^{-3} M (\diamond); α -terpineol 10^{-2} M (\blacksquare) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio funcional. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m de 5 experimentos, respectivamente. *** $p < 0,001$ versus controle.

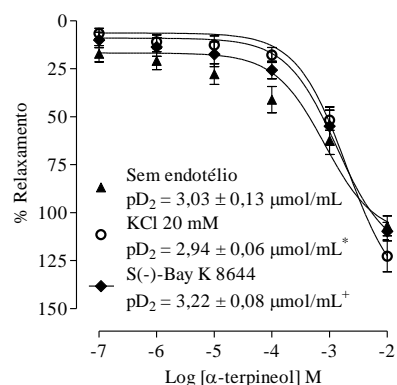


FIGURA 4 - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante de α -terpineol em anéis sem endotélio vascular obtidos de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos L-NAME após contração por fenilefrina (\circ) e por S(-)-Bay K 8644 (\diamond) em solução de KCl 20 mM. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos. * $p < 0,05$ versus "sem endotélio".

O principal achado deste estudo foi o de que o monoterpene α -terpineol induz efeito vasorelaxante dependente de concentração e independente do endotélio vascular em preparações de artéria mesentérica superior de ratos hipertensos L-NAME, provavelmente envolvendo o bloqueio de canais para cálcio e abertura de canais para potássio.

Para verificar o efeito vasorelaxante do α -terpineol sobre a musculatura lisa vascular de ratos hipertensos L-NAME, utilizou-se fenilefrina, um agonista dos receptores α_1 -adrenérgicos, que induz liberação de cálcio dos estoques intracelulares sensíveis a IP_3 e aumento do influxo de cálcio através dos canais para cálcio operados por receptor, gerando um processo contrátil⁹. Nessas condições, observou-se que α -terpineol induziu um potente efeito vasorelaxante dependente de concentração e independente do endotélio vascular (FIGURA 01), sugerindo que os FRDE provavelmente não estão envolvidos nessa resposta. Em preparações pré-contraídas com KCl 80 mM, um agente despolarizante, observou-se também que α -terpineol foi capaz de promover vasodilatação de maneira dependente de concentração, permitindo sugerir que ele promova alguma ação sobre o influxo de cálcio através da membrana celular. Observou-se também que concentrações mais altas deste composto foram capazes de inibir as contrações induzidas por fenilefrina de maneira dependente de concentração (FIGURA 02); pode-se, assim, aventar a hipótese de que aja sobre a liberação de cálcio dos estoques intracelulares, inibindo-a, ou inibindo o influxo de cálcio através da membrana. Para elucidar isto, utilizaram-se curvas concentração-resposta com cloreto de cálcio em meio nominalmente sem cálcio, antes e após a incubação com α -terpineol. Nessas condições, ele atenuou significativamente as contrações induzidas com CaCl_2 (FIGURA 03), sugerindo uma inibição desse influxo de cálcio. Mais que isso, haveria uma ação direta do α -terpineol sobre os Ca_vL , que promove vasodilatação em anéis mesentéricos contraídos com S(-)-Bay K 8644, agonista direto de Ca_vL ¹⁰ (FIGURA 04). Por fim, o envolvimento de canais para potássio foi testado em outra série de experimentos, em solução de KCl 20 mM. Dado que houve uma atenuação do efeito vasorelaxante

de α -terpineol (FIGURA 04), pode-se sugerir que a modulação do efluxo de K^+ participe na resposta vasorelaxante do monoterpeno¹¹.

CONCLUSÃO.

O monoterpeno α -terpineol induz efeito vasorelaxante dependente de concentração e independente do endotélio vascular em preparações de artéria mesentérica superior de ratos hipertensos L-NAME, provavelmente envolvendo o bloqueio de canais para cálcio sensíveis a voltagem tipo L (Ca_vL) e a abertura de canais para potássio.

APOIO. CNPq. CAPES. FAPEPI. UFPI.

REFERÊNCIAS

1. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA / SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO / SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq. Bras. Cardiol.** 2010; 95(1 supl.1): 1-51.
2. FEITOSA, EMA; ARRIAGA, AMC; SANTIAGO, GMP; LEMOS, TLG; OLIVEIRA, MCF; VASCONCELOS, JN; LIMA, JQ; MALCHER, GT; NASCIMENTO, RF; BRAZ-FILHO, R. Chemical Composition and Larvicidal Activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **J. Braz. Chem. Soc.** 2009;20(2):375-378.
3. CHA, JD; EUN-KYUNG J; BONG-SEOP K; KYUNG-YEOL L. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil from *Artemisia feddei*. **J. Microbiol. Biotechnol.** 2007;17(12):2061-2065.
4. MAGALHÃES, PJ; LAHLOU, S; JUCÁ, DM; COELHO-DE-SOUZA, LN; DA FROTA, PT; DA COSTA, AM; LEAL-CARDOSO JH. Vasorelaxation induced by the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. **Fundam. Clin. Pharmacol.** 2008;22(2):169-177.
5. RIBEIRO, TP; PORTO, DL; MENEZES, CP; ANTUNES, AA; SILVA, DF; DE SOUSA, DP; NAKAO, LS; BRAGA, VA; MEDEIROS IA. Unravelling the cardiovascular effects induced by alpha-terpineol: a role for the nitric oxide-cGMP pathway. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 2010;37(8):811-816.
6. DANANBERG, J; SIDER, RS; GREKIN, RJ. Sustained hypertension induced by orally administered nitro-L-arginine. **Hypertension.** 1993;21(3):359-363.
7. FURCHGOTT, RF; ZAWADZKI, JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.** 1980;288(5789):373-376.
8. PRIVIERO, FB; TEIXEIRA, CE; CLAUDINO, MA; DE NUCCI, G; ZANESCO, A; ANTUNES, E. Vascular effects of long-term propranolol administration after chronic nitric oxide blockade. **Eur. J. Pharmacol.** 2007;571(2-3):189-196.
9. KARAKI, H; WEISS, GB. Calcium release in smooth muscle. **Life Sci.** 1988;42(2):111-122.
10. BARRÚS, MT; REVIRIEGO, J; MARÍN, J. Effect of the Ca^{2+} -channel agonist Bay K 8644 on the contractile responses in human placental veins. **J. Auton. Pharmacol.** 1996;16:161-167.
11. CLARK, SG; FUCHS, LC. Role of nitric oxide and Ca^{++} -dependent K^+ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1997;282(3):1473-1479.

PALAVRAS-CHAVE. Vasodilatação. Artéria mesentérica. Hipertensão L-NAME. α -terpineol.