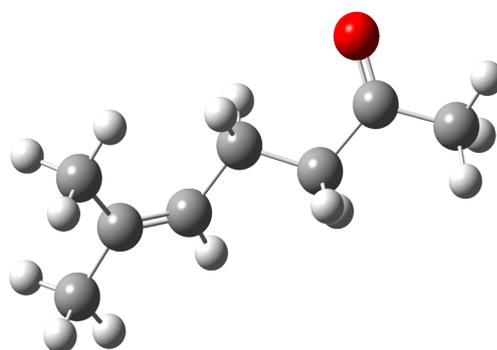




**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MÁRCIO EDIVANDRO PEREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA EM CÉLULAS *A7r5* E ANTI-HIPERTENSIVA EM
RATOS SHR INDUZIDO PELA 6-METIL-5-HEPTEN-2-ONA (SULCATONA)**



TERESINA

2019

MÁRCIO EDIVANDRO PEREIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA EM CÉLULAS A7r5 E ANTI-HIPERTENSIVA EM
RATOS SHR INDUZIDO PELA 6-METIL-5-HEPTEN-2-ONA (SULCATONA)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA.

Orientadora: Profa. Dra. ALDEÍDIA PEREIRA DE OLIVEIRA

Supervisora: Profa. Dra. DÉBORA REJANE FIOR CHADI

TERESINA

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Divisão de Processos Técnicos

S237a Santos, Márcio Edivandro Pereira dos
Avaliação citotóxica em células A7r5 e anti-hipertensiva em ratos
SHR induzido pela 6-metil-5-hipten-2-ona (sulcatona) / Márcio Edivandro
Pereira dos Santos. – 2019.
202 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de
Tecnologia , Doutorado em Biotecnologia, Teresina, 2019.
Orientação:” Prof^ª. Dr^ª. Aldeídia Pereira de Oliveira “

1. Células. 2. Citotóxica. I. Título.

CDD 571.6

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Candidato: MÁRCIO EDIVANDRO PEREIRA DOS SANTOS

Título da Tese: AVALIAÇÃO CITOTÓXICA EM CÉLULAS A7r5 E ANTI-HIPERTENSIVA EM RATOS SHR INDUZIDO PELA 6-METIL-5-HEPTEN-2-ONA (SULCATONA)

BANCA EXAMINADORA

Examinador Externo:

Assinatura:.....

Nome: Dr. JOÃO PAULO JACOB SABINO

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

Examinador Externo:

Assinatura:.....

Nome: Dra. ROSIMEIRE FERREIRA DOS SANTOS

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

Presidente:

Assinatura:

Nome: Dra. ALDEÍDIA PEREIRA DE OLIVEIRA

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

Examinador Externo:

Assinatura:.....

Nome: Dr. GUILHERME BARROSO LANGONI DE FREITAS

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

Examinador Interno:

Assinatura:.....

Nome: Dr. JOAO MARCELO DE CASTRO E SOUSA

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

DEDICATÓRIAS

Aos meus amados pais Edival Álvaro dos Santos e Sandra Lúcia Pereira dos Santos pelo seu grande amor e carinho, por acreditar em meu potencial e pelo constante incentivo, amo vocês.

A minha irmã Marcela Mauade Pereira dos Santos pela amizade, companheirismo e força nessa jornada.

A minha Orientadora Profa Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira frente a seus ensinamentos e constante incentivo e força.

A minha Supervisora Prof. Dra. Débora Rejane Fior Chadi, por acreditar e me receber tão bem no seu laboratório no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

A uma pessoa em especial (Jonas Job Diniz) por estarmos juntos há um ano e nove meses que estava morando em São Paulo, obrigado imensamente pelo carinho, amor, respeito dedicado a mim nesse tempo ao meu lado, me entendendo e me apoiando.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Um vencedor é apenas um perdedor que tentou mais uma vez.”

George M. Moore Jr.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as realizações e conquistas, por me fazer capaz de chegar a este dia dando-me sempre forças perante as dificuldades.

À minha orientadora Profa. Dra. Aldeídia Pereira de Oliveira pela orientação e constante presença, ensinamentos, paciência, amizade e carinho dispensados.

À Profa Dra. Débora Rejane Fior Chadi pelo carinho, dedicação, incentivo e ter disponibilizado seu laboratório no Instituto de Biociências/USP para realização de todo projeto da Tese de Doutorado.

À Profa Dra. Regina Markus por ter cedido materiais e reagentes para realização do trabalho.

Aos Profs. Doutores (Prof. João Paulo Jacob Sabino, Rita de Cássia Meneses de Oliveira, Rosimeire Ferreira dos Santos) que fizeram parte da banca de qualificação pelas grandes contribuições à execução do trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia – RENORBIO por proporcionar o curso de doutorado para que possamos nos aperfeiçoar e aprender muito nesses anos contribuindo dessa forma para nossa formação bem como a todos os professores que fazem parte do programa pela contribuição e ensinamentos dedicados.

Ao Sr. Carlos Alberto de Deus, Sra. Renata Alves dos Santos e Sr. Henrique Mattos pelo exímio cuidado dispensado ao biotério do NPPM/UFPI e do IB/USP, de extrema importância para o êxito dos trabalhos experimentais.

Aos amigos que conquistei no NPPM, alunos de doutorado, mestrado e iniciação científica durante esses anos.

Aos meus grandes amigos e colegas de trabalho que conquistei na USP: Ewerton Sousa, Edson Duarte, Izabella Trevisan, Débora do Santos, Carol Quiles, Marlina Córdoba Moreno, Daniela Dantas, Sandra Márcia Muxwell, Ricardo Andrade Zampier, Stephanie Acuna, Otoniel Lima, Thaís Walter.

Aos grandes amigos que contribuem para toda organização do Instituto de Biociências/USP: Débora Moura, Márcio de Patto, Rosely Silva Santos, Catherine Rocha.

A minha família de modo geral principalmente minhas tias Regina e Clélia e meus primos por todo carinho creditado a mim e constante incentivo.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo concedimento da Bolsa de Doutorado Sanduíche no País; Processo N - 300261/2018-7.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), suporte técnico através do Portal de Periódicos.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) – Projeto PPSUS-DCIT 2016/FAPEPI/CNPq pelo apoio financeiro ao desenvolvimento desse trabalho.

Ao IFPI (Instituto Federal do Piauí) por ter me liberado dos meus afazeres na instituição para realização da minha Tese de Doutorado.

À Universidade Federal do Piauí e a Universidade de São Paulo (IB/USP - Instituto de Biociências), pelo subsídio à realização deste trabalho, aliado a seu potencial científico e tecnológico.

À todos que direta ou indiretamente incentivaram e participaram da produção desta tese.

Márcio Edivandro Pereira dos Santos

RESUMO

A pressão arterial elevada (PA), comumente chamada de hipertensão, é um importante problema de saúde mundial. Estatísticas epidemiológicas nos revelam que cerca de 45 a 55% dos homens e 45 a 65% das mulheres em faixas etárias entre 45 e 70 anos apresentam algum fator de risco para o desenvolvimento da hipertensão. O uso de drogas anti-hipertensivas busca reduzir derrames, infartos do miocárdio e insuficiência cardíaca. A Sulcatona é encontrada em frutas cítricas, está presente no óleo de citronela, é um ingrediente aromatizante pertencente à classe dos hemiterpenos e também é considerada um feromônio de insetos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a biomolécula Sulcatona (6-metil-5-hepten-2-ona) caracterizando seu potencial citotóxico em células *A7r5* e ação anti-hipertensiva em animais SHR e WKY, avaliando o mecanismo de ação envolvidos. Os testes de citotoxicidade foram realizados em células *A7r5* (BCRJ 0034), utilizando o teste de viabilidade celular MTT nos tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação. Os resultados demonstraram que nos testes de citotoxicidade a Sulcatona não promoveu morte celular nas concentrações de 10^{-10} a 10^{-3} M, somente na maior concentração de 10^{-2} M demonstrou caráter citotóxico, podendo ressaltar que nas outras concentrações analisadas a Sulcatona aumentou a viabilidade celular, podendo sugerir que ela não apresenta atividade citotóxica nas concentrações de 10^{-10} a 10^{-3} M, sobre as células dos músculo liso vascular. Nos experimentos da atividade anti-hipertensiva utilizou-se ratos Wistar kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR). Os valores basais Pressão arterial média (PAM) e de Frequência Cardíaca (FC) dos animais foram (WKY: PAM: $104,5 \pm 2,26$; FC: $302,6 \pm 11,89$; e SHR: PAM: $161,9 \pm 4,0$; FC: $332,4 \pm 11,09$ respectivamente). A administração venosa de Sulcatona induziu uma acentuada hipotensão; $-14,72 \pm 0,89$ mmHg seguida de uma resposta taquicárdica nas doses (12,5 e 25 mg/kg) e uma bradicardia na dose (50mg/kg) em ambos os modelos (WKY: $18,55 \pm 1,62$; $-29,68 \pm 1,18$; $-52,45 \pm 1,18$ mmHg e SHR: ($-14,72 \pm 0,89$; $-20,44 \pm 1,09$; $-39,59 \pm 2,31$ mmHg), efeitos estes que duraram cerca de 10–15 s. Após os bloqueios como o bloqueio com atropina observou-se uma atenuação da PAM e praticamente aboliu a FC de animais WKY e SHR em todas as doses. A Sulcatona na dose de 50 mg/kg atenuou a hipotensão e reverteu a bradicardia na presença de ioimbina. O bloqueio da No-sintase com L-Name reduziu a PAM nas doses de 25 e 50 mg/kg e a FC foi revertida na maior dose em animais WKY. A Sulcatona na forma livre (100 mg/kg, v.o.) não foi capaz de diminuir a PA em SHR porém Sulcatona/ β -CD na dose de (200 mg/kg, v.o) reduziu a PA após 2 h com tempo de ação de 3 horas quando comparado com o controle. Em relação a atividade da Sulcatona sobre os receptores de adenosina A_{2A} em células *A7r5*, verificamos a presença deste receptor nessas células através de rt-qPCR. Para averiguar a ação da Sulcatona sobre os receptores A_{2A} e a enzima CYP1B1, utilizamos o *In-Cell Western-Blotting* na qual verificamos que a Sulcatona aumentou a expressão desse receptor de forma dependente de concentração (10^{-6} a 10^{-3} M), e observou-se também que a Sulcatona alterou a expressão da enzima CYP1B1 no estado basal. Assim todos os resultados nos permite concluir que, Sulcatona possui ação anti-hipertensiva envolvendo a participação dos receptores muscarínicos e α 2-adrenérgicos e da enzima NO-sintase, demonstrou-se também a presença dos receptores de adenosina A_{2A} em células de músculo liso vascular (*A7r5*), bem como, que a Sulcatona age diretamente ou modulando os receptores de adenosina A_{2A} em células de músculo liso vascular (*A7r5*) e no estado basal a sulcatona foi capaz de atenuar a expressão da enzima CYP1B1 na concentração de 10^{-5} M. Os resultados obtidos neste estudo são promissores, e nos impulsiona a continuar a investigação dos mecanismos de ação da Sulcatona na patologia da hipertensão arterial e doenças cardiovasculares.

Palavras-chaves: hipertensão, citotoxicidade, sulcatona, SHR, células *A7r5*, receptores A_{2A}

ABSTRACT

High blood pressure (BP), commonly called arterial hypertension, is an important international health problem. Systemic arterial hypertension (SBP) is at least 140 mmHg or it is systemic arterial pressure (DBP) of at least 90 mmHg or both. The main goal of antihypertensive treatment is for strokes, myocardial infarctions and heart failure. Thus, a new synthetic molecule called sulcatone or 6-methyl-5-hepten-2-one evaluated in its antihypertensive activity in SHR and WKY animal models is solved. Sulcatone is found in citrus fruits, is present in citronella oil and is a flavoring component of the family of Hemiterpenes. In the cytotoxicity tests with the MTT assay sulcatone did not cause cell death at concentrations of 10^{-3} to 10^{-10} M, only at the highest concentration of 10^{-2} M it was cytotoxic. Regarding the cardiovascular limits, the sulcatone administered i.v. and small doses (12.5 and 25 mg/kg) and bradycardia at the highest dose (50mg/kg) in both animal models were used. Effect that after the pressure of pharmaceutical compounds has been the effect of the block of fungicide the fall of the PAM and practically abolished to FC of animals WKY and SHR in all the doses, the Sulcatona in dose of 50 mg/kg attenuated a hypotension and reversed bradycardia after yohimbine blockade. And after L-name blockade the WKY animals had a dose reduction of 25 and 50 mg/kg and HR were reversed at the higher dose. Sulcatone in pure form was not able to lower blood pressure in SHR animals, but the Sulcatone/ β -CD complex at the dose of 200 mg / kg reduced blood pressure from 2 hours after oral administration of a 3-hour action time when compared to the control. In this way, we can conclude that the pharmacological tests can be submitted to those that may be present in muscarinic, α_2 -adrenergic receptors and NO production in WKY and SHR animal models leading to blood pressure drop. In view of the biotechnological apparatus used, a complexation of Sulcatone/ β -CD, an antihypertensive effect was observed at a dose of 200mg / kg orally when compared to the control, which was not done only with the use of free sulcatone. Thus, it may be necessary to add an antihypertensive improved Sulcatone/ β -CD solution in SHR animal models, thus successively, in a solubility of the substance tested. Regarding the activity of Sulcatone on adenosine A_{2A} receptors in *A7r5* cells we verified the presence of this receptor in these cells through the rt-qPCR technique. To verify the action of Sulcatone on A_{2A} receptors and CYP1B1 enzyme, we used In-Cell Western Blotting in which we found that sulcatone increased expression of this receptor in a concentration-dependent manner (10^{-6} to 10^{-3} M), however. Sulcatone was unable to alter the expression of CYP1B1 enzyme at baseline. Thus, the results show that we verify the presence of A_{2A} adenosine receptors in vascular smooth muscle cells (*A7r5*), as well as sulcatone acts directly or modulating adenosine A_{2A} receptors in vascular smooth muscle cells (*A7r5*) at all concentrations. which were used (10^{-6} to 10^{-3} M) and in the basal state sulcatone was able to attenuate the expression of CYP1B1 enzyme at a concentration of 10^{-5} M.

Keywords: hypertension, cytotoxicity, Sulcatone, SHR, *A7r5* cells, A_{2A} receptors

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 01: REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 01 - Etiologia do Processo Inflamatório.....	35
FIGURA 02 - Regulação do Sistema Nervoso Autônomo na Função Cardíaca.....	37
FIGURA 03 - Representação Esquemática do Barorreflexo Arterial.	39
FIGURA 04 - Modelo anatômico e estrutura do NTS.....	41
FIGURA 05 - Localização anatômica do núcleo do trato solitário (NTS), da medula ventrolateral rostral (RVLM) e medula ventrolateral caudal (CVLM).....	42
FIGURA 06 - Formação de um complexo de inclusão de ciclodextrina numa solução aquosa e automontagem de complexos de ciclodextrina.....	54
FIGURA 07 - Distribuição relativa de ciclodextrinas usadas em medicamentos comercializados.....	56
FIGURA 08 - Fórmula estrutural da Sulcatona.....	57
FIGURA 09 - Biosíntese simplificada da Sulcatona a partir de terpenóides.....	58
FIGURA 10 - Espectros de IV do complexo de inclusão (a), Sulcatona (b), Mistura física (c) e β -CD (d).....	61
FIGURA 11 - Difratoogramas de β -CD, complexo de inclusão e mistura física.....	62
FIGURA 12 - Efeito hipotensor da Sulcatona (SU) e do Complexo Sulcatona/ β -CD (SU- β -CD) sobre a PAM em ratos normotensos (Wistar) não-anestesiados.	64
CAPÍTULO 02: AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DA 6-METIL-5-HEPTEN-2-ONA (SULCATONA) EM CÉLULAS DE LINHAGEM A7r5	
FIGURA 13 - Estruturas do MTT e o produto colorido formado formazan.....	89
FIGURA 14 - Aparato e técnica para contagem celular. A – Câmara de Neubauer; B – Esquema da câmara de Neubauer; C- Contagem em ziguezague; D- Esboço da contagem de células.....	93
FIGURA 15 - Microplaca com ensaio de MTT mostrando a intensidade de formação de Formazan.....	95

FIGURA 16 – Células <i>A7r5</i> de músculo liso de aorta torácica de ratos.....	96
FIGURA 17 - Viabilidade celular da linhagem de células do músculo liso de aorta de ratos (<i>A7r5</i>) após estímulo com Sulcatona por 24 horas.....	97
FIGURA 18 - Viabilidade celular da linhagem de células do músculo liso de aorta de ratos (<i>A7r5</i>) após estímulo com Sulcatona por 48 horas.....	98
FIGURA 19 - Viabilidade celular da linhagem de células do músculo liso de aorta de ratos (<i>A7r5</i>) após estímulo com Sulcatona por 72 horas.....	99
 CAPÍTULO 03: EFEITO DA 6-METIL-5-HEPTEN-2-ONA (SULCATONA) SOBRE OS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS	
FIGURA 20 - Registro original representativo ilustrando o efeito de doses crescentes de Sulcatona (12,5; 25,0 e 50,0 mg/kg, i.v.) sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos WKY não anestesiados.....	119
FIGURA 21 - Registro original representativo ilustrando o efeito de doses crescentes de Sulcatona (12,5; 25,0 e 50,0 mg/kg, i.v.) sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos SHR não anestesiados.....	120
FIGURA 22 - Efeito comparativo da 6-Metil-5-hepten-2-ona sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos WKY e SHR.....	121
FIGURA 23 - Efeito da 6-Metil-5-hepten-2-ona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos WKY após bloqueio com prazosin (1mg/kg).....	123
FIGURA 24 - Efeito da 6-Metil-5-hepten-2-ona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos SHR após bloqueio com prazosin (1mg/kg).....	124
FIGURA 25 - Efeito da 6-Metil-5-hepten-2-ona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos WKY após bloqueio com ioimbina (2mg/kg).....	126
FIGURA 26 - Efeito da 6-Metil-5-hepten-2-ona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos SHR após bloqueio com ioimbina (2 mg/kg).....	127
FIGURA 27 - Efeito da 6-Metil-5-hepten-2-ona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos WKY após bloqueio com propranolol (1,5 mg/kg).....	129
FIGURA 28 - Efeito da 6-Metil-5-hepten-2-ona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos SHR após bloqueio com propranolol (1,5 mg/kg).....	130

FIGURA 29 - Efeito da 6-Metil-5-hepten-2-ona em ratos WKY (12,5; 25 e 50 mg/kg) após bloqueio com atropina (2 mg/kg).....	132
FIGURA 30 - Efeito da 6-Metil-5-hepten-2-ona em ratos SHR (12,5; 25 e 50 mg/kg) após bloqueio com atropina (2 mg/kg).....	133
FIGURA 31 - Efeito da 6-Metil-5-hepten-2-ona em ratos WKY (12,5; 25 e 50 mg/kg) após bloqueio com hexametônio (20 mg/kg).....	135
FIGURA 32 - Efeito da 6-Metil-5-hepten-2-ona em ratos SHR (12,5; 25 e 50 mg/kg) após bloqueio com hexametônio (20 mg/kg).....	136
FIGURA 33 - Efeito da 6-Metil-5-hepten-2-ona em ratos WKY (12,5; 25 e 50 mg/kg) após bloqueio com L-NAME (20 mg/kg).....	138
FIGURA 34 - Efeito da 6-Metil-5-hepten-2-ona em ratos SHR (12,5; 25 e 50 mg/kg) após bloqueio com L-NAME (20 mg/kg).....	139
FIGURA 35 - Efeito anti-hipertensivo da Sulcatona e do Complexo Sulcatona/ β -CD sobre a PAM em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) não anestesiados.....	140
 CAPÍTULO 04: AÇÃO DA SULCATONA SOBRE OS RECEPTORES DE ADENOSINA A_{2A} EM CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DA LINHAGEM <i>A7r5</i>	
FIGURA 36 - Estrutura da adenosina.....	159
FIGURA 37 - Envolvimento do receptor A_2 no relaxamento do músculo liso vascular.....	161
FIGURA 38 - Síntese de adenosina e vias metabólicas dentro e fora de uma célula.....	164
FIGURA 39 - Vias de sinalização dos receptores de Adenosina.....	167
FIGURA 40 - Esquema do tratamento utilizado nas placas de 24 poços para o In-Cell Western Blotting.....	172
FIGURA 41 - Quantificação dos Receptores de Adenosina em células <i>A7r5</i>	176
FIGURA 42 - Expressão do receptor de adenosina A_{2A} após tratamento com Sulcatona Via In-Cell Western Blotting.....	178
FIGURA 43 - Ação da Sulcatona sobre a proteína CYP1B1 no estado basal de células <i>A7r5</i> via In-Cell Western Blotting.....	180

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 01: REVISÃO DA LITERATURA

TABELA 01 - Parâmetros de Diagnóstico da Pressão Arterial..... 32

TABELA 02 - Propriedades físico-químicas α , β , γ ciclodextrinas..... 52

TABELA 03 - Deslocamentos químicos (δ) dos prótons (H) na β -CD e do complexo..... 63

CAPÍTULO 04: AÇÃO DA SULCATONA SOBRE OS RECEPTORES DE ADENOSINA A_{2A} EM CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DA LINHAGEM A7r5

TABELA 04: Programa utilizado no termociclador NyxTechnik para realização do cDNA..... 171

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI: Angiotensina I

AII: Angiotensina II

ACh: Acetilcolina

ADA: Adenosina desaminase

ADP: Adenosina 5'-difosfato

AK: Adenosina quinase

AMP: Adenosina 5'-monofosfato

AMPc: Adenosina 5'-monofosfato cíclico

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

AVC: Acidente vascular cerebral

β-CD: Beta ciclodextrina

BCCs: Bloqueadores de canais de cálcio

BRA: Bloqueadores dos receptores de angiotensina

CD: Ciclodextrina

CD39: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

CD73: Ecto-5'-nucleotidase

CITO-5'NT: 5'-nucleotidase citosólica

Cl⁻: Íons cloreto

CMLVs: Células do músculo liso vascular

CVLM: Medula ventrolateral caudal

DAG: Diacilglicerol

DC: Débito cardíaco

DEPC: Dietil pirocarbonato

DRX: Difração de raio-x

DSC: Calorimetria exploratória diferencial

ECA: Enzima conversora de angiotensina

eNOS: Sintase de óxido nítrico endotelial

FC: Frequência cardíaca

GABA: Ácido γ -aminobutírico

HA: Hipertensão arterial

IECAS: Inibidores da enzima conversora de angiotensina

IP3: Trisfosfato de inositol

IR: Espectrometria de Infravermelho

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

MLCK: Miosina quinase de cadeia leve

MLC:

Na⁺: Íons sódio

NAV: Nodo Atrioventricular

NECA: 5'- N- etilcarboxamideadenosina

NO: Óxido nítrico

NPS: Nitroprussiato de Sódio

NSA: Nodo Sinoatrial

NTS: Núcleo do trato solitário

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAM: Pressão arterial média

PDE: Fosfodiesterase

PKC: Proteína quinase C

PLC: Fosfolipase C

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

RMN: Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

RT-qPCR: *Reverse Transcription – quantitative PCR*)

RVLM: Medula ventrolateral rostral

RVP: Resistência vascular periférica

SAH: S-adenosil-homocisteína

SNC: Sistema nervoso central

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TGA: Análise termogravimétrica

TPSV: Taquicardia paroxística supraventricular

WKY: Ratos normotensos Wistar-Kyoto

SUMÁRIO

1.0 – INTRODUÇÃO	25
2.0 – OBJETIVOS	28
2.1 – Geral.....	28
2.2 – Específicos.....	28
CAPÍTULO 01: REVISÃO DA LITERATURA	30
1.0 - Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS).....	30
2.0 - Hipertensão Neurogênica e Controle Neural da Pressão Arterial.....	36
3.0 - Modelo Animal para estudo da Hipertensão Arterial: SHR.....	43
4.0 - Tratamento da Hipertensão Arterial.....	45
5.0 - Ciclodextrinas.....	51
6.0 - 6-Metil-5-Hepten-2-ona (Sulcatona).....	57
7.0 - Sulcatona e Beta Ciclodextrina (Sulcatona/ β -CD).....	59
Referências.....	65
CAPÍTULO 02: AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DA 6-METIL-5-HEPTEN-2-ONA (SULCATONA) EM CÉLULAS DE LINHAGEM A7r5	82
RESUMO	83
1.0 – INTRODUÇÃO	84
1.1 – Toxicidade da Sulcatona.....	86
1.2 - Viabilidade Celular e o teste do MTT.....	87
2.0 - MATERIAL E MÉTODOS	91
2.1- Linhagem e Cultivo Celular.....	91
2.2 - Tripsinização Celular.....	91
2.3 - Quantificação Celular.....	92
2.4 – Drogas e Reagentes.....	94
2.5 - Avaliação da Citotoxicidade: Teste de MTT.....	94
3.0 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	95
4.0 – RESULTADOS	96
4.1 – Linhagem Celular A7r5.....	96

4.2- Avaliação da Citotoxicidade da Sulcatona Teste de MTT em 24 horas.....	97
4.3- Avaliação da Citotoxicidade da Sulcatona Teste de MTT em 48 horas.....	98
4.4- Avaliação da Citotoxicidade da Sulcatona Teste de MTT em 72 horas.....	99
5.0 – DISCUSSÃO.....	100
6.0 – CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS.....	104
CAPÍTULO 03: EFEITO DA 6-METIL-5-HEPTEN-2-ONA (SULCATONA) SOBRE OS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS.....	110
RESUMO.....	111
1.0 – INTRODUÇÃO.....	112
2.0 - MATERIAL E MÉTODOS.....	114
2.1 – Animais.....	114
2.2 – Drogas e Reagentes.....	114
2.3 - Aferição dos parâmetros cardiovasculares após administração venosa e oral de Sulcatona em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).....	115
2.4 - Efeito da Sulcatona sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).....	116
2.5 - Preparo e Caracterização do processo de inclusão Sulcatona/ β -Ciclodextrina (Sulcatona/ β -CD).....	117
3.0 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	118
4.0 – RESULTADOS.....	118
4.1- Efeito Anti-hipertensivo da Sulcatona (i.v) sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos WKY e SHR.....	118

4.2 - Efeito Anti-hipertensivo da Sulcatona antes e após o bloqueio do receptor α 1-adrenérgicos em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).....	122
4.3 - Efeito Anti-hipertensivo da Sulcatona antes e após o bloqueio do receptor α 2-adrenérgicos em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).....	125
4.4 - Efeito Anti-hipertensivo da Sulcatona antes e após o bloqueio dos receptores β adrenérgicos em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).....	128
4.5 - Efeito Anti-hipertensivo da Sulcatona antes e após o bloqueio dos receptores muscarínicos em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).....	131
4.6 - Efeito Anti-hipertensivo da Sulcatona antes e após o bloqueio ganglionar em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).....	134
4.7 - Efeito Anti-hipertensivo da Sulcatona antes e após o bloqueio do óxido nítrico sintase (NOS) em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).....	137
4.8 - Efeito da administração oral de Sulcatona livre e do complexo Sulcatona/ β -CD em animais espontaneamente hipertensos (SHR).....	140
5.0 – DISCUSSÃO	141
6.0 – CONCLUSÃO	149
7.0 – AGRADECIMENTOS	149
REFERÊNCIAS	150
CAPÍTULO 04: AÇÃO DA SULCATONA SOBRE OS RECEPTORES DE ADENOSINA A_{2A} EM CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DA LINHAGEM A7r5	157
RESUMO	158
1.0 – INTRODUÇÃO	159
1.1 - Formação e Metabolismo da Adenosina.....	162
1.2 - Receptores de Adenosina e sua Classificação.....	164
1.2.1 - Receptores de Adenosina A_1	168
1.2.2 - Receptores de Adenosina A_2	168

1.2.3 - Receptores de Adenosina A ₃	169
2.0 – MATERIAL E MÉTODOS	170
2.1- Drogas e Reagentes.....	170
2.2 - Análise da Expressão de mRNA dos receptores A ₁ e A _{2A} em células A7r5 por PCR em tempo real (RT- qPCR – <i>Reverse Transcription – quantitative PCR</i>).....	170
2.3 - Quantificação da expressão do Receptor A _{2A} após tratamento com Sulcatona Via In-Cell Western Blotting.....	172
2.4 - Quantificação da expressão da enzima Citocromo P450 1B1 (CYP1B1) após tratamento com Sulcatona Via In-Cell Western Blotting.....	173
3.0 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	174
4.0 – RESULTADOS	175
4.1- Presença dos Receptores de Adenosina A _{2A} nas células A7r5 pela técnica de Rt-qPCR.....	175
4.2 - Expressão do Receptor de adenosina A _{2A} após tratamento com Sulcatona Via In-Cell Western Blotting.....	177
4.3 - Ação da Sulcatona sobre a proteína CYP1B1 no estado basal de células A7r5 via In-Cell Western Blotting.....	180
5.0 – DISCUSSÃO	181
6.0 – CONCLUSÃO	184
7.0 – AGRADECIMENTOS	184
REFERÊNCIAS	185
CONCLUSÃO	194
PERSPECTIVAS	196
APÊNDICE	198
1.0 – Artigo de colaboração submetido.....	198
2.0 – Artigos submetidos derivados da Tese.....	199
3.0 – Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA).....	201

INTRODUÇÃO

1.0 – INTRODUÇÃO

A pressão arterial (PA) é um sistema complexo determinado pelo produto do débito cardíaco e a resistência vascular periférica, regulado por mecanismos pressores (prómitógenos, SRAA, endotelinas e tônus simpático) e depressores (anti-mitógenos, NO, prostaciclina) que interagem e se equilibram entre si. Todavia, quando o equilíbrio é quebrado com predominância dos fatores pressores, ocorre a hipertensão arterial primária (FOLKOW, 1982). A aorta e as grandes artérias possuem a função de transformar o fluxo pulsátil gerado pela contração ventricular em fluxo contínuo ao nível da periferia. Esta função depende das propriedades mecânicas da parede arterial, da organização e composição das células endoteliais. (PALOMBO; KOZAKOVA, 2016).

A hipertensão arterial (HA) com repercussões patológicas a nível sistêmico, é definida de acordo com os últimos consensos em clínica médica na população mundial, como o aumento da pressão arterial acima de 140/90 mmHg. Estatísticas epidemiológicas nos revelam que cerca de 45 a 55% dos homens e 45 a 65% das mulheres em faixas etárias entre 45 e 70 anos apresentam algum fator de risco para o desenvolvimento da hipertensão (EGAN et al., 2010). Há anos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tenta alertar o mundo acerca das mudanças em estilos de vida da população que pecam no consumo exagerado de dietas hiperlipídicas, hipersódicas e hiperglicídicas, levando a obesidade e dislipidemias, além do contínuo ciclo vicioso que envolve sedentarismo, uso abusivo do cigarro, álcool e diabetes descontrolado. Tais fatores provocam o aparecimento da hipertensão como a principal patologia do grupo das doenças cardiovasculares, colocando-as no rol das principais causas de morte da humanidade (OMS, 2003).

A 6-metil-5hepten-2-ona (Sulcatona) é uma substância sintética pertencente a classe dos Terpenóides (LIU et al., 2018). A Sulcatona é encontrada em frutas cítricas e também encontrada em animais. A literatura cita certas funções dessa substância como por exemplo um ferormônio de atração entre insetos (RODRIGUEZ; PÉREZ; NAZARENO, 2016), porém não consta nenhum efeito biológico da sulcatona em modelos animais.

Embora novas drogas anti-hipertensivas mais eficazes tenham sido produzidas a cada ano, os efeitos adversos promovidos por estas e a conseqüente baixa taxa de adesão farmacológica contribui amplamente para falta de controle dos níveis de

pressão arterial em pacientes hipertensos, resultando assim em implicações de elevada morbimortalidade (AL-SALAH, 2014; VALENZUELA-FLORES, 2016).

Diante do exposto, a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos são fundamentais, visto que, consiste em utilizar-se de diversas estratégias que tem por objetivo produzir fármacos que sejam capazes de apresentar os efeitos farmacológicos desejados, com biodisponibilidade adequada, com menos efeitos adversos, além de apresentar segurança e eficácia em seu emprego terapêutico (BARREIRO, 2002; SAKLAYEN; DESHPANDE, 2016).

Considerando a importância de se buscar novas drogas anti-hipertensivas e com menos efeitos colaterais, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico em células *A7r5* e atividade anti-hipertensiva em animais K_WY e SHR da Sulcatona e seu complexo com beta-ciclodextrina (β -CD) sobre os parâmetros cardiovasculares bem como avaliar ação da sulcatona sobre os receptores de adenosina A_{2A} e a enzima CYP1B em células *A7r5* com a finalidade de buscar alternativas terapêuticas eficazes e seguras para o tratamento da hipertensão ou como modelos e ferramentas farmacológicas que conduzam ao desenvolvimento de novos fármacos.

OBJETIVOS

2.0 - OBJETIVOS:

2.1 - GERAL:

- Verificar o efeito citotóxico em células *A7r5* e anti-hipertensivo da Sulcatona em ratos normotensos (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).

2.2 - ESPECÍFICOS:

- Averiguar a viabilidade celular das células de linhagem *A7r5* na presença da 6-metil-5-hepten-2-ona (Sulcatona).

- Verificar o efeito da Sulcatona administrada por via venosa sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de animais Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).

- Avaliar a participação dos receptores alfa (1 e 2), beta adrenérgicos, muscarínicos e ganglionares no efeito Sulcatona sobre a PAM e FC *in vivo*.

- Averiguar a participação da NO sintase no efeito da Sulcatona sobre a PAM e FC *in vivo*

- Avaliar o efeito da 6-metil-5-hepten-2-ona (Sulcatona) e complexo Sulcatona/ β -CD administrada por via orogástrica sobre os parâmetros cardiovasculares de animais espontaneamente hipertensos (SHR).

- Verificar a expressão do mRNA dos receptores de adenosina A_{2A} em células *A7r5*.

- Avaliar a ação da sulcatona sobre os receptores de adenosina A_{2A} e a enzima CYP1B1 em células *A7r5*.

CAPÍTULOS

CAPÍTULO 01: REVISÃO DA LITERATURA

1.0- HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS)

A hipertensão é a doença cardiovascular com maior impacto epidemiológico no mundo. Ela afeta um quarto da população brasileira adulta e também representa um importante fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças como o infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, disfunção endotelial, síndrome metabólica, disfunção renal, insuficiência cardíaca congestiva, doença arterial coronariana, doença renal crônica (AVILA-VILLARREAL et al., 2013; OGIHARA et al. al. 2005) . Essa doença é um grave problema de saúde pública, acometendo cerca de um terço de jovens adultos, quase dois terços dos indivíduos com idade superior a 60 anos, e em aproximadamente 75% dos indivíduos com mais de 70 anos (ROSÁRIO et al., 2009). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a hipertensão afeta cerca de um bilhão de pessoas em todo o mundo e contribui para aproximadamente 9,4 milhões de mortes por doenças cardiovasculares a cada ano. Estima-se que o número de adultos com pressão alta aumentará de 1 bilhão para 1,5 bilhão em todo o mundo até 2020 (OMS). Mesmo com avanços no entendimento da fisiopatologia da hipertensão e na implementação de estratégias de prevenção e tratamento efetivo, a hipertensão continua sendo um dos grandes problemas de saúde pública do mundo (POULTER; PRABHAKARAN, 2015). Além disso, estima-se que até o ano 2030, 23 milhões de mortes cardiovasculares são projetados para decorrerem devido à hipertensão (SHRIVASTAVA, 2014).

Esta doença é classificada como crônica e de difícil controle, estima-se ainda que metade dos indivíduos hipertensos não consiga atingir valores ótimos de PA (VALENZUELA-FLORES, 2016). A elevação duradoura da PA $\geq 140/90$ mmHg é definida de modo convencional como hipertensão primária ou essencial sendo considerada uma condição clínica multifatorial, a qual, de acordo com numerosos estudos, resulta da interação de vários genes com fatores ambientais (SBC/VI-DBH, 2010).

A predisposição para a hipertensão idiopática ou essencial é de origem poligênica. A expressão do processo da doença pode ser desenvolvida quando combinada com fatores comportamentais, incluindo obesidade, diminuição dos níveis de atividade física, aumento dos níveis de estresse, consumo de álcool, sódio dietético elevado ou baixo teor de potássio, cálcio e magnésio. Essencialmente, a hipertensão parece ser causada por uma interação multifacetada entre predisposição genética e os fatores comportamentais listados anteriormente. Essa interação complexa parece afetar os níveis de sódio e catecolaminas, o sistema renina-angiotensina, a insulina e a função da membrana celular, o que leva a uma elevação da PA (DOMINICZAK; KUO, 2017; ISLAM, 2015; RIVERA et al., 2019).

Em indivíduos adultos, consideram-se valores normais de pressão sistólica abaixo de 120 mmHg e a diastólica abaixo de 80 mmHg (CHOBANIAN et al., 2003). A hipertensão é uma das principais causas de doença cardiovascular em populações envelhecidas, e é uma doença crônica e vitalícia caracterizada por um aumento persistente da pressão sistólica ou pressão arterial diastólica (LEWINGTON et al., 2002; SHI et al., 2019).

Causas detectáveis mais comuns de hipertensão incluem: doença renal crônica (2% - 5%); doença renovascular (0,2% - 0,7%); síndrome de Cushing (0,1% - 0,6%); feocromocitoma (0,04% - 0,1%); hiperaldosteronismo primário (0,01% - 0,30%) (MOZZAFARIAN et al., 2015).

Devido à alta prevalência de hipertensão, a medida da PA deve ser considerada em cada consulta de saúde. Segundo Whelton et al., (2017), as medições da PA baseiam-se em uma média de 2 ou mais medidas apropriadas obtidas em 2 ou mais ocorrências independentes (a Tabela 01 fornece parâmetros que definem a hipertensão).

É extremamente complexo para o organismo controlar a PA, pois depende da integração de diversos sistemas, como o cardiovascular, o renal, o neural e o endócrino. Sendo assim, o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da PA é necessário para identificar as anormalidades que causam a elevação dos níveis normais de pressão (SANJULIANI, 2002). A hipertensão leva ao aumento global da morbidade e mortalidade (CHOCKALINGAM et al., 2006). Ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, hiperatividade do sistema simpático sistema nervoso e retenção de sódio renal estão envolvidos na ocorrência de hipertensão.

TABELA 01: Parâmetros de Diagnóstico da Pressão Arterial

Categoria da PA	PA Sistólica		PA Diastólica
<i>Normal</i>	< 120 mmHg	e	< 80 mmHg
<i>Elevada</i>	120 -129 mmHg	e	< 80 mmHg
<i>Hipertensão</i>	-		-
<i>Estágio 1</i>	130 – 139 mmHg	ou	80 – 89 mmHg
<i>Estágio 2</i>	≥ 140 mmHg	-	≥ 90 mmHg

Indivíduos com PAS e PAD em 2 categorias devem ser designados para a maior categoria de PA. (Fonte: adaptado WHELTON et al. 2017)

No entanto, a patogênese da hipertensão ainda não está completamente elucidada. A hipertensão também está intimamente relacionada à disfunção endotelial, que é caracterizado por um desequilíbrio de fatores de relaxamento e contração derivados do endotélio (GKALIAGKOUSI et al., 2015). O endotélio é uma parte essencial da vasculatura e desempenha um papel fundamental na regulação do tônus vascular pela liberação de óxido nítrico (NO) (GHEIBI et al., 2018). Em resposta a estímulos endógenos, como bradicinina, isquemia, mudanças de temperatura, estresse de cisalhamento, o endotélio libera algum fator vasodilatador, que se difunde dentro da parede do vaso, induzindo a dilatação do músculo liso (YANG et al., 2015). A redução nos níveis de NO causada pela diminuição da atividade da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) é uma via subjacente disfunção endotelial (MORDI et al., 2016).

O produto do débito cardíaco (DC) e da resistência vascular periférica (RVP) também determinam a PA, assim, condições relacionadas ao sistema cardiovascular, como o volume de sangue circulante, a frequência cardíaca e a contratilidade e relaxamento do miocárdio influenciam no DC. Já a RVP está relacionada aos mecanismos vasoconstritores, vasodilatadores, sistema nervoso simpático e sistema

renina-angiotensina (SANJULIANI, 2002). A resistência periférica total elevada é uma das principais características da hipertensão arterial (LUND-JOHANSEN, 1983).

A pressão arterial média é resultado do tempo de saída de sangue do coração e da resistência vascular periférica (RVP). Assim, a elevação da pressão arterial média pode ser modulada pelo aumento do débito cardíaco e / ou da RVP. A RVP é dominada por vasos de resistência (vasos com diâmetro entre 30 e 300 μ m) (MAYET; HUGHES 2003). Em pacientes hipertensos (sem lesão de órgão alvo) observa-se aumento da resistência vascular periférica em toda área vascular (LUND-JOHANSEN, 1994). O tônus vascular é um importante modulador da resistência vascular periférica, uma vez que o aumento do tônus vascular induz um aumento da RVP.

Esta resistência periférica aumentada resulta primariamente do aumento da dissipação de energia que ocorre quando o sangue flui através das pequenas artérias de resistência com o lúmen reduzido. As artérias de resistência podem ser definidas como vasos pré-arteriolares que contribuem passivamente e ativamente para a manutenção da resistência basal e para o controle do fluxo sanguíneo durante alterações hemodinâmicas (MULVANY, 2003). Em muitas situações patológicas, em particular na hipertensão, as artérias de resistência representam um importante papel na etiologia desta enfermidade (FOLKOW et al. 1957; FOLKOW, 1990; MULVANY, 1987; KORNER; ANGUS, 1997) e alguns autores têm mesmo sugerido que o desenvolvimento de anormalidades nestes vasos poderia ser causa primária em tais processos (KORNER; ANGUS, 1997).

Os principais fatores que contribuem para o aumento da resistência periférica na hipertensão são: o remodelamento vascular, as alterações mecânicas da parede arterial e as alterações das respostas vasoconstritora e vasodilatadora. Além disso, essas alterações são importantes contribuintes para o aparecimento das complicações cardiovasculares associadas à hipertensão (SCHIFFRIN, 1997) como a isquemia miocárdica (BRUSH et al., 1988; HASDAI et al., 1997), o acidente vascular cerebral (COLLINS et al., 1990) e a insuficiência renal (KLAHR; MORRISSEY, 2003).

Na hipertensão arterial, além do processo de remodelamento vascular e da disfunção endotelial, outras alterações vasculares parecem contribuir para o aumento na resistência vascular periférica como: o aumento da contração do músculo liso vascular e da sensibilidade a agentes vasoconstritores, o aumento do tônus miogênico, o aumento da permeabilidade da membrana aos íons sódio e cálcio, as

modificações na atividade da Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática e do retículo sarcoplasmático, as modificações de atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, assim como as modificações na atividade e expressão da Na^+K^+ -ATPase (FOLKOW, 1982; KONISHI; SU, 1983; BOHR; WEBB, 1984; LÜSCHER; VANHOUTTE, 1986; BLAUSTEIN, 1993; MARÍN, 1993). Esta última é um componente importante para a manutenção do tônus vascular, e o comprometimento de sua atividade com a hipertensão pode estar associada a alterações vasculares do processo hipertensivo (WEBB; BHOR, 1979; BLAUSTEIN, 1993; MARÍN; REDONDO, 1999).

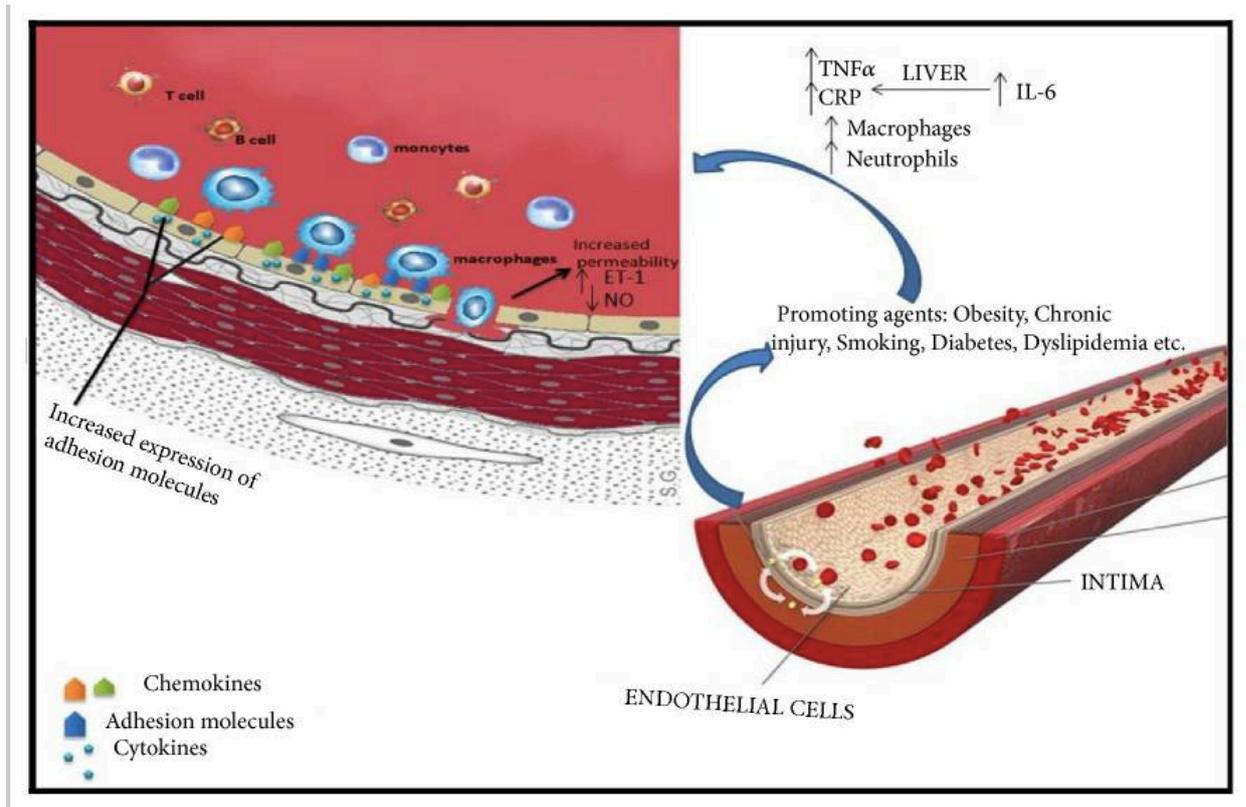
Dentre outros processos fisiológicos que levam a hipertensão arterial temos o processo inflamatório. É amplamente reconhecido que a inflamação de baixo grau é um importante mediador na iniciação e manutenção da elevação da PA e poderia contribuir para sua ocorrência em associação com doenças inflamatórias crônicas. Juntos, esses processos aumentam a PA, em parte, participando de lesão e remodelamento vascular e danos renais (LEIBOWITZ; SCHIFFRIN, 2011; SCHIFFRIN, 2012).

A camada mais interna dos vasos sanguíneos, o endotélio, foi primeiro considerada uma barreira passiva entre o sangue e a parede vascular. Bunting et al. demonstraram em 1976, que a parede arterial pode sintetizar fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF) como NO, prostaciclina (PGI_2) e sulfeto de hidrogênio (H_2S) e fatores constritores incluindo angiotensina II (Ang II) e endotelina-1 (ET-1) (BERNATOVA, 2014).

Fatores de risco cardiovascular, como dislipidemia, obesidade e diabetes, por meio de seu estado inflamatório, promovem disfunção endotelial. Mastócitos, linfócitos T, células dendríticas, neutrófilos ativados e plaquetas interagem para produzir uma resposta inflamatória, com produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, EROs e moléculas de adesão (TSOUPRAS et al., 2009; KELESIDIS et al., 2015; SAGER; NAHRENDORF, 2016.). Em algumas doenças autoimunes, como a psoríase ou a artrite reumatóide, os anticorpos antiendoteliais (NEIMANN et al., 2006; PANOULAS et al., 2007), fazem com que as células endoteliais liberem moléculas de adesão e quimiocinas. Níveis séricos elevados de IL-6 levam ao aumento da produção de marcadores inflamatórios hepáticos, como a PCR e aumentam a permeabilidade vascular, a apoptose celular e a trombose (Figura 01). Além disso, a ligação entre a disfunção endotelial e a produção de citocinas

inflamatórias tem sido enfatizada por estudos que atribuem o aumento da produção de IL-6 ao estiramento endotelial mecânico em indivíduos hipertensos, com uma diminuição subsequente na produção de NO (PIERANGELI et al., 2001; TANASE et al., 2019).

FIGURA 01: Etiologia do Processo Inflamatório.



A inflamação crônica de baixo nível aumenta as concentrações dos marcadores e das células inflamatórias, levando ao aumento da produção de proteína C-reativa (PCR) pelo fígado, em resposta à interleucina-6 (IL-6), que provoca redução da vasodilatação e aumento no dano vascular. TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL-6: interleucina-6; PCR: proteína C reativa; NO: óxido nítrico; ET-1: endotelina-1. Fonte: TANASE et al., 2019.

Estímulos hipertensivos (angiotensina II, aldosterona, endotelina-1, Na⁺Cl⁻) podem causar ligeira elevação inicial da pressão arterial (PA), devido, em parte, ao aumento da ativação do sistema nervoso simpático (SNS) e, potencialmente, também à diminuição da atividade do sistema nervoso parassimpático (SNP). Isso pode levar a lesão tecidual leve, formação de padrões moleculares associados a dano (DAMPs) e neo-antígenos, promovendo a ativação da imunidade inata via receptores Toll-like

(TLRs) em macrófagos (M1), células dendríticas (DC1) e células B. As células imunes inatas contribuem para a inflamação e para o estresse oxidativo, tanto diretamente quanto via ativação da imunidade adaptativa, induzindo citocinas pró-inflamatórias, como IL-17 e IFN γ , e auto-anticorpos liberando e favorecendo a persistência das células T de memória. Esses efeitos combinados levam a lesões vasculares e renais. Um ciclo vicioso de ativação do sistema imunológico, inflamação e estresse oxidativo segue, promovendo, assim, a progressão da doença e causando danos aos órgãos-alvo (MIAN; PARADIS; SCHIFFRIN, 2014).

2.0- HIPERTENSÃO NEUROGÊNICA E CONTROLE NEURAL DA PRESSÃO ARTERIAL

Hipertensão neurogênica pode ser definida como a hipertensão em pacientes nos quais o sistema nervoso simpático desempenha um papel significativo ou mesmo dominante como força de sua hipertensão (MANN, 2018).

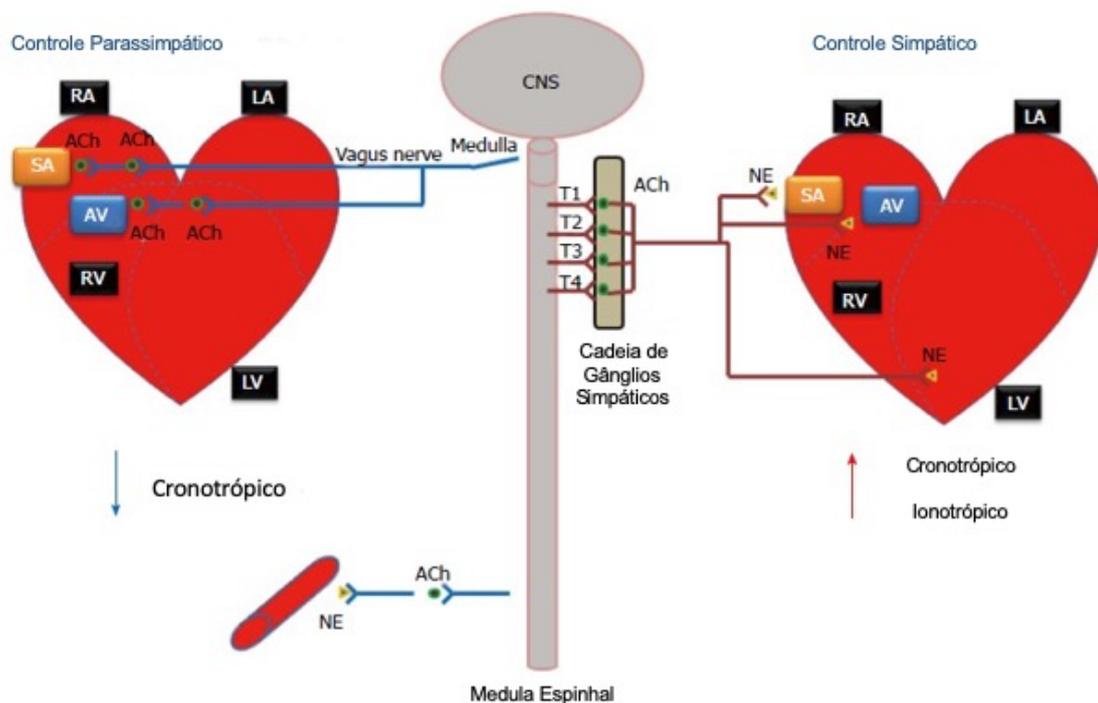
A hipertensão é, por definição, uma elevação crônica da PA média de 24 horas, e a doença é conhecida como neurogênica se a causa provável for uma anormalidade do sistema nervoso autonômico ao invés de um defeito vascular ou renal primário. Essa anormalidade pode se originar na via do sistema aferente (por exemplo, barorreceptores, quimiorreceptores e aferentes renais) ou no circuito central. O controle neural da circulação opera via neurônios simpáticos que inervam o coração e através de três classes principais do sistema simpático eferente - barossensível, termossensível e glicossensível - que inervam os vasos sanguíneos, o coração, os rins e a medula da supra-renal (GUYENET, 2006).

O sistema nervoso central (SNC) desempenha um papel essencial na regulação cardiovascular: do nível da vasculatura periférica, à modulação da função cardíaca, à homeostase dos fluidos corporais. Redes neurais complexas, juntamente com insumos de reflexo, influenciam a atividade dos nervos autonômicos que inervam os sistemas orgânicos envolvidos na regulação cardiovascular (Figura 02) (YOUNG; DAVISSON, 2011; GORDAN; GWATHMEYE; LAI-HUA, 2015)

Além da inervação eferente direta dos órgãos-alvo, o SNC também está criticamente envolvido na liberação e modulação dos fatores hormonais que influenciam o controle cardiovascular. O controle do sistema cardiovascular pelo

sistema nervoso central (SNC) tornou-se uma área de intensa investigação devido ao crescente corpo de evidências de que várias doenças complexas comuns, incluindo hipertensão, insuficiência cardíaca e obesidade, são caracterizadas por alterações na regulação neurocardiovascular (MALPAS, 2010; YOUNG; DAVISSON, 2011).

FIGURA 02: Regulação do Sistema Nervoso Autônomo na Função Cardíaca.



O sistema nervoso autônomo afeta a taxa e a força das contrações cardíacas. CNS: sistema nervoso central; RA: átrio direito; LA: átrio esquerdo; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo; SA: Nó sino-atrial; AV: nó atrioventricular; NE: Norepinefrina; ACh: acetilcolina (adaptado de Gordan, Gwathmeyer and Lai-Hua, 2015)

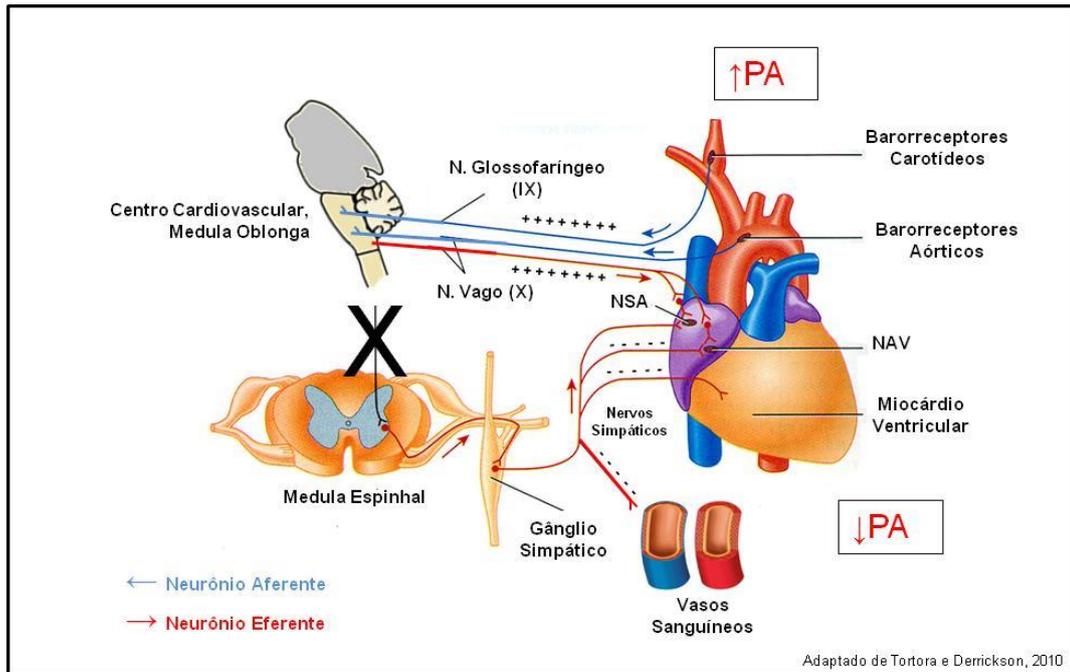
A manutenção da PA envolve controle rígido, mediado tanto por mecanismos periféricos quanto centrais, sendo, os barorreceptores arteriais, um dos principais responsáveis pelo ajuste momento-a-momento da PA. Os sinais são conduzidos ao sistema nervoso central (SNC), especificamente ao núcleo do trato solitário (NTS), via nervo glossofaríngeo (fibras carotídeas) e vago (fibras aórticas) (IRIGOYEN et al.; 2005; MENDONÇA et al.; 2005).

O principal mecanismo de ativação dos barorreceptores é a deformação mecânica das terminações neurais, decorrente do estiramento da parede arterial, o que é determinada pela onda de pulso ao longo do eixo vascular (IRIGOYEN et al., 2005; CORRAL et al., 2007). Na pressão basal, os barorreceptores descarregam de forma intermitente e sincrônica com a pressão arterial sistólica (PAS), na dependência das variações instantâneas da deformação e da tensão vascular induzidas pela PA (KRIEGER et al., 1999; MICHELINI, 2000).

A função primordial dos barorreceptores é manter a PA estável, dentro de uma faixa estreita de variação, esteja o indivíduo em repouso ou durante a realização de atividades (IRIGOYEN et al., 2005). Exercem uma importante regulação reflexa da frequência cardíaca (FC), DC, contratilidade miocárdica, RVP e, conseqüentemente, distribuição regional do fluxo sanguíneo (HAIBARA; SANTOS, 2000). Assim, elevações súbitas da PA aumentam a atividade dos barorreceptores, os quais reflexamente inibem a atividade tônica simpática para os vasos e coração (Figura 03). À redução da atividade simpática associa-se um aumento da atividade vagal, a qual produz bradicardia (KRIEGER et al., 1999; MICHELINI, 2000; CORRAL et al., 2007; KASHIHARA, 2009). A redução da atividade simpática e o aumento da atividade vagal tendem a produzir uma redução da resistência periférica total e do DC, contribuindo, assim, para o retorno dos níveis tensionais aos padrões normais (KRIEGER et al., 1999; MICHELINI, 2000; CORRAL et al., 2007).

Por outro lado, quando diante de quedas súbitas da PA ocorre inibição da ação barorreceptora, o que resulta em aumento da descarga simpática e redução do tônus vagal, minimizando, assim, a diminuição da PA (KRIEGER et al., 1999; MICHELINI, 2000; CORRAL et al., 2007).

Uma vez que, os barorreceptores são os principais responsáveis pela regulação a curto prazo da PA (SPYER, 1981), esse controle se dá por uma complexa interação neuronal (Figura 03) que se inicia no SNC, no núcleo do trato solitário (NTS), envolvendo, além deste, várias regiões, especialmente a região caudal ventrolateral do bulbo (CVLM), a região rostral ventrolateral do bulbo (RVLM), o núcleo dorsal motor do vago (NDMV) e o núcleo ambíguo (NA) (CHAPLEAU et al., 1995).

FIGURA 03: Representação Esquemática do Barorreflexo Arterial.

Visão detalhada do mecanismo de controle da PA diante da ativação do barorreflexo. Em situações de aumento de PA, os barorreceptores aórticos e carotídeos enviam sinais aferentes (linha em azul), de caráter excitatórios (+++++++), através do nervo vago e glossofaríngeo, respectivamente, para o centro cardiovascular, localizado na medula oblonga. Em resposta, há um aumento do tônus parassimpático, representado por um estímulo excitatório (++++++) através de neurônios eferentes (linha em vermelho) que compõem o nervo vago e se dirige para o coração. Em contrapartida, o tônus simpático é reduzido pelo silenciamento (- - - -) dos neurônios pré-ganglionares que conduzem os estímulos para os vasos e coração. Esses efeitos, somados, são responsáveis pela diminuição da PA. PA: Pressão Arterial; NSA: Nodo Sinoatrial; NAV: Nodo Atrioventricular.

Os barorreceptores são receptores sensíveis ao estiramento localizados nas áreas de pressão alta (barorreceptores de alta pressão), bem como em áreas de baixa pressão (barorreceptores de baixa pressão) do sistema circulatório. Considera-se que os barorreceptores arteriais de alta pressão localizados no seio carotídeo e no arco aórtico (barorreceptores sinoaórticos) desempenham um papel dominante na regulação momento a momento da PA arterial. Considerando este fato, alterações nos mecanismos de barorreflexo arterial têm sido implicadas em desordens clínicas caracterizadas por flutuações anormais na PA, comumente impostas por variações posturais (KAUR et al., 2016).

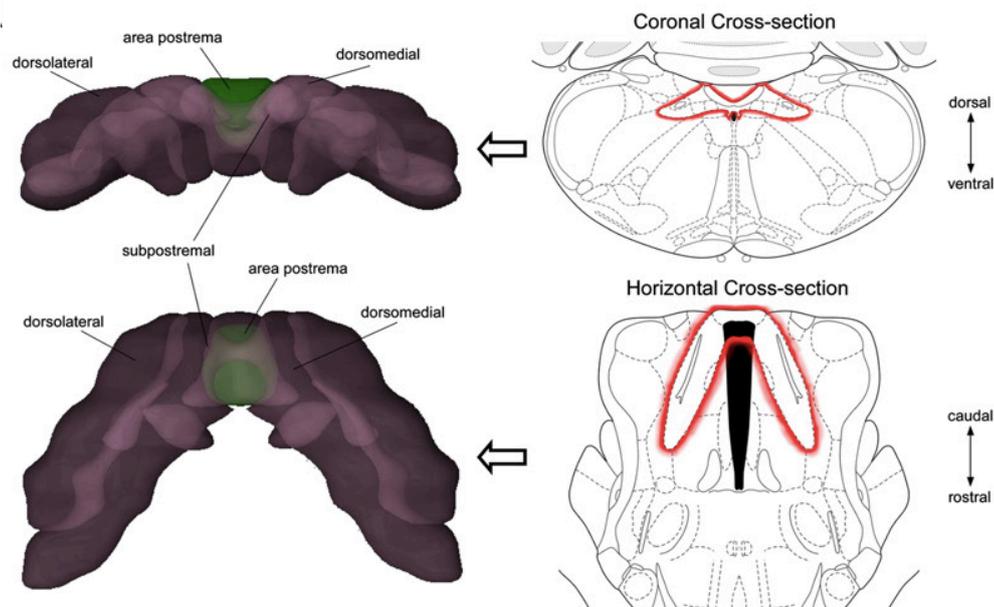
Os barorreceptores sino-aórticos fornecem aos centros de regulação cardiovascular no tronco encefálico um fluxo contínuo de informações sobre a pulsação para superar as flutuações na PA. Esses receptores sensíveis ao estiramento são terminais nervosos encapsulados ou livres localizados na túnica adventícia do seio carotídeo e do arco aórtico que respondem às mudanças nas dimensões da parede arterial produzidas por flutuações na pressão transmural. As informações aferentes dos receptores são retransmitidas para os núcleos do tronco cerebral através dos nervos glossofaríngeos (aferentes do seio carotídeo) e vagos (aferentes do arco aórtico) que atuam como o centro do arco barorreflexo (Figura 03). A entrada de barorreceptores no tronco encefálico atinge principalmente o núcleo do trato solitário (NTS) localizado na medula dorsal que possui conexões intrincadas com os centros cardioinibitórios e vasomotores localizados na medula ventrolateral caudal e rostral (RVLM) e no núcleo ambíguo do vago. O RVLM projeta-se para neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na coluna cinzenta intermediolateral dos segmentos torácico e lombar da coluna vertebral. Os axônios dos neurônios do núcleo ambíguo se projetam como suprimento parassimpático pré-ganglionar para o coração (CAMPAGNARO et al., 2012; KAUR et al., 2016).

A pressão arterial (PA) flutua constantemente com o comportamento; contudo a média diária é mantida e regulada pelo sistema nervoso autônomo com insumos dos sistemas barorreflexo e quimiorreflexo que sustentam a homeostase corporal. O núcleo do trato solitário (NTS) é um agrupamento de núcleos no interior da medula oblonga do tronco cerebral que possui várias funções reguladoras autonômicas. Por exemplo, um aumento no PA ativa os barorreceptores pela distensão da parede arterial, resultando em aumento da frequência de disparo do potencial de ação do barorreceptor que despolariza neurônios do NTS para alcançar a inibição de neurônios eferentes simpáticos, que por sua vez reduz a frequência cardíaca (FC), causa vasodilatação e restaura níveis normais de PA (HAINES, 2004; SANTIAGO; FIOR-CHADI; CARRETTIERO, 2015).

O NTS também recebe entradas barorreflexas do seio carotídeo através do nervo glossofaríngeo, estimulando o nervo vago a afetar a resposta reflexa bradicárdica por ativação parassimpática, o barorreflexo é o principal mecanismo homeostático empregado para amortecer flutuações de PA de curto prazo. A estrutura anatômica macroscópica o NTS é o da letra "V", com os núcleos medial e lateral

bilaterais convergindo adjacente aos núcleos comissurais centrais e subtramais, localizado abaixo da área postrema, e divergindo lateralmente em direção ao anterior do NTS (Figura 04). A função dos neurônios no NTS varia de maneira regionalmente específica, com aferências viscerais de nervos glossofaríngeo e vago associados a regiões NTS que, rostro-caudalmente, serve para fins gustativos, funções cardiovasculares / respiratórios e gastrointestinais (HAINES, 2004; SANTIAGO; FIOR-CHADI; CARRETTIERO, 2015).

FIGURA 04: Modelo Anatômico e Estrutura do NTS.



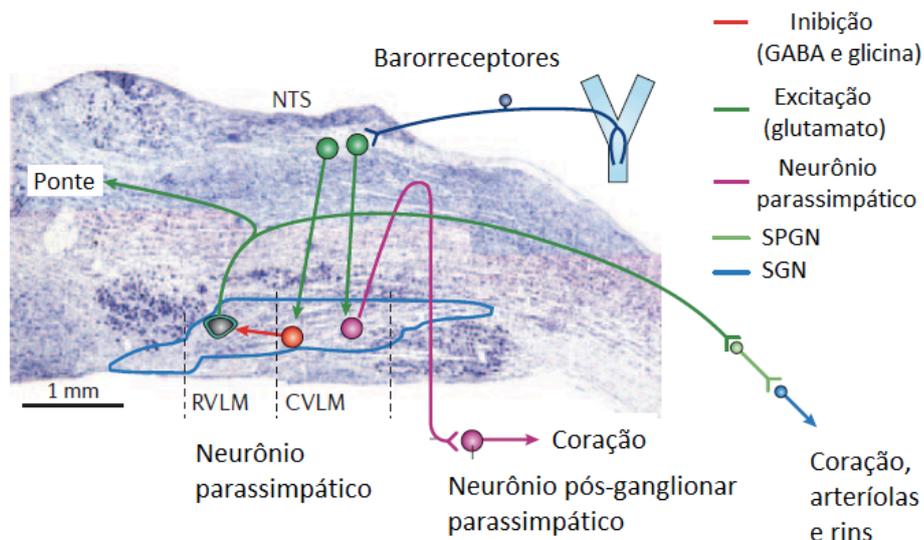
Imagens frotais e superiores dos núcleos lateral, medial e subpostremal. Estruturas análogas, correspondentes às regiões do Atlas Cerebral de Ratos (Paxinos; Watson, 2007), são mostradas à direita, em corte transversal coronal (superior direito; Bregma – 13.80), e em corte horizontal (inferior direito; Interaural 1.90mm) – adaptado de Santiago; Fior-Chadi e Carrettiero, (2015).

Como dito anteriormente, o NTS, localizado na porção dorsal do bulbo, é um importante centro integrador das informações cardiovasculares (REIS et al. 1984). Este núcleo recebe aferências primárias dos baro e quimiorreceptores localizados no arco aórtico e no seio carotídeo possibilitando ajustes homeostáticos instantâneos nos níveis de pressão e acidez arterial, respectivamente. Do NTS partem projeções excitatórias para o CVLM que, por sua vez, projeta-se inibindo neurônios do RVLM (DAMPNEY, 1994). Os neurônios deste núcleo são cruciais para o controle da pressão

arterial, pois se auto-disparam originando o tônus simpático basal. Este controle momento-a-momento da pressão arterial, que acaba por modular a atividade cardíaca, da adrenal e das arteríolas, é chamado de barorreflexo (Figura 05).

Neurônios secundários do NTS excitam neurônios pré-ganglionares do parassimpático localizados no núcleo dorsal motor do vago e no núcleo ambíguo, que por sua vez se projetam (eferentes vagais) aos neurônios pós-ganglionares intramurais situados no coração, determinando aumento da atividade vagal e queda da frequência cardíaca (FC). O tônus simpático para o coração, rins e vasos, por outro lado, é reduzido, uma vez que outros neurônios do NTS, quando estimulados por aumento da PA, excitam o bulbo ventrolateral caudal que inibe os neurônios pré-motores simpáticos do bulbo ventrolateral rostral. Ocorre, assim, redução da contratilidade cardíaca e bradicardia e, também, queda da resistência vascular periférica e renal, que levam à redução da PA (IRIGOYEN et al.; 2005; MENDONÇA et al.; 2005).

FIGURA 05: Localização anatômica do núcleo do trato solitário (NTS), da medula ventrolateral rostral (RVLM) e medula ventrolateral caudal (CVLM).



Aferências primárias dos barorreceptores e quimiorreceptores chegam ao NTS. Essas aferências são redistribuídas para núcleos mais ventrais, como a CVLM e o RVLM de onde partem vias simpáticas e parassimpáticas para o coração e arteríolas e rins. Este controle momento-a-momento da pressão arterial é chamado de barorreflexo. Fonte: Modificada de Guyenet (2006).

3.0- MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL: SHR

No intuito de trabalhar com modelos de animais eficientes que se assemelham a hipertensão humana buscando uma eficácia no tratamento, existem hoje vários modelos animais de estudo como por exemplo: ratos espontaneamente hipertensos (SHR), ratos sensíveis ao sal (Dahl-rapp), modelos de hipertensão transgênica, hipertensão por inibição crônica do óxido nítrico, modelos de hipertensão renal, neurogênica e ainda endócrina (DORNAS; SILVA, 2011; FAZAN JR et al., 2001).

Estudos farmacológicos em busca de novos agentes anti-hipertensivos têm apresentado grande avanço com uso de modelos animais os quais apresentam grande semelhança fisiopatológica. A participação de fatores genéticos determinando a elevação da PA tornou possível a seleção de ratos geneticamente hipertensos, entre estes podemos citar os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) desenvolvidos por Okamoto e Aoki e seus respectivos controles Wistar Kyoto (WKY) (TRIPPODO; FROHLIC, 1981).

Os ratos Wistar Kyoto (WKY) foram originalmente criados como controles normotensos para os ratos com hipertensão espontânea (SHR). Esses ratos têm sido extensivamente utilizados em estudos fisiológicos relacionados à hipertensão, mas também exibem uma bateria de características comportamentais distintas (ZHANG-JAMES; MIDDLETON; FARAONE, 2013). Além de medidas comportamentais, a cepa WKY também demonstra alterações no neurotransmissor central endógeno, incluindo anormalidades monoaminérgicas, com sistemas de neurotransmissores dopaminérgicos e noradrenérgicos e sistemas do hormônio estimulante da tireóide, em comparação com animais controle (EDWARDS; KING, 2009).

A importância do modelo animal SHR tem sido atribuída a semelhança de sua fisiopatologia com hipertensão essencial em humanos (TRIPPODO; FROHLIC 1981). É o modelo animal mais utilizado da hipertensão essencial, distúrbio metabólico e hipertrofia ventricular (PRAVENEK et al, 2014).

Trippodo e Frohlich, ao afirmarem que o SHR é um excelente modelo da hipertensão essencial do homem, o fazem com as seguintes ressalvas: 1) reconhecimento da improbabilidade de que ambas as formas de hipertensão espontânea (rato e homem) sejam expressões idênticas de uma doença hipertensora determinada geneticamente; 2) ambas têm origem poligênica e são influenciadas por

fatores ambientais; 3) sendo o controle cardiocirculatório multifatorial, certos mecanismos pressores não se expressam, necessariamente, em ambas as situações.

Devido à similaridade da sua fisiopatogenia com a hipertensão essencial no homem, ambas têm origem poligênica, não expressam certos mecanismos pressores e são influenciadas por fatores ambientais; sendo o controle cardiocirculatório multifatorial. A hipertensão no rato adulto está associada a um aumento da resistência periférica total e um débito cardíaco normal ou diminuído (PRAVENEK et al, 2013).

Estudos com SHR revelam que o aumento da resistência periférica total esta associada à redução da distensibilidade e complacência vascular nos animais jovens como resultado de uma hipertrofia da camada média, em vez de alterações intrínsecas das propriedades elásticas dos vasos (PIRES; JACKSON; DORRANCE, 2015). Estes animais apresentam alterações de alguns sistemas de neurotransmissores que podem ter relevância funcional, tais como uma neurotransmissão colinérgica prejudicada característica, além de hipofunção dopaminérgica e hiperatividade noradrenérgica, acredita-se que outros mecanismos além destes tenham participação na manutenção da hipertensão arterial de SHR jovens e velhos (TAYEBATI; TOMASSONI; AMENTA, 2012).

Ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) foram originados de forma consanguínea de ratos Wistar e seus controles não-hipertensos endogâmicos Wistar-Kyoto (WKY) (OKAMOTO e AOKI, 1963). Estes ratos desenvolvem hipertensão a cerca de 4–6 semanas de idade sem tratamento fisiológico, farmacológico ou intervenção cirúrgica (ZICHA; KUNES, 1999).

Os SHRs começam a desenvolver hipertensão arterial com 5 semanas de vida, já apresentando um nível de pressão considerado como hipertensão espontânea entre a 7^a e a 15^a semanas, atingindo um platô entre a 20^a e 28^a semanas, não havendo influência sexual nesse desenvolvimento. Entretanto, fatores ambientais, tais como ingestão exagerada de sódio, estresse, alterações sociais e alterações do ciclo claro/escuro, afetam o desenvolvimento da hipertensão (YAMORI, 1984).

Estudos in vivo demonstraram que nos estágios iniciais da hipertensão, os SHRs têm um débito cardíaco aumentado resistência periférica total normal. À medida que o SHR progride para o estado de hipertensão estabelecido, o débito cardíaco retorna aos valores normais e os vasos sanguíneos hipertrofiados produzem um

aumento no total periférico resistência (SMITH; HUTCHINS, 1979). Com o avanço da hipertensão, o SHR se desenvolve progressivamente (entre 6 e 24 meses de idade) alterações estruturais no coração, que estão associados à hipertrofia cardíaca progressiva (ENGELMANN et al. 1987). Como esta não é uma cepa estritamente endogâmica, variações individuais no background genético de ambos SHR e particularmente de sua cepa de controle podem influenciar significativamente as mudanças nos órgãos-alvo.

4.0- TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL

As pressões sanguíneas alvo são usadas na prática clínica pelos médicos para tomar decisões de tratamento relacionadas à intensidade da terapia anti-hipertensiva para cada paciente. O alvo padrão da pressão arterial geralmente tem sido um limiar arbitrário de pressão arterial acima do qual o tratamento é recomendado. Com o tempo, o limite tornou-se menor. A meta padrão de pressão arterial sistólica declinou de uma meta de ≤ 160 mmHg para uma meta de ≤ 140 mmHg e a meta de pressão arterial diastólica diminuiu de ≤ 100 mmHg para ≤ 90 mmHg em pessoas com até 80 anos de idade (MANCIA, et al., 2007). Mesmo metas menores de pressão arterial foram propostas para pessoas com histórico de eventos cardiovasculares (MANCIA, et al., 2007; CHOBANIAN et al., 2003).

Atualmente, existem medicamentos anti-hipertensivos utilizados no controle da pressão arterial classificados como bloqueadores dos canais de cálcio diidropiridínicos; bloqueadores dos canais de cálcio não diidropiridínicos; fármacos diuréticos; inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA); β bloqueadores; bloqueadores dos receptores da angiotensina-2; e bloqueadores α -1 (STAFFILENO, 2005) esses reduzem a pressão arterial agindo na resistência e na capacitância dos vasos, no coração e nos rins (WEBB et al., 2010; MONTEIRO et al., 2012).

Os antagonistas de canais de cálcio vêm sendo empregados no tratamento da hipertensão arterial desde meados da década de 1970. Constituem grupo heterogêneo de drogas, existindo, no presente, quatro famílias distintas: os derivados das diidropiridinas (como, por exemplo, nifedipina, felodipina, lacidipina e amlodipina), dos benzotiazepínicos (como, por exemplo, diltiazem), das fenilalquilaminas (como, por exemplo, verapamil) e tetralol (mebefradil) (PITT, 1997).

Os bloqueadores de canais de cálcio inibem o influxo de íons cálcio no músculo liso vascular e nas células miocárdicas. Eles reduzem a pressão arterial através de vários mecanismos: pela vasodilatação, reduzindo a força de contração do coração, diminuindo a frequência cardíaca e reduzindo diretamente a produção de aldosterona (WRIGHT et al., 2018).

A ação anti-hipertensiva decorre da redução da resistência vascular periférica por diminuição da concentração de cálcio nas células musculares lisas vasculares. Com base no mecanismo de ação, o íon cálcio é um importante mensageiro intracelular, sendo fundamental nos mecanismos de excitação e contração da musculatura lisa do miocárdio e dos vasos. Além disso, as correntes de cálcio são necessárias para a atividade marca-passo do nó sinoatrial e do sistema de condução atrioventricular. O íon cálcio penetra no citoplasma celular através de diferentes canais; no sistema cardiovascular, os canais mais importantes são os voltagem-dependente (dependente de um estímulo elétrico) e receptor-dependente (estimulado por agonistas). Há pelo menos seis tipos de canais voltagem-dependente encontrados em vários tecidos: L, N, P, Q, R e T (TRIGGLE, 1996; CATTERALL, 2011).

No sistema cardiovascular são encontrados dois tipos de canais: o reconhecido canal L (L de longa ação da corrente elétrica produzida pela entrada de cálcio para dentro da célula) e o mais recentemente descoberto e denominado canal T (caracterizado pela corrente elétrica transitória e de menor voltagem) (DOLLERY, 1991). A estrutura protéica do canal L está bem reconhecida. É composto de várias subunidades, incluindo alfa1, alfa2, beta e delta (a gama existe apenas no músculo esquelético). Todos os antagonistas de canais de cálcio ligam-se à subunidade alfa1. Os diferentes antagonistas de canais de cálcio exibem diferentes comportamentos farmacológicos, dependentes do sítio onde estiverem atuando (BEAN, 1991)

Diuréticos utilizados no tratamento de hipertensão arterial podem ser divididos em quatro grandes grupos de acordo com o seu principal local de ação no túbulo renal: túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e túbulo coletor. Uma característica comum a todos os diuréticos é a ação natriurética, que leva à diminuição do Na⁺ corporal total (BATLOUNI, 2009).

O mecanismo de ação pelo qual os diuréticos tiazídicos reduzem a pressão arterial a longo prazo não é totalmente compreendido (ZHU et al., 2005). Após o uso crônico, as tiazidas diminuem a resistência periférica. O mecanismo desses efeitos é

incerto, pois pode envolver efeitos em todo o corpo, auto-regulação renal ou ações vasodilatadoras diretas (HUGHES, 2004). As tiazidas atuam no rim para inibir a reabsorção de íons sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-) dos túbulos contorcidos distais nos rins, bloqueando o simetizador de cloreto de sódio sensível à tiazida (DUARTE, 2010). Também aumentam a reabsorção de cálcio no túbulo distal e aumentam a reabsorção de íons cálcio (Ca^{2+}), por um mecanismo envolvendo a reabsorção de sódio e cálcio no túbulo proximal em resposta à depleção de sódio.

Todas as classes de fármacos anti-hipertensivos demonstraram reduzir significativamente o risco de acidente vascular cerebral e eventos cardiovasculares importantes: no entanto, algumas classes de medicamentos, como os que atuam no sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) revelaram-se particularmente favoráveis em termos de eficácia e segurança e por esta razão estão entre os medicamentos anti-hipertensivos mais populares, amplamente utilizados e recomendados (OMBONI; VOLPE, 2019).

Os inibidores da ECA bloqueiam a conversão da angiotensina I (AI) em angiotensina II (AII), diminuindo assim as ações da angiotensina II. O resultado final é diminuir a resistência arteriolar e aumentar a capacidade venosa; diminuir o débito cardíaco, o índice cardíaco, o trabalho de acidente vascular cerebral e o volume; menor resistência nos vasos sanguíneos nos rins; e aumentar a excreção de sódio na urina. Renina e AI aumentam a concentração no sangue como resultado de feedback negativo da conversão de AI em AII. Os níveis de AII e aldosterona diminuem. A bradicinina aumenta, porque a ECA também é responsável pela inativação da bradicinina. Os bloqueadores dos receptores da angiotensina (BRA), bloqueiam a ativação dos receptores AT_1 da angiotensina II. O bloqueio dos receptores AT_1 provoca diretamente vasodilatação, reduz a secreção de vasopressina e reduz a produção e a secreção de aldosterona (WRIGHT et al., 2018).

A redução da pressão arterial por todas as classes de medicamentos anti-hipertensivos é acompanhada por reduções significativas de acidentes vasculares cerebrais e doenças cardiovasculares (DC). Drogas que atuam no sistema renina-angiotensina-aldosterona, como os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECAs) e bloqueadores dos receptores da angiotensina (BRAs), mostraram benefícios semelhantes nos principais eventos cardiovasculares para outros medicamentos anti-hipertensivos. Na prática, os BRAs reduziram em 10% a

incidência de mortalidade, infarto do miocárdio não fatal, acidente vascular cerebral não fatal e forneceram proteção superior contra eventos DC do que os IECAs em pacientes de alto risco. Apesar de propriedades anti-hipertensivas semelhantes e um perfil de segurança favorável tanto para os IECAs como para os BRAs, evidências indicam que pacientes tratados com BRAs têm menores taxas de abstinência por eventos adversos e maior persistência na terapia do que aqueles tratados com IECAs (WILLIAMS et al., 2018; OMBONI; VOLPE, 2019).

Embora o efeito na diminuição da PA seja semelhante entre os agentes anti-hipertensivos, algumas diferenças na eficácia são relatadas na prática clínica. As diferenças podem ser parcialmente atribuídas a maior adesão e melhora da qualidade de vida observada durante os tratamentos com IECAs e BRAs, comparados aos bloqueadores dos canais de cálcio, diuréticos ou betabloqueadores. A adesão ou descontinuação são muitas vezes consequência de efeitos colaterais indesejados (KRONISH et al., 2011).

Os *beta*-bloqueadores são antagonistas competitivos que bloqueiam os locais receptores de epinefrina (adrenalina) e norepinefrina nos receptores *beta* adrenérgicos. Alguns bloqueiam a ativação de todos os tipos de receptores *beta*-adrenérgicos (β_1 , β_2 e β_3), e outros são seletivos para um dos três tipos de receptores *beta* (FRISHMAN, 2005).

Os *beta*-bloqueadores têm sido usados como terapia de primeira linha para a hipertensão, porque se pensava que eles tivessem efeitos favoráveis de longo prazo sobre as doenças cardiovasculares (JNC-6, 1997; PHILIPP et al., 1997), mas a evidência para o uso de betabloqueadores como terapia de primeira linha para a hipertensão já foi questionada (MESSERLI et al., 2003 ; CARLBERG et al., 2004). Em duas meta-análises recentes, os *beta*-bloqueadores foram menos eficazes na redução da incidência de AVC (LINDHOLM et al., 2005) e o composto dos principais desfechos cardiovasculares, incluindo acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio e morte (KHAN; MCALISTER, 2006), em comparação com todos os outros anti-hipertensivos tomados em conjunto. No entanto, os *beta*-bloqueadores podem ter diferentes resultados comparativos versus as várias outras classes de drogas. Por exemplo, vários estudos afirmam que os bloqueadores dos canais de cálcio (BCCs) são melhores que outros agentes anti-hipertensivos na prevenção de AVC, mas menos eficazes na prevenção de doenças coronarianas (WIYSONGE et al., 2007).

A patogênese e manutenção da hipertensão essencial tem sido associada a vários fatores, mas a hiperatividade do sistema nervoso simpático possui um papel principal. Uma manifestação dessa hiperatividade é um aumento generalizado na resistência periférica total, a anormalidade hemodinâmica fundamental na hipertensão essencial (DAVEY, 1986). Esta anormalidade aparece mesmo em pacientes que não têm evidência de aumento da resistência periférica em repouso, mas que, em exercício, demonstram alta resistência sistêmica inadequada em um dado nível de aumento do débito cardíaco (DAVEY, 1987). Outros mecanismos proeminentes no desenvolvimento de hipertensão sistêmica incluem aumento da sensibilidade vascular às catecolaminas ou a outras substâncias vasoativas, hiperatividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona, ou um nível reduzido de substâncias vasodilatadoras locais ou circulantes (COLUCCI, 1983).

As ações do sistema nervoso simpático envolvem dois tipos de receptores: α_1 e α_2 -adrenérgicos. Estes receptores são definidos por suas respostas à estimulação por catecolaminas: receptores α -adrenérgicos respondem primariamente à epinefrina e norepinefrina e menos a isoproterenol; o inverso é verdadeiro de receptores β -adrenérgicos (COLUCCI, 1983). Os receptores α -adrenérgicos são subdivididos em dois tipos distintos: α_1 , a maioria dos quais estão localizados pós-juncionalmente a célula muscular lisa vascular e α_2 , que estão localizados pré-juncionalmente no nervo simpático (COLUCCI; BRAUNWALD, 1984). Os bloqueadores dos receptores alfa adrenérgicos inibem a ligação de norepinefrina (noradrenalina), nos receptores α_1 nas células musculares lisas vasculares. O principal efeito dessa inibição é a vasodilatação, que diminui a resistência vascular periférica, levando à diminuição da pressão arterial (WRIGHT et al., 2018).

Por outro lado, os agonistas como a noradrenalina, ligam-se aos receptores metabotrópicos α_1 -adrenérgicos, com sete segmentos transmembranar, acoplados a uma proteína G heterotrimérica (Gq/11). As proteínas G são heterotrimeros compostos de três subunidades: alfa, beta e gama. Durante a ativação, a subunidade alfa se dissocia das demais e passa a ativar uma série de eventos estimulando a atividade da fosfolipase C (PLC). Esta enzima degrada o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) catalisando a formação de dois potentes segundos mensageiros: trifosfato de inositol (IP₃) e do diacilglicerol (DAG). O IP₃ se liga ao seu receptor (IP₃R) presente na membrana do retículo sarcoplasmático (RS), promovendo assim, a liberação do

Ca²⁺ do RS (NELSON et al., 1990; BERS, 2002; WEBB, 2003; BANKAR et al.; 2009, CHEN et al.; 2009; GUEDES et al.; 2004; ZHANG et al.; 2010; KROON, 2011). Por sua vez, o DAG e as altas concentrações de cálcio (Ca²⁺) ativam a proteína quinase C (PKC). As células musculares lisas vasculares possuem 3 isoformas de PKC: PKC α , PKC β que são cálcio e DAG dependentes e a PKC ϵ que só depende de DAG para sua ativação. Em resposta a estímulos específicos no músculo liso, a concentração intracelular de Ca²⁺ aumenta, e ele combina-se com a proteína calmodulina, um dímero com quatro sítios de ligação ao Ca²⁺. Este complexo ativa a miosina quinase de cadeia leve (MLCK) para fosforilar a miosina de cadeia leve (MLC). Além da fosforilação da MLCK a PKC pode ainda ativar outras proteínas envolvidas com a contração como quinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares (ERK 1/2), Rho quinase e a proteína quinase dependente de calmodulina II. Uma vez ativada, via PKC ou pelo complexo Ca²⁺- calmodulina (CAM), a MLCK fosforila a MLC. A fosforilação da MLC possibilita a interação entre os filamentos de actina e miosina. A energia liberada do ATP pela atividade intrínseca de uma ATPase localizada na cabeça da miosina leva a formação de pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina resultando na contração. Desta forma, a contração é determinada essencialmente pelo estado de fosforilação da MLC. Em algumas CMLVs, a fosforilação da MLC é mantida em níveis reduzidos capazes de manter a contração ainda que na ausência de estímulos mecânicos ou da ativação de receptores e esta atividade resulta no tônus do músculo liso (NELSON et al., 1990; BERS, 2002; WEBB, 2003; KROON, 2011).

O receptor α_2 -adrenérgico pré-juncional é bastante diferente do receptor α_1 -adrenérgico e está envolvido na manutenção do tônus vascular mediando a liberação de norepinefrina. Quando o receptor α_2 -adrenérgico é estimulado pela norepinefrina, a liberação adicional de norepinefrina é inibida. O bloqueio do receptor α_2 -adrenérgico resulta em um efeito oposto; ou seja, liberação aumentada de norepinefrina. O receptor α_2 -adrenérgico, portanto, faz parte de um loop de feedback que mantém atividade simpática e subsequente tônus vascular (COLUCCI, 1983; NASH, 1990).

Os receptores α -adrenérgicos também diferem em suas especificidades quanto aos agentes antagonistas. Os receptores α_1 -adrenérgicos possuem alta afinidade por drogas como prazosina, doxazosina e terazosina e baixa afinidade por drogas como a clonidina ou ioimbina. O inverso é verdadeiro para os receptores α_2 -adrenérgicos:

afinidade extremamente baixa para prazosina e doxazosina e alta afinidade para clonidina ou ioimbina (COLUCCI, 1983; NASH, 1990).

Embora, nos últimos cinquenta anos, um longo caminho tenha sido percorrido em busca do tratamento eficaz no manejo da hipertensão, introduzindo progressivamente no mercado farmacêutico drogas anti-hipertensivas com melhor eficácia, eles ainda possuem sérios efeitos adversos (AL-SALAH, 2014)

Além disso, a incompleta compreensão, em alguns aspectos, da fisiopatologia da hipertensão denominada “essencial” ou mesmo a hipertensão resistente, contribui para o insucesso do controle pressórico do tratamento farmacológico atual. Permanecendo para o presente século o desafio da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (SAKLAYEN; DESHPANDE, 2016).

5.0- CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos obtidos a partir da degradação enzimática do amido, possuindo estrutura cíclica formada por unidades de D-glucopiranosose ligadas através de ligações α (1-4). Estas moléculas possuem conformação tronco-cônica, com superfície externa hidrofílica e cavidade interna hidrofóbica (MURA, 2014) (Figura 06). As CDs naturais são denominadas α -, β - e γ -CDs, sendo compostas, respectivamente, por seis, sete e oito unidades monoméricas (LOFTSSON; BREWSTER, 2012).

As CDs naturais e seus derivados são usados como excipientes farmacêuticos que melhoram a solubilidade aquosa de fármacos pouco solúveis, aumentam a permeabilidade do fármaco através de membranas biológicas e melhoram a biodisponibilidade do fármaco. Ao contrário dos intensificadores de penetração convencionais, sua estrutura hidrofílica e seu alto peso molecular impedem que penetrem nas membranas lipofílicas, deixando as membranas biológicas intactas (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018). As CDs naturais e alguns de seus derivados são comumente usados como aditivos alimentares e em produtos de higiene pessoal. As CDs formam complexos de inclusão com porções lipofílicas de drogas hidrofóbicas. Além disso, As CDs são capazes de formar complexos de não inclusão e agregados automontados; pequenos e grandes agregados complexos com estruturas semelhantes a micelas que podem aumentar a

solubilidade do fármaco. Excipientes comumente usados em formulações farmacêuticas podem ter efeito aditivo ou inibidor sobre a solubilização de CD (JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos, formados por unidades de glicose α -1,4- ligadas, com superfície externa hidrofílica e cavidade central lipofílica (ASTRAY et al., 2009; KURKOV; LOFTSSON, 2013; JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018; MUANKAEW; LOFTSSON, 2018). As CD mais importantes são compostas de seis (α -CD), sete (β -CD) e oito (γ -CD) unidades ou monômeros de glicose através da ligação α -(1-4). Esses números de monômeros conferem diferentes propriedades físico-químicas a cada uma dessas CD, como mostra a Tabela 02.

TABELA 02: Propriedades físico-químicas α , β , γ ciclodextrinas.

Propriedade	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidade de glicose	6	7	8
Massa molar (g mol ⁻¹)	972	1135	1297
Solubilidade em H ₂ O (g/100 mL a 25 °C)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro interno (Å)	4,7 – 5,3	6,0 – 6,5	7,5 – 8,3
Altura da estrutura (Å)	7,9±0,1	7,9±0,1	7,9±0,1
Volume aproximado (Å ³)	174	262	427
pKa (25 °C)	12,333	12,202	12,081

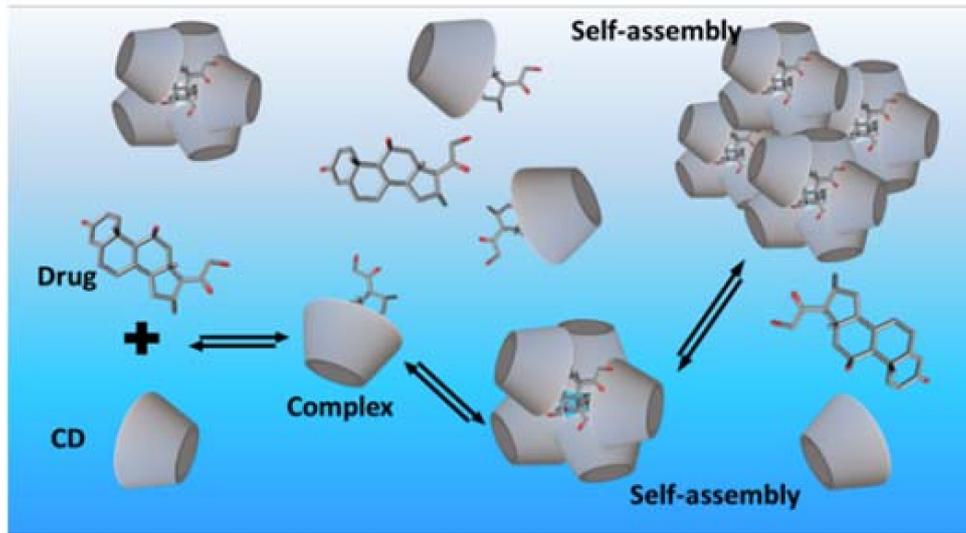
Fonte: VEIGA et al, 2006.

A α -ciclodextrina (α CD), β -ciclodextrina (β CD) e γ -ciclodextrina (γ CD) são produtos naturais que podem ser encontrados em pequenas quantidades em vários produtos de consumo fermentados, como a cerveja. Embora os α CD, β CD e γ CD naturais não substituídos e seus complexos sejam hidrofílicos, sua solubilidade em

soluções aquosas é um tanto limitada, especialmente a de β CD. Consequentemente, os derivados de CD mais solúveis, tais como 2-hidroxiopropil- β CD (HP β CD) e o sal de sódio sulfobutileter β CD (SBE β CD), são preferidos para utilização em soluções aquosas farmacêuticas, tais como formulações parenterais de fitofármacos, embora tanto α CD como γ CD possam ser encontradas em baixas concentrações em formulações parenterais (FDA, 2019). As CDs estão incluídas em mais de 40 produtos farmacêuticos comercializados em todo o mundo, além de inúmeros produtos alimentícios, cosméticos e de higiene (ASTRAY et al., 2009; HU et al., 2014; ARIMA et al., 2017).

Devido à sua capacidade de alterar as propriedades físico-químicas de fármacos e outros compostos, as CDs são frequentemente referidos como excipientes farmacêuticos capacitantes. As CDs permitem o fornecimento de medicamentos pouco solúveis em água e quimicamente instáveis ao organismo. Assim, as CDs são capazes de converter compostos biologicamente ativos que não possuem propriedades físico-químicas semelhantes a drogas em drogas terapeuticamente eficazes. As CDs (referidos como moléculas hospedeiras) são capazes de formar complexos de inclusão com drogas (referidas como moléculas hospedeiras) ao tomar parte de uma molécula de droga na cavidade central do CD. Isso mudará as propriedades físico-químicas do medicamento incluído (SAOKHAM et al., 2018). A formação de um complexo de inclusão fármaco/CD pode, por exemplo, aumentar a solubilidade aquosa do fármaco, aumentar a sua estabilidade química e física e aumentar a distribuição de fármaco através de membranas biológicas (STELLA et al., 1999). As moléculas do fármaco são prontamente liberadas do complexo por diluição do meio ou por complexação competitiva (KURKOV et al., 2012; LOFTSSON et al., 2016). Uma ou mais moléculas de fármaco podem formar um complexo com uma molécula de CD e uma ou mais moléculas de CD podem formar um complexo com uma molécula de fármaco (Figura 06). No entanto, mais comumente, uma molécula de droga (D) forma um complexo com uma molécula de CD.

FIGURA 06: Formação de um complexo de inclusão de ciclodextrina em uma solução aquosa.



Fonte: SAOKHAM et al., 2018.

Os grupos hidroxila secundários na molécula de CD estão localizados na borda mais larga da molécula e os grupos hidroxila primários na borda estreita os tornam hidrofílicos (SZEJTLI, 1998; BREWSTER; LOFTSSON, 2007). Devido à sua superfície externa hidrofílica e seu grande número de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, as CDs têm um valor $\log P_{o/w}$ muito negativo (isto é, o valor logarítmico do coeficiente de partição octanol/água (KURKOV; LOFTSSON, 2013). Em soluções aquosas, as CDs são suscetíveis à hidrólise ácida em pH baixo, resultando na abertura do anel e na formação de vários oligossacarídeos lineares e unidades de glicose, mas são estáveis sob condições alcalinas. Os grupos hidroxila ligados ao aro começam a desprotonar em pH de aproximadamente 12 (LOFTSSON et al., 2007).

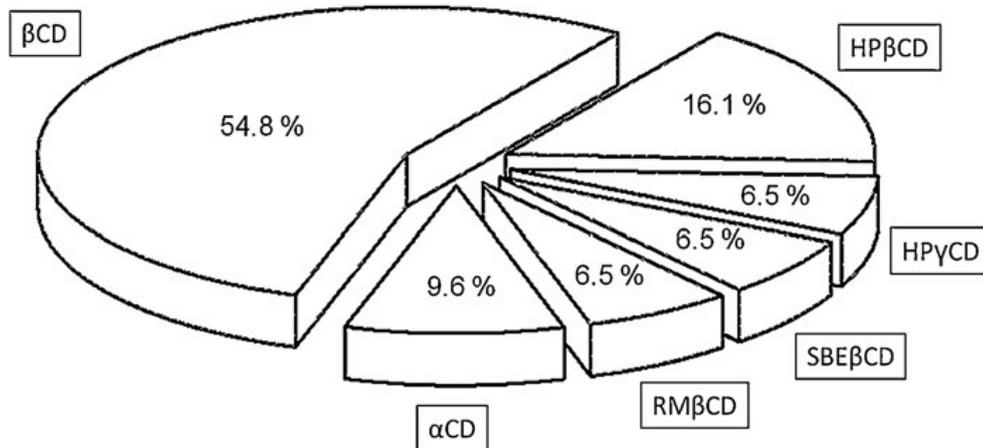
A principal diferença das três CDs naturais, além do tamanho de sua cavidade central, é a sua solubilidade aquosa. β CD é o menos solúvel, mas, ao mesmo tempo, possui o tamanho de cavidade mais adequado para a formação de complexos com muitos fármacos (LOFTSSON; MARCUS, 2012). A fraca solubilidade pode ser explicada em termos de rigidez molecular da molécula CD e o efeito causado pela ligação de hidrogênio intermolecular no estado cristalino. Particularmente, a formação da ligação de hidrogênio entre C2-OH e C3-OH vizinhos na molécula β CD leva à

chamada cinta secundária completa resultando em estrutura inflexível e capacidade reduzida da molécula β CD de formar ligação de hidrogênio intermolecular com moléculas de água circundantes (SZEJTLI, 1998; SABADINI et al., 2006). Simulações dinâmicas moleculares mostraram alta densidade na água e forte ordenação de moléculas de água ao redor da molécula β CD (NAIDOO et al., 2004). Isso indica que as moléculas de água ao redor das moléculas de β CD dissolvidas têm entalpia desfavorável e baixa entropia, o que pode explicar a baixa solubilidade em água de β CD em comparação com outras CDs naturais. Em contraste, α CD possui uma faixa incompleta de ligações de hidrogênio e γ CD possui uma estrutura não coplanar. Consequentemente, tanto α CD como γ CD possuem maior solubilidade em água (SAOKHAM et al., 2018).

Kurkov & Loftsson, (2013), mostram que a β CD é a mais comumente empregada (Figura 07), devido a facilidade de sua produção e subsequente baixo preço (mais de 10.000 toneladas produzidas anualmente com um preço médio aproximadamente 5 USD por kg). No entanto, as CD têm algumas desvantagens, principalmente a sua solubilidade aquosa relativamente fraca. Em contraparte sua forma linear é livremente solúvel em água.

Acredita-se que a baixa solubilidade da CD é causada por sua estrutura; suas dimensões moleculares são ótimas para a formação de um anel de hidrogênio intramolecular ligações que neutralizam a hidratação do CD, reduzindo assim sua solubilidade. Devido à sua baixa solubilidade aquosa, o CD não é adequado para administração parenteral. Uma solução universal para este problema foi encontrada na substituição de múltiplos CD-hidroxilas em ambas bordas da molécula (isto é, ligação aleatória de porções orgânicas causou a ruptura da construção intramolecular da ligação de hidrogênio que, em conjunto com a redução da cristalinidade, resultou em solubilidade aquosa notavelmente melhorada). Devido a estas vantagens, as CDs substituídos cobrem mais de 1/3 de todos os medicamentos contendo CD, ao passo que uma alta tolerância no corpo humano abriu novas portas no desenvolvimento de formulações injetáveis com maior eficiência (KURKOV; LOFTSSON, 2013).

FIGURA 07: Distribuição relativa de ciclodextrinas usadas em medicamentos comercializados.



Legenda: Beta-Ciclodextrina (β -CD), Alfa-Ciclodextrina (α -CD), 2-hidroxipropil-beta-Ciclodextrina (HP β CD), 2-hidroxipropil-gama-Ciclodextrina (HP γ CD), sulfobutileter-beta-ciclodextrina (SBE β CD), metil-beta-ciclodextrina substituída aleatoriamente (RM β CD). **Fonte:** KURKOV; LOFTSSON, 2013.

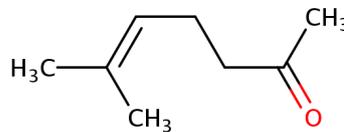
A digestão de dextrinas lineares simples, bem como o amido após administração oral, procede principalmente através de um processo de hidrólise enzimática gradual em glicose (DONA et al., 2010). A amilase salivar hidrolisa as dextrinas prontamente, mas as dextrinas administradas por via oral são transportadas rapidamente para o estômago, onde a enzima está inativada. Algumas hidrólises ácidas específicas não enzimáticas das dextrinas ocorrem no estômago, mas a formação de complexos com lipídios alimentares pode retardar a hidrólise (SINGH; DARTOIS; KAUR, 2010). Do estômago, as dextrinas seguem para o ambiente neutro do intestino delgado, onde o líquido pancreático contendo a amilase é liberado. Aqui, a hidrólise enzimática da dextrina continua.

Os substratos de dextrina não digeridos pela amilase sofrem digestão bacteriana nas seções inferiores do sistema de digestão. As dextrinas lineares e outros polímeros solúveis são comumente utilizados em soluções parenterais. Os parâmetros farmacocinéticos mais importantes para essas macromoléculas são a depuração urinária e captação hepática (NISHIKAWA; TAKAKURA; HASHIDA, 1996).

6.0- 6-METIL-5-HEPTEN-2-ONA (SULCATONA)

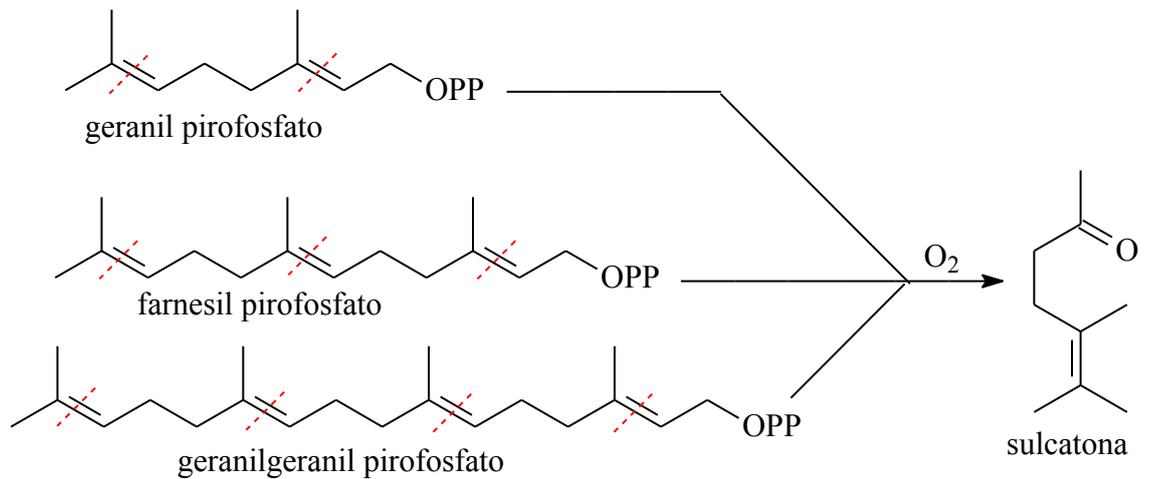
A 6-metil-5hepten-2-ona é uma substância sintética, encontrado em frutas cítricas, está presente no óleo de citronela e é um ingrediente aromatizante pertence à família dos Hemiterpenos. Estes são terpenos contendo apenas uma unidade de isopreno (C5-terpenos). Tem como nome IUPAC 6-metilhept-5-en-2-One (NCBI, accessed Feb. 11, 2019). Essa substância possui peso molecular de 126,199 g/mol e apresenta a seguinte fórmula estrutural:

FIGURA 08: Fórmula estrutural da Sulcatona.



Dentre várias substâncias sintéticas utilizadas para estudos de diversas doenças encontramos a Sulcatona ou 6-metil-5-hepten-2-ona pertencente classe dos terpenóides (LIU et al., 2018).

Uma biosíntese simplificada da Sulcatona foi proposta por Blomquist e colaboradores em 2010, iniciando pela clivagem oxidativa dos terpenoides geranil pirofosfato, farnesil pirofosfato ou geranilgeranil pirofosfato que são intermediários da rota do ácido mevalônico (Figura 09). Nesse processo ocorre clivagem oxidativa desses intermediários, resultando na cetona terpenóide Sulcatona. Terpenóide é definido como todo composto oxigenado derivado do isopropenil pirofosfato.

FIGURA 09: Biosíntese simplificada da Sulcatona a partir de terpenóides

Fonte: BLOMQUIST et al, 2010.

Sulcatona é um odorante volátil repetidamente identificado no corpo humano e também é emitido por uma variedade de outros animais e plantas. Também foram encontrados aproximadamente quatro vezes mais Sulcatona no odor corporal de seres humanos vivos do que no odor de uma galinha, pêlos de cavalos, vacas e ovelhas. Coletivamente McBride et al., 2014, sugerem que o aumento da expressão do receptor Or4 pode ajudar os mosquitos a distinguir os seres humanos de animais não humanos ao conferir sensibilidade à Sulcatona.

A sulcatona também é produzida em humanos pele durante a degradação induzida por ERO do esqualeno (FRUEKILDE et al., 1998). De acordo com Rodriguez; Pérez; Nazareno, 2016, a Sulcatona funciona como um ferormônio de insetos (*Acrotomopus atropunctellus*) para atração entre machos e fêmeas. Este composto foi relatado pela primeira vez como envolvidos na comunicação família Curculionidae.

Vários ferormônios naturais importantes como Sulcatona, acetato de sulcatila, sulcatol apresentaram um grande potencial antifúngico contra espécies de *Candida krusei* e *Candida albicans* em testes in vitro, e essas substâncias estão entre os principais constituintes do óleo essencial de *Aristolochia trilobata* L (SANTOS et al., 2014). Esta espécie de planta é muito difundida na América, África e Ásia e seu óleo essencial tem mostrado atividades diuréticas, analgésicas, antiinflamatórias e abortivas (YU et al., 2007). Os compostos químicos que foram identificados nestas

plantas, tanto nos óleos essenciais como nos extratos de solventes orgânicos, incluem as aporfinas, amidas, quinolinas, lignanos, éteres difenílicos, flavonóides, benzenoides, esteróides e terpenóides, sendo este último o grupo que se enquadra a sulcatona (SANTOS et al., 2014; WU et al., 2005).

Já no ano 2000, Rao et al. identificaram 50 compostos que correspondiam a aproximadamente 90% do total do óleo da espécie *Lippia alba* uma planta típica encontrada no Nordeste brasileiro. Onde a sulcatona correspondeu a cerca de 4,60%. E dentre os efeitos conhecidos dessa espécie destaca-se anticonvulsivante, miorrelaxante, sedativa (ZETÓLA et al., 2002) antibacteriana (ALEA et al., 1997), citotóxico, anti-fúngico (HOLETZ et al., 2006). Além disso, foi encontrado em várias frutas tais como damascos, maçãs e nectarinas (MATTHEIS et al., 1991; GÓMEZ et al., 1993).

A sulcatona é fabricada em duas etapas de síntese usando substâncias iniciadoras 3-metilbut2-en-1-ol em sistemas exclusivamente fechados (OECD SIDS, 2003). A sulcatona é mais de 95% usado como intermediário em sistemas fechados na indústria química para a síntese de produtos químicos (por exemplo, vitaminas, aroma produtos químicos, ingredientes ativos utilizados em produtos farmacêuticos). Uma quantidade de <5% é preenchida e distribuída para as indústrias que utilizam a substância, por um lado, como intermediários para síntese e por outro lado como composto aromatizante e/ou o aditivo aromatizante em cosméticos e alimentos (OECD SIDS, 2003).

Dessa forma, resolvemos estudar o efeito da Sulcatona sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos hipertensos com intuito de verificar sua ação e compreender os possíveis mecanismos de ação dessa substância sintética, já que na literatura não dispõe de dados da ação da Sulcatona no sistema cardiovascular.

7.0- SULCATONA E BETA CICLODEXTRINA (SULCATONA/ β -CD)

Um dos objetivos do referente trabalho foi avaliar o efeito anti-hipertensivo do complexo em ratos SHR, com base nisso foram realizados procedimentos de padronização e caracterização do complexo Sulcatona/ β -CD.

Dados provenientes do Aluno Ivan dos Santos Silva, do Laboratório de Geoquímica Orgânica da Universidade Federal do Piauí, resultados estes publicados

na Revista: **Journal of the Brazilian Chemical Society/JBCS** com Artigo intitulado: **Theoretical and Experimental Study of Inclusion Complex of β -Cyclodextrin and sulcatone: Cardiovascular activity evaluation**. Alguns resultados estão listados abaixo.

Assim foi averiguado o perfil de solubilidade da Sulcatona em β -CD, O diagrama de solubilidade da Sulcatona, em β -CD, apresentou perfil linear e ascendente (AL), sugerindo uma complexação da Sulcatona em β -CD com estequiometria de 1:1 (VEIGA et al., 2006). Os diagramas do tipo AL indicam a formação de complexos solúveis o que aumenta a biodisponibilidade da Sulcatona.

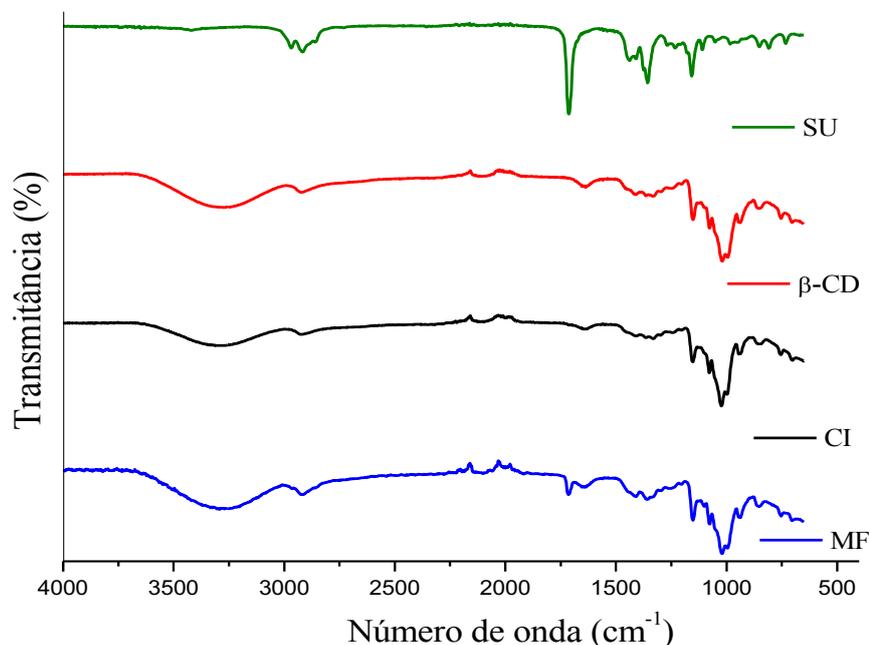
O rendimento ponderal obtido para o complexo de SU em β -CD, preparado por secagem por aspersão ou *spray drying*, foi de 65,87%. A literatura relata que o valor de 36,9% é aceitável como rendimento m/m neste método de secagem (SANTOS et al., 2003). Após a determinação do rendimento, efetuou-se a extração da SU presente no complexo e determinou-se, a partir da curva analítica, que 100 mg do complexo possui 3 mg de SU. A partir dessa informação foi possível calcular a eficiência de encapsulação (EE%) através da equação 7 abaixo.

$$EE\% = \frac{SU_{\text{exp}}(\text{mg})}{SU_{\text{t}}(\text{mg})} \times 100$$

Sendo SU_{exp} a massa do composto determinado na extração do complexo de inclusão e SU_{t} é a massa teórica utilizada para o preparo do complexo de inclusão. O valor foi determinado para EE do complexo resultando num valor de 37%.

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) da Sulcatona, complexo de inclusão, β -CD e mistura física, foram obtidos pelo modo ATR, Figura 10. As bandas de absorção características das CDs, que representam a maioria das bandas de absorção dos complexos de inclusão, são pouco afetadas pela complexação. As bandas relacionadas às moléculas hóspedes apresentam desvios para maiores ou menores valores, acompanhadas de uma diminuição de intensidade e em alguns casos, desaparecem por completo (VEIGA et al., 2006).

FIGURA 10: Espectros de IV do complexo de inclusão (a), Sulcatona (b), Mistura física (c) e β -CD (d).



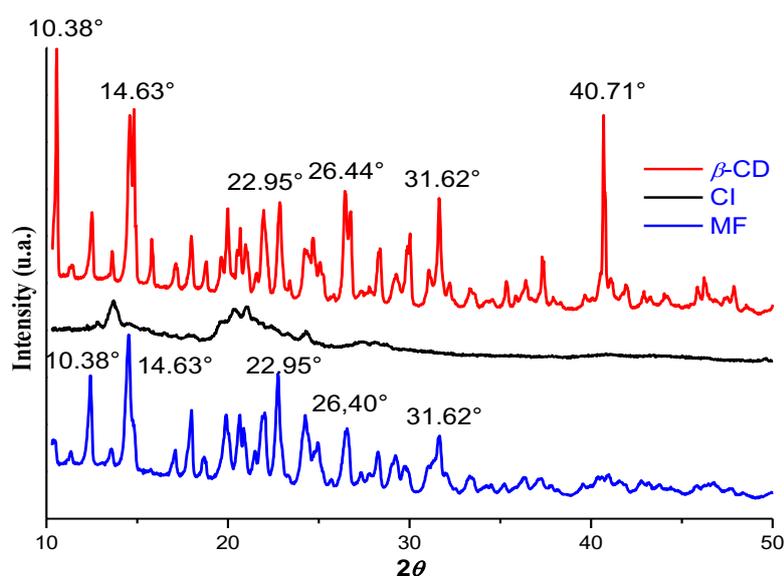
Legenda: SU: Sulcatona, β -CD: Beta Ciclodextrina, CI: Complexo de Inclusão, MF: Mistura Física
Fonte: Ivan dos Santos Silva, do Laboratório de Geoquímica Orgânica da Universidade Federal do Piauí.

A análise de difração de raios X é um dos melhores métodos de investigação de complexos de inclusão na fase sólida, pois permite verificar não só a formação do complexo como também conhecer a sua estrutura e as relações que se estabeleceram entre a molécula hóspede e a CD (UEKAMA e OTAGIRI, 1987). A comparação dos difratogramas de um suposto complexo de inclusão com o de uma mistura física de fármaco e CD deverá demonstrar diferenças significativas nas posições dos principais picos de difração dos compostos, com possibilidade de desaparecimento de alguns dos picos mais característicos e eventual aparecimento de novos picos por ocasião da complexação de uma substância na cavidade hidrofóbica da CD (SZEJTLI, 1994). O fenômeno da formação de um complexo de inclusão está frequentemente associado ao aumento do grau de amorfização das substâncias envolvidas que pode ser monitorado pela difração de raios X (BOTELLA et al., 1996).

A Sulcatona é uma substância líquida, logo não apresenta perfil de difração de raios X. A β -CD apresenta estrutura cristalina que ficou evidenciada pela presença de

picos 10° e 41° em seu difratograma, Figura 11. O complexo de inclusão não apresentou picos que caracterizam uma estrutura cristalina, fato que pode ser atribuído à presença da Sulcatona que aumentou o grau de amorfização do sistema. A redução das intensidades dos principais picos no difratograma da mistura física revela interações entre a Sulcatona e a β -CD de uma forma menos acentuada que no complexo de inclusão (VEIGA et al., 2006).

FIGURA 11: Difratogramas de β -CD, complexo de inclusão Sulcatona/ β -CD e mistura física.



Legenda: β -CD: Beta Ciclodextrina, CI: Complexo de Inclusão, MF: Mistura Física. **Fonte:** Ivan dos Santos Silva, do Laboratório de Geoquímica Orgânica da Universidade Federal do Piauí.

Os desvios químicos (δ) de um determinado núcleo dependem da sua constante de proteção magnética, que por sua vez é altamente condicionada pelos efeitos do meio. Conseqüentemente, as variações dos desvios químicos dos prótons do fármaco e CD permitem quantificar a magnitude da interação de sistemas hóspede-hospedeiro, uma vez que ocorrem alterações significativas no ambiente químico dos prótons quando o fármaco e CD se encontram sob forma livre ou complexada (WILSON; VERRAL, 1998). Neste processo, as ressonâncias dos prótons da molécula do hóspede também são afetadas, provocando variações que são facilmente observáveis nos espectros de ^1H -RMN (VEIGA et al, 2006).

A principal evidência de complexação são os desvios químicos dos prótons internos da cavidade da CD (H-3 e H-5). Os desvios químicos desses prótons são geralmente causados por perturbações conhecidas como efeitos magnéticos anisotrópicos e que são exercidos pela parte da molécula de fármaco que penetra no interior da cavidade hidrofóbica da CD, manifestando-se em desvios das ressonâncias para campo alto ($\Delta\delta < 0$) (RAMUSINO et al., 1998).

As principais evidências de formação do complexo de inclusão de Sulcatona em β -CD foram os deslocamentos químicos para campo alto dos átomos de H-3 e H-5 no interior da cavidade da ciclodextrina como evidenciado na tabela seguinte.

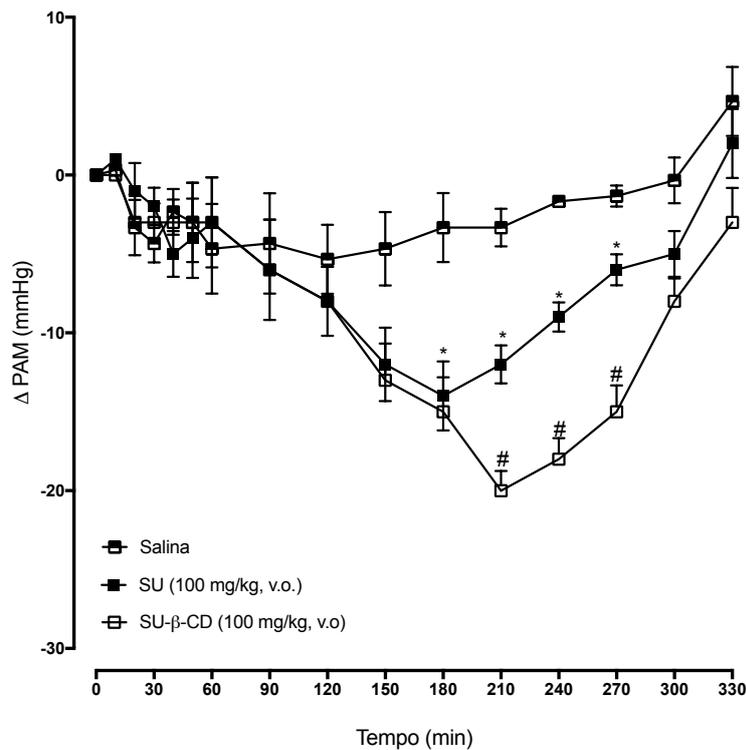
TABELA 03: Deslocamentos químicos (δ) dos prótons (H) na β -CD e do complexo.

Tipos de H	β -CD livre δ (ppm)	Complexo δ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H-1	4,83	4,79	-0,04
H-2	3,30	3,29	-0,01
H-3	3,61	3,54	-0,07
H-4	3,37	-	
H-5	3,55	3,51	-0,04
H-6	3,63	3,59	-0,04
H-OH	4,44	4,45	-0,02

Fonte: Ivan dos Santos Silva, do Laboratório de Geoquímica Orgânica da Universidade Federal do Piauí

E assim para confirmar o efeito hipotensor da sulcatona complexada com Beta Ciclodextrina, a mesma foi administrada por via oral em ratos *Wistar* e verificou-se uma redução mais efetiva do complexo Sulcatona/ β -CD em comparação a Sulcatona livre como verificado na Figura 12.

FIGURA 12: Efeito hipotensor da Sulcatona (SU) e do Complexo Sulcatona/ β -CD (SU- β -CD) sobre a PAM em ratos normotensos (*Wistar*) não-anestesiados.



Sendo assim, de posse desses dados a Tese foi fundamentada na avaliação do potencial citotóxico da Sulcatona em células A7r5 e atividade anti-hipertensiva da Sulcatona e do complexo (Sulcatona/ β -CD) em animais espontaneamente hipertensos (SHR).

REFERÊNCIAS

- ALEA, J.A.; LUIS, A.G.; PEREZ, A.R.; JORGE, M.R.; BALUJA, R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. **Rev. Cubana Farm**, v.30, p. 29-35, 1997.
- AL-SALAH. Biological effects of a new set 1,2,4-triazolo[1,5-a] quinazolines on heart rate and blood pressure. **Chem Central**. J.8 (1): 3. 2014.
- AMENDT, K.; CZACHURSKI, J.; DEMBOWSKY, K.; SELLER, H. Bulbospinal projections to the intermediolateral cell column: a neuroanatomical study. **J. Auton. Nerv. Syst.**, pp. 103-107. 1979.
- ARIMA, H.; MOTOYAMA, K.; HIGASHI, T. Potential use of cyclodextrins as drug carriers and active pharmaceutical ingredients. **Chem. Pharm. Bull.** v 65, 341–348, 2017.
- ASTRAY, G.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; MEJUTO, J.C.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocoll.** 23, 1631–1640, 2009.
- AVILA-VILLARREAL, G.; HERNÁNDEZ-ABREU, O.; HIDALGO-FIGUEROA, S.; NAVARRETE-VÁZQUEZ, G.; ESCALANTE-EROSA, F.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L.M.; VILLALOBOS-MOLINA, R.; ESTRADA-SOTO, S. Antihypertensive and vasorelaxant effects of dihydrospinochalcone-A isolated from *Lonchocarpus xuul* Lundell by NO production: Computational and *ex vivo* approaches. **Phytomedicine**. v20, 1241-1246, 2013.
- BANKAR, G.R.; NANDAKUMAR, K.; NAYAK, P.G.; THAKUR, A.; CHAMALLAMUDI, M.R.; NAMPURATH, G.K. Vasorelaxant effect in rat aortic rings through calcium channel blockage: A preliminary in vitro assessment of a 1,3,4-oxadiazole derivative. **Chemico-Biological Interactions** 181: 377–382, 2009.
- BARREIRO, E.J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Quím. Nova** [online]. 25: (6b) 1172-1180. 2002.
- BATLOUNI, M. Diuréticos. **Rev Bras Hipertens**. vol.16(4):211-214, 2009.
- BEAN, B.P. Pharmacology of calcium channels in cardiac muscle, vascular muscle, and neurons. **Am J Hypertens**. 4(suppl):406S-411S, 1991.

- BERNATOVA, I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? **BioMed Research International**. 2014.
- BERS, D.M. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature**. v.415, p.198-205, 2002.
- BLAUSTEIN, M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. **American Journal of Physiology**, 264:C1367-C1387. 1993.
- BLOMQUIST, G. J; FIGUEROA-TERAN, R; AW, M; SONG, M; GORZALSKI, A; ABBOTT, N.L; CHANG, E; TITTIGER, C. Pheromone production in bark beetles. **Insect Biochemistry of Molecular Biology** v. 40, p. 699-712, 2010.
- BOTELLA, S. M.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; MENÉNDEZ, J.C.; VÁSQUEZ, L.; LERNER, D.A. Analytical applications of retinoid-cyclodextrin inclusion complexes. 1. Characterization of a retinal β -cyclodextrin complex. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 51, p. 090-915, 1996.
- BOHR, D.F.; WEBB, R.C. Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension. **American Journal of Medicine**, 77:3-16. 1984.
- BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Adv. Drug Del. Rev.** 59, 645–666. 2007.
- BRUSH, J.E.J.; CANNON, R.O.; SCHENKE, W.H.; BONOW, R.O.; LEON, M.B.; MARON, B.J.; EPSTEIN, S.E. Angina due to coronary microvascular disease in hypertensive patients without left ventricular hypertrophy. **New England Journal of Medicine**, 319:1302-1307.1988.
- BUNTING, S.; GRYGLEWSKI, R.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. **Prostaglandins.** ;12(6):897–913; 1976.
- CAMPAGNARO, B.P.; GAVA, A.L.; MEYRELLES, S.S.; VASQUEZ, E.C. “Cardiac-Autonomic Imbalance and Baroreflex Dysfunction in the Renovascular Angiotensin-Dependent Hypertensive Mouse,” **International Journal of Hypertension**, 2012.
- CARLBERG, B.; SAMUELSOSON, O.; LINDHOLM, L.H. Atenolol in hypertension: is it a wise choice? **Lancet**, 364:1684-89, 2004.
- CATTERALL, W.A. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** Aug 1;3(8): a003947. 2011.

- CHAPLEAU, M. W.; CUNNINGHAM, J. T.; SULLIVAN, M. J.; WACHTEL, R.E.; ABOUD, F.M. Structural versus functional modulation the arterial baroreflex. **Hypertension**, v. 26, p. 341-7, 1995.
- CHEN, G.P.; YE, Y.; LI, Y.Y.; QIAN, A.; HU, S. Endothelium-independent vasorelaxant effect of sodium ferulate on rat thoracic aorta. **Life Sciences** 84, 81–88, 2009.
- CHOBANIAN, A.V.; BAKRIS, G.L.; BLACK, H.R.; CUSHMAN, W.C.; GREEN, L.A.; IZZO, J.L.; JONES, D.W.; MATERSON, B.J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J.T.; ROCCELLA, E.J. National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 Report. **JAMA**. 289(19):2560-72, 2003.
- CHOCKALINGAM, A.; CAMPBELL, N.R.; FODOR, J.G. Worldwide epidemic of hypertension. **Can J Cardiol**. 22(7):553–555. 2006.
- COLLINS, R.; PETO, F.; MACMAHON, S. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease, part 2: short term reductions in blood pressure: overview of randomized drug trials in their epidemiological context. **Lancet** 335:827-838. 1990.
- COLUCCI, W.S. New developments in alpha-adrenergic receptor pharmacology: Implications for the initial treatment of hypertension. **Am J Cardiol** 51, 639. 1983.
- COLUCCI, W.S.; BRAUNWALD, E. Adrenergic receptors: New concepts and implications. **Cardiovasc Clin**. 14, 39. 1984.
- CORRAL, S.; FALCÃO, F. P.; MARTINELLI, L. K.; CARDOSO, R.B.; AZEVEDO, D.F.G.; RUSSOMANO, T. Desenvolvimento e aplicações de um novo instrumento para estimulação do barorreflexo. **Scientia Medica**, v. 17, n. 2, p. 63-71. 2007.
- CUSPIDI, C.; TADIC, M.; GRASSI G.; MANCIA, G. Treatment of hypertension: The ESH/ESC guidelines recommendations. Feb; 128:315-321. 2018.
- DAMPNEY, R.A. Brain stem mechanisms in the control of arterial pressure. **Clin Exp Hypertens**. 3(3):379-91. 1981.
- DAMPNEY, R.A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol Rev**. Apr;74(2):323-64. 1994.

- DAVEY, MJ. The pharmacological basis for the use of alpha- adrenoceptor antagonists in the treatment of essential hypertension. **Br J Clin pharmacol** 21, 5s. 1986.
- DAVEY, M. Mechanism of alpha blockade for blood pressure control. **Am J Cardiol** 59, 18G, 1987.
- DOLLERY, C. Clinical pharmacology of calcium antagonists. **Am J Hypertens** ;4(suppl):88S-95S. 1991.
- DOMINICZAK, AF.; KUO, D. Hypertension: update 2017. **Hypertension**. 69:3–4. 4. 2017.
- DONA, A.C.; PAGES, G.; GILBERT, R.G.; KUCHEL, P.W. Digestion of starch: in vivo and in vitro kinetic models used to characterise oligosaccharide or glucose release. **Carbohydr. Polym.**, 80, pp. 599-617; 2010.
- DORNAS, W.C.; SILVA, M.E. Animal models for the study of arterial hypertension. **J. Biosci.** 36 731–737; 2001.
- DUARTE, J.D.; COOPER-DEHOFF, R.M. Mechanisms for blood pressure lowering and metabolic effects of thiazide and thiazide-like diuretics. **Expert Rev Cardiovasc Ther.** 8(6):793-802. 2010.
- EDWARDS, E.; KING, J.A. Stress Response: Genetic Consequences. **Encyclopedia of Neuroscience**, 2009.
- EGAN, B.M.; ZHAO, Y.; AXON, R.N. US trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension, 1988-2008. **JAMA.** v.303:2043-50, 2010.
- ENGELMANN, G.L.; VITULLO, J.C.; GERRITY, R.G. Morphometric analysis of cardiac hypertrophy during development, maturation, and senescence in spontaneously hypertensive rats. **Circ. Res.** 60 487–494. 1987.
- FAZAN, Jr. R.; SILVA, V.J.D.; SALGADO, H.C. Modelos de hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens** 8: 19-29, 2001.
- FDA, U.S.F.D.U.S. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products. Available online: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/getiigWEB.cfm> (a cesso em 31 Janeiro 2019).
- FOLKOW, B.; GRIMBY, G.; THULESIUS, O. Adaptive structural changes of the vascular walls in hypertension and their relation to the control of the peripheral resistance. **Acta Physiologica Scandinavica**, 44:255-272. 1957.

- FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiological Reviews**, 62:347-504. 1982.
- FOLKOW, B. Structural factor in primary and secondary hypertension. **Hypertension**, 16:89-101. 1990.
- FRISHMAN, W.H.; CHENG-LAI, A.; NAWARSKAS, J. *Current Cardiovascular Drugs*. Fourth. **Current Science Group**, 153. 2005.
- FRUEKILDE, P.; HJORTH, J.; JENSEN, N.R.; KOTZIAS, D.; LARSEN, B. Ozonolysis at vegetation surfaces: a source of acetone, 4-oxopentanal, 6-methyl-5-hepten-2-one, and geranyl acetone in the troposphere. **Atmospheric Environment**, 32: 1983-1902. 1998.
- GHEIBI, S.; JEDDI, S.; CARLSTRÖM, M.; GHOLAMI, H.; GHASEMI A. Effects of long-term nitrate supplementation on carbohydrate metabolism, lipid profiles, oxidative stress, and inflammation in male obese type 2 diabetic rats. **Nitric Oxide**, 75, pp. 27-41, 2018.
- GKALIAGKOUSI E.; GAVRIILAKI, E.; DOUMA, S. Effects of Acute and Chronic Exercise in Patients with Essential Hypertension: Benefits and Risks, **American Journal of Hypertension**, Volume 28, Issue 4, Pages 429–439, 2015.
- GÓMEZ, E.; LEDBETTER, C.A.; HARTSELL, P.L. Volatile compounds in apricot, plum and their interspecific hybrids, **J. Agric. Food Chem.** 41, 1669-1676. 1993.
- GORDAN, R.; GWATHMEY, J. K.; XIE, L. H. Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. **World journal of cardiology**, 7(4), 204–214. 2015.
- GUEDES, D.N.; SILVA, D.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MEDEIROS, I.A. Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolone. **Braz J Med Biol Res** , 37: 1881-1887,2004.
- GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, 7(5), 335–346. 2006.
- HAIBARA, A. S.; SANTOS, R. A. S. Descobrimiento e importância dos barorreceptores. **Rev Bras Hipertens**, v. 7, n. 2, 2000.
- HAINES, D.E. *Neuroanatomy: An Atlas of Structures, Sections, and Systems*. 2004.
- HASDAI, D.; GIBBONS, R.J.; HOLMES, D.R.J.; HIGANO, S.T.; LERMAN, A. (1997). Coronary endothelial dysfunction in humans is associated with myocardial perfusion defects. **Circulation**, 96:3390-3395.

- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97(7), 1027-1031. 2002.
- HU, Q.-D.; TANG, G.-P.; CHU, P.K. Cyclodextrin-based host-guest supramolecular nanoparticles for delivery: From design to applications. **Acc. Chem. Res.**, 47, 2017–2025. 2014.
- HUGHES, A.D. "How do thiazide and thiazide-like diuretics lower blood pressure?". **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, ;5(4):155-60. 2004.
- IRIGOYEN, M. C.; FIORINO, P.; DE ANGELIS, K.; KRIEGER, E.M. Simpático e hipertensão arterial: reflexos cardiocirculatórios. **Rev Bras Hipertens**, v. 12, n. 4, p. 229-34. 2005.
- ISLAM, S.M.; MAINUDDIN, A.; ISLAM, M.S.; KARIM, M.A.; MOU, S.Z.; AREFIN, S.; CHOWDHURY, K.N. Prevalence of risk factors for hypertension: A cross-sectional study in an urban area of Bangladesh. **Glob Cardiol Sci Pract**. 20; (4):43. 2015.
- JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: Structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **Int. J. Pharm.** 535, 272–284. 2018.
- JNC-6. The sixth report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Arch Intern Med** ;157(24):2413-2446. 1997.
- KAUR, M.; CHANDRAN, D. S.; JARYAL, A. K.; BHOWMIK, D.; AGARWAL, S. K.; DEEPAK, K. K. Baroreflex dysfunction in chronic kidney disease. **World journal of nephrology**, 5(1), 53–65. 2016.
- KELESIDIS, T.; PAPAKONSTANTINOOU, V.; DETOPOULOU, P.; FRAGOPOULOU, E.; CHINI, M.; LAZANAS, M.C.; ANTONOPOULOU, S. The role of platelet-activating factor in chronic inflammation, immune activation, and comorbidities associated with HIV infection. **AIDS Reviews**.17(4):191–201. 2015.
- KHAN, N.; MCALISTER, F.A. Re-examining the efficacy of [beta]-blockers for the treatment of hypertension: a meta-analysis. **CMAJ**. 174:1737-42. 2006.
- KLAHR, S.; & MORRISSEY, J. Progression of chronic renal disease. **American Journal of Kidney Diseases**, 41:S3-S7. 2003.

- KONIHISI, M.; & SU, C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. **Hypertension**, 5: 881-886. 1983.
- KORNER, P.I.; ANGUS, J.A. Vascular remodelling. **Hypertension**, 29:1065-1066, 1997.
- KRIEGER, E. M.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, J. E. Fisiopatologia da hipertensão. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, v. 9, p. 1-7, 1999.
- PALOMBO, C.; KOZAKOVA, M. Arterial stiffness, atherosclerosis and cardiovascular risk: Pathophysiologic mechanisms and emerging clinical indications. **Vascul Pharmacol**. Feb; 77:1-7; 2016.
- KASHIHARA, K. Roles of Arterial Baroreceptor Reflex During Bezold-Jarisch Reflex. **Curr Cardiol Rev**, v. 5, n. 4, p. 263–7, 2009.
- KROON, M. Influence of dispersion in myosin filament orientation and anisotropic filament contractions in smooth muscle. **Journal of Theoretical Biology**, 272: 72–82, 2011.
- KRONISH, I.M.; WOODWARD, M.; SERGIE, Z.; OGEDEGBE, G.; FALZON, L.; MANN, D.M. Meta-analysis: impact of drug class on adherence to antihypertensives. **Circulation**. 123:1611–21. 2011.
- KURKOV, S.V.; MADDEN, D.E.; CARR, D.; LOFTSSON, T. The effect of parenterally administered cyclodextrins on the pharmacokinetics of coadministered drugs. **J. Pharm. Sci.** 101, 4402–4408. 2012.
- KURKOV, S.V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **Int. J. Pharm.** 453, 167–180. 2013.
- LEIBOWITZ, A.; SCHIFFRIN, E.L. Immune mechanisms in hypertension. **Curr Hypertens Rep**. 13:465–72. 2011.
- LEWINGTON, S.; CLARKE, R.; QIZILBASH, N.; PETO, R.; and COLLINS, R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: A meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet** 360: 1903–1913. 2002.
- LINDHOLM, L.H.; CARLBERG, B.; SAMUELSSON, O. Should [beta] blockers remain first choice in the treatment of primary hypertension? A meta-analysis. **Lancet**, 366:1545-53. 2005.
- LIU, H.; MENG, F.; MIAO, H.; CHEN, S.; YIN, T.; HU, S.; SHAO, Z.; LIU, Y.; GAO, L.; ZHU, C.; ZHANG, B.; WANG, Q. Effects of postharvest methyl jasmonate

treatment on main health-promoting components and volatile organic compounds in cherry tomato fruits. **Food Chem.** Oct 15; 263:194-200. 2018.

LOEWY, A. D.; & SPYER, K. M. Central Regulation of Autonomic Functions **Oxford Univ. Press**, New York, 1990.

LOFTSSON, T.; VOGENSEN, S.B.; BREWSTER, M.E.; KONRÁÐSDÓTTIR, F. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. **J. Pharm. Sci.** 96, 2532–2546. 2007.

LOFTSSON, T.; BREWSTER MARCUS, E. Cyclodextrins as functional excipients: Methods to enhance complexation efficiency. **J. Pharm. Sci.** 101, 3019–3032. 2012.

LOFTSSON, T.; MOYA-ORTEGA, M.D.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes. **J. Pharm. Pharmacol.** 68, 544–555. 2016.

LUND-JOHANSEN, P. Newer thinking on the hemodynamics of hypertension. **Curr. Opin. Cardiol.**, 9 (5) (Sep), pp. 505-511. 1994.

LÜSCHER, T.F.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, 8:344-348. 1986.

MALPAS, S.C. Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. **Physiol Rev** 90: 513–557, 2010.

MANCIA, G.; BACKER, G.; DOMINICZAK, A.; CIFKOVA, R.; FAGARD, R.; GERMANO, G.; GRASSI, G.; HEAGERTY A.M.; KJELDSEN, S.E.; LAURENT, S.; NARKIEWICZ, K.; RUILOPE, L.; RYNKIEWICZ, A.; SCHMIEDER, R.E.; BOUDIER, H.A.J.S.; ZANCHETTI, A. Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **European Heart Journal**; 28(12):1462-536. 2007.

MANN, S.J. Neurogenic hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. **Clin Auton Res.** Aug; 28(4):363-374. 2018

MARÍN, J. Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. **Journal of Autonomic Pharmacology**, 13: 127-176. 1993.

- MARÍN, J.; REDONDO, J. Vascular Sodium Pump: Endothelial modulation and alterations in some pathological processes and aging. **Pharmacology & Therapeutics**, 84: 249-271. 1999.
- MATTHEIS, J.P.; FELLMAN, J.K.; CHEN, P.M.; PATTERSON M.E. Changes in headspace volatiles during physiological development of Bisbee delicious apple fruit, **J. Agric. Food Chem.** 39, 1902- 1906.1991.
- MAYET, J.; HUGHES, A. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. **Heart**, 89 (9) (Sep). pp. 1104-1109. 2003.
- MCBRIDE, C.S.; BAIER, F.; OMONDI, A.B.; SPITZER, S.A.; LUTOMIAH, J.; SANG, R.; IGNELL, R.; VOSSHALL, L.B. Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. **Nature**. Nov 13;515(7526):222-7. 2014.
- MENDONÇA, D.A.; ALMADO, C.E.L.; FERNANDES, L.G.; MACHADO, B.H. Controle neural da circulação e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**. vol.12(4): 235-241, 2005.
- MESSERLI, F.H.; BEEVERS, D.G.; FRANKLIN, S.S.; PICKERING, T.G. [beta]-blockers in hypertension--the emperor has no clothes: an open letter to present and prospective drafters of new guidelines for the treatment of hypertension. **Am J of Hypertens**; 16:870-73. 2003.
- MIAN, M.O.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E.L. Innate immunity in hypertension. **Curr Hypertens Rep**.16:413. 2014.
- MICHELINI, L. C. Regulação momento a momento da pressão arterial na normotensão e na hipertensão. **Hipertensão**, v. 3, p. 90-8. 2000.
- MONTEIRO, F.S.; SILVA, A.C.L.; MARTINS, I.R.R.; CORREIA, A.C.C.; BASÍLIO, I.J.L.D.; AGRA, M.F.; BHATTACHARYYAB, J.; SILVA, B.A. Vasorelaxant action of the total alkaloid fraction obtained from *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae) involves NO/cGMP/PKG pathway and potassium channels. **J Ethnopharmacol**. Jun 14;141(3):895-900, 2012.
- MORDI, I.; MORDI, N.; DELLES, C.; TZEMOS, N. Endothelial dysfunction in human essential hypertension. **J Hypertens**. Aug; 34(8): 1464-72. 2016.
- MOZZAFARIAN, D.; BENJAMIN, E.J.; GO, A.S.; ARNETT, D.K.; BLAHA, M.J.; CRUSHMAN, M.; FERRANTI, S.; DESPRÉS, J.P.; FULLERTON, H.J.; HOWARD, V.J.; HUFFMAN, M.D.; JUDD, S.E.; KISSELA, B.M.; LACKLAND, D.T.; LICHTMAN, J.H.; LISABETH, L.D.; LIU, S.; MACKEY, R.H.; MATCHAR, D.B.; MCGUIRE, D.K.; MOHLER, E.R. 3RD.; MOY, C.S.; MUNTNER, P.;

- MUSSOLINO, M.E.; NASIR, K.; NEUMAR, R.W.; NICHOL, G.; PALANIAPPAN, L.; PANDEY, D.K.; REEVES, M.J.; RODRIGUEZ, C.J.; SORLIE, P.D.; STEIN, J.; TOWFIGHI, A.; TURAN, T.N.; VIRANI, S.S.; WILLEY, J.Z.; WOO, D.; YEH, R.W.; TURNER, M.B. Heart disease and stroke statistics. 2015 update: a report from the **American Heart Association**. 131: e 29–322. 2015.
- MUANKAEW, C.; LOFTSSON, T. Cyclodextrin-based formulations: A non-invasive platform for targeted drug delivery. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 122, 46–55. 2018.
- MULVANY, M.J. The structure of the resistance vasculature in essential hypertension. **Journal of Hypertension**, 5:129-136. 1987.
- MULVANY, M.J. Structural abnormalities of the resistance vasculature in hypertension. **Journal of Vascular Research**, 40:558-560. 2003.
- MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 238-250, 2014.
- NAIDOO, K.J.; CHEN, J.Y.-J.; JANSSON, J.L.M.; WIDMALM, G.; MALINIAK, A. Molecular properties related to the anomalous solubility of β -cyclodextrin. **J. Phys. Chem. B**, 108, 4236–4238. 2004.
- NATIONAL CLINICAL GUIDELINE CENTRE. Hypertension: clinical management of primary hypertension in adults. Hypertension: the clinical management of primary hypertension in adults. London (UK): **National Clinical Guideline Centre**, Aug (updated 2016 Nov); Vol. Clinical Guidelines:CG127. 2011.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Database; CID=9862, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9862> (accessed Feb. 11, 2019).
- NEIMANN, A. L.; SHIN, D. B.; WANG, X.; MARGOLIS, D. J.; TROXEL, A. B.; GELFAND, J. M. (2006). Prevalence of cardiovascular risk factors in patients with psoriasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**. 55(5):829–835. 2006.
- NELSON, M. T.; PATLAK, J. B.; WORLEY, J.F.; STANDEN, N. B. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. **American Journal of Physiology**, v. 259, p. 3 - 18, 1990.

- NISHIKAWA, M.; TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Pharmacokinetic evaluation of polymeric carriers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 21, pp. 135-155; 1996.
- OECD SIDS. BASF AG, Germany; Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland; Kuraray, Japan. SIDS Initial Assessment Report For SIAM 17 Arona, Italy, 11–14 November, 2003.
- OGIHARA, T.; MATSUZAKI, M.; MATSUOKA, H.; SHIMAMOTO, K.; SHIMADA, K.; RAKUGI, H.; UMEMOTO, S.; KAMIYA, A.; SUZUKI, N.; KUMAGAI, H.; OHASHI, Y.; TAKISHITA, S.; ABE, K.; SARUTA, T. The combination therapy of hypertension to prevent cardiovascular events (COPE) trial: rationale and design. **Hypertension Research**, 28, pp. 331-338, 2005.
- OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn. Circulation J.** 27 282–293. 1963.
- OMBONI, S.; VOLPE, M. Angiotensin Receptor Blockers Versus Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors for the Treatment of Arterial Hypertension and the Role of Olmesartan. **Adv Ther.** Feb;36(2):278-297. 2019.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, SOCIEDADE INTERNACIONAL DE HIPERTENSÃO ESCRITA GRUPO. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) / Sociedade Internacional de Hipertensão (ISH) declaração sobre o gerenciamento da hipertensão. **J. Hipertens.**, 21, pp. 1983 – 1992, 2003.
- PANOULAS, V. F.; DOUGLAS, K. M. J.; MILIONIS, H. J.; STAVROPOULOS-KALINGLOU, A.; NIGHTINGALE, P; KITA, M.D.; TSELIOS, AL.; METSIOS, G.S.; ELISAF, M.S.; KITAS, G.D. Prevalence and associations of hypertension and its control in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology**. 46(9):1477–1482. 2007.
- PAXINOS, G., WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6th ed. Elsevier, Amesterdam, 2007.
- PHILIPP, T.; ANLAUF, M.; DISTLER, A.; HOLZGREVE, M.; MICHAELIS, J.; WELLECK, S. Randomised, double blind, multicentre comparison of hydrochlorothiazide, atenolol, nifedipine and enalapril in antihypertensive treatment: results of the HANE study. **BMJ**, 315:154-159. 1997.
- PIERANGELI, S. S.; ESPINOLA, R. G.; LIU, X.; HARRIS, E. N. Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and P-selectin. **Circulation Research**. 88(2):245–250. 2001.

- PIRES, P.W.; JACKSON, W.F.; DORRANCE, A.M. Regulation of myogenic tone and structure of parenchymal arterioles by hypertension and the mineralocorticoid receptor. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 309(1):H127-36. 2015.
- PITT, B. Diversity of calcium antagonists. **Clin Ther**. 19 (suppl A): 3-17. 1997.
- POULTER, N.R.; PRABHAKARAN, D. CAULFIELD, M. Hypertension. **Lancet**, 386, pp. 801 – 812. 2015.
- PRAVENEK, M.; KOZICH, V.; KRIJT, J.; SOKOLOVÁ, J.; ZÍDEK, V.; LANDA, V.; SIMÁKOVÁ, M.; MLEJNEK, P.; SILHAVY, J.; OLIYARNYK, O.; KAZDOVÁ, L.; KURTZ, T.W. Folate deficiency is associated with oxidative stress, increased blood pressure, and insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens** 26:135-140. 2013.
- PRAVENEK, M.; KREN, V.; LANDA, V.; MLEJNEK, P.; MUSILOVÁ, A.; SILHAVY, J.; SIMÁKOVÁ, M.; ZÍDEK, V. Recent Progress in the Genetics of Spontaneously Hypertensive Rats. **Physiol. Res**. 63 (1): S1-S8. 2014.
- RAMUSINO, M. C.; GALLINELLA, B.; BARTOLOMEI, M. H-NMR, UV and circular dichroism study of inclusion complex formation between the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton and β and γ -cyclodextrin. **J. Incl. Phenom. Macroc. Chem**. 32, 485-498, 1998.
- REIS, D.J.; GRANATA, A.R.; JOH, T.H.; ROSS, C.A.; RUGGIERO, D.A.; PARK, D.H. Brain stem catecholamine mechanisms in tonic and reflex control of blood pressure. **Hypertension**. Sep-Oct;6(5 Pt 2):117-15. 1984.
- RIVERA, S. L.; MARTIN, J.; LANDRY, J. Acute and Chronic Hypertension. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, 31(1), 97–108. 2019.
- RODRÍGUEZ, S.A.; PÉREZ, M.L.; NAZARENO, M.A. Identification of male-produced aggregation pheromone of the curculionid beetle *Acrotomopus atropunctellus*. **Bull Entomol Res**. Aug;106(4):494-501. 2016.
- ROSÁRIO, T. M. do; SCALA, L. C. N. S.; FRANÇA, G. V. A. de; PEREIRA, M. R. G.; JARDIM, P. C. B. V. Prevalência, controle e tratamento da hipertensão arterial sistêmica em Nobres, MT. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 93, n. 6, p. 672-678, 2009.
- ROSENDORFF, C.; BLACK, H.R.; CANNON, C.P.; GERSH, B.J.; GORE, J.; IZZO, J.L.; KAPLAN, N.M.; O'CONNOR, C.M.; O'GARA, P.T.; OPARIL, S. Treatment of hypertension in the prevention and management of ischemic heart disease: a scientific statement from the **American Heart Association Council for High**

Blood Pressure Research and the Council on Clinical Cardiology and Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 115(21):2761-88. 2007.

- SABADINI, E.; COSGROVE, T.; EGÍDIO, F.D.C. Solubility of cyclomaltooligosaccharides (cyclodextrins) in H₂O and D₂O: A comparative study. **Carbohydr. Res.** 341, 270–274. 2006.
- SAGER, H. B.; NAHRENDORF, M. Inflammation: a trigger for acute coronary syndrome. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**. 60(2):185–193. 2016.
- SAKLAYEN, M.G; DESHPANDE, N.V. Timeline of History of Hypertension Treatment. Review. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**. 3 (3). 2016.
- SANJULIANI, A. F. Fisiopatologia da hipertensão arterial: conceitos teóricos úteis para a prática clínica. **Revista da SOCERJ**, v. 15, n. 4, 2002.
- SANTIAGO, F.E.; FIOR-CHADI, D.R.; CARRETTIERO, D.C. Alpha2-adrenoceptor and adenosine A1 receptor within the nucleus tractus solitarius in hypertension development. **Auton Neurosci**. Jan; 187:36-44. 2015.
- SANTOS, J.V.; MOURA, T.F.A.; RAFFIN, F.N. Otimização dos Parâmetros de Secagem por Aspersão de Micropartículas de Quitosana Como Carreadores de Insulina. **Lat. Am. J. Pharm.** 22, 327–333. 2003.
- SANTOS, D.A.; ALVES, P.B.; COSTA, E. V.; FRANCO, C.R.P.; NEPEL, A.; BARISON, A. Volatile Constituents Of *Aristolochia trilobata* L. (Aristolochiaceae): A Rich Source Of Sulcatyl Acetate. **Quim. Nova**, 37, 977–981. 2014.
- SAOKHAM, P.; MUANKAEW, C.; JANSOOK, P.; LOFTSSON, T. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. **Molecules**, 23(5), 1161; 2018.
- SCHIFFRIN, E.L. Resistance arteries as endpoints in hypertension. **Blood Press**, 2(Suppl)24-30. 1997.
- SCHIFFRIN, E.L. Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment. **Hypertension**.59:367–74. 2012.
- SHI, W.; YUAN, R.; CHEN, X.; XIN, Q.; WANG, Y.; SHANG, X.; CONG, W.; CHEN, K. Puerarin Reduces Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats by Targeting eNOS. **Am J Chin Med**. Jan 7:1-20.2019.

- SHRIVASTAVA, S.R.S.; PRATEEK, S.S.; JEGADEESH, R. The Determinants and Scope of Public Health Interventions to Tackle the Global. Problem of Hypertension. **Int J Prev Med.** 5(7): 807–812. 2014.
- SINGH, J.; DARTOIS, A.; KAUR, L. Starch digestibility in food matrix: a review. **Trends Food Sci. Technol.**, 21, pp. 168-180; 2010.
- SMITH, T.L.; HUTCHINS, P.M. Central hemodynamics in the developmental stage of spontaneous hypertension in the unanesthetized rat. **Hypertension.** 1, 508–517, 1979.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Rev Bras Hipertens.**17(1):7-10. 2010.
- SPYER, K. Neural organization and control of the baroreceptor reflex. **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**, v. 88, n. 1, p. 23-124, 1981.
- STAFFILENO, B.A. Treating hypertension with cardioprotective therapies: the role of ACE inhibitors, ARBs, and beta-blockers. **Journal of Cardiovascular Nursing**, 20, pp. 354-364, 2005.
- STELLA, V.J.; RAO, V.M.; ZANNOU, E.A.; ZIA, V. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. **Adv. Drug Del. Rev.** 36, 3–16. 1999.
- SZEJTLI, J. Medicinal applications of cyclodextrins. **Med Res Rev.** May;14(3):353-86. 1994.
- SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chem. Rev.** 98, 1743–1754. 1998.
- TANASE, D.M.; GOSAV, E.M.; RADU, S.; OUATU, A.; REZUS, C.; CIOCOIU, M.; COSTEA, C.F.; FLORIA M. Arterial Hypertension and Interleukins: Potential Therapeutic Target or Future Diagnostic Marker? **Int J Hypertens.** May 2; 3159283. 2019.
- TAYEBATI, S.K.; TOMASSONI, D.; AMENTA, F. Spontaneously hypertensive rat as a model of vascular brain disorder: microanatomy, neurochemistry and behavior. **J Neurol Sci.** 322(1-2):241-9. 2012.
- TRIGGLE, D.J. The classification of calcium antagonists. **J Cardiovasc Pharmacol.** 1996;27(suppl):13S-18S. 1996.
- TRIPPODO, N.C.; FROHLICH, E.D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circulation Research.** 48:309–319, 1981.

- TSOUPRAS, A. B.; IATROU, C.; FRANGIA, C.; DEMOPOULOS, C. A. The implication of platelet activating factor in cancer growth and metastasis: potent beneficial role of PAF-inhibitors and antioxidants. **Infectious Disorders - Drug Targets**. 9(4):390–399. 2009.
- UEKAMA, K.; OTAGIRI, M. Cyclodextrins in drug carrier systems. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**. 3(1):1-40. 1987.
- VALENZUELA-FLORES, A.A.; SOLÓRZANO-SANTOS, F.; VALENZUELA-FLORES, A.G.; DURÁN-ARENAS, L.G.; LEÓN-ROSALES, S.P.; OROPEZA-MARTÍNEZ, M.P.; GÓMEZ-GARCÍA, J.A.; MORENO-RUÍZ, L.A.; MARTÍNEZ-VARGAS, R.; HERNÁNDEZ-AMEZCUA, L.; ESCOBAR-RODRÍGUEZ, D.; MARTÍNEZ-FLORES, E.; VINIEGRA-OSORIO, A.; OEST-DÁVILA, C.W.; SORIA-GUERRA, M. Recomendaciones de la guía de práctica clínica de hipertensión arterial en el primer nivel de atención. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc**. 54(2):249-60. 2016.
- VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica, **Minerva Coimbra**: Coimbra, 2006.
- WEBB, R.C.; & BOHR, D.F. Potassium relaxation of vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. **Blood Vessels**, 16:71-79. 1979.
- WEBB, R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**. V.27: 201-206, 2003.
- WEBB, A.J.; FISCHER, U.; MEHTA, Z.; ROTHWELL, P.M. Effects of antihypertensive drug class on interindividual variation in blood pressure and risk of stroke: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**. 375, 906–915. 2010.
- WHELTON, P.K.; CAREY, R.M.; ARONOW, W.S.; CASEY JR, D.E.; COLLINS, K.J.; HIMMELFARB, C.D.; DEPALMA, S.M.; GIDDING, S.; JAMERSON, K.Q.; JONES, D.W.; MACLAUGHLIN, E.J.; MUNTNER, P.; OVBIAGELE, B.; SMITH JR, S.C.; SPENCER, C.C.; STAFFORD, R.S.; TALER, S.J.; THOMAS, R.J.; WILLIAMS, K.A.; WILLIAMSON, J.D.; WRIGHT JR, J.T. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/ AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American Acute and Chronic Hypertension 107 College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. **J Am Coll Cardiol** 71:127–248. 2018.
- WILLIAMS, B.; MANCIA, G.; SPIERING, W., ROSEI, E.A.; AZIZI, M.; BURNIER, M.; CLEMENT, D.L.; COCA, A.; SIMONE, G.; DOMINICZAK, A.; KAHAN, T.; MAHFOUD, F.; REDON, J.; RUILOPE, L.; ZANCHETTI, A.; KERINS, M.; KJELDSSEN, S.E.; KREUTZ, R.; LAURENT, S.; LIP, G.Y.H.; MACMANUS, R.;

- NARKIEWICS, K.; RUSCHITZKA, F.; SCHMIEDER, R.E.; SHLYAKHTO, E.; TSIOUFIS, C.; ABOYANS, V.; DESORMAIS, I. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. **Eur Heart J.** 39:3021–104. 2018.
- WILSON, L.D.; VERRAL, R. D. F and H NMR investigation of cyclodextrin/fluorocarbon alkyl carboxylate surfactante inclusion complexes. **Langmuir**, v. 14, p. 4710-4717, 1998.
- WIYSONGE, C.S.U.; BRADLEY, H.A.; MAYOSI, B.M.; MARONEY, R.T.; MBEWU, A.; OPIE, L.; VOLMINK, J. Beta-blockers for hypertension. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Issue 1. Art. No.: CD002003. 2007.
- WRIGHT, J.M.; MUSINI, V.M.; GILL, R. First-line drugs for hypertension. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Issue 4. Art. No.: CD001841. 2018.
- YAMORI, Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: De Jong W (ed.). *Experimental and Genetic Models of Hypertension*. **Handbook of Hypertension**. Elsevier, 224-39, 1984.
- YANG, O.; LI, J.; KONG, J. The endothelium as a target for the treatment of heart failure. **Cell Biochem. Biophys**. Jan 24, 2015.
- YOUNG, C.N.; DAVISSON, R.L. In vivo assessment of neurocardiovascular regulation in the mouse: principles, progress, and prospects. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 301(3):H654-62. 2011.
- YU, J. Q.; LIAO, Z. X.; CAI, X. Q.; LEI, J. C.; ZOU, G. L. Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 162–167, 2007.
- ZETÓLA, M.; DE LIMA, T.; SONAGLIO, G.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; LIMBERGER, R.; PETROVICK, P.; e BASSANI, V. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* - Verbenaceae (Brazilian false melissa) – **J. Ethnopharmacology**; v.82, p.207-215, 2002.
- ZICHA, J.; AND KUNES, J. Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. **Physiol. Rev.** 79 1227–1282, 1999.
- ZHANG, Y.; WANG, Q.L; ZHAN Y. Z.; DUAN H.J.; CAO Y.J.; HE L.C. Role of store-operated calcium entry in imperatorin-induced vasodilatation of rat small mesenteric artery. **Eur. J. Pharmacol.** 647, 126-131, 2010.

ZHANG-JAMES, Y.; MIDDLETON, F.A.; FARAONE, S.V. Genetic architecture of Wistar-Kyoto rat and spontaneously hypertensive rat substrains from different sources. **Physiol Genomics**. 45(13):528–538. 2013

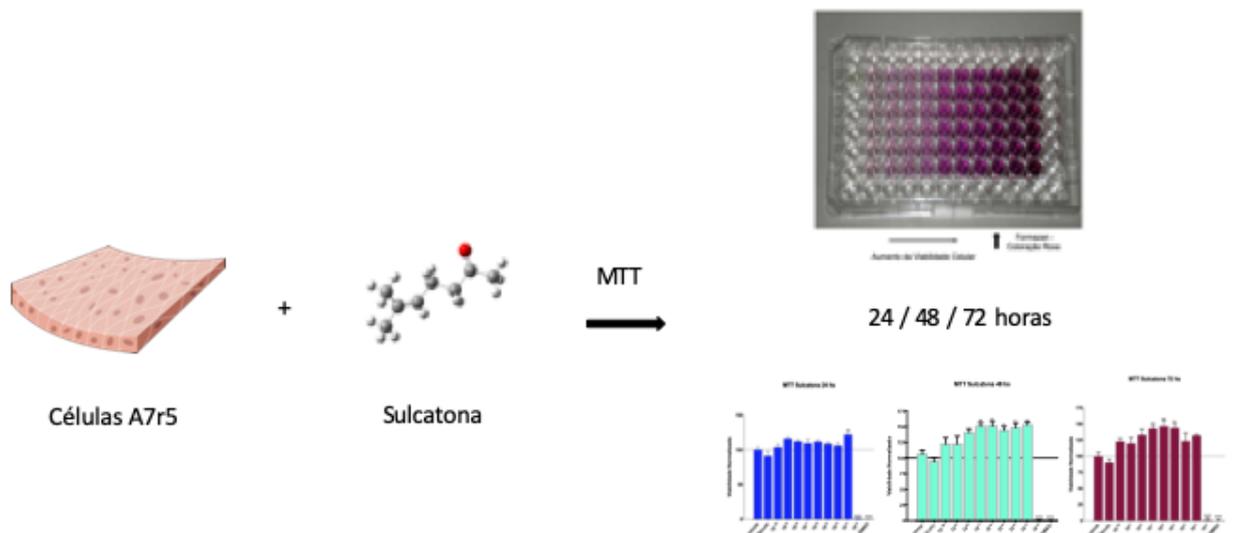
ZHU, Z.; ZHU, S.; LIU, D.; CAO, T.; WANG, L.; TEPEL, M. Thiazide-like diuretics attenuate agonist-induced vasoconstriction by calcium desensitisation linked to Rho kinase". **Hypertension**. ;45(2):233-9, 2005.

CAPÍTULO 02:**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DA 6-METIL-5-HEPTEN-2-ONA (SULCATONA) EM CÉLULAS DE LINHAGEM A7r5**

Márcio Edivandro Pereira dos Santos^{1,2}, Thaís Walter Vieira², Sandra Márcia Muxel², Débora Rejane Fior Chadi², Aldeídia Pereira de Oliveira^{3,4}.

- 1- Departamento de Informação, Ambiente, Saúde e Produção Alimentícia, Instituto Federal do Piauí, Teresina, Brasil.
- 2- Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- 3- Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.
- 4- Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.

E-mail: aldeidia@gmail.com

RESUMO GRÁFICO:

AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DA 6-METIL-5-HEPTEN-2-ONA (SULCATONA) EM CÉLULAS DE LINHAGEM A7r5

RESUMO:

A citotoxicidade é a medida do potencial de um agente em causar injúria celular como: alterações morfológicas, lesões na membrana, perda de atividade metabólica, viabilidade e adesão celular; inibição do crescimento celular; danos no material genético (genotoxicidade) e morte celular. Estudos de citotoxicidade são realizados para avaliar a viabilidade celular, os quais podem avaliar a função celular através da integridade da membrana e de organelas, conteúdo celular (metabólito ou macromolécula) e atividade enzimática. Dessa forma, como não foi encontrado na literatura estudos de citotoxicidade da Sulcatona em células do músculo liso de aorta de ratos (A7r5) e sabendo da importância do estudo citotóxico, o seguinte trabalho teve como objetivo averiguar a citotoxicidade da Sulcatona em células de linhagem do músculo liso de aortas de ratos (A7r5) pelo teste de MTT em 24, 48 e 72 horas. Assim foi utilizado o teste de MTT na qual células viáveis com metabolismo ativo convertem o MTT em um produto formazan de cor púrpura. Portanto, a Sulcatona promoveu uma redução da viabilidade celular, apenas na concentração de 10^{-2} M em todos os tempos avaliados (24, 48 e 72 h) e induziu proliferação celular da linhagem de células do músculo liso de aorta de ratos A7r5 em concentrações que variam entre 10^{-3} M a 10^{-7} M dependendo do tempo de incubação. Mostrando dessa forma que a Sulcatona pode ser utilizada para testes *in vitro* de modo seguro a partir de uma concentração de 10^{-3} M em células A7r5 pois não ocasionou diminuição da viabilidade celular.

Palavras-chaves: Sulcatona, citotoxicidade, MTT, formazan, células A7r5

1.0- INTRODUÇÃO

A legislação atual exige que novas drogas sejam testadas antes de serem liberadas para uso farmacológico ou alimentício, onde a toxicidade é um fator importante e limitante para a liberação e consumo (FRESHNEY, 1994). Assim, a descoberta e caracterização físico química de substâncias causaram um grande aumento na demanda de ensaios biológicos necessários para avaliação das atividades toxicológicas destas substâncias (GROTH; FALCK; MIETHKE, 1995; CLEMEDSON et al., 1996).

A citotoxicidade é a medida do potencial de um agente em causar injúria celular como: alterações morfológicas, lesões na membrana, perda de atividade metabólica, viabilidade e adesão; inibição do crescimento celular; danos no material genético (genotoxicidade) e morte celular. Estudos de citotoxicidade são realizados para avaliar a viabilidade celular, os quais podem avaliar a função celular através da integridade da membrana e de organelas, conteúdo celular (metabólito ou macromolécula) e atividade enzimática (LOVELAND et al., 1992; REPETO; SANZ, 1993; OLIVIER et al., 1995).

O estudo toxicológico *in vivo* não tem sido preterido em virtude da utilização de elevado número de animais, acarretando alto custo financeiro, além de aspectos éticos questionados por entidades protetoras de animais. Desta forma, estudos *in vitro* têm sido cada vez mais utilizados, já que o efeito deletério de um xenobiótico em determinada linhagem celular é um indicativo da sua toxicidade *in vivo*. Além disto, apesar das limitações da cultura de células, os resultados obtidos são reprodutíveis (FRESHNEY, 1994; RODRIGUEZ; HAUN, 1999).

O cultivo de células é caracterizado por permitir a manutenção de células vivas (*in vitro*) em laboratório independente do organismo que a originou. As células mantidas em culturas não estão mais organizadas em tecidos, crescendo em recipientes estéreis, usualmente placas e frascos plásticos e descartáveis. A cultura celular é uma extensão da técnica de cultura de tecidos, um termo genérico utilizado para incluir culturas *in vitro* de órgãos, tecidos e células. Durante o século XX, não havia uma clara distinção entre as possíveis diferenças e tipos de culturas (i.e. órgãos, tecidos e células). Esses termos frequentemente eram indistintos, apesar dos maiores

avanços na ciência terem sido obtidos através da utilização da cultura de células (FRESHNEY, 1994).

Convencionou-se a denominar uma cultura celular como primária, quando suas células são diretamente obtidas de um tecido humano ou animal. Linhagens celulares contínuas, por outro lado, são aquelas nas quais as células sofreram imortalização, i.e., adquiriram a capacidade de se multiplicar indefinidamente. Comparadas às culturas primárias, experimentos empregando células de linhagens contínuas tendem a apresentar menor variação nos resultados obtidos, oferecendo maior reprodutibilidade e fidelidade dos dados (FRESHNEY, 2006).

A cultura de células eucariotas tornou-se um recurso valioso tanto para a pesquisa biomédica como para a área de biotecnologia industrial. Células mantidas em cultura são modelos biológicos mais simples que os estabelecidos com base em animais de experimentação e tendem a fornecer respostas simplificadas para problemas complexos de investigação biomédica (FRESHNEY, 2006).

Os dados produzidos a partir de culturas de células eucariotas *in vitro* podem ser suficientemente informativos, particularmente para estudos funcionais, bioquímicos e moleculares, como também para análise de alvos farmacológicos e produção de produtos biológicos, incluindo vacinas e anticorpos, por exemplo (FRESHNEY, 2005).

Diversos avanços na pesquisa básica, como a descrição de fenômenos biológicos como a pinocitose, a hibridação celular, a inibição de crescimento por contato célula-célula (a qual auxiliou na discriminação entre células normais e malignas), foram beneficiados pelo desenvolvimento do cultivo de células (FELL, 1971). Essa técnica também fomentou importante expansão nas áreas de Biologia Celular e Molecular, oferecendo, inclusive, ferramentas subsidiárias para experimentos *in vivo*.

Em estudos de Farmacologia e Neurobiologia, a cultura celular ampliou a compreensão acerca dos mecanismos de toxicidade e neurotoxicidade por meio da produção de dados sobre as características das células-alvo, sobre interações celulares e alterações induzidas por substâncias químicas, notadamente os fármacos (HARRY et al., 1998; VON MOLTKE et al., 1998; FRESHNEY, 2001).

1.1 - Toxicidade da Sulcatona

Em estudos já realizados, a DL₅₀ da Sulcatona via oral em ratos (5 animais por sexo e dose grupo) foi de 3.570 mg/kg de peso corporal (p.c.) (OECD SIDS, 2003). Os sintomas clínicos foram descritos como apatia, atonia, dispnéia, posição abdominal e lateral (1.360 mg/kg peso corporal ou mais). Uma resposta à dose foi observada, com os sintomas piorando progressivamente com o aumento da dose. A recuperação ocorreu em sobreviventes dentro de 5 dias em dosagens de 4.250 mg/kg de peso corporal ou menos. Na necropsia, nenhuma anormalidade foi detectada em animais que foram sacrificados após uma observação num período de 7 dias. Este resultado é amplamente consistente com um estudo oral agudo adicional no rato que revelou uma DL₅₀ valor de 4.100 mg/kg de peso corporal (COMPADRE et al., 1987).

Os valores de DL₅₀ oral aguda em camundongos foram relatados como >2.000, 2.410 e 3.609 mg/kg p.c. (COMPADRE et al., 1987; MIGUKINA et al., 1988). A LC₅₀ inalatória em ratos foi de: >13,96 mg/l/4h (correspondendo a 13.960 mg/m³/4 h), > 6,98 mg/l/8 h (correspondendo a > 6,980 mg/m³/8 horas); estimado pela regra de Haber a partir de um teste de perigo de inalação que utilizou um sistema de exposição a vapor altamente enriquecido/saturado a 20°C, no qual 12 ratos expostos ao vapor de Sulcatona durante 8 horas (concentração calculada: 6,980 mg/m³). Não foi observada mortalidade e os sintomas clínicos foram limitados ao equilíbrio reversível um dia após a exposição (OECD SIDS, 2003).

A DL₅₀ dérmica aguda excedeu 5.000 mg/kg p.c. em coelhos (KEATING, 1972). Observou-se que a Sulcatona é de baixa toxicidade aguda após ingestão oral, contato com a pele e após inalação. A DL₅₀ após exposição cutânea foi > 5.000 mg/kg p.c. para coelhos. De um teste de risco de inalação, uma CL₅₀> 13,96 mg/l/4 h (> 13.960 mg/m³/4 hrs) pode ser estimado.

Segundo a OECD SIDS, 2003, em estudos *in vitro* a Sulcatona foi testada quanto ao seu potencial mutagênico em doses de até 5.000 µg/placa nas cepas de Salmonella TA1535, TA100, TA1537, TA98 e em E. coli WP2 uvrA com e sem ativação metabólica de acordo com OCDE TG 471 (BASF AG, 2002). Na qual não foi observado alterações no teste de placa padrão e no teste de pré-incubação.

A substância também foi negativa no teste de Ames com e sem mistura S-9 usando cepas TA1535, TA100, TA1537 e TA98 quando testado em uma única concentração de 3 $\mu\text{mol/placa}$ (FLORIN et al., 1979).

Em um ensaio de mutação direta usando cepa de *Salmonella typhimurium* TM677, Sulcatona não mostrou atividade mutagênica até as concentrações testadas mais altas de 5 mg / ml na presença e ausência de ativação metabólica (COMPADRE et al., 1987).

Nos estudos *in vivo* a Sulcatona foi testada quanto à sua capacidade de induzir micronúcleos na medula óssea eritrócitos em camudongos utilizando duas doses intraperitoneais de até 800 mg/kg de pc/dia de acordo com a OCDE TG 474 (BASF AG, 2001). Este nível de dose produzido em todos os animais tratados é evidente sinais de toxicidade que eram reversíveis após dois dias. Nas duas doses mais baixas, apenas pequenos sinais de toxicidade clínica foram observados após uma hora de administração. A substância em estudo não teve um efeito prejudicial aos cromossomos (clastogénico) e não houve indicações de qualquer distribuição cromossômica no curso da mitose (atividade aneugênica) em células da medula óssea *in vivo* mostrando dessa forma que a Sulcatona não induziu efeito mutagênico em bactérias ou clastogénicos em animais *in vivo*. Portanto, sem indicação de potencial genotóxico *in vivo*.

1.2 – Viabilidade Celular e o teste do MTT

Diante desses achados na literatura e sabendo que a determinação da toxicidade de uma substância é tão importante quanto à verificação de sua atividade biológica, utilizamos o teste de MTT para verificar o efeito citotóxico da Sulcatona em células A7r5.

O MTT é um dos testes mais utilizadas para estudos de viabilidade celular, proliferação, citotoxicidade, quimio e radiosensibilidade *in vitro* (MOSMANN, 1983; CARMICHAEL et al., 1987). O MTT em sua forma oxidada possui coloração amarela, porém quando incorporado pelas células metabolicamente ativas ocorre à formação de cristais de formazan de cor púrpura, insolúveis em água, após clivagem do anel de tetrazólio que se acumulam no interior da célula. (RISS et al., 2013).

Em comparação com métodos alternativos, o ensaio de viabilidade MTT é mais simples e menos demorado, e também permite avaliação semiautomática usando placas de múltiplos poços e leitores de placas fotométricas. O ensaio de redução do tetrazólio (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) foi o primeiro ensaio de viabilidade celular homogêneo desenvolvido para um formato de 96 poços que foi adequado para triagem de alto rendimento (MOSMANN, 1983). Os sais de formazan formado no ensaio do MTT possuem um caráter lipofílico (característica mais significativa), uma vez que controla diretamente a permeabilidade da membrana (STOCKERT et al., 2018).

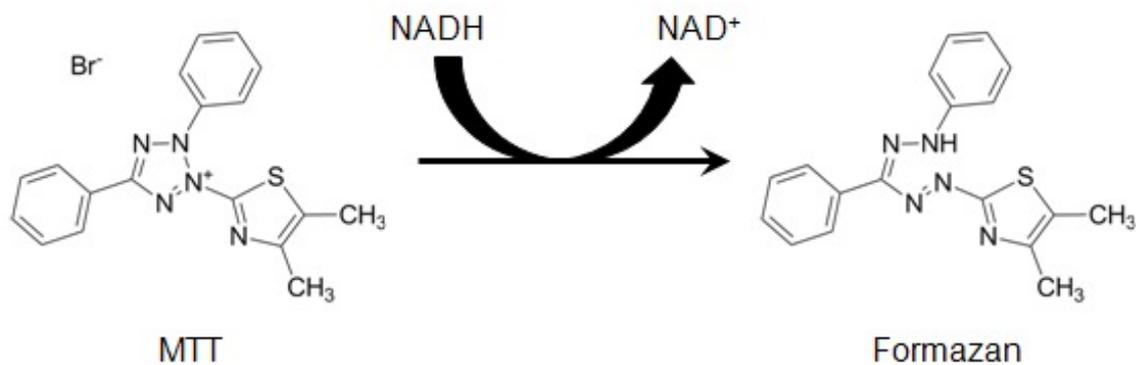
O substrato de MTT é preparado em uma solução fisiologicamente balanceada, adicionado às células em cultura, usualmente em uma concentração final de 0,2 - 0,5 mg/ml, e incubado por 1 a 4 horas. Os cristais de formazan são dissolvidos com a adição de DMSO, a quantidade de formazan (diretamente proporcional ao número de células viáveis) é medida registrando as alterações na absorvância a 570 nm utilizando um espectrofotômetro de leitura de placas. Um comprimento de onda de referência de 630 nm é usado algumas vezes, mas não é necessário para a maioria das condições do ensaio, A atividade das desidrogenases é diretamente proporcional à capacidade redutora do sistema sobre o MTT e, portanto, produção de cromógeno (RISS et al., 2013).

Células viáveis com metabolismo ativo convertem o MTT em um produto formazan de cor púrpura (Figura 13). Quando as células morrem, elas perdem a capacidade de converter MTT em formazan, assim a formação da cor serve como um marcador útil e conveniente apenas das células viáveis. O exato mecanismo celular de redução do MTT em formazan não é bem compreendido, mas provavelmente envolve reação com NADH ou moléculas redutoras similares que transferem elétrons para o MTT (MARSHALL, GOODWIN, HOLT, 1995). A especulação na literatura inicial envolvendo enzimas mitocondriais específicas levou à suposição mencionada em numerosas publicações de que o MTT está medindo a atividade mitocondrial (BERRIDGE; TAN, 1993; BERRIDGE et al., 1996).

A redução do MTT à formazan foi assim considerada uma medida da atividade mitocondrial, mas o processo não depende de succinato como se acreditava anteriormente (BERRIDGE; TAN, 1993). A origem desse equívoco poderia ter algum raciocínio histórico, baseado principalmente nos estudos iniciais de Slater et al.(1963)

sobre sistemas de succinato-tetrazólio, e propostas do MTT para avaliação de viabilidade por Mosmann (1983) e Carmichael et al. (1987). Sabe-se agora que, nos ensaios de viabilidade, o MTT é reduzido principalmente a coenzima NAD(P)H e enzimas glicolíticas do retículo endoplasmático (BERRIDGE et al., 1996, 2005). Portanto, a redução do MTT celular deve ser vista como uma medida da taxa de produção de NAD(P)H glicolítica.

FIGURA 13: Estruturas do MTT e o produto Formazan formado



Fonte: Adaptado de RISS et al., 2013.

O produto formazan acumula-se como um precipitado insolúvel dentro das células, além de ser depositado próximo à superfície celular e no meio de cultura. O formazan deve ser solubilizado antes de registrar as leituras de absorbância. Uma variedade de métodos tem sido usada para solubilizar o produto formazan para estabilizar a cor, evitar a evaporação e reduzir a interferência pelo vermelho de fenol e outros componentes do meio de cultura (TADA et al., 1986; HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989; DENIZOT; LANG, 1986). Vários métodos de solubilização incluem o uso de: isopropanol acidificado, DMSO, dimetilformamida, SDS e combinações de detergente e solvente orgânico. A acidificação da solução de solubilização tem a vantagem de alterar a cor do vermelho de fenol para a cor amarela, que pode ter menos interferência nas leituras de absorbância. O pH da solução de solubilização pode ser ajustado para fornecer absorbância máxima se a sensibilidade for um problema (PLUMB; MILROY; KAYE, 1989; RISS et al., 2013).

A quantidade de sinal gerado depende de vários parâmetros, incluindo: a concentração de MTT, a duração do período de incubação, o número de células viáveis e sua atividade metabólica. Todos esses parâmetros devem ser considerados ao otimizar as condições do ensaio para gerar uma quantidade suficiente de produto que possa ser detectada acima do fundo (RISS et al., 2013).

Diante dessas informações e como não foi encontrado na literatura estudos de citotoxicidade da Sulcatona em células do músculo liso de aorta de ratos (A7r5) e sabendo da importância do estudo citotóxico, o seguinte trabalho teve como objetivo averiguar a citotoxicidade da Sulcatona em células de linhagem do músculo liso de aortas de ratos (A7r5) pelo teste de MTT em 24, 48 e 72 horas.

2.0- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Linhagem e Cultivo Celular

Neste estudo foram utilizadas a linhagem celular A7r5 (derivada do músculo liso de aorta de rato), obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (código 0034).

Estas células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² contendo *Dulbecco's modified Eagle's medium* – DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco), 3,7 g/l de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), pH 7,4 e mantidos em estufa umedecida com 95 % de O₂ e 5 % de CO₂ à 37 °C.

As células foram cultivadas até a 15 passagem com uma taxa de repique de 1:3. O repique foi realizado a cada 4-5 dias após as células atingirem confluência (cerca de 80%), por remoção completa do meio de cultura, lavagem da garrafa com PBS (1x) estéril e adição de solução de tripsina (0,25%) / EDTA (0,03%) pré-aquecida a 37 °C, seguida de agitação da garrafa. Após a digestão enzimática, o conteúdo da garrafa foi transferido para tubo Falcon contendo DMEM. O tubo foi centrifugado (2000 rpm por 10 min à temperatura ambiente), o sobrenadante descartado e uma alíquota do precipitado ressuspenso em DMEM foi transferida para outra garrafa guarnecida com meio fresco. As culturas foram mantidas na incubadora umidificada a 37°C com 5% de CO₂ e o meio foi trocado a cada 3 dias. As células foram estocadas em solução de congelamento (95% meio de cultura completo, 5% DMSO) no freezer -80 °C (MA et al., 2016; GARCÍA-MIGUEL et al., 2018).

2.2- Tripsinização Celular

Para utilização das células realizou-se o processo de tripsinização, onde a solução Tripsina/EDTA (0,25%/0,02%), 5 mL para um frasco de 75 cm², foi adicionada ao recipiente, a fim de remover a aderência das células da parede deste, aguardando-se cerca de 10 minutos, para que a reação ocorresse. As proteínas de adesão destas células necessitam de cálcio e magnésio para exercerem a sua função.

Devido a isto, a tripsina e o EDTA são utilizados em conjunto. A perda de adesão celular ocorre, uma vez que a tripsina, sendo uma enzima proteolítica, atua

quebrando as moléculas de adesão presentes na superfície celular que são responsáveis pela adesão da célula ao frasco, enquanto que o EDTA atua quelando os cátions divalentes livres. A tripsinização é interrompida, após o tempo estabelecido, acrescentando-se meio de cultura contendo soro fetal bovino (SFB).

As proteínas, nele existentes, irão competir com as moléculas de adesão supracitadas, promovendo o fim da reação, e prevenindo-se a degradação excessiva da superfície celular. Em seguida, a suspensão contendo as células foi transferida para um tubo tipo falcon (15 mL), sendo posteriormente centrifugada a 2000 rpm durante 10 minutos e os sedimentos ressuspensos no meio DMEM com 10% SFB.

2.3- Quantificação Celular

Realizou-se a quantificação do número inicial de células, a partir da retirada de 90 µL da amostra que foi diluída em 10 µL de corante azul de tripan (4%), realizando a contagem das células em câmara de Neubauer. Esta metodologia de exclusão com o corante azul de tripan, juntamente com observações morfológicas, permite avaliar a integridade estrutural da membrana plasmática celular. Este ensaio mede a capacidade das células viáveis, com membrana plasmática intacta, de excluir o corante, permitindo a quantificação do número de células vivas, para a execução do experimento. O manejo da cultura celular era feito sempre em capela de fluxo laminar, em ambiente estéril.

As soluções (células/ Azul de Tripan) foram homogeneizadas e colocadas em um lado da câmara de Neubauer para contagem com auxílio do microscópio óptico (OLYMPUS BX40) no aumento de 40X. As células são contadas nos quatro quadrantes externos da câmara seguindo sempre a mesma direção e usando o esquema do “L” para que a mesma célula não seja contada duas vezes (Figura 14).

Portanto, as células que se encontravam sobre as linhas de baixo e da direita não eram contadas. A equação usada para determinar o número de células por mililitro foi:

$$QC = FD \times 10^4 \times 1\text{mL} \times \underline{\text{N}^\circ \text{ de células}}, \text{ onde:}$$

QC → Quantidade de células por mL

FD → Fator de diluição (40x)

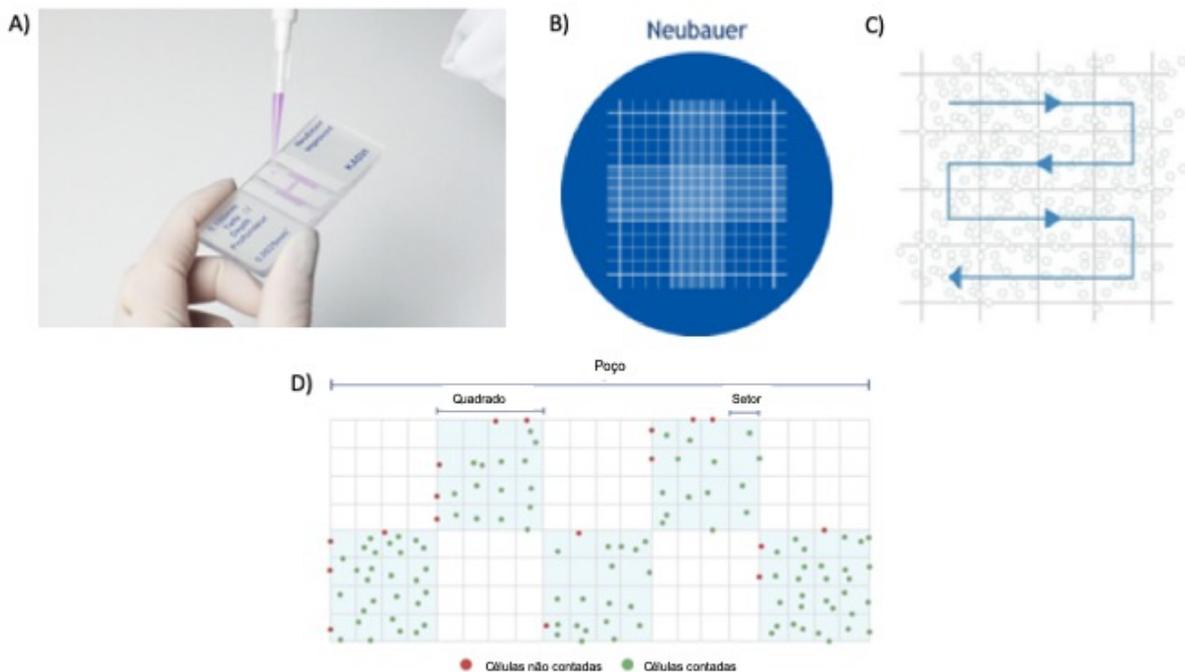
10^4 → Fator de correção da câmara de Neubauer

1mL → Volume da amostra

Nº de células → Média do número de células contadas

4

FIGURA 14: Aparato e técnica para contagem celular. A – Câmara de Neubauer; B – Esquema da câmara de Neubauer; C- Contagem em ziguezague; D- Esboço da contagem de células.



Fonte: Adaptado de <https://kasvi.com.br/como-e-realizada-contagem-de-celulas>.

2.4- Drogas e Reagentes

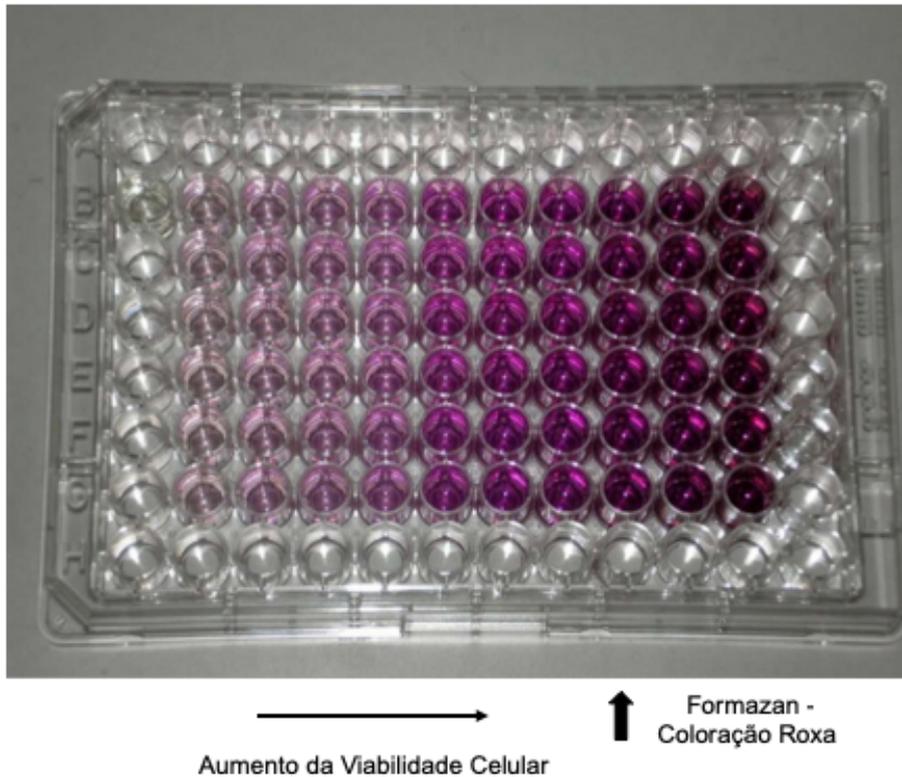
As drogas utilizadas nesse estudo foram 6-metil-5-hepten-2-ona (Sulcatona), MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium, DMSO - dimetilsulfóxido (da Sigma, St. Louis, MO, USA), Trypan Blue 0,4% (GIBCO/Invitrogen, USA), Tween 80 (Fisher scientific, EUA). Na preparação das soluções estoques a Sulcatona foi diluída em Tween 80 (0,05% v/v), para todos os experimentos com cultura de células. Todas as soluções estoques foram mantidas à -20°C.

2.5- Avaliação da Citotoxicidade: Teste de MTT

A citotoxicidade da Sulcatona foi analisada pela técnica de redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium), que é um método colorimétrico que mede a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

As células da linhagem A7r5, quando incubadas com Sulcatona foram analisadas utilizando o ensaio com o MTT (formazan). Inicialmente, as células foram semeadas em placas de 96 poços em uma concentração de 2×10^5 cél/mL incubadas em meio DMEM com 10% de soro bovino fetal (SFB), durante o período de 24, 48 e 72 h, a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após este período, o meio foi retirado e, em seguida, foram colocadas as diferentes concentrações de Sulcatona (10^{-2} á 10^{-10} M) diluídas no meio de crescimento. Esta linhagem foi cultivada sob as mesmas condições de temperatura e CO₂ durante 24 h. Após esse período de incubação com a substância testada, removeu-se o sobrenadante da cultura, adicionou-se a solução de MTT (0,5 mg/mL em tampão fosfato-salina (PBS), retornando à placa para a estufa durante 4 h para que ocorresse a reação. Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados com a adição de uma solução de 1:1 Isopropanol/DMSO á temperatura ambiente. Após 30 min, a absorbância foi mensurada em 570 nm, com background de subtração em 690 nm no espectrofotômetro, SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (KINKER et al., 2016) (Figura 15).

FIGURA 15: Microplaca com ensaio de MTT mostrando a intensidade de formação de Formazan



Fonte: Adaptado de <https://kasvi.com.br/aplicacoes-microplaca-microtitulacao>.

3.0- ANÁLISE ESTATÍSTICA

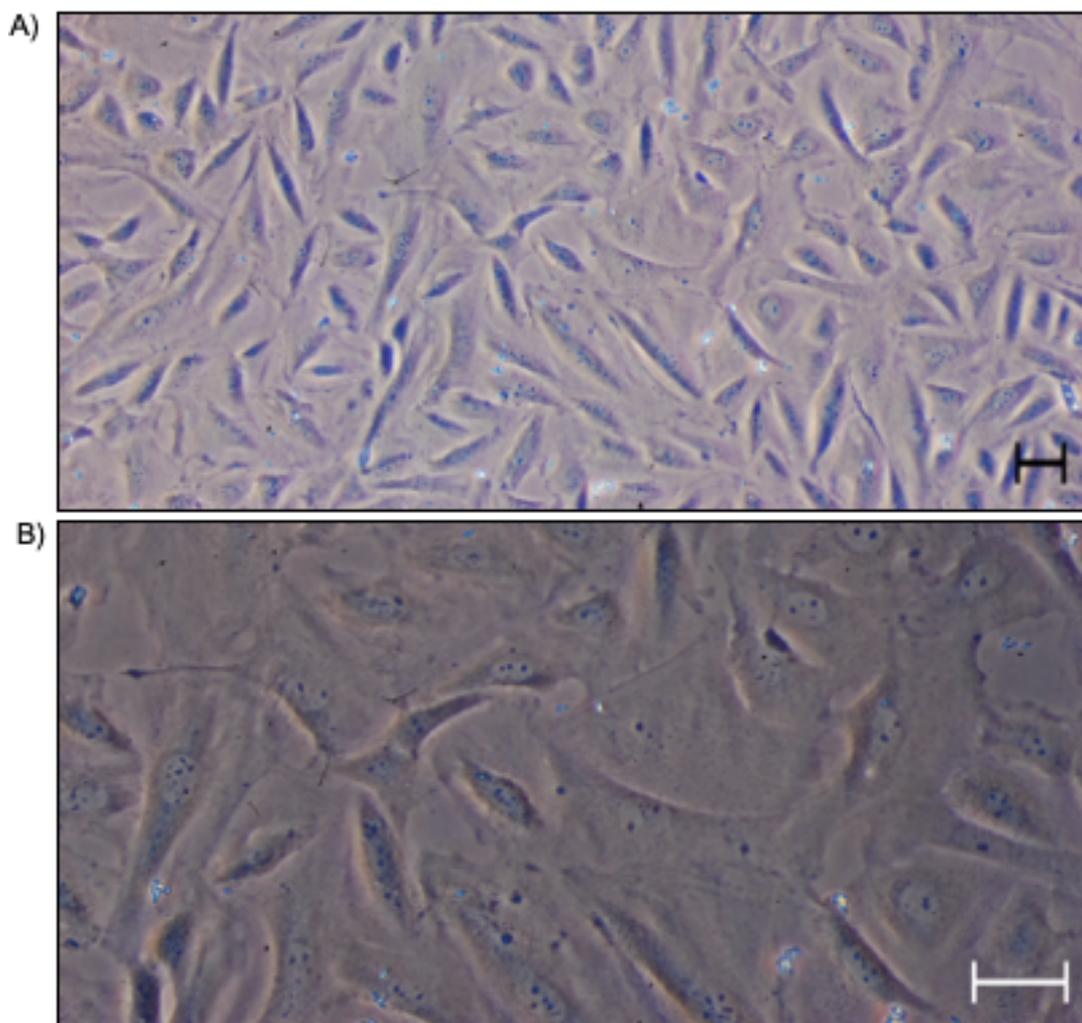
Resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias de quatro a cinco poços de células com 2×10^5 céls/por poço. Primeiramente as médias dos grupos eram normalizadas com base no controle e em seguida a estatística foi realizada utilizando o Anova one-way seguida do pos-test de Tukey. Nas análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os procedimentos foram analisados utilizando o programa Graph Pad Prism 6.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

4.0- RESULTADOS

4.1- LINHAGEM CELULAR *A7r5*

Células de linhagem *A7r5* que foram cultivadas e utilizadas para os experimentos *in vitro*.

FIGURA 16: Células *A5r7* de músculo liso de aorta torácica de ratos. Figura 16A: com aumento de 10x (escala 50 μm) e Figura 16B: com aumento de 20x (escala 50 μm).

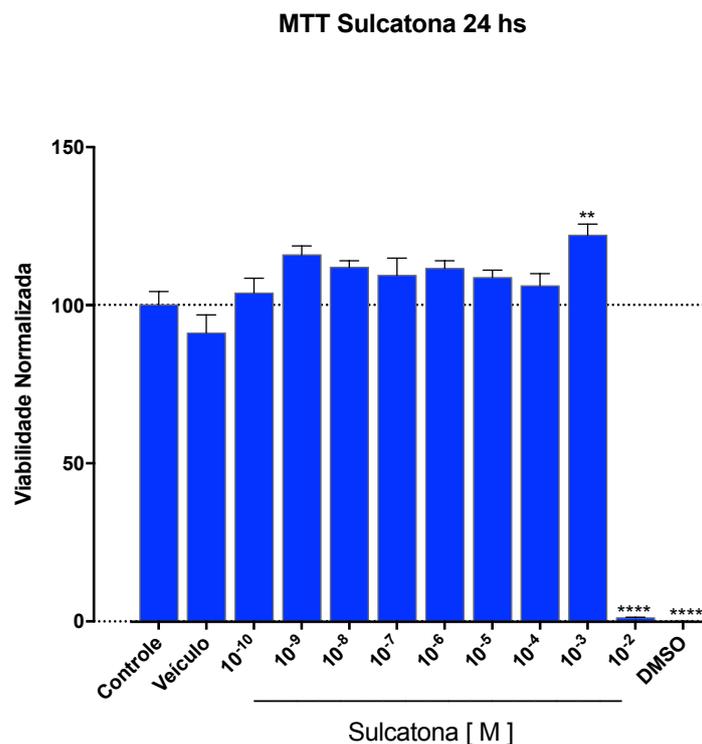


Fonte: Laboratório de Neurotransmissão e Modulação Neural da Pressão Arterial – IB/USP)

4.2- AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA SULCATONA PELO TESTE DE MTT EM 24 HORAS

Como mostra a Figura 17, o estímulo com Sulcatona nas concentrações de 10^{-4} a 10^{-10} M e o veículo não reduziram a viabilidade celular das células A7r5 durante um período de estimulação de 24h (Controle: $100,10 \pm 4,20$; Veículo: $91,19 \pm 5,75$; 10^{-10} M: $103,84 \pm 4,69$; 10^{-9} M: $115,92 \pm 2,82$; 10^{-8} M: $111,98 \pm 1,09$; 10^{-7} M: $109,47 \pm 5,45$; 10^{-6} M: $111,62 \pm 2,43$; 10^{-5} M: $108,75 \pm 2,33$; 10^{-4} M: $106,14 \pm 3,88$; n=5 poços) quando comparados ao controle, apenas a maior concentração (10^{-2} M) e o controle positivo DMSO causou morte celular (10^{-2} M: $1,12 \pm 0,22$; DMSO: $0 \pm 0,06$; n=5) e a concentração de 10^{-3} M ($122,12 \pm 3,53$; n=5 poços) induziu uma proliferação celular quando comparado com o controle. A concentração de Sulcatona que induz metade do efeito máximo (EC_{50}) de proliferação celular durante o período de estimulação de 24 h foi de $0,007 \pm 2,54$.

FIGURA 17: Viabilidade celular da linhagem de células do músculo liso de aorta de ratos (A7r5) após estímulo com Sulcatona por 24 horas.

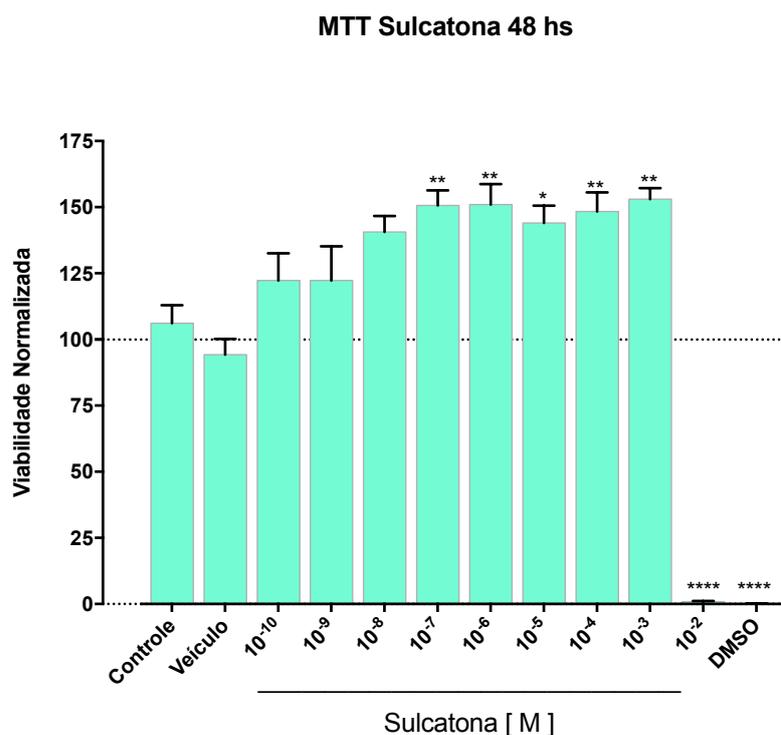


Os dados foram expressos como média ± e.p.m, por One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. n=5, **p<0,01, ****p<0,0001. Concentrações de Sulcatona, DMSO vs Controle.

4.3- AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA SULCATONA PELO TESTE DE MTT EM 48 HORAS

Na Figura 18, o estímulo com Sulcatona nas concentrações de 10^{-8} a 10^{-10} M e o veículo não reduziram a viabilidade celular das células *A7r5* durante um período de estimulação de 48h (Controle: $106,14 \pm 6,78$; Veículo: $94,29 \pm 5,92$; 10^{-10} M: $122,28 \pm 10,31$; 10^{-9} M: $122,28 \pm 12,93$; 10^{-8} M: $140,64 \pm 5,99$; $n=4$) quando comparados ao controle, apenas a maior concentração (10^{-2} M) e o controle positivo DMSO causaram morte celular (10^{-2} M: $0,80 \pm 0,30$; DMSO: $0 \pm 0,17$; $n=5$) e as concentrações de 10^{-3} a 10^{-7} M (10^{-7} M: $150,62 \pm 5,77$; 10^{-6} M: $150,98 \pm 7,73$; 10^{-5} M: $144,02 \pm 6,52$; 10^{-4} M: $148,39 \pm 7,21$; 10^{-3} M: $153,03 \pm 4,19$; $n=4$) induziram um aumento na proliferação celular quando comparado com o controle. A EC_{50} da Sulcatona durante o período de estimulação de 48 h foi de $0,44 \pm 0,81$.

FIGURA 18: Viabilidade celular da linhagem de células do músculo liso de aorta de ratos (*A7r5*) após estímulo com Sulcatona por 48 horas.

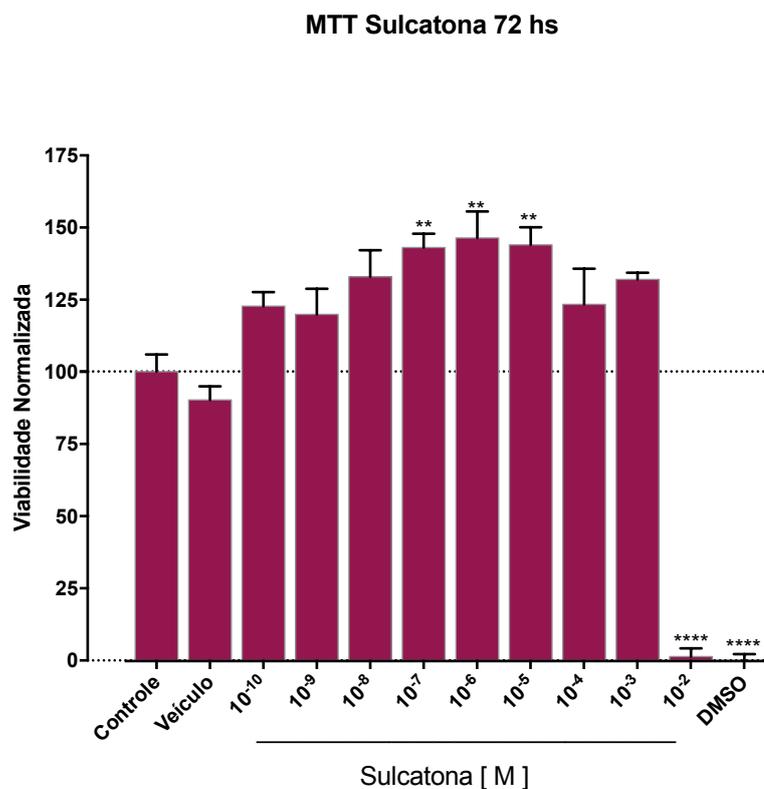


Os dados foram expressos como média \pm e.p.m, por One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. $n=5$, * $p < 0,05$, ** $P < 0,01$ Concentrações de Sulcatona, DMSO vs Controle.

4.4- AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA SULCATONA PELO TESTE DE MTT EM 72 HORAS

No estímulo de 72h com Sulcatona nas concentrações 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-8} a 10^{-10} M e o veículo não reduziram a viabilidade celular das células *A7r5* como mostrado na Figura 19 (Controle de viabilidade: $100,11 \pm 5,93$; Veículo: $90,27 \pm 4,68$; 10^{-10} M: $122,80 \pm 4,87$; 10^{-9} M: $119,90 \pm 8,92$; 10^{-8} M: $132,98 \pm 9,18$; 10^{-7} M: $132,06 \pm 2,30$ 10^{-6} M: $123,37 \pm 12,36$; n=4). As concentrações de 10^{-5} a 10^{-7} M induziram proliferação celular (10^{-7} M: $143,05 \pm 4,80$; 10^{-6} M: $146,41 \pm 9,20$; 10^{-5} M: $143,98 \pm 6,10$; n=4) e a menor concentração de 10^{-2} M e o DMSO causaram morte celular (10^{-2} M: $1,38 \pm 2,79$ e DMSO: $0 \pm 2,17$) todas as concentrações quando comparados com o controle. A EC_{50} da Sulcatona durante o período de estimulação de 72h foi de $0,31 \pm 0,58$.

FIGURA 19: Viabilidade celular da linhagem de células do músculo liso de aorta de ratos (*A7r5*) após estímulo com Sulcatona por 72 horas.



Os dados foram expressos como média ± e.p.m, por One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. n=5, *p<0,05, Concentrações de Sulcatona, DMSO vs Controle.

5.0- DISCUSSÃO

Os ensaios baseados em células são frequentemente utilizados para rastreamento de coleções de compostos para determinar se as moléculas de teste têm efeitos na proliferação celular ou mostram efeitos citotóxicos diretos que conduzem eventualmente a morte celular. Estes ensaios também são amplamente utilizados para medir a ligação ao receptor e uma variedade de eventos de transdução de sinal que podem envolver a expressão de repórteres genéticos, o tráfego de componentes celulares ou o monitoramento da função de organelas. Independentemente do tipo de ensaio baseado em células utilizado, é importante saber quantas células viáveis permanecem no final da experiência. Há uma variedade de métodos de ensaio que podem ser usados para estimar o número de células eucarióticas viáveis.

Com o objetivo de examinar os efeitos da Sulcatona em células de músculo liso de aorta de ratos, foi necessário fazer a medida de atividade celular como indicador de dano celular ou citotoxicidade. Um dos ensaios mais simples utiliza o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio (MTT), um corante amarelo solúvel em água que é facilmente absorvido por células viáveis e reduzido pela ação das desidrogenases mitocondriais (SLATER; SAWYER; STRAULI, 1963). A redução ao produto é um formazan azul insolúvel em água, que deve então ser dissolvido para medição colorimétrica. Etanol ou propanol (DENIZOT; LANG, 1986), ácido-isopropanol (0,04 M HCl em propan-2-ol) (MOSMANN, 1983), ácido-isopropanol mais Triton X-100 a 10% (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991), óleo mineral (não especificado) ou dimetilsulfóxido (DMSO) (CARMICHAEL et al., 1987) foram todos sugeridos como substâncias para solubilizar os cristais de formazan, porém, o DMSO foi considerado o mais satisfatório em nosso trabalho.

A produção de formazan é diretamente proporcional ao número de células no intervalo ~ 200-50.000 células / poço, e pode ser usado para detectar a presença de pequeno número de células vivas. Células inativadas metabolicamente, como eritrócitos, não produzem quantidades significativas de formazan. Por outro lado, a quantidade de formazan produzido por célula em um determinado período depende da atividade metabólica dessa célula; Linfócitos ativados geram até dez vezes mais formazan como células em repouso (MOSMANN, 1983). A produção de formazan é linear com o tempo acima de 30 min-2 h e também é proporcional à concentração de

MTT, sendo que a relação difere com os diferentes tipos de células (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986, VISTICA et al.,1991).

O procedimento de MTT avalia a atividade (e número) de células vivas no final de um experimento. Uma outra vantagem do ensaio MTT é que as enzimas de clivagem do tetrazólio não estão presentes no soro. Uma desvantagem é que este é uma técnica destrutiva em que as células não podem posteriormente ser usadas para qualquer outro ensaio. No entanto, o meio de cultura pode ser salvo para outros, se necessário.

Sendo assim, avaliou-se o efeito citotóxico da Sulcatona em células *A7r5* pelo teste de MTT nos tempos de 24, 48 e 72 horas e verificamos que a Sulcatona não ocasionou morte celular em oito das nove concentrações testadas. Apenas a maior concentração 10^{-2} M ocasionou um efeito citotóxico nas células *A7r5* nos três períodos de tempos testados.

Outro dado interessante é que a Sulcatona promoveu um aumento da viabilidade celular em todos os tempos utilizados 24, 48 e 72 horas, sendo que no período de 24 h apenas a concentração de 10^{-3} M, em 48 horas cinco concentrações (10^{-7} M a 10^{-3} M) e no tempo de 72 h, três concentrações (10^{-5} a 10^{-7} M) testadas induziram proliferação celular como mostrado na figura 17,18 e 19 respectivamente.

As células musculares lisas vasculares (CMLVs) são essenciais para um bom desempenho da musculatura vascular. Ao contrair e relaxar, as CMLVs desempenham um papel importante na manutenção de uma pressão arterial adequada, alterando o diâmetro luminal, e também desempenham outras funções, que se tornam progressivamente mais importantes durante o remodelamento vascular (OWENS; KUMAR; WAMHOFF, 2004; HAYASHI; NAIKI, 2009; ZHANG, et al., 2014). Ao contrário de outras células musculares, as CMLVs não se diferenciam de maneira terminal. Eles podem mudar reversivelmente ao longo de um contínuo fenótipo contrátil (também conhecido como fenótipo diferenciado ou fenótipo quiescente) para um fenótipo sintético (também conhecido como fenótipo desdiferenciado ou fenótipo ativado) (BEAMISH et al., 2010). Neste processo, o aumento da proliferação e migração de CMLVs são, sem dúvida, necessárias e potentes para o reparo vascular (BEAMISH et al., 2010; ZHANG, et al., 2014).

Uma vez que a Sulcatona aumentou a viabilidade celular podemos sugerir um possível efeito angiogênico bem como de reparação vascular. A angiogênese, a formação de novos vasos a partir de preexistentes, é um processo que participa de condições fisiológicas, como desenvolvimento e cicatrização de feridas, mas também é um fator fundamental em muitas condições patológicas, incluindo câncer, artrite infecciosa e psoríase. Inclui várias etapas caracterizadas por funções celulares endoteliais distintas, como proliferação, migração, formação de lúmen, diferenciação e maturação. Cada etapa envolve múltiplos fatores de crescimento, receptores e moléculas, causando a diversidade de vias de sinalização que afetam a patogenicidade da angiogênese em diferentes doenças (VIALLARD; LARRIVÉE, 2017; SAJIB et al., 2018).

Sabe-se também que o uso de inibidores da angiogênese induz o desenvolvimento da hipertensão arterial. Os inibidores da angiogênese (IA) são divididos em dois grupos principais: os anticorpos monoclonais inibidores das vias de sinalização vascular (bevacizumab) e as pequenas moléculas inibidoras de tirosinaquinase (sunitinib, sorafenibe). O mecanismo de ação desses fármacos em induzir HA não é completamente entendido, mas pode estar diretamente relacionado à inibição da sinalização via tirosina quinase e dos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) (YEH; BICKFORD, 2009; SUTER; EWER, 2013).

A sinalização VEGF é importante para o adequado funcionamento endotelial e a síntese de óxido nítrico – na qual sua inibição prejudica a vasodilatação. Outros efeitos da inibição de VEGF incluem a indução da morte de células endoteliais e a rarefação dos vasos de resistência (EWER; YEH, 2013; SUTER; EWER, 2013). A terapia com IA objetiva atingir moléculas que estão com expressão aumentada nos pacientes com câncer; entretanto, tais moléculas também estão presentes em células não tumorais e têm papel fisiológico em diversos sistemas, incluindo o cardiovascular. Portanto, ao atuarem no tumor pela inibição do VEGF, os IA também causam HA. Isso gera um paradoxo posto que a presença de HA é, ao mesmo tempo, um efeito adverso cardiovascular e um sinal de resposta terapêutica oncológica favorável (EWER; YEH, 2013).

Assim, podemos concluir que a Sulcatona pode funcionar como uma substância citoprotetora, bem como agir induzindo regeneração celular ou até mesmo possuir efeito antitumoral como muitos terpenos, classe em que se encontra a

Sulcatona. Diante desses resultados também podemos inferir que a Sulcatona pode ser usada de modo seguro em uma grande margem de concentrações, 10^{-3} M a 10^{-10} M, sem causar danos celular. E como ressaltado na literatura, com sua DL_{50} oral em ratos bastante elevada (3.570 mg/kg p.c.) dá uma grande margem de segurança para os trabalhos *in vivo* e não apresentou efeitos mutagênicos e clastogênicos.

6.0- CONCLUSÃO

Concluimos dessa forma que a Sulcatona não ocasiona morte celular nas linhagens *A7r5* nos tempos de 24, 48 e 72 h, com excessão da maior concentração de 10^{-2} M. Dessa forma ela pode ser usada de modo seguro para os experimentos *in vivo* realizados no captítulo 03 e para os testes moleculares realizados no capítulo 04, mostrando assim, que os efeitos verificados foram devido ao seu efeito biológico e não efeito citotóxico.

REFERÊNCIAS

- AMIGÓ, H.; TERÊNCIO, M.C.; MITOVA, H.; IODICE, C.; PAYA, H.; ROSA, S. Potential antipsoriatic avarol derivatives as antioxidants and inhibitors of PGE (2) generation and proliferation in the HaCaT cell line. **J Nat Prod**; 67: 1459 – 63. 2004.
- BANKS, H.T.; SUTTON, K.L.; THOMPSON, W.C.; BOCHAROV, G.; ROOSE, D.; SCHENKEL, T.; MEYERHANS, A. Estimation of cell proliferation dynamics using CFSE data. **Bull Math Biol.** Jan;73(1):116-50. 2011.
- BASF AG. Product safety, Cytogenetic study in vivo, mouse micronucleus test after two intraperitoneal administrations with 6-Methylhept-5-en-2-one (methylheptenon), unpublished study, 26M0874/004151, 00/0874. 10 July 2001.
- BASF AG. Product Safety, Salmonella typhimurium / Escherichia coli reverse mutation assay (standard plate test and preincubation test) with 6-Methylhept-5-en-2-one (methylheptenon), unpublished study, 40M0874/004193, 00/0874. 18 April 2002.
- BEAMISH, J.A.; HE, P.; KOTTKE-MARCHANT, K.; MARCHANT, R.E. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. **Tissue Eng. Part B Rev.** 16: 467-491. 2010.
- BERRIDGE, M.V.; TAN, A.S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Arch Biochem Biophys.** 303(2):474–82. 1993.
- BERRIDGE, M.; TAN, A.; MCCOY, K.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica.** 4:14–19. 1996.
- BERRIDGE, M.V.; HERST, P.M.; TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnol. Annu. Rev.** 11, 127–152. 2005.
- BONHOEFFER, S.; MOHRI, H.; HO, D.; PERLESON, A.S. Quantification of cell turnover kinetics using 5-Bromo-2'-deoxyuridine. **J Immunol.** 164:5049–5054, 2000.
- CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W.G.; GAZDAR, A.F.; MINNA, J.D.; MITCHELL, J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colotimetnc assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Res** 47, 936-942. 1987.

- CLEMEDSON, C.; MC FARLANE-ABDULLA, E.; ANDERSSON, M.; BARILE, F.A.; CALLEJA, M.C.; CHESNÉ, C.; CLOTHIER, R.; COTTIN, M.; CURREN, R.; DANIEL-SZOLGAY, E.; DIERICKX, P.; FERRO, M.; FISKESSIO, G. Meic evaluation of acute systematic toxicity. Part I: Methodology of 68 29 Referências Bibliográficas in vitro toxicity assays used to test the first 30 reference chemical. **American Theological Library Association**, 24, 251 – 272. 1996.
- COMPADRE, C.M.; HUSSAIN, R.A.; DE COMPADRE, R.L.L.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D. The intensely sweet sesquiterpene hernandulcin: Isolation, synthesis, characterization, and preliminary safety evaluation, **J. Agric. Food Chem.** 35, 273-279. 1987.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Meth**; 89:271–277. 1986.
- EWER, M.S.; YEH, E.T. Cancer and the heart. 2nd ed. Shelton, Connecticut: **Peoples Medical Publishing House-USA**. p. 57-67. 2013.
- FLORIN, I.; RUTBERG, L.; CURVALL, M.; ENZELL, C.R. Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames' Test. **Toxicology**. 15, 219-232. 1979.
- FRESHNEY, R.I. In: Culture of Animal Cells. **A manual of basic technique**. 3rd. Ed. Wiley-Liss. 1994.
- FRESHNEY, R.I. Application of cell cultures to toxicology. **Cell biology and toxicology**. 17 (4-5):213-30. 2001.
- FRESHNEY, R.I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 5°ed. New York. Wiley-Liss. 2005.
- FRESHNEY, R.I. Basic Principles of Cell Culture, in Culture of Cells for Tissue Engineering (eds G. Vunjak-Novakovic and R. I. Freshney), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. Inc pp 03-22. 2006.
- FELL, H.B. The George Bidder lectures. Tissue Culture and its contribution to Biology and Medicine. **The Journal of Experimental Biology**; 55(1):1-12. 1971.
- GARCÍA-MIGUEL, M.; RIQUELME, J.A.; NORAMBUENA-SOTO, I.; MORALES, P.E.; SANHUEZA-OLIVARES, F.; NUÑEZ-SOTO, C.; MONDACA-RUFF, D.; CANCINO-ARENAS, N.; SAN MARTÍN, A.; CHIONG, M. Autophagy mediates tumor necrosis factor- α -induced phenotype switching in vascular smooth muscle A7r5 cell line. **PLoS one**, 13(5). 2018.

- GHISALBERTI, E.L. The biological activity of naturally occurring kaurene diterpenes. **Fitoterapia**, v. 68, n. 4, p. 303-325, 1997.
- GROTH, T.; FALCK, P.; MIETHKE, R.R. Cytotoxicity of biomaterials – basic mechanisms and in vitro test methods: a review. **American Theological Library Association**, 23, 790 – 799. 1995.
- HANSEN, M.B.; NIELSEN, S.E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J. Immunol. Methods**.119:203–210. 1989.
- HARRY, G.J.; BILLINGSLEY, M.; BRUININK, A.; CAMPBELL, I.L.; CLASSEN, W.; DORMAN, D.C. In vitro techniques for the assessment of neurotoxicity. **Environmental health perspectives**. 106 Suppl 1:131-58. 1998.
- HAYASHI, K.; NAIKI, T. Adaptation and remodeling of vascular wall; biomechanical response to hypertension. **J. Mech. Behav. Biomed. Mater.** 2: 3-19. 2009.
- HAWKINS, E.D.; HOMMEL, M.; TURNER, M.L.; BATTYE, F.; MARKHAM, J.; HODGKIN, P.D. Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data. **Nat Protocols**. 2:2057–2067, 2007.
- KEATING, J.W. Report to RIFM cited in Opdyke, Fd. **Cosm. Toxicol**. 13, 859, 1972.
- KIM, S.H.; PARK, E.J.; LEE, C.R.; CHUN, J.N.; Cho, N.H.; Kim, I.G.; JEON, J.H. Geraniol induces cooperative interaction of apoptosis and autophagy to elicit cell death in PC-3 prostate cancer cells. **International Journal of Oncology**, 40(5), 1683-1690. 2012.
- KINKER, G.S.; OBA-SHINJO, S.M.; CARVALHO-SOUSA, C.E.; MUXEL, S.M.; MARIE, S.K.N.; MARKUS, R.P.; FERNANDES, P.A. Melatonergic system-based two-gene index is prognostic in human gliomas. **J. Pineal Res**. 60:84–94. 2016.
- KLAID, S.A.; FRIEDRICHSEN, G.E.M.; CHRISTENSEN, S.B.; EL TAHIR, A.; SATTI, O.M. Isolation and characterization of pristimerine as the antiplasmodial and antileishmanial agent of *Maytenus senegalis* (Lam.) **Excell. Akivoc.**, v.9, p.129-134. 2007.
- LYONS, A.B.; DOHERTY, K.V. Flow cytometric analysis of cell division by dye dilution. **Curr Protocols Cytom**. pp. 9.11.1–9.11.10, 2004.
- LOVELAND, B.E.; JOHNS, T.G.; MACKAY, I.R.; VAILLANT, F.; WANG, Z.X.; HERTZOG, P.J. Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in

- proliferative and antiproliferative assays. **Biochemistry International**, 27: 501-510. 1992.
- MA, W.; WANG, Y.; YAO, X.; XU, Z.; AN, L.; YIN, M. The role of Exo70 in vascular smooth muscle cell migration. **Cellular & molecular biology letters**, 21, 20. 2016.
- MARSHALL, N.J.; GOODWIN, C.J.; HOLT, S.J. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. **Growth Regul.**;5(2):69–84. 1995.
- MATERA, G.; LUPI, M.; UBEZIO, P. Heterogeneous cell response to topotecan in a CFSE-based proliferative test. **Cytometry A**. 62:118–128, 2004.
- MENA-RÉJON, G.J.M.; ESPADAS, A.R.P.; MOO-PUC, R.E.; RIVIERA, R.C.; BAZZOCCHI, L.L.; DIAZ, I.A.J.; QUIJANO, L. Antigiardial activity of triterpenoids from root bark of *Hippocratea excelsa*. **J. Nat. Prod.**, v.70, p.863-865. 2007.
- MIGUKINA, N.B.; LIPANINA, T.B.; MALTZEWA, N.M.; STEPKINA, L.N.; SCHUMARINA, N.B.; KARPUCHINA, E.A.; KAJUTINA, C.B. To the validation of tentative safe level of methylheptenon exposure in the work zone air, *Gigiena Truda i Professional'nye Zabolevaniya*. **Labor Hygiene and Occupational Diseases** 32 (88), 52-53. 1988.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods** v.16, p.55-56, 1983.
- OECD SIDS. BASF AG, Germany; Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland; Kuraray, Japan. SIDS Initial Assessment Report For SIAM 17 Arona, Italy, 11–14 November 2003.
- OLIVIER, P.; TESTARD, P.; MARZIN, D.; ABBOTT, D. Effect of high polyol concentrations on the neutral red absorption assay and tetrazolium-MTT test of rat hepatocytes in primary culture. **Toxicology in vitro**, 9, 133 - 138. 1995.
- OWENS, G.K.; KUMAR, M.S.; WAMHOFF, B.R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. **Physiol. Rev.** 84: 767-801. 2004.
- PAN, W.; ZHANG, G. Linalool monoterpene exerts potent antitumor effects in OECM 1 human oral cancer cells by inducing sub-G1 cell cycle arrest, loss of mitochondrial membrane potential and inhibition of PI3K/AKT biochemical pathway. **J BUON**. Jan-Feb;24(1):323-328. 2019.

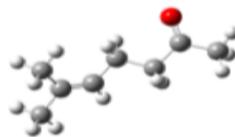
- PAVANAND, K.; WEBSTER, H.K.; YONGVANITCHIT, K.; KUN-ANAKE, A.; DECHATIWONGSE, T.; NUTAKUL, W.; BANSIDDNI, J.; Schizontocidal activity of *Celastrus paniculatus* Willd against *Plasmodium falciparum* in vitro. **Phytother. Res.**, v.3, p.136-139. 1989.
- PLUMB, J.A.; MILROY, R.; KAYE, S.B. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. **Cancer Res.** 15;49(16):4435-40. 1989.
- QUAH, B.; WARREN, H.; PARISH, C. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. **Nat Protocols.** 2:2049–2056. 2007.
- REPETTO, G.; SANZ, P. Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function: in vitro effect of 24 metals. **American Theological Library Association**, 21, 501-507. 1993.
- RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.L. Cell Viability Assays. May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
- RODRIGUEZ, J.A.; HAUN, M. Cytotoxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on V79 cells and rat hepatocytes. **Planta Medica**, 65, 1-5. 1999.
- RODRÍGUEZ, S.; PÉREZ, M.; NAZARENO, M. Identification of male-produced aggregation pheromone of the curculionid beetle *Acrotomopus atropunctellus*. **Bulletin of Entomological Research**, 106(4), 494-501. 2016.
- SAJIB, C.; MD. ISMAIL, H.; MUSADDEQUE A.; HOSSAIN U.S. Onco-Multi-OMICS Approach: A New Frontier in Cancer Research,” **BioMed Research International**, vol. 2018, Article ID 9836256, 14 pages, 2018.
- SLATER, T.F.; SAWYER, B.; STRAULI, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III Points of coupling of four different tetrazolium salts. **Biochim Biophys Acta** 77, 383-393. 1963.
- STOCKERT, J.C.; HOROBIN, R.W.; COLOMBO, L.L.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. **Acta Histochemica**, 120(3), 159–167. 2018.

- SUTER, T.M.; EWER, M.S. Cancer drugs and the heart: importance management. **Eur Heart J.** 34(15):1102-11. 2013.
- TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **J. Immunol. Methods.** 93:157-65. 1986.
- TAHIR, A.E.; SATTI, G.M.H.; SAMI, A. A novel antiplasmodial activity of pristimerin isolated from *Maytenus senegalensis* (Lam.) **J. Saudi Chem. Soc.**, v.5, p.157-163. 2001.
- TAKEUCHI, H., BABA, M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **J Virol Methods** 33, 61-71. 1991.
- VIALARD, C.; LARRIVÉE, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. **Angiogenesis.** Nov;20(4):409-426. 2017.
- VISTICA, D.T.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, M.R. Tetrazolium-based assays for cellular viability, a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Res.** 51, 2515-252. 1991.
- VON MOLTKE, L.L.; GREENBLATT, D.J.; SCHMIDER, J.; WRIGHT, C.E.; HARMATZ, J.S.; SHADER, R.I. In vitro approaches to predicting drug interactions in vivo. **Biochemical pharmacology.** 55(2):113-22. 1998.
- YEH, E.T.; BICKFORD, C.L. Cardiovascular complication of cancer therapy. **J Am Coll Cardiol.** 53(24):2231-47. 2009.
- ZHANG, B.; ZHOU, H.S.; CHENG, Q.; LEI, L.; HU, B. Low-frequency ultrasound induces apoptosis of rat aortic smooth muscle cells (A7r5) via the intrinsic apoptotic pathway. **Genet Mol Res.** Apr 17;13(2):3143-53. April.17.10. 2014.

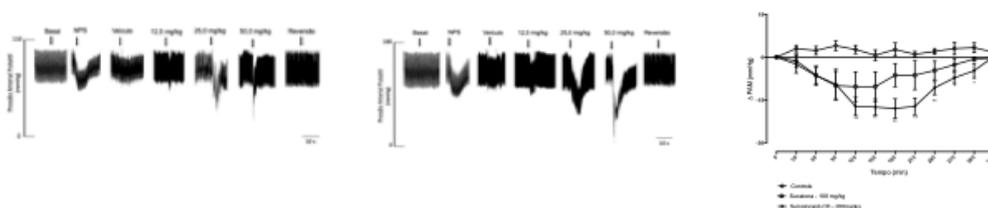
CAPÍTULO 03:**EFEITO DA 6-METIL-5-HEPTEN-2-ONA (SULCATONA) LIVRE E COMPLEXADA SOBRE OS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Márcio Edivandro Pereira dos Santos^{1,4,6}, Marcelo Bezerra Mendes^{5,6}, Ivan dos Santos Silva², Sidney Gonçalo de Lima², Edson Cavalcanti da Silva Filho³, Débora Rejane Fior Chadi⁴, Aldeídia Pereira de Oliveira^{5,6}.

- 1- Departamento de Informação, Ambiente, Saúde e Produção Alimentícia, Instituto Federal do Piauí, Teresina, Brasil.
- 2- Laboratório de Geoquímica Orgânica, Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.
- 3- Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados, Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.
- 4- Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- 5- Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais, Centro de Ciências em Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.
- 6- Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil. E-mail: aldeidia@gmail.com

GRÁFICO RESUMO:

SULCATONA

EFEITO HIPOTENSIVO E ANTI-HIPERTENSIVO EM RATOS WKY E SHR

EFEITO DA 6-METIL-5-HEPTEN-2-ONA (SULCATONA) LIVRE E COMPLEXADA SOBRE OS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

RESUMO

A 6-metil-5hepten-2-ona (Sulcatona) é encontrada em frutas cítricas, está presente no óleo de citronela e é um ingrediente aromatizante pertencente à classe dos Hemiterpenos, os quais são terpenos contendo apenas uma unidade de isopreno (C5-terpenos), tendo como nome IUPAC 6-metilhept-5-en-2-Ona e possui peso molecular de 126,199 g/mol. Assim o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito anti-hipertensivo da Sulcatona livre (via venosa) e complexada (via oral) em ratos Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR). Os ratos foram anestesiados para implantação de cateteres de polietileno (PE-10 e PE-90) na artéria e veia femorais esquerdas. A pressão arterial e a frequência cardíaca foram medidas através de um transdutor de pressão acoplado a um amplificador (PowerLab 4/35 – ADInstruments – SP/Brasil). Os resultados foram expressos como (média±e.p.m). A administração venosa de Sulcatona em todas as doses 12,5; 25 e 50 mg/Kg foi capaz de diminuir a pressão arterial média (PAM) e causar taquicardia nas doses de 12,5 e 25 mg/Kg e bradicardia na dose de 50 mg/Kg. Efeitos esses que após o bloqueio farmacológicos foi mais acentuado após bloqueio com atropina que atenuou a queda da PAM e praticamente aboliu a FC de animais WKY e SHR em todas as doses. A Sulcatona na dose de 50 mg/kg atenuou a hipotensão e reverteu a bradicardia após bloqueio com ioimbina. E após o bloqueio com L-Name os animais WKY tiveram uma redução na PAM nas doses de 25 e 50 mg/kg e a bradicardia foi revertida na maior dose. Por via oral, a Sulcatona na forma livre não foi capaz de diminuir a pressão arterial de animais SHR, porém o complexo Sulcatona/ β -CD (Sulcatona/ β -CD) na dose de 200 mg/kg reduziu a pressão arterial a partir de 2 horas após administração oral. Sugerindo dessa forma que a Sulcatona está agindo sobre os receptores muscarínicos no coração, em receptores α_2 -adrenérgicos bem como uma ação dependente de óxido nítrico. O complexo Sulcatona/ β -CD como averiguado tem efeito anti-hipertensivo em animais SHR na dose de 200 mg/kg quando administrado de forma oral com um tempo de duas e meia de duração.

Palavras Chaves: Sulcatona, anti-hipertensivo, bradicardia, SHR.

1.0- INTRODUÇÃO

A hipertensão é o fator de risco mais importante para doenças cardiovasculares em todo o mundo. A hipertensão prolongada acarreta disfunção endotelial vascular, que por sua vez facilita o progresso da aterosclerose, levando finalmente à doença cardiovascular (VANHOUTTE, 1997; LAWERS; HOORN; RODGERS, 2008). Portanto, é de grande importância descobrir os mecanismos responsáveis e encontrar tratamentos eficazes para o tratamento da hipertensão (GOTO; OHTSUBO; KITAZONO, 2018).

A busca por fármacos novos, seguros, eficientes, com menores efeitos colaterais e com custos reduzidos para o tratamento das mais diversas patologias têm motivado a pesquisa científica na área da química medicinal. É importante mencionar que a utilização de produtos naturais ativos como modelo ou molécula-protótipo para a síntese de análogos mais potentes e seletivos, têm contribuído significativamente para a obtenção de novos agentes terapêuticos, que podem, muitas vezes, ser obtidos mais facilmente e a custos menores. Inúmeros fármacos disponíveis atualmente no mercado farmacêutico foram obtidos sinteticamente baseados em estruturas ativas de fontes naturais (CECHINEL-FILHO; YUNES, 2001).

A síntese total de análogos também representa um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos. Atualmente, o percentual de substâncias sintéticas utilizadas como fármacos atinge cerca de 75% do total dos medicamentos utilizados no mundo. A síntese orgânica, que engloba também a síntese de fármacos, representa a vertente da química orgânica capaz de construir moléculas, independente do seu grau de complexidade estrutural, explorando conceitos fundamentais que regem o comportamento químico dos diferentes grupamentos funcionais (BARREIRO, 1991).

O processo de geração de novas terapêuticas é um procedimento de longa duração que visa não apenas descobrir novas drogas para tratar uma doença específica, mas também garantir sua segurança e eficácia em condições da vida real. Trazer um novo medicamento da descoberta para o mercado geralmente leva mais de 10 anos e requer centenas de milhões de dólares. O processo consiste em dois estágios, a descoberta de medicamentos e o desenvolvimento de medicamentos (NYS; FILLET, 2018).

Dentre esses produtos sintéticos de origem natural destaca-se a Sulcatona ou 6-metil-5-hepten-2-ona pertencente à classe dos terpenóides (LIU et al., 2018), uma molécula biológica com grande potencial farmacológico. A Sulcatona é encontrada em frutas cítricas, está presente no óleo de citronela e é um ingrediente aromatizante pertence à classe dos Hemiterpenos, os quais são terpenos contendo apenas uma unidade de isopreno (C5-terpenos), tendo como nome IUPAC 6-metil-5-hepten-2-Ona e peso molecular de 126,199 g/mol.

Dessa forma com as várias atividades biológicas demonstrada pelos terpenos como anticâncer (TRINDADE et al., 2019), analgésica e anti-inflamatória (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS, 2013), anti-hipertensiva (MAIONE et al., 2013) vasorrelaxante (SILVA-FILHO et al., 2012), antibacteriana, antifúngica, antiviral (KANDANUR et al., 2019) e na literatura não consta nenhum efeito da Sulcatona no sistema cardiovascular, o objetivo do trabalho foi avaliar a ação da Sulcatona livre (por via venosa) e complexada (por via oral) sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).

2.0- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Animais

Nesse estudo foram utilizados ratos machos adultos, com 20 semanas de idade, da linhagem SHR e WKY (*Rattus norvegicus*), pesando cerca de 250 - 350 g, oriundos do biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Nesta idade, os animais SHR já possuem hipertensão bem estabelecida (DORNAS; SILVA, 2011), mesma idade na qual foi utilizado o controle WKY. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, mantidos em sala com temperatura e umidade controladas e com água e ração *ad libitum*, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Os ratos foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e cetamina (100 mg/kg) e eutanasiados por decapitação. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos para experimentação animal, segundo o protocolo experimental (275/2016 e 335/2018) da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí e do Instituto de Biociências/USP, respectivamente.

2.2- Drogas e Reagentes

As drogas utilizadas nesse estudo foram N^ω-nitro-l-arginina metil ester hidróclorido (TOCRIS, Ellisville, MO, USA), 6-metil-5hepten-2-ona (Sulcatona), prazosin, ioimbina, atropina, hexametônio (todos da Sigma, St. Louis, MO, USA), heparina (Cristalia, São Paulo, Brazil) e Tween 80 (Fisher scientific, EUA). Na preparação das soluções estoques a Sulcatona (6-metil-5-hepten-2-ona) e o complexo Sulcatona/ β -CD foram diluídos em Tween 80 (0,5% v/v), para todos os experimentos *in vivo*. Todas as soluções estoques foram mantidas à -20°C.

2.3- Aferição dos parâmetros cardiovasculares após administração venosa e oral de Sulcatona em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR)

Foram avaliados os efeitos da Sulcatona nas doses 12,5; 25 e 50 mg/Kg administradas endovenosamente. Para isto os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/Kg, i. p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.), e cateteres de polietileno (PE), foram implantados na aorta abdominal e na veia cava inferior, via artéria e veia femoral esquerda, respectivamente. Após a inserção e fixação, os cateteres foram exteriorizados na região cervical posterior do animal (*scapulae*) e foram mantidos com solução salina heparinizada (100 U/mL) imediatamente após a colocação e antes do registro do sinal da PAM (OLIVEIRA et al., 1996). A PAM e FC foram medidas 24h após o ato cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado acoplado a um amplificador (Quad Bridge Amp – ADInstruments - SP/Brasil) e conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital (PowerLab 4/35 – ADInstruments – SP/Brasil) e com o programa LabChart (PowerLab 4/35 – ADInstruments – SP/Brasil).

Para obtenção de uma curva dose-resposta controle, as medições foram realizadas conforme a descrição de Lahlou, (2002). Os animais foram mantidos em aclimação por um período de, no mínimo, 60 min para estabilização dos parâmetros cardiovasculares (PAM e FC). Em seguida, administrou-se nitroprussiato de sódio (10 µg/kg, i.v.) para verificar a correta da implantação do cateter. Após 30 min, doses crescentes da Sulcatona foram administradas de forma randomizada com intervalos de tempo suficiente (± 30 min) para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores da linha de base. Como controle positivo foi utilizado um grupo de animais normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) que receberam nitroprussiato de sódio (10 µg/kg i.v.). Os valores de PAM e FC foram computados antes (valores da linha de base) e imediatamente após a administração das substâncias e suas variações foram expressas como diferença da pressão arterial média/frequência cardíaca final menos a inicial: $\Delta PAM = PAM_f - PAM_i$ / $\Delta FC = FC_f - FC_i$, onde PAM_f: pressão arterial média final, PAM_i: pressão arterial média inicial, FC_f: frequência cardíaca final, FC_i: frequência cardíaca inicial.

Com o intuito de verificar o efeito da administração oral do complexo Sulcatona/ β -CD e apenas Sulcatona o cateter foi implantado apenas na artéria femoral esquerda. Os animais foram divididos em três grupos (SHR controle salina, SHR + Sulcatona/ β -CD – 200 mg/Kg e SHR + Sulcatona- 100 mg/Kg) com cinco animais cada. Após 30 min de estabilização dos parâmetros cardiovasculares, o primeiro grupo recebeu salina mais tween 80 (v.o) e o segundo recebeu uma dose de 200 mg/kg (v.o.) do Sulcatona/ β -CD ou apenas Sulcatona na dose de 100 mg/kg. Os valores da PAM e FC foram registrados nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 e 330 min após administração. Os valores de PAM e FC foram computados antes (valores de linha de base) e após a administração das substâncias e suas variações foram expressas em diferença de pressão ou frequência.

2.4- Efeito da Sulcatona sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR)

Após estabilização dos parâmetros hemodinâmicos utilizou-se NPS 10 μ g/kg (i.v.), um doador de óxido nítrico (CASTRO et al., 2011), como controle positivo. Após o retorno ao seu estado basal (\approx 30 min) os animais foram tratados com: prazosina (1,0 mg/kg, i.v.), antagonista dos receptores alfa-1 adrenérgicos (ALLARD et al., 1995; MARSHALL et al., 2019), atropina (2,0 mg/kg, i.v.), um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (ASSAIDI et al., 2014), ioimbina (2,0 mg/kg, i.v.) antagonista dos receptores alfa-2 adrenérgicos (ALLARD et al., 1995), propranolol (1,5 mg/kg, i.v) um antagonista dos receptores beta adrenérgicos (KENTON, BOON, CAIN, 2008), hexametônio (20 mg/kg, i.v.), um bloqueador ganglionar (BORODINOVA et al., 2013) ou L-NAME (20 mg/kg, i.v.), um inibidor competitivo da sintase de óxido nítrico (NOS) (TRAYSTMAN et al., 1995; ASSAIDI et al., 2014), e após 30 min do bloqueio uma curva dose-resposta para Sulcatona (12,5; 25 e 50 mg/kg, i.v.).

2.5- Preparo e Caracterização do processo de inclusão Sulcatona/ β -Ciclodextrina (Sulcatona/ β -CD)

O preparo e caracterização do processo de inclusão Sulcatona/ β -CD foi realizado no Laboratório de Geoquímica Orgânica e cedido pelo professor Dr. Sidney Gonçalo de Lima do departamento de Química da Universidade Federal do Piauí (dados estes foram submetidos a Revista: International Journal of Pharmaceutics, Intitulado: Theoretical and Experimental Study of Inclusion Complex of β -Cyclodextrin and sulcatone: Cardiovascular activity evaluation).

Para a preparação do complexo, foram utilizados; Sulcatona (SU), 98% (St. Louis, MO, EUA), peso molecular = 126 g mol⁻¹ e β -ciclodextrina (β -CD), Roquette, marca KLEPTOSE®, massa molecular = 1134,98 g mol⁻¹. As soluções foram produzidas com água ultrapura (18,2 M Ω) obtida usando um sistema de purificação Master All (GEHAKA).

No processo de preparo do complexo foi utilizado a técnica de spray-dry para caracterização e evidências do complexo de inclusão Sulcatona/ β -CD e foram fornecidas pelas técnicas de IR (Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier), DRX (Difração de raio-x), TGA (Análise termogravimétrica), DSC (Calorimetria exploratória diferencial) e RMN (Espectroscopia de ressonância magnética nuclear).

O diagrama de solubilidade da Sulcatona, em β -CD, apresentou perfil linear e ascendente (AL), sugerindo uma complexação da Sulcatona em β -CD com estequiometria de 1:1.

A eficiência de encapsulação foi determinada em 37% (3,7 mg de Sulcatona para cada 100mg de β -CD). A partir de cálculos teóricos, foi possível avaliar a estabilidade e determinar o modo de orientação do ligante (Sulcatona) na cavidade da ciclodextrina.

3.0- Análise Estatística

Resultados foram expressos como media \pm erro padrão das medias de quatro a nove animais por grupo. A estatística foi realizada utilizando o Test-t *Student* não pareado ou Anova one-way seguida do pos-test de Dunnet. Nas análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantivos. Todos os procedimentos foram analisados utilizando o programa Graph Pad Prism 6.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

4.0- RESULTADOS

4.1- Efeito Anti-hipertensivo da Sulcatona (i.v) sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos WKY e SHR

A administração venosa de Sulcatona (12,5; 25 e 50 mg/kg) reduziu a pressão arterial de maneira dose-dependente em modelos de ratos não-anestesiados utilizados. A maior dose utilizada (50 mg/kg) causou bradicardia, enquanto as outras duas doses causaram taquicardia (Figura 03). As figuras 20 e 21 mostram os registros originais dos parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) dos animais WKY e SHR.

Com relação a dose de 12,5 mg/kg, verificou-se que não ocorreu diferença significativa na hipotensão do animal WKY ($-18,55 \pm 1,62$ mmHg) em relação ao SHR ($-14,72 \pm 0,89$ mmHg). Na dose de 25 mg/kg a hipotensão foi significativamente aumentada comparando os dois modelos de animais: SHR ($-20,44 \pm 1,09$ mmHg) e KWY ($-29,68 \pm 1,18$ mmHg). Em relação a frequência cardíaca ambas as doses causaram taquicardia sem diferença significativa entre elas.

Na maior dose utilizada (50 mg/kg) a hipotensão foi aumentada tendo diferença significativa entre animais SHR ($-39,59 \pm 2,31$ mmHg) em relação ao KWY ($-52,45 \pm 1,18$ mmHg) e de modo diferente das outras doses ocorreu bradicardia acentuada (WKY: $-52,45 \pm 1,18$; SHR: $-39,59 \pm 2,32$ bpm) não havendo diferença significativa nos modelos de animais utilizados.

FIGURA 20: Registro original representativo ilustrando o efeito de doses crescentes de Sulcatona (12,5; 25,0 e 50,0 mg/kg, i.v.) sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos WKY não anestesiados. As setas indicam o momento exato da administração. NPS: Nitroprussiato de sódio.

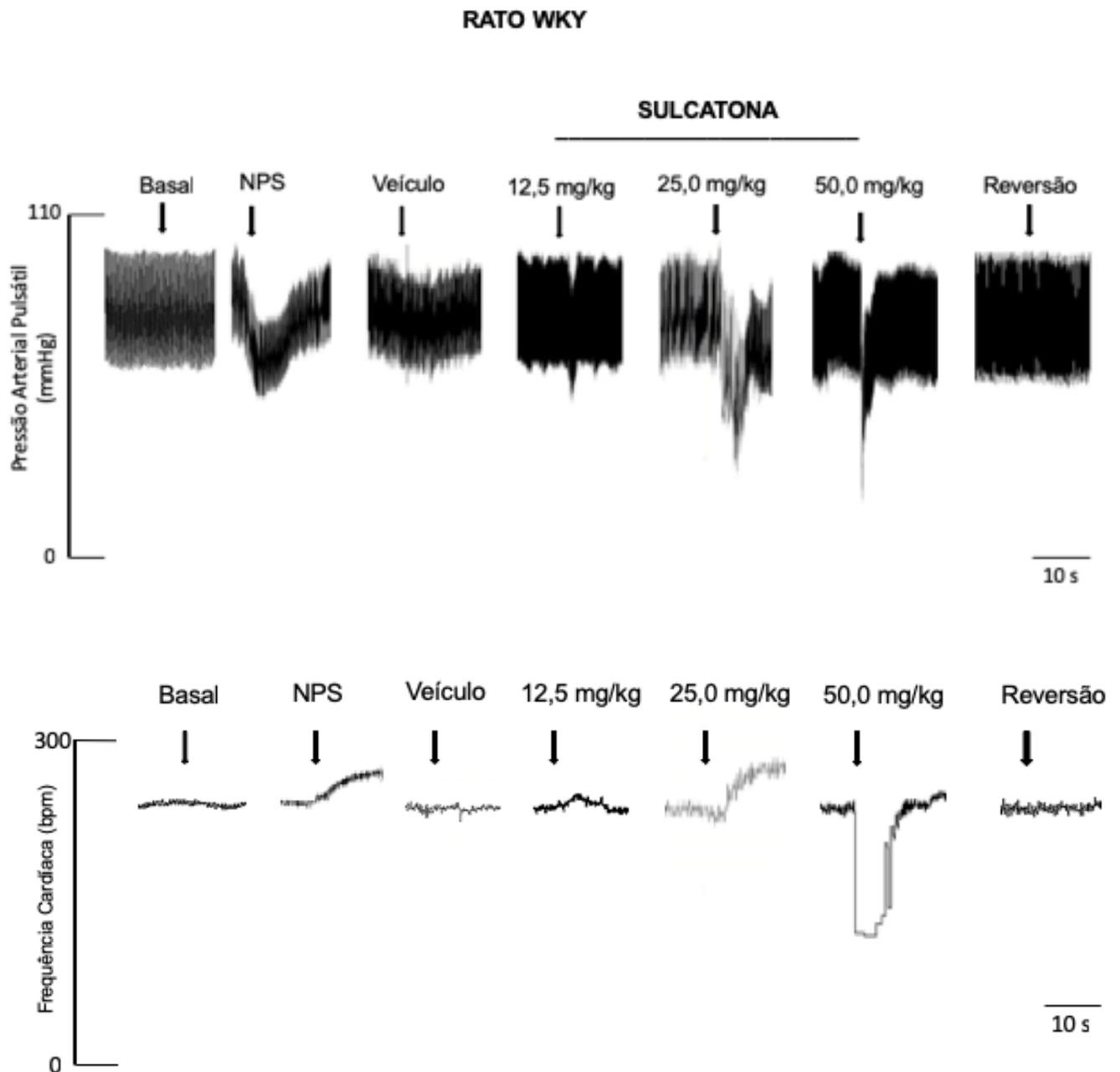


FIGURA 21: Registro original representativo ilustrando o efeito de doses crescentes de Sulcatona (12,5; 25,0 e 50,0 mg/kg, i.v.) sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos SHR não anestesiados. As setas indicam o momento exato da administração. NPS: Nitroprussiato de sódio.

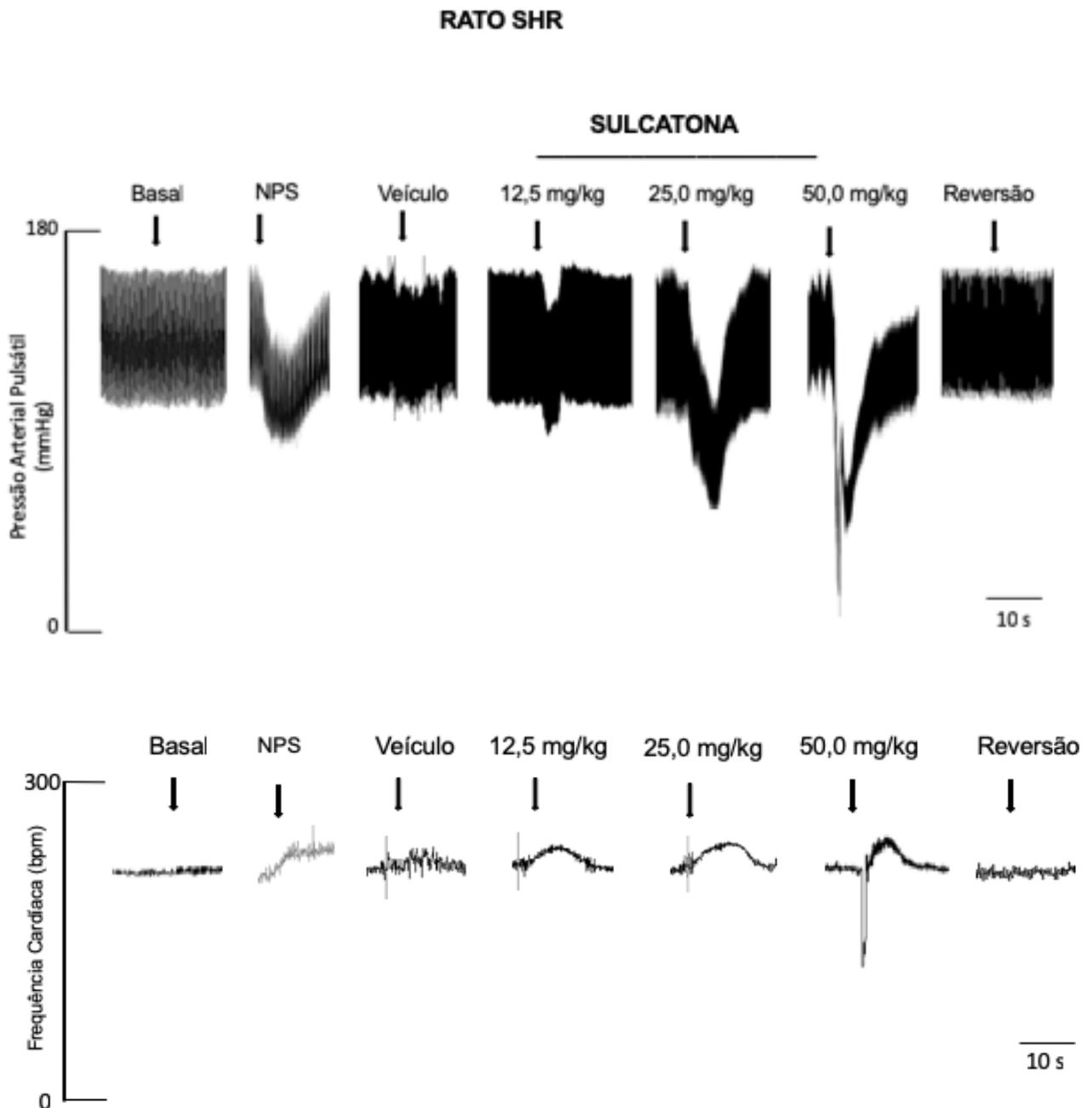
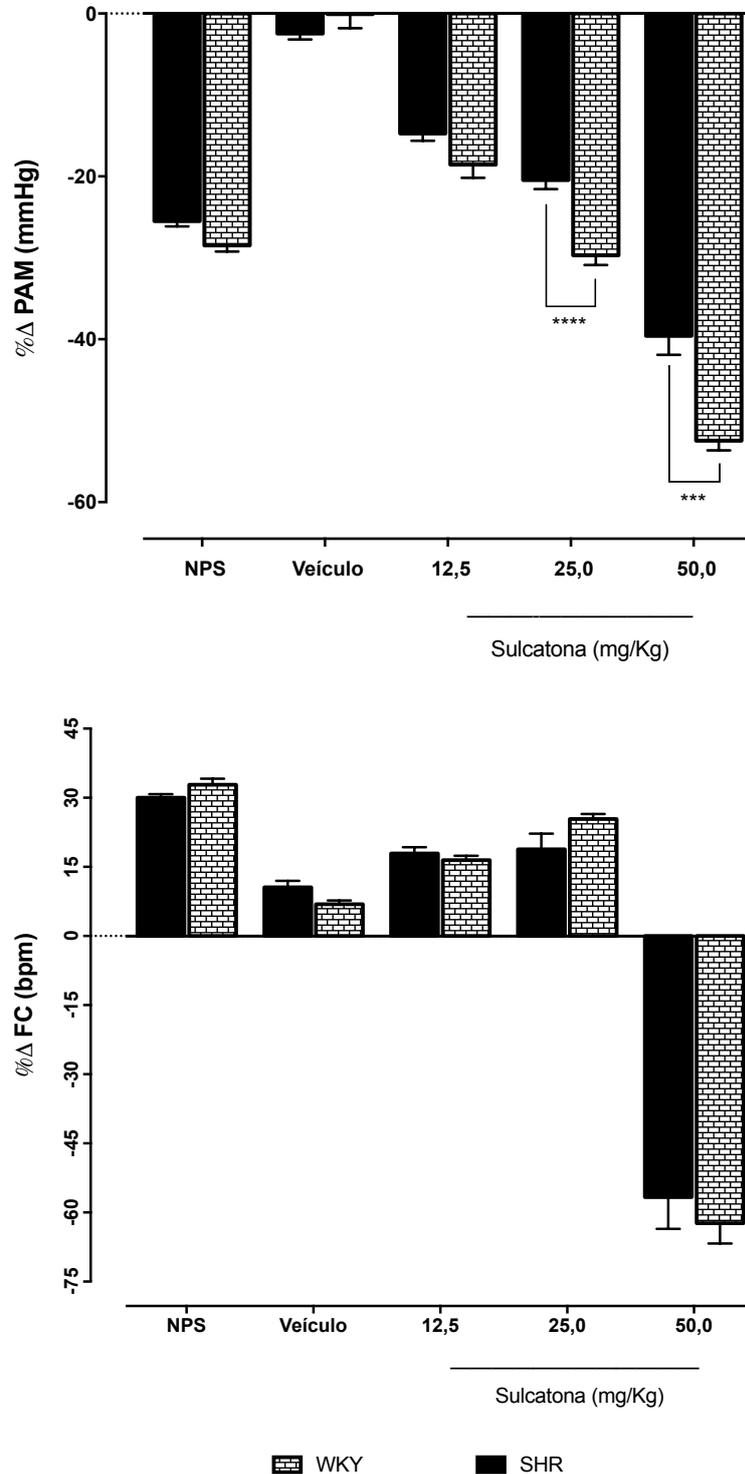


FIGURA 22: Efeito comparativo da Sulcatona sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos WKY e SHR. Valores expressos como média \pm e.p.m. (n= 4 -9), Teste-t de Student não pareado; ***p<0,001, ****p<0,0001. NPS: Nitroprussiato de sódio.



4.2- Efeito Anti-hipertensivo da Sulcatona antes e após o bloqueio do receptor α_1 adrenérgicos em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR)

A Administração endovenosa de Sulcatona tanto nos animais WKY quanto SHR, após o bloqueio do receptor α_1 adrenérgicos com prazosin (1 mg/kg) acarretou um aumento da hipotensão nas menores doses (12,5 e 25 mg/kg) (WKY: $-18,53 \pm 1,62$; $-29,68 \pm 1,18$ mmHg e SHR: $-14,72 \pm 0,89$; $-20,45 \pm 1,09$ mmHg) porém não houve diferença significativa na maior dose utilizada (50 mg/kg; WKY: $-52,45 \pm 1,18$ mmHg e SHR: $-39,59 \pm 2,32$ mmHg), o mesmo ocorreu com a frequência cardíaca, na qual ocorreu uma reversão da taquicardia levando há uma bradicardia nas menores doses (WKY: $16,45 \pm 0,96$; $26,32 \pm 1,26$ bpm e SHR: $17,93 \pm 1,34$; $18,82 \pm 3,41$ bpm), sem alteração significativa com a maior dose (WKY: $-62,31 \pm 4,42$ bpm e SHR: $-56,65 \pm 6,88$ bpm). Dados esses apresentados nas Figuras 23 e 24.

FIGURA 23: Efeito hipotensor da Sulcatona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos WKY após bloqueio com prazosin (1 mg/kg). Valores expressos como média \pm e.p.m. (n= 5), Teste-*t* de *Student* não pareado; * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$. NPS: Nitroprussiato de sódio.

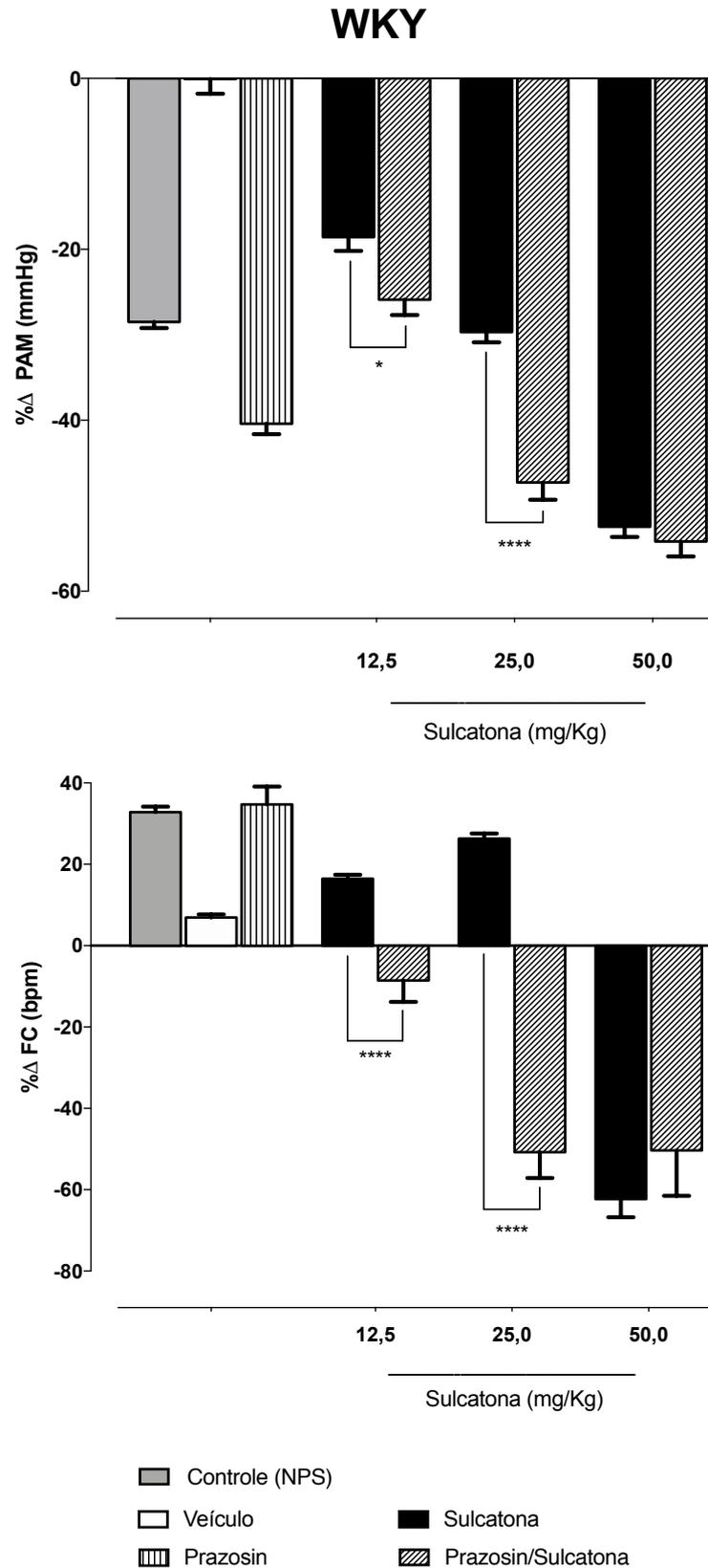
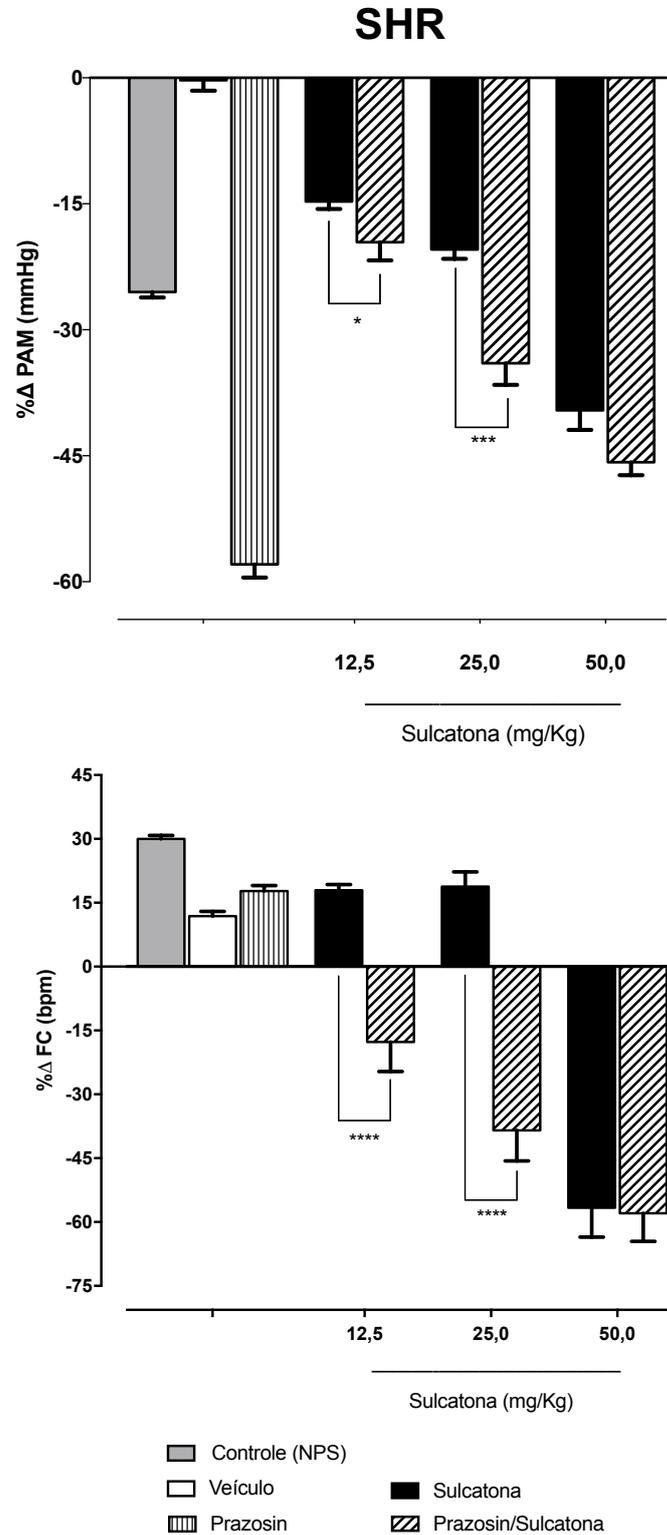


FIGURA 24: Efeito anti-hipertensivo da Sulcatona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos SHR após bloqueio com prazosin (1 mg/kg). Valores expressos como média \pm SEM (n= 4), Teste-*t* de *Student* não pareado; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. NPS: Nitroprussiato de sódio.



4.3- Efeito Anti-hipertensivo da Sulcatona antes e após o bloqueio do receptor α_2 adrenérgicos em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR)

A administração de Sulcatona na dose de 12,5 e 25 mg/kg após o bloqueio farmacológico com ioimbina (um bloqueador dos receptores α_2 adrenérgicos) na dose de 2 mg/kg acentuou a hipotensão, porém não alterou a frequência cardíaca quando comparada apenas com a administração de Sulcatona na mesma dose tanto em modelos WKY (PAM: $-32,77 \pm 2,49$; $-39,95 \pm 2,93$ mmHg; FC: $14,26 \pm 1,57$; $22,07 \pm 1,74$ bpm) como em SHR (PAM: $-20,97 \pm 1,01$; $-37,88 \pm 6,98$ mmHg; FC: $13,56 \pm 2,15$; $15,07 \pm 2,27$ bpm).

No entanto, a dose de 50 mg/kg não alterou a hipotensão em ratos WKY ($-56,58 \pm 2,28$ mmHg) e foi atenuada em ratos SHR ($-29,69 \pm 1,88$ mmHg), porém a bradicardia foi atenuada significativamente após o bloqueio farmacológico com ioimbina em ratos WKY ($-17,28 \pm 13,51$ bpm) e revertida em animais SHR ($9,86 \pm 4,35$ bpm). Resultados esses mostrados nas Figuras 25 e 26.

FIGURA 25: Efeito hipotensor da Sulcatona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos WKY após bloqueio com ioimbina (2 mg/kg). Valores expressos como média \pm SEM (n= 5), Teste *t* de *Student* não pareado; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. NPS: Nitroprussiato de sódio.

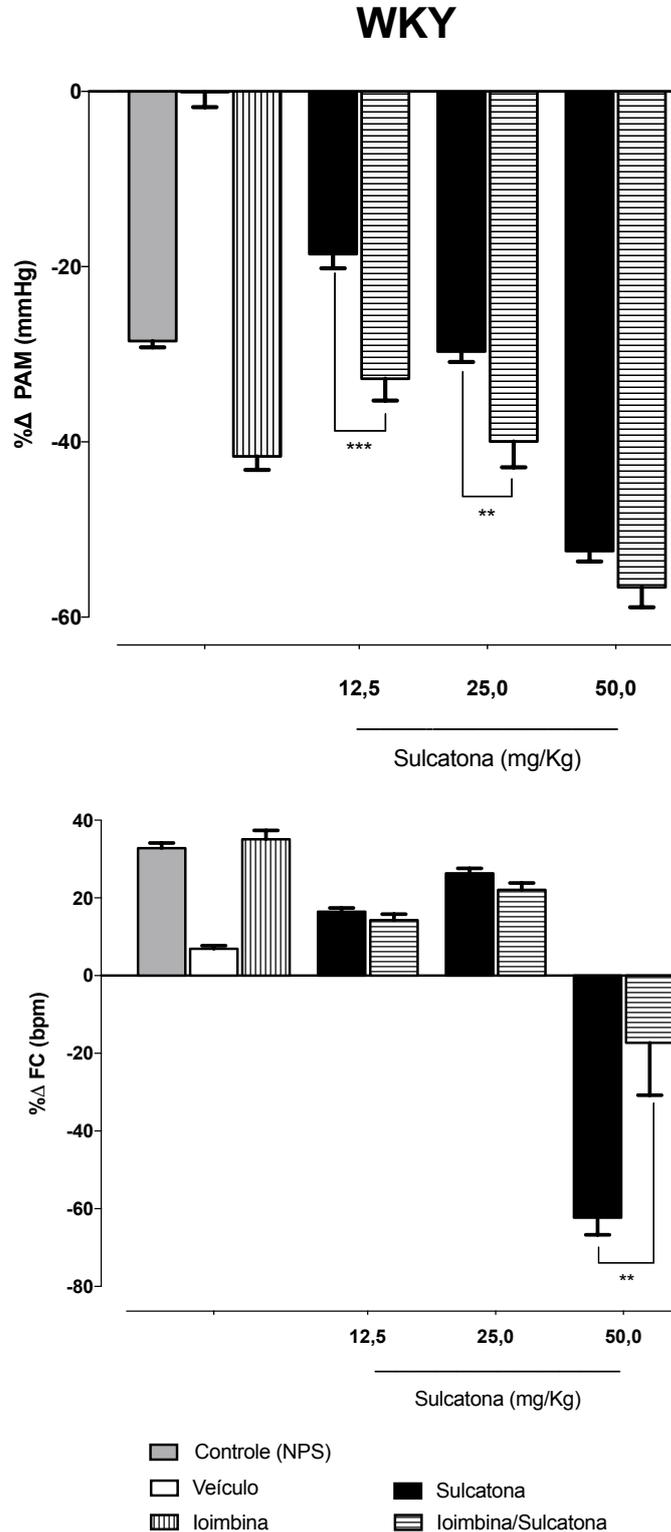
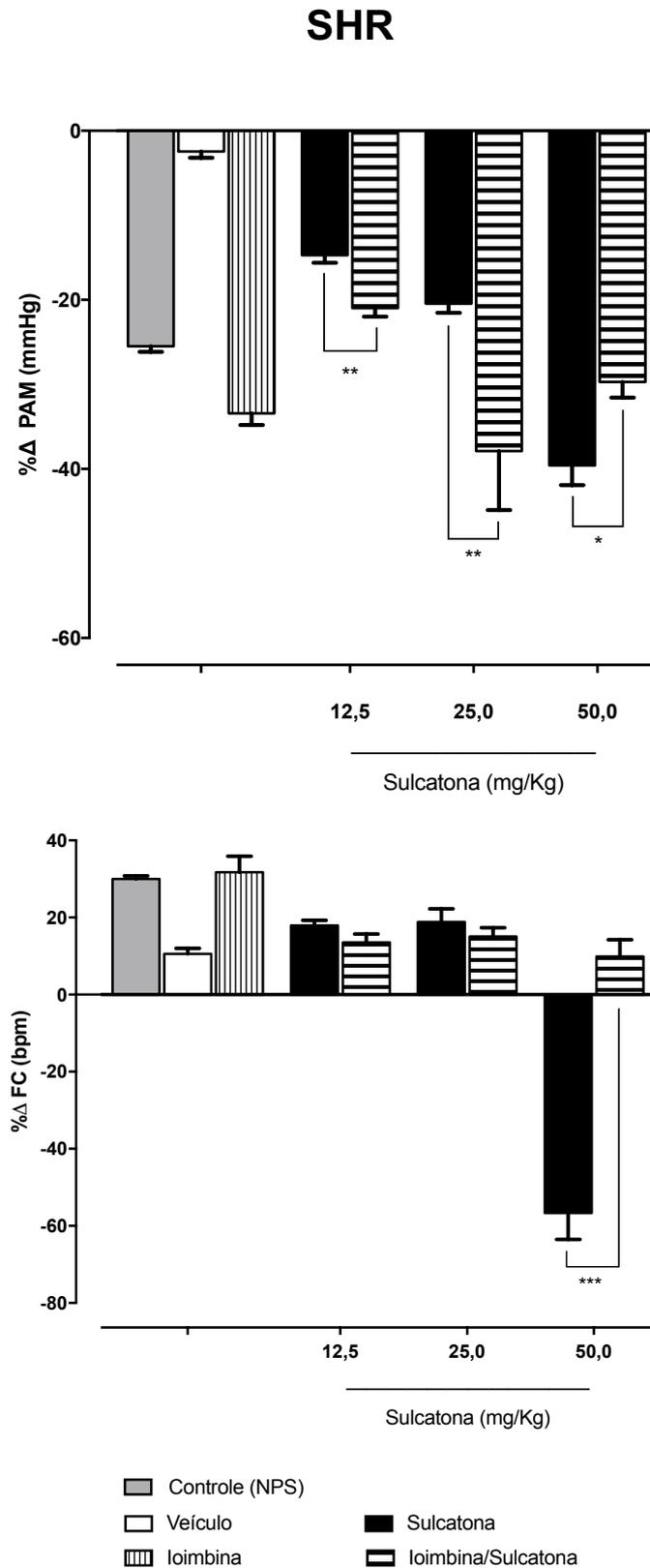


FIGURA 26: Efeito anti-hipertensivo da Sulcatona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos SHR após bloqueio com ioimbina (2 mg/kg). Valores expressos como média \pm e.p.m. (n= 4), Teste-t de *Student* não pareado; *p<0,05; **p<0,01 ***p<0,001. NPS: Nitroprussiato de sódio.



4.4- Efeito Anti-hipertensivo da Sulcatona antes e após o bloqueio dos receptores β -adrenérgicos em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR)

Após a administração de Sulcatona nas três doses utilizadas (12,5; 25 e 50 mg/kg), houve um aumento da hipotensão após o bloqueio com propranolol (dose de 1,5 mg/kg) em ratos WKY ($-42,53 \pm 0,82$; $-44,07 \pm 1,10$; $-68,65 \pm 0,59$ mmHg) e SHR ($-17,96 \pm 1,66$; $-29,29 \pm 1,43$; $-58,92 \pm 1,54$ mmHg). Sendo que apenas na menor dose não ocorreu alteração da hipotensão quando comparada apenas com a administração da Sulcatona sem bloqueio farmacológico com propranolol.

Já em relação a frequência cardíaca evidenciou-se um bloqueio total em todas as doses em ambos os animais WKY ($-0,42 \pm 0,39$; $4,96 \pm 1,18$; $-0,14 \pm 0,30$ bpm) e SHR ($13,56 \pm 1,71$; $15,07 \pm 1,74$; $9,86 \pm 2,07$ bpm) após o bloqueio farmacológico dos receptores β adrenérgicos.

Os efeitos sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca podem ser visualizados na Figuras 27 e 28.

FIGURA 27: Efeito hipotensor da Sulcatona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos WKY após bloqueio com propranolol (1,5 mg/kg). Valores expressos como média \pm e.p.m. (n= 4), Teste-t de *Student* não pareado; ****p<0,0001. NPS: Nitroprussiato de sódio.

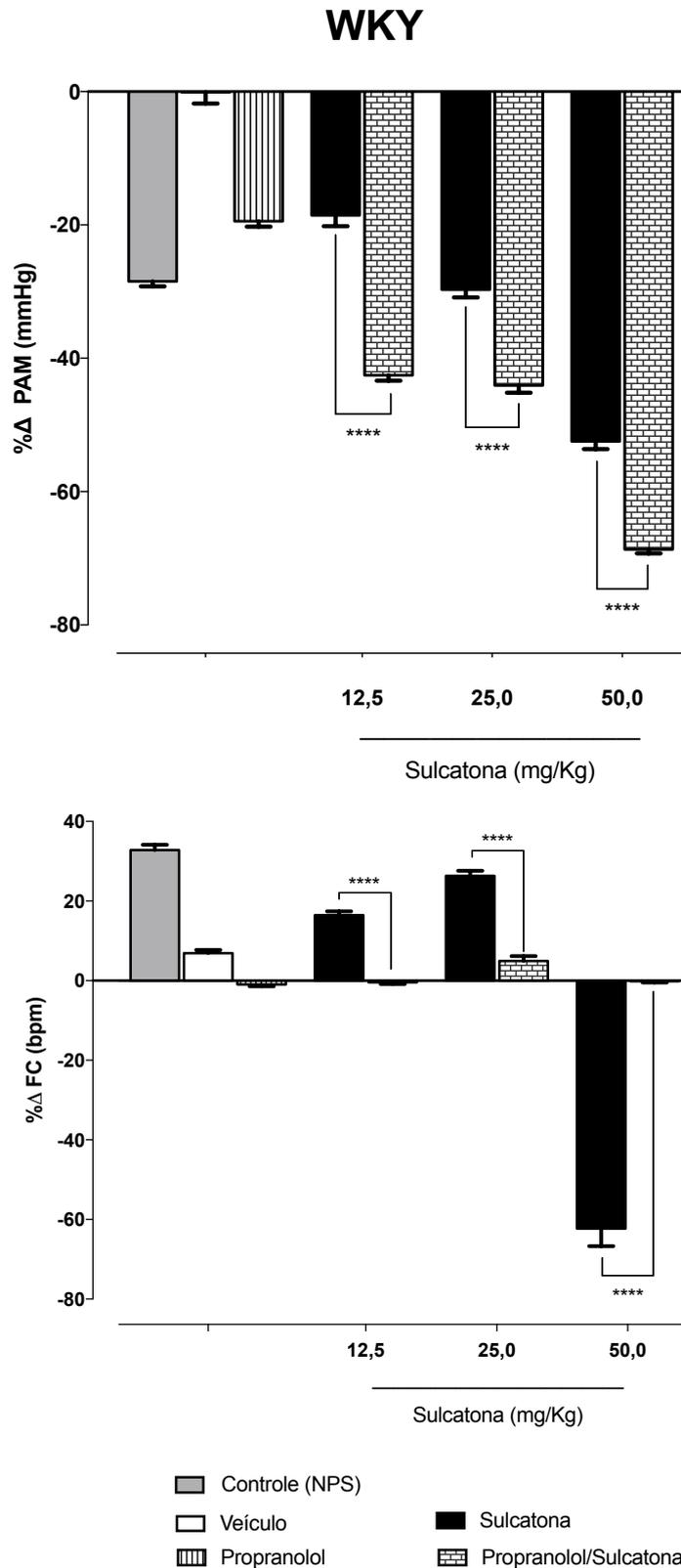
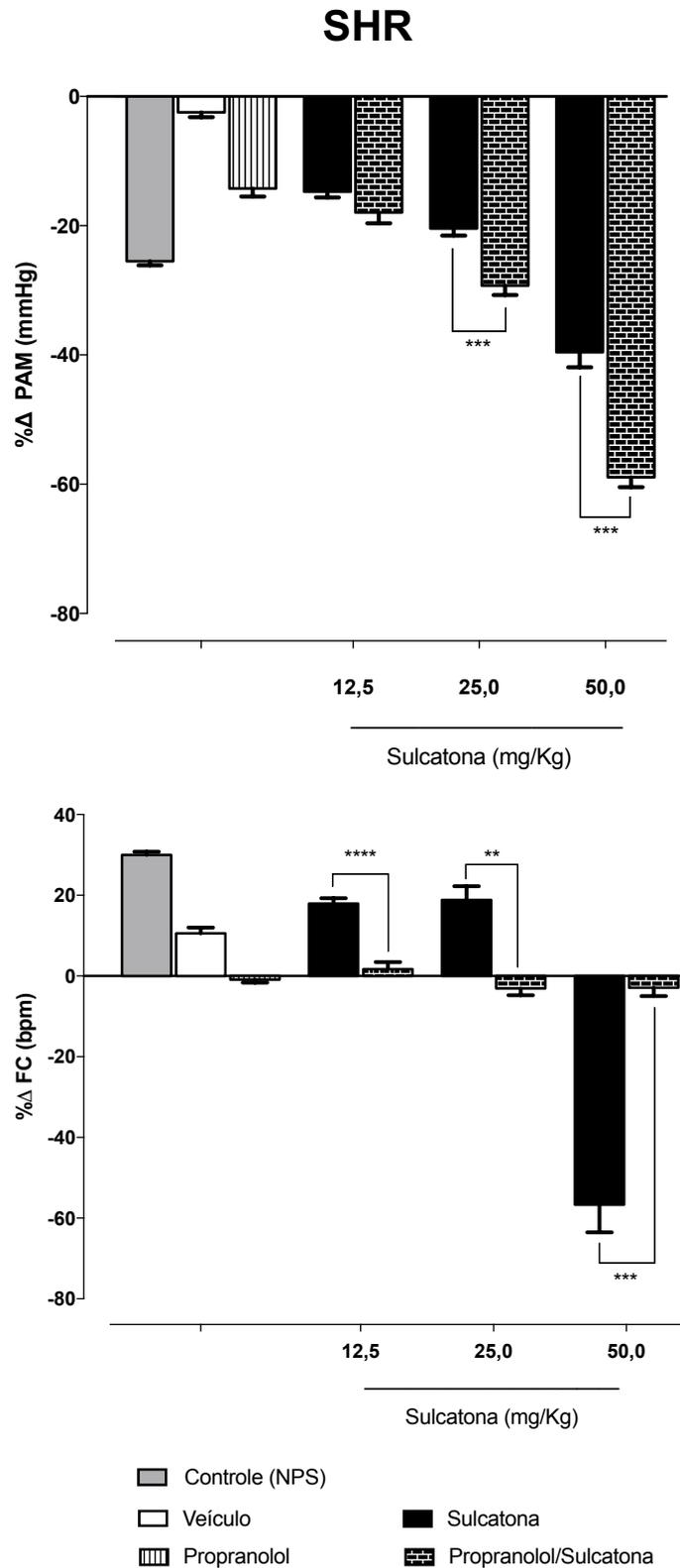


FIGURA 28: Efeito anti-hipertensivo da Sulcatona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos SHR após bloqueio com propranolol (1,5 mg/kg). Valores expressos como média \pm e.p.m. (n= 4), Teste-t de *Student* não pareado; **p<0,01, ***p<0,001. NPS: Nitroprussiato de sódio.



4.5- Efeito Anti-hipertensivo da Sulcatona antes e após o bloqueio dos receptores muscarínicos em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR)

Após o bloqueio dos receptores muscarínicos com atropina na dose de 2 mg/kg (SANTOS et al., 2015) o efeito hipotensor da Sulcatona nas três doses utilizadas foi significativamente atenuado tanto em animais WKY ($-16,32 \pm 1,90$; $-16,49 \pm 2,92$; $-21,46 \pm 5,07$ mmHg) quanto em animais SHR ($-10,42 \pm 0,14$; $-11,21 \pm 1,56$; $-17,62 \pm 1,21$ mmHg), não houve diferença significativa na menor dose, de 12,5 mg/kg, em animais WKY.

No entanto, a frequência cardíaca em todas as doses foi significativamente atenuada tanto em animais WKY ($3,28 \pm 0,64$; $5,37 \pm 1,37$; $5,38 \pm 0,44$ bpm) quanto em animais SHR ($2,01 \pm 0,61$, $9,58 \pm 0,48$; $10,69 \pm 1,45$ bpm). Efeitos esses mostrados na Figuras 29 e 30.

FIGURA 29: Efeito hipotensor da Sulcatona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos WKY após bloqueio com atropina (2 mg/kg). Valores expressos como média \pm e.p.m. (n= 5), Teste-t de *Student* não pareado; ***p<0,001; ****p<0,0001. NPS: Nitroprussiato de sódio.

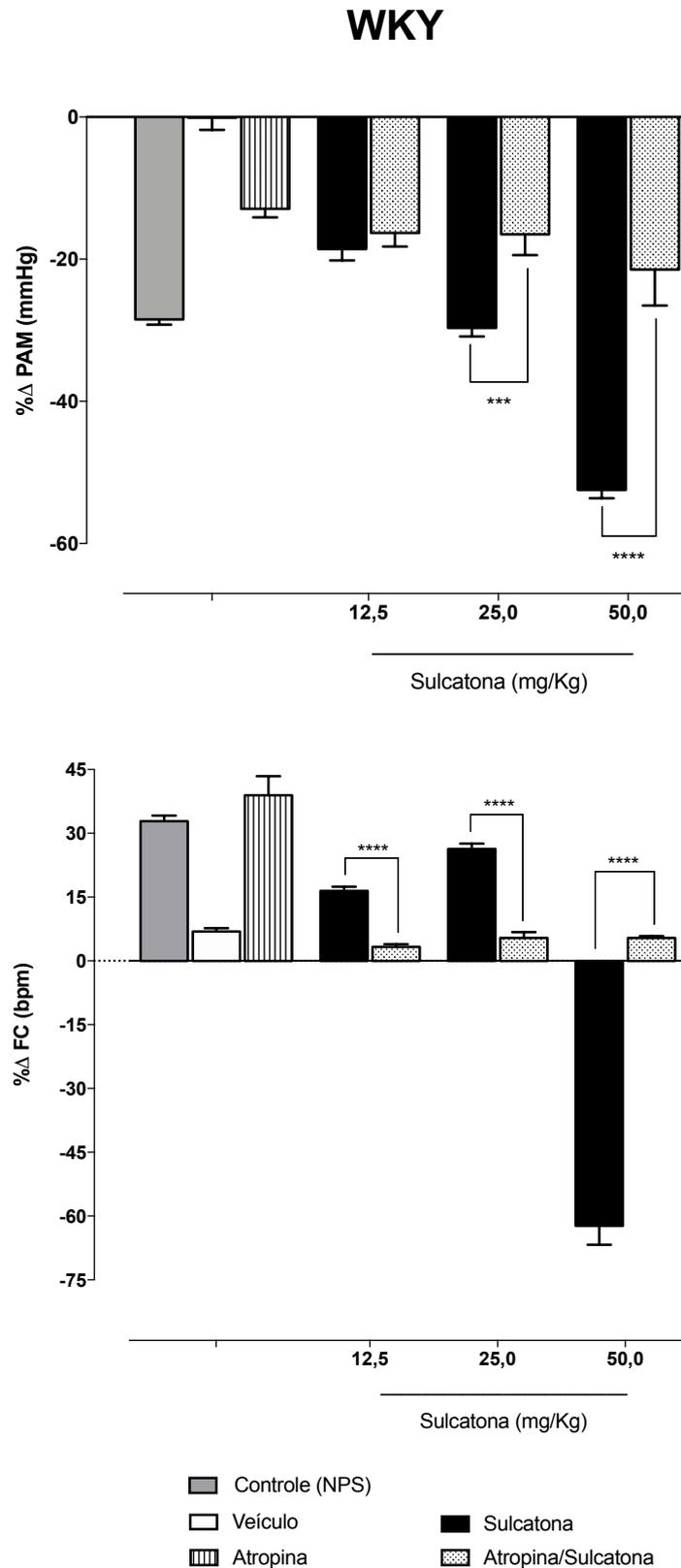
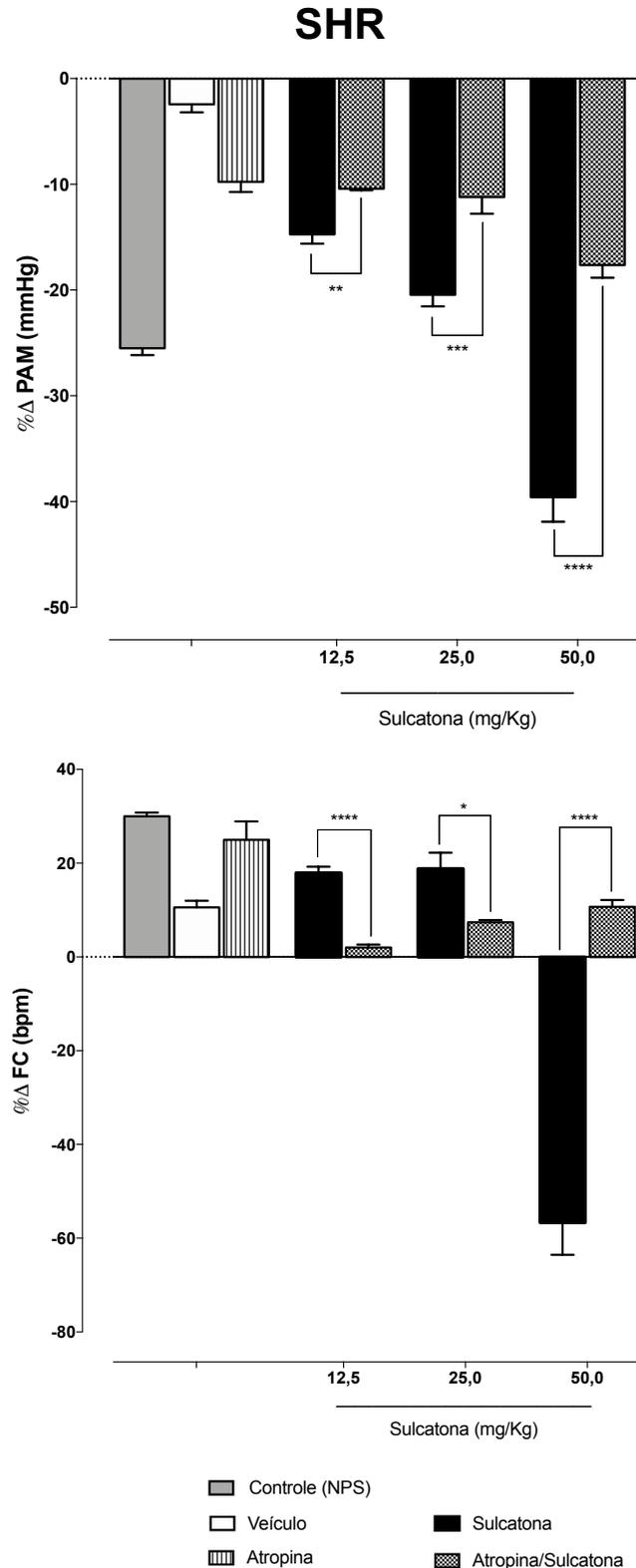


FIGURA 30: Efeito anti-hipertensivo da Sulcatona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos SHR após bloqueio com atropina (2 mg/kg). Valores expressos como média \pm e.p.m. (n= 4), Teste-t de *Student* não pareado; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. NPS: Nitroprussiato de sódio.



4.6- Efeito Anti-hipertensivo da Sulcatona antes e após o bloqueio ganglionar em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR)

O bloqueio ganglionar com hexametônio na dose de 20mg/kg atenuou a queda da pressão arterial após administração da dose de 50 mg/kg ($-34,79 \pm 4,86$ mmHg) e aumentou na dose de 25 mg/kg ($-37,98 \pm 4,49$ mmHg) em ratos WKY não tendo diferença significativa na menor dose de 12,5 mg/Kg ($-16,75 \pm 0,95$ mmHg). Já em ratos SHR todas as doses levaram a um aumento da hipotensão ($-31,26 \pm 2,46$; $-44,01 \pm 1,06$; $-54,16 \pm 1,84$ mmHg) após o bloqueio ganglionar.

Em relação a frequência cardíaca a administração venosa de Sulcatona nas doses de 12,5 e 25 mg/kg aumentou a taquicardia após o bloqueio com hexametônio ($70,50 \pm 15,78$; $55,75 \pm 10,93$ bpm); e na dose 50 mg/kg ocorreu uma reversão da bradicardia em ratos WKY ($45,51 \pm 8,71$ bpm), no entanto, em animais SHR a taquicardia causada pela Sulcatona nas menores doses e bradicardia na maior dose foram praticamente abolidas após o bloqueio ganglionar. Efeitos esses mostrados na Figuras 31 e 32.

FIGURA 31: Efeito hipotensor da Sulcatona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos WKY após bloqueio com hexametônio (20 mg/kg). Valores expressos como média \pm e.p.m. (n= 4), Teste-t de *Student* não pareado; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. NPS: Nitroprussiato de sódio.

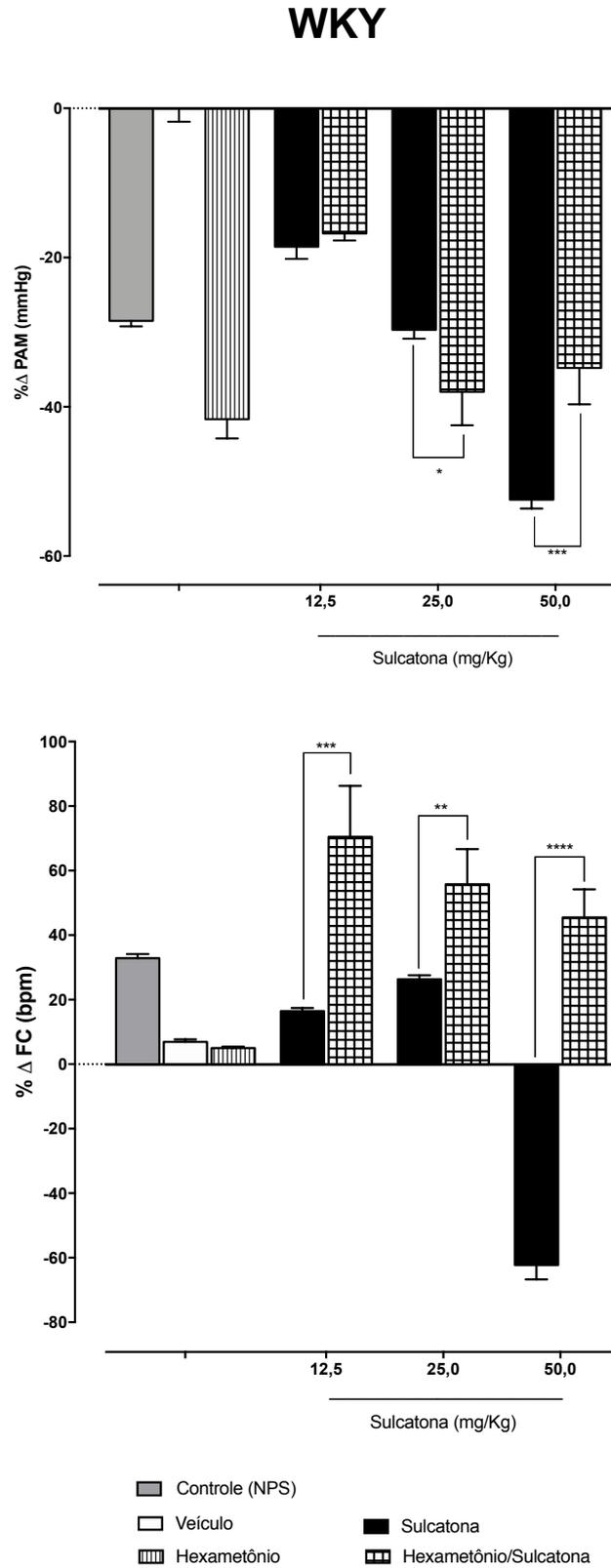
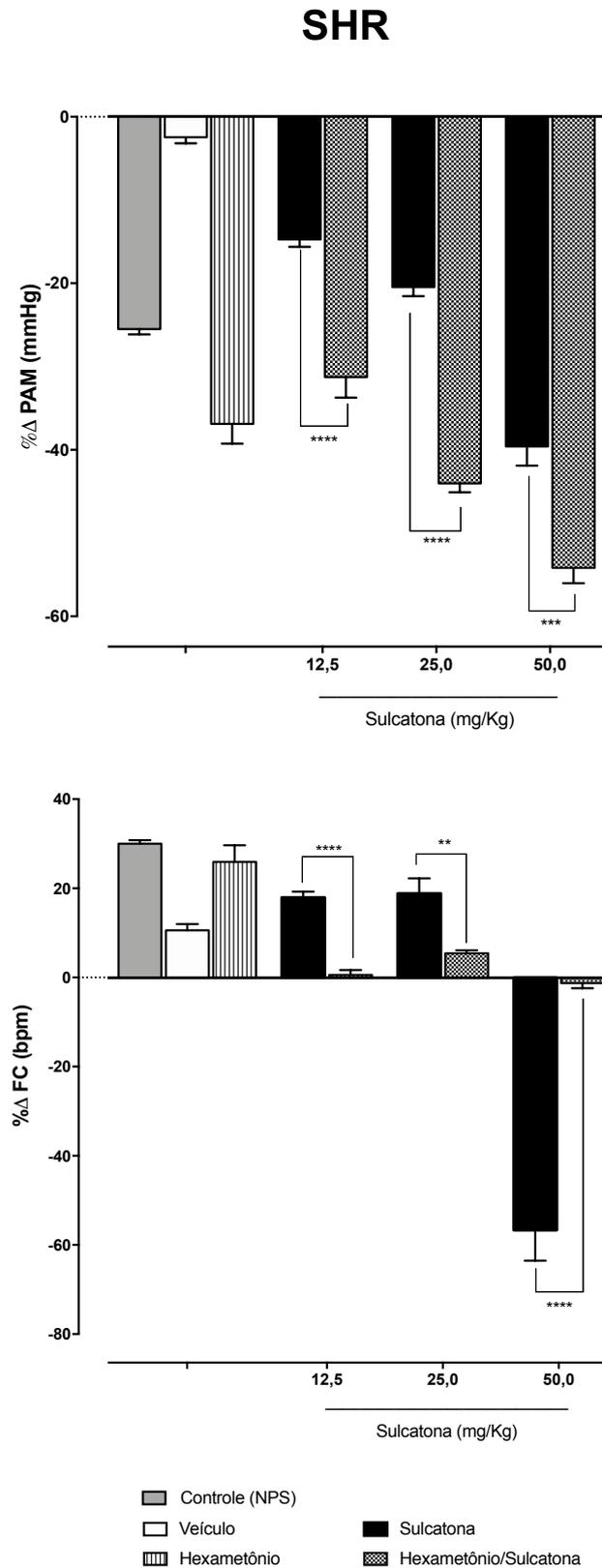


FIGURA 32: Efeito anti-hipertensivo da Sulcatona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos SHR após bloqueio com hexametônio (20 mg/kg). Valores expressos como média \pm e.p.m. (n= 5), Teste-t de *Student* não pareado; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001. NPS: Nitroprussiato de sódio.



4.7- Efeito Anti-hipertensivo da Sulcatona antes e após o bloqueio da óxido nítrico sintase (NOS) em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR)

A Sulcatona nas doses de 25 e 50 mg/kg atenuou a hipotensão após bloqueio com L-NAME (20 mg/kg) em ratos WKY ($-19,64 \pm 1,17$; $-40,00 \pm 6,85$ mmHg) e aumentou a hipotensão na dose de 25 mg/kg em ratos SHR ($-35,48 \pm 4,53$ mmHg).

A Sulcatona aumentou a taquicardia na menor dose ($23,75 \pm 3,54$ bpm) e reverteu a bradicardia na maior dose ($65,40 \pm 22,83$ bpm) em ratos WKY. Por outro lado, aumentou a taquicardia na dose de 12,5 mg/Kg ($55,85 \pm 1,11$ bpm) e reverteu a taquicardia na dose de 25 mg/kg ($-79,90 \pm 1,24$ bpm) em ratos SHR. A bradicardia na dose de 25 mg/kg foi acompanhada de súbito aumento da frequência cardíaca com posterior normalização da mesma em ratos SHR.

Os efeitos causados pela Sulcatona nas doses utilizadas após bloqueio da NOS em ratos WKY e SHR estão mostrados na Figuras 33 e 34.

FIGURA 33: Efeito hipotensor da Sulcatona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos WKY após bloqueio com L-NAME (20 mg/kg). Valores expressos como média \pm e.p.m. (n= 4), Teste-t de *Student* não pareado; *p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001. NPS: Nitroprussiato de sódio.

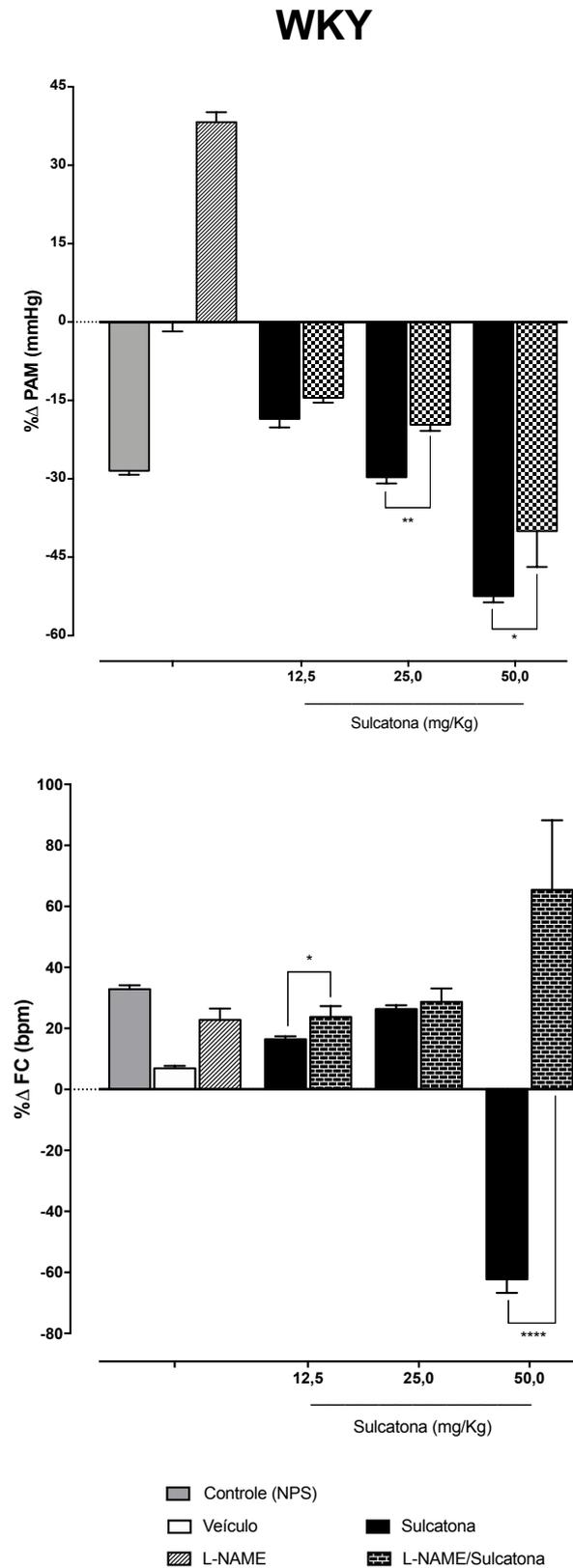
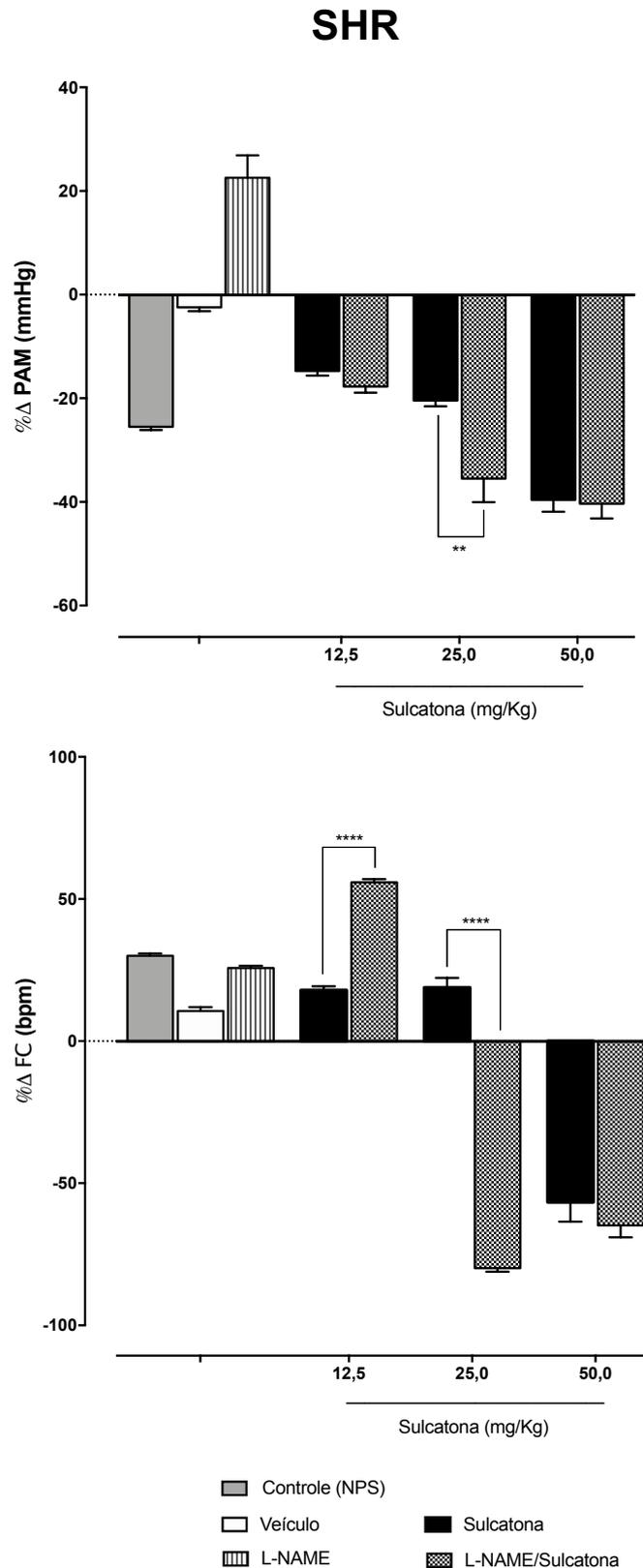


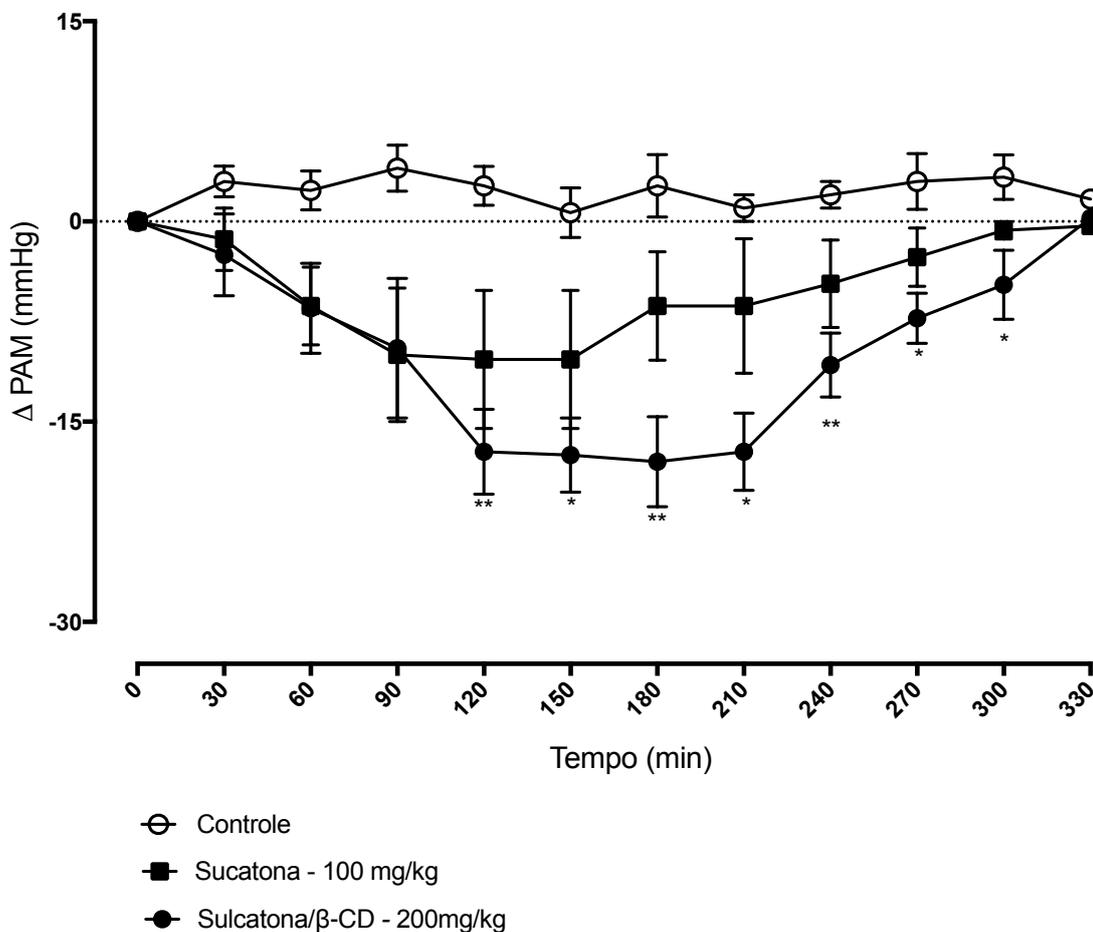
FIGURA 34: Efeito anti-hipertensivo da Sulcatona (12,5; 25 e 50 mg/kg) em ratos SHR após bloqueio com L-NAME (20 mg/kg). Valores expressos como média \pm e.p.m. (n= 4), Teste-t de *Student* não pareado; **p<0,01; ****p<0,0001. NPS: Nitroprussiato de sódio.



4.8- Efeito da administração oral de Sulcatona livre e do complexo Sulcatona/ β -CD em animais espontaneamente hipertensos (SHR)

Após a administração da dose de 200 mg/kg do complexo Sulcatona/ β -CD por via oral houve uma queda da pressão arterial após 120 min de administração oral com um tempo médio de três horas até voltar ao basal ($174,00 \pm 4,58$ n=3), valores estes: 120 min : $144,00 \pm 8,57$; 150 min: $143,75 \pm 6,93$; 180 min: $143,25 \pm 8,24$; 210 min: $144,00 \pm 8,17$; 240 min: $150,50 \pm 7,77$; 270 min: $154,00 \pm 6,48$; 300 min: $156,50 \pm 6,24$. Com relação a administração de 100 mg/kg de Sulcatona (v.o) não houve diferença significativa comparada com o grupo controle e nem com a administração do complexo. Dados esses que estão mostrados na Figura 35.

FIGURA 35: Efeito anti-hipertensivo da Sulcatona e do Complexo Sulcatona/ β -CD sobre a PAM em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) não anestesiados.



Valores expressos como média \pm epm. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnet; SHR X Controle.

5.0 - DISCUSSÃO

A hipertensão arterial é uma doença assintomática a longo prazo e um importante fator de risco para acidente vascular cerebral, doença coronariana e doença vascular renal. É bem conhecido que os medicamentos têm muitos efeitos colaterais que podem complicar a condição médica do paciente. Apesar da disponibilidade de vários tipos de drogas anti-hipertensivas, um tratamento bem-sucedido para a hipertensão é difícil de ser alcançado. Assim, o desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas pode ajudar a melhorar o manejo clínico dessa patologia (EDDOUKS et al., 2002; LAURENT et al., 2012; GORZALCZAN et al., 2013; ASSAIDI et al., 2014).

Na aplicação de estratégias de planejamento de novas ferramentas farmacológicas, os estudos dos processos evolutivos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos assumem grande importância, pois constituem as bases fundamentais para o entendimento de propriedades como potência, afinidade e seletividade. Diante desse complexo paradigma, as ferramentas biotecnológicas associadas aos métodos de química medicinal ganham papel destacado no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica (GUIDO et al., 2010).

Dentre essas novas ferramentas farmacológicas têm-se o uso de substâncias sintéticas que são encontradas em várias plantas medicinais usadas no tratamento de diversas doenças incluindo a hipertensão arterial devido aos baixos efeitos colaterais quando comparados com as drogas vendidas comercialmente. Logo, a procura de novas ferramentas que possam diminuir as consequências da hipertensão arterial é de grande importância para a sociedade. Com base nisso, esse estudo foi fundamentado utilizando uma substância sintética chamada 6-Metil-5-hepten-2-ona (Sulcatona), que é da classe dos terpenos e um óleo essencial encontrado em algumas espécies de plantas, bem como usado como ferormônio de atração entre insetos (RODRIGUEZ; PÉREZ; NAZARENO, 2016.).

Em estudo prévio, a Sulcatona foi capaz de causar vasorrelaxamento independente do endotélio vascular em anéis de aorta de ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) (SILVA et al., 2019). Com base nisso, resolveu-se avaliar o efeito anti-hipertensivo da Sulcatona em ratos Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR), sendo que este último tem uma grande importância devido a

similaridade com a hipertensão essencial do homem (PAREDES et al., 2018; TRIPPODO, FROHLICH, 1981). Os ratos SHR apresentam atividade aumentada dos mecanismos de retenção de líquidos, reabsorção de sódio e aumento da resistência vascular, bem como uma hiperatividade simpática. A hipertensão do SHR adulto está associada a um aumento da resistência periférica total e um débito cardíaco normal ou diminuído. Esse aumento na resistência vascular é produzido primeiramente por mecanismos neurogênicos e, posteriormente, por alterações vasculares estruturais (LUNDIM et al., 1984; POTTS et al., 1998).

Assim, para verificar os possíveis mecanismos de ação da Sulcatona por via venosa realizou-se a administração intravenosa de Sulcatona nas doses 12,5; 25 e 50 mg/kg em ratos KWIY e SHR. Com isso verificamos que a Sulcatona causou uma hipotensão de forma dependente de dose nos modelos animais analisados, porém, somente a maior dose (50 mg/kg) causou uma hipotensão seguida de uma bradicardia enquanto que as outras doses causaram o efeito taquicárdico. Efeito hipotensor esse que foi mais acentuado em ratos Kyoto quando comparado com os animais SHR e tanto a taquicardia nas menores doses quanto a bradicardia da maior dose não tiveram diferença significativa entre os modelos animais analisados (Figuras 20, 21 e 22).

Para averiguar o envolvimento das possíveis vias de sinalização envolvidas no mecanismo que poderiam causar a hipotensão bem como a taquicardia e a bradicardia dependendo da dose, utilizou-se ferramentas farmacológicas para bloquear determinadas vias de sinalização em modelos animais WKY e SHR.

Os receptores α_1 adrenérgicos, pertencem a uma grande família de receptores acoplados a proteína G (GPCR) que medeiam ações das catecolaminas endógenas, norepinefrina e epinefrina. Eles desempenham papéis críticos em muitos processos fisiológicos, incluindo a contração do músculo liso vascular, inotropia e cronotropia do miocárdio, e no metabolismo da glicose hepática (NICHOLS; RUFFOLO, 1991), bem como, são responsáveis também pelo processo de contração do músculo liso vascular. Evidências farmacológicas crescentes sugerem que múltiplos subtipos α_1 -AR com homologia estrutural, mas com características distintas, regulam essas respostas. Por exemplo, o α_{1A} -AR foi mostrado por mediar a contração das artérias renal e caudal (LACHNIT et al., 1997; PIASCIK et al., 1997; HROMETZ et al., 1999). O α_{1D} -AR foi mostrado para regular a contração da aorta femoral, ilíaca e artéria mesentérica superior (PIASCIK et al., 1997; HROMETZ et al., 1999). E há pouca

evidência direta para um papel do α_{1B} -AR como um mediador da função contrátil nos vasos sanguíneos. Estes dados isolados mostram que há diversidade na árvore vascular em relação ao α_1 -AR, que modula a contração do músculo liso vascular.

Sendo assim, foi utilizado prazosin (1 mg/kg i.v) um bloqueador dos receptores α_1 adrenérgicos, em animais WKY e SHR nos quais a Sulcatona nas doses de 12,5 e 25 mg/kg (v.v.) aumentou a hipotensão e a taquicardia foi revertida. Efeito hipotensor esse se deve a diminuição da resistência periférica dos vasos sanguíneos, porém a maior dose 50 mg/kg não alterou os parâmetros cardiovasculares, mostrando dessa forma um possível efeito sinérgico da Sulcatona com outros sistemas de receptores no organismo, sobre os parâmetros cardiovasculares de animais normotensos e hipertensos (Figuras 23 e 24).

Os agonistas α_2 -adrenérgicos estimulam os receptores no SNC e periférico, realizando a inibição da liberação de nora-epinefrina pelos terminais nervosos, diminuindo o efluxo simpático para a periferia, o que conseqüentemente reduz: a resistência periférica vascular, alterações do débito cardíaco e bradicardia, resultando em hipotensão (FLACKE, 1992). No rato, estudos neuroanatômicos e fisiológicos demonstraram que dois grupos interconectados de neurônios dentro da medula oblonga ventrolateral são parte integrante do controle do tônus vasomotor: um pressor rostral (RVLM) e um grupo depressor mais caudal (CVLM). Neurônios no RVLM e pré-ganglionares do nervo medular estão envolvidos na manutenção do tônus simpático de repouso e da pressão arterial, e um subconjunto de neurônios no CVLM fornece entradas inibitórias tônicas para os neurônios vasopressores RVLM. Além disso, estudos farmacológicos mostraram que o RVLM é o local de ação de agentes anti-hipertensivos de ação central.

Para verificar se a queda da PA induzida pela Sulcatona envolveria a ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos do SNC, foi utilizado ioimbina (2 mg/kg), antagonista seletivo destes receptores. Nestas condições, observou-se que a resposta anti-hipertensiva da Sulcatona acentuou a hipotensão nas menores doses utilizadas tanto em animais WKY quanto em SHR, não alterando na maior dose 50 mg/kg. Não alterando a taquicardia causada nas menores doses e diminuindo a bradicardia na maior em ratos WKY e reverteu a bradicardia em animais SHR (Figuras 25 e 26). Com base nesses resultados podemos sugerir que a Sulcatona possa ter efeitos

simpaticolíticos devido uma acentuação da queda da pressão arterial após bloqueio dos receptores α_2 -adrenérgicos.

Com o objetivo de verificar o efeito hipotensor da Sulcatona sobre o bloqueio dos receptores adrenérgicos, principalmente nos receptores adrenérgicos β_1 que se localizam em maior densidade no coração e receptores adrenérgicos β_2 , localizados principalmente na musculatura lisa (vascular e brônquios), utilizou-se o propranolol que é um antagonista β -adrenérgico não seletivo (KENTON; BOON; CAIN, 2008). Após o bloqueio farmacológico com propranolol houve um aumento da hipotensão em ratos WKY e SHR. Na menor dose não ocorreu alteração da hipotensão quando comparada apenas com a administração da Sulcatona sem bloqueio farmacológico com propranolol. Em relação a frequência cardíaca evidenciou-se um bloqueio total em todas as doses em ambos os animais após o bloqueio farmacológico dos receptores β adrenérgicos (Figuras 27 e 28).

Essa droga diminui o efluxo simpático por antagonizar a ação das catecolaminas nos receptores beta no sistema nervoso central e na periferia. O propranolol é o protótipo dos betabloqueadores inespecíficos e, inicialmente, diminui a pressão arterial por diminuir o débito cardíaco. A longo prazo, o débito cardíaco retorna ao normal e a resistência periférica total diminui, mantendo a pressão arterial baixa. A menor resistência periférica é atribuída ao bloqueio dos receptores beta no sistema nervoso central e à menor secreção de renina pelos rins, uma vez que a inervação adrenérgica para o aparelho justaglomerular ocorre por estimulação dos receptores beta (FROHLICH, 1980).

Tais receptores estão acoplados a proteína G_s , ligados a adenilato-ciclase (AC) da qual existem pelo menos 9 isoformas, sendo as isoformas V e VI as principais expressas no coração e quando ativados por agonistas (catecolaminas) a AC catalisa o ATP em a adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPc), ativando a proteína cinase A (PKA). Ao fazê-lo, as subunidades catalíticas da PKA são tornadas competentes para fosforilar vários alvos proteicos intracelulares em resíduos de serina e treonina, inclusive os canais de Ca^{2+} aumentando a $[Ca^{2+}]_i$, que devido a isso aumenta o encurtamento fracional do músculo cardíaco durante a contração (efeito inotrópico positivo) e eleva a frequência cardíaca (efeito cronotrópico positivo), ocasionando o aumento do débito cardíaco (MANSOOR, 2009).

A bradicardia observada neste experimento pode ser desencadeada por várias vias, incluindo aquelas que atuam localmente para influenciar a função do músculo cardíaco e miócitos. Pode ser devido à hiperpolarização celular após a abertura de canais de potássio que estão diretamente ligados às proteínas G e à saída dos íons de potássio da célula (MOHAN, PATERSON 2000; THRASHER, 2004; BERNARDES et al., 2013).

Algumas drogas anti-hipertensivas comumente usadas no tratamento da hipertensão resistente, com os bloqueadores adrenérgicos que foram utilizados nesse experimento, ativam cronicamente o sistema nervoso simpático enquanto diminuem a pressão arterial (LOHMEIER, ILIESCU, 2015), uma resposta provavelmente mediada pela descarga crônica dos barorreceptores arteriais, com isso podemos inferir que após o uso de bloqueadores adrenérgicos, como o aumento da hipotensão ocasionado pela Sulcatona pode ser devido em parte a ativação dos barorreceptores arteriais.

Para averiguar a causa da bradicardia ocorrida na maior dose, foi utilizado um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos (Atropina, 2 mg/kg). Sabe-se que a estimulação de receptores muscarínicos por um agonista como acetilcolina promove a redução da taxa e força dos batimentos cardíacos resultante da ação parassimpática. E a ativação desses mesmos receptores (predominantemente do subtipo M₂) no nodo sinoatrial por ação vagal induz bradicardia intensa (efeito inotrópico negativo) devido a um retardo na condução elétrica do coração, que pode ser acompanhado por hipotensão, devido a uma diminuição no débito cardíaco (FURCHGOTT, ZAWADZKI, 1980; CAULFIELD, 1993; MONCAD, HIGGS, 1993; MEDEIROS et al., 2006).

O controle extrínseco da função cardíaca é regulado principalmente pelo sistema nervoso autônomo. O ramo parassimpático, que libera o neurotransmissor ACh, é bem conhecido por controlar a FC (DHEIN et al., 2001) ao regular predominantemente a função atrial (LOFFELHOLZ; PAPPANO, 1985). Ricas inervações colinérgicas são encontradas no nodo sinoatrial, no miocárdio atrial, no nó atrioventricular e no sistema de condução ventricular de muitas espécies (KENT et al., 1974). Embora menos abundantes, as fibras parassimpáticas também são encontradas nos ventrículos, onde a estimulação do receptor de ACh muscarínico tipo

2 por ACh leva à inibição do canal de cálcio tipo L e, conseqüentemente, reduz a contratilidade dos cardiomiócitos (NAGATA et al., 2000).

Na presença de atropina, a hipotensão causada pela Sulcatona foi significativamente reduzida, assim como a frequência cardíaca em todas as doses e modelos animais utilizados quando comparada ao controle (Figuras 29 e 30), o que sugere que a Sulcatona possa estar agindo sobre receptores M_2 no coração levando a uma intensa bradicardia bem como uma hipotensão devido a diminuição do débito cardíaco, ou seja, uma ação colinomimética agindo de acordo com o mesmo mecanismo que a acetilcolina (ACh), efeito encontrado com o óleo essencial de *Aniba canelilla* (Kunth) Mez (LAHLOU et al., 2005), extrato etanólico de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (SANTOS et al., 2015), 1-nitro-2-feniletano (INTERAMINENSE et al., 2011), substâncias isoladas de plantas como vasicina (SILVEIRA et al., 2003), rotundifolone (GUEDES et al., 2002) Linalol (SIQUEIRA et al., 2013) demonstraram ter capacidade de causar hipotensão seguida de bradicardia assim como a Sulcatona.

Sendo assim, para averiguar se o efeito da Sulcatona poderia ser indiretamente via ativação neuronal colinérgica, utilizou-se o hexametônio (20 mg/kg i.v.), um bloqueador ganglionar, reduzindo assim tanto a transmissão colinérgica quanto a adrenérgica (MEDEIROS et al., 2006). Dessa forma, verificou-se que o tratamento agudo com a Sulcatona acentuou a hipotensão na dose de 25 mg/kg em ratos WKY e em todas as doses utilizadas em ratos SHR bem como praticamente aboliu a taquicardia e bradicardia causada neste modelo animal (Figuras 31 e 32).

O efeito hipotensor já era esperado, uma vez que o bloqueio autonômico cardíaco não alterou o efeito da queda da PA e, segundo McCallum (1998) os efeitos centrais e periféricos simpaticolíticos dos agonistas α_2 -adrenérgicos podem ser aumentados com o bloqueio ganglionar, o que foi observado no experimento. Na dose de 50 mg/kg no animal WKY, após o bloqueio, com hexametônio ocorreu atenuação da hipotensão seguido de uma taquicardia, sugerindo que a hipotensão e bradicardia na maior dose sem o bloqueio ganglionar seria um reflexo da hiperestimulação desses receptores. Assim, a hipotensão induzida pela Sulcatona em ratos parece não ser inibida com a remoção do suporte autonômico nervoso para o sistema cardiovascular.

Sabe-se que o núcleo do trato solitário (NTS) desempenha um importante papel na modulação da atividade autonômica eferente para o sistema cardiovascular (MACHADO et al., 1997). Como os estudos com atropina e hexametônio não

descartam uma ação mais central, pode-se supor que a Sulcatona tenha efeito sobre as vias neuronais do núcleo do trato solitário. O NTS envia projeções para o núcleo ambíguo, excitando neurônios pré-ganglionares parassimpáticos, resultando assim numa consequente descarga vagal para o coração e queda da FC (MACHADO et al., 1997; VERBERNE; GUYENET, 1992). Apesar disto, outros experimentos seriam necessários para melhor compreensão deste ponto.

Evidências mostram que a atividade cardiovascular eferente simpática gerada e modulada pelos neurônios da região bulbar ventro-lateral rostral (RVLM) e esta atividade encontra-se normalmente sob inibição tônica mediada pelo ácido γ -aminobutírico (GABA) (GUYENET et al., 1989). Embora o efeito bradicárdico induzido pela Sulcatona via ativação colinérgica (muscarínica e nicotínica) possa estar contribuindo para a resposta hipotensora através da queda no débito cardíaco, vale lembrar que existem receptores muscarínicos nas células endoteliais que também podem estar influenciando o efeito hipotensor.

Conforme estabelecido na literatura, o tônus vascular do leito arterial sustenta a manutenção da resistência periférica na circulação e é o principal contribuinte para o controle da pressão arterial (BASTOS et al., 2010; WHITE et al., 1996). Além disso, na maioria dos leitos vasculares, a ativação de receptores muscarínicos nas células endoteliais induz vasorrelaxamento pela liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDHF), incluindo óxido nítrico e metabólitos da ciclooxigenase, como a prostaciclina (PGI_2) (MONCADA et al., 1991). O óxido nítrico (NO), uma vez sintetizado a partir do seu precursor, o aminoácido L-arginina pela isoforma endotelial da NOS (eNOS) (PALMER et al., 1988), liga-se ao grupo metálico heme ferroso da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC), que conduz à conversão do GTP (trifosfato de guanosina) em GMPc (monofosfato de guanosina cíclico) provocando relaxamento da musculatura lisa vascular (SU, 2015).

Para determinar se o efeito anti-hipertensivo da Sulcatona pode envolver a liberação de óxido nítrico por uma forma independente da ativação muscarínica, realizou-se protocolos experimentais com N^ω -nitro-L-arginina metil éster hidróclorido (L-NAME), um inibidor de sintase de óxido nítrico (NOS). Dessa forma a hipotensão foi diminuída nas doses de 25 e 50 mg/kg em animais e a FC foi revertida na maior dose em animais WKY já em animais SHR o bloqueio com L-NAME aumentou a hipotensão e causou bradicardia na dose de 25 mg/kg e aumentou a

taquicardia na menor dose (Figuras 33 e 34). Podemos concluir que a Sulcatona provavelmente induz um aumento de óxido nítrico sistêmico em animais WKY, o que não foi visto no animal SHR, que pode ser atribuído ao fato de que o animal SHR possui disfunção da camada endotelial, o que não acarretaria na produção necessária de NO.

Sabendo do efeito venoso da Sulcatona sobre os parâmetros cardiovasculares resolveu-se verificar o efeito anti-hipertensivo tanto da Sulcatona livre quanto da forma complexada com β -CD administrado de forma oral em animais espontaneamente hipertensos (SHR).

As Ciclodextrinas (CD) são compostos não tóxicos (KURKOV; LOFTSSON, 2013), capazes de formar complexos de inclusão e conseqüentemente estabilizar um largo espectro de substâncias. Essa característica, juntamente com outras propriedades, faz delas um grande atrativo para variado número de aplicações industriais (KURKOV; LOFTSSON, 2013). A solubilidade das CD, o método de complexação e a proporção de fármaco/CD no complexo são fatores que podem determinar o grau de dissolução do fármaco. O aumento da solubilidade resultante da complexação com as CD's está associado à sua capacidade de reduzir a tensão interfacial entre o fármaco e o meio de dissolução, e também à redução da cristalinidade dos compostos, uma vez que compostos com características amorfas são mais facilmente solúveis que compostos mais cristalinos (RAMA et al., 2006; SOARES-SOBRINHO et al., 2011).

A administração oral de Sulcatona livre não alterou os parâmetros cardiovasculares comparado com o controle na dose 100 mg/kg, porém o complexo Sulcatona/ β -CD foi capaz de reduzir a PAM no animal SHR a partir de duas horas após administração na dose 200 mg/kg (7,3 mg de Sulcatona) tendo uma duração de cerca de três horas até voltar ao normal (Figura 35). Esses resultados mostram que o complexo tem um efeito anti-hipertensivo no animal SHR com uma dose muito menor comparada com a administração da Sulcatona livre, importante mencionar que, de acordo com os cálculos realizados no complexo (Sulcatona/ β -CD), existe cerca de 3,7% de Sulcatona para cada 100 mg do complexo, ou seja, um valor muito inferior comparando a dose administrada da Sulcatona livre (100 mg/kg) dessa forma o complexo aumentou a biodisponibilidade da substância, bem como a eficácia e a potência da atividade da Sulcatona em 69,67%, o que não foi verificado com a

substância livre. E somente a β -CD quando administrada sozinha não possui efeito, não interferindo, nos parâmetros cardiovasculares, mesmo fato que ocorre quando se administrou o veículo como controle nos referidos animais.

Esses resultados demonstram que o uso de técnicas biotecnológicas pode ser usado de modo vantajoso melhorando tanto a ação, quanto a biodisponibilidade e liberação de determinadas substâncias que no caso da Sulcatona pura não apresentou efeito estatisticamente significativo na redução da pressão arterial média.

6.0- CONCLUSÃO

Diante do realizado podemos concluir que:

- A administração venosa de Sulcatona induziu hipotensão seguido de taquicardia em animais Kyoto e SHR nas menores doses e apenas na maior dose ocorreu bradicardia.

- Após bloqueios farmacológicos sugerimos que a Sulcatona possa estar agindo em receptores muscarínicos subtipo M_2 , α_2 -adrenérgicos e na produção de NO em modelos de animais WKY e SHR levando a redução da pressão arterial.

- A complexação da Sulcatona com β -CD, mostrou um efeito anti-hipertensivo por via oral, melhorando de forma significativa o efeito anti-hipertensivo em modelos de animais SHR.

7.0 AGRADECIMENTOS

Somos gratos ao IFPI (Instituto Federal do Piauí), RENORBIO-UFPI (Rede Nordeste de Biotecnologia - Universidade Federal do Piauí, Brasil), IB/USP (Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo) ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil- Bolsa Doutorado Sanduiche no país; processo N - 300261/2018-7), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) – Projeto PPSUS-DCIT 2016/FAPEPI/CNPq pelo apoio financeiro ao desenvolvimento desse trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALLARD, M.; LABROUCHE, S.; NOSJEAN, A.; LAGUZZI, R. Mechanisms underlying the cardiovascular responses to peripheral administration of NPPF in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, 274:577–583. 1995.
- ASSAIDI, A.; LEGSSYER, A.; BERRICHI, A.; AZIZ, M.; MEKHFI, H.; BNOUHAM, M.; ZIYYAT, A. Hypotensive property of *Chenopodium ambrosioides* in anesthetized normotensive rats. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, 11(1), pp. 1-7. 2014.
- BARREIRO, E.J. A importância da síntese de fármacos na produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 14, n. 3, p. 179-188. 1991.
- BASTOS, J.F.A.; MOREIRA, I.J.A.; RIBEIRO, T.P.; MEDEIROS, I.A.; ANTONIOLLI, A.R.; DE SOUSA, D.P.; SANTOS, M.R.V. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, p. 331-337. 2010.
- BERNARDES, M.J.; CARVALHO, F.S.; SILVEIRA, L.L.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.; GARROTE, C.F.; PEDRINO, G.R.; ROCHA, M.L. Hypotensive effect of *Aspidosperma subincanum* Mart. In rats and its mechanism of vasorelaxation in isolated arteries. **J Ethnopharmacol**, 145:227–32. 2013.
- BORODINOVA, A.A.; ABRAMOCHKIN, D.V.; SUKHOVA, G.S. Non-quantal release of acetylcholine in rat atrial myocardium is inhibited by noradrenaline. **Experimental Physiology**, 98(12), 1659–1667. 2013.
- CASTRO, P.F.S.; PEREIRA, A.C.; ROGRIGUES, G.J.; BATISTA, A.C.; SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M.; ROCHA, M.L. A new nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor presents higher efficacy than sodium nitroprusside on relaxation of air way smooth muscle. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 43,370–377. 2011.
- CAULFIELD, M.P. Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. **Pharmacol Ther**. Jun;58(3):319-79. 1993.
- CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estudo Químico de Plantas Medicinais Orientado para a Análise Biológica. Obtenção, Determinação e Modificação Estrutural de Compostos Bioativos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (ed.). *Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos, Cap. 2, p. 59-69. 2001.

- DHEIN, S.; VAN KOPPEN, C.J.; BRODDE, O.E. Muscarinic receptors in the mammalian heart. **Pharmacol Res.** 44:161–82. 2001.
- EDDOUKS, M.; MAGHRANI, M.; LEMHADRI, A.; OUAHIDI, M.L.; JOUAD, H. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of morocco (tafilalet). **J Ethnopharmacol**; 82:97–103. 2002.
- FAZAN JR, R.; SILVA, V. J. D.; SALGADO, H. C. Modelos de hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, 8(1), 19-29. 2001.
- FLACKE, J.W. Alpha 2-adrenergic agonists in cardiovascular anesthesia. **J Cardiothorac Vasc Anesth.** Jun;6(3):344-59. Review. 1992.
- FROHLICH, E.D. Methyldopa: mechanisms and treatment 25 years later. **Arch Intern Med** 140:954-9. 1980.
- FRUEKILDE, P.; HJORTH, J.; JENSEN, N.R.; KOTZIAS, D.; LARSEN, B. Ozonolysis at vegetation surfaces: a source of acetone, 4-oxopentanal, 6-methyl-5-hepten-2-one, and geranyl acetone in the troposphere. **Atmospheric Environment** 32: 1983-1992. 1998.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.** Nov 27;288(5789):373-6. 1980.
- GORZALCZANY, S.; MOSCATELLI, V.; FERRARO, G. *Artemisia copa* aqueous extract as vasorelaxant and hypotensive agent. **Journal of Ethnopharmacology.** Vol148, Issue 1, 21 June, Pages 56-61. 2013.
- GOTO, K.; OHTSUBO, T.; KITAZONO, T. Endothelium-Dependent Hyperpolarization (EDH) in Hypertension: The Role of Endothelial Ion Channels. **International journal of molecular sciences**, 19(1), 315. 2018.
- GUEDES, D.N.; SILVA, D.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MEDEIROS, I.A. Muscarinic agonist properties involved in the hypotensive and vasorelaxant responses of Rotundifolone in rat. **Planta Med**, 68:700-704, 2002.
- GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Revista Estudos Avançados.** São Paulo, v.24, n.70, p.81-98. 2010.
- GUIMARÃES, A.G.; QUINTANS, J.S.; QUINTANS, L.J.Jr. Monoterpenes with analgesic activity--a systematic review. **Phytother Res.** Jan;27(1):1-15. 2013.

- GUYENET, P.G.; HASELTON, J.R.; SUN, M.K. Sympathoexcitatory neurons of the rostroventrolateral medulla and the origin of the sympathetic vasomotor tone. **Prog Brain Res.** 81:105-16. 1989.
- HROMETZ, S.L.; EDELMANN, S.E.; MCCUNE, D.F.; OLGES, J.R.; HADLEY, R.W.; PEREZ, D.M.; PIASCIK, M.T. Expression of multiple alpha1-adrenergic receptors on vascular smooth muscle: correlation with the regulation of contraction. **J Pharmacol Exp Ther** 290:452–463. 1999.
- INTERAMINENSE, L.F.; SIQUEIRA, R.J.; XAVIER, F.E.; DUARTE, G.P.; MAGALHÃES, P.J.; SILVA, J.K.; MAIA, J.G.; SOUSA, P.J.; LEAL-CARDOSO, J.H.; LAHLOU, S. Cardiovascular effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of Aniba canelilla, in spontaneously hypertensive rats. **Fundam Clin Pharmacol.** Dec;25(6):661-9. Epub 2010 Nov 16. 2011.
- KANDANUR, S.G.S.; TAMANG, N.; GOLAKOTI, N.R.; NANDURI, S. Andrographolide: A natural product template for the generation of structurally and biologically diverse diterpenes. **Eur J Med Chem.** Aug 15; 176: 513-533. 2019.
- KENT, K.M.; EPSTEIN, S.E.; COOPER, T.; JACOBOWITZ, D.M. Cholinergic innervation of the canine and human ventricular conducting system. Anatomic and electrophysiologic correlations. **Circulation**; 50:948–55. 1974.
- KENTON, L.; BOON, F.; CAIN, D.P. Combined but not individual administration of β -adrenergic and serotonergic antagonists impairs water maze acquisition in the rat. **Neuropsychopharmacology**, 33:1298–1311. 2008.
- KURKOV, S.V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. Review. **International Journal of Pharmaceutics**, v.453, p.167–180. 2013.
- LACHNIT, W.G.; TRAN, A.M.; CLARKE, D.E.; FORD, A.P. Pharmacological characterization of an alpha1A-adrenoceptor mediating contractile responses to noradrenaline in isolated caudal artery of rat. **Br J Pharmacol.** 120:819–826. 1997.
- LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, R.F.; LEAL-CARDOSO, J.H. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* in DOCA-salt-hypertensive rats. **Phytomedicine** 9:715–20. 2002.
- LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P.J.; SIQUEIRA, R.J.; FIGUEIREDO, A.F.; INTERAMINENSE, L.F.; MAIA, J.G.; SOUSA, P.J. Cardiovascular effects of the

essential oil of Aniba canelilla bark in normotensive rats. **J Cardiovasc Pharmacol.** Oct;46(4):412-21. 2005.

LAURENT, S.; SCHLAICH, M.; ESLER, M. New drugs, procedures and devices for hypertension. **The Lancet** 380, pp. 591-600. 2012.

LAWERS, C.M.; HOORN, S.V.; RODGERS, A. Global burden of blood-pressure-related disease. **Lancet.**; 371:1513–1518. 2008.

LIU, H.; MENG, F.; MIAO, H.; CHEN, S.; YIN, T.; HU, S.; SHAO, Z.; LIU, Y.; GAO, L.; ZHU, C.; ZHANG, B.; WANG, Q. Effects of postharvest methyl jasmonate treatment on main health-promoting components and volatile organic compounds in cherry tomato fruits. **Food Chem.** Oct 15; 263:194-200. 2018.

LOFFELHOLZ, K.; PAPPANO, A.J. The parasympathetic neuroeffector junction of the heart. **Pharmacol Rev** 37:1–24. 1985.

LOHMEIER, T.E.; ILIESCU, R. The baroreflex as a long-term controller of arterial pressure. **Physiology (Bethesda).** 30(2):148-58. 2015.

LUNDIN, S.; RICKSTEN, S.E.; THORÉN, P. Renal sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods. **Acta Physiol Scand** 120: 265- 72. 1984.

MACHADO, B.H.; MAUAD, H.; CHIANCA JUNIOR, D.A.; HAIBARA, A.S.; COLOMBARI, E. Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii. **Braz J Med Biol Res** 30:533–543. 1997.

MAIONE, F.; CICALA, C.; MUSCIACCO, G.; DE FEO, V.; AMAT, A.G.; IALENTI, A.; MASCOLO, N. Phenols, alkaloids and terpenes from medicinal plants with antihypertensive and vasorelaxant activities. A review of natural products as leads to potential therapeutic agents. **Nat Prod Commun.** Apr;8(4):539-44. 2013.

MARSHALL, C.A.; BRODNIK, Z.D.; MORTENSEN, O.V.; REITH, M.E.A.; SHUMSKY, J.S.; WATERHOUSE, B.D.; ESPAÑA, R.A.; KORTAGERE, S. Selective activation of Dopamine D3 receptors and norepinephrine transporter blockade enhance sustained attention. **Neuropharmacology.** Apr; 148:178-188. 2019.

MANSOOR, A.H.; KAUL, U. Beta-blockers in cardiovascular Medicine *SUPPLEMENT OF JAPI V.* 57: 7-12. 2009.

MCCALLUM, J.B.; BOBAN, N.; HOGAN, Q.; SCHMELING, W.T.; KAMPINE, J.P.; BOSNJAK, Z.J. The Mechanism of [alpha]2-Adrenergic Inhibition of Sympathetic Ganglionic Transmission. **Anesthesia & Analgesia** 87(3), 503–510. 1998.

- MEDEIROS, I.A.; SANTOS, M.R.V.; NASCIMENTO, N.M.S.; DUARTE, J.C. Cardiovascular effects of *Sida cordifolia* leaves extract in rats. **Fitoterapia** 77,19–27. 2006.
- MOHAN, R.M.; PATERSON, D.J. Activation of sulphonylurea-sensitive channels and the NO–cGMP pathway decreases the heart rate response to sympathetic nerve stimulation. **Cardiovasc Res** 47:81–9. 2000.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev** 43:109–42. 1991.
- MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**. Dec 30;329(27):2002-12. 1993.
- NAGATA, K.; YE, C.; JAIN, M.; MILSTONE, D.S.; LIAO, R.; MORTENSEN, R.M. Galpha (i2) but not Galpha (i3) is required for muscarinic inhibition of contractility and calcium currents in adult cardiomyocytes. **Circ Res** 87:903–9. 2000.
- NICHOLS, J.A.; RUFFOLO, J.R.R. Functions mediated by alpha-adrenoceptors. R.R. Ruffolo Jr. (Ed.), *α-Adrenoceptors: Molecular Biology, Biochemistry, and Pharmacology. Prog Basic Clin Pharmacol*. Basel, Karger, vol 8, pp 115-179. 1991.
- NYS, G.; FILLET, M. Microfluidics contribution to pharmaceutical sciences: From drug discovery to post marketing product management. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Vol 159, 348-362. 2018.
- OLIVEIRA, E.J.; MEDEIROS, I.A. Mukeierjee, R. Hypotensive and spasmolytic effects of normacusine B from *Strychnos atlantica* root. **Phytomedicine** v. 3, p. 45-49. 1996.
- PALMER, R.M.; REES, D.D.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem Biophys Res Commun** 153(3):1251-6. 1988.
- PAREDES, M.D.; ROMECÍN, P.; ATUCHA, N.M.; O'VALLE, F.; CASTILLO, J.; ORTIZ, M.C.; GARCÍA-ESTAÑ, J. Moderate Effect of Flavonoids on Vascular and Renal Function in Spontaneously Hypertensive Rats. **Nutrients**, 10(8), 1107. 2018.
- PIASCIK, M.T.; HROMETZ, S.L.; EDELMANN, S.E.; GUARINO, R.D.; HADLEY, R.W.; BROWN, R.D. Immunocytochemical localization of the α1b-adrenergic receptor and the contribution of this and the other subtypes to vascular smooth muscle

contraction: analysis with selective ligands and antisense oligonucleotides. **J Pharmacol Exp Ther.** 283:854–868. 1997.

POTTS, J.T.; MCKEOWN, K.P.; SHOUKAS, A.A. Reduction in arterial compliance alters carotid baroreflex control of cardiac output in a model of hypertension. **Am J Physiol** 43: H1121-H1131,14. 1998.

RAMA, A.C.R.; VEIGA, F.; FIGUEIREDO, I.V.; SOUSA, A.; CARAMONA, M. Complexos de inclusão de indometacina com hidroxipropil - β ciclodextrina. Estudos de dissolução e coeficiente de partição. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1. 2006.

RODRÍGUEZ, S.A.; PÉREZ, M.L.; NAZARENO, M.A. Identification of male-produced aggregation pheromone of the curculionid beetle *Acrotomopus atropunctellus*. **Bull Entomol Res.** Aug;106(4):494-501. 2016.

SANTOS, M.E.P.; MOURA, L.H.P.; MENDES, M.B.; ARCANJO, D.D.R.; MONÇÃO, N.B.N.; ARAÚJO, B.Q.; LOPES, J.A.; SILVA-FILHO, J.C.; FERNANDES, R.M.; OLIVEIRA, R.C.; CITÓ, A.M.; OLIVEIRA, A.P. Hypotensive and vasorelaxant effects induced by the ethanolic extract of the *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae) inflorescences in normotensive rats. **J. Ethnopharmacol** 164, 120–128. 2015.

SILVA, I.S.; FEITOSA, E.L.; SANTOS, M.E.P.; SILVA, R.M.; ROCHA, M.S.; DA SILVA, F.I.; LIMA, F.C.A.; COSTA, A.M.S.; ALVES, P.B.; DE SOUSA, S.A.A.; OLIVEIRA, A.P.; DE LIMA, S.G. Theoretical and Experimental Investigations on Inclusion Complex β -Cyclodextrin and Sulcatone: A Cardiovascular Activity Evaluation. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 00, No. 00, 1-14, 2019.

SILVA-FILHO, J.C.; OLIVEIRA, N.N.; ARCANJO, D.D.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; CAVALCANTI, S.C.; SANTOS, M.R.; OLIVEIRA, R. de C.; OLIVEIRA, A.P. Investigation of mechanisms involved in (-)-borneol-induced vasorelaxant response on rat thoracic aorta. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** Feb;110(2):171-7. 2012.

SILVEIRA, A.L.; GOMES, M.A.S.; SILVA FILHO, R.N.; SANTOS, M.R.V.; MEDEIROS, I.A.; BARBOSA FILHO, J.M. Evaluation of the cardiovascular effects of vasicine, an alkaloid isolated from the leaves of *Sida cordifolia* L. (Malvaceae). **Rev. bras. farmacogn.** 13: 37-39, 2003.

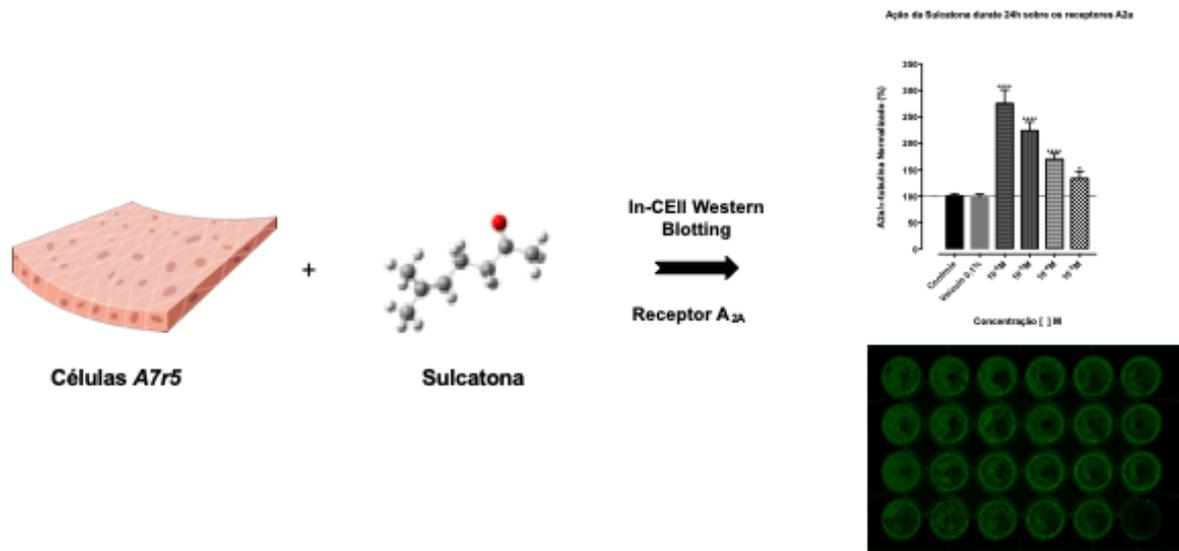
SIQUEIRA, R.J.; RODRIGUES, K.M.S.; SILVA, M.T.B.; JUNIOR, C.A.B.C.; DUARTE, G.P.; MAGALHÃES, P.J.C.; SANTOS, A.A.; MAIA, J.G.S.; CUNHA, P.J.S.; LAHLOU, S. Linalool-rich Rosewood Oil Induces Vago-vagal Bradycardic and Depressor Reflex in Rats. **Phytother. Res.** 2013.

- SOARES-SOBRINHO, J.L.; SOARES, M.F.R.; ROLIM-NETO, P.J.; LABANDEIRA, J.J.T. Physicochemical study of solid-state benzimidazole–cyclodextrin complexes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry** v. 106, n. 319–325. 2011.
- SU, J.B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. **World J Cardiol** 7(11):719-41. 2015.
- TRAYSTMAN, R.J.; MOORE, L.E.; HELFAER, M.A.; DAVIS, S.; BANASIAK, K.; WILLIAMS, M.; HURN, P.D. Nitro-L-arginine analogues dose- and time-related nitric oxide synthase inhibition in brain. **Stroke** 26:864–869. 1995.
- TRINDADE, G.G.G.; THRIVIKRAMAN, G.; MENEZES, P.P.; FRANÇA, C.M.; LIMA, B.S.; CARVALHO, Y.M.B.G.; SOUZA, E.P.B.S.S.; DUARTE, M.C.; SHANMUGAM, S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; BEZERRA, D.P.; BERTASSONI, L.E.; ARAÚJO, A.A.S. Carvacrol/ β -cyclodextrin inclusion complex inhibits cell proliferation and migration of prostate cancer cells. **Food Chem Toxicol**. Mar; 125:198-209, 2019.
- THRASHER, T.N. Baroreceptors and the long-term control of blood pressure. **Exp Physiol** 84:331–41. 2004.
- TRIPPODO, N.C.; FROHLICH, E.D. Similarities of Genetic (Spontaneous) Hypertension. **Circ Res** 48: 309-19. 1981.
- VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. **Eur. Heart J.** 18:E19–E29. 1997.
- VERBERNE, A.J.; GUYENET, P.G. Midbrain central gray: influence on medullary sympathoexcitatory neurons and the baroreflex in rats. **Am J Physiol** Jul;263(1 Pt 2): R24-33. 1992.
- WHITE, R.M.; RIVERA, C.O.; DAVISON, C.B. Differential contribution of endothelial function to vascular reactivity in conduit and resistance arteries from deoxycorticosterone-salt hypertensive rats. **Hypertension** 27:1 245–53. 1996.

CAPÍTULO 04:**ACÇÃO DA SULCATONA SOBRE OS RECEPTORES DE ADENOSINA A_{2A} EM CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DA LINHAGEM A7r5**

Márcio Edivandro Pereira dos Santos^{1,2}, Ricardo Andrade Zampieri², Sandra Márcia Muxel², Débora Rejane Fior Chadi², Sidney Gonçalo de Lima⁴, Aldeídia Pereira de Oliveira^{3,5}.

- 1- Departamento de Informação, Ambiente, Saúde e Produção Alimentícia, Instituto Federal do Piauí, Teresina, Brasil.
 - 2- Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
 - 3- Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.
 - 4- Laboratório de Geoquímica Orgânica, Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.
 - 5- Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.
- E-mail: aldeidia@gmail.com

Gráfico Resumo:

ACÇÃO DA SULCATONA SOBRE OS RECEPTORES DE ADENOSINA A_{2A} EM CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DA LINHAGEM *A7r5*

RESUMO

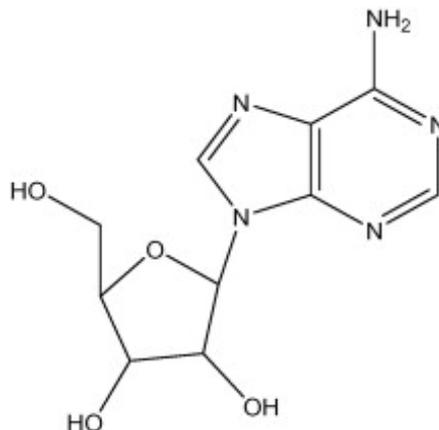
A adenosina é uma molécula de sinalização extracelular onipresente com funções essenciais na fisiologia humana. Devido à expressão generalizada dos receptores de adenosina, tem efeitos de longo alcance em muitos sistemas orgânicos diferentes. Com papel de destaque no sistema cardiovascular, tem sido amplamente estudado por suas habilidades terapêuticas e de diagnóstico. A adenosina tem efeitos de longo alcance como uma molécula sinalizadora extracelular, induzindo vasodilatação na maioria dos leitos vasculares, regulando a atividade no sistema nervoso simpático, tendo ação antitrombóticas e também reduz a pressão sanguínea e a frequência cardíaca. Tais propriedades são algumas das razões pelas quais a adenosina e seus derivados têm efeitos terapêuticos na maioria dos sistemas orgânicos. Dessa forma o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação da sulcatona sobre os receptores de adenosina A_{2A} em células de músculo liso vascular da linhagem *A7r5*. Assim primeiramente utilizamos a técnica de real time PCR para confirmar a presença de dos receptores A_{2A} nas células *A7r5*, após confirmação verificamos a ação da sulcatona sobre esses receptores bem como a ação sobre a enzima CYP1B1 utilizando o método de In-Cell Western Blotting, onde podemos verificar um aumento da expressão do receptor A_{2A} em todas as concentrações utilizadas (10^{-6} a 10^{-3} M) no período de 24 horas, e a expressão da enzima CYP1B1 foi atenuada após esse período pelo tratamento de sulcatona na concentração de 10^{-5} M no estado basal da células *A7r5*. Dessa forma concluímos que as células *A7r5* possuem receptores de adenosina do subtipo A_{2A} e mostramos pela primeira vez que a sulcatona está agindo modulando ou até mesmo diretamente nos receptores de adenosina A_{2A} em células *A7r5*, mediando o relaxamento do músculo liso vascular e consequentemente vasodilatação dos vasos sanguíneos.

Palavras Chaves: Receptor A_{2A} , Sulcatona, Células *A7r5*, CYP1B1.

1.0 - INTRODUÇÃO

A adenosina (Figura 36) é um nucleosídeo endógeno composto por adenina ligada a uma ribose. Está envolvida na formação de ácidos nucleicos que resulta da degradação do ATP no ambiente intra e extracelular pela ação de enzimas específicas e pode atuar como uma molécula de sinalização interagindo com proteínas integrais da membrana, conhecidas como receptores de adenosina ou receptores purinérgicos P_1 (BURNSTOCK, 2006). É um composto essencial da vida distribuído em vários tecidos de mamíferos (CACCIARI et al., 2005). A adenosina foi primeiramente reconhecida como um regulador fisiológico do tônus vascular coronariano por Drury e Szent-György (1929), entretanto foi até 1970 que Sattin e Rall mostraram que a adenosina regula a função celular através da ocupação de receptores específicos na superfície celular (HASKÓ et al., 2007, SATTIN; RALL, 1970). A adenosina pode deixar o espaço intracelular por exocitose, ou pode ter origem pela quebra enzimática do ATP extracelular. O ATP também pode ser gerado por neurônios e células gliais lesadas ao passar a membrana plasmática danificada (TAUTENHAHN et al., 2012).

FIGURA 36: Estrutura da adenosina.



Fonte: Sachdeva; Gupta, 2013.

Ela afeta diretamente uma variedade de processos sinápticos, vias de sinalização e desempenha um papel importante na regulação de vários neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC). Ao contrário de um neurotransmissor clássico, a adenosina não é armazenada nas vesículas sinápticas,

nem atua exclusivamente nas sinapses. Sua liberação e absorção são mediadas por transportadores de nucleosídeos bidirecionais em que a direção do transporte depende apenas do gradiente de concentração entre o citoplasma e o espaço extracelular. A adenosina é, portanto, considerada como um neuromodulador que afeta a atividade neural através de múltiplos mecanismos pré-sinápticos, controlando a liberação de neurotransmissores, pós-sinápticamente por neurônios hiper ou despolarizantes, e não sináptica principalmente via efeitos regulatórios nas células gliais (BOISON et al., 2012).

Além disso, também possui algumas características de neurotransmissor, uma vez que as enzimas produtoras de adenosina estão presentes nas sinapses. Ela exerce suas ações através da interação com receptores e suas ações podem ser bloqueadas por antagonistas específicos. Suas ações são finalizadas por um eficiente sistema de recaptura e um sistema de metabolização (CACCIARI et al., 2005).

A adenosina desempenha um papel vital em várias funções fisiológicas e está envolvida na síntese de ácidos nucleicos. Quando ligado a três grupos fosfato; forma o ATP, o componente integral do sistema de energia celular. Ela produz vários efeitos farmacológicos, tanto na periferia como no sistema nervoso central, através de uma ação em receptores específicos localizados nas membranas celulares (MATSUMOTO et al., 2012). Assim, quando produzida em ambientes hipóxicos, isquêmicos ou inflamados a adenosina reduz a lesão tecidual e promove o reparo. A produção intracelular de adenosina é aumentada durante a hipóxia ou isquemia (LINDEN, 2005). Durante o estresse celular, as concentrações intracelulares locais de aumento de adenosina, seguido pelo transporte ativo de adenosina no espaço extracelular e subsequente ativação de subtipos de receptor de adenosina (P_1) (SHUKLA; MISHRA, 1995).

O sistema adenosinérgico tem sido implicado em vários processos, como modulação da neurotransmissão, contração do músculo liso, resposta imune, tanto em condições fisiológicas quanto fisiopatológicas e possuem grande ação no sistema cardiovascular (JACOBSON; GAO, 2006).

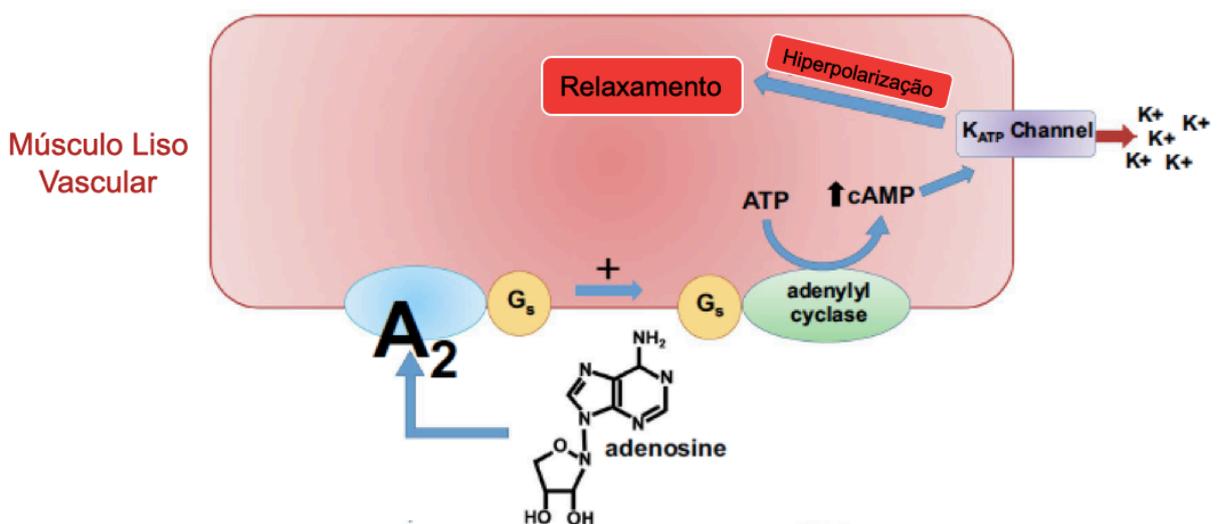
A ativação dos receptores A_1 tem vários efeitos no sistema cardiovascular, incluindo redução da frequência cardíaca e contratilidade atrial, além da atenuação das ações estimuladoras das catecolaminas no coração (FRASER et al., 2003; ZABLOCKI, et al., 2004). A ativação do receptor de adenosina A_1 por infusão

intravenosa de adenosina é usada para restaurar o ritmo cardíaco normal em pacientes com taquicardia paroxística supraventricular (PSVT) (JACOBSON; GAO, 2006).

A adenosina também é liberada em grandes quantidades durante a isquemia do miocárdio, resultando em pré-condicionamento eficaz nos cardiomiócitos através da ativação dos receptores A_1 e A_3 (AUCHAMPACH et al., 1997) A administração de um agonista sintético do receptor de adenosina para ativar um ou ambos os receptores podem, portanto, ser benéfica para a sobrevivência do coração isquêmico. Várias linhas de evidência indicam que o RA A_3 tem um papel na proteção do coração. A sobre expressão de A_3 diminui a frequência cardíaca, preserva energética e protege os corações isquêmicos. (JACOBSON; GAO, 2006).

Já o receptor A_{2A} está envolvido na vasodilatação da aorta e artéria coronária (Figura 37). Foi sugerido que o efeito taquicárdico da ativação do RA A_{2A} é mediado por receptores localizados centralmente, enquanto seu efeito hipotensor é mediado pelo A_{2A} periférico (FREDHOLM et al., 2001; JACOBSON; GAO, 2006).

FIGURA 37: Envolvimento do receptor A_2 no relaxamento do músculo liso vascular.



Fonte: Modificado de Reiss et al., 2019.

A ativação do RA A_{2B} induz vasodilatação em alguns leitos vasculares (RUBINO; RALEVIC; BURNSTOCK, 1993), este mesmo receptor é seletivamente regulado positivamente por hipóxia, e os antagonistas do RA A_{2B} neutralizam efetivamente a redução provocada pelo ATP na permeabilidade endotelial após a hipóxia (ELTZSCHIG, et al., 2003). A ativação seletiva da RA A_{2B} inibe a mitose das células do músculo liso da aorta de rato (DUBEY et al., 2000) e também são importantes para a inibição mediada pela adenosina das funções dos fibroblastos cardíacos (CHEN et al., 2004) e a estimulação da produção de óxido nítrico durante a absorção de glicose ou glutamina ligada ao Na⁺. A ativação do RA A_{2B} também promove a angiogênese aumentando a liberação de fatores angiogênicos (JACOBSON; GAO, 2006).

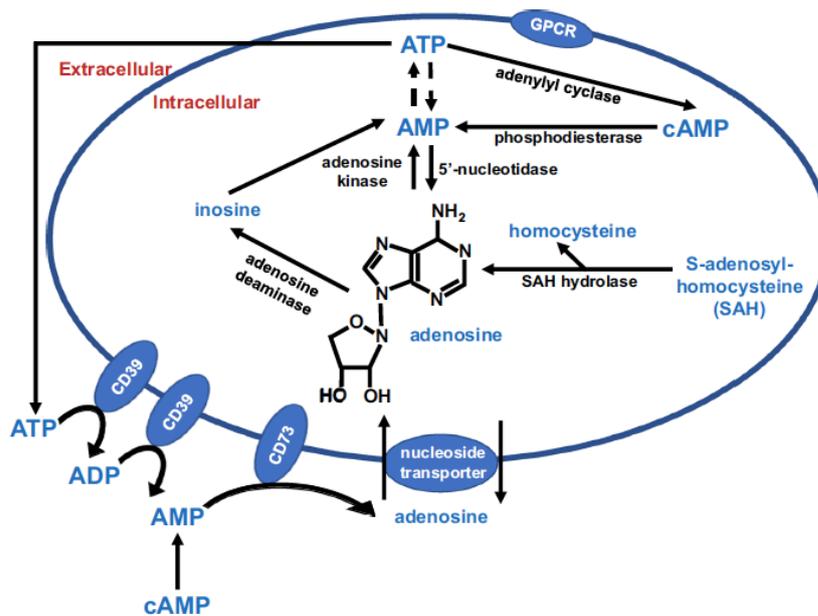
1.1 - Formação e Metabolismo da Adenosina

A adenosina é um nucleosídeo de purina endógena constitutivamente presente em baixas concentrações no espaço extracelular, que é conhecido por aumentar sob condições estressantes do ponto de vista metabólico. A razão para o aumento está relacionada à ativação de um ciclo de auto-regulação, cuja função é proteger os órgãos contra lesões após o estímulo estressante inicial (POOLSA; HOLTGATE, 2006). A adenosina é formada tanto em sítios intracelulares quanto extracelulares por duas vias distintas que envolvem dois substratos diferentes, a saber, AMP e S-adenosil homocisteína e transportados através das membranas celulares por transportadores de nucleosídeos (ZHOU et al., 2009, POULSEN; QUINN, 1998, LIVINGSTON et al., 2004).

A adenosina é liberada nos tecidos em momentos de estresse celular como hipóxia, isquemia e inflamação. Com o processo isquêmico, quando as demandas metabólicas excederem o suprimento de oxigênio, os níveis endógenos de adenosina aumentam rapidamente (ELTZSCHIG et al., 2012). A hipóxia celular é um estímulo potente para a liberação de adenosina. Adenosina é formada via desfosforilação de trifosfato de adenosina (ATP) dentro e fora da célula (HASKO et al., 2009). Isto pode ser formado intracelularmente a partir de ATP, difosfato de adenosina (ADP) ou adenosina monofosfato (AMP) por atividade das 5'-nucleotidases citoplasmáticas ou extracelularmente do ATP ou ADP pela ação sequencial do ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (ecto-NTPDase-1 [CD39]) - ou por outras NTPDases - que formam o

AMP e ecto-5'-nucleotidase (CD73), que converte AMP em adenosina. A adenosina também pode ser gerada a partir da S-adenosil-homocisteína (SAH) via SAH hidrolase (Figura 03) (REISS et al., 2019).

Um mecanismo bioquímico responsável pela produção significativa de adenosina pelo AMPc é chamado de sinalização AMPc-adenosina (ZIMMERMANN, 2000). Este caminho envolve a conversão de AMPc para AMP por uma enzima fosfodiesterase (PDE) ou exonuclease - seguida por desfosforilação de 5'-AMP por 5'-nucleotidases intra e extracelulares. A adenosina é capaz de atravessar as membranas celulares para manter o equilíbrio entre concentrações intracelulares e extracelulares. A adenosina extracelular é rapidamente absorvida em células via transportadores dependentes e independentes de sódio para metabolismo subsequente (REISS et al., 2019). A captação muito rápida da adenosina ocorre através de células endoteliais, eritrócitos, e tecidos adjacentes, onde a adenosina pode se mover através da membrana plasmática e ser utilizada dentro da célula. Depois que a adenosina é absorvida pelo endotélio, ela é fosforilada pela adenosina quinase para formar AMP ou degradada pela adenosina desaminase (ADA) em inosina (Figura 38) (ELTZSCHIG et al., 2006; REISS et al., 2019).

FIGURA 38: Síntese de adenosina e vias metabólicas dentro e fora de uma célula.

Dentro da célula, o ATP e a adenosina são continuamente reciclados, dependendo das necessidades de energia, por meio de uma série de etapas de desfosforilação e fosforilação mediadas por enzimas, como a 5'-nucleotidase citosólica (cito-5'NT), a adenosina quinase (AK) e a AMP quinase (AMPK). Sob condições fisiológicas, a enzima limitadora da taxa é AK. A adenosina também pode ser gerada a partir da hidrólise de S-adenosil-homocisteína (SAH). Em resposta à alta atividade metabólica, ATP e adenosina são extrudados para o exterior da célula por meio de difusão facilitada e transporte ativo secundário. Sob tais condições, há uma degradação adicional do ATP em adenosina, onde ele pode ativar os receptores de adenosina. O excesso de adenosina é irreversivelmente desamidado em inosina pela enzima adenosina desaminase (ADA). **Fonte:** Modificado de Reiss, et al., (2019).

1.2- Receptores de Adenosina e sua Classificação

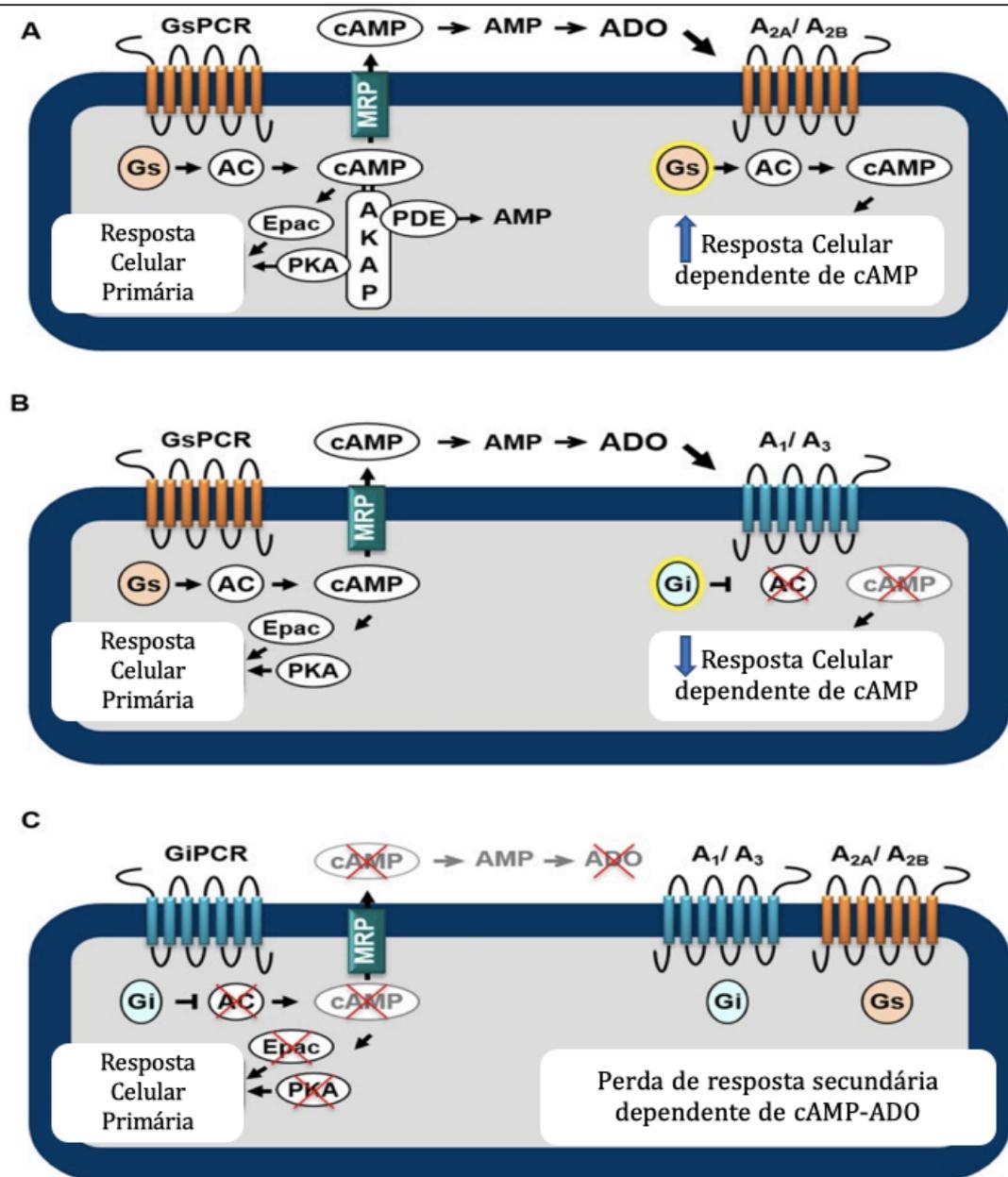
As purinas extracelulares, por exemplo, adenosina, adenosina 5'-difosfato (ADP) e adenosina 5'-trifosfato (ATP) e pirimidinas, [5'-difosfato de uridina (UDP) e 5'-trifosfato de uridina (UTP)] mediam diversos efeitos biológicos através de receptores de superfície celular denominados receptores purinérgicos. Esses receptores foram formalmente reconhecidos por Burnstock et al. em 1978. Ele classificou os purinoceptores em dois subtipos: receptores P₁ e P₂, com base em suas propriedades farmacológicas e clonagem molecular (RALEVIC; BURNSTOCK, 1991). Receptores P₁, reconhecem a adenosina como o principal ligante natural e os receptores P₂ têm

uma ampla especificidade, reconhecendo ATP, ADP, UTP, UDP e alguns dinucleotídeos. As famílias de receptores P_1 e P_2 são subdivididas de acordo com evidências moleculares, bioquímicas e farmacológicas (MATSUMOTO et al., 2012). Esses purinoceptores estão presentes na maioria dos sistemas orgânicos do corpo e desempenham um papel importante no tônus contrátil de várias artérias, incluindo as artérias cerebrais, aorta torácica, artérias mesentérica e femoral. Todos esses receptores pertencem à família classe A da super-família do receptor acoplado à proteína G (GPCR) (Figura 04) (GÖBLYÖS; IJZERMAN, 2009; GODINHO; DUARTE; PACINI, 2015).

A ativação dos receptores de adenosina (ARs) depende da presença de adenosina extracelular que pode se ligar a uma família de quatro receptores P_1 ou A, denominados A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 . Todos os quatro receptores são acoplados à proteína G, G_s ou G_i e sinalizam principalmente através da ativação (A_{2A} e A_{2B}) ou inibição (A_1 e A_3) do cAMP (Figura 39) (GODINHO; DUARTE; PACINI, 2015). Esses receptores têm uma distribuição tecidual muito ampla, realizando efeitos fisiológicos relevantes no sistema nervoso central (WEI et al., 2011), cardiovasculares (HEADRICK et al., 2013; IDZKO et al., 2014a) e sistemas músculo-esqueléticos (BURNSTOCK et al., 2013) e muitos outros tecidos (SHETH et al., 2014). A ativação da adenosina também está envolvida em condições fisiopatológicas, como câncer, inflamação (ANTONIOLI et al., 2013; IDZKO et al., 2014b) e doenças neurodegenerativas, com possíveis implicações terapêuticas para as doenças de Parkinson e Alzheimer (GODINHO; DUARTE; PACINI, 2015).

A ativação do A_1 e A_3 os receptores de adenosina (ARs) inibe a atividade da adenilil ciclase, através da ativação da proteína G_i sensível à toxina pertussis que resulta num aumento da atividade da fosfolipase C (PLC) via subunidade $G_{\beta\gamma}$. A ativação dos receptores A_{2A} e A_{2B} aumenta a atividade da adenilil ciclase através da ativação da proteína G_s . A ativação do receptor A_{2A} induz a formação de fosfato de inositol em certas circunstâncias, possivelmente através das proteínas $G_{\alpha15}$ e $G_{\alpha16}$ insensíveis à toxina pertussis G_i . Uma ativação da PLC induzida por AR A_{2B} ocorre através da proteína G_q . Sendo assim, os quatro receptores ativam a fosfolipase C e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) tendo um papel importante no crescimento, sobrevivência, morte e diferenciação celular (FREDHOLM et al., 2001; JACOBSON; GAO, 2006; GODINHO; DUARTE; PACINI, 2015).

Existe uma forte homologia entre ARs específicos em diferentes espécies e todas são glicoproteínas ligadas à asparagina com sete sequências transmembranares. O receptor A_1 compreende seis éxons (dois dos quais estão codificando) e os outros ARs têm dois éxons de codificação (OLAH; STILES, 2000; FREDHOLM et al., 2001; HASKO et al., 2005). Os receptores A_1 e A_{2A} , em particular, podem heterodimerizar com os receptores D_1 e D_2 da dopamina (KUDLACEK et al., 2003 ; FUXE et al., 2007; KIM; PALMITER, 2008) e os receptores metabotrópicos de glutamato do grupo 1 e 2 (DI LORIO et al., 1996; FERRE et al., 1999) fornecendo outro nível de controle funcional. Há também evidências que sugerem que a adenosina pode interagir ou ativar canais iônicos, como canais de cálcio dos tipos L e N (MEI et al., 1996), canais de cálcio dependentes de voltagem (CHIENG; BEKKERS, 2001; MCCOOL; FARRONI, 2001) e canais K^+ (PAISANSATHAN et al., 2010). RAs são amplamente expressos, e têm diferentes afinidades para a adenosina, os receptores A_1 e A_{2A} são até um certo ponto os receptores de elevada afinidade ($K_m < 30$ nM), enquanto que a A_3 e particularmente o receptor A_{2B} são receptores de baixa afinidade (K_m 1-20 μ M) Assim, é provável que os receptores A_{2B} e A_3 sejam ativados apenas sob condições celulares metabólicas e estressantes elevadas (FREDHOLM et al., 2001).

FIGURA 39: Vias de sinalização dos receptores de Adenosina.

A ativação de receptores acoplados à proteína Gs (GsPCR) leva à estimulação da adenilil ciclase (AC) e ao aumento da geração de cAMP, que podem provocar resposta celular localizada via ativação de efetores como PKA ou Epac (A, B), organizados em microdomínios através de proteínas de ancoragem, como AKAP. O cAMP pode ser hidrolisado por fosfodiesterases intracelulares (PDEs) ou sair da célula via proteínas de resistência a múltiplas drogas (MRPs). Fora da célula, a ecto-PDE e a ecto-5'nucleotidase convertem sequencialmente cAMP em AMP e adenosina (ADO), que podem ativar A_{2A}/A_{2B} (A) ou A₁/A₃ (B) acoplado a receptores Gs, aumentando ou atenuando a produção de AMPc, respectivamente. Além disso, a ativação de receptores acoplados à proteína Gi (GiPCR) resulta na inibição de ACs sensíveis a Gi, reduzindo a geração e o fluxo de AMPc (C), com consequente perda de sinalização de feedback autócrino/parácrino de AMPc extracelular. **Fonte:** Modificado de Godinho; Duarte; Pacini, 2015.

1.2.1 - Receptores de Adenosina A₁

A₁R é o receptor de adenosina mais abundante e densamente expresso ao longo do SNC com alta abundância no neocórtex, cerebelo, hipocampo e corno dorsal da medula espinhal e também é encontrado no tecido adiposo, músculo cardíaco, células inflamatórias como neutrófilos (TOWNSEND-NICHOLSON et al., 1995; OLAH; STILES, 1995). A adenosina é a principal agonista nesta classe de receptor e estes receptores possuem uma afinidade elevada para os análogos de adenosina substituídos na posição N₆ (LIVINGSTON et al., 2004). Os receptores A₁ estão envolvidos na inibição da adenilato ciclase. A ativação do receptor A₁ também pode inibir a ativação dos canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem acoplados proteína G e também atuam ativando a fosfolipase C (YUZLENKO; KONONOWICZ, 2006).

1.2.2. - Receptores de Adenosina A₂

Em contraste com o subtipo A₁, a estimulação do subtipo A₂ leva à ativação da adenilato-ciclase resultando na elevação de AMPc intracelular. Os receptores A₂ são mais amplamente distribuídos que os receptores A₁, sendo encontrados em terminais nervosos pré e pós-sinápticos, mastócitos, músculo liso das vias aéreas e leucócitos circulantes. Eles ligam a adenosina com menos afinidade que os receptores A₁ e são preferencialmente estimulados por análogos de adenosina substituídos na posição 5'-N, por exemplo, 5'- N- etilcarboxamideadenosina (NECA). Os receptores A₂ são subdivididos em receptores A_{2A} e receptores A_{2B}, baseados em alta e baixa afinidade pela adenosina, respectivamente (LIVINGSTON et al., 2004).

Os receptores de adenosina A_{2A} são abundantes no putâmen caudado, no nucleus accumbens e no tubérculo olfativo em várias espécies. No putâmen caudado, os receptores de adenosina A_{2A} estão localizados em vários neurônios e demonstraram modular a neurotransmissão do ácido γ-aminobutírico (GABA), acetilcolina e glutamato. Na maioria dos tipos celulares, o subtipo A_{2A} inibe os níveis intracelulares de cálcio, enquanto o A_{2B} os potencializa. O receptor A_{2A} é um alvo terapêutico para a vasodilatação coronária (agonista da adenosina); e doença de Parkinson (antagonista da adenosina) (YUZLENKO; KONONOWICZ, 2006, FREDHOLM et al., 2002). O receptor A_{2A} geralmente parece inibir a liberação de mediadores dessas células imunológicas (BORRMANN et al., 2009).

Os receptores A_{2B} são altamente expressos no trato gastrointestinal, na bexiga, no pulmão e nos mastócitos. O receptor A_{2B} , embora estruturalmente relacionado ao receptor A_{2A} , ele é capaz de ativar a adenilato ciclase, de forma muito diferente. Foi postulado que este subtipo pode utilizar sistemas de transdução de sinal diferentes da adenilato ciclase devido a estas diferenças funcionais (LIVINGSTON et al., 2004). Entre todos os receptores de adenosina, o receptor de adenosina A_{2B} é um receptor de baixa afinidade que se acredita permanecer em condições fisiológicas e ser ativado em consequência do aumento dos níveis de adenosina extracelular (RYZHOV et al., 2008).

1.2.3 - Receptor de adenosina A_3

O receptor A_3 é distribuído amplamente, sendo encontrado no rim, testículo, pulmão, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, coração e no córtex cerebral (LIVINGSTON et al., 2004). Tal como acontece com o receptor A_1 , estimulação do receptor A_3 conduz à inibição da adenilato-ciclase e estimula diretamente as fosfolipases C e D. A ativação do receptor A_3 também resulta no influxo de cálcio e sua liberação de reservas intracelulares (JACOBSON, 1998).

Os receptores de Adenosina A_1 e A_{2A} são caracterizados por alta afinidade pela adenosina, enquanto os receptores A_{2B} e A_3 apresentam afinidade significativamente menor pela adenosina. A ativação dos receptores A_1 da adenosina ocorre na concentração de 0.3–3 nM de adenosina, receptores A_{2A} da adenosina em 1-20 nM, enquanto a ativação do receptor A_{2B} ou A_3 da adenosina requer uma concentração de agonista maior que 1 μ M (CIESLAK et al., 2008). Os receptores de adenosina são alvos atraentes para a intervenção terapêutica de uma ampla gama de distúrbios, como a hipóxia, asma, doença de Parkinson e muitos outros. Entre os quatro subtipos, o receptor A_{2B} é funcionalmente ativo tanto nas células musculares lisas das vias aéreas humanas quanto nas células fibroblásticas pulmonares, o que está relacionado à inflamação e asma (FREDHOLM et al., 2002).

Diante do exposto este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da sulcatona sobre os receptores de adenosina do subtipo A_{2A} em células de músculo liso vascular da linhagem A7r5.

2.0 - MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas a linhagem celular A7r5 (derivada do músculo liso de aorta de rato), obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (código 0034). Todo processo cultivo, expansão e quantificação celular foram realizados conforme o Capítulo 02 da presente Tese.

2.1- Drogas e Reagentes

As drogas utilizadas nesse estudo foram 6-metil-5-hepten-2-ona (Sigma-Aldrich, USA), Acetona (Synth, Brasil), Albumina Bovina (BSA) e Anticorpo CYP1B1 (Sigma-Aldrich, USA), Clorofórmio, Isopropanol, Etanol 75%, Dietil Pirocarbonato (DEPC), Tween 80 (Fisher Scientific, EUA), Tween 20 (Fisher Scientific, EUA) Trypan Blue 0,4% (GIBCO/Invitrogen, USA), Trizol (Invitrogen, USA), Metanol (Ls Chemicals, Brasil). Na preparação das soluções estoques a Sulcatona (6-metil-5-hepten-2-ona) foram diluídos em Tween 80 (0,05% v/v), para todos os experimentos *in vitro*. Todas as soluções estoques foram mantidas à -20°C.

2.2 - Análise da Expressão de mRNA dos receptores A1 e A_{2A} em células A7r5 por PCR em tempo real (RT- qPCR – Reverse Transcription – quantitative PCR)

O RNA total de cultura de células A7r5 foi obtido com a utilização do reagente Trizol (Invitrogen), conforme instruções do fabricante, foram utilizadas placas de 06 poços e as células na proporção de 10⁶ céls/poço.

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando a enzima MultiScribe (AB, applied biosystems, Lithuania) e oligo (dT) e dNTPs em um volume final de 20 µL conforme o protocolo do fabricante, utilizando o termociclador NyxTechniK, programa utilizado para a transcrição reversa está descrito na Tabela 01. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a sua utilização.

TABELA 04: Programa utilizado no termociclador NyxTechnik para realização do cDNA.

Ciclos	Temperatura/ Tempo
1º	25 °C – 10 min
2º	37 °C – 120 min
3º	85 °C – 5 min
4º	4 °C – Hold (∞)

O cDNA (20 ng/ml) foi adicionado a uma placa de reação junto com uma mistura contendo os iniciadores específicos, água deionizada autoclavada e tampão SYBR Green PCR Master Mix (Sigma-Aldrich). A quantificação da expressão dos genes foi realizada no aparelho de Real-Time PCR: PikoReal 96 (Thermo Scientific), que detecta mudanças na concentração das amostras por fluorescência. Após desnaturação inicial à 50° C por 2 minutos e à 95° C por 10 minutos.

O gene AIF foi utilizado como controle interno nas reações de amplificação:

AIF – forward: 5' - TGATGCTGGGCAAGAGATCTGCC – 3';

AIF – reverse: 5' – CCTCCAATTAGGGCAACTCAGAAATAG – 3'.

Foram utilizados primers dos genes ADORA1 E ADORA2 com os seguintes iniciadores:

A1 – forward: 5' – GGATCGATACCTCCGAGTCAAGAT – 3';

A1 – reverse: 5' – ATCCAGCAGCCAGCTATGGCC – 3';

A2 – forward: CTACATCGCCATCCGAATTCCACT – 3';

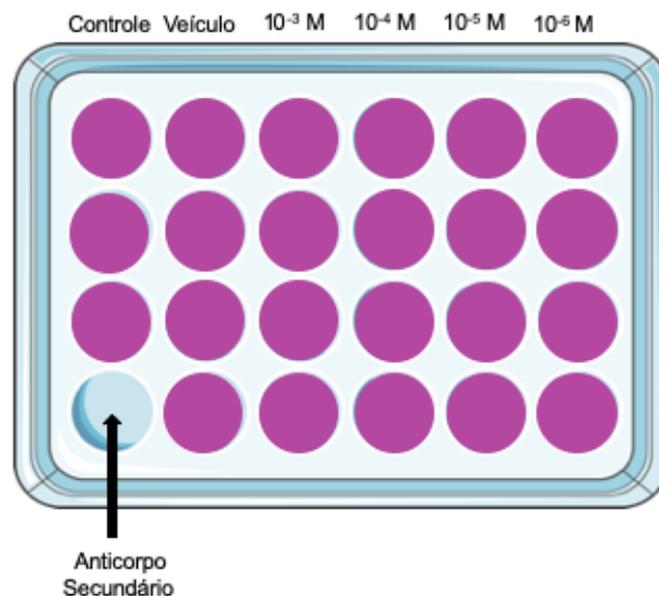
A2 – reverse: CGCCCTCACACCTGTCACCAA – 3'.

No presente trabalho, utilizamos o método de quantificação relativa das amostras que descreve as mudanças na expressão do gene alvo no grupo experimental em relação à expressão do grupo controle, que foi considerado como 1. Os níveis relativos de RNAm foram determinados pela comparação do limiar (threshold) dos ciclos (Ct, do inglês cycle threshold) de PCR entre os grupos. A normalização pelo controle interno, cuja expressão não se altera nas diferentes manipulações do estudo, foi feita subtraindo o valor do Ct do gene em estudo do valor do Ct do AIF e esses valores obtidos foram submetidos à fórmula $2^{-\Delta Ct}$ (Cordeiro et al., 2013) e em seguida às análises estatísticas.

2.3 - Quantificação da expressão do Receptor A_{2A} após tratamento com Sulcatona Via In-Cell Western Blotting

Para analisar a expressão do receptor de adenosina A_{2A} , utilizou-se o ensaio In-Cell Western adaptado do protocolo de Muxel et al., (2017). As células foram plaqueadas em placas de 24 poços com uma densidade de 2×10^5 céls/poço e tratadas com Sulcatona nas concentrações de 10^{-6} a 10^{-3} M durante 24 horas de acordo com o esquema da figura 40.

FIGURA 40: Esquema do tratamento utilizado nas placas de 24 poços para o In-Cell Western Blotting. Legenda: Controle, Veículo (Tween 80 0,05%), Sulcatona nas concentrações de 10^{-6} a 10^{-3} M.



Em seguida as células foram fixadas com metanol/acetona (1:1; 15 min à 20° C) e lavadas 3x com PBS 1x, seguindo da permeabilização com 0,05% Tween 20 em PBS 1X por 30 min. Posteriormente foram bloqueadas com BSA 3% por 1 hora à temperatura ambiente em agitador com posterior lavagem 3x com PBS 1x. Então foram incubadas com anticorpo primário (PBS plus 0.01% Tween 20) overnight à 4°C.

Os anticorpos secundários anti-rabbit IRDye 800CW e anti-mouse Alexa-Fluor 680CW foram diluídos (1:5000) em solução de bloqueio e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram escaneadas com o sistema de análise de imagens em infravermelho Odissey (LI-COR Biosciences, Alemanha) nos canais 700 e 800nm simultaneamente em configurações padrão para a In-Cell Western.

E foram calculados a intensidade relativa da fluorescência do A_{2A} normalizando com os valores por fluorescência da α -tubulina usando o software de imagem (LICOR).

- Anticorpos primários:

- α -tubulina 1:3000 (anti-mouse) – Sigma-Aldrich, USA.
- A_{2A}: 1:100 (anti-rabbit) - Sta-Cruz, USA.

- Anticorpos secundários:

- Alexa Flúor 680 donkey anti-mouse (1:5000) – Life Technologies, USA.
- Goat anti-rabbit 800 (1:5000) - LI-COR Biosciences, Alemanha.

2.4 - Quantificação da expressão da enzima Citocromo P450 1B1 (CYP1B1) após tratamento com Sulcatona Via In-Cell Western Blotting

Para analisar a expressão da CYP1B1, utilizou-se o ensaio In-Cell Western adaptado do protocolo de Muxel et al., (2017) de acordo com o item 2.4. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços com uma densidade de 2×10^5 céls/poço poço e tratadas com Sulcatona nas concentrações de 10^{-8} a 10^{-5} M durante 24 horas de acordo com o esquema na figura 40.

Para este protocolo verificamos a ação da sulcatona sobre expressão da enzima CYP1B1 no estado basal.

Os anticorpos utilizados foram:

- Anticorpos primários:

- α -tubulina 1:3000 (anti-mouse) - Sigma-Aldrich, USA.

- CYP1B1: 1:500 (anti-rabbit) - Sigma-Aldrich, USA.

- Anticorpos secundários:

- Alexa Flúor 680 donkey anti-mouse (1:5000) - Life Technologies, USA.

- Goat anti-rabbit 800 (1:5000) - LI-COR Biosciences, Alemanha.

3.0 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Resultados foram expressos como media \pm erro padrão das medias. A estatística foi realizada utilizando o Test-t *Student* não pareado ou anova one-way seguida do pos-test de Tukey. Nas análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os procedimentos foram analisados utilizando o programa Graph Pad Prism 6.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

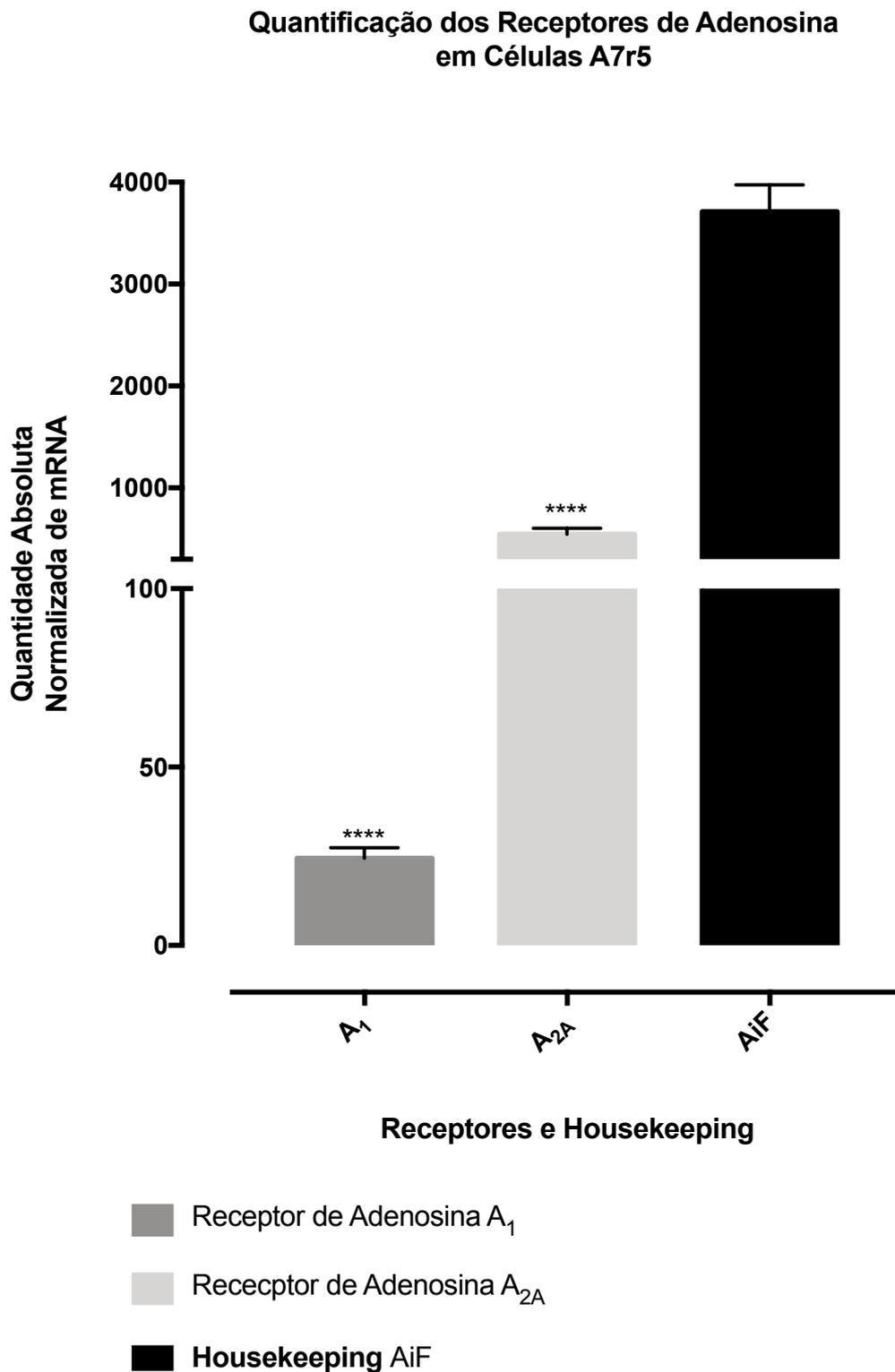
4.0 - RESULTADOS

4.1- Presença dos Receptores de Adenosina A_{2A} nas células A7r5 pela técnica de Rt-qPCR

Primeiramente foi realizado uma ampla investigação na literatura sobre a presença dos receptores nas células A7r5, porém não foi encontrado nenhum trabalho que mostrasse de fato a presença deles nesse tipo celular. De posse dessa informação investigamos a presença dos receptores A₁ e A_{2A} nessas células de músculo liso de aorta torácica de ratos, pois a ativação dos receptores, especificamente, do subtipo A_{2A} nas células musculares lisas acarreta a vasodilatação (JACOBSON; GAO, 2006).

Sendo assim a figura 41 abaixo mostra a quantidade absoluta normalizada em relação ao housekeeping AIF ($3709 \pm 264,5$ n =8), do mRNA dos receptores A₁ ($24,42 \pm 2,95$, n=8) e A_{2A} ($545,8 \pm 57$, n=8). Mostrando assim a presença considerável dos receptores A_{2A} em relação ao A₁ nesse tipo de linhagem celular, dessa forma dando confiabilidade em prosseguir nossos estudos em função do receptor A_{2A}. Resultados esses que também foram confirmados pela técnica de In-Cell Western Blotting mostrando a presença dos receptores A_{2A} na referida linhagem celular.

FIGURA 41: Quantificação dos Receptores de Adenosina em células A7r5. Os dados foram expressos como média \pm e.p.m. A significância estatística foi determinada com base no Teste *t de Student* não pareado. * $p < 0,05$. Receptores de Adenosina A₁ e A_{2A} vs Controle

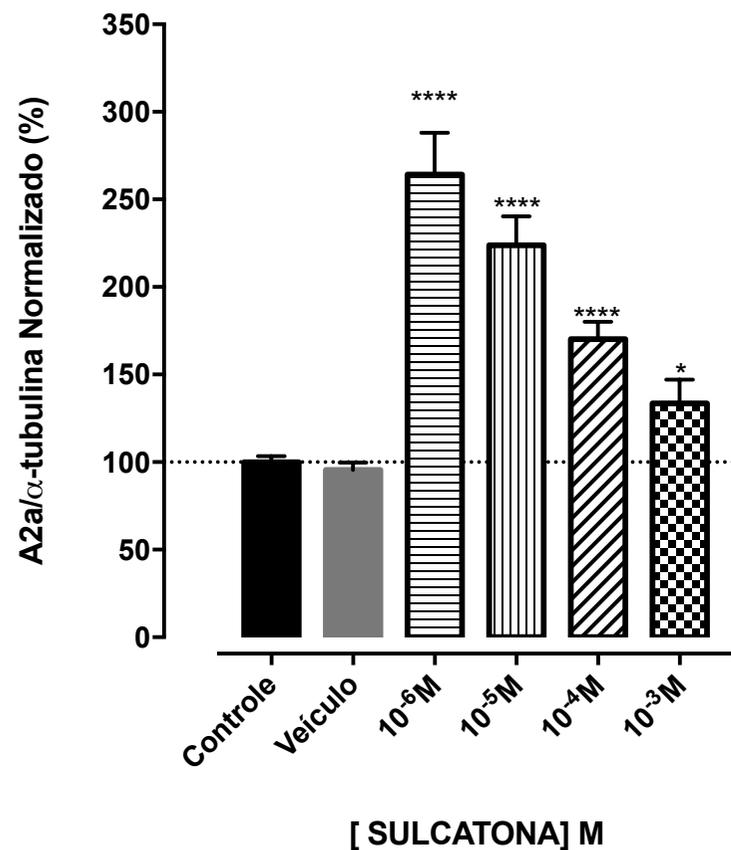


4.2 - Expressão do Receptor de adenosina A_{2A} após tratamento com Sulcatona Via In-Cell Western Blotting

Com objetivo de verificar a expressão do receptor de adenosina A_{2A} em Células A7r5 provenientes de músculo liso de aorta de ratos embrionários (2x10⁵ células/poço) foi realizado tratamento com Sulcatona durante um período de 24 horas em diferentes concentrações (10⁻⁶ a 10⁻³ M).

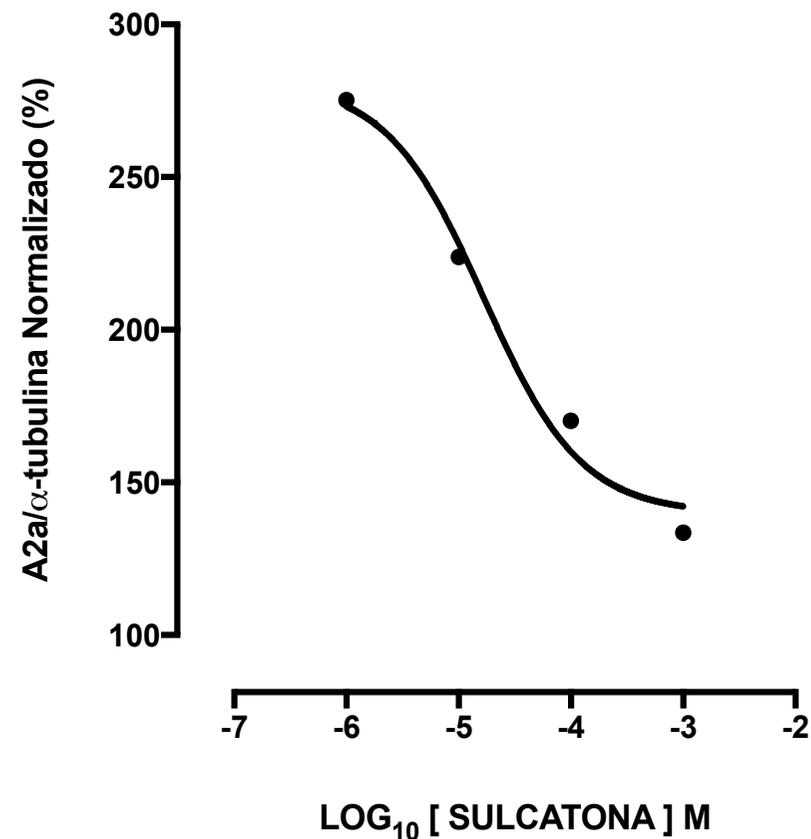
Na figura 42A, o estímulo com Sulcatona aumentou o a expressão do receptor de adenosina A_{2A} de maneira dependente da concentração: 10⁻³ M: 133,5 ± 13,61, n=4; 10⁻⁴ M: 170,2 ± 9,836, n=5; 10⁻⁵ M: 223,8 ± 16,5, n=6 e 10⁻⁶ M: 275,3 ± 25,8, n=5) quando comparado com o controle (99,99 ± 4,928, n=7) sendo que o veículo (Tween 80 0,05%: 98,53 ± 5,98, n=6) não interferiu na resposta como mostrada na figura.

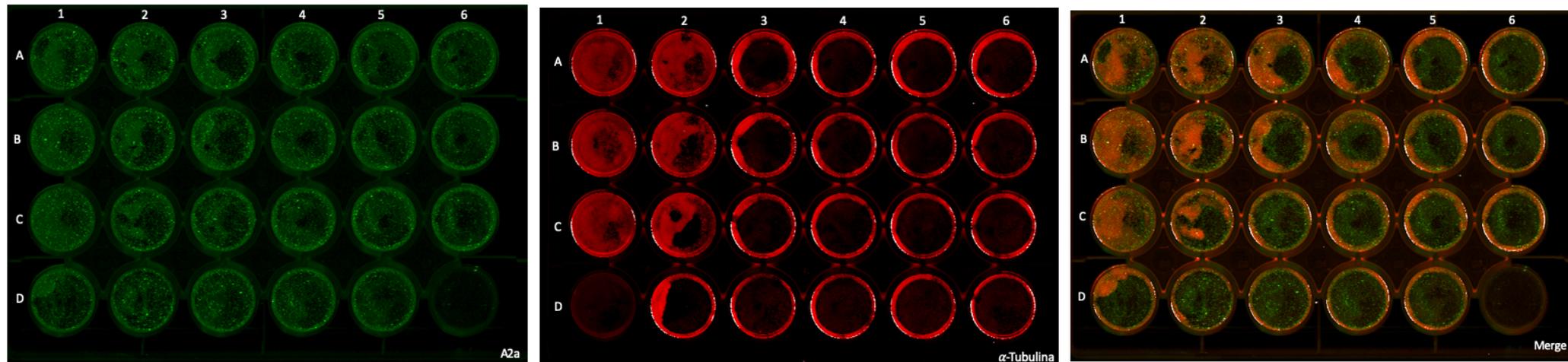
A figura 42B, mostra a regressão linear da resposta das diferentes concentrações de Sulcatona.

FIGURA 42: Expressão do receptor de adenosina A_{2A} após tratamento com Sulcatona Via In-Cell Western Blotting.A) Ação da Sulcatona durante 24h sobre os receptores A_{2A} 

B)

Regressão Não Linear Dose Resposta





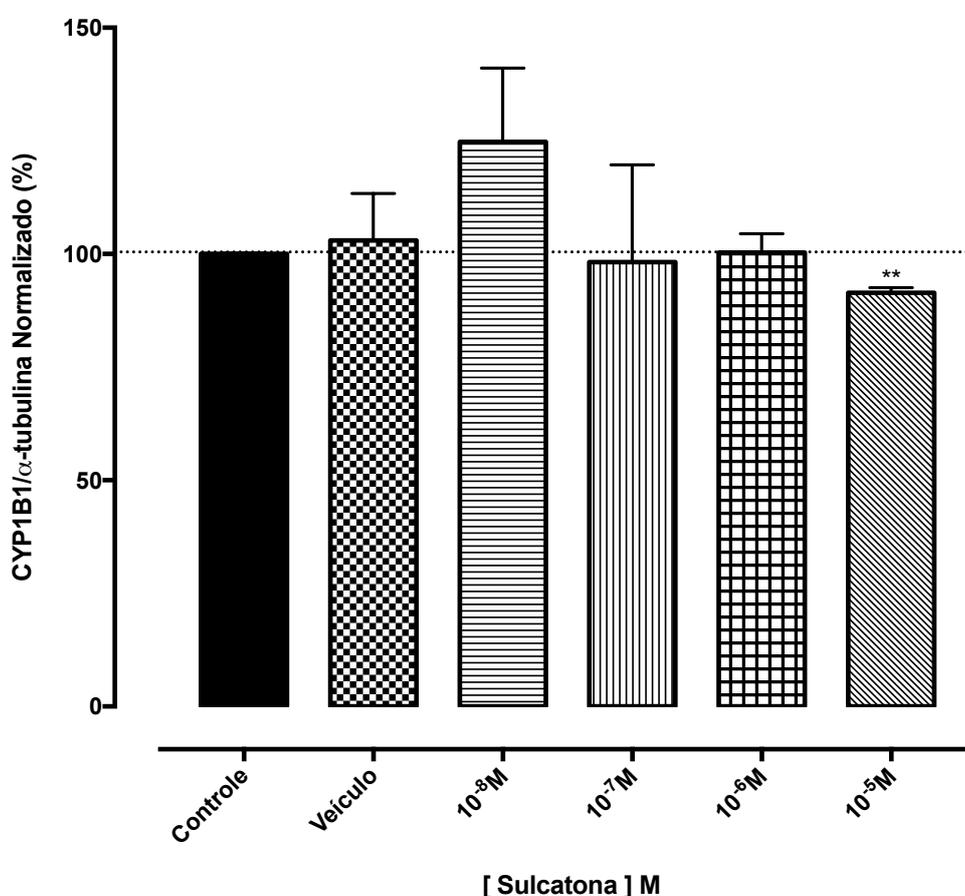
As células A7r5 foram cultivadas em placa de 24 poços e submetidos aos seguintes tratamentos: Controle negativo (poços 1A-C), Veículo - Tween 80 0,05% (poços 2A-D), Sulcatona 10^{-3} M (poços 3A-D), Sulcatona 10^{-4} M (poços 4A-D), Sulcatona 10^{-5} M (poços 5A-D) e Sulcatona 10^{-6} M (poços 6A-C). Após 24 horas de tratamento, as amostras foram analisadas quanto a expressão do receptor de adenosina A_{2A} e Alfa-tubulina pela técnica do In-Cell Western. Imagem Verde; ligação do anticorpo do receptor A_{2A} (rabbit) com o anticorpo secundário anti-rabbit (800nm). Imagem Vermelha: ligação do anticorpo da α -tubulina (mouse) com anticorpo secundário Alexa Flúor anti-mouse (680nm). Imagem Amarela (merge): mesclado da fluorescência adquirida em 800 e 700 nm. Figura A: Cada barra representa a média \pm SEM dos valores de A_{2A} / α -tubulina normalizados (n = 4-7). A significância estatística foi determinada com base no Teste *t de Student* não pareado. *p <0,05, comparando as células A7r5 tratadas com Sulcatona e o controle negativo. Os poços 6D e 1D são os controles de anticorpo secundário (sem incubação com anticorpo primário). Figura B: Regressão não-linear dose resposta dos grupos tratados com Sulcatona comparados com o controle negativo.

4.3 - Ação da Sulcatona sobre a proteína CYP1B1 no estado basal de células A7r5 via In-Cell Western Blotting.

Com objetivo de verificar a expressão da enzima CYP1B1 no estado basal em células da linhagem A7r5 provenientes de músculo liso de aorta de ratos embrionários (2×10^5 células/poço) foi realizado tratamento com Sulcatona durante um período de 24 horas em diferentes concentrações (10^{-8} a 10^{-5} M).

Após 24 horas de tratamento com Sulcatona nas concentrações (10^{-8} a 10^{-5} M), houve alteração na expressão da enzima CYP1B1, na concentração de 10^{-5} M, como mostrado na Figura 43.

FIGURA 43: Ação da Sulcatona sobre a proteína CYP1B1 no estado basal de células A7r5 via In-Cell Western Blotting.



Cada barra representa a média \pm SEM dos valores de CYP1B1/ α -tubulina normalizados ($n = 4$). A significância estatística foi determinada com base no Teste *t de Student* não pareado. ** $p < 0,01$, comparando as células A7r5 tratadas com Sulcatona e o controle negativo.

5.0 – DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar os possíveis efeitos farmacológicos da sulcatona sobre os receptores de adenosina em células de músculo liso vascular da linhagem *A7r5*. Este estudo se torna essencial pois o sistema de receptores de adenosina é importante na regulação da pressão arterial, bem como são importantes no processo de relaxamento do músculo liso vascular, implicando de certa forma no possível tratamento da hipertensão arterial sistêmica.

Após uma vasta procura na literatura sobre os efeitos da adenosina em células de músculo liso vascular *A7r5*, esse presente capítulo propôs verificar os possíveis efeitos da Sulcatona sobre os receptores de adenosina A_{2A} , subtipo esse é importante na regulação do fluxo sanguíneo, pois na literatura não consta nenhum trabalho mostrando essa possível ação neste tipo específico de célula.

Sendo assim, confirmamos primeiramente a presença dos receptores A_{2A} nas células de músculo liso vascular *A7r5*. Para tal objetivo, utilizamos da técnica de real time PCR, onde na Figura 41, confirmamos a presença desse subtipo de receptor em maior abundância quando comparado com o receptor A_1 nas mesmas células de músculo liso vascular.

Diante desse resultado, verificamos o possível efeito da Sulcatona sobre os receptores A_{2A} , na qual observamos de acordo com a Figura 42 que após 24 horas o tratamento com Sulcatona de forma dependente da concentração foi capaz de aumentar a expressão dos receptores A_{2A} , principalmente na menor concentração utilizada de 10^{-6} M, mostrando dessa forma que a mesma possa estar modulando ou agindo sobre esses receptores nas células *A7r5*, a ativação desses receptores no músculo liso vascular acarreta vasodilatação e conseqüentemente queda da pressão arterial.

A adenosina é conhecida por induzir a vasodilatação nos tecidos vasculares, um efeito classicamente atribuída aos receptores A_2 nas células do músculo liso vascular, o que leva a um aumento do fluxo sanguíneo e oxigenação (BRYAN; MARSHALL, 1999) No entanto, as evidências também tem demonstrado que os receptores do adenosina A_2 podem mediar a vasodilatação de forma dependente do óxido nítrico (MUSTAFA et al., 2009; TABRIZCHI; BEDI, 2001). De fato, em estudos mais recentes, demonstrou-se que ativação dos receptores A_1 e A_{2A} em células

endoteliais promove a produção de NO e, conseqüentemente, a vasodilatação mediada por NO (DUBEY et al., 1996).

Este é um mecanismo particularmente importante para combinar o fluxo sanguíneo coronário às necessidades metabólicas do coração. No músculo liso vascular, a adenosina se liga aos receptores de adenosina A_{2A} , que são acoplados à proteína Gs. A ativação desta proteína G estimula a adenilil ciclase, aumenta o cAMP e causa a ativação da proteína quinase A (PKA), que promove a atividade da fosfatase e desfosforilação da cadeia leve de miosina e diminuição da força contrátil, levando assim ao relaxamento do músculo liso. O aumento do cAMP também estimula os canais K_{ATP} , que hiperpolariza o músculo liso, causando relaxamento do músculo liso (BILLINGTON, et al., 2013; YUAN; LOPEZ BERNAL, 2007). Há também evidências de que a adenosina inibe a entrada de cálcio na célula através dos canais de cálcio do tipo L. Como o cálcio regula a contração muscular lisa, a redução do cálcio intracelular causa relaxamento. Em alguns tipos de vasos sanguíneos, há evidências de que a adenosina produz vasodilatação através do aumento do cGMP, o que leva à inibição da entrada de cálcio nas células e à abertura dos canais de potássio (CHALLIS et al., 2000; YUAN; LOPEZ BERNAL, 2007).

Diante desses resultados podemos constatar que as células A7r5 possuem receptores de adenosina do subtipo A_{2A} e sugerir pela primeira vez que a sulcatona esteja agindo modulando ou até mesmo agindo diretamente nos receptores de adenosina A_{2A} em células A7r5, mediando o relaxamento do músculo liso vascular e conseqüentemente vasodilatação dos vasos sanguíneos como verificado pela técnica inCell Western Blotting.

Também verificamos o possível efeito da sulcatona sobre a enzima citocromo CYP1B1, esta enzima é importante pois ela é expressa no sistema cardiovascular, principalmente nas células do músculo liso vascular e segundo Jennings et al., 2014, o aumento do estresse oxidativo gerado pelo CYP1B1 contribui para a hipertensão, aumento da produção de citocinas e atividade simpática e alterações fisiopatológicas associadas no SHR, bem como a enzima CYP1B1 pode ser um novo alvo para o desenvolvimento de medicamentos para tratar a hipertensão e sua patogênese.

A CYP1B1 é um membro da família da enzima citocromo P450, subfamília B, polipeptídeo 1, foi clonado em 1994 (MALIK et al., 2012; SONG et al., 2016) a partir de células de queratinócitos humanos tratados com tetracloro-dibenzo-1/2-dioxina e

atualmente é o único membro conhecido da família CYP1B, ele é expresso em vários tecidos não hepáticos, incluindo o sistema cardiovascular (MALIK et al., 2012; SONG et al., 2016). Embora o CYP1B1 seja expresso em tecidos normais e seja constitutivamente ativo, sua expressão é aumentada em várias células cancerígenas, particularmente células sensíveis aos esteróides (KORASHY; EL-KADI, 2006; McFAYDEN; MELVIN; MURRAY, 2004) Vários hidrocarbonetos aromáticos policíclicos pró-carcinogênicos que são metabolizados pelo CYP1B1 também aumentam sua expressão em vários tecidos, incluindo o coração, rim e células vasculares (KORASHY; EL-KADI, 2006; RYU; HODGSON, 1999). Nos vasos sanguíneos, o CYP1B1 é expresso principalmente nas células do músculo liso vascular (CMLVs), com expressão muito baixa nas células endoteliais, e é aumentado pelo estresse de cisalhamento (CONWAY et al., 2009). No entanto, o CYP1B1 também é expresso nas células endoteliais da retina, onde está envolvido na angiogênese em resposta à hipóxia (TANG et al., 2009). O CYP1B1 é constitutivamente ativo e pode metabolizar vários substratos, incluindo ácidos graxos, esteróides e retinóides (CHOUDHARY et al., 2004). Ele também metaboliza pro-carcinógenos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, que promovem o desenvolvimento de tumores e aterosclerose e resultam na formação de adutos de DNA nas CMLVs (SONG et al., 2016).

Porém ao avaliarmos a ação da sulcatona durante 24 horas sobre a enzima CYP1B1 em células do músculo liso vascular no estado basal, houve uma atenuação da expressão da enzima CYP1B1 (Figura 43) na concentração de 10^{-5} M. Sabe-se que os níveis de arginina vasopressina (AVP), catecolaminas e endotelina-1 (ET-1) contribuem para a hipertensão (JENNINGS et al., 2012). Estes agentes também ativam a fosfolipase A_2 e liberam ácido araquidônico (AA) a partir de fosfolípidos (TREVISI et al., 2002). Metabólitos de AA gerados via lipoxigenase (LO) ou citocromo P450 (CYP) estão presentes em ratos espontaneamente hipertensos (MUTHALIF et al., 2000). O metabolismo do AA também resulta na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) que causam disfunção endotelial e contribuem para o desenvolvimento de vários modelos de hipertensão (JENNINGS et al., 2012).

Segundo Jennings et al., 2012, a CYP1B1 pode metabolizar AA *in vitro* em ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) e ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) contribuindo para o crescimento de células musculares lisas induzidas por Ang II,

hipertensão e alterações fisiopatológicas associadas como disfunção renal e lesão de órgão terminal.

Dessa forma, podemos constatar que a Sulcatona esteja agindo modulando a enzima CYP1B1 contribuindo para o tratamento da hipertensão arterial, o que foi verificado em estudos realizados no Capítulo 03, mostrando sua ação anti-hipertensiva em ratos SHR.

6.0. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que:

- Verificamos a presença dos receptores de adenosina A_{2A} em células de músculo liso vascular (A7r5).

- A sulcatona age diretamente ou modulando os receptores de adenosina A_{2A} em células de músculo liso vascular (A7r5) em todas concentrações que foram utilizadas (10^{-6} a 10^{-3} M).

- No estado basal a sulcatona foi capaz de atenuar a expressão da enzima CYP1B1 na concentração de 10^{-5} M.

7.0 - AGRADECIMENTOS

Somos gratos ao IFPI (Instituto Federal do Piauí), RENORBIO-UFPI (Rede Nordeste de Biotecnologia - Universidade Federal do Piauí, Brasil), IB/USP (Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo) ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil- Bolsa Doutorado Sanduiche no país; processo N - 300261/2018-7), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) – Projeto PPSUS-DCIT 2016/FAPEPI/CNPq pelo apoio financeiro ao desenvolvimento desse trabalho.

REFERÊNCIAS

- ANTONIOLI, L.; BLANDIZZI, C.; PACHER, P.; HASKO, G.. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. **Nat. Rev. Cancer** 13 842–857. 2013.
- AUCHAMPACH, J.A.; RIZVI, A.; QIU, Y.; TANG, X.L.; MALDONADO, C.; TESCHNER, S.; BOLLI, R. Selective activation of A₃ adenosine receptors with N⁶-(3-iodobenzyl) adenosine-5'-N-methyluronamide protects against myocardial stunning and infarction without hemodynamic changes in conscious rabbits. **Circ. Res.** 80:800–809. 1997.
- BILLINGTON, C.K.; OJO, O.O.; PENN, R.B.; ITO, S. cAMP regulation of airway smooth muscle function. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, 26(1), 112–120. 2013.
- BLACKBURN, M. R. Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. **Trends Pharmacol. Sci.** 24 66–70. 2003.
- BOISON, D.; SINGER, P.; SHEN, H.Y.; FELDON, J.; YEE, B.K. Adenosine hypothesis of schizophrenia—Opportunities for pharmacotherapy. **Neuropharmacology**. 62:1527–1543. 2012.
- BORRMANN, T.; HINZ, S.; BERTARELLI, D.C.G.; LI, W.; FLORIN, N.C.; SCHEIFF, A.B.; MULLER, C.E. 1-Alkyl-8-(piperazine-1-sulfonyl) phenylxanthines: development and characterization of adenosine A receptor antagonists and a new radioligand with subnanomolar affinity and subtype specificity. **J. Med. Chem.** Jul 9;52(13):3994-4006, 2009.
- BRYAN, P.T.; MARSHALL, J.M. Adenosine receptor subtypes and vasodilatation in rat skeletal muscle during systemic hypoxia: A role for A1 receptors. **J. Physiol.** 514((Pt 1)):151–162. 1999.
- BURNSTOCK G. Novartis Foundation Symposium. Volume 276. John Wiley; Chichester, UK: **Purinergic signalling**—An overview; pp. 26–48, 2006.
- BURNSTOCK, G., ARNETT, T.R.; ORRISS I.R. Purinergic signalling in the musculoskeletal system. **Purinergic Signal.** 9 541–572. 2013.
- CACCIARI, B.; PASTORIN, G.; BOLCATO, C.; SPALLUTO, G.; BACILIERI, M.; MORO, S. A_{2B} adenosine receptor antagonists: recent developments. **Mini-Rev. Med. Chem.** 5:1053–1060.2005.
- CIESLAK, M.; KOMOSZYNÁLSKI, M.; WOJTCZAK, A. Adenosine A_{2A} receptors in Parkinson's disease treatment. **Purinergic Signal.** 4,305–312. 2008.

- CHALLIS, J; SLOBODA, D.; MATTHEWS, S.; HOLLOWAY, A.; ALFAIDY, N.; HOWE, D.; FRASER, M.; NEWNHAM, J. Fetal hypothalamic-pituitary adrenal (HPA) development and activation as a determinant of the timing of birth, and of postnatal disease. **Endocr Res**, v. 26, n. 4, p. 489-504, 2000.
- CHEN, Y.; et al. Functional effects of enhancing or silencing adenosine A_{2B} receptors in cardiac fibroblasts. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 287:H2478–H2486. 2004.
- CHIENG, B.; BEKKERS, J.M. Inhibition of calcium channels by opioid- and adenosine-receptor agonists in neurons of the nucleus accumbens. **Br. J. Pharmacol.** 133 337–344, 2001.
- CHOUDHARY, D.; JANSSON, I.; STOILOV, I.; SARFARAZI, M.; SCHENKMAN, J.B. Metabolism of retinoids and arachidonic acid by human and mouse cytochrome P450 1b1. **Drug Metab Dispos.** 32:840–847. 2004.
- CONWAY, D.E.; SAKURAI, Y.; WEISS, D.; VEGA, J.D.; TAYLOR, W.R.; JO, H.; ESKIN, S.G.; MARCUS, C.B.; MCINTIRE, L.V. Expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human endothelial cells: regulation by fluid shear stress. **Cardiovasc Res.** 81:669–77. 2009.
- DI LORIO, P.; BATTAGLIA, G.; CICCARELLI, R.; BALLERINI, P.; GIULIANI, P.; POLI, A.; NICOLETTI, F.; CACIAGLI, F. Interaction between A1 adenosine and class II metabotropic glutamate receptors in the regulation of purine and glutamate release from rat hippocampal slices. **J. Neurochem.** 67 302–309, 1996.
- DRURY, A.N.; SZENT-GYÓÁN RGYU, A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. **J. Physiol.** 68, 213–237. 1929.
- DUBEY, R.K.; GILLESPIE, D.G.; OSAKA, K.; SUZUKI, F.; JACKSON, E.K. Adenosine inhibits growth of rat aortic smooth muscle cells. Possible role of A_{2b} receptor. **Hypertension.** 27:786–793. 1996.
- DUBEY, R.K.; GILLESPIE, D.G.; SHUE, H.; JACKSON, E.K. A_{2B} receptors mediate antimitogenesis in vascular smooth muscle cells. **Hypertension.** 35:267–272. 2000.
- ELTZSCHIG HK, et al. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signalling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A_{2B} receptors. **J. Exp. Med.** 198:783–796. 2003.

- ELTZSCHIG, H.K.; FAIGLE, M.; KNAPP, S.; KARHAUSEN, J.; IBLA, J.; ROSENBERGER P, et al. Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. **Blood**.108(5):1602–10. 2006.
- ELTZSCHIG, H.K.; SITKOVSKY, M.V.; ROBSON, S.C. Purinergic signaling during inflammation. **N Engl J Med**. 367:2322–33. 2012.
- FERRE, S.; POPOLI, P.; RIMONDINI, R.; REGGIO, R.; KEHR, J.; FUXE, K. Adenosine A_{2A} and group I metabotropic glutamate receptors synergistically modulate the binding characteristics of dopamine D₂ receptors in the rat striatum. **Neuropharmacology** 38 129–140, 1999.
- FRASER, H.; GAO, Z.; OZECK, M.J.; BELARDINELLI, L. N-[3-(R)-tetrahydrofuranyl]-6-aminopurine riboside, an A₁ adenosine receptor agonist, antagonizes catecholamine-induced lipolysis without cardiovascular effects in awake rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther**. 305:225–231. 2003.
- FREDHOLM, B.B.; IJZERMAN, A. P.; JACOBSON, K.A.; KLOTZ, K.N.; LINDEN, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacol. Rev**. 53 527–552. 2001.
- FREDHOLM, B.B.; CUNHA, R.A.; SVENNINGSSON, P. Pharmacology of Adenosine A_{2A} Receptors and Therapeutic Applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. 3: 413. 2002.
- FUXE, K.; FERRE, S.; GENEDANI, S.; FRANCO, R.; AGNATI, L.F. Adenosine receptor–dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. **Physiol. Behav**. 92 210–217. 2007.
- GODINHO, R.O.; DUARTE, T.; PACINI, E. S. New perspectives in signaling mediated by receptors coupled to stimulatory G protein: the emerging significance of cAMP efflux and extracellular cAMP-adenosine pathway. **Frontiers in pharmacology**, 6, 58. 2015.
- GOBLYOS, A.; IJZERMAN, A. Allosteric modulation of adenosine receptors. **Purinergic Signal**. 5, 51–61. 2009.
- HAM, J.; EVANS, B. A. J. An emerging role for adenosine and its receptors in bone homeostasis. **Frontiers in endocrinology** vol. 3 113. 18 Sep. 2012.
- HASKO, G.; PACHER, P.; VIZI, E.S.; ILLES, P. Adenosine receptor signaling in the brain immune system. **Trends Pharmacol. Sci**. 26 511–516, 2005.

- HASKÓ, G.; PACHER, P.; DEITCH, E.A.; VIZI, E.S. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. **Pharmacol. Ther.** 113:264–275. 2007.
- HASKO, G.; CSOKA, B.; NEMETH, Z.H.; VIZI, E.S.; PACHER, P. A2B adenosine receptors in immunity and inflammation. **Trend Immunol.** 30:263–70. 2009.
- HEADRICK, J.P.; ASHTON K.J.; ROSE'MEYER R.B.; PEART J.N. Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions. **Pharmacol. Ther.** 140 92–111. 2013.
- IDZKO, M.; FERRARI, D.; ELTZSCHIG, H.K. Nucleotide signalling during inflammation. **Nature.** 509 310–317. 2014a.
- IDZKO, M.; FERRARI, D.; RIEGEL, A. K.; ELTZSCHIG, H.K. Extracellular nucleotide and nucleoside signaling in vascular and blood disease. **Blood** 124 1029–1037. 2014b.
- JACOBSON, K.A.; GAO, Z.G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov.** 5(3):247–264. 2006.
- JENNINGS, B.L.; ESTES, A.M.; ANDERSON, L.J.; FANG, X.R.; YAGHINI, F.A.; FAN, Z.; GONZALEZ, F.J.; CAMPBELL, W.B.; MALIK, K.U. Cytochrome P450 1B1 gene disruption minimizes deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension and associated cardiac dysfunction and renal damage in mice. **Hypertension.** Dec;60(6):1510-6. 2012.
- JENNINGS, B.L.; MONTANEZ, D.E.; MAY, M.E.; ESTES, A.M.; FANG, X.R.; YAGHINI, F. A.; MALIK, K. U. Cytochrome P450 1B1 contributes to increased blood pressure and cardiovascular and renal dysfunction in spontaneously hypertensive rats. **Cardiovascular drugs and therapy**, 28(2), 145–161. 2014.
- KIM, D.S.; PALMITER, R.D. Interaction of dopamine and adenosine receptor function in behavior: studies with dopamine-deficient mice. **Front. Biosci.** 13 2311–2318. 2008.
- KINKER, G.S.; OBA-SHINJO, S.M.; CARVALHO-SOUSA, C.E.; MUXEL, S.M.; MARIE, S.K.; MARKUS, R.P.; FERNANDES, P.A. Melatonergic system-based two-gene index is prognostic in human gliomas. **J Pineal Res.** Jan;60(1):84-94. 2016.
- KORASHY, H.M.; EL-KADI, A.O.S. The role of aryl hydrocarbon receptor in the pathogenesis of cardiovascular diseases. **Drug Metab Rev.** 38:411–50. 2006.

- KUDLACEK, O.; JUST, H.; KORKHOV, V.M.; VARTIAN, N.; KLINGER, M.; PANKEVYCH, H.; YANG, Q.; NANOFF, C.; FREISSMUTH, M.; BOEHM, S. The human D2 dopamine receptor synergizes with the A2A adenosine receptor to stimulate adenylyl cyclase in PC12 cells. **Neuropsychopharmacology** 28 1317–1327. 2003.
- LINDEN J. Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. **Mol. Pharmacol.** 67:1385–1387. 2005.
- LIVINGSTON, M.; HEANEY, L.G.; ENNIS, M. Adenosine, inflammation and asthma- a review. **Inflamm. Res.**, 53, pp. 171-178. 2004.
- MALIK, K. U.; JENNINGS, B. L.; YAGHINI, F. A.; SAHAN-FIRAT, S.; SONG, C. Y.; ESTES, A. M.; FANG, X. R. Contribution of cytochrome P4501B1 to hypertension and associated pathophysiology: a novel target for antihypertensive agents. **Prostaglandins & other lipid mediators**, 98(3-4), 69–74. 2012.
- MATSUMOTO, T.; TOSTES, R.C.; WEBB, R.C. Alterations in vasoconstrictor responses to the endothelium-derived contracting factor uridine adenosine tetraphosphate are region specific in DOCA-salt hypertensive rats. **Pharmacol. Res.** 65:81–90. 2012.
- McFADYEN, M.C.; MELVIN, W.T.; MURRAY, G.I. Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics. **Mol Cancer Ther.** 4.3:363–71. 2004.
- McCOOL, B.A.; FARRONI, J.S. A1 adenosine receptors inhibit multiple voltage-gated Ca²⁺ channel subtypes in acutely isolated rat basolateral amygdala neurons. **Br. J. Pharmacol.** 132 879–888. 2001.
- MEI, Y.A.; LE FOLL, F.; VAUDRY, H.; CAZIN, L. Adenosine inhibits L- and N-type calcium channels in pituitary melanotrophs. Evidence for the involvement of a G protein in calcium channel gating. **J. Neuroendocrinol.** 8 85–91, 1996.
- MUXEL, S.M.; LARANJEIRA-SILVA, M.F.; ZAMPIERI, R.A.; AOK, J.I.; ACUÑA, S.M.; FLOETER-WINTER, L.M. Functional validation of miRNA-mRNA interactions in macrophages by inhibition/competition assays based in transient transfection. **Protocol Exchange.** 34. 1-14. 2017.
- MUSTAFA, S.J.; MORRISON, R.R.; TENG, B.; PELLEG A. Adenosine receptors and the heart: Role in regulation of coronary blood flow and cardiac electrophysiology. **Handb. Exp. Pharmacol.** 161–188. 2009.

- MUTHALIF, M.M.; KARZOUN, N.A.; GABER, L.; KHANDEKAR, Z.; BENTER, I.F.; SAEED, A.E.; PARMENTIER, J-H.; ESTES, A.; MALIK, K.U. Angiotensin II-induced hypertension. Contribution of Ras GTPase/mitogen-activated protein kinase and cytochrome P450 metabolites. **Hypertension**; 36:604–609. 2000.
- OLAH, M.E.; STILES, G.L. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 35, 581–606. 1995.
- PAISANSATHAN, C.; XU, H.; VETRI, F.; HERNANDEZ, M.; PELLIGRINO, D.A. Interactions between adenosine and K⁺ channel-related pathways in the coupling of somatosensory activation and pial arteriolar dilation. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 299 H2009–H2017. 2010.
- POOLSA, R.; HOLGATE, S.T. Adenosine receptors as promising therapeutic targets for drug development in chronic airway inflammation. **Curr. Drug Targets** 7, 699–706. 2006.
- POULSEN, S.A.; QUINN, R.J. Adenosine receptors: new opportunities for future drugs. **Bioorg. Med. Chem.**, 6, pp. 619-641. 1998.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Effects of purines and pyrimidines on the rat mesenteric arterial bed. **Circ. Res.** 69, 1583–1590. 1991.
- REISS, A.B.; GROSSFELD, D.; KASSELMAN, L.J.; RENNA, H.A.; VERNICE, N.A.; DREWES, W.; KONIG, J.; CARSONS, S.E.; DELEON, J. Adenosine and the Cardiovascular System. **Am J Cardiovasc Drugs.** Oct;19(5):449-464. 2019.
- RUBINO, A.; RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. The P1-purinoceptors that mediate the prejunctional inhibitory effect of adenosine on capsaicin-sensitive nonadrenergic noncholinergic neurotransmission in the rat mesenteric arterial bed are of the A₁ subtype. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 267:1100–1104. 1993.
- RYU DY, HODGSON E. Constitutive expression and induction of CYP1B1 mRNA in the mouse. **J Biochem Mol Toxicol.** 13:249–51. 1999.
- RYZHOV, S.; NOVITSKIY, S.V.; ZAYNAGETDINOV, R.; GOLDSTEIN, A.E.; CARBONE, D.P.; BIAGGIONI, I.; DIKOV, M.M.; FEOKTISTOV, I. Host A_{2B} adenosine receptors promote carcinoma growth. **Neoplasia.** 10, 987–995. 2008.
- SATTIN, A.; RALL, T.W. The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine-30,50-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. **Mol. Pharmacol.** 6, 13–23. 1970.

- SHETH, S.; BRITO, R.; MUKHERJEA, D.; RYBAK, L.P.; RAMKUMAR, V. Adenosine receptors: expression, function and regulation. **Int. J. Mol. Sci.** 15 2024–2052. 2014.
- SHUKLA, M.K.; MISHRA, P.C. Structure-activity relationship for some xanthines as adenosine A₁receptor antagonists, bronchodilators and phosphodiesterase inhibitors: an electric field mapping approach. **J. Mol. Struct. (Theochem.)** 340:159–167. 1995.
- SONG, C.Y.; GHAFOOR, K.; GHAFOOR, H.U.; KHAN, N.S.; THIRUNAVUKKARASU, S.; JENNINGS, B.L.; MALIK, K.U. Cytochrome P450 1B1 Contributes to the Development of Atherosclerosis and Hypertension in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, 67(1), 206–213. 2016.
- SOUSA, J. B.; DINIZ, C. The Adenosinergic System as a Therapeutic Target in the Vasculature: New Ligands and Challenges. **Molecules (Basel, Switzerland)**, 22(5), 752. 2017.
- TABRIZCHI, R.; BEDI, S. Pharmacology of adenosine receptors in the vasculature. **Pharmacol. Ther.** 91:133–147. 2001.
- TANG, Y.; SCHEEF, E.A.; WANG, S.; SORENSON, C.M.; MARCUS, C.B.; JEFCOATE, C.R.; SHEIBANI, N. CYP1B1 expression promotes the proangiogenic phenotype of endothelium through decreased intracellular oxidative stress and thrombospondin-2 expression. **Blood.** 113:744–754. 2009.
- TAUTENHAHN, M.; LEICHSENRING, A.; SERVETTINI, I.; PESIC, M.; SPERLAGH, B.; NÖRENBERG, W.; ILLES, P. Purinergic modulation of the excitatory synaptic input onto rat striatal neurons. **Neuropharmacology.** 62:1756–1766. 2012.
- TOWNSEND-NICHOLSON, A.; BAKER, E.; SCHOFIELD, P.R.; SUTHERLAND, G.R. Localization of the adenosine A₁ receptor subtype gene (ADORA1) to chromosome 1q32.1. **Genomics** 26, 423–425.1995.
- TREVISI, L.; BOVA, S.; CARGNELLI, G.; CELOLOTTO, G.; LUCIANI, S. Endothelin-1-induced arachidonic acid release by cytosolic phospholipase A₂ activation in rat vascular smooth muscle via extracellular signal-regulated kinases pathway. **Biochem Pharmacol.** 64:425–431. 2002.
- WEI, C. J.; LI, W.; CHEN, J. F. Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies. **Biochim. Biophys. Acta.** 1808 1358–1379. 2011.

- YUAN, W.; LÓPEZ BERNAL, A. Cyclic AMP signalling pathways in the regulation of uterine relaxation. **BMC pregnancy and childbirth**, 7 Suppl 1(Suppl 1), S10. 2007.
- YUZLENKO, O., KONONOWICZ, K.K. Potent adenosine A₁ and A_{2A} receptors antagonists: recent developments. **Curr. Med. Chem.** 13,3609–3625. 2006.
- ZABLOCKI, J.A.; WU, L.; SHRYOCK, J.; BELARDINELLI, L. Partial A1 adenosine receptor agonists from a molecular perspective and their potential use as chronic ventricular rate control agents during atrial fibrillation (AF) **Curr. Top. Med. Chem.** 4:839–854. 2004.
- ZIMMERMANN H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** 362:299–309. 2000.
- ZHOU, Y.; SCHNEIDER, D.J.; BLACKBURN, M.R. Adenosine signaling and the regulation of chronic lung disease. **Pharmacol. Ther.** , 123, pp. 105 – 116, 2009.

Conclusão

CONCLUSÃO

Diante de todo esse estudo podemos concluir o seguinte:

- A Sulcatona não ocasiona morte celular nas linhagens *A7r5* nos tempos de 24, 48 e 72 h.

- A administração venosa de Sulcatona induziu hipotensão seguido de taquicardia em animais Kyoto e SHR nas menores doses e apenas na maior dose ocorreu bradicardia.

- Após os bloqueios farmacológicos sugerimos que a Sulcatona possa estar agindo em receptores muscarínicos subtipo M₂, α_2 -adrenérgicos e na produção de NO em modelos de animais WKY e SHR levando a redução da pressão arterial.

- A complexação da Sulcatona com β -CD, mostrou um efeito anti-hipertensivo por via oral, melhorando de forma significativa o efeito anti-hipertensivo em modelos de animais SHR.

- Verificamos a presença dos receptores de adenosina A_{2A} em células de músculo liso vascular (*A7r5*).

- A sulcatona age diretamente ou modulando os receptores de adenosina A_{2A} em células de músculo liso vascular (*A7r5*) em todas concentrações que foram utilizadas (10^{-6} a 10^{-3} M).

- No estado a basal a sulcatona foi capaz de atenuar a expressão da enzima CYP1B1 na concentração de 10^{-5} M.

Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo são promissores, e nos impulsiona a continuar a investigação dos mecanismos de ação da Sulcatona na patologia da hipertensão arterial e doenças cardiovasculares.

Perspectivas

PERSPECTIVAS

- Verificar o efeito proliferativo da Sulcatona em células *A7r5* pela técnica de citometria de fluxo.

- Verificar o efeito da sulcatona sobre o mRNA dos receptores A_{2A} em células de músculo liso vascular *A7r5* pela técnica de real time PCR.

- Verificar o efeito da sulcatona sobre os receptores A_{2A} em células de músculo liso vascular *A7r5* pelas técnicas de inCell Western Blotting e Citometria de Fluxo.

- Analisar o efeito da sulcatona sobre as proteínas ERK1 e ERK2 pela técnica de citometria de fluxo.

- Analisar o possível efeito central da Sulcatona sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca através da administração intracerebroventricular no IV ventrículo em ratos SHR e WKY.

- Analisar o efeito da Sulcatona sobre os receptores de adenosina A_1 e A_{2A} , através da administração intracerebroventricular no IV ventrículo em ratos SHR e WKY pela análise de expressão por western blotting e imunohistoquímica.

APÊNDICE

APÊNDICE

ARTIGO DE COLABORAÇÃO PUBLICADO

Article

<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190273>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-14, 2019
Printed in Brazil - ©2019 Sociedade Brasileira de Química



Theoretical and Experimental Investigations on Inclusion Complex β -Cyclodextrin and Sulcatone: A Cardiovascular Activity Evaluation

Ivan S. Silva,^{*,a} Eduardo L. Feitosa,^a Márcio E. P. Santos,^b Raiane M. Silva,^a
Márcio S. Rocha,^a Francisco I. da Silva,^c Francisco C. A. Lima,^c Ana Maria S. Costa,^c
Péricles B. Alves,^d Samuel A. A. de Sousa,^a Aldeídia P. Oliveira^b and Sidney G. de Lima^{*,a}

^aLaboratório de Geoquímica Orgânica, Departamento de Química, Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, 64049-550 Teresina-PI, Brazil

^bCentro de Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas de Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, 64049-550 Teresina-PI, Brazil

^cLaboratório Teórico e Computacional de Química, Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Piauí, Campus Poeta Torquato Neto, 64002-150 Teresina-PI, Brazil

^dDepartamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, s/n, 49100-000 São Cristóvão-SE, Brazil

In this paper, we have applied state-of-the-art technologies and new investigations were developed focusing on obtaining simple and inexpensive molecules for treating cardiovascular diseases, as they are considered the leading cause of death in the world. For the first time, the inclusion complex of sulcatone (SU) and β -cyclodextrin (β -CD) was achieved (using a spray drier) and characterized making use of spectroscopic, thermal and computational methods. In addition, the system was evaluated regarding its vasorelaxant properties. Evidence of the inclusion complex formation was provided using different techniques, such as X-ray diffraction (XRD), thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared (FTIR), and ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopies and then deduced by pharmacological experiments, which showed significant changes in relation to the initial material.

Keywords: sulcatone, β -cyclodextrin, hypotension, vasorelaxant activity, computational methods

PRIMEIRO ARTIGO DERIVADO DA TESE SUBMETIDO A FRONTIERS PHARMACOLOGY (A1 EM BIOTECNOLOGIA)



Frontiers Pharmacology Editorial Office <pharmacology.editorial.office@frontiersin.org>
para eu ▾

23:22 (há 0 minuto)



inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem

Desativar para: inglês ×

Dear Dr Santos,

Frontiers Pharmacology Editorial Office has sent you a message. Please click 'Reply' to send a direct response

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "EFFECT ANTI-HYPERTENSIVE OF 6-METIL-HEPTEN- 2-ONE (SULCATONE) IN WISTAR KYOTO AND SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS" to be considered for publication in Frontiers in Pharmacology, section Cardiovascular and Smooth Muscle Pharmacology.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link: <http://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

Your manuscript is now in the initial validation stage to determine its suitability for peer review. Should your manuscript be sent out for peer review, you will receive a notification once we receive the reports from reviewers and the interactive review forum is activated. You will then be able to read the review reports and exchange directly with the reviewers in the interactive review forum as well as submit a revised manuscript, if appropriate.

With best regards,

Your Frontiers in Pharmacology team

Frontiers | Editorial Office – Collaborative Peer Review Team www.frontiersin.org Avenue du Tribunal Fédéral 34, 1005 Lausanne, Switzerland Office T T 41 21 510 17 60

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (zendesk.frontiersin.org/hc/en-us)

-----MANUSCRIPT DETAILS----- Manuscript title: EFFECT ANTI-HYPERTENSIVE OF 6-METIL-HEPTEN- 2-ONE (SULCATONE) IN WISTAR KYOTO AND SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS Manuscript ID: 507287 Authors: Márcio Edivandro Santos, Marcelo Bezerra Mendes, Ivan Santos Silva, Sidney Gonçalo Lima, Edson Cavalcanti Silva-Filho, Débora Rejane Fior Chadi, Aldeídia Pereira Oliveira Journal: Frontiers in Pharmacology, section Cardiovascular and Smooth Muscle Pharmacology Article type: Original Research Submitted on: 25 Oct 2019

-----ADDITIONAL INFORMATION-----

In order to enable a smooth and efficient review process, please familiarize yourself with the Frontiers review guidelines:

http://www.frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=135&name=cardiovascular_and_smooth_muscle_pharmacology

To take part in the Resource Identification Initiative please cite antibodies, genetically modified organisms, software tools, data, databases and services using the corresponding catalog number and RRID in the text of your article. Please see here for more information: http://www.frontiersin.org/files/pdf/letter_to_author.pdf

SEGUNDO ARTIGO DERIVADO DA TESE SUBMETIDO A CELLULAR SIGNALLING (A1 EM BIOTECNOLOGIA)

Submission Confirmation Caixa de entrada x



Cellular Signalling <eesserver@eesmail.elsevier.com>
para eu, edivandrobiomedico ▾

01:17 (há 0 minuto) ☆ ↶ ⋮

🌐 inglês ▾ > português ▾ [Visualizar mensagem traduzida](#)

[Sempre traduzir: inglês](#)

*** Automated email sent by the system ***

Dear Márcio,

Your submission entitled "ACTION OF SULCATONE ON ADENOSINE A2A RECEPTORS IN A7r5 LINE VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS" for the category SI:Cell signalling in PKD has been received by Cellular Signalling

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/cls/>.

Your username is: marcio.edivandro@ifpi.edu.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/cls/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Cellular Signalling

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

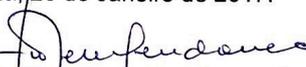


CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Desenvolvimento de uma formulação farmacêutica a partir das inflorescências de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. com potencial anti-hipertensivo”, registrada nº 275/16, sob a responsabilidade da Profa. Dra. ALDEÍDIA PEREIRA DE OLIVEIRA– NPPM/CCS/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica (ou Ensino)- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **20/01/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Fevereiro/ 2017 à Fevereiro/ 2019
Espécie/Linhagem/raça	1. Camundongo heterogênico/ Swiss 2. Rato heterogênico/ <i>R. norvegicus</i>
Nº de Animais	1. 50 2. 332
Peso/ Idade	1. 25-30g/ 3 meses 2. 200-250g/ 3 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Setorial do NPPM/UFPI

Teresina, 20 de Janeiro de 2017.


Prof.^a Ivet L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Ação hipotensora da 6-metil-5-hepten-2-ona (sulcatona) em ratos espontaneamente hipertensos**”, registrada com o nº 338/2018, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Débora Rejane Fior Chadi e com a participação dos colaboradores Aldeídia Pereira de Oliveira (Universidade Federal do Piauí) e Márcio Edivandro Pereira dos Santos (Universidade Federal do Piauí), que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica 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 aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em reunião de 11 de dezembro de 2018.

Vigência da autorização: 11/12/2018 a 31/10/2019

Finalidade: Pesquisa Científica

- **Espécie/linhagem:** Rato heterogênico (*R.novergicus*)/SHR

Nº de animais: 150(M) **Idade/Peso aprox:** 4 meses/200-300g

- **Espécie/linhagem:** Rato heterogênico (*R.novergicus*)/WKY

Nº de animais: 150(M) **Idade/Peso aprox.:** 4 meses/200-300g **Total:** 300 animais

Origem: Biotério do Departamento de Fisiologia – IB-USP, São Paulo, SP

OBS.: Qualquer intercorrência ou alteração do projeto em andamento deverá ser previamente autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-IB.


Prof. Dr. Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

