



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA



LORENA ISABEL SILVA MACIEL

RELAÇÃO ESTRUTURA/ATIVIDADE ENTRE LIGNANAS E MECANISMOS
ENVOLVIDOS NA VASODILATAÇÃO EM AORTA DE CAMUNDONGO

BELO HORIZONTE - MG

2013

LORENA ISABEL SILVA MACIEL

Relação Estrutura/Atividade entre Lignanas e Mecanismos Envolvidos na
Vasodilatação em Aorta de Camundongo

Dissertação de mestrado realizada junto
ao Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas: Fisiologia e
Farmacologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais. Área de Concentração:
Farmacologia. Orientador: Prof. Dr.
Steyner F. Côrtes.

BELO HORIZONTE - MG

2013

**Dedico este trabalho aos meus pais Elenita e João,
meus grandes exemplos,
responsáveis por eu ter chegado até aqui.**

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me dar forças para seguir em frente. “Graças ao grande amor do Senhor é que não somos consumidos, pois as suas misericórdias são inesgotáveis. Renovam-se cada manhã.” (Lm 3:22-23)

Aos meus pais por apoiarem minhas escolhas, dando tudo de si para tornar meus sonhos realidade. Obrigada pelo amor incondicional, pelas palavras de sabedoria, pela base sólida, por serem o que tenho de mais valioso. Dizem que filhos são bençãos de Deus em nossas vidas, mas tenho o privilégio de poder afirmar o contrário: mãe e pai, Deus me abençoou por permitir que crescesse ao lado de pessoas tão maravilhosas. Amo vocês!

Ao Marcus, por ser mais que meu marido, meu melhor amigo. Obrigada pelo apoio, pelas palavras de incentivo e por dividir comigo todos os momentos da minha vida. Você é meu porto seguro, meu companheiro, meu verdadeiro amor.

A Luciana, pela amizade e companheirismo. Obrigada por estar ao meu lado tanto nos momentos difíceis quanto nos alegres, que graças a Deus prevaleceram! E como prevaleceram! Seja nos almoços de sábado, nas tardes no CEU, nos “rocks” em BH e Ouro Preto, sua companhia tornou esta etapa muito mais agradável.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Steyner F. Côrtes, por me receber em seu laboratório e direcionar o delineamento científico deste trabalho. Obrigada por sempre se colocar a disposição para esclarecer minhas dúvidas.

Aos integrantes dos Laboratórios de Fisiologia e de Farmacologia Cardiovascular que formam uma grande equipe sempre disposta a ajudar uns aos outros. Obrigada Prof^a Dr^a Vírginia S. Lemos, Prof. Dr. Luciano Capettini, Vania, Aline, Grazi, Josi, Rosária, Thiago, Dani e Flávia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia pela oportunidade de realizar este trabalho e a Capes, pelo suporte financeiro.

Muito obrigado a todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.”

Cora Coralina

Resumo

Estudos demonstraram que lignanas apresentam propriedades benéficas ao sistema cardiovascular, apresentando ação anti-hipertensiva, vasodilatadora e protetora vascular. Foi Investigado a relação estrutura-atividade e o mecanismo de ação do efeito vasodilatador de lignanas em aorta de camundongos. Aortas de camundongos foram mantidas em um sistema de banho de órgão em solução fisiológica de Krebs-Riger. Curvas concentração-resposta cumulativas de lignanas: grandisina, licarina A e yangambina foram obtidas. Em aortas com endotélio funcional, grandisina, licarina A e yangambina induzem efeito vasodilatador concentração-dependente ($pCI_{50} = 4,30 \pm 0,13$, $> 4,00$ e $4,51 \pm 0,05$, respectivamente). Na ausência de endotélio funcional o efeito vasodilatador da grandisina não foi alterado. No entanto, a ação vasodilatadora da licarina A foi significativamente reduzida e promoveu um deslocamento para direita da curva concentração-efeito de yangambina. O mesmo padrão de respostas foi observado com a pré-incubação dos vasos com L-NAME. A pré-incubação de anéis de aorta com ODQ promoveu um deslocamento para direita da curva concentração-efeito de yangambina e de licarina A. A pré-contracção dos vasos com KCl não reduziu o relaxamento vascular induzido por grandisina e yangambina. Na ausência de cálcio extracelular, a pré-incubação com grandisina e com yangambina reduziu a contracção induzida por fenilefrina. Além disso, na ausência de cálcio extracelular, a pré-incubação com grandisina e com yangambina reduziram significativamente a contracção induzida pela cafeína. A pré-incubação de anéis de aorta com grandisina e com yangambina reduziu a intensidade de fluorescência emitida por Fluo 4-AM diante ao estímulo de fenilefrina na presença de cálcio extracelular. Em contrapartida, vasos pré-incubados com grandisina e com yangambina não apresentaram alteração na intensidade de fluorescência emitida por Fluo 4-AM na ausência de cálcio extracelular. O grupamento propenilbenzofurano da licarina A pode ser responsável por um efeito vasodilatador dependente de endotélio e de óxido nítrico, enquanto que o único grupo furano da grandisina estaria relacionado com um mecanismo de ação independente de endotélio e dependente da inibição do influxo de cálcio. O grupo furofurano da yangambina parece permitir uma ativação parcial da vasodilatação dependente do

endotélio e inibição do influxo de cálcio. Assim, este trabalho dá suporte para o desenvolvimento de novos fármacos vasodilatadores com base na estrutura de lignanas.

Palavras chave: Lignanas, grandisina, licarina A, yangambina, vasodilatação.

Abstract

Studies have shown that lignans have properties beneficial to the cardiovascular system, showing an anti-hypertensive, vasodilator and protective vascular action. The structure-activity relationship and the mechanism of action of the vasodilatory effect of lignans in mice aorta were investigated. Mice aortas were maintained in a organ system bath in Krebs-Riger saline. Cumulative concentration-response curves of lignans: grandisin, licarin A and yangambin were obtained. In aortas with functional endothelium, grandisin, licarin A and yangambin induce vasodilation effect, concentration-dependent ($pIC_{50} = 4.30 \pm 0.13, > 4.00$ and 4.51 ± 0.05 , respectively). In the absence of a functional endothelium the vasodilator effect of grandisin has not changed. However, the vasodilator effect of licarin A was significantly reduced and the concentration-effect curve of yangambin was shifted to the right. The same pattern of response was observed in vessels pre-incubated with L-NAME. Pre-incubation of aortic rings with ODQ promoted a shift to the right of yangambin and licarin A concentration-effect curves. Vessels pre-contracted with KCl did not reduce vascular relaxation induced by grandisin and yangambin. In medium without calcium, pre-incubation with grandisin and yangambin reduced the contraction induced by phenylephrine. Furthermore, in absence of extracellular calcium, pre-incubation with grandisin and yangambin significantly reduced the contraction induced by caffeine. Pre-incubation of the aortic rings with grandisin and yangambin reduced the intensity of fluorescence emitted by Fluo 4-AM front phenylephrine stimulation in the presence of extracellular calcium. In contrast, vessels pre-incubated with grandisin and yangambin had no significant effect on the fluorescence intensity emitted by Fluo 4-AM in the absence of extracellular calcium. The propenylbenzofuran group of licarin may be responsible for an endothelium- and nitric oxide-dependent mechanism, while the single furan group of grandisin could be related to a mechanism of action endothelium-independent and dependent of inhibition of calcium influx. The furofuran group of yangambin seem to allow a partial activation of endothelium-dependent vasodilatation and inhibition of calcium influx. Therefore, this work gives support for the development of new vasodilator drugs based on the structure of lignans.

Keywords: Lignans, grandisin, licarin A, yangambin, vasodilation.

Lista de Abreviações e Símbolos

AAS	Ácido acetil-salicílico
ACh	Acetilcolina
AMPK	Proteína quinase AMP-ativada
ANOVA	Análise de variância
AVC	Acidente vascular cerebral
[Ca²⁺]_i	Concentração intracelular de cálcio
Ca²⁺/CaM	Ca ²⁺ /calmodulina
CaMKKβ	Proteína quinase β Ca ²⁺ /CaM-dependente
CVDs	Doenças cardiovasculares
DBB	2,3-Dibenzilbutano-1,4-diol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPB	2-(2,4-dihidroxifenil)-5-(E)-propenilbenzofurano
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
Fenil/Phe	Fenilefrina/ <i>Phenylefrine</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanilato monofosfato cíclico
HDL	Lipoproteína de baixa densidade; <i>High density lipoprotein</i>
HSV	Herpes vírus
HPV	Papiloma vírus humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IP3	Inositol trifosfato
LDL	Low density lipoprotein
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
MLC	Cadeia leve de miosina
MLCK	Quinase de cadeia leve de miosina
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal

NOS	Óxido nítrico sintase
ODQ	1H-[1,2,4]-oxidiazol[4,3-a] quinoxalin-1-one
PAD	Pressão arterial diastólica
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PAS	Pressão arterial sistólica
pCl₅₀	Concentração inibidora de 50% do efeito
RhoA	Família homólogo Ras membro A
ROCK	Quinase associada à Rho
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do Retículo Sarco-Endoplasmático; <i>Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase</i>
UI/ml	Unidades por mililitro

Lista de Figuras

- Fig.1: Mapa mundial mostrando a prevalência de pressão arterial elevada em ambos os sexos (idades 25 +, idade padronizada) (WHO, 2011).....3
- Fig. 2: Estrutura molecular da grandisina; [furano, tetraidro-3,4-dimetil-2,5-bis(3,4,5-trimetoxifenil)].....10
- Fig. 3: Estrutura molecular da licarina A; [fenol, 4-[(2R,3R)-2,3-diidro-7-metoxi-3-metil-5-(1E)-1-propen-1-il-2-benzofuranil]-2-metoxi].....11
- Fig. 4: Estrutura molecular da yangambina ; [1H,3H-furo[3,4-c]furano, tetraidro-1,4-bis(3,4,5-trimetoxifenil)].....12
- Fig 5: Percentuais de novas entidades químicas de origem natural (incluindo produto natural, produto natural botânico e derivado de um produto natural) aprovadas de 1981 a 2010 (Newman e Cragg, 2012).....14
- Fig. 6: Efeito vasodilatador das lignanas grandisina (A), licarina A (B) e yangambina (C) em anéis de aorta com endotélio funcional. Os resultados são representados em média \pm EPM de pelo menos 5 experimentos.....25
- Fig. 7: Efeito vasodilatador das lignanas grandisina (A), licarina A (B) e yangambina (C) em anéis de aorta na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio funcional. Os resultados são representados em média \pm EPM de pelo menos 5 experimentos. (Two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni ***p < 0,001).....26
- Fig. 8: Efeito vasodilatador das lignanas grandisina (A), licarina A (B) e yangambina (C) em anéis de aorta, com endotélio funcional, pré-incubados ou não com L-NAME (300 μ M). Os resultados são representados como média \pm EPM de pelo menos 5 experimentos (Two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni; **p < 0,01; ***p < 0,001).....27
- Fig. 9: Efeito vasodilatador das lignanas licarina A (A) e yangambina (B) em anéis de aorta, com endotélio funcional, pré-incubados ou não com ODQ (1,0 μ M). Os resultados são representados como média \pm EPM de pelo menos 5 experimentos (Two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni; *p < 0,05).....28

- Fig. 10: Efeito vasodilatador das lignanas licarina A (A) e yangambina (B) em anéis de aorta, com endotélio funcional, pré-incubados ou não com catalase (2400 unidades). Os resultados são representados como média \pm EPM de pelo menos 5 experimentos (Two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni).....28
- Fig. 11: Efeito vasodilatador das lignanas grandisina (A) e yangambina (B) em anéis de aorta, com endotélio funcional, pré-contráídos com fenilefrina (0,3 μ M) e KCl (80 mM). Os resultados são representados como média \pm EPM de pelo menos 5 experimentos (Two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni).....29
- Fig. 12: Redução do efeito vasoconstritor de fenilefrina (Fenil; 0,3 μ M) em anéis de aorta, com endotélio funcional, após a pré-incubação com 100 μ M grandisina (A) e 100 μ M yangambina (B) em meio sem cálcio. Os resultados são representados como média \pm EPM de pelo menos 5 experimentos (Teste t de Student; ** p < 0,01).....30
- Fig. 13: Redução do efeito vasoconstritor de cafeína (10 mM) em anéis de aorta, com endotélio funcional, após a pré-incubação com 100 μ M grandisina (A) e 100 μ M yangambina (B) em meio sem cálcio. Os resultados são representados como média \pm EPM de pelo menos 5 experimentos (Teste t de Student; *** p < 0,001).....30
- Fig. 14: Efeito de lignanas grandisina 100 μ M (A) e yangambina 100 μ M (B), em meio com cálcio, no aumento de cálcio intracelular induzido pela fenilefrina (Fenil; 0,3 μ M) em anéis de aorta, com endotélio funcional, medido com fluo-4AM por microscopia confocal. Os resultados são representados como média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos (Teste t de Student; * p < 0,05; *** p < 0,001).....31
- Fig. 15: Efeito de lignanas grandisina 100 μ M (A) e yangambina 100 μ M (B), em meio sem cálcio, no aumento de cálcio intracelular induzido pela fenilefrina (Fenil, 0,3 μ M) em anéis de aorta, com endotélio funcional, medido com fluo-4AM por microscopia confocal. Os resultados são representados como média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos (Teste t de Student).....31
- Fig. 16: Vasodilatação mediada por fatores endoteliais e inibidores (L-NAME, ODQ e Catalase) utilizados para avaliação do efeito de lignanas sobre estes fatores. Estímulos como o shear stress e o aumento da concentração intracelular de cálcio

estimulam a oxido nítrico sintase (NOS) presente na célula endotelial a converter L-arginina em óxido nítrico (NO) que se difunde e chega a célula da musculatura lisa vascular, onde ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) que converte o GTP em GMPc, ativando a PKG, que por sua vez ativa a cálcio ATPase presente no retículo sarcoplasmático a captar o cálcio presente no citoplasma, o que reduz a concentração intracelular de cálcio e promove vasodilatação. O NO produzido na célula endotelial também ativa canais para K^+ presentes na célula da musculatura lisa vascular, provocando hiperpolarização e inibe a entrada de cálcio pelos canais para cálcio voltagem dependente e contribui para a redução da concentração intracelular de Ca^{2+} , logo, para vasodilatação. Além disso, a célula endotelial também produz H_2O_2 , que também produz GMPc e ativa canais para K^+ , contribuindo com o processo vasodilatador.....34

Fig. 17: Mediadores contráteis que atuam na célula da musculatura lisa vascular. Ao se ligar ao seu receptor, a fenilefrina (Phe) ativa a proteína G_{q11} e ativa a fosfolipase C que converte PIP_2 em IP_3 e DAG. O IP_3 se liga ao seu receptor no retículo sarcoplasmático (RS) e promove liberação do Ca^{2+} armazenado nesta organela. Já o DAG ativa a PKC que fosforila os canais para Ca^{2+} voltagem dependente, induzindo o influxo de Ca^{2+} . A Phe também promove despolarização da célula da musculatura lisa vascular que também estimula o influxo de Ca^{2+} via canais para Ca^{2+} voltagem dependente. A cafeína se liga ao receptor de rianoidina presentes no RS e promove liberação do Ca^{2+} armazenado nesta organela. Todo este Ca^{2+} intracelular se liga à calmodulina (CaM) presente no citoplasma, formando o complexo Ca^{2+}/CaM que ativa a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK) que fosforila a cadeia leve de miosina (MLC). A miosina fosforilada se liga a actina, o que leva a contração. Além disso, a Phe ativa a proteína $G_{12/13}$ e ativa a RhoA, que por sua vez ativa a ROCK. A ROCK fosforila o CPI-17 que inibe a fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP), responsável por desfosforilar a cadeia leve de miosina. A inibição do MLCP resulta na manutenção do processo contrátil. Já a solução KCl a 80 mM promove despolarização das células da musculatura lisa vascular que resulta na abertura de canais para Ca^{2+} voltagem dependente, seguida do aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e vasoconstrição.....37

Fig. 18: Resumo dos fatores envolvidos na vasodilatação mediada por grandisina, licarina A e yangambina.....39

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Hipertensão Arterial.....	2
1.2 Fármacos Anti-Hipertensivos.....	4
1.2.1 Anti-Hipertensivos naturais.....	6
1.3 Lignananas.....	8
1.3.1 Grandisina.....	10
1.3.2 Licarina A.....	11
1.3.3 Yangambina.....	11
1.4 Desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais.....	12
2 OBJETIVO.....	15
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 METODOLOGIA.....	17
3.1 Animais.....	18
3.2 Lignananas.....	18
3.3 Preparação e montagem dos vasos.....	18
3.3.1 Avaliação da integridade dos anéis aórticos.....	19
3.4 Estudo do efeito vasodilatador de lignanas em aorta de camundongo.....	19
3.5 Avaliação do papel do endotélio e de seus mediadores sobre o efeito vasodilatador de lignanas.....	20
3.6 Avaliação do efeito de lignanas sobre os canais para cálcio.....	21

3.7 Avaliação do efeito de lignanas sobre os estoques intracelulares de cálcio.....	21
3.8 Avaliação do efeito de lignanas sobre o transiente de cálcio citoplasmático.....	22
3.9 Análise estatística.....	23
4 RESULTADOS.....	24
4.1 Estudo do efeito vasodilatador de lignanas em aorta de camundongo.....	25
4.2 Avaliação do papel do endotélio e de seus mediadores sobre o efeito vasodilatador de lignanas.....	26
4.3 Avaliação do efeito de lignanas sobre os canais para cálcio.....	29
4.4 Avaliação do efeito de lignanas sobre os estoques intracelulares de cálcio.....	29
4.5 Avaliação do efeito de lignanas sobre o transiente de cálcio citoplasmático.....	30
5 DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÃO.....	40
7 REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial

As doenças cardiovasculares (CVDs) permanecem a maior causa de mortes no mundo. Mais de 17 milhões de pessoas morreram em virtude destas enfermidades em 2008, sendo que mais de 3 milhões dessas mortes ocorreram antes da idade de 60 anos e poderiam ter sido em grande parte evitadas. A porcentagem de mortes prematuras por CVDs isquêmicas é de 4% em países de alta renda, chegando a 42% em países de baixa renda (WHO, 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as CVDs são causadas por distúrbios do coração e vasos sanguíneos, e incluem doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral (AVC), doença arterial periférica, doença reumática, doença cardíaca congênita, insuficiência cardíaca e pressão arterial elevada.

A hipertensão é um importante fator de risco para CVDs. Em alguns grupos de indivíduos estima-se que o risco de doença cardiovascular dobra a cada incremento de 20/10 mmHg na pressão arterial, partindo-se de valores baixos tais como 115/75 mmHg. (Chobanian *et al.*, 2003). De acordo com a Sociedade Brasileira de Hipertensão é considerado hipertenso o indivíduo que apresenta, sistematicamente, pressão arterial sistólica (PAS) ≥ 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg.

Em todo o mundo, aumento da pressão sanguínea é causa estimada de 7,5 milhões de mortes, cerca de 12,8% do total de todas as mortes anuais. O número de pessoas com hipertensão aumentou de 600 milhões em 1980 para quase um bilhão em 2008. A prevalência de hipertensão arterial em adultos com 25 anos ou mais foi de cerca de 40% em 2008, sendo os maiores índices observados em países de desenvolvimento baixo, médio inferior e médio superior (WHO, 2011).

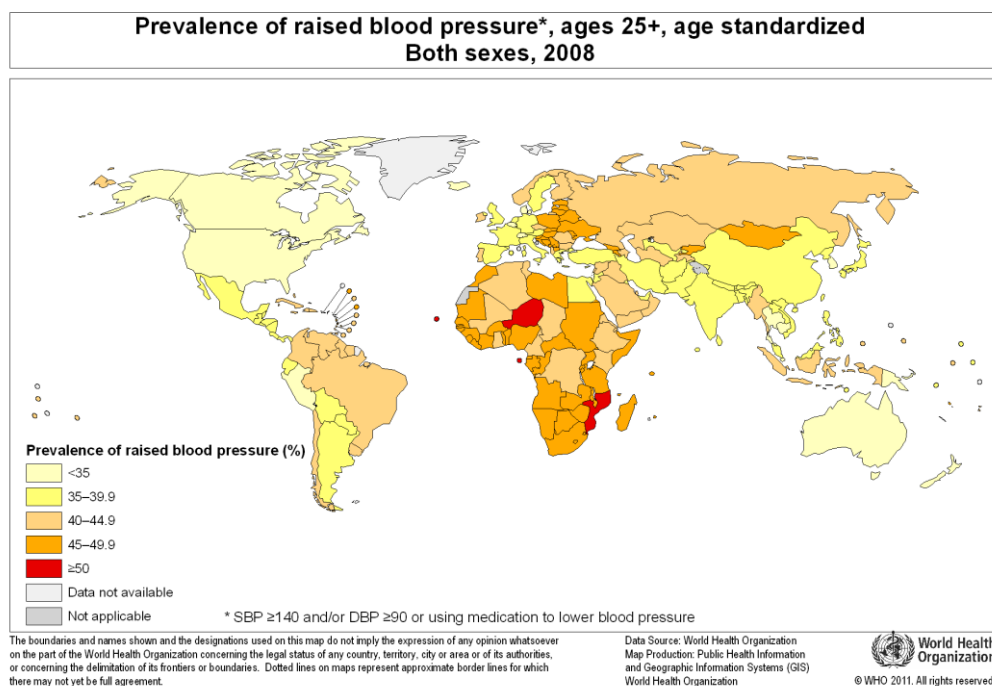


Fig.1: Mapa mundial mostrando a prevalência de pressão arterial elevada em ambos os sexos (idades 25 +, idade padronizada) (WHO, 2011).

A hipertensão pode causar lesão renal em fase inicial, e muitas vezes o dano renal acontece insidiosamente e persiste por muitos anos sem quaisquer sintomas clínicos típicos. Nos últimos dez anos, a incidência de doença renal em estágio final causada por hipertensão cresceu de uma taxa anual de 9% para 28% (Ruilope, 2002).

Em idosos, a hipertensão é um importante fator de risco para o AVC isquêmico e hemorragia cerebral (Kannel *et al.*, 1976). O benefício da redução da pressão arterial no risco de acidente vascular cerebral foi demonstrada pelo Programa Hipertensão Sistólica em Idosos (*Systolic Hypertension in the Elderly Program-SHEP*), em que os pacientes ativamente tratados apresentaram redução na incidência tanto de AVC isquêmico (37%) quanto de hemorrágico (54%) (Perry *et al.*, 2000).

Indivíduos hipertensos têm grande propensão a desenvolver hipertrofia ventricular esquerda que está associada com aumento da incidência de insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, doença cardíaca coronária, arritmias graves e morte

cardíaca súbita (Messerli & Ketelhut, 1991; Schillaci *et al.*, 2000). A hipertensão também é considerada um importante fator de risco para oclusão arterial da retina e neuropatia óptica isquêmica anterior não artéica (Hayreh *et al.*, 1996). Os estágios finais da doença da retina são desencadeados pelo rompimento da barreira retina/sangue e por exsudados lipídicos, comuns em casos de pressão arterial severamente elevada (Staessen *et al.*, 2000).

Modificações de estilo de vida podem ser o único tratamento necessário para prevenir ou até mesmo tratar as formas mais leves de hipertensão. Redução do peso (resulta em uma diminuição na PAS 5-20 mmHg por 10 kg a menos), a redução de sódio na dieta (diminuição de 2-8 mmHg na PAS), atividade física (diminuição de 4-9 mmHg na PAS), o consumo moderado de álcool (uso de álcool aumenta de 2-4 mmHg a PAS) e dieta balanceada (*Dietary Approaches to Stop Hypertension - DASH*: diminuição de 8-14 mmHg na PAS) são fundamentais para o controle da hipertensão em combinação ou não com o tratamento farmacológico (Chobanian *et al.*, 2003).

1.2 Fármacos Anti-Hipertensivos

A pressão arterial corresponde ao produto do débito cardíaco pela resistência periférica, sendo assim, fármacos que promovam redução destes parâmetros têm por consequência a redução da pressão arterial. Os hipotensores podem reduzir o débito cardíaco ao inibir a contratilidade miocárdica ou ao diminuir a pressão de enchimento ventricular, por meio de ações sobre o tônus venoso ou no volume sanguíneo, por intermédio de efeitos renais. Já a resistência periférica pode ser reduzida por fármacos que atuem sobre a musculatura lisa dos vasos de resistência ou por interferir na atividade de sistemas que produzam vasoconstrição (Oates e Brown, 2010).

De acordo com Oates e Brown (2010), os fármacos anti-hipertensivos podem ser classificados conforme seus locais ou mecanismos de ação como: diuréticos, simpaticolíticos, vasodilatadores, bloqueadores de canais para cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina e antagonistas do receptor da angiotensina II do tipo 1.

A descoberta dos diuréticos de tiazídicos, em 1957, ofereceu pela primeira vez a possibilidade de reduzir a pressão arterial de maneira eficiente. Desde então estes fármacos têm representado uma ferramenta fundamental para o tratamento da hipertensão (Ghiadoni, 2006). Estudos clínicos relataram o benefício de diuréticos tiazídicos, seja administrados isoladamente ou combinados com bloqueadores de cálcio, na redução da morbidade e mortalidade de infartos (SHEP *Cooperative Research Group*, 1991; ALLHAT *Collaborative Research Group*, 2002; Liu, *et al.*, 2009). Entretanto, o uso prolongado destes fármacos pode ocasionar aumento nos níveis de colesterol total e de LDL e diminuição nos níveis de HDL (Tuck, 1990). Além disso, seu uso pode causar hipocalcemia, que prejudica o metabolismo da glicose através da redução da secreção de insulina, podendo causar diabetes tipo 2 (Pepine *et al.*, 2004).

Dentre os hipotensores simpaticolíticos podemos destacar os agentes de ação central, como a α -metildopa e os antagonistas β -adrenérgicos, como o propranolol. O anti-hipertensivo mais comumente utilizado por grávidas hipertensas é a α -metildopa uma vez que seu uso não afeta a circulação uteroplacentária (Khalil *et al.*, 2010). Os β -bloqueadores são considerados fármacos de primeira escolha para pacientes que sofreram infarto do miocárdio e doença coronariana (Chobanian *et al.*, 2003). Já o carvedilol é um β -bloqueador de terceira geração que não apresenta os efeitos hemodinâmicos e metabólicos negativos dos β -bloqueadores tradicionais, podendo ser utilizados como um agente cardioprotetor inclusive em pacientes com síndrome metabólica ou diabetes (Leonetti *et al.*, 2012).

O nitroprussiato de sódio é um vasodilatador cujo metabólito ativo é o óxido nítrico. É considerado fármaco de primeira escolha no tratamento da crise hipertensiva associada à insuficiência cardíaca congestiva, por atuar na musculatura lisa arteriolar e venular, promovendo vasodilatação direta. Seu uso pode levar a intoxicação, principalmente em pacientes com insuficiência renal e hepática, uma vez que o nitroprussiato de sódio é metabolizado a cianeto e biotransformado em tiocianato pelo fígado, cuja excreção é renal. (Nobre *et al.*, 2002).

Os bloqueadores dos canais de cálcio, como o verapamil e a nifedipina, reduzem a pressão arterial ao relaxar o músculo liso arteriolar, reduzindo a resistência vascular periférica (Hulthén, 1986). Não causam retenção de sódio e não

comprometem a função renal. Ao contrário dos β -bloqueadores de primeira geração, não alteram o perfil lipídico e a glicemia, sendo uma opção para pacientes com dislipidemias e diabéticos (Fukao *et al.*, 2011).

O captopril foi o primeiro anti-hipertensivo inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA; Cushman *et al.*, 1977). A síntese deste fármaco teve como protótipo peptídeos isolados do veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*) por Ferreira e colaboradores (1965), que apresentavam a capacidade de inibir esta enzima. O uso prolongado desta classe de hipotensores causa tosse seca devido ao acúmulo de bradicinina, que normalmente é degradada pela ECA, dificultando a adesão ao tratamento. Já os bloqueadores do receptor da angiotensina II do tipo 1, como o losartan, não apresentam este efeito adverso, uma vez que não interferem no funcionamento da ECA. Também não afetam os outros subtipos de receptores de angiotensina, sendo assim, permitem estimulação dos receptores tipo 2 pela angiotensina II, que garante efeitos benéficos cardiovasculares, renais e anti-inflamatórios (Giestas *et al.*, 2010).

Na prática clínica, fármacos anti-hipertensivos são muitas vezes utilizados em combinação, pois a maioria dos pacientes hipertensos não atinge a pressão arterial alvo por meio de monoterapia. Terapias que combinam fármacos com diferentes mecanismos podem proporcionar efeitos sinérgicos sobre a pressão sanguínea, resultando em maior eficácia anti-hipertensiva do que os componentes individuais (Mancia *et al.*, 2007). Um estudo de meta-análise envolvendo 11.000 pacientes mostrou que aqueles que utilizaram regime de combinação medicamentosa apresentaram uma redução da pressão arterial cinco vezes mais eficaz em relação aos que foram submetidos à monoterapia (Wald *et al.*, 2009).

1.2.1 Anti-Hipertensivos naturais

Diversas pesquisas relatam que o consumo moderado de vinho tinto está associado com a redução do risco de CVDs (Vinson *et al.*, 2001; Bernatova *et al.*, 2002; Dell'Agli *et al.*, 2004). A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como os ânions superóxido, é um dos fatores que contribui para a disfunção endotelial, através da redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) vascular

(Miller *et al.*, 1998). Um estudo de Sarr e colaboradores (2006) demonstrou que os polifenóis presentes no vinho tinto previnem a hipertensão e a disfunção endotelial através da prevenção da indução da NADPH oxidase, preservando a biodisponibilidade de NO. Soares de Moura e colaboradores (2002) avaliaram o efeito hipotensor do extracto hidroalcoólico (GSE) obtido a da casca da uva vinífera (*Vitis labrusca*). O efeito anti-hipertensivo de GSE é resultado uma combinação de ações vasodilatadoras e antioxidantes.

Ácidos clorogênicos (CGAs) são potentes antioxidantes encontrados em certos alimentos e bebidas, principalmente no café. Os metabolitos de CGAs reduzem a produção de ROS, diminuindo a pressão arterial através do aumento da biodisponibilidade do NO na vasculatura arterial. Uma dieta rica em CGAs pode ser promissora para proporcionar uma abordagem não farmacológica para a prevenção e tratamento da hipertensão (Zhao *et al.*, 2012).

A canela (*Cinnamomum zeylanicum*) é uma especiaria comumente utilizada na culinária. Nyadjeu e colaboradores (2011) observaram que a injeção intravenosa aguda do extrato da casca do caule de *C. zeylanicum* induziu uma redução significativa na pressão arterial média de ratos wistar normotensos e hipertensos, cuja hipertensão foi induzida por três modelos distintos. Em anéis de aorta de rato, o extrato de *C. zeylanicum* induziu relaxamento através do aumento da produção de NO endotelial e da ativação dos canais para K⁺ no músculo liso vascular.

A reserpina é um alcaloide extraído da raiz de *Rauwolfia serpentina*, um arbusto nativo da Índia (Doyle *et al.*, 1955). Atualmente é utilizada no tratamento da hipertensão arterial. É antagonista adrenérgico que atua reduzindo o débito cardíaco e resistência vascular periférica. Embora apresente eficácia, comodidade posológica e baixo custo, vem sendo substituída por outros hipotensores com menos efeitos adversos (Kostis *et al.*, 1995).

O chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*) é uma planta encontrada em todo o Brasil, principalmente na região Sudeste, popularmente utilizada no tratamento da hipertensão arterial. Um estudo desenvolvido por pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz demonstrou que o extrato etanólico bruto de *E. grandiflorus* (EEEG) apresenta efeitos anti-hipertensivo através da libertação de óxido nítrico e

da estimulação de receptores muscarínicos colinérgicos e de receptores de PAF. Estes resultados sugerem que EEEG pode ser vir a ser utilizado para o tratamento oral da hipertensão arterial (Lessa *et al.*, 2008).

A *Hancornia speciosa*, cujas folhas são popularmente usadas no Brasil para tratar diabetes e hipertensão. Um estudo desenvolvido por nosso grupo de pesquisa demonstrou que o extrato desta planta apresenta potente efeito hipotensor em ratos normotensos. Seu efeito hipotensivo se deve a inibição da ECA levando à redução na angiotensina II e no aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) (Silva *et al.*, 2011).

1.3 Lignanas

Lignanas e neolignanas são um grande grupo de produtos naturais caracterizados pelo acoplamento de duas unidades C_6C_3 . Quando as duas unidades C_6C_3 estão ligados por uma ligação entre as posições 8 e 8', o composto é nomeado como lignana. Na ausência da ligação C-8 a C-8', e onde as duas unidades C_6C_3 estão unidas por uma ligação carbono-carbono, trata-se de uma neolignana (Moss, 2000).

Lignanas são metabólitos secundários de plantas produzidos a partir de fenilpropanóides através da via do chiquimato (Marienhagen e Bott, 2013). Estão amplamente distribuídas no reino vegetal, sendo encontradas em pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (Ghisalberti, 1997).

Estudos demonstraram que esta classe de compostos possui propriedade anti-tumoral. Lignanas isoladas das folhas de *Juniperus sabina* (Cupressaceae) apresentaram ação antineoplásica contra leucemia murina P-388, carcinoma pulmonar humano A-549 e carcinoma de cólon HT-29 (San Feliciano *et al.*, 1993; Gordaliza *et al.*, 1994). Além disso, lignanas isoladas da *Aglaia elliptica* (Meliaceae) inibiram o crescimento de células cancerígenas humanas de pulmão e mama em cultura (Lee *et al.*, 1998).

Charlton (1998) descreveu a atividade antiviral de lignanas, que se mostraram eficazes contra herpes vírus (HSV), papiloma vírus humano (HPV) e vírus da imunodeficiência humana (HIV). Dentre os mecanismos de ação envolvidos

destacam-se: ligação de tubulina e inibição da transcriptase reversa, da integrase e da topoisomerase.

Foram descritas propriedades bactericidas de lignanas isoladas de *Myristica argentea* (Myristicaceae) contra *Streptococcus mutans* (Nakatani *et al.*, 1988). Além disso, lignanas isoladas de *Terminalia bellerica* apresentaram atividade antifúngica, inibindo o crescimento de *Penicillium expansum* (Valsaraj *et al.*, 1997).

Lignanas também demonstraram ação antiparasitária. Lignanas isoladas de *Doliocarpus dentatus* (Dellineaceae) foram eficazes no combate da forma amastigota de *Leishmania amazonensis* (Sauvain *et al.*, 1996). Além disso, lignanas isoladas de *Virola surinamensis* apresentaram elevada ação trypanomicida in vitro contra a forma trypomastigota de *Trypanosoma cruzi* (Lopes *et al.*, 1998).

Com relação aos benefícios cardiovasculares, um estudo de Abe e colaboradores (1989) demonstrou os efeitos do 2,3-dibenzilbutano-1,4-diol (DBB), uma lignana encontrada na urina de humanos, na musculatura lisa vascular da aorta de coelhos. Eles observaram que o DBB induz o relaxamento da musculatura lisa vascular através da inibição do influxo de cálcio (Ca^{2+}) sem influenciar na liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares.

Em 1991, este mesmo grupo estudou os efeitos de DBB em aorta de ratos e observou que esta lignana inibiu as contrações induzidas por noradrenalina (NA) de maneira concentração dependente. Este efeito foi acompanhado da inibição do aumento de Ca^{2+} intracelular induzido por NA, além de aumentar os níveis de guanilato monofosfato cíclico (GMPc). Além do DBB, a literatura descreve a atividade de várias lignanas como anti-hipertensiva (Prasad, 2004; Park *et al.*, 2012), vasodilatadora (Matsunaga *et al.*, 1994; Matsuda *et al.*, 2000; Piccinelli *et al.*, 2004; Nakano *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2008; Raimundo *et al.*, 2009; Albuquerque *et al.*, 2011) e protetora vascular (Nakano *et al.*, 2003; Matsumura *et al.*, 2000).

Estudos clínicos também evidenciaram efeitos benéficos de lignanas ao sistema cardiovascular. Um estudo transversal envolvendo 242 indivíduos (151 homens e 91 mulheres na pós-menopausa) realizado por Pellegrini e colaboradores (2010) demonstrou que o aumento na ingestão da lignana matairesinol, no contexto de uma dieta típica italiana do norte, está associado a redução da inflamação

vascular e disfunção endotelial. Além disso, um estudo duplo-cego, cruzado e controlado com placebo, investigou o efeito da sesamina, lignana encontrada no gergelin, na pressão arterial de indivíduos levemente hipertensos. Observou-se que a administração de 60 mg de sesamina por 4 semanas diminuiu significativamente a pressão arterial, sugerindo que esta lignana apresenta ação anti-hipertensiva em seres humanos (Miyawaki *et al.*, 2009). Estes relatos demonstram o potencial deste grupo de compostos para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de doenças cardiovasculares.

1.3.1 Grandisina

Grandisina é uma furano neolignana cuja estrutura química está representada na Fig. 2.

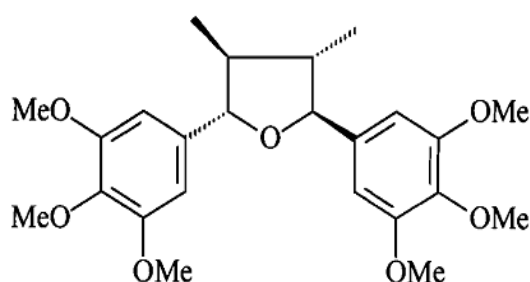


Fig. 2: Estrutura química da grandisina; [furano, tetraidro-3,4-dimetil-2,5-bis(3,4,5-trimetoxifenil)].

Esta lignana está presente em diversas espécies de plantas das regiões norte e nordeste do Brasil, utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversos distúrbios, entre eles, cólica, inflamação, artrite e dispepsia (Ayres & Loike, 1990).

Diversas atividades farmacológicas desta lignana foram demonstradas em modelos *in vivo* e *in vitro*, incluindo atividades antiviral, antirreumática, antineoplásica e antipsoriática (Lopes *et al.*, 1998).

Carvalho e colaboradores (2010) demonstraram que grandisina apresenta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, provavelmente, por inibir a formação e/ou atividade de prostaglandinas. Esta ação seria consequência da inibição da atividade da ciclooxygenase ou por antagonizar os receptores de prostaglandinas.

1.3.2 Licarina A

Licarina A é uma propenilbenzofurano neolignana cuja estrutura química está representada na Fig. 3.

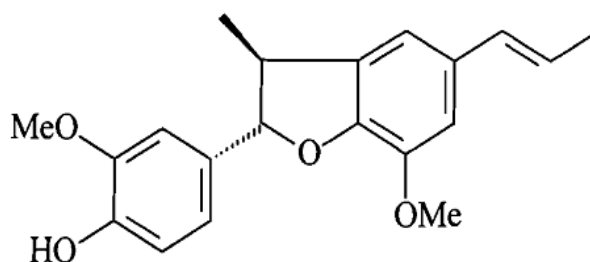


Fig. 3: Estrutura química da licarina A; [fenol, 4-[(2R,3R)-2,3-diidro-7-metoxi-3-metil-5-(1E)-1-propen-1-il-2-benzofuranil]-2-metoxi].

Trabalhos anteriores demonstraram que licarina A exerce efeitos antiproliferativos contra linhagens de células cancerígenas humanas (Lee *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004).

Além disso, licarina A extraído de *Aristolochia taliscana*, apresentou uma relevante inibição de linhagens de *Mycobacterium tuberculosis*. Isto demonstra que esta lignana pode apresentar potencial terapêutico no tratamento da tuberculose (León-Díaz *et al.*, 2010).

Recentemente, foi relatado atividade tripanocida para licarina A isolada a partir de *Nectandra glabrescens* (Cabral *et al.*, 2010).

1.3.3 Yangambina

Yangambina é uma furano lignana cuja estrutura química está representada na Fig. 4.

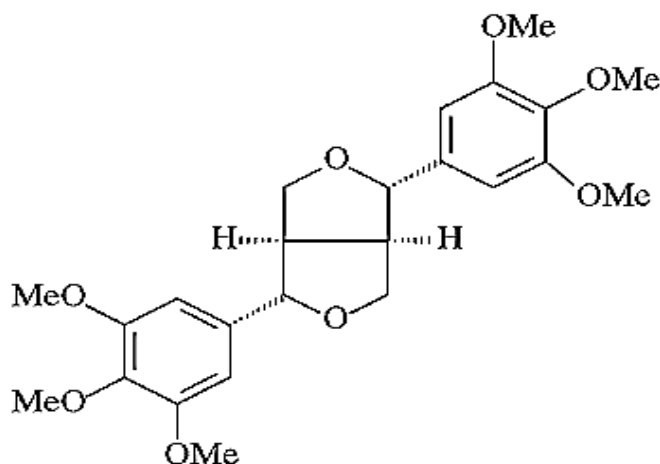


Fig. 4: Estrutura química da yangambina; [1H,3H-furo[3,4-c]furano, tetraidro-1,4-bis(3,4,5-trimetoxifenil)].

Trabalhos anteriores demonstraram que yangambina é um antagonista seletivo do receptor de fator de ativação de plaquetas (PAF) (Castro-Faria-Neto *et al.*, 1995; Herbert *et al.*, 1997).

Serra *et al.* (1997) observaram que yangambina é antagonista não somente sobre os receptores para PAF mas também sobre os receptores para leucotrieno B₄.

Também foram descritas atividades no sistema nervoso central. Yangambina aumentou a duração de imobilidade no teste de natação forçada, reduziu a atividade locomotora espontânea em campo aberto e aumentou o tempo de sono com pentobarbital de sódio, parâmetros que sugerem atividade depressora sobre o sistema nervoso central (Sousa *et al.*, 2005).

1.4 Desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais

Os produtos naturais representaram a principal fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos durante séculos. Em 1990 cerca de 80% dos fármacos eram produtos naturais ou foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (Sneider, 1996).

Um exemplo clássico para o desenvolvimento dos fármacos a partir de produtos naturais foi a descoberta dos salicilatos obtidos de *Salix alba* (salgueiro).

As cascas do salgueiro eram popularmente conhecidas por suas propriedades analgésicas e antipiréticas. Em 1828, pesquisadores isolaram a salicina, que anos mais tarde possibilitou a síntese do ácido salicílico e posteriormente do ácido acetil-salicílico (AAS). As propriedades terapêuticas do AAS levaram os laboratórios de pesquisa da Bayer a lançarem este fármaco em 1897, nomeado Aspirina® (Agosta *et al.*, 1997).

Além disto, existem relatos de produtos naturais que auxiliaram não apenas no desenvolvimento de novos fármacos, como também ajudaram a revelar um novo aspecto da fisiologia. Por exemplo, a partir da *Digitalis purpurea* mostraram o papel da sódio-potássio-ATPase; a morfina indicou o caminho para os receptores afetados por opióides endógenos, muscarínicos e nicotínicos; a tubocurarina ajudou a explorar os diferentes tipos de receptores de acetilcolina, entre outros (Rishton *et al.*, 2008).

Após a introdução da síntese de alto rendimento e da química combinatória, os produtos naturais tornaram-se uma fonte menos significativa para o desenvolvimento de novos fármacos. Embora a despesa global em pesquisa de fármacos dobrou desde 1991, o número de novos fármacos aprovados anualmente pelo FDA (*Food and Drug Administration*) diminuiu em 50% ou mais (Hughes, 2009).

Apesar da promessa dos métodos alternativos de detecção de fármacos, ainda há uma escassez de compostos que progridem para ensaios clínicos. Este é especialmente o caso em áreas terapêuticas, como oncologia, imunossupressão e doenças metabólicas onde os produtos naturais têm desempenhado um papel central na descoberta de novos fármacos (Newman, *et al.*, 2003).

Em uma recente revisão, Newman e Cragg (2012) analisaram o número de fármacos derivados de produtos naturais no total de lançamentos de 1981 a 2010 (Fig 5) e constataram que os produtos naturais representam uma fonte significativa destas novas drogas, especialmente na terapêutica oncológica.

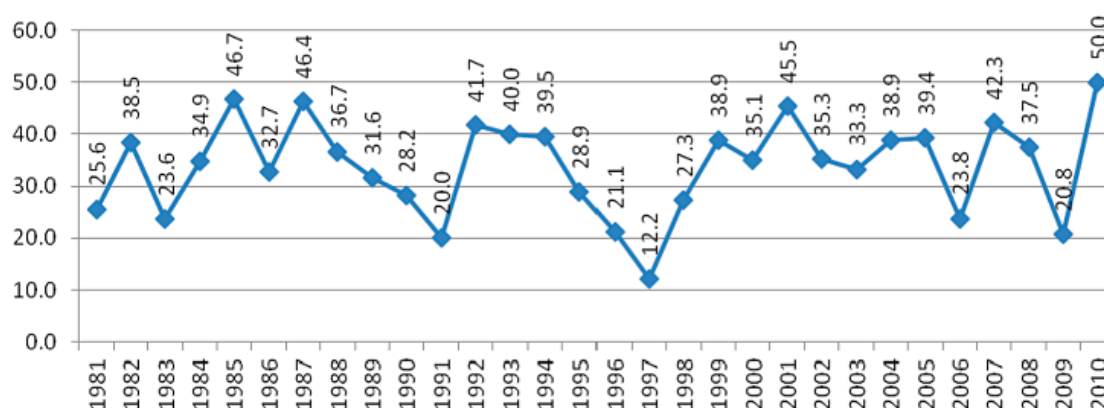


Fig 5: Percentuais de novas entidades químicas de origem natural (incluindo produto natural, produto natural botânico e derivado de um produto natural) aprovadas de 1981 a 2010 (Newman e Cragg, 2012).

Uma abordagem multidisciplinar, envolvendo a geração de uma nova diversidade molecular a partir de produtos naturais, combinados com metodologias sintéticas total e combinatória, incluindo a manipulação de vias biossintéticas, constitui a melhor solução para a atual crise de produtividade que a comunidade científica enfrenta na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (Newman e Cragg, 2012).

As fontes naturais estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico. (Butler, 2008). Além disso, os produtos naturais também podem ser utilizados como modelos químicos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Lignanans possuem uma ampla variedade de propriedades biológicas e têm sido muito utilizadas na medicina popular para o tratamento de um vasto espectro de patologias humanas (Tibiriçá, 2001). Sendo assim, o estudo das propriedades farmacológicas desta classe de produtos naturais, bem como seu respectivo mecanismo de ação, são fundamentais para o desenvolvimento de novos fármacos.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a relação estrutura-atividade e o mecanismo de ação do efeito vasodilatador das lignanas grandisina, licarina A e yangambina em aorta de camundongo.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a relação concentração-efeito da vasodilatação induzida pelas lignanas grandisina, licarina A e yangambina em aorta de camundongo;

Investigar a participação do endotélio e de fatores derivados do endotélio no efeito vasodilatador destas lignanas;

Investigar o mecanismo de ação envolvido na atividade vasodilatadora destas lignanas em aorta de camundongo;

Avaliar a relação estrutura-atividade destas lignanas para a atividade vasodilatadora e mecanismo de ação.

3 METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos com idade entre 9 e 15 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em ciclos de claro-escuro, com livre acesso à água e ração. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) - UFMG, protocolo nº 168/2012.

3.2 Lignanas

As lignanas foram cedidas pelo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba. Foram utilizadas grandisina isolada de *Licaria aurea*, licarina A obtida de *Nectandra glabrescens* e yangambina isolada de *Ocotea duckei*. As lignanas foram solubilizadas em Dimetilsulfóxido (DMSO), sendo as soluções a 0,01 M preparadas em DMSO 100% e as soluções a 0,001 M em DMSO 50%, diluído em água destilada.

3.3 Preparação e montagem dos vasos

Após o sacrifício dos animais, a aorta torácica foi retirada e transferida para uma placa de Petri com solução fisiológica de Krebs-Henseleit (mM): NaCl 118,0; KCl 4,7; NaHCO₃ 25,0; CaCl₂.2H₂O 2,5; glicose 11,0; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2), sendo removido o excesso de tecido adiposo e conjuntivo. A artéria foi cortada em anéis de 2 a 3 mm de comprimento. Duas hastes metálicas triangulares foram passadas pelo lúmen do vaso. Os anéis foram transferidos para cubas de vidro com volume de 10 mL, contendo solução de Krebs-Henseleit, aerada continuamente com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂), a uma temperatura de 37 ± 1 °C. Uma das hastes foi à cuba e a outra foi acoplada a um transdutor de tensão

isométrica. Foi aplicada uma tensão basal de 0,5 g aos anéis, simulando uma tensão a qual ele era submetido fisiologicamente. A preparação foi mantida nestas condições por 45 minutos, sendo a tensão reajustada até a estabilização. A solução de Krebs-Henseleit foi trocada em intervalos de 15 minutos, a fim de garantir nutrientes aos anéis de aorta e evitar o acúmulo de metabólitos.

O registro das tensões foi feito através de transdutores isométricos (World Precision Instruments, Inc., USA), acoplados a um amplificador (Modelo TBM-4; World Precision Instruments, Inc., USA), e este conectado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital (AD16JR; World Precision Instruments, Inc. USA). Utilizou-se o programa WinDaq Data Acquisition (Dataq Instruments, USA).

3.3.1 Avaliação da integridade dos anéis aórticos

A fim de certificar que os vasos não foram danificados durante a preparação, os anéis aórticos foram contraídos com fenilefrina (Phe; 0,3 μ M). Após a estabilização da contração, os vasos foram estimulados com acetilcolina (ACh; 10 μ M) e seu relaxamento observado. Os vasos com relaxamento superior ou igual a 70% foram considerados viáveis para o experimento.

3.4 Estudo do efeito vasodilatador de lignanas em aorta de camundongo

Após montagem dos vasos conforme descrito acima e estabilização das preparações, duas respostas submáximas simples à fenilefrina similares e estáveis, foram obtidas e consideradas como controle. Uma terceira resposta foi obtida e, durante a sua fase tônica, concentrações crescentes das lignanas (grandisina, licarina A e yangambina) foram adicionadas. Curvas concentração-efeito cumulativas foram obtidas para cálculo do log da concentração inibitória de 50% do efeito contrátil (pCI_{50}).

3.5 Avaliação do papel do endotélio e de seus mediadores sobre o efeito vasodilatador de lignanas

Anéis de aorta, na presença e na ausência de endotélio funcional, foram utilizados para avaliar a participação do endotélio no efeito relaxante de lignanas (grandisina, licarina A e yangambina). A camada endotelial foi removida mecanicamente, por fricção da haste metálica no lúmen vascular. A ausência de endotélio funcional foi confirmada por um relaxamento induzido por ACh 10 μ M inferior a 10%.

Com o objetivo de avaliar a participação do NO na vasodilatação induzida por lignanas, anéis de aorta com endotélio funcional foram previamente incubados, por 30 minutos, com N^G-nitro L-arginina metil éster (L-NAME 300 μ M), inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase NOS. Em seguida, os vasos foram pré-contraídos com Phe (0,3 μ M) e, após estabilização da resposta contrátil, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas com grandisina, licarina A e yangambina.

A participação da guanilato ciclase solúvel (GCs) na vasodilatação induzida por lignanas foi avaliada através de experimentos realizados na ausência e na presença de 1H-[1,2,4]-oxidiazol[4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ), inibidor desta enzima. Os anéis de aorta com endotélio funcional foram pré-incubados com ODQ (1,0 μ M) por 15 minutos. Em seguida, os vasos foram pré-contraídos com Phe (0,3 μ M) e, após estabilização da resposta contrátil, foram obtidas as curvas concentração-efeito cumulativas com licarina A e yangambina.

O envolvimento do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na vasodilatação induzida por lignanas foi avaliada através de experimentos realizados na ausência e na presença de catalase, enzima que degrada o H₂O₂ em água (H₂O) e oxigênio (O₂). Os anéis de aorta foram pré-incubados com catalase (2400 UI/mL) por 30 minutos. Em seguida, anéis de aorta com endotélio funcional foram pré-contraídos com Phe (0,3 μ M) e, após estabilização da resposta contrátil, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas com licarina A e yangambina.

3.6 Avaliação do efeito de lignanas sobre os canais para cálcio

O efeito de lignanas sobre os canais para cálcio foi avaliado utilizando cloreto de potássio (KCl) como estímulo contrátil. Este agente despolarizante impede o efluxo de potássio e bloqueia a ação de fatores hiperpolarizantes, permitindo avaliar se a resposta vasorrelaxante desencadeada por lignanas depende da abertura de canais para cálcio. Como agente despolarizante, o KCl promove contração por ativar canais para cálcio, resultando aumento intracelular de cálcio, permitindo a avaliação da inibição do influxo de cálcio como mecanismo da atividade vasodilatadora das lignanas estudadas. Anéis de aorta com endotélio funcional foram pré-contraídos com solução de KCl (80 mM) e, após estabilização da resposta contrátil, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas com grandsin e yangambina. Como controle, anéis de aorta com endotélio funcional foram pré-contraídos com Phe (0,3 μ M) e, após estabilização da resposta contrátil, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas com grandsin e yangambina.

3.7 Avaliação do efeito de lignanas sobre os estoques intracelulares de cálcio

Anéis de aorta incubados em solução fisiológica de Krebs-Henseleit isenta de Ca^{2+} (mM: NaCl 118,0; KCl 4,7; NaHCO_3 25,0; glicose 11,0; KH_2PO_4 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; EGTA 2,0) foram contraídos com Phe (0,3 μ M) ou cafeína (10 mM), registrando-se a resposta contrátil máxima. Em seguida os vasos foram lavados 3 vezes com solução fisiológica de Krebs-Henseleit padrão ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mM) afim de reestabelecer os estoques intracelulares de Ca^{2+} e mantida por 15 minutos. Posteriormente, a preparação foi lavada 3 vezes com solução fisiológica de Krebs-Henseleit isenta de Ca^{2+} e após 15 minutos uma segunda contração com Phe (0,3 μ M) ou cafeína (10 mM) foi induzida e registrada, fazendo-se a média entre os dois registros que foi utilizada como controle. Novamente, os vasos foram lavados 3 vezes com solução fisiológica de Krebs-Henseleit padrão e mantida por 15 minutos, seguido de 3 lavagens com solução fisiológica de Krebs-Henseleit isenta de Ca^{2+} . Após 15 minutos os anéis de aorta foram pré-incubados com as lignanas grandisina (100 μ M) e yangambina (100 μ M) por 15 minutos e uma terceira e última contração

foi induzida por Phe (0,3 μM) ou cafeína (10 mM) e registrada para comparação com a média das duas primeiras.

3.8 Avaliação do efeito de lignanas sobre o transiente de cálcio citoplasmático

Foi utilizada a sonda fluorescente para cálcio Fluo-4AM (Invitrogen). As artérias aorta foram isoladas e colocadas em solução de Hanks (mM): NaCl 145,0; KCl 5,0; MgCl_2 1,0; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; NaH_2PO_4 0,5; glicose 10,0 e Hepes 10,0, em pH 7.4 a 37°C. Com auxílio de lupa e lâmina de bisturi foram cortados anéis de aorta de aproximadamente 150 μm de espessura. Estes anéis foram colocados em lamínula para microscopia confocal (42 mm de diâmetro) contendo solução de polilisina (50%, diluída em Hanks), mantidas em câmara úmida a 37°C, sob aeração com mistura carbogênica, por cerca de 15 minutos para fixação. Posteriormente, adicionou-se Fluo 4-AM (10 $\mu\text{mol/L}$, diluído em Hanks) à preparação, mantendo-se por 30 minutos. Após a incubação, o excesso da sonda foi removido lavando-se os anéis, cuidadosamente, com solução de Hanks. Em seguida, os anéis de aorta foram pré-incubados por 15 minutos com as lignanas grandisina (100 μM) e yangambina (100 μM) em estufa a 37°C. Para o grupo controle, anéis de aorta foram pré-incubados por 15 minutos com DMSO (100%), utilizado como solvente para as lignanas. Posteriormente, adicionou-se Phe (0,3 μM) a preparação como estímulo para a mobilização de Ca^{2+} . Para protocolos que requeriam meio livre de Ca^{2+} foi utilizada solução Hanks sem o acréscimo de CaCl_2 . Utilizando laser de argônio, o Fluo 4-AM foi excitado em 488 nm e emissão em 510 nm em microscópio confocal (Zeiss 510 META, CEMEL- ICB/UFMG). Utilizando objetiva de imersão em óleo (63 x), 400 Hz, 512 x 512 pixels, as imagens foram capturadas a cada segundo durante 10 minutos. O programa ImageJ 1.45s foi usado para analisar as imagens. Foram selecionadas regiões de interesse na camada muscular e considerado F_0 como fluorescência basal antes do estímulo, F como fluorescência final após o estímulo, obtendo-se $(F - F_0 / F_0)$.

3.9 Análise estatística

Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.03. Os dados de relaxamento vascular foram representados como o percentual de redução da contração em resposta a fenilefrina. As curvas concentração-efeito cumulativas foram analisadas através do método two-way ANOVA para medidas repetidas, seguidas de testes de comparação do tipo Bonferroni. O teste t de Student foi utilizado para comparação de pares de resultados. Todos os resultados foram expressos como média \pm EPM e considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Estudo do efeito vasodilatador de lignanas em aorta de camundongo

Grandisina, licarina A e yangambina induzem efeito vasodilatador, concentração-dependente (Fig. 6), em aortas com endotélio funcional ($pCl_{50} = 4,30 \pm 0,13$, $> 4,00$ e $4,51 \pm 0,05$, respectivamente).

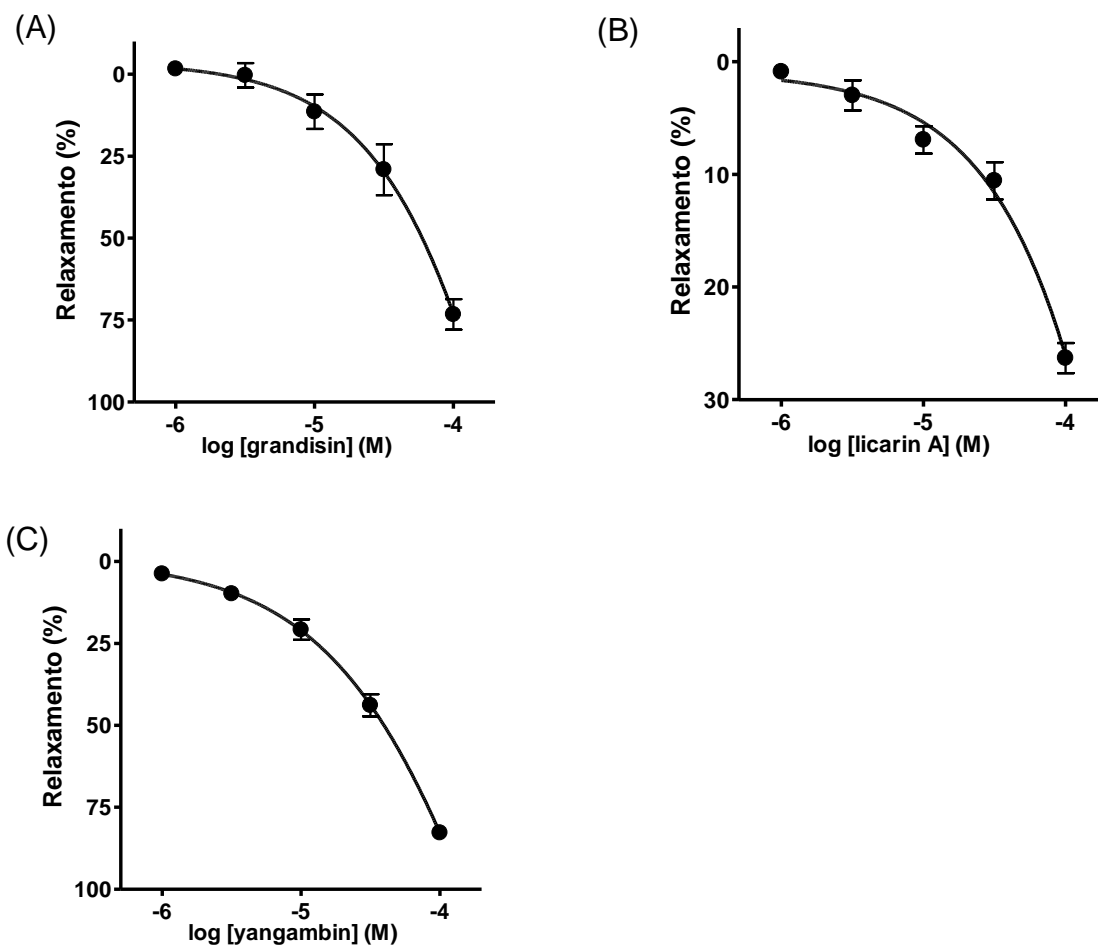


Fig. 6: Efeito vasodilatador das lignanas grandisina (A), licarina A (B) e yangambina (C) em anéis de aorta com endotélio funcional. Os resultados são representados em média \pm EPM de pelo menos 5 experimentos.

4.2 Avaliação do papel do endotélio e de seus mediadores sobre o efeito vasodilatador de lignanas

Na ausência de endotélio funcional, o efeito vasodilatador da grandisina não foi alterado ($pCI_{50} = 4,11 \pm 0,09$; Fig. 7A). No entanto, a ação vasodilatadora da licarina A foi fortemente inibida (Fig. 7B), enquanto que curva concentração-efeito de yangambina foi significativamente ($P < 0,05$) deslocada para direita ($pCI_{50} = 4,02 \pm 0,08$; Fig. 7C).

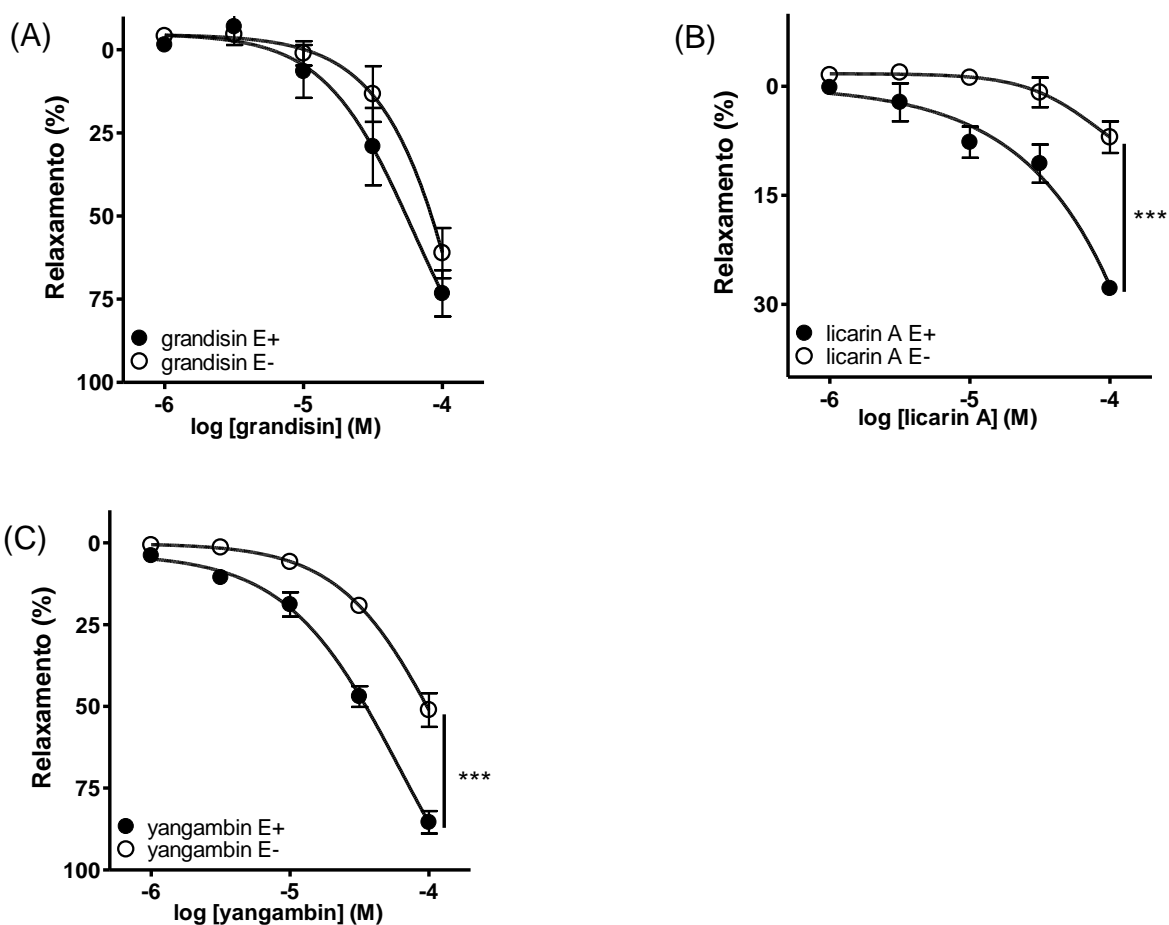


Fig. 7: Efeito vasodilatador das lignanas grandisina (A), licarina A (B) e yangambina (C) em anéis de aorta na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio funcional. Os resultados são representados como média \pm EPM de pelo menos 5 experimentos (Two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni; *** $p < 0,001$).

A pré-incubação de anéis de aorta com endotélio funcional com L-NAME (300 μ M), inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), não alterou

significativamente curva concentração-efeito de grandisina (Fig. 8A). No entanto, o L-NAME inibiu significativamente a vasodilatação induzida por licarina A (Fig. 8B) e promoveu um deslocamento para direita da curva concentração-efeito de yangambina (Fig. 8C).

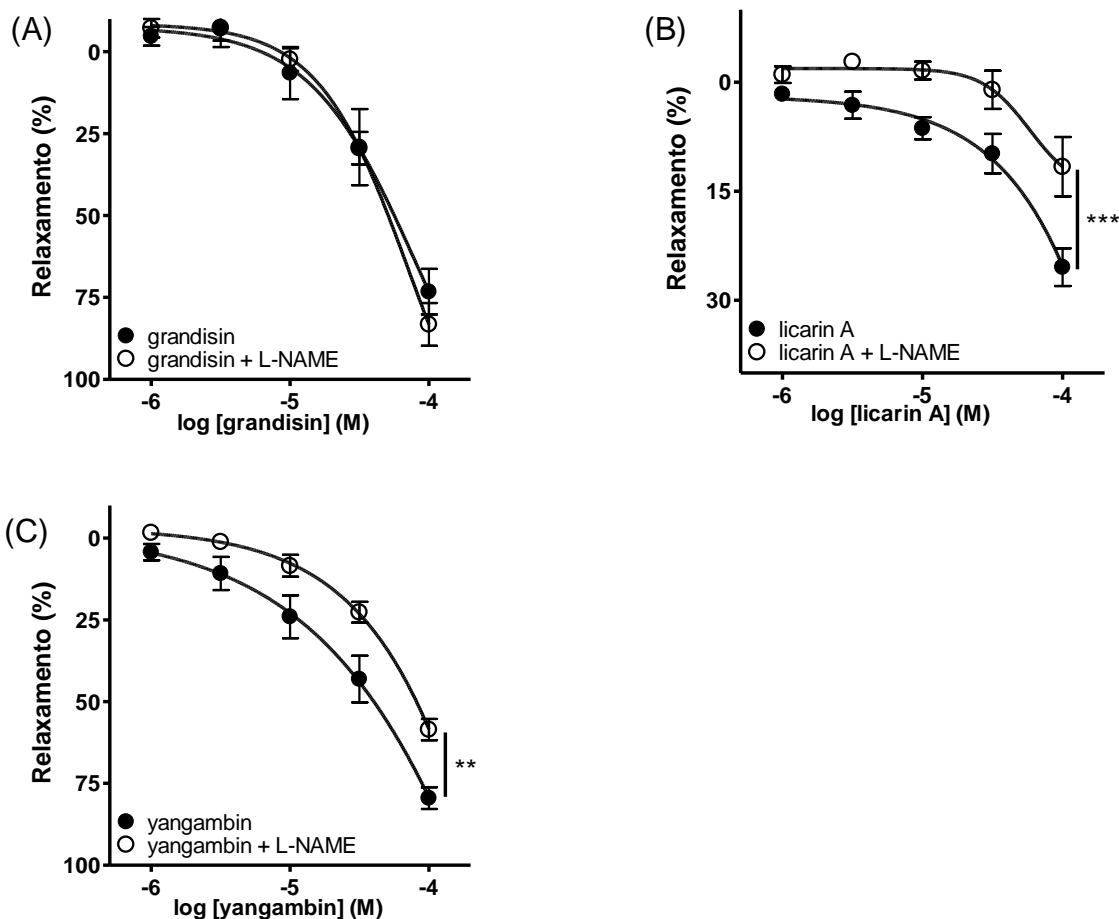


Fig. 8: Efeito vasodilatador das lignanas grandisina (A), licarina A (B) e yangambina (C) em anéis de aorta, com endotélio funcional, pré-incubados ou não com L-NAME (300 μ M). Os resultados são representados como média \pm EPM de pelo menos 5 experimentos (Two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Além disso, a pré-incubação de anéis de aorta com endotélio funcional com ODQ (1,0 μ M), inibidor da guanilato ciclase solúvel, promoveu um deslocamento para direita da curva concentração-efeito de licarina A (Fig. 9A) e de yangambina (Fig. 9B).

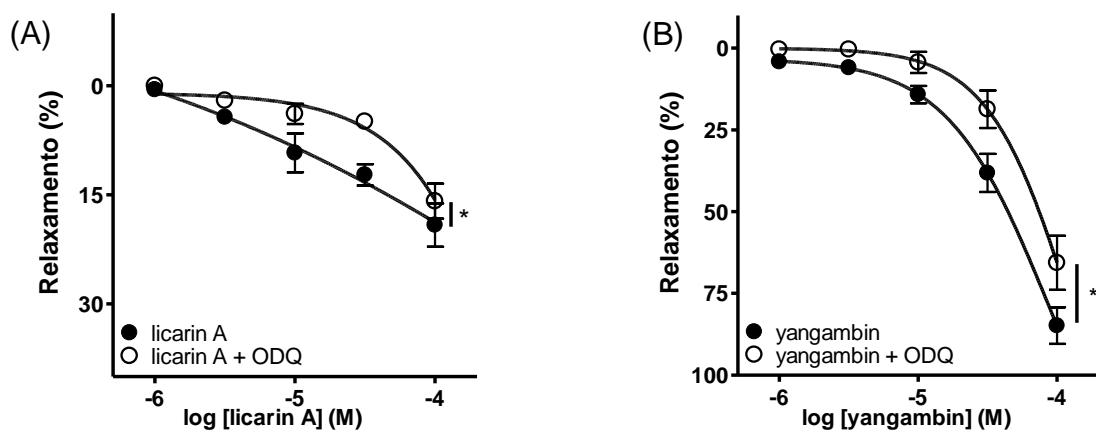


Fig. 9: Efeito vasodilatador das lignanas licarina A (A) e yangambina (B) em anéis de aorta, com endotélio funcional, pré-incubados ou não com ODQ (1,0 µM). Os resultados são representados como média ± EPM de pelo menos 3 experimentos (Two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni; *p < 0,05).

A pré-incubação de anéis de aorta com endotélio funcional com catalase (2400 UI/ml), enzima que degrada o H₂O₂, não alterou a vasodilatação induzida tanto por licarina A (Fig. 10A), quanto por yangambina (Fig. 10B).

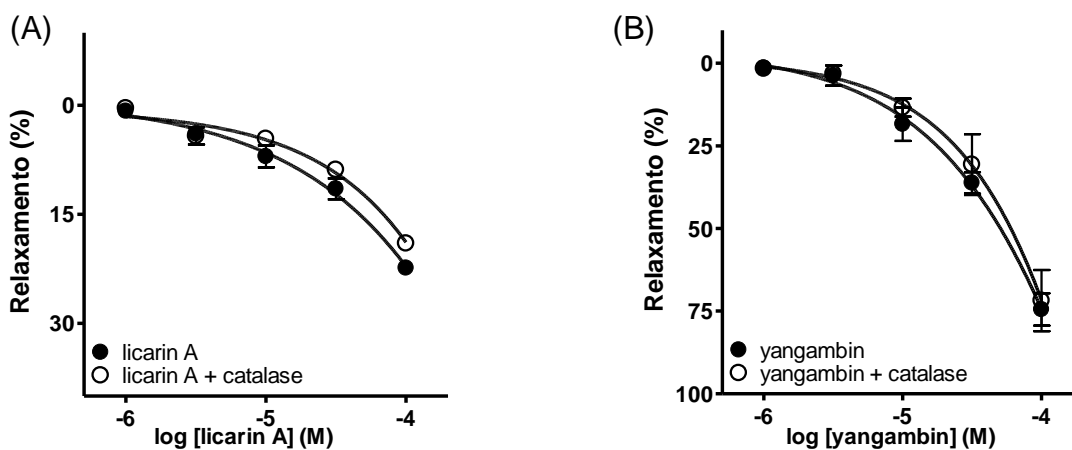


Fig. 10: Efeito vasodilatador das lignanas licarina A (A) e yangambina (B) em anéis de aorta, com endotélio funcional, pré-incubados ou não com catalase (2400 unidades). Os resultados são representados como média ± EPM de pelo menos 3 experimentos (Two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni).

4.3 Avaliação do efeito de lignanas sobre os canais para cálcio

A pré-contracção de anéis de aorta com endotélio funcional com KCl (80 mM) não alterou o relaxamento vascular induzido por grandisina e por yangambina (Fig. 11).

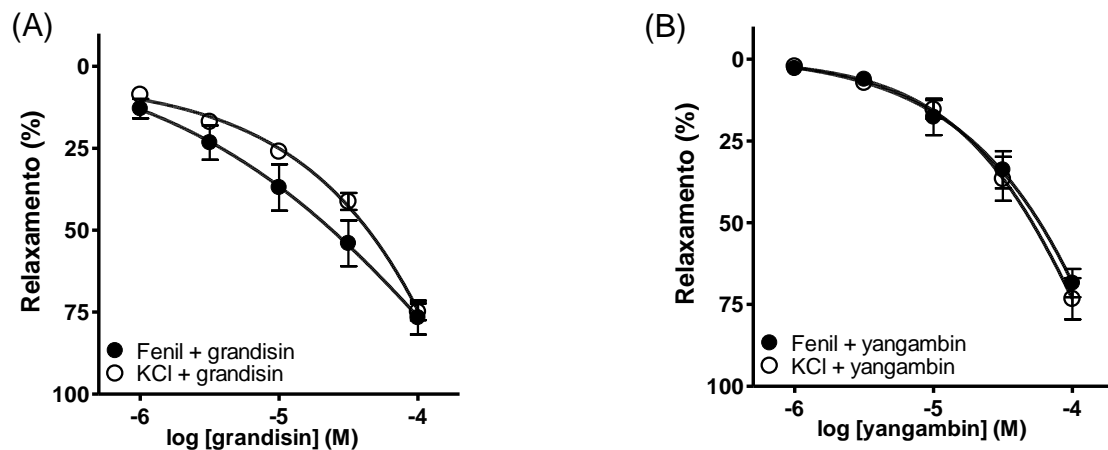


Fig. 11: Efeito vasodilatador das lignanas grandisina (A) e yangambina (B) em anéis de aorta, com endotélio funcional, pré-contraindidos com fenilefrina (0,3 μ M) e KCl (80 mM). Os resultados são representados como média \pm EPM de pelo menos 5 experimentos (Two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni).

4.4 Avaliação do efeito de lignanas sobre os estoques intracelulares de cálcio

Na ausência de Ca^{2+} extracelular, a pré-incubação de anéis de aorta com grandisina (100 μ M) e com yangambina (100 μ M) reduziu a contracção induzida por fenilefrina (0,3 μ M) (Fig. 12).

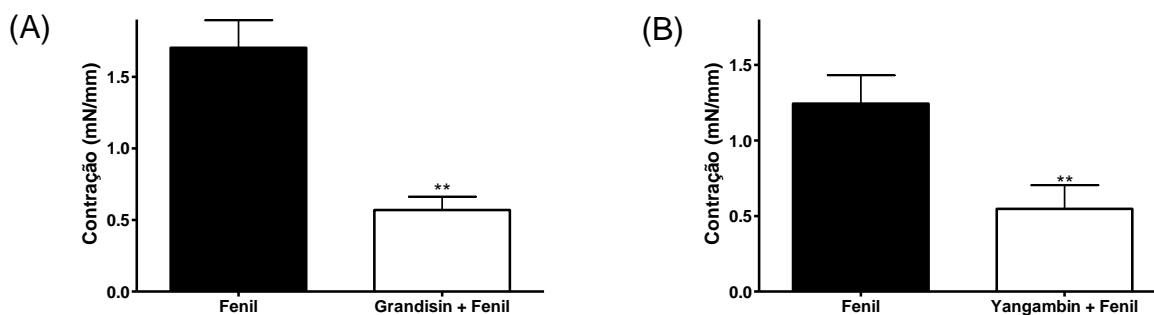


Fig. 12: Redução do efeito vasoconstritor de fenilefrina (Fenil; 0,3 μ M) em anéis de aorta, após a pré-incubação com 100 μ M grandisina (A) e 100 μ M yangambina (B) em meio sem cálcio. Os resultados são representados como média \pm EPM de pelo menos 5 experimentos (Teste t de Student; ** p < 0,01).

Além disso, também na ausência de Ca^{2+} extracelular, a pré-incubação de anéis de aorta com grandisina (100 μ M) inibiu a contração induzida pela cafeína (10 mM), enquanto que a pré-incubação destes vasos com yangambina (100 μ M) reduziu significativamente a contração induzida pela cafeína (10 mM) (Fig. 13).

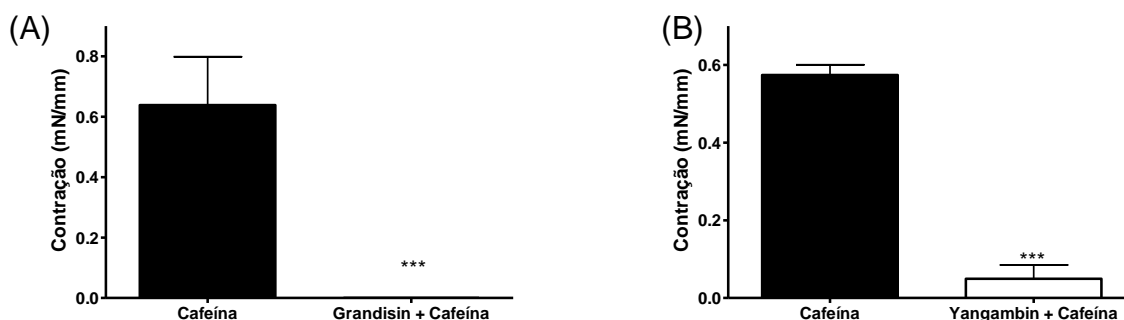


Fig. 13: Redução do efeito vasoconstritor da cafeína (10 mM) em anéis de aorta, após a pré-incubação com 100 μ M grandisina (A) e 100 μ M yangambina (B) em meio sem cálcio. Os resultados são representados como média \pm EPM de pelo menos 5 experimentos (Teste t de Student; *** p < 0,001).

4.5 Avaliação do efeito de lignanas sobre o transiente de cálcio citoplasmático

A pré-incubação de anéis de aorta tanto com grandisina (100 μ M) quanto com yangambina (100 μ M) reduziu a intensidade de fluorescência emitida pela sonda Fluo 4-AM diante ao estímulo da fenilefrina (0,3 μ M) (Fig. 14).

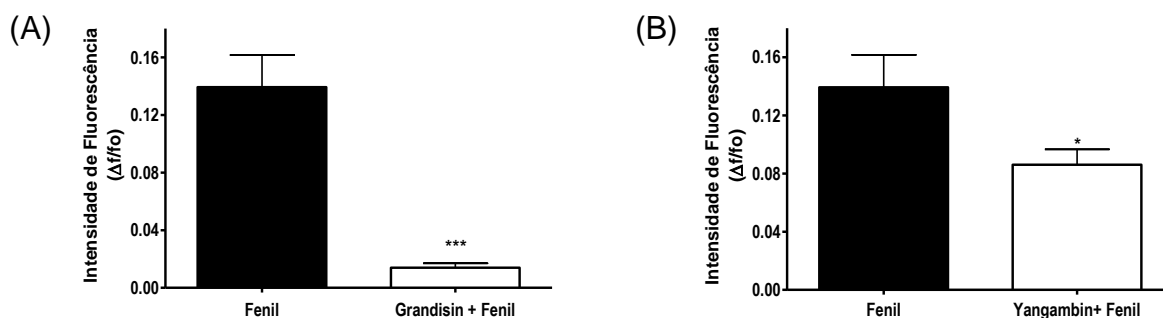


Fig. 14: Efeito de lignanas grandisina 100 μM (A) e yangambina 100 μM (B), em meio com cálcio, no aumento de cálcio intracelular induzido pela fenilefrina (Fenil, 0,3 μM) em anéis de aorta, medido com fluo-4AM por microscopia confocal. Os resultados são representados como média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos (Teste t de Student; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Todavia, na ausência de cálcio extracelular, a pré-incubação de anéis de aorta tanto com grandisina (100 μM) quanto com yangambina (100 μM) não causou diferença significativa na intensidade de fluorescência emitida pela sonda Fluo 4-AM (Fig. 15A) diante ao estímulo de fenilefrina (0,3 μM) (Fig. 15).

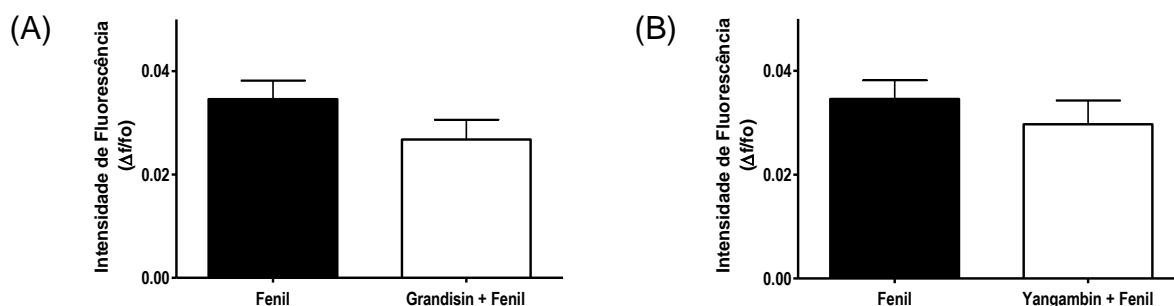


Fig. 15: Efeito de lignanas grandisina 100 μM (A) e yangambina 100 μM (B), em meio sem cálcio, no aumento de cálcio intracelular induzido pela fenilefrina (Fenil, 0,3 μM) em anéis de aorta, medido com fluo-4AM por microscopia confocal. Os resultados são representados como média \pm EPM de pelo menos 3 experimentos (Teste t de Student).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O endotélio vascular desempenha um importante papel no sistema cardiovascular. Sua principal função corresponde à síntese e liberação de potentes vasodilatadores tais como NO, prostaglandinas vasodilatadoras e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), que são responsáveis pelo controle da homeostase e do tônus vascular (Vanhoutte *et al.*, 2009). A remoção do endotélio não alterou o efeito vasodilatador da grandisina, ao passo que a vasodilatação induzida por licarina A e yangambina foi significativamente reduzida. Portanto, o efeito vasodilatador de grandisina independe da participação de fatores relaxantes derivados do endotélio. Por outro lado, a presença de endotélio vascular íntegro é fundamental para que a vasodilatação induzida por licarina A alcance seu efeito máximo. Já na vasodilatação induzida por yangambina a integridade endotelial é um fator parcial.

O NO induz vasodilatação de forma indireta através da ativação da GCs, produzindo GMPc como segundo mensageiro que por sua vez promove dessensibilização do aparato contrátil vascular ao Ca^{2+} (Carvajal *et al.*, 2000). Os efeitos diretos do NO incluem a inibição da liberação Ca^{2+} pelas células da musculatura lisa vascular induzida pelo inositol trifosfato (IP3) (Ji *et al.*, 1998); estimulação do sequestro de Ca^{2+} intracelular para o retículo sarcoplasmático através da estimulação da Ca^{2+} -ATPase (SERCA) presente nesta organela (Adachi *et al.*, 2004), e hiperpolarização celular via ativação de canais para K^+ (Bolotina *et al.*, 1994) (Fig. 16). A pré-incubação de anéis de aorta com endotélio funcional com L-NAME, inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase não alterou significativamente curva concentração-efeito de grandisina, enquanto que reduziu de forma significativa a vasodilatação induzida por licarina A e yangambina. Sendo assim, a vasodilatação induzida por grandisina não depende da liberação de NO, o que é coerente com os resultados obtidos em vasos cujo endotélio foi removido. Por outro lado, o NO está envolvido no vasorrelaxamento induzido por licarina A e por yangambina em anéis de aorta com endotélio funcional.

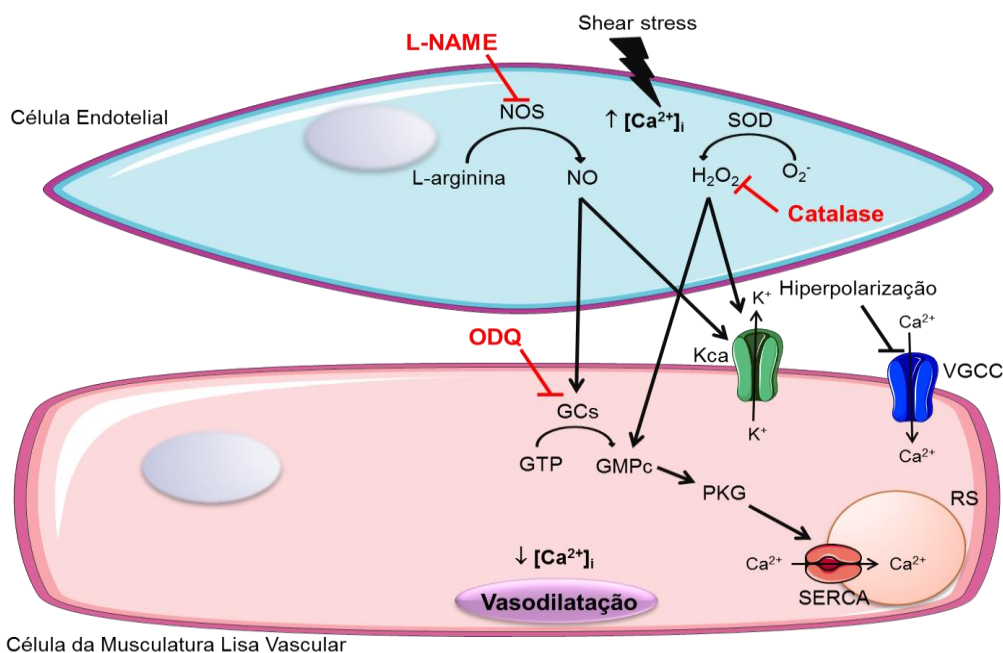


Fig. 16: Vasodilatação mediada por fatores endoteliais e inibidores (L-NAME, ODQ e Catalase) utilizados para avaliação do efeito de lignanas sobre estes fatores. Estímulos como o shear stress e o aumento da concentração intracelular de cálcio estimulam a óxido nítrico sintase (NOS) presente na célula endotelial a converter L-arginina em óxido nítrico (NO) que se difunde e chega a célula da musculatura lisa vascular, onde ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) que converte o GTP em GMPc, ativando a PKG, que por sua vez ativa a cálcio ATPase presente no retículo sarcoplasmático a captar o cálcio presente no citoplasma, o que reduz a concentração intracelular de cálcio e promove vasodilatação. O NO produzido na célula endotelial também ativa canais para K^+ presentes na célula da musculatura lisa vascular, provocando hiperpolarização e inibe a entrada de cálcio pelos canais para cálcio voltagem dependente e contribui para a redução da concentração intracelular de Ca^{2+} , logo, para vasodilatação. Além disso, a célula endotelial também produz H_2O_2 , que também produz GMPc e ativa canais para K^+ , contribuindo com o processo vasodilatador.

DPPB (2-(2,4-dihidroxifenil)-5-(E)-propenilbenzofurano) é uma lignana cuja estrutura molecular apresenta um grupamento propenilbenzofurano, assim como licarina A. Ladurner e colaboradores (2012) demonstraram que DPPB aumenta a atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a disponibilidade de NO em cultura de células endoteliais. Esta ação é mediada por um mecanismo que envolve a elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} através de uma via envolvendo Ca^{2+} /calmodulina (Ca^{2+} /CaM), proteína quinase β Ca^{2+} /CaM-dependente (CaMKK β) e proteína quinase AMP-ativada (AMPK).

A GCs apresenta um grupamento heme em seu sítio regulatório. O NO ativa esta enzima ao se ligar ao Fe^{2+} do sítio heme, produzindo GMPc. O ODQ é um inibidor seletivo da GCs que promove oxidação do grupamento heme desta enzima ao retirar um elétron do Fe^{2+} que passa a Fe^{3+} , tornando-a inativa (Schmidt *et al.*, 2012) (Fig. 16). A pré-incubação de anéis de aorta com ODQ promoveu um deslocamento para direita da curva concentração-efeito de licarina A e de yangambina. Sendo assim, o mecanismo pelo qual estas lignanas induzem a vasodilatação em aorta de camundongo apresenta uma dependência parcial da ativação da GCs.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a isoforma neuronal da óxido nítrico sintase (nNOS) é constitutivamente expressa no endotélio da aorta de camundongo e, além de NO, também produz H_2O_2 . Outrossim, o H_2O_2 produzido a partir da nNOS contribui igualmente com o NO derivado da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) para o relaxamento vascular dependente do endotélio em aorta de camundongo (Capettini *et al.*, 2008; 2010) (Fig. 16). Entretanto, a vasodilatação em anéis de aorta induzida por licarina A e yangambina não foi alterada pela pré-incubação dos vasos com catalase, enzima responsável pela hidólise do H_2O_2 em H_2O e O_2 , indicando que este EDHF não está envolvido na vasodilatação induzida por estas lignanas.

Canais de Ca^{2+} desempenham um papel importante na regulação da contratilidade do músculo e do tônus vascular (Karaki *et al.*, 1997). A contração dos anéis de aorta com KCl 80 mM ocorre devido a despolarização das células da musculatura lisa vascular por aumentar o potencial de membrana que leva a abertura de canais para Ca^{2+} voltagem dependente, resultando no aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Ko *et al.*, 2008) (Fig. 17). Tendo em vista que o relaxamento vascular induzido por grandisina não ocorre com a participação de mediadores endoteliais e que a dependência de yangambina é parcial, foi avaliada a participação de canais para Ca^{2+} no relaxamento vascular induzido por estas lignanas. Observou-se que anéis de aorta pré-contraídos com KCl 80 mM não apresentaram alteração no relaxamento vascular induzido por grandisina e yangambina, sugerindo que a ativação de canais para Ca^{2+} está envolvida na vasodilatação induzida por estas lignanas.

Tendo indícios da participação de canais para Ca^{2+} , investigou-se alterações na mobilização de Ca^{2+} na vasodilatação induzida por estas lignanas. Sabe-se que a fenilefrina é um agonista $\alpha 1$ -adrenérgico e causa vasoconstrição através da ativação da fosfolipase C e produção de IP3, o que provoca a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático seguido por entrada sustentada de Ca^{2+} (Karakı *et al.*, 1997) (Fig. 17). Foi testada a hipótese de que o efeito vasorelaxante de grandisina e yangambina ocorre via inibição da liberação de Ca^{2+} intracelular do retículo sarcoplasmático na musculatura lisa vascular. Em meio livre de Ca^{2+} , a fenilefrina induz contração transitória que resulta principalmente da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (Ko *et al.*, 2000). Nossos resultados mostraram que a pré-incubação de anéis de aorta com grandisina e com yangambina reduziram a resposta contrátil induzida pela fenilefrina na ausência de Ca^{2+} extracelular, o que sugere um efeito inibitório destas lignanas na liberação intracelular de Ca^{2+} na musculatura lisa vascular.

A cafeína é uma xantina com vários efeitos e mecanismos de ação no tecido vascular. Em células endoteliais, aumenta o cálcio intracelular o que estimula a produção de NO, através do aumento da expressão da óxido nítrico sintase endotélial. Esta xantina é agonista do receptor de rianoidina localizado no retículo sarcoplasmático e, ao se ligar a este receptor, promove a liberação do Ca^{2+} armazenado nesta organela (Porta *et al.*, 2011) (Fig. 17). Assim como a fenilefrina, em meio livre de cálcio, a cafeína induz contração transitória, porém de menor magnitude. Por este motivo, a cafeína pode ser utilizada como ferramenta para avaliar o efeito inibitório de grandisina e de yangambina na liberação de Ca^{2+} intracelular no músculo liso vascular. Com este intuito, utilizamos cafeína (10 mM) em meio 0 Ca^{2+} como estímulo contrátil, uma vez que este efeito é resultado somente da liberação de Ca^{2+} estocada no retículo sarcoplasmático. Observou-se uma inibição da resposta contrátil induzida pela cafeína na ausência de Ca^{2+} extracelular através da pré-incubação de anéis de aorta com grandisina e yangambina. Estes resultados sugerem que estas lignanas possuem efeito inibitório na liberação intracelular de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, corroborando com os resultados obtidos com a fenilefrina.

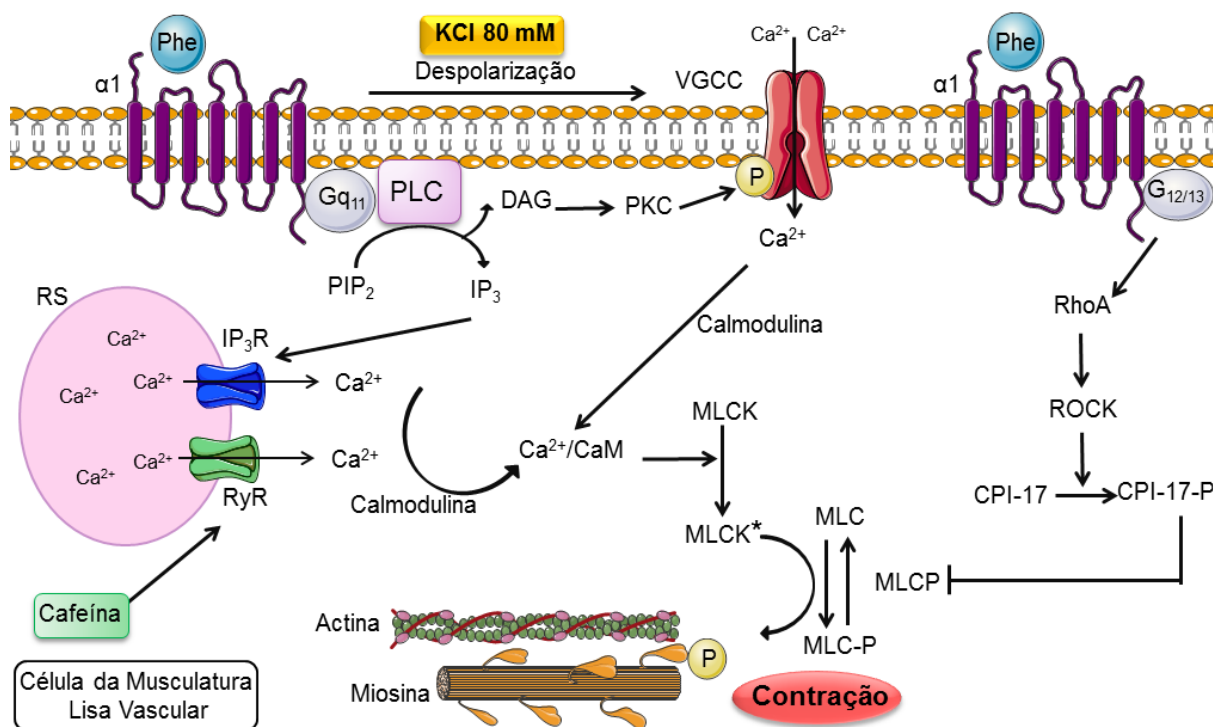


Fig. 17: Mediadores contráteis que atuam na célula da musculatura lisa vascular. Ao se ligar ao seu receptor, a fenilefrina (Phe) ativa a proteína G_{q11} e ativa a fosfolipase C que converte PIP_2 em IP_3 e DAG. O IP_3 se liga ao seu receptor no retículo sarcoplasmático (RS) e promove liberação do Ca^{2+} armazenado nesta organela. Já o DAG ativa a PKC que fosforila os canais para Ca^{2+} voltagem dependente, induzindo o influxo de Ca^{2+} . A Phe também promove despolarização da célula da musculatura lisa vascular que também estimula o influxo de Ca^{2+} via canais para Ca^{2+} voltagem dependente. A cafeína se liga ao receptor de rianidina presentes no RS e promove liberação do Ca^{2+} armazenado nesta organela. Todo este Ca^{2+} intracelular se liga à calmodulina (CaM) presente no citoplasma, formando o complexo Ca^{2+}/CaM que ativa a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK) que fosforila a cadeia leve de miosina (MLC). A miosina fosforilada se liga a actina, o que leva a contração. Além disso, a Phe ativa a proteína $G_{12/13}$ e ativa a RhoA, que por sua vez ativa a ROCK. A ROCK fosforila o CPI-17 que inibe a fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP), responsável por desfosforilar a cadeia leve de miosina. A inibição do MLCP resulta na manutenção do processo contrátil. Já a solução KCl a 80 mM promove despolarização das células da musculatura lisa vascular que resulta na abertura de canais para Ca^{2+} voltagem dependente, seguida do aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e vasoconstrição.

A fim de confirmar estes resultados, avaliou-se a mobilização intracelular de Ca^{2+} em tempo real através da sonda Fluo 4-AM. Observamos que a pré-incubação de anéis de aorta tanto com grandisina quanto com yangambina, na presença de Ca^{2+} extracelular, reduziu a emissão de fluorescência induzida pela fenilefrina, indicando que estas lignanas induzem inibição do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular para o intracelular. Já na ausência de Ca^{2+} extracelular, a pré-incubação de anéis de aorta tanto com grandisina quanto com yangambina não alterou a

emissão de fluorescência induzida pela fenilefrina, sugerindo que estas lignanas não alteram a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares para o citoplasma.

O fato de grandisina e yangambina reduzirem a resposta contrátil induzida pela fenilefrina e pela cafeína, mas não inibirer a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares para o citoplasma sugerem que outras vias que compõe o aparato contrátil vascular possam ser alvo destas lignanas. Dentre estas, podemos destacar a via RhoA/ROCK (família homólogo Ras membro A/quinase associada a Rho), responsável por manter uma contração sustentada, o que caracteriza a fase tônica contrátil (Ureña e López-Barneo, 2012). Além disto, a formação do complexo Ca^{2+} /CaM é essencial para a ativação da quinase de cadeia leve de miosina (MLCK), garantindo a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) que se liga a actina e resulta na contração (Wilson *et al.*, 2002). Sendo assim, grandisina e yangambim podem estar envolvidos na inibição de alguma destas vias e, por conseguinte, ocasionarem redução da resposta contrátil.

Entre as três lignanas estudadas, grandisina apresenta uma estrutura mais simples, composta por um grupo furano ligado a dois radicais trimetoxifenil, o que lhe confere ação vasodilatadora independente do endotélio e envolve a inibição do influxo de Ca^{2+} . No caso de licarina A, a presença de um grupamento propenilbenzofurano garante a indução de relaxamento vascular dependente da participação de fatores relaxantes derivados do endotélio vascular, através da ativação da NOS, culminando na liberação de NO e posterior ativação da GCs. Já yangambina, apresenta uma estrutura molecular mais complexa, constituída por um grupamento furofurano ligado a dois radicais trimetoxifenil. Esta lignana induz um relaxamento vascular parcialmente dependente de fatores relaxantes derivados do endotélio vascular, através da ativação da NOS e GCs, além de envolver a redução do influxo de Ca^{2+} . Isto sugere que a presença de dois radicais trimetoxifenil está diretamente relacionada com a capacidade da lignana em reduzir o influxo de Ca^{2+} , uma vez que grandisina e yangambina apresentam esta porção em comum em sua estrutura molecular. A figura 18 esquematiza os fatores envolvidos na vasodilatação mediada por grandisina, licarina A e yangambina.

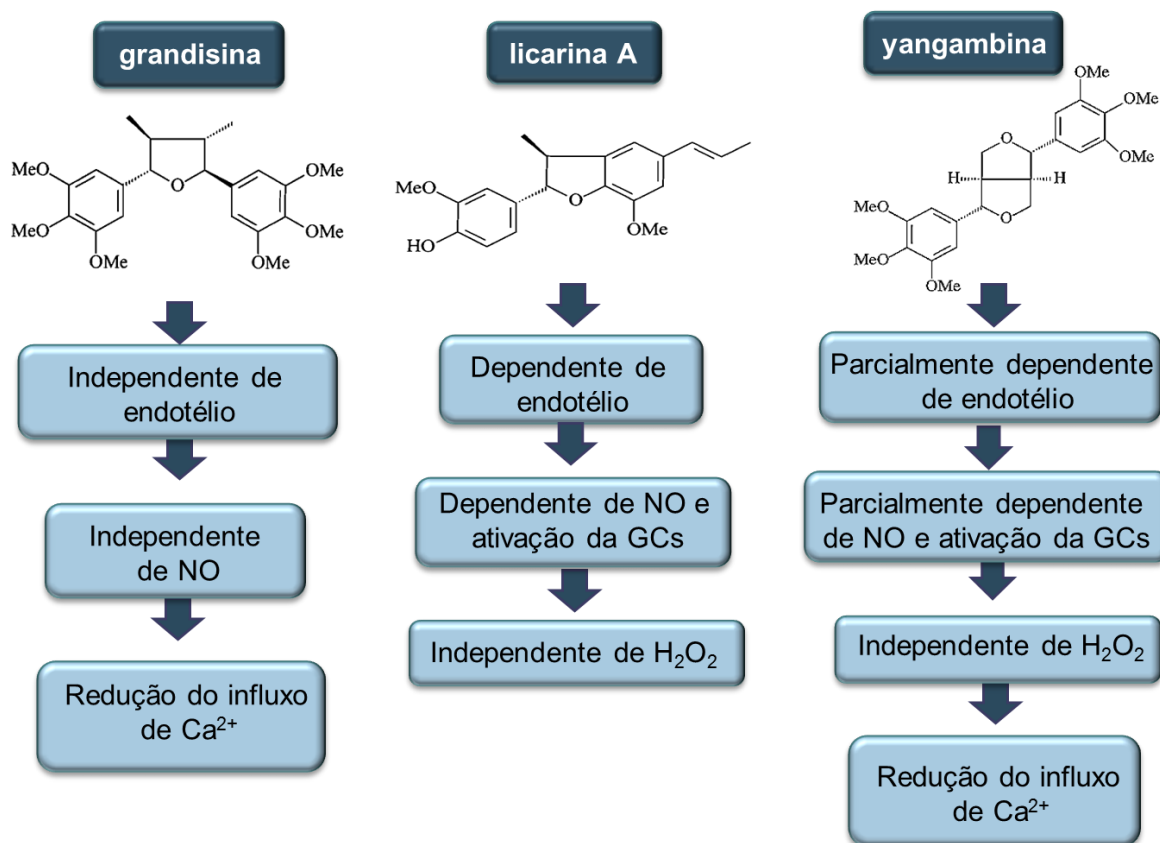


Fig. 18: Resumo dos fatores envolvidos na vasodilatação mediada por grandisina, licarina A e yangambina.

Este trabalho demonstrou a ação vasodilatadora da grandisina, licarina A e yangambina e parte do mecanismo de ação envolvido neste processo. Mais estudos devem ser realizados para avaliar se estas lignanas possuem potencial farmacológico para o tratamento de doenças cardiovasculares. Sendo assim, a partir da realização de testes complementares pode ser possível que estas lignanas venham a ser utilizadas como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem a existência de uma relação estrutura-atividade para o efeito vasodilatador induzido por lignanas. A porção propenilbenzofurano de licarina A pode ser responsável por um mecanismo dependente de endotélio e de NO, enquanto que o único grupo furano de grandisina estaria relacionado a um mecanismo de ação independente do endotélio e dependente da inibição do influxo de Ca^{2+} . Já o grupo furofurano de yangambina parece permitir uma vasodilatação parcialmente dependente do endotélio e da redução do influxo de Ca^{2+} . Assim, este trabalho dá suporte para o desenvolvimento de novas drogas vasodilatadoras com base na estrutura de lignanas.

7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- Abe M, Morikawa M, Inoue M, Nakajima A, Tsuboi M, Naito T, Hosaka K, Mitsuhashi H. Effects of 2,3-dibenzylbutane-1,4-diol on vascular smooth muscle of rabbit aorta. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* v. 301, p. 40-50, 1989.
- Abe M, Morikawa M, Inoue M, Tsuboi M, Aoyagi Y, Ohta A. Effects of the mammalian lignan, 2,3-dibenzylbutane-1,4-diol, on contraction and Ca^{2+} mobilization induced by noradrenaline in rat aorta. *Gen Pharmacol.* v. 22, p. 663-668, 1991.
- Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schoneich C, Cohen RA. S-glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med.* v. 10, p. 1200-1207, 2004.
- Agosta WC. Medicines and Drugs from Plants. *J Chem Educ.* v. 74, p. 857-860, 1997.
- Albuquerque S, Bastos JK, Calefi PS, Ciuffi KJ, Cunha WR, Da Silva de Laurentiz R, Lucarini R, Nassar EJ, Alves da Silva Filho A, Silva MLAE. Cubebin, dibenzylbutyrolactone lignan, semi-synthetic and synthetic derivatives thereof, and other lignans and neolignans as vasodilating agents in the therapy of erectile dysfunction. PCT 2011/075801.
- ALLHAT Collaborative Research Group. Major outcomes in highrisk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs. diuretic: the Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *JAMA.* v. 288, p. 2981-2997, 2002.
- Ayres DC, Loike JD. Lignans Chemical and Clinical Properties. 1. ed. Cambridge University Press: Cambridge, 1990.
- Bernatova I, Pechanova O, Babal P, Kysela S, Stvrtina S, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v. 282, p. 942-948, 2002.

- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. v. 368, p. 850-853, 1994.
- Butler MS. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep*. v. 25, p. 475-516, 2008.
- Cabral MMO, Barbosa-Filho JM, Maia GLA, Chaves MCO, Braga MV, De Souza W, Soares ROA. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. v. 124, p. 319-324, 2010.
- Capettini LS, Cortes SF, Gomes MA, Silva GA, Pesquero JL, Lopes MJ et al.. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. v. 295, p. H2503-H2511, 2008.
- Capettini LS, Cortes SF, Lemos VS. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. *Eur J Pharmacol*. v. 643, p. 260-266, 2010.
- Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol*. v. 184, p. 409-420, 2000.
- Carvalho AAV, Galdino PM, Nascimento MVM, Kato MJ, Valadares MC, Cunha LC, Costa EA. Antinociceptive and Antiinflammatory Activities of Grandisina extracted from *Virola surinamensis*. *Phytother Res*. v. 24, p. 113-118, 2010.
- Charlton JL. Antiviral activity of lignans. *J Nat Prod*. v. 61, p. 1447-1451, 1998.
- Castro-Faria-Neto HC, Araujo CV, Moreira S, et al. Yangambina: A new naturally occurring platelet activating factor receptor antagonist: In vivo pharmacological studies. *Planta Med*. v. 61, p. 106-112, 1995.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Roccella EJ. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *Hypertension*. v. 42, p. 1206-1252, 2003.

- Cushman DW, Cheung HS, Sabo EF, Ondetti MA. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*. v. 16, p. 5484-91, 1977.
- Dell'Agli M, Busciala A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res*. v. 63, p. 593-602, 2004.
- Doyle AE, McQueen EG, Smirk FH. Treatment of hypertension with reserpine, with reserpine in combination with pentapyrrolidinium, and with reserpine in combination with *Veratrum* alkaloids. *Circulation*. v. 11, p. 170-181, 1955.
- Ferreira SH, Rocha e Silva M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (Bradykinin Potentiating Factor) from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia*. v. 21, p. 347-9, 1965.
- Fukao K, Shimada K, Hiki M, Kiyonagi T, Hirose K, Kume A, Ohsaka H, Matsumori R, Kurata T, Miyazaki T, Daida H. Effects of calcium channel blockers on glucose tolerance, inflammatory state, and circulating progenitor cells in non-diabetic patients with essential hypertension: a comparative study between azelnidipine and amlodipine on glucose tolerance and endothelial function - a crossover trial (AGENT). *Cardiovasc Diabetol*. v. 10, p. 79, 2011.
- Ghisalberti EL. Cardiovascular activity of naturally occurring lignans. *Phytomedicine*. v. 4, p. 151-166, 1997.
- Ghiadoni ASL, Thiazide Diuretics in the Treatment of Hypertension: An Update. *J Am Soc Nephrol*. v. 17, p. 25-29, 2006.
- Giestas A, Palma I, Ramos M. Sistema renina-angiotensina-aldosterona e sua modulação farmacológica. *Acta Med Port*. v. 23, p. 677-688, 2010.
- Gordaliza M, Castro MA, García-Grávalos MD, Ruiz P, Miguel del Corral JM, San Feliciano A. Antineoplastic and antiviral activities of podophyllotoxin related lignans. *Arch Pharm*. v. 327, p. 175-179, 1994.
- Hayreh SS. Duke-Elder Lecture: Systemic arterial blood pressure and the eye. *Eye*. v. 10, p. 5-28, 1996.

- Herbert JM, Castro-Faria-Neto HC, Barbosa-Filho JM, Cordeiro RS, Tibiriça E. Pharmacological evidence for the putative existence of two different subtypes of PAF receptors on platelets and leukocytes; studies with yangambina. *J Lipid Mediat Cell Signal*. v. 17, p. 1-14, 1997.
- Hughes B. 2008 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov*. v. 8, p. 93-96, 2009.
- Hulthén L. Hemodynamic effects of calcium channel blockers in essential hypertension. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. v. 58, p. 73-79, 1986.
- Ji J, Benishin CG, Pang PK. Nitric oxide selectively inhibits intracellular Ca^{2+} release elicited by inositol trisphosphate but not caffeine in rat vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. v. 285, p. 16-21, 1998.
- Kannel WB, Dawber TR, Sorlie P, Wolf PA. Components of blood pressure and risk of atherothrombotic brain infarction: the Framingham study. *Stroke*. v. 7, p. 327-331, 1976.
- Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev*. v. 49, p. 157-230, 1997.
- Khalil A, Harrington K, Muttukrishna S, Jauniaux E. Effect of antihypertensive therapy with alpha-methyldopa on uterine artery Doppler in pregnancies with hypertensive disorders. *Ultrasound Obstet Gynecol*. v. 35, p. 688-694, 2010.
- Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res*. v. 44, p. 65-81, 2008.
- Ko WH, Yao XQ, Lau CW, Law WI, Chen ZY, Kwok W, Ho K, Huang Y. Vasorelaxant and antiproliferative effects of berberine. *Eur J Pharmacol*. v. 399, p. 187-196, 2000.
- Kostis JB, Berge KG, Davis BR, Hawkins CM, Probstfield J. Effect of atenolol and reserpine on selected events in the systolic hypertension in the elderly program (SHEP). *Am J Hypert*. v. 8, p. 1147-1153, 1995.

- Ladurner A, Atanasov AG, Heiss EH, Baumgartner L, Schwaiger S, Rollinger JM, Stuppner H, Dirsch VM. 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-5-(E)-propenylbenzofuran promotes endothelial nitric oxide synthase activity in human endothelial cells. *Biochem Pharmacol.* v. 84, p. 804-812, 2012.
- Lee SK, Cui B, Mehta RR, Kinghorn AD, Pezzuto JM. Cytostatic mechanism and antitumor potential of novel 1H-cyclopenta- β -benzofuran lignans isolated from *Aglaia elliptica*. *Chem Biol Interact.* v. 115, p. 215-228, 1998.
- Lee J, Kim J, Yu Y, Kin Y. Inhibition of phospholipase C gamma 1 and cancer cell proliferation by lignans and flavans from *Machilus thunbergii*. *Arch Pharm Res.* v. 27, p. 1043-1047, 2004.
- León-Díaz R, Meckes M, Said-Fernández S, Molina-Salinas GM, Vargas-Villarreal J, Torres J, Luna-Herrera J, Jiménez-Arellanes A. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v. 105, p. 45-51, 2010.
- Leonetti G, Egan CG. Use of carvedilol in hypertension: an update. *Vasc Health Risk Manag.* v. 8, p. 307-322, 2012.
- Lessa MA, Araújo CV, Kaplan MA, Pimenta D, Figueiredo MR, Tibiriçá E. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. *Fundam Clin Pharmacol.* v. 22, p. 161-168, 2008.
- Li N, Zou AP, Ge ZD, Campbell WB, Li PL. Effect of nitric oxide on calcium-induced calcium release in coronary arterial smooth muscle. *Gen Pharmacol.* v. 35, p. 37-45, 2000.
- Liu L, Wang Z, Gong L, *et al.* Blood pressure reduction for the secondary prevention of stroke: a Chinese trial and a systematic review of the literature. *Hypertens Res.* v. 32, p. 1032-1040, 2009.
- Lopes NP, Chicaro P, Kato MJ, Albuquerque S, Yoshida M. Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs active against *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Planta Med.* v. 64, p. 667-669, 1998.

- Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, et al. 2007 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). *Eur Heart J*. v. 28, p. 1462-1536, 2007.
- Marienhagen J e Bott M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *J Biotechnol*. v. 163, p. 166-178, 2013.
- Matsuda H, Murakami T, Nishida N, Kageura T, Yoshikawa M. Medicinal foodstuffs. XX. Vasorelaxant active constituents from the roots of *Angelica furcijuga* Kitagawa: structures of hyuganins A, B, C, and D. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. v. 48, p. 1429-1435, 2000.
- Matsumura Y, Kita S, Ohgushi R, Okui T. Effects of sesamin on altered vascular reactivity in aortic rings of deoxycorticosterone acetate salt induced hypertensive rat. *Biol Pharm Bull*. v. 23, p. 1041-1045, 2000.
- Matsunaga K, Shibuya M, Ohizumi Y. Graminone B, a novel lignan with vasodilative activity from *Imperata cylindrical*. *J Nat Prod*. v. 57, p. 1734-1736, 1994.
- Messerli FH & Ketelhut R. Left ventricular hypertrophy: an independent risk factor. *J Cardiovasc Pharmacol*. v. 17, p. 59-67, 1991.
- Miller FJ, Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res*. v. 82, p. 1298-1305, 1998.
- Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, et al. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem*. v. 214, p. 11-16, 1993.
- Miyawaki T, Aono H, Toyoda-Ono Y, Maeda H, Kiso Y, Moriyama K. Antihypertensive effects of sesamin in humans. *J Nutr Sci Vitaminol*. v. 55, p. 87-91, 2009.

- Moss GP. Nomenclature of lignanas and neolignans. *Pure Appl Chem.* v. 72, p. 1493-1523, 2000.
- Nakano D, Itoh C, Ishii F, Kawanishi H, Takaoka M, Kiso Y, Tsuruoka N, Tanaka T, Matsumura Y. Effects of sesamin on aortic oxidative stress and endothelial dysfunction in deoxycorticosterone acetate salt hypertensive rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* v. 26, p. 1701-1705, 2003.
- Nakano D, Kwak C-J, Fujii K, Ikemura K, Satake A, Ohkita M, Takaoka M, Ono Y, Nakai M, Tomimori N, *et al.* Sesamin metabolites induce an endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation through their antioxidative property independent mechanisms: possible involvement of the metabolites in the antihypertensive effect of sesamin. *J Pharmacol Exp Ther.* v. 318, p. 328-335, 2006.
- Nakatani N, Ikeda K, Kikuzaki H, Kidoa M, Yamaguchi Y. Diaryldimethylbutane lignans from *Myristica argentea* and their antimicrobial action against *Streptococcus mutans*. *Phytochemistry.* v. 27, p. 3127-3129, 1988.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* v. 66, p. 1022-1037, 2003.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* v. 75, p. 311-335, 2012.
- Nobre F, Chauchar F, Viana JM, Pereira GJ, Lima NK. Evaluation of the medical care of patients with hypertension in an emergency department and in ambulatory hypertension unit. *Arq Bras Cardiol.* v. 78, p. 156-161, 2002.
- Nyadjeu P, Dongmo A, Nguenefack TB, Kamanyi A. Antihypertensive and vasorelaxant effects of *Cinnamomum zeylanicum* stem bark aqueous extract in rats. *J Complement Integr Med.* v. 8, 2011.
- Oates JA e Brown NJ. Anti-hipertensivos e terapia farmacológica da hipertensão. In: Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil. cap. 33, p. 657-678, 2010.

- Oh K-S, Choi YH, Ryu SY, Oh BK, Seo HW, Yon GH, Kim YS, Lee BH. Cardiovascular effects of lignans isolated from *Saururus chinensis*. *Planta Med.* v. 74, p. 233-238, 2008.
- Park BY, Min BS, Kwon OK, Oh SR, Ahn KS, Kim TJ, Kim DY, Bae K, Lee HK. Increase of caspase-3 activity by lignans from *Machilus thunbergii* HL-60 cells. *Biol Pharm Bull.* v. 27, p. 1305-1307, 2004.
- Park JY, Yun JW, Choi YW, Bae JU, Seo KW, Lee SJ, Park SY, Hong KW, Kim CD. Antihypertensive effect of gomisin A from *Schisandra chinensis* on angiotensin II induced hypertension via preservation of nitric oxide bioavailability. *Hypertens Res.* v. 35, p. 928-934, 2012.
- Pellegrini N, Valtueña S, Ardigò D, Brighenti F, Franzini L, Del Rio D, Scazzina F, Piatti PM, Zavaroni I. Intake of the plant lignans matairesinol, secoisolariciresinol, pinoresinol, and lariciresinol in relation to vascular inflammation and endothelial dysfunction in middle age-elderly men and post-menopausal women living in Northern Italy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* v. 20, p. 64-71, 2010.
- Pepine CJ, Cooper-Dehoff RM. Cardiovascular therapies and risk for development of diabetes. *J Am Coll Cardiol.* v. 44, p. 509-512, 2004.
- Perry HM, Davis BR, Price TR, Applegate WB, Fields WS, Guralnik JM, Kuller L, Pressel S, Stamler J, Probstfield JL. Effect of treating isolated systolic hypertension on the risk of developing various types and subtypes of stroke: the Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP). *JAMA.* v. 284, p. 465-471, 2000.
- Piccinelli AL, Arana S, Caceres A, d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Rastrelli L. New lignans from the roots of *Valeriana prionophylla* with antioxidative and vasorelaxant activities. *J Nat Prod.* v. 67, p. 1135-1140, 2004.
- Porta M, Zima AV, Nani A, Diaz-Sylvester PL, Copello JA, et al. Single ryanodine receptor channel basis of caffeine's action on Ca²⁺ sparks. *Biophys J.* v. 100, p. 931-938, 2011.

- Prasad K. Antihypertensive activity of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flaxseed: role of guanylate cyclase. *Int J Angiol.* v. 13, p. 7-14, 2004.
- Raimundo JM, Trindade APF, Velozo LSM, Kaplan MAC, Sudo RT, Zapata-Sudo G. The lignan eudesmin extracted from *Piper truncatum* induced vascular relaxation via activation of endothelial histamine H1 receptors. *Eur J Pharmacol.* v. 606, p. 150-154, 2009.
- Rishton GM. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. *Am J Cardiol.* v. 101, p. 43-49, 2008.
- Ruilope LM. The kidney as a sensor of cardiovascular risk in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol.* v. 13, n. 3, p. 165–168, 2002.
- San Feliciano A, Gordaliza M, Miguel del Corral JM, Castro MA, García-Grávalos MD, Ruiz-Lázaro P. Antineoplastic and antiviral activities of some cyclolignans. *Planta Med.* v. 59, p. 246-9, 1993.
- Sarr M, Chataigneau M, Martins S, Schott C, Jasser EL, Min-Ho O, et al. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: Role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res.* v. 71, p. 794-802, 2006.
- Sauvain M, Kunesch N, Poisson J, Gantier J-C, Gayral P, Dedet J-P. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from Amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (Dellineaceae). *Phytother Res.* v. 10, p. 1-4, 1996.
- Schillaci G, Verdecchia P, Porcellati C, Cuccurullo O, Cosco C, et al. Continuous relation between left ventricular mass and cardiovascular risk in essential hypertension. *Hypertension.* v. 35, p. 580-586, 2000.
- Schmidt K, Neubauer A, Kolesnik B, Stasch JP, Werner ER, Gorren AC, Mayer B. Tetrahydrobiopterin protects soluble guanylate cyclase against oxidative inactivation. *Mol Pharmacol.* v. 82, p. 420-427, 2012.
- SHEP Cooperative Research Group. Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension: final results of the

- Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP). JAMA. v. 265, p. 3255-3264, 1991.
- Serra MF, Diaz BL, Barreto EO, Pereira APB, Lima MCR, Barbosa-Filho JM, Cordeiro RSB, Martins MA, Silva PMMR. Anti-allergic properties of the natural PAF antagonist yangambina. Planta Med. v. 63, p. 207-212, 1997.
- Silva GC, Braga FC, Lima MP, Pesquero JL, Lemos VS, Cortes SF. Hancornia speciosa Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. J Ethnopharmacol. v. 137, p. 709-713, 2011.
- Sneader W. Drug Prototypes and Their Exploitation. Wiley, UK, 1996.
- Soares de Moura R, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP, Rubenich LM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmão Correia ML. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. J Pharm Pharmacol. v. 54, p. 1515-1520, 2002.
- Sousa FCF, Pereira BA, Lima VTM, Lacerda CDG, Melo CTV, Barbosa-Filho JM, Vasconcelos SMM, Viana GSB. Central Nervous System Activity of Yangambina from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) in Mice. Phytother Res. v. 19, p. 282-286, 2005.
- Staessen JA, Gasowski J, Wang JG, Thijs L, Den Hond E, Boissel JP, Coope J, Ekblom T, Gueyffier F, Liu L, Kerlikowske K, Pocock S, Fagard RH. Risks of untreated and treated isolated systolic hypertension in the elderly: meta-analysis of outcome trials. Lancet. v. 355, p. 865-872, 2000.
- Tibiriçá E. Cardiovascular Properties of Yangambina, a Lignan Isolated from Brazilian Plants. Cardiovascular Drug Reviews. v. 19, n. 4, p. 313-328, 2001.
- Tuck ML. Metabolic considerations in hypertension. Am J Hypertens. v. 3, p. 355-365, 1990.
- Ureña J, López-Barneo J. Metabotropic regulation of RhoA/Rho-associated kinase by L-type Ca²⁺ channels. Trends Cardiovasc Med. v. 22, p. 155-160, 2012.

- Valsaraj R, Pushpangadan P, Smitt UW, Adsersen A, Christensen SB, Sittie A, Nyman U, Nielsen C, Olsen CE. New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*. J Nat Prod. v. 60, p. 779-742, 1997.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. Acta Physiologica. v. 196, p. 193-222, 2009.
- Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. Atherosclerosis. v. 156, p. 67-72, 2001
- Wald DS, Law M, Morris JK, Bestwick JP, Wald NJ. Combination therapy versus monotherapy in reducing blood pressure: meta-analysis on 11,000 participants from 42 trials. Am J Med. v. 122, p. 290-300, 2009.
- WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2010. World Health Organization. Geneva, WHO, 2010.
- WHO. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. World Health Organization. Geneva, 2011.
- Wilson DP, Sutherland C, Walsh MP. Ca^{2+} activation of smooth muscle contraction: evidence for the involvement of calmodulin that is bound to the triton insoluble fraction even in the absence of Ca^{2+} . J Biol Chem. v. 277, p. 2186-2192, 2002.
- Zhao Y, Wang J, Balleve O, Luo H, Zhang W. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. Hypertens Res. v. 35, p. 370-374, 2012.