

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa

TESE DE DOUTORADO

7-HIDROXICUMARINA INDUZ VASODILATAÇÃO, REDUÇÃO DA  
CONTRATILIDADE CARDÍACA E HIPOTENSÃO: UMA MOLÉCULA  
PROMISSORA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS  
CARDIOVASCULARES

QUIARA LOVATTI ALVES

Salvador - Bahia  
2020

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa**

**7-HIDROXICUMARINA INDUZ VASODILATAÇÃO, REDUÇÃO DA  
CONTRATILIDADE CARDÍACA E HIPOTENSÃO: UMA MOLÉCULA  
PROMISSORA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS  
CARDIOVASCULARES**

**QUIARA LOVATTI ALVES**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Darízy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Doutor.

**Salvador - Bahia**

**2020**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

A474h Alves, Quiara Lovatti.  
7-Hidroxycumarina induz vasodilatação, redução da contratilidade cardíaca e hipotensão: Uma molécula promissora para o tratamento de doenças cardiovasculares, Brasil. / Quiara Lovatti Alves. - 2020.  
114 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Darízy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos,  
Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Endócrina e Cardiovascular.

Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –  
Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

1. 7-Hidroxycumarina. 2. Vasodilatação. 3. Hipotensão. 4. Sistema  
Cardiovascular. I. Título.

CDU 616.12

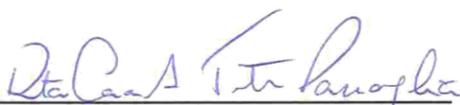
"HIDROXICUMARINA INDUZ VASODILATAÇÃO, REDUÇÃO DA CONTRATILIDADE CARDÍACA E HIPOTENÇÃO: UMA MOLÉCULA PROMISSORA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES."

**QUIARA LOVATTI ALVES**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 05 de fevereiro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA



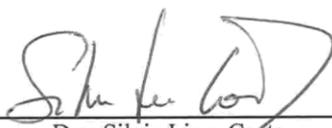
---

Dra. Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia  
Professora titular  
USP



---

Dra. Milena Botelho Pereira Soares  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



---

Dra. Silvia Lima Costa  
Professora titular  
UFBA

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES  
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB

*Dedico este trabalho a **minha mãe**...especial, linda, forte...incrível!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos **meus pais** por todos os ensinamentos e valores que guiaram e guiam meus passos! Agradeço especialmente a minha mãe, **Regina Lovatti**, por todo amor, cuidado, respeito e dedicação! Você é a minha maior fonte de inspiração e eu te amo com todo meu coração!

Aos meus irmãos **Bernardo Lovatti** e **Carlos Vítor**, por trazerem leveza e alegria para a minha vida!!

Ao **meu tio Clodoaldo**, por todo amor! Você me inspira a ser uma pessoa melhor todos os dias.

Ao meu amor e grande amigo **Pedro Barreto**, por sempre acreditar em mim e me fazer acreditar!

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. **Darízy Flávia Silva**, especialmente por me ensinar não apenas a fazer pesquisa, mas fazê-la sempre da melhor maneira possível! Agradeço por todos os ensinamentos e conselhos que foram essenciais para a minha formação como professora e pesquisadora!

A todos os colegas do **LAFFEC** pela parceria e apoio!

A **Letícia Simões, Samuel Camargo e Raiana Moraes**...amigos queridos... Com vocês foi tudo mais leve. Obrigada por tanto!

Aos meus amigos da **Faculdade de Farmácia (UFBA)**, em especial a **Josiane, José Fernando, Danilo, Thamires, Augusto e Erick!** Ter vocês, deixa a minha vida mais feliz!

Ao **Laboratório de membranas excitáveis da UFMG (LAMEX)** e em especial ao professor Dr<sup>o</sup>. **Jader Cruz** pela recepção e ensinamentos.

Ao professor Dr<sup>o</sup>. **José Maria Barbosa Filho e seus alunos**, pela colaboração científica no isolamento da substância de estudo deste trabalho.

Ao **Instituto de pesquisa Gonçalo Moniz e aos membros do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Medicina Investigativa**, por garantirem um ensino de excelência e proporcionarem subsídios para pesquisas de qualidade. Um agradecimento especial a **Simone e Noélia**, por todo cuidado e compromisso e também a **Ana Maria Fiscina**, por toda eficiência nos ajustes finais deste trabalho!

Aos **ratinhos**, cujas vidas transformadas em pesquisa, foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

A **FAPESB, CAPES, UFBA e FIOCRUZ** pelo apoio financeiro.

ALVES, Quiara Lovatti. 7-Hidroxycumarina induz vasodilatação, redução da contratilidade cardíaca e hipotensão: Uma molécula promissora para o tratamento de doenças cardiovasculares, Brasil. 116 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** As cumarinas exibem uma ampla variedade de efeitos biológicos, entre as quais atividades no sistema cardiovascular. **OBJETIVO:** Avaliar o potencial cardiovascular da 7-Hidroxycumarina. **MATERIAL E MÉTODO:** Como modelo experimental foram utilizados ratos wistar e para avaliação dos efeitos cardiovasculares da 7-hidroxycumarina foram empregadas abordagens *in vivo* e *in vitro*. **RESULTADOS:** Nos cardiomiócitos de ratos H9c2, o 7-HC não foi tóxico nas concentrações testadas. 7-HC ( $10^{-9}$  -  $3 \times 10^{-4}$  M) induziu vasodilatação, que foi significativamente atenuada pela pré-incubação dos anéis mesentéricos com a solução de Tyrode despolarizante com KCl 60 mM quanto com KCl 20 mM. Essa atenuação sugere a participação de canais para potássio. Para testar essa hipótese, bloqueador dos canais para  $K^+$  retificadores de entrada ( $K_{ir}$ ),  $BaCl_2$  ( $30 \mu M$ ) foi pré-incubado e não atenuou significativamente a vasodilatação induzida por 7-HC, embora tenha deslocado a curva para a direita de modo significativo. Resultado semelhante foi observado com o bloqueio dos canais para  $K^+$  retificadores retardados ( $K_v$ ) com 4-aminopiridina (1 mM) e com o bloqueio dos canais para  $K^+$  sensíveis a ATP com a glibetamida ( $10 \mu M$ ). Com o bloqueio não seletivo dos canais de potássio sensíveis ao cálcio de alta condutância ( $BK_{Ca}$ ) com TEA (1 mM) houve atenuação significativa do efeito do 7-HC. Dessa maneira, iberitoxina (50 nM), bloqueador seletivo para os  $BK_{Ca}$  foi utilizado e o efeito da 7-HC foi significativamente atenuado, sugerindo o envolvimento dos  $BK_{Ca}$  nas respostas vasodilatadoras de 7-HC. Além disso, para verificar a influência da 7-HC no influxo de cálcio, o 7-HC ( $100 \mu M$ ) na presença de solução despolarizante sem cálcio, foi capaz de reduzir significativamente a contração induzida por  $CaCl_2$  e ensaios para avaliar a influência da 7-HC na mobilização de cálcio intracelular demonstraram que 7-HC parece inibir a liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares sensíveis a Phe e a cafeína. Nos cardiomiócitos ventriculares isolados, o 7-HC foi capaz de reduzir a contratilidade nas concentrações de 10 e  $100 \mu M$ , bem como o tempo de pico da contração com 1, 10 e  $100 \mu M$ . Nos átrios isolados 7-HC ( $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M), induziu efeito inotrópico negativo sem alteração significativa na ritmicidade cardíaca. Nos ensaios *in vivo*, o 7-HC reduziu a pressão arterial sem alterar a frequência cardíaca em ratos não anestesiados, enquanto no teste eletrocardiográfico em animais anestesiados, o 7-HC pareceu não alterar os parâmetros elétricos cardíacos, como frequência cardíaca, intervalo PR e intervalo QRS. **CONCLUSÕES:** Nossos resultados sugerem que o 7-HC possui atividade cardíaca direta, tanto no nível celular quanto no tecido diminuindo a força de contração cardíaca, além de induzir efeito vasorrelaxante, independente do endotélio, provavelmente envolvendo canais de potássio, especialmente o  $BK_{Ca}$ , bem como atenuação do influxo de cálcio e redução da mobilização do cálcio intracelular. Em conjunto, estes efeitos parecem ser os responsáveis pela redução da pressão arterial nos testes *in vivo*, o que a torna uma molécula promissora com atividade cardiovascular.

**Palavras-chave:** 7-Hidroxycumarina, Vasodilatação, Canais para  $K^+$  e Canais para  $Ca^{2+}$ , Hipotensão.

ALVES, Quiara Lovatti. 7-Hydroxycoumarin induces vasodilation, reduced contractility and hypotension: A promising molecule for the treatment of cardiovascular disease, Brazil. 116 f. Thesis (PhD in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Coumarins exhibit a wide variety of biological effects, including activities in the cardiovascular system. **AIM:** Evaluate the cardiovascular potential of 7-Hydroxycoumarin. **MATERIAL AND METHOD:** Wistar rats were used as an experimental model and *in vivo* and *in vitro* approaches were used to evaluate the cardiovascular effects of 7-hydroxycoumarin. **RESULTS:** In cardiomyocytes of H9c2 rats, 7-HC was non-toxic at the concentrations tested. 7-HC ( $10^{-9}$  -  $3 \times 10^{-4}$ M) induced vasodilation, which was significantly attenuated by preincubation of the mesenteric rings with the depolarizing Tyrode solution with KCl 60mM and 20mM. This attenuation suggests the participation of potassium channels. To test this hypothesis, a blocker for  $K^+$  input rectifiers channels ( $K_{ir}$ ), BaCl<sub>2</sub> (30 $\mu$ M) was preincubated and shifted the curve to the right. Similar results were observed with the blockade of  $K^+$  delayed rectifiers channels ( $K_v$ ) and ATP-sensitive  $K^+$  channels with 4-aminopyridine (1mM) and glibenclamide (10 $\mu$ M), respectively, suggesting that  $K_v$  and  $K_{ATP}$  appear to participate in the effects of 7-HC. Non-selective blockade of high-conductance calcium-sensitive potassium channels ( $BK_{Ca}$ ) with TEA (1mM) significantly attenuated the effect of 7-HC. Thus, iberiotoxin (50nM), selective blocker for  $BK_{Ca}$  was used and the effect of 7-HC was significantly attenuated, suggesting the involvement of  $BK_{Ca}$  in 7-HC vasodilator responses. In addition, to verify the influence of 7-HC on calcium influx, 7-HC (100 $\mu$ M) in the presence of calcium-free depolarizing solution was able to significantly reduce CaCl<sub>2</sub>-induced contraction and assays to evaluate the influence of CaCl<sub>2</sub>. 7-HC in intracellular calcium mobilization demonstrated that 7-HC appears to inhibit the release of  $Ca^{2+}$  from phenylephrine and caffeine sensitive intracellular stocks. In isolated ventricular cardiomyocytes, 7-HC was able to reduce contractility at concentrations of 10 and 100 $\mu$ M, as well as peak contraction time at 1, 10 and 100 $\mu$ M. In 7-HC ( $10^{-9}$ M- $10^{-4}$ M) atria induced negative inotropic effect without significant change in cardiac rhythmicity. Through *in vivo* assays, 7-HC reduced blood pressure without changing heart rate in not anesthetized rats, while in electrocardiographic testing in anesthetized animals, 7-HC did not appear to change cardiac electrical parameters such as heart rate, PR interval and QRS interval. **CONCLUSIONS:** Our results suggest that 7-HC has direct cardiac activity, both at the cellular and tissue levels, and induces the vasorelaxant artery, independent of the endothelium, probably involving potassium channels ( $K_{ir}$  and  $BK_{Ca}$ ) as well as attenuation of calcium influx and reduction of intracellular calcium mobilization. In addition, 7-HC reduced blood pressure without altering electrical parameters, making it a promising molecule with cardiovascular activity.

**Keywords:** 7-Hydroxycoumarin, Vasodilation,  $K^+$  Channels and  $Ca^{2+}$  Channels, Hypotension.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Estrutura básica de uma cumarina ..... 33
- Figura 2: Aparato utilizado para os experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos wistar..... 43
- Figura 3: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes das cumarinas (0,001 - 300 $\mu$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato wistar, pré-contraídos com Phe (1 $\mu$ M).....44
- Figura 4: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da reversibilidade da contratilidade tecidual à solução tyrode com KCl 60mM depois da adição da concentração da 7-HC (0,001 - 300 $\mu$ M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada. .... 46
- Figura 5: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da 7-HC (0,001 - 300 $\mu$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato wistar com endotélio vascular funcional, sobre o tônus basal. .... 47
- Figura 6: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de 7-HC (0,001 - 300 $\mu$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos wistar na ausência de endotélio, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 60mM)..... 48
- Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de canais para K<sup>+</sup> na resposta vasorrelaxante induzida pela 7-HC em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, na ausência de endotélio utilizando solução despolarizante contendo KCl 20 mM..... 49
- Figura 8: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de diferentes canais para K<sup>+</sup> na resposta vasodilatadora induzida pela 7-HC em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, na ausência de endotélio..... 50
- Figura 9: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito da 7-HC sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de CaCl<sub>2</sub> (1 - 10000 $\mu$  M) em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca<sup>2+</sup>..... 51

Figura 10: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito da 7-HC sobre as contrações transientes induzidas por Phe 1 $\mu$ M e CAF 20 mM. ....	52
Figura 11: Representação esquemática do protocolo de isolamento de cardiomiócitos dos ratos wistar.....	53
Figura 12: A, Aparato utilizado para experimentos de contratilidade em cardiomiócitos. B, imagem do cardiomiócito isolado e a representação da contração das suas bordas direita e esquerda e a contração referente à célula inteira. ....	54
Figura 13: Representação esquemática do protocolo de isolamento de átrios dos ratos wistar.....	56
Figura 14: Representação esquemática do protocolo para avaliação dos efeitos cronotrópicos e inotrópicos induzidos pela 7-HC.....	56
Figura 15: Desenho esquemático da implantação de cateteres de polietileno para a investigação do efeito da 7-HC na hemodinâmica de animais wistar.....	58
Figura 16: Representação esquemática do protocolo para avaliação dos valores de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos wistar não anestesiados. ....	58
Figura 17: Efeito da 7-HC sobre a viabilidade de cardiomiócitos.....	62
Figura 18: Influência da 7-HC sobre a capacidade contrátil vascular. ....	63
Figura 19: Influência da 7-HC sobre o tônus basal.....	64
Figura 20: Efeito de 7-HC em artéria mesentérica superior de ratos wistar pré-contráidos com solução de alto $K^+$ extracelular (60 mM).....	65
Figura 21: Efeito de 7-HC em artéria mesentérica superior de ratos wistar pré-contráidos com solução com aumento de $K^+$ extracelular (20 mM).....	66
Figura 22: Participação de canais de $K^+$ retificadores retardados no relaxamento induzido pela 7-HC.....	67
Figura 23: Participação de canais de $K^+$ retificadores de entrada no relaxamento vascular induzido pela 7-HC em artéria mesentérica isolada de ratos wistar.....	68
Figura 24 Participação de canais de $K^+$ sensíveis a ATP no relaxamento vascular induzido pela 7-HC em artéria mesentérica isolada de ratos wistar....	69

Figura 25: Participação de canais de BK <sub>Ca</sub> no relaxamento vascular induzido pela 7-HC em artéria mesentérica isolada de ratos wistar.....	70
Figura 26: Influência da 7-HC sobre o influxo de Ca <sup>2+</sup> .....	72
Figura 27: Efeito da 7-HC (30 e 300 µM) sob as contrações induzidas por CAF (20 mM) em meio livre de Ca <sup>2+</sup> .....	73
Figura 28: Influência de 7-HC (30 e 300 µM) sob contrações induzidas por Phe (1 µM).....	74
Figura 29: Influência da 7-HC (1, 10 e 1µM) na contratilidade de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais wistar.....	75
Figura 30: Influência da 7-HC (1, 10 e 100µM) no tamanho dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais wistar.....	75
Figura 31: Influência da 7-HC (1, 10 e 100 µM) no tempo de pico de contração dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais wistar.....	76
Figura 32: Efeito da 7-HC sobre o cronotropismo cardíaco em átrios direitos isolados de ratos wistar.....	77
Figura 33: Efeito da 7-HC sobre o inotropismo cardíaco em átrios esquerdos isolados de ratos wistar .....	77
Figura 34: Registro original mostrando o efeito da administração intravenosa das doses de 2,5; 5; 10 e 20mg/Kg da 7-HC sobre a pressão arterial e sobre a frequência cardíaca em rato normotenso não anestesiado.	79
Figura 35: Efeito da 7-hidroxycumarina sobre a A) pressão arterial média e B) frequência cardíaca em ensaios <i>in vivo</i> utilizando a técnica de medida direta de pressão arterial em ratos wistar.. .....	80
Figura 36: Efeito da 7-HC sobre a eletrogênese cardíaca.....	81
Figura 37: Representação esquemática dos efeitos cardiovasculares induzidos pela 7-HC e provável via de sinalização da resposta vasorelaxante induzida pela 7-HC em artéria mesentérica superior de ratos wistar. ....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação da pressão arterial de acordo com a medição casual ou no consultório (>18 anos): .....	23
<b>Tabela 2:</b> Composição da solução de Krebs-bicarbonato (pH=7,4) .....	40
<b>Tabela 3:</b> Composição da solução de Tyrode para ensaios com células (pH=7,4) .....	40
<b>Tabela 4:</b> Composição da solução de C.I.B. (Cell Isolation Buffer) (pH=7,4) ..	41
<b>Tabela 5:</b> Composição da solução de Tyrode (pH=7,4) .....	41
<b>Tabela 6:</b> Composição da solução de Tyrode despolarizante com KCl a 20mM (pH=7,4) .....	41
<b>Tabela 7:</b> Composição da solução de Tyrode despolarizante com KCl a 60mM (pH=7,4) .....	42
<b>Tabela 8:</b> Composição da solução de Tyrode nominalmente sem cálcio (pH=7,4) .....	42
<b>Tabela 9:</b> Efeito vasodilatador das substâncias teste .....	61

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1:** Classificação da pressão arterial de acordo com a medição casual ou no consultório (>18 anos):.....39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP	4-Aminopiridina
7-HC	7-Hidroxycumarina
Ach	Acetilcolina
BaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Bário
BK <sub>Ca</sub>	Canais para K <sup>+</sup> sensíveis a Ca <sup>2+</sup> de grande condutância
[Ca <sup>2+</sup> ]	Concentração de Cálcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentração de Cálcio intracelular
Ca <sub>v</sub>	Canais para Ca <sup>2+</sup> sensíveis a voltagem
CAF	Cafeína
CCR	Canais para cátions ativados por receptores
C.I.B.	Cell Isolation Buffer – Tampão para isolamento de células
CICR	Liberação de Ca <sup>2+</sup> induzida por Ca <sup>2+</sup>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DAG	Diacilglicerol
DC	Débito Cardíaco
DCV	Doenças Cardiovasculares
ECG	Eletrocardiograma
EDFR	Fatores relaxantes derivados do endotélio
EGTA	Ácido Etilenoglicol Tetracético
ENaC	Canais epiteliais sensíveis ao Na <sup>+</sup> /ácido
HA	Hipertensão Arterial
Hz	Hertz
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de Inositol [1,4,5]
I.V.	Intravenosa
K <sup>+</sup>	Íon Potássio
K <sub>ATP</sub>	Canais para Potássio sensíveis ao ATO
K <sub>ir</sub>	Canais para Potássio retificadores de entrada
K <sub>v</sub>	Canais para Potássio sensíveis a voltagem
Mg <sup>2+</sup>	Magnésio
Na <sup>+</sup>	Íon Sódio

NCX	Trocador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
P	Significância estatística
PA	Pressão Arterial
Phe	Fenilefrina
RE	Retículo Endoplasmático
ROC	Canais para Ca <sup>2+</sup> operados por receptor
Rpm	Rotação por minuto
RS	Retículo Sarcoplasmático
RVPT	Resistência Vascular Periférica Total
SAC	Canal ativado por estiramento
SOC	Canais para Ca <sup>2+</sup> operados por estoque
V	Volts
VG	Violeta de Genciana
CMLV	Célula do músculo lisa vascular

**Observação:** As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas internacionalmente.

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
2.	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	21
3.	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
3.1	GERAL .....	36
3.2	ESPECÍFICO .....	36
4.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
4.1	ANIMAIS .....	38
4.2	SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS .....	38
4.3	OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS TESTES .....	38
4.4	SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS .....	39
4.5	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE .....	42
4.5.1	<b>Avaliação do potencial citotóxico da 7-HC em células cardíacas de rato</b> .....	42
4.6	<b>AVALIAÇÕES VASCULARES</b> .....	43
4.6.1	<b>Isolamento da artéria mesentérica superior isolada de rato</b> .....	43
4.6.2	<b>Avaliação do efeito das cumarinas em artérias pré-contraídos com agonista <math>\alpha</math>1-adrenergico</b> .....	44
4.6.3	<b>Avaliação da reversibilidade contrátil vascular após a adição da 7-HC</b> .....	45
4.6.4	<b>Avaliação dos efeitos 7-HC sobre o tônus intrínseco vascular</b> .....	46
4.6.5	<b>Avaliação do efeito da 7-HC sobre as contrações vasculares induzidas por agente despolarizante KCl 60mM</b> .....	47
4.6.6	<b>Avaliação da participação de canais para <math>K^+</math> na resposta vasodilatadora induzida pela 7-HC</b> .....	48
4.6.7	<b>Influência de bloqueadores para diferentes canais para <math>K^+</math> na resposta vasodilatadora induzida pela 7-HC</b> .....	49
4.6.8	<b>Avaliação do efeito da 7-HC sobre as contrações induzidas por <math>CaCl_2</math></b> .....	50
4.6.9	<b>Efeito da 7-HC sobre a mobilização de cálcio dos estoques sensíveis a fenilefrina (<math>1\mu M</math>) e cafeína (20mM)</b> .....	51
4.7	<b>AVALIAÇÕES CARDÍACAS</b> .....	52
4.7.1	<b>Ensaio com Cardiomiócitos</b> .....	52

4.7.1.1	Isolamento dos cardiomiócitos de ratos wistar .....	52
4.7.1.2	Técnica de medida de contratilidade .....	53
4.7.1.3	Avaliação do efeito da 7-HC sobre a contratilidade de cardiomiócitos ventriculares isolados de ratos wistar .....	54
4.7.2	<b>Ensaio com Átrios Isolados</b> .....	55
4.7.2.1	Isolamento dos tecidos atriais cardíacos de ratos .....	55
4.7.2.2	Avaliação dos efeitos cronotrópicos e inotrópicos induzidos por 7-HC .....	56
4.8	<b>AVALIAÇÕES HEMODINÂMICAS</b> .....	57
4.8.1	<b>Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados</b> .....	57
4.8.2	<b>Avaliação do efeito da 7-HC sobre a PAM e FC de ratos normotensos não-anestesiados</b> .....	58
4.9	<b>AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA 7-HC SOBRE A ELETROGÊNESE CARDÍACA</b> .....	59
4.10	<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	59
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	61
5.1	<b>EFEITO VASODILATADOR DAS CUMARINAS</b> .....	61
5.2	<b>CITOTOXICIDADE DA 7-hc EM CÉLULAS DE MAMÍFERO</b> .....	62
5.3	<b>AVALIAÇÕES VASCULARES</b> .....	62
5.3.1	<b>Reversibilidade da contratilidade vascular após a adição da 7-HC</b> .....	62
5.3.2	<b>Efeitos da 7-HC em anéis de artéria mesentérica sobre o tônus intrínseco vascular</b> .....	64
5.3.3	<b>Efeito da 7-HC em artérias mesentéricas isoladas de ratos wistar contraídas por agente despolarizante KCl60mM</b> .....	65
5.3.4	<b>Participação dos canais para K<sup>+</sup> na resposta vasodilatadora induzida pela 7-HC em artéria mesentérica</b> .....	66
5.3.5	<b>Envolvimento dos canais para K<sup>+</sup> retificadores retardados na resposta vasodilatadora induzida pela 7-HC em artéria mesentérica</b> .....	67
5.3.6	<b>Influência dos canais para K<sup>+</sup> retificadores de entrada na resposta vasodilatadora induzida pela 7-HC em artéria mesentérica</b> .....	68

5.3.7	<b>Influência dos canais para K<sup>+</sup> sensíveis a ATP na resposta vasodilatadora induzida pela 7-HC em artéria mesentérica</b> .....	69
5.3.8	<b>Participação dos canais para BKCa nos efeitos de 7-HC em artéria mesentérica</b> .....	71
5.3.9	<b>Influência de 7-HC sobre o influxo de cálcio em artéria mesentérica</b> .....	73
5.3.10	<b>Influência da 7-HC sobre a mobilização de cálcio intracelular</b> ....	75
5.4	<b>AVALIAÇÕES CARDÍACAS</b> .....	78
5.4.1	Efeito da 7-HC sobre a contratilidade de cardiomiócitos ventriculares	78
5.4.2	Efeito da 7-HC sobre o cronotropismo cardíaco em átrios direitos isolados de ratos .....	80
5.4.3	Efeito da 7-HC sobre o inotropismo cardíaco em átrios direitos isolados de ratos .....	80
5.5	<b>AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA</b> .....	82
5.5.1	Efeitos da 7-HC na pressão arterial média (PAM) e na frequência cardíaca (FC) de ratos wistar .....	82
5.6.	<b>AVALIAÇÃO DOS REGISTROS ELETROCARDIOGRÁFICOS</b> .....	83
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	87
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	102
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	105
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	107

# Introdução

## 1. INTRODUÇÃO

A pressão arterial refere-se à pressão medida em grandes artérias na circulação sistêmica e divide-se em pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica. Pressão sistólica refere-se à pressão máxima dentro das grandes artérias quando o músculo cardíaco se contrai para impulsionar o sangue através do corpo. A pressão diastólica descreve a pressão mais baixa nas grandes artérias durante o relaxamento dos músculos cardíacos entre os batimentos (SHAHOU; AEDDULA, 2019).

O sistema cardiovascular é o principal responsável pela regulação e manutenção da pressão arterial (PA), uma das funções fisiológicas mais complexas do sistema biológico (SANTOS; HAIBARA, 2001). Esta função é alcançada por alterações hemodinâmicas que ocorrem continuamente, envolvendo alterações no débito cardíaco, na resistência vascular e na regulação renal dos fluidos corporais (INOUE et al., 2006). A regulação da pressão arterial é multifatorial e envolve vários sistemas que modulam os principais determinantes da pressão arterial, como o débito cardíaco e a resistência vascular periférica total, assegurando um fluxo adequado de sangue para vários órgãos no corpo e quando prejudicada, essa regulação pode levar à hipertensão essencial (COWLEY-JÚNIOR, 2006).

Hipertensão é uma condição clínica multifatorial com consequentes alterações em órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e, também alterações metabólicas, com aumento do risco para o surgimento de doenças cardiovasculares (WILLIAMS, 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010, MALTA, 2009). Ela é um importante fator de risco para doenças decorrentes de aterosclerose e trombose, que se exteriorizam, predominantemente, por acometimento cardíaco, cerebral, renal e vascular periférico. Em todo o mundo, aumento da pressão arterial é estimado em 7,5 milhões de mortes, cerca de 12,8% do total de todas as mortes (WHO, 2018).

A utilização de plantas com finalidade medicinal, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA-JÚNIOR et al., 2005) e os produtos naturais provenientes

de plantas medicinais provaram ser uma fonte abundante de compostos biologicamente ativos, muitos dos quais têm sido a base para o desenvolvimento de novos produtos químicos para a indústria farmacêutica (HOTWANI et al., 2014).

Dentre os diferentes produtos de origem vegetal, já foram identificadas cerca de 1.300 cumarinas em fontes naturais, (CZELUSNIAK; et al., 2012) e algumas delas apresentaram atividades cardíacas e vasodilatadoras e vários mecanismos têm sido propostos para explicar esses efeitos.

As cumarinas estudadas nesta tese foram: 1,2-Benzopirona, 3-Hidroxycumarina, 4- Hidroxycumarina, 6- Hidroxycumarina, 7- Hidroxycumarina, 6,7-Dihidroxycumarina, 6-Metoxi-7-Hidroxycumarina, 7,8-Dihidroxí-6-metoxicumarina e dentre estas cumarinas, apenas 3 possuem seus efeitos cardiovasculares descritos na literatura.

Sendo assim, embora algumas cumarinas tenham sido descritas por apresentarem um potencial efeito sobre o sistema cardiovascular, faz-se necessário elucidar os mecanismos de ação e mecanismos moleculares envolvidos nestas respostas, além de demonstrar e caracterizar os efeitos das cumarinas que ainda não foram estudadas. Outrossim, levando-se em consideração a hipertensão arterial e suas complicações, torna-se de fundamental importância a busca de novos fármacos para o tratamento dessa condição clínica, e os produtos naturais com finalidade de tratamento medicamentoso e fonte abundante de moléculas bioativas são utilizados desde tempos imemoriais, sendo importante a melhor elucidação de suas atividades e mecanismos de ação sobre o sistema cardiovascular.

# Referencial Teórico

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

A hipertensão arterial (HA) é uma condição clínica multifatorial que consiste em manutenção de níveis elevados da pressão arterial (PA). Alterações estruturais e/ou funcionais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e alterações metabólicas normalmente estão associadas, com aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2006; MALTA et al., 2009; WILLIAMS, 2010).

A pressão arterial é um parâmetro biológico complexo regulado por sinalizações renal, neural, cardiovascular e hormonal, de modo integrado, com múltiplas influências ambientais e genéticas (LIFTON; GHARAVI; GELLER; 2001; NEWTON-CHEH, 2009). A HA pode ser classificada como primária ou essencial e secundária. Quando secundária, acomete entre 5-10% dos casos e geralmente não apresenta histórico familiar, tem uma idade mais precoce no início e uma causa clara, como uma doença renal ou endócrina, e ainda uso de medicamentos como agentes imunossupressores, anti-inflamatórios não esteroidais, dentre outros (HSU et al., 2009; MULVANY, 2011; MANCIA et al., 2013; ONUSKO, 2003). Em 90-95%, a doença é denominada hipertensão essencial e suas causas ainda permanecem desconhecidas (HSU et al., 2009; MULVANY, 2011).

Hipertensão é o fator de risco mais prevalente para doença cardiovascular, incluindo doença cardíaca coronariana, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral, doença renal em estágio terminal e doença vascular periférico, em homens e mulheres (ROGER et al., 2012). A mortalidade por doença cardiovascular (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

De acordo com as diretrizes da American College of Cardiology (ACC)/ American Heart Association (AHA) todas as pessoas com pressão arterial >130/80 mm/Hg são consideradas hipertensas, e a pressão arterial deve ser reduzida para <130/80 mm/Hg em todos os pacientes. Por outro lado, segundo as diretrizes da European Society of Cardiology (ESC)/ European Society of

Hypertension (ESH), é considerado hipertenso o indivíduo que apresenta pressão arterial >140/90 mm/Hg, sendo que os valores pressóricos de todos os pacientes devem alcançar valores <140/90 mm/Hg e em pacientes com alto risco cardiovascular objetiva-se alcançar valores pressóricos <130/80 mm/Hg (BAKRIS; WALEED; GIANFRANCO, 2019).

No Brasil a classificação da pressão arterial foi determinada pela Sociedade Brasileira de Cardiologia em associação com a Sociedade Brasileira de Hipertensão e Nefrologia classificam os níveis de pressão arterial, de acordo com a tabela 1.

**Tabela 1: Classificação da pressão arterial de acordo com a medição casual ou no consultório (>18 anos):**

<b>Classificação</b>	<b>Pressão sistólica (mm Hg)</b>	<b>Pressão diastólica (mm Hg)</b>
<b>Normal</b>	≤ 120	≤ 80
<b>Pré-hipertensão</b>	121 - 139	81 – 89
<b>Hipertensão estágio 1</b>	140 - 159	90 – 99
<b>Hipertensão estágio 2</b>	160 - 179	100 - 109
<b>Hipertensão estágio 3</b>	≥ 180	≥ 110

Quando a pressão arterial sistólica e a pressão arterial diastólica situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para a classificação da pressão arterial

Considera-se hipertensão sistólica isolada se a pressão arterial sistólica ≥ 140 mm Hg e a pressão arterial diastólica < 90 mm Hg. (Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016)

Sendo responsável por 45% dos ataques cardíacos e 51% dos acidentes vasculares cerebrais, a HA é também foi responsável por 9,4 milhões de mortes no mundo por doenças cardiovasculares, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (2013). De acordo com pesquisa do Ministério da Saúde realizada em 2012, 24,3% da população têm hipertensão arterial, a doença é mais comum entre as mulheres (26,9%) do que entre os homens (21,3%) e, também varia de acordo com a faixa etária e a escolaridade. Entre os brasileiros com mais de 65 anos de idades, 59,2% são hipertensos, contra apenas 3,8% na faixa de 18 a 24 anos e 8,8% de 25 a 34 anos. Estima-se que entre 2000 e 2025,

560 milhões de pessoas serão afetadas pela hipertensão (KEARNEY et al., 2005) e levando-se em consideração que em 2010 a pressão alta já era a maior contribuinte de mortes no mundo (LIM et al., 2012), esta perspectiva é preocupante.

Em 1975, o número de adultos com hipertensão era de 594 milhões, já em 2015, esse número aumentou para 1,13 bilhão, sendo composto por 597 milhões de homens e 529 milhões de mulheres. O envelhecimento e o aumento das populações foram os possíveis responsáveis por esse aumento (NCD-RISC, 2017). Estima-se que quase 1,5 bilhão de adultos no mundo terão hipertensão na próxima década e dessa maneira, tornou-se uma prioridade reduzir os valores predominantes de pressão arterial em todo o mundo (CHOPRA; RAM, 2019).

Particularmente em países em desenvolvimento, a HA tem uma prevalência estimada de 37,3%, em comparação com 22,9% em nações industrializadas. As projeções são de que até o ano de 2025, 75% (ou 1.170 milhões de pessoas) das pessoas com hipertensão no mundo estarão vivendo em países emergentes (PICON, 2012).

A pressão sanguínea é determinada por dois parâmetros físicos importantes, o débito cardíaco (DC) e da resistência vascular periférica total (RVPT) (FIRTH et al., 2007). A regulação da pressão arterial é multifatorial e envolve vários sistemas biológicos (SVENNINGSEN et al., 2014). Estes órgãos/sistemas (coração, rins, vasos sanguíneos, sistema neuroendócrino) modulam os principais determinantes da pressão arterial, como o DC e a RVPT, assegurando um fluxo adequado de sangue para vários órgãos no corpo e quando prejudicada, essa regulação pode levar à hipertensão (COWLEY-JÚNIOR, 2006).

Nas fases iniciais da doença, o DC é aumentado, embora a RVPT permaneça constante, quando a doença é sustentada o DC diminui, enquanto a RVPT é elevada devido a uma constrição anormal das pequenas artérias e arteríolas refletindo, principalmente, o grau de tônus arterial (FIRTH et al., 2007).

As células endoteliais formam o revestimento interno do leito vascular (BARTON et al., 2012). Antes visto como uma barreira simples entre o sangue e a parede dos vasos, o endotélio agora é considerado um órgão dinâmico que reveste todo o sistema vascular (GALLEY; WEBSTER, 2004), sendo essencial para manutenção da homeostase cardiocirculatória, além de ser responsável pela manutenção da integridade da parede vascular e modulação do tônus em todo o sistema vascular (BECKER et al., 2000). Furchgott e Zawadzki (1980) descobriram as células endoteliais como fonte de um potente fator relaxante derivado do endotélio (EDRF, do inglês *endothelium-derived relaxing factor*) capaz de modular a resposta vascular. Em 1987, Ignarro e colaboradores, identificaram o EDRF como óxido nítrico e, outras pesquisas mostraram o endotélio também como fonte de fatores vasoativos que controlam a inflamação, o crescimento das CMLVs, exerce controle sobre a função plaquetária e estão envolvidas na coagulação plasmática (BARTON e HAUDENSCHILD, 2001; TRAUPE et al., 2003). O endotélio está envolvido na metabolização de diversas substâncias endógenas, como prostaglandinas E e F, adenosina, norepinefrina, 5-hidroxitriptamina, leucotrienos, nucleotídeos de adenina, entre outros (VANHOUTTE, 2009; GRYGLEWSKI, 2009). Além disso, o endotélio vascular tem papel fundamental na modulação do tônus vascular, regulando dessa forma, a manutenção da pressão sanguínea. As células endoteliais podem ser estimuladas por diversos fatores, entre eles os hormônios, neurotransmissores, substâncias derivadas de plaquetas e estresse de cisalhamento que conduzem a liberação de EDRFs, como prostaglandinas e óxido nítrico e EDCFs (fatores contracturantes derivados do endotélio), como endotelina-1 e angiotensina II, modulando o estado contrátil dos vasos (GODO; SHIMOKAWA, 2017; KANG, 2014).

CMLV normalmente não operam em sua total ativação, pelo contrário, estas células possuem um tônus (GUADAGNIN et al., 2015). Sob condições de repouso, o leito arterial apresenta uma vasoconstrição no estado basal conhecida como tônus vascular, que pode ser modulado por mecanismos de regulação centrais (sistema nervoso simpático), periféricos (com participação do sistema renina angiotensina-aldosterona) e um mecanismo local, mediado pelo endotélio, o qual possui uma potência maior quando comparado aos anteriores

(YUGAR-TOLEDO et al., 2015). O tônus dos vasos sanguíneos arteriais controla o fluxo sanguíneo e é constantemente regulado por vários estímulos, incluindo o próprio fluxo sanguíneo, bem como vários estímulos neurais e humorais (CHENNUPATI et al., 2019).

Uma forma particular de autorregulação, a resposta miogênica, foi descrita pela primeira vez por Bayliss (1902), que observou que o estiramento imposto à parede vascular por um aumento da pressão intraluminal induzia uma contração do vaso. Foi sugerido que a vasoconstrição miogênica está envolvida na manutenção do tônus vascular basal para promover a perfusão constante, apesar das flutuações na pressão de perfusão e, para evitar danos aos tecidos nos casos de uma perfusão muito aumentada (LOUTZENHISER et al., 2002; WALSH; COLE, 2013; CARLSTRÖM et al., 2015). Como qualquer contração vascular do músculo liso, a resposta miogênica acompanha a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC), que permite à miosina interagir com a actina e gerar forças contráteis (SOMLYO et al., 2004; VETTERKIND; MORGAN, 2012). A fosforilação da MLC pode ser aumentada pela ativação da MLC cinase (MLCK) através de um mecanismo dependente de  $Ca^{2+}$  - calmodulina ou pela inibição da miosina fosfatase via Rho/Rho-cinase (SOMLYO e SOMLYO, 2000).

O tônus do músculo liso vascular é regulado principalmente por  $[Ca^{2+}]_i$ , que é importante para a fosforilação da miosina. O grau de tônus pode ser modulado por uma série de sinais extracelulares agindo através de várias vias de transdução de sinal interconectadas, a maioria das quais envolve a ativação de proteínas cinases e a fosforilação de vários substratos de proteínas (WALSH, 1994). O fluxo sanguíneo é governado pela equação simples,  $Fluxo = \Delta Pressão / Resistência$ , e a capacidade do óxido nítrico, ou fluxo, de mediar alterações no tônus vascular é considerada uma propriedade fundamental da vasculatura (FURCHGOTT, 1999). Sendo assim, a regulação da atividade contrátil das células musculares lisas vasculares depende da interação entre os fatores vasodilatadores e vasoconstritores, em especial, fatores derivados do endotélio, hormônios circulantes, neurotransmissores, bem como a pressão arterial (JACKSON, 2000).

Canais iônicos representam um papel central na regulação do tônus vascular e, dentre os canais envolvidos nessa regulação, estão os canais para cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), canais operados por estoque (SOCs), canais ativados por estiramento (SACs), canais para potássio ( $\text{K}^+$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ) (JACKSON, 2000), assim como os canais de receptor do potencial transiente (TRP) (BRAYDEN et al., 2008) e os receptores de rianodina e de  $\text{IP}_3$  (BROZOVICH et al., 2016). As células musculares lisas vasculares de artérias e arteríolas de resistência expressam um grande número de canais iônicos, incluindo, dentre outros: duas ou mais classes de canais para cálcio sensíveis a voltagem, quatro ou mais classes para canais  $\text{K}^+$ , dois ou mais canais de liberação de cálcio intracelular, múltiplos membros de cinco classes da família de canais TRP, duas ou mais classes de canais para  $\text{Cl}^-$  e membros dos canais epiteliais sensíveis ao  $\text{Na}^+$ /ácido (ENaC) (TYKOCKI; BOERMAN; JACKSON, 2017).

Os íons  $\text{Ca}^{2+}$  desempenham um papel importante em muitas respostas celulares, onde controlam não apenas as funções celulares em curto prazo, tais como contração, secreção, excitose, e transdução de sinal sensorial, como também respostas à longo prazo, tais como o crescimento celular, proliferação e morte celular. Na maioria das células,  $\text{Ca}^{2+}$  tem a sua principal função de sinalização quando sua concentração é elevada no compartimento citosólico, a concentração em repouso é de cerca de  $0,1\mu\text{M}$ , mas a ativação pode subir para cerca de  $1-10\mu\text{M}$  (BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000). A partir daí, também podem difundir-se para organelas, tais como as mitocôndrias e o núcleo. A concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior das células é regulada pela interação simultânea de vários processos, os quais podem aumentar ou diminuir a concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  dependendo da necessidade celular (BOOTMAN; HOLMES; RODERICK, 2006). A homeostase intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  é mantida principalmente através do retículo endoplasmático (RE) ou a versão específica encontrada nas células do músculo, o retículo sarcoplasmático (RS) (WATANABE et al., 2008). A liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares é mediada por dois tipos de canais iônicos permeáveis a  $\text{Ca}^{2+}$  localizados na membrana do RE: (i) receptores de rianodina e (ii) receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ) (AMBERG; NAVEDO, 2013). Segundo Watanabe e colaboradores (2008), o  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser liberado a partir do RE através da

estimulação de receptores acoplados à proteína-G, que ativam a fosfolipase C (PLC), que ao agir sobre os fosfolípidos da membrana plasmática, promove a liberação de 1,4,5 - trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 liga-se ao seu receptor na membrana do RE e promove a liberação de cálcio armazenado para o citosol. Liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RE é mediada pelo aumento global de cálcio promovido pelos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de voltagem ( $\text{Ca}_v$ ) na membrana das células do músculo liso, que promove uma liberação de cálcio através do receptor de Rianodina (RyR), o qual funciona como o canal de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  (COLLIER; WANG; KITOKOFF, 2000). Além do RS, o meio extracelular é uma fonte de  $\text{Ca}^{2+}$ , e vários canais iônicos permitem que  $\text{Ca}^{2+}$  entre na célula a partir do meio extracelular (WATANABE et al., 2008).

O  $\text{Ca}^{2+}$  também desempenha um papel importante em processos fisiológicos do miocárdio. Especialmente, a homeostase molecular das respostas dos cardiomiócitos é muito sensível para os desequilíbrios no nível de  $\text{Ca}^{2+}$  (BÖGEHOLZ; MUSZYNSKI; POTT, 2012). O  $\text{Ca}^{2+}$  é considerado como um dos principais íons para assegurar a função cardíaca, no chamado acoplamento de excitação-contração, que descreve a excitação elétrica do tecido cardíaco que é seguida por contração mecânica (BERS, 2002). Acoplamento excitação-contração cardíaco é iniciado pela abertura de canais para  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem ( $\text{Na}_v$ ), mediando uma corrente de entrada de  $\text{Na}^+$ , que despolariza o potencial de membrana. Assim,  $\text{Ca}^{2+}$  e canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem tipo-L abrem-se e induzem influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  que pode ligar-se ao receptor de rianodina induzindo a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  (LCIC) do retículo sarcoplasmático (RS). O consequente aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) induz a contração dos miofilamentos. Uma vez que o  $\text{Ca}^{2+}$  realizou suas funções de sinalização, ele é rapidamente removido. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática (PMCA) e o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  realizam a extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  para o exterior enquanto a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo endo/sarcoplasmático (SERCA) retorna o  $\text{Ca}^{2+}$  para os estoques internos (BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000). Disfunções na mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular estão presentes em anormalidades cardíacas como arritmias (BOOTMAN et al., 2011; KNOLLMANN; RODEN, 2008), insuficiência cardíaca (BERS et al., 2003; LUO; ANDERSON, 2013) e canalopatias (KIRCHHEFER et al., 2010), dentre outras.

Mendelsohn (2005), levantou a hipótese de que as anormalidades primárias em proteínas das células musculares lisas vasculares (CMLVs), que regulam o tônus vascular podem causar hipertensão e, vários modelos experimentais de hipertensão, apontam para alterações na expressão e função de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e/ou de  $\text{K}^+$  em CMLVs (COX, 2002; TAJADA et al., 2013; YANG et al., 2013; ZHANG et al., 2018).

Os canais para potássio ( $\text{K}^+$ ) localizam-se nas membranas celulares e controlam o influxo e efluxo dos íons  $\text{K}^+$  nas células e desempenham papéis cruciais em células excitáveis e não excitáveis podendo ser encontrados em praticamente todas as espécies, exceto em alguns parasitos (KUO et al., 2005).

Os canais para potássio nas membranas plasmáticas das CMLVs desempenham um papel importante no controle e regulação do potencial de membrana dessas células e do tônus arteriolar. Eles são a condutância iônica plasmalemal dominante nas CMLVs, e em todas as células, e sua atividade é modulada pelo potencial de membrana e por vasodilatadores e vasoconstritores, de modo que esses canais iônicos participam de todos os aspectos da regulação do tônus arteriolar e controle da perfusão microvascular (TYKOCKI; BOERMAN; JACKSON, 2017).

O efluxo de  $\text{K}^+$  através de canais presentes na membrana plasmática determina o potencial de membrana celular. Entre os canais para potássio estão os canais dependentes da voltagem ( $\text{K}_v$ ), os ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{ca}$ ), os retificadores de entrada ( $\text{K}_{ir}$ ), os canais sensíveis ao ATP ( $\text{K}_{ATP}$ ) e os canais de dois poros ( $\text{K}_{2P}$ ) (NELSON; QUAYLE, 1995; CHRISOBOLIS; SOBEY, 2003; GUÉGUINOU et al., 2014). Cabe ressaltar que os canais de  $\text{K}^+$  sensíveis à adenosina trifosfato ( $\text{K}_{ATP}$ ) pertencem à superfamília dos  $\text{K}_{ir}$  (SOBEY, 2001; SORENSEN; BRAUNSTEIN; SALOMONSSON, 2012).

Canais para potássio dependentes de voltagem ( $\text{K}_v$ ) possuem poros seletivos para  $\text{K}^+$  que são abertos por despolarização da membrana. Esta abertura permite o movimento de íons  $\text{K}^+$  através da membrana plasmática e a geração de correntes  $\text{K}^+$  que tendem a repolarizar a membrana para o potencial de equilíbrio para  $\text{K}^+$  (RUDY et al., 2009). A maioria dos canais  $\text{K}_v$  abre quando a

membrana é despolarizada (menos negativa no interior) e fecha quando a membrana é hiperpolarizada (mais negativa no interior) (SWARTZ, 2008).

Os  $K_{Ca}$  são canais para potássio ativados por cálcio intracelular (GHATTA et al., 2006). A família do  $K_{Ca}$  é dividida em duas subfamílias: a subfamília de pequena ( $SK_{Ca}$ ) e média ( $IK_{Ca}$ ) condutância e a subfamília de grande/larga condutância (MaxiK ou  $BK_{Ca}$ ) (FELÉTOU, 2009). Eles apresentam uma estrutura semelhante aos Kv, possuem um domínio transmembranar extra, denominado S0. Estes canais são regulados não apenas pela voltagem, mas também pelo  $Ca^{2+}$  intracelular de modo que os canais  $BK_{Ca}$  possuem uma região de “ $Ca^{2+}$  Bowl” no terminal C, enquanto os canais  $SK/IK_{Ca}$  são modulados pela ligação do cálcio à calmodulina (BAO et al., 2004; MAYLIE et al., 2004).

Os canais para  $K^+$  retificadores de entrada ( $K_{ir}$ ) têm funções fisiológicas diversas na célula, dependendo do tipo e da localização, e são modulados por vários mediadores, como íons, fosfolípidios e proteínas de ligação. A retificação interna ocorre porque eles são bloqueados por magnésio intracelular e poliaminas na despolarização, enquanto esses bloqueadores são liberados na hiperpolarização para permitir o influxo de  $K^+$  para a célula (HIBINO et al., 2010). O canal  $K_{ir}$  contém um domínio de formação de poros e um domínio citosólico, onde o domínio formador de poros é responsável pela condução iônica enquanto o domínio citosólico regula a abertura e fechamento do canal (KUANG; PURHONEN; HEBERT, 2015).  $K_{ir}$  são abundantes no músculo liso dos vasos de resistência de pequeno diâmetro (KNOT et al., 1996; QUAYLE et al., 1996), entretanto sua função exata na musculatura lisa vascular permanece incerta, embora existam duas possibilidades: Primeiramente,  $K_{ir}$  contribuem para o potencial de membrana em repouso e o tônus de repouso no músculo liso de vasos de pequeno diâmetro, o que é apoiado por estudos que mostram a constrição das artérias coronárias e cerebrais de pequeno diâmetro no tônus basal em resposta a  $Ba^{2+}$ , um inibidor específico dos canais de  $K_{ir}$  (PARK et al., 2007c, PARK et al., 2007d). Em segundo lugar, a ativação do canal  $K_{ir}$  devido ao moderado aumento da concentração extracelular de  $K^+$  (10-15 mM) pode causar vasodilatação. A evidência para esta hipótese vem do fato de que a vasodilatação pode ser prevenida por  $Ba^{2+}$ , mas não pela remoção do endotélio

ou por inibidores dos outros canais  $K^+$  (NELSON E QUAYLE, 1995; KNOT et al., 1996; CHRISOBOLIS et al., 2000; RIVERS et al., 2001; PARK et al., 2007d).

Os canais de  $K^+$  de dois poros ( $K_2P$ ) são abundantes em células excitáveis e não excitáveis, onde desempenham diversas funções (BUCKINGHAM et al., 2005) dentre elas, a manutenção do potencial de membrana em repouso (ENYEDI; CZIRJAK et al., 2010). Eles são regulados por vários estímulos, como pH, pressão parcial de  $O_2$ , estiramento da membrana, temperatura, proteínas G, ácidos graxos e anestésicos por inalação (BITTNER et al., 2010; GOONETILLEKE; QUAYLE, 2012).

Canais para  $K^+$  sensíveis a ATP ( $K_{ATP}$ ) foram identificados pela primeira vez no músculo cardíaco e, em seguida, foram encontrados em várias células, incluindo o músculo liso vascular (NOMA, 1983; NELSON E QUAYLE, 1995). Demonstrou-se *in vitro* e *in vivo* que um bloqueio nos canais de  $K_{ATP}$  leva à vasoconstrição e à despolarização da membrana em vários tipos de músculo liso vascular (NELSON et al., 1990; NAKASHIMA; VANHOUTTE, 1995, QUAYLE et al., 1997; TERAMOTO, 2006).

A abertura dos canais de  $K^+$  em resposta a estímulos endógenos ou agentes farmacológicos pode resultar em efluxo de  $K^+$  a partir de CMLVs, levando a uma hiperpolarização da membrana plasmática e fechamento de canais de  $Ca^{2+}$ , levando à diminuição dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelulares e, eventualmente, a vasodilatação. Por outro lado, o fechamento de canais de  $K^+$  despolariza a membrana plasmática, o que resulta na abertura de mais canais de  $Ca^{2+}$ , e leva a um aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelulares com uma consequente vasoconstrição. (COX; RUSCH, 2002).

Produtos naturais podem ter ação em canais iônicos dependentes de voltagem, tais como canais para  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  (STROMGAARD, 2005). Na primeira parte do século XX, uma grande quantidade de fármacos foi descoberta a partir de produtos naturais, e até hoje, os produtos naturais servem como fontes cruciais para novos fármacos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Uma análise de medicamentos que foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) entre 1939 até 2014 revela o uso persistente de estruturas derivadas de produtos naturais na química medicinal (RODRIGUES et al., 2016).

Uma análise detalhada de novos medicamentos aprovados pela FDA entre 1981 e 2010 revelou que 34% desses medicamentos eram produtos naturais ou derivados diretos de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012). Mais recentemente Newman e Cragg (2016) descobriram que entre 1981 e 2014 a FDA aprovou 1.562 medicamentos, 64 (4%) eram produtos naturais inalterados, 141 (9,1 %) eram medicamentos botânicos (mistura), 320 (21%) eram derivados de produtos naturais e 61 (4%) eram drogas sintéticas, mas com farmacóforos de produtos naturais.

Existem algumas vantagens na utilização de produtos naturais no processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos. Eles representam novidades químicas e, em comparação com outras fontes, podem originar candidatos a medicamentos para alvos complexos. Além disso, moléculas derivadas de produtos naturais possuem uma diversidade química incomparável a qualquer molécula química sintética: eles podem formar estruturas complexas bidimensionais e tridimensionais, e ainda assim podem ser absorvidos e metabolizados no corpo (STROHL, 2000). Por outro lado, o uso de moléculas derivadas de produtos naturais como fonte de novos medicamentos também apresenta alguns desafios devido à falta de legislação específica que rege o acesso a recursos biológicos em países com muita biodiversidade. Além disso, também pode ser fisicamente difícil o acesso a habitats naturais e, os processos necessários para isolar, purificar e caracterizar quimicamente os compostos ativos são caros e podem ser demorados (CALIXTO, 2019).

De acordo com Houlst e Payá (1996) e Fylaktakidou (2004) as cumarinas (conhecidas como 1,2-benzopirona ou lactona do ácido o-hidroxi-cinâmico) (**Figura 1**) compreendem uma classe muito grande de derivados fenólicos encontrados nas plantas e consistem na fusão de anéis benzeno e  $\alpha$ -pirona e, mais de 1300 foram identificados, principalmente como metabolitos secundários em plantas verdes, em fungos e em bactérias, conforme citado por Murray e colaboradores (1982) e Murray (1991).

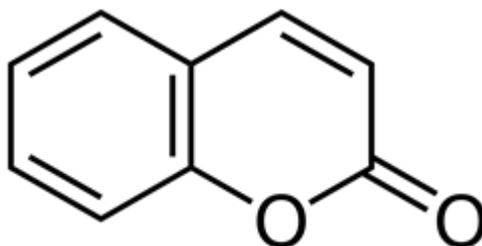


Figura 1: Estrutura básica de uma cumarina

As cumarinas já foram descritas por apresentarem atividade fungicida (SCIO, 2004), moluscicida (SOUZA et al., 1984), vasorelaxante (HE et al., 2007; LEMMICH et al., 1983), antidiabética (LI et al., 2017), anti-HIV (BUCKHEIT et al., 1995; MCKEE et al., 1996), anticoagulante (KOSUGE et al., 1985; KO et al., 1989; CHEN et al., 1995), antibacteriana (SOUZA, 2005).

Lemmich e colaboradores (1983) demonstraram que glicosídeos de di-hidrofurocumarina apresentam atividade vasodilatadora coronariana através da inibição da cAMP-fosfodiesterase e anticoagulante, inibindo a formação de tromboxano nas plaquetas, enquanto He e colaboradores (2007) investigaram o efeito da cumarina Imperatorim ([[(9-(3-metilbut-2-eniloxi)furo (3,2-g) cromen-7-ona)]) em artéria mesentérica, a qual induziu vasorelaxamento independente de endotélio vascular através da inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  pelo bloqueio de canais de  $Ca_v$ .

De acordo com Baccard e colaboradores (2000), a 7-Hidroxycumarina promoveu aumento do fluxo coronariano e inotropismo positivo em coração de rato, bem como um efeito vasodilatador direto nas coronárias. A 6,7-Dihidroxycumarina possui um efeito antiproliferativo em células musculares lisas vasculares de ratos (PAN et al., 2003) e a 6-Metoxi-7-hidroxycumarina foi capaz de inibir mobilização de cálcio intracelular em aorta isolada de rato (OLIVEIRA et al., 2001). A 7-metoxi-8-[3-methylpent-2-enyl] cumarina, conhecida como Osthole, inibiu a agregação plaquetária (KO et al., 1989), a contração muscular lisa de artéria aorta torácica de ratos (KO et al., 1992) e a contração de traquéia isolada de porquinho da Índia (TENG et al., 1994) em experimentos *in vitro* e, segundo Chang e But (1986) APUD Houlst e Payá (1996), esta mesma cumarina foi capaz de provocar hipotensão em experimentos *in vivo* em cães após

administração intravenosa e segundo Li e colaboradores (2017) também demonstrou atenuar de forma significativa a pressão arterial média pulmonar em ratos com hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina. De acordo com Padte, Pednekar e Shejwalkar (2017), o derivado metoxi de Osthole, extraído de *Cnidium monnieri*, apresentou efeito vasodilatador em corpo cavernoso do coelho e efeito semelhante pôde ser observado por algumas cumarinas derivadas de butirolactona, como citado por Rahman, Choudhary e Reitz (2010).

Dessa forma, apesar do potencial vasodilatador e cardíaco de algumas cumarinas, a literatura disponível não aborda trabalhos direcionados ao entendimento dos efeitos e mecanismos moleculares destas cumarinas, nem tão pouco a relação estrutura atividade destes compostos de origem natural, sendo assim, torna-se necessário elucidar seus mecanismos de ação e melhor caracterizá-los frente à suas ações sobre o sistema cardiovascular.

# Objetivos

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar os efeitos cardiovasculares da 7-Hidroxicumarina.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade celular da 7-hidroxicumarina;
- Caracterizar o mecanismo de ação vascular da 7-hidroxicumarina;
- Avaliar os efeitos da 7-hidroxicumarina sobre átrios isolados e sobre cardiomiócitos ventriculares;
- Avaliar os efeitos da 7-hidroxicumarina sobre a hemodinâmica cardiovascular;
- Avaliar os efeitos da 7-hidroxicumarina sobre a eletrogênese cardíaca

# **Material e Métodos**

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados para todos os experimentos ratos normotensos da linhagem wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 250-350 gramas. Os animais foram provenientes do Biotério do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Estes animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $21 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas (6 – 18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de ética em uso animal do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEUA -ICS/UFBA – Protocolo número 130/2017).

### 4.2 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes substâncias: cloridrato de L(-) fenilefrina (Sigma), cloridrato de acetilcolina (Sigma), Cremophor EL (Sigma), cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2$ ) (sigma), 4-aminopiridina (Sigma), iberiotoxina (Sigma), Cafeína (VETEC), Tiopental sódico (Cristália), Sal sódico de heparina (Roche), Glibenclamida (Sigma), Colagenase tipo II (worthington biochemical corporation), Protease (worthington biochemical corporation), Tripsina (worthington biochemical corporation), meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil), violeta de genciana (Synth, São Paulo, SP, Brasil).

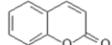
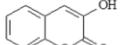
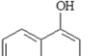
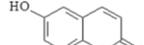
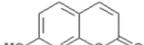
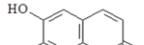
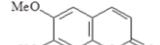
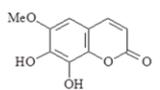
### 4.3. OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS COMPOSTOS TESTES

As cumarinas 1,2-benzopirona (PIUVEZAN et al., 2004), 3- hidroxycumarina (Sigma), 4-hidroxycumarina (Sigma), 6- hidroxycumarina (Sigma), 7- hidroxycumarina (SOARES et al., 2009), 6,7-dihidroxycumarina (Sigma), 6-metoxi-7-hidroxycumarina (VILLARREAL et al., 2011), 7,8-diidroxi-6-metoxicumarina (GOTTLIEB et al., 1989) (Quadro 1), utilizadas como substâncias teste foram isoladas pelo grupo do Professor Doutor José Maria Barbosa Filho, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LTF-UFPB) ou adquiridas na SIGMA para serem testadas em nosso laboratório.

Para a preparação das soluções estoques, as cumarinas foram solubilizadas em cremophor (numa proporção de 2:1), que em ensaios preliminares não apresentou atividade biológica, e diluídas em água destilada, de modo a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental.

#### 4.4 SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

**Quadro 1:** Diferentes amostras de cumarinas a serem testadas

NOME	ESTRUTURA QUÍMICA	PESO MOLECULAR	FÓRMULA	FONTE
Coumarin ou 1,2-Benzopyrone		146	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	<i>Amburana cearensis</i> (Leguminosae) e <i>Typha domingensis</i> (Typhaceae)
3-Coumarinol ou 3-Hydroxycoumarin		162	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	-
4-Coumarinol ou 4-Hydroxycoumarin		162	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	-
Grevillone ou 6-Hydroxycoumarin		162	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	-
Umbelliferone ou 7-Hydroxycoumarin		162	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	<i>Typha domingensis</i> (Typhaceae)
Esculetin ou 6,7-Dihydroxycoumarin		178	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	-
Scopoletin ou 6-Methoxy-7-hydroxycoumarin		192	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	<i>Typha domingensis</i> (Typhaceae)
Flaxetin ou 7,8-Dihydroxy-6-methoxycoumarin		208	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	<i>Licaria aurea</i> (Lauraceae)

Para a preparação das soluções fisiológicas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O), sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), cloreto de magnésio hexa-hidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), fosfato de sódio mono-hidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) e fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (todas obtidas pela VETEC) HEPES (USB corporation), EGTA (Sigma).

As tabelas a seguir mostram as composições das várias soluções utilizadas:

**A) Solução fisiológica para átrios isolados de ratos**

**Tabela 2:** Composição da solução de Krebs-bicarbonato (pH=7,4)

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
<b>Cloreto de Sódio (NaCl)</b>	117,0
<b>Cloreto de Potássio (KCl)</b>	5,36
<b>Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O)</b>	2,5
<b>Fosfato de Potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	1,03
<b>Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>)</b>	25,0
<b>Sulfato de Magnésio (MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O)</b>	0,57
<b>Glicose(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)</b>	11,1

Fonte: BAILEY e ONG, 1978

**B) Soluções fisiológicas para cardiomiócitos isolados de ratos**

**Tabela 3:** Composição da solução de Tyrode modificado para ensaios com células (pH=7,4)

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
<b>Cloreto de Sódio (NaCl)</b>	140,0
<b>Cloreto de Potássio (KCl)</b>	5,4
<b>Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O)</b>	1,8
<b>Fosfato de Sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	0,33
<b>HEPES</b>	5,0
<b>Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O)</b>	0,5
<b>Glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)</b>	11

Fonte: Adaptado de SHIOYA 2007

**Tabela 4:** Composição da solução de C.I.B. (Cell Isolation Buffer) (pH=7,4)

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
<b>Cloreto de Sódio (NaCl)</b>	130,0
<b>Cloreto de Potássio (KCl)</b>	5,4
<b>Fosfato de Sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	0,33
<b>HEPES</b>	25
<b>Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O)</b>	0,5
<b>Glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)</b>	22

Fonte: Adaptado de SHIOYA 2007

### C) Solução fisiológica para artérias mesentéricas isolados de ratos

**Tabela 5:** Composição da solução de Tyrode (pH=7,4)

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
<b>Cloreto de Sódio (NaCl)</b>	158,3
<b>Cloreto de Potássio (KCl)</b>	4,0
<b>Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O)</b>	2,0
<b>Cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>)</b>	1,05
<b>Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>)</b>	10,0
<b>Fosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	0,42
<b>Glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)</b>	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

**Tabela 6:** Composição da solução de Tyrode despolarizante com KCl a 20mM (pH=7,4)

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
<b>Cloreto de Sódio (NaCl)</b>	142,3
<b>Cloreto de Potássio (KCl)</b>	20,0
<b>Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O)</b>	2,0
<b>Cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>)</b>	1,05
<b>Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>)</b>	10,0
<b>Fosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	0,42
<b>Glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)</b>	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

**Tabela 7:** Composição da solução de Tyrode despolarizante com KCl a 60mM (pH=7,4)

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
<b>Cloreto de Sódio (NaCl)</b>	102,3
<b>Cloreto de Potássio (KCl)</b>	60,0
<b>Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O)</b>	2,0
<b>Cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>)</b>	1,05
<b>Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>)</b>	10,0
<b>Fosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	0,42
<b>Glicose(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)</b>	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

**Tabela 8:** Composição da solução de Tyrode nominalmente sem cálcio (pH=7,4)

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
<b>Cloreto de Sódio (NaCl)</b>	142,3
<b>Cloreto de Potássio (KCl)</b>	20,0
<b>Cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>)</b>	1,05
<b>Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>)</b>	10,0
<b>Fosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	0,42
<b>Glicose(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)</b>	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

#### 4.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

##### 4.5.1 Avaliação do potencial citotóxico da 7-HC em células cardíacas de rato

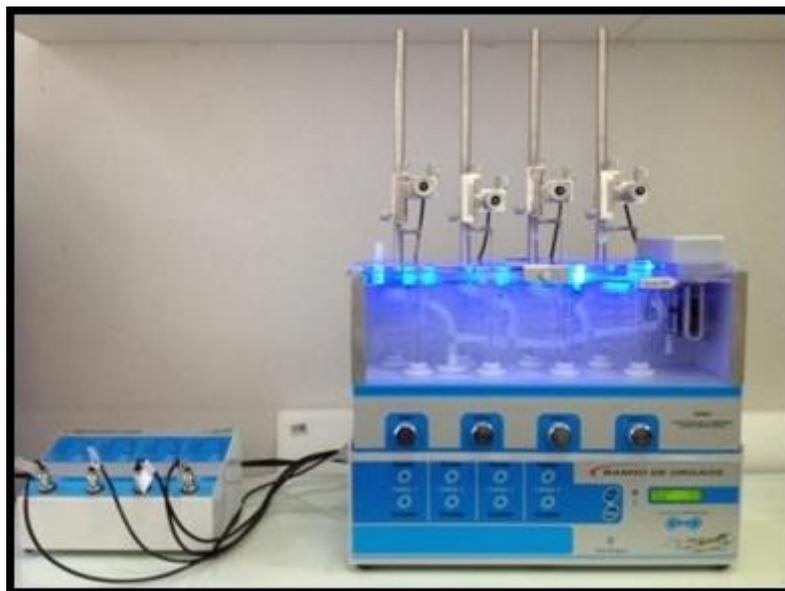
Cardiomiócitos de rato da linhagem H9c2 foram utilizados para avaliar a citotoxicidade da 7-HC em células de mamífero. As células foram incubadas em placa de 96 poços ( $5 \times 10^3$ ) em meio Dulbecco's modified Eagle's medium, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 50 µg/mL de gentamicina e mantidos por 24h na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A 7-HC foi testada em diferentes concentrações (1,56 - 100 µM), em triplicatas, incubados por 72 horas. Em seguida, a citotoxicidade em cardiomiócitos foi avaliada pelo método

do AlamarBlue (MEIRA et al., 2015). Como controle positivo foi utilizado a violeta de genciana na concentração de 10  $\mu\text{M}$ .

## 4.6. AVALIAÇÕES VASCULARES

### 4.6.1. Isolamento da artéria mesentérica superior isolada de rato

Os ratos foram eutanasiados em câmara de  $\text{CO}_2$ . Através de uma incisão no abdome do animal, a artéria mesentérica superior foi retirada, isolada de tecido conectivo e adiposo e anéis do primeiro segmento da artéria (2 mm) foram obtidos. Os anéis foram mantidos em cubas contendo 10mL de solução de Tyrode a  $37^\circ\text{C}$  e gaseificados com uma mistura de 95% de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$  (mistura carbogênica). Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força, o qual estava acoplado a um sistema de aquisição AVS para o registro das contrações isométricas (Figura 2). Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de 60min. Durante esse período, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos.



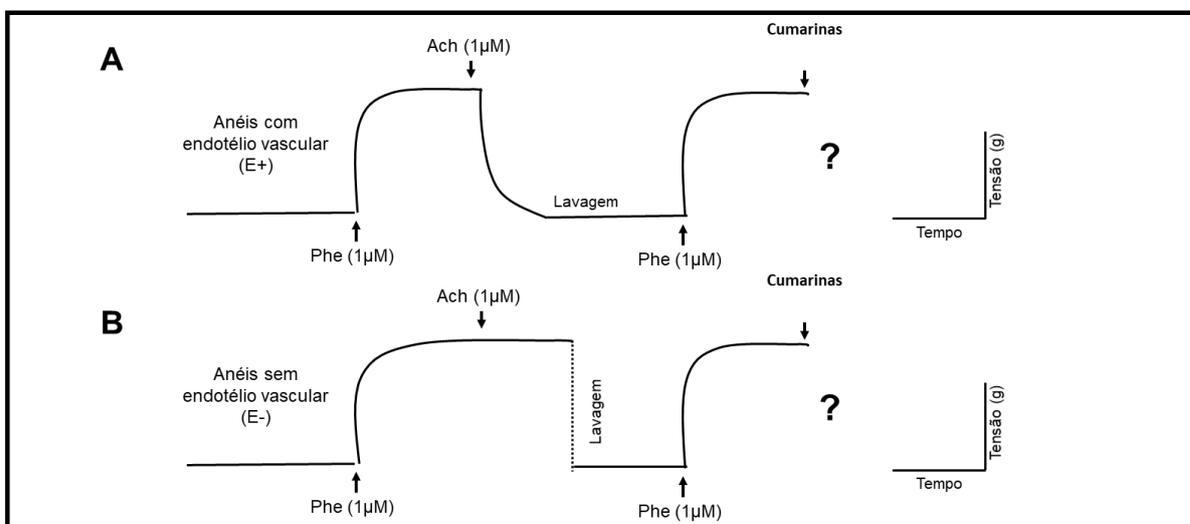
**Figura 2:** Aparato utilizado para os experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos wistar.

Posteriormente uma contração tônica submáxima à Phe  $1\mu\text{M}$ , a qual se estabiliza em torno de 5 minutos, foi registrada. Uma segunda resposta à Phe foi obtida e concentrações diferentes das diferentes cumarinas foram adicionadas

cumulativamente à cuba. Os resultados foram expressos levando em consideração que a contração induzida por Phe corresponde a 100% e que, a tensão de repouso é igual a 0%.

Para a realização dos experimentos na ausência do endotélio funcional, os anéis foram submetidos a um leve atrito mecânico entre as paredes internas do vaso com uma haste de metal.

A presença de endotélio funcional foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de  $1\mu\text{M}$  de acetilcolina (ACh). Foram considerados com endotélio, os anéis com relaxamento superior a 90% sobre a pré-contração com Phe. Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10%, foram considerados sem endotélio (Figura 3). Anéis com relaxamentos entre 10 e 90% foram desprezados dos protocolos experimentais.



**Figura 3:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes das cumarinas ( $0,001 - 300\mu\text{M}$ ) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato wistar, pré-contraídos com Phe ( $1\mu\text{M}$ ). (A) Anéis com endotélio intacto. (B) Anéis com endotélio ausente

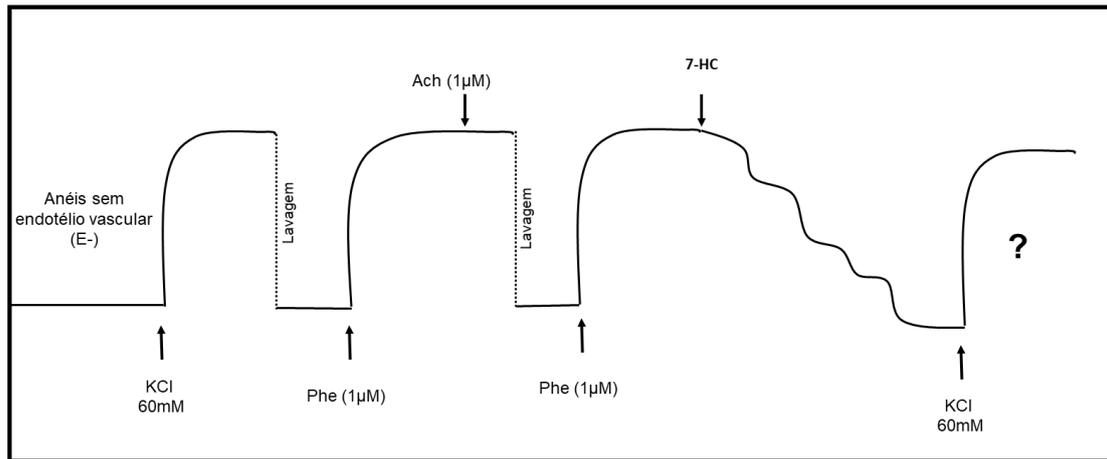
#### 4.6.2 Avaliação do efeito das cumarinas em artérias pré-contraídos com agonista $\alpha 1$ -adrenérgico

Após um período de 60 minutos de estabilização, uma contração tônica submáxima a Phe (agonista  $\alpha 1$ -adrenérgico)  $1\mu\text{M}$ , a qual se estabilizou em torno de 5 minutos, foi registrada em anéis mesentéricos de animais wistar. Uma segunda resposta à Phe foi obtida e concentrações crescentes para cada

cumarina isoladamente (0,001 - 300 $\mu$ M) foram adicionadas, cumulativamente à cuba, contendo os anéis mesentéricos com o endotélio intacto ou anéis com o endotélio funcionalmente removido. Após a obtenção das curvas concentração-resposta, foi analisado o efeito das curvas individuais na presença e na ausência de endotélio funcional. A cumarina selecionada para a elucidação dos mecanismos de ação vasculares foi a 7-Hidroxicumarina (7-HC).

#### **4.6.3. Avaliação da reversibilidade contrátil vascular após a adição da 7-HC**

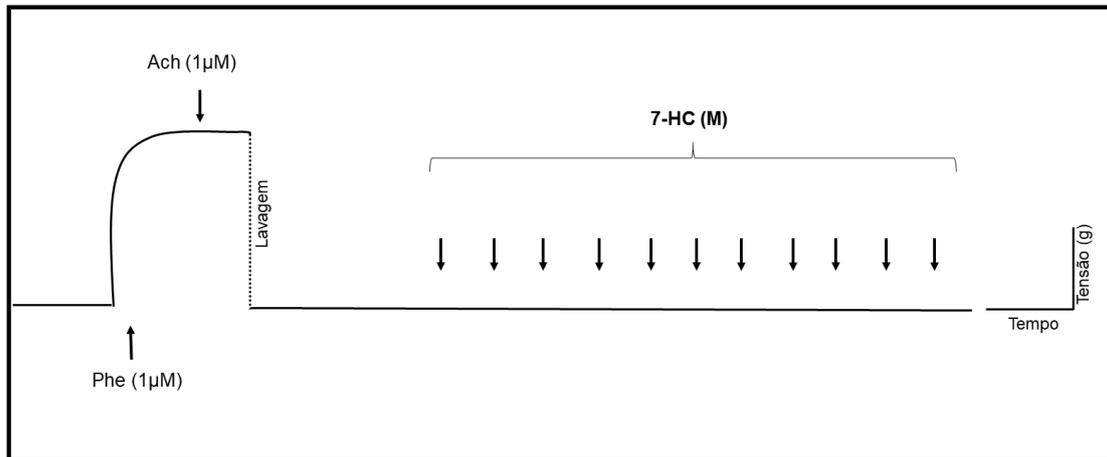
Este experimento foi desenvolvido para avaliar se a 7-HC apresenta indícios de alterar a maquinaria contrátil de forma persistente ou irreversível. Após o período de estabilização, a solução de tyrode foi trocada por uma solução tyrode com KCl à 60 mM até alcançar o platô da resposta contrátil, posteriormente, as preparações foram submetidas à uma nova estabilização, no qual a solução tyrode era trocada até que a tensão do anel retornasse aos valores basais com tensão de repouso (0,75 g). Posteriormente foi realizada a verificação da ausência do endotélio vascular funcional como descrito anteriormente, seguidamente, foi induzida uma segunda contração de Phe 1 $\mu$ M por 15 a 20 minutos e adicionadas as concentrações cumulativas da 7-HC (0,001 – 300  $\mu$ M) à cuba. Posteriormente, a solução de tyrode foi trocada a cada 15 min (procedimento repetido quatro vezes) para remoção da 7-HC da cuba. Após esse período, a solução de tyrode foi trocado por uma solução tyrode com KCl à 60mM até atingir o platô da resposta contrátil. Por conseguinte, foi verificada a resposta contrátil do tecido a solução tyrode com KCl à 60mM antes e depois da adição do composto em estudo e analisada a reversibilidade da contratilidade tecidual (Figura 4).



**Figura 4:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da reversibilidade da contratilidade tecidual à solução tyrode com KCl 60mM depois da adição da concentração da 7-HC (0,001 – 300  $\mu$ M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada.

#### 4.6.4. Avaliação dos efeitos 7-HC sobre o tônus basal vascular

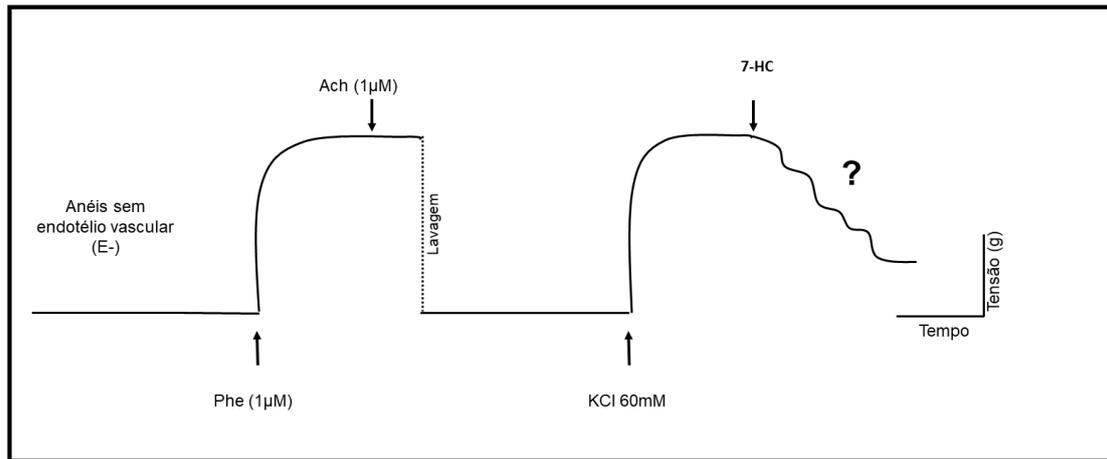
Para avaliar o efeito da 7-HC no estado de contratilidade basal do tecido vascular, a 7-HC foi testada em anéis mesentéricos de animais wistar, com endotélio vascular funcional, sobre o tônus basal. Após a verificação da presença do endotélio vascular funcional como descrito anteriormente os anéis foram lavados com solução tyrode até atingirem o tônus basal (em torno de 0,75 g), depois de 30 minutos de estabilização, foram adicionadas as concentrações crescentes e cumulativas da 7-HC (0,001 – 300  $\mu$ M) à cuba contendo os anéis mesentéricos, com a finalidade de avaliar os efeitos da 7-HC sobre o tônus muscular basal (Figura 5).



**Figura 5:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes da 7-HC (0,001 – 300  $\mu$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato wistar com endotélio vascular funcional, sobre o tônus basal.

#### 4.6.5. Avaliação do efeito da 7-HC sobre as contrações vasculares induzidas por agente despolarizante KCl 60 mM.

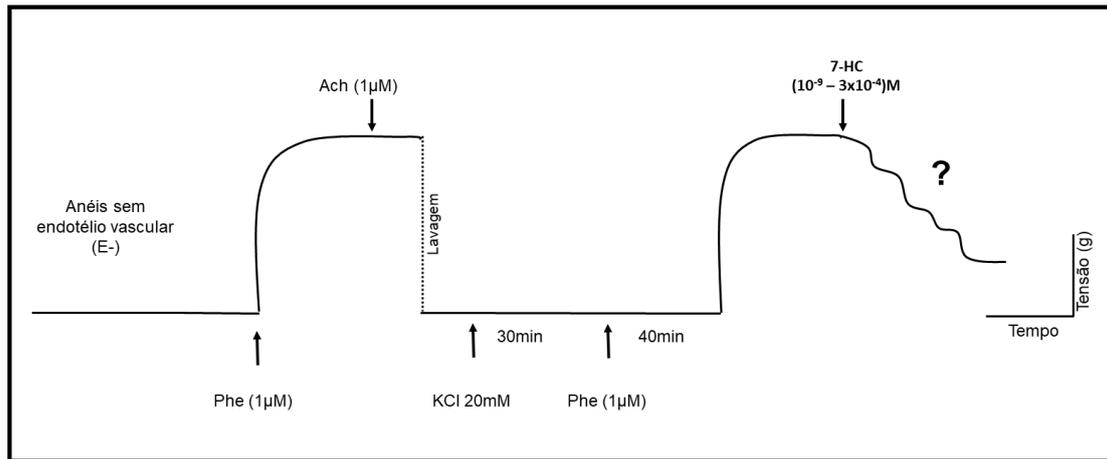
Levando-se em consideração que a cumarina escolhida para a elucidação dos mecanismos de ação foi a 7-HC e ensaios citados acima demonstraram seu potencial efeito vasodilatador, foram realizados ensaios para esclarecer os mecanismos pelos quais a 7-HC foi capaz de promover esses efeitos em vasos sanguíneos isolados. Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, o meio nutritivo de cada preparação foi trocado por uma solução com elevada concentração de  $K^+$  (KCl 60 mM - Tabela 6) e a 7-HC foi cumulativamente adicionada às cubas contendo os anéis mesentéricos sem endotélio (Figura 6).



**Figura 6:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de concentrações crescentes de 7-HC (0,001 – 300  $\mu\text{M}$ ) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos wistar na ausência de endotélio, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 60mM).

#### 4.6.6 Avaliação da participação de canais para $\text{K}^+$ na resposta vasodilatadora induzida pela 7-HC

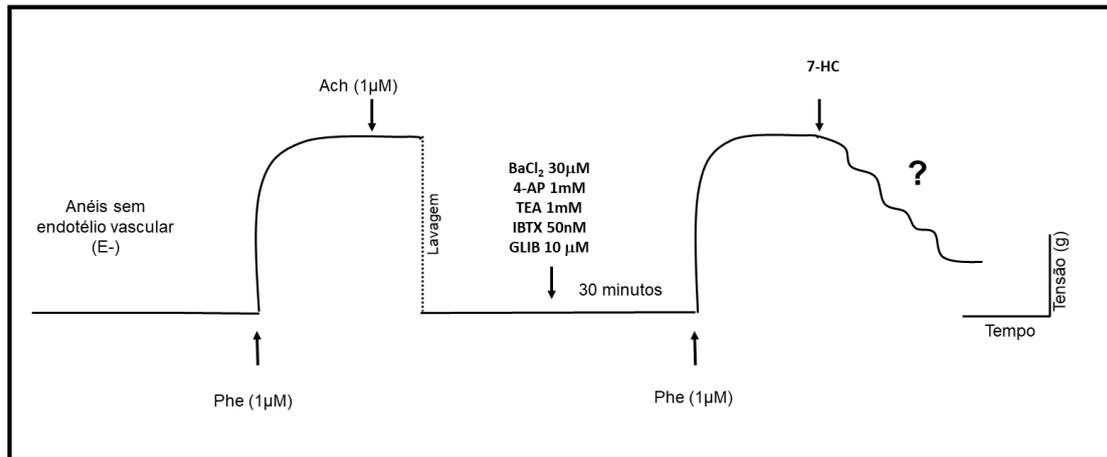
Após a verificação da ausência do endotélio funcional como descrito anteriormente, a solução de Tyrode (Tabela 4) das cubas foi trocada pela solução despolarizante de Tyrode com KCl 20 mM (KCl 20) (Tabela 5) e as preparações permaneceram nesta solução até o final do experimento. Esse procedimento impede parcialmente o efluxo de  $\text{K}^+$  e atenua relaxamentos mediados por abertura de canais para  $\text{K}^+$  (CLARK; FUCHS, 1997). Passados 30 minutos da incubação da solução de KCl 20 mM, foi induzida uma nova contração tônica com Phe (1  $\mu\text{M}$ ) e, em seguida, uma curva concentração-resposta para a 7-HC foi obtida (figura 7).



**Figura 7:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de canais para K<sup>+</sup> na resposta vasorrelaxante induzida pela 7-HC em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, na ausência de endotélio utilizando solução despolarizante contendo KCl 20 mM.

#### 4.6.7. Influência de bloqueadores para diferentes canais para K<sup>+</sup> na resposta vasodilatadora induzida pela 7-HC.

O objetivo deste protocolo foi avaliar a participação de diferentes tipos de canais para K<sup>+</sup> na resposta vasodilatadora induzida pela 7-HC. Dessa maneira, após a verificação da ausência do endotélio funcional, foram administradas, em preparações diferentes, 4-aminopiridina (1 mM), bloqueador dos canais para K<sup>+</sup> retificador retardado (WANG; et al., 2008), BaCl<sub>2</sub> (30 μM), bloqueador dos canais para K<sup>+</sup> retificadores de entrada (KAWABATA et al., 2004), glibenclâmida (10 μM) bloqueador dos canais para K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP (INSUK et al., 2003), TEA 1 mM (BRAYDEN, 1996) e iberitoxina (50 nM) (FRIEDEN; SOLINNI; BENY, 1999) bloqueadores dos canais para K<sup>+</sup> de larga condutância sensíveis ao cálcio, permanecendo com os mesmos até o final do experimento. Passados 30 minutos da incubação com os bloqueadores, foi induzida uma nova contração tônica com Phe (1 μM) e, em seguida, uma curva concentração-resposta para a 7-HC foi obtida (figura 8). Os valores dos efeitos produzidos por cada concentração foram obtidos e comparados na situação-controle e na presença de cada bloqueador dos canais para K<sup>+</sup>

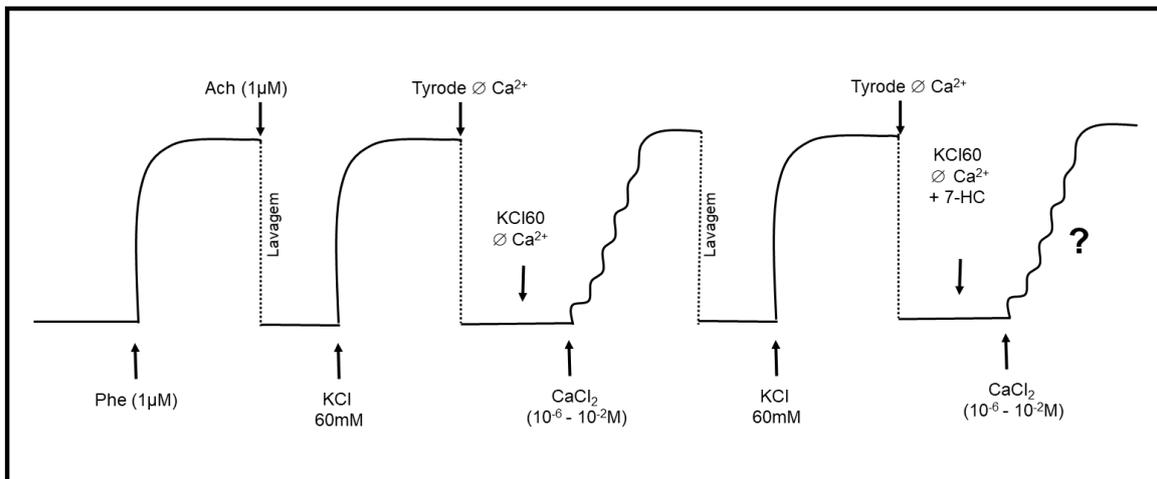


**Figura 8:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação de diferentes canais para  $K^+$  na resposta vasodilatadora induzida pela 7-HC em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, na ausência de endotélio.

#### 4.6.8. Avaliação do efeito da 7-HC sobre as contrações induzidas por $CaCl_2$ .

Este protocolo foi realizado para verificar se a diminuição do influxo de cálcio para célula muscular lisa seria um mecanismo utilizado pela 7-HC para causar efeito vasodilatador. Os anéis mesentéricos de ratos wistar foram expostas a uma solução despolarizante contendo KCl 60 mM (Tabela 6) e em seguida foram lavadas com solução de Tyrode nominalmente sem  $Ca^{2+}$  (Tabela 7), onde permaneceram nesse meio por 15 minutos. Após esse período, o meio foi trocado por uma solução despolarizante de KCl 60 mM, nominalmente sem  $Ca^{2+}$ . A ausência de  $Ca^{2+}$  foi inferida pela falha da solução despolarizante nominalmente sem  $Ca^{2+}$  em produzir vasoconstrição. Posteriormente, foi obtida uma curva concentração-resposta ao  $CaCl_2$  (1 – 10000  $\mu$ M) (curva controle).

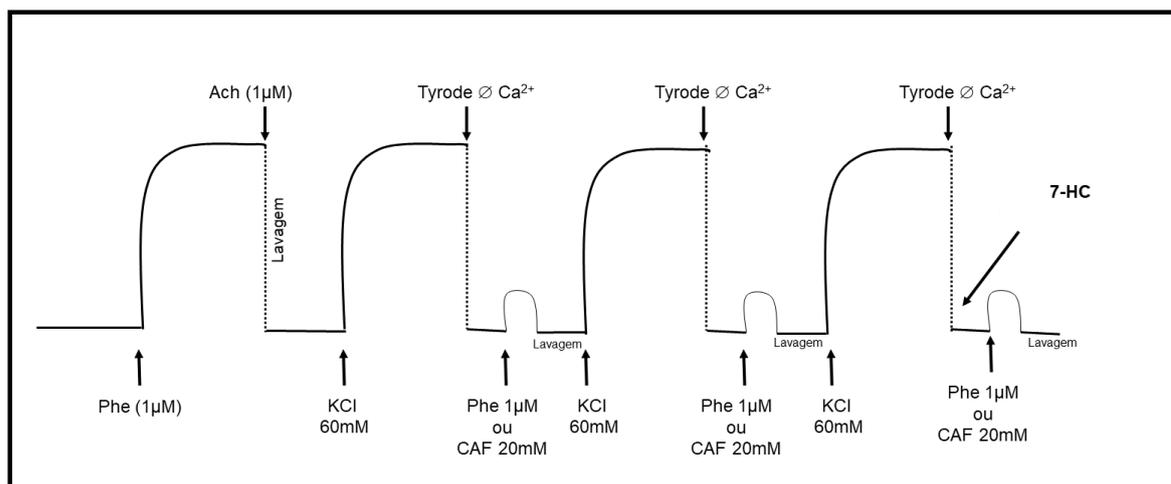
O processo foi novamente repetido, sendo que concentrações isoladas de 7-HC (3; 30; 300  $\mu$ M) foram incubadas às preparações juntamente com a solução despolarizante de KCl 60 mM, nominalmente sem  $Ca^{2+}$  e uma nova curva concentração-resposta ao  $CaCl_2$  (1 – 10000  $\mu$ M) foi obtida. O efeito da 7-HC sobre as contrações induzidas por  $CaCl_2$  foi avaliado comparando-se as curvas de  $CaCl_2$  na ausência (controle) e na presença da 7-HC (Figura 9).



**Figura 9:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito da 7-HC sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-2}$  M) em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 4.6.9. Efeito da 7-HC sobre a mobilização de cálcio dos estoques sensíveis a fenilefrina ( $1\mu\text{M}$ ) e cafeína ( $20\text{ mM}$ )

O efeito da 7-HC (30 e 300  $\mu\text{M}$ ) sobre os estoques de cálcio intracelulares sensíveis a fenilefrina (Phe) e cafeína (CAF) foram investigados usando o protocolo descrito por Sakata e Karakai, 1991. Depois do período de estabilização por 1 hora, os tecidos foram expostos à solução despolarizante com KCl 60 mM por 3 minutos. Os tecidos foram então lavados com solução livre de  $\text{Ca}^{2+}$  por 2 minutos e em seguida foi adicionado 1  $\mu\text{M}$  de Phe (banho à temperatura de 37 °C) ou 20 mM de cafeína (banho à temperatura de 25 °C). Após lavagem do tecido com solução Tyrode normal, foi adicionada novamente solução despolarizante com KCl 60 mM durante 3 minutos e este procedimento era repetido até que duas contrações transientes de magnitude similar do agonista fossem obtidas. Em seguida, 7-HC (30 e 300  $\mu\text{M}$ ) foi adicionada juntamente com solução de Tyrode livre de  $\text{Ca}^{2+}$  durante 5 minutos. E ainda em sua presença, Phe 1  $\mu\text{M}$  ou CAF (20 mM) foram adicionados novamente. A inibição da contração foi avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após adição de 7-HC (Figura 10).



**Figura 10:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito da 7-HC sobre as contrações transientes induzidas por Phe 1  $\mu$ M e CAF 20 mM.

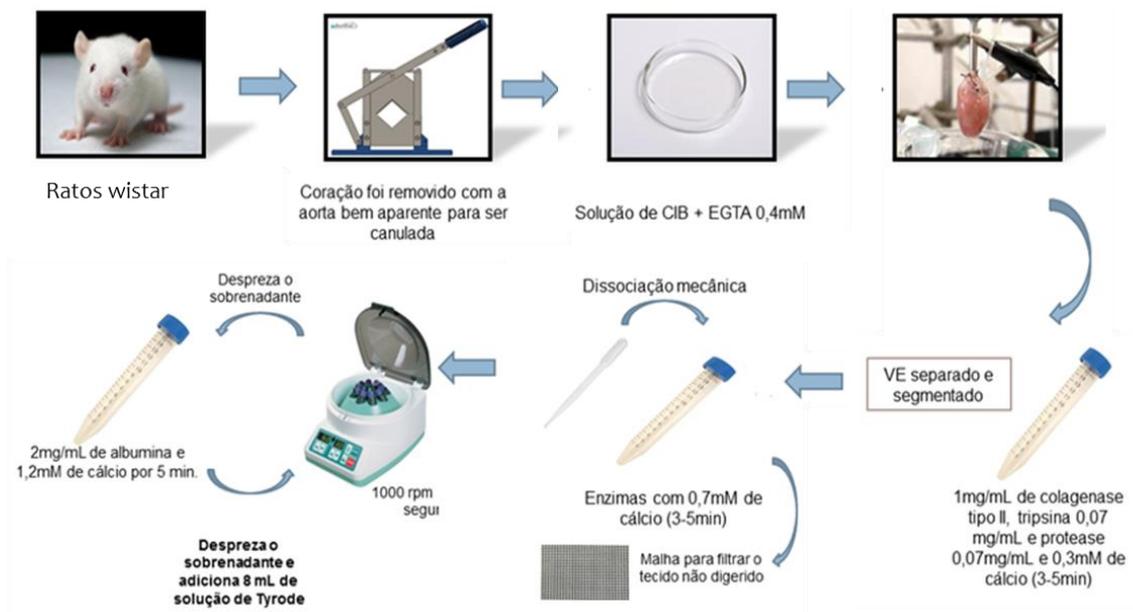
## 4.7. AVALIAÇÕES CARDÍACAS

### 4.7.1. Ensaios com Cardiomiócitos

#### 4.7.1.1. Isolamento dos cardiomiócitos de ratos wistar

Após eutanásia, o coração foi imediatamente removido e colocado em solução de C.I.B. (livre de cálcio) contendo EGTA 0,4 mM para a canulação da artéria aorta, de acordo com a técnica descrita por SHIOYA, 2007. Após a canulação o coração foi perfundido na mesma solução para retirar excesso de sangue. Em seguida, o coração foi perfundido com uma solução contendo 1 mg/mL de colagenase tipo II, tripsina 0,07 mg/mL e protease 0,07 mg/mL e 0,3mM de cálcio durante 5 minutos para dissociação enzimática das células do coração. Após a perfusão, o ventrículo esquerdo foi separado, fragmentado e colocado em uma solução contendo 1mg/mL de colagenase tipo II, tripsina 0,07 mg/mL e protease 0,07mg/mL e 0,7mM de cálcio durante 5 minutos banho-maria. Após esse procedimento, com uma seringa de plástico foi realizada a dissociação mecânica no intuito de dissolver o tecido ventricular na solução de modo que não houvesse tecido existente. Essa preparação foi centrifugada a 1000 rpm durante 18-20 segundos, o sobrenadante desprezado e adicionado uma solução contendo 2mg/mL de albumina e 1,2mM de cálcio durante 5 minutos em banho-maria. Após esse período, a preparação foi novamente

centrifugada a 1000 rpm durante 18-20 segundos, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 8 mL de solução de Tyrode (Figura 11).



**Figura 11:** Representação esquemática do protocolo de isolamento de cardiomiócitos dos ratos wistar

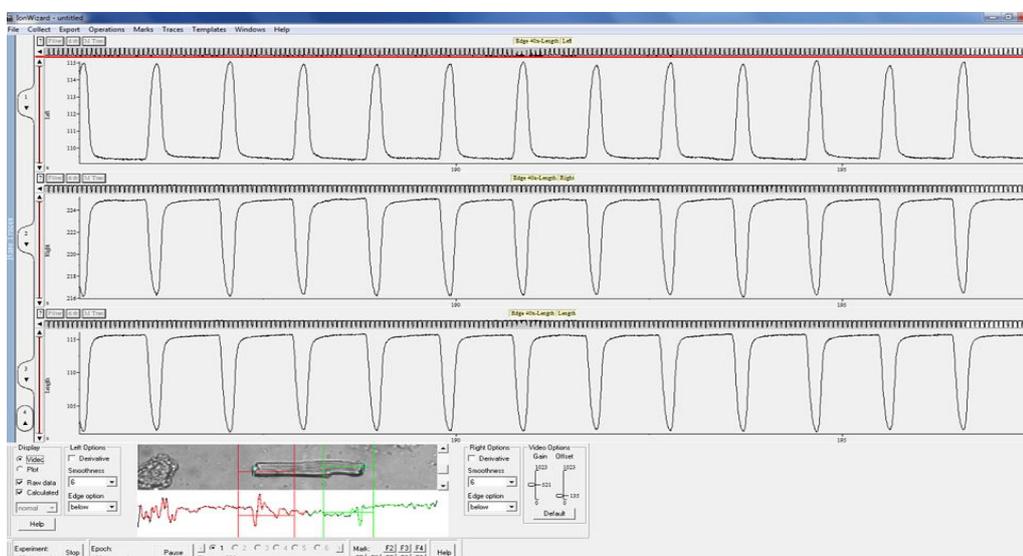
#### 4.7.1.2. Técnica de medida de contratilidade

A contração celular foi medida por meio da técnica de alteração de comprimento do cardiomiócito, usando-se um sistema de detecção de bordas, montado em um microscópio invertido (Ionoptix, EUA) (figura 12A). Os cardiomiócitos isolados foram acomodados em uma câmara experimental com a base de vidro e banhados por solução de Tyrode. Os cardiomiócitos foram visualizados em um monitor por meio de uma câmera (Myocam, Ionoptix, 240 hz) acoplada a um microscópio utilizando um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix). Os cardiomiócitos foram estimulados na frequência de 1 Hz (10 V por 5 Min) utilizando-se um par de eletrodos de aço e um estimulador elétrico de campo (Myopacer, Ionoptir). Os movimentos longitudinais dos cardiomiócitos foram capturados pelo sistema de detecção de bordas e armazenados para análise posterior (figura 12B). Foram utilizados para as medidas de contração somente os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso e sem apresentar contrações voluntárias.

A



B



**Figura 12:** **A**, Aparato utilizado para experimentos de contratilidade em cardiomiócitos. **B**, imagem do cardiomiócito isolado e a representação da contração das suas bordas direita e esquerda e a contração referente à célula inteira.

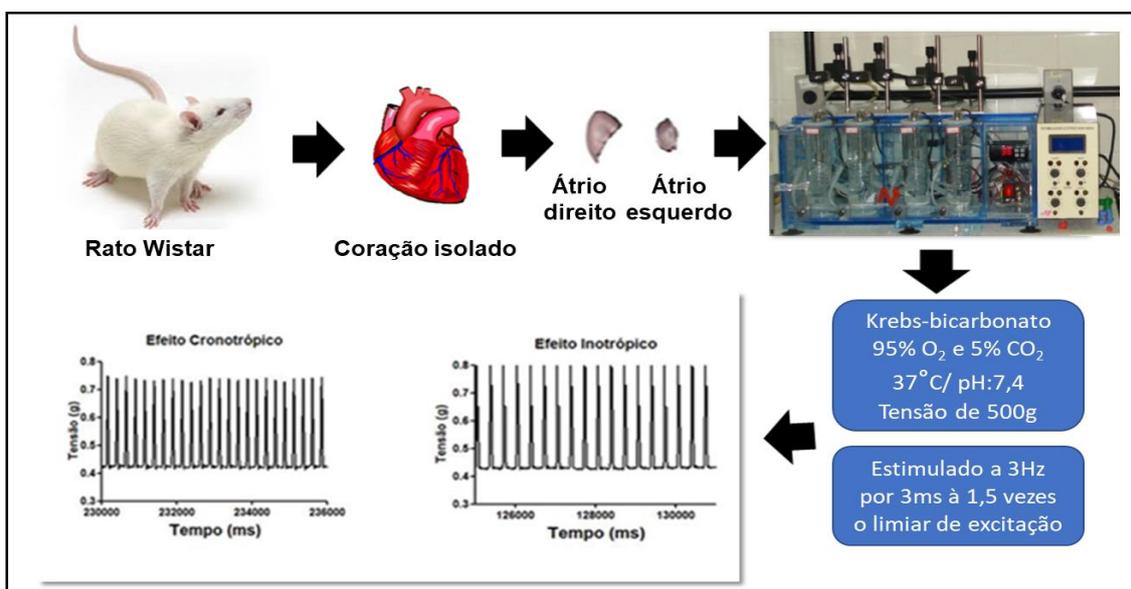
#### 4.7.1.3 Avaliação do efeito da 7-HC sobre a contratilidade de cardiomiócitos ventriculares isolados de ratos wistar

Após o isolamento das células provenientes de ventrículos esquerdos dos animais em estudo, estas foram incubadas com 7-HC em três diferentes concentrações (1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ ) por 10 minutos em cada concentração e foram observados os efeitos da 7-HC na contração celular.

## 4.7.2. Ensaios com Átrios Isolados

### 4.7.2.1. Isolamento dos tecidos atriais cardíacos de ratos

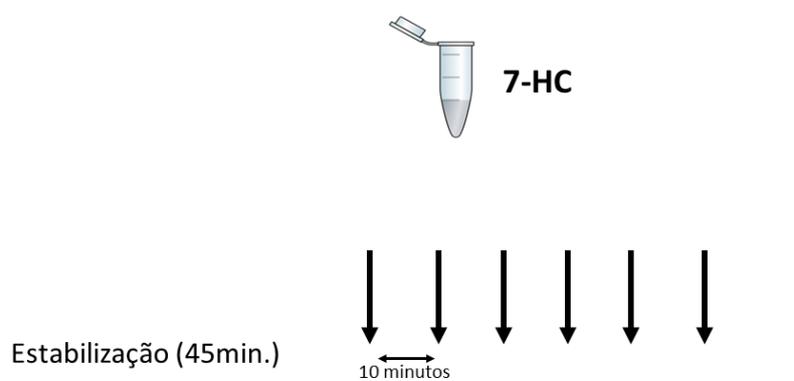
Após eutanásia dos animais em câmara de CO<sub>2</sub>, o coração foi imediatamente removido, e os átrios foram isolados, de acordo com a técnica descrita por NASA et al., 1992, para ensaios com átrio isolado e perfundido de rato em banho de órgãos. Os átrios esquerdos e direitos foram cortados perpendicularmente ao eixo do coração e, em seguida, cada um foi suspenso por um fio de algodão e colocado em cuba de 10 mL, contendo solução de Krebs-Bicarbonato. O banho foi mantido a uma temperatura de 37 °C e aerado com uma mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). A tensão inicial de cada átrio foi ajustada em 500 mg e os tecidos foram mantidos em equilíbrio durante um período de 45 minutos antes do início dos experimentos. As preparações de átrio esquerdo foram estimuladas eletricamente de forma contínua (estimulação de campo), usando o estimulador (AVS), com pulsos quadrados de 3 Hz, duração de 3 ms e voltagem de 1,5 vezes o limiar de excitação do tecido cardíaco. As preparações de átrio direito foram montadas no mesmo banho para órgão, mas não foram estimuladas, devido à presença do nodo sinoatrial, permitindo a medidas de ritmicidade e das contrações espontâneas (figura 13). Os parâmetros cardíacos foram registrados pelo sistema de aquisição de dados AVS. A frequência de batimentos espontâneos dos átrios direitos foi quantificada e definida como frequência atrial para a avaliação dos efeitos cronotrópicos induzidos pelas drogas. A força de contração atrial foi avaliada no átrio esquerdo e determinado o efeito inotrópico induzido pelas mesmas drogas.



**Figura 13:** Representação esquemática do protocolo de isolamento de átrios dos ratos wistar

#### 4.7.2.2 Avaliação dos efeitos cronotrópicos e inotrópicos induzidos por 7-HC

Após um período de 45 minutos de estabilização das preparações, concentrações crescentes de 7-HC (0.001  $\mu$ M – 300  $\mu$ M) foram adicionadas cumulativamente nos banhos de órgãos, contendo os átrios direito e esquerdo dos ratos wistar, com intervalo de 10 minutos entre as concentrações (figura 14). Os efeitos inotrópicos e cronotrópicos da 7-HC foram avaliados e foram obtidas representações gráficas da força de contração e frequência cardíaca, nos átrios esquerdos e direitos, respectivamente.



**Figura 14:** Representação esquemática do protocolo para avaliação dos efeitos cronotrópicos e inotrópicos induzidos pela 7-HC.

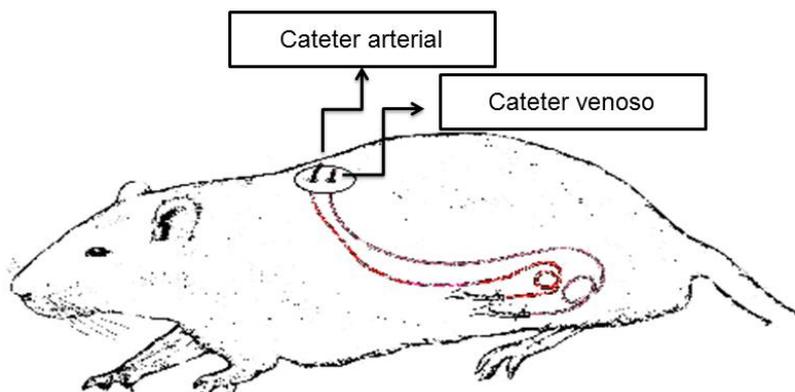
## 4.8. AVALIAÇÕES HEMODINÂMICAS

### 4.8.1. Medida direta da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados.

A princípio, os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina e cateteres de polietileno (PE), segmentos de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente) soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente) foram implantados na aorta abdominal e na veia cava inferior, via artéria e veia femoral esquerda, respectivamente (Figura 15). Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal.

Passado o período de 24 horas da cirurgia, a pressão arterial foi continuamente monitorada através do cateter arterial conectado a um transdutor de pressão arterial (AD instruments), cujo sinal foi amplificado e gravado digitalmente por uma interface analógica para digital (Power/Lab 8 35, requerimento de aquisição de dados, LabChart, New South Wales, Austrália) gravou (1 kHz) em um microcomputador para posterior análise. A pressão arterial média (PAM) foi calculada a partir de dados de pressão arterial sistólica e diastólica, enquanto a frequência cardíaca (FC) foi determinada pela pulsação da pressão arterial.

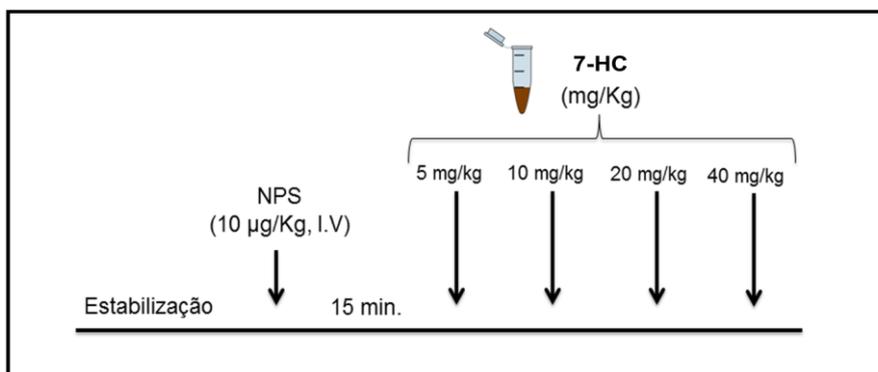
Após estabilização dos parâmetros cardiovasculares, a PAM e FC foram registradas antes (valores iniciais) e depois da administração intravenosa da 7-HC (2,5; 5; 10 e 20, aleatoriamente). Injeções sucessivas foram separadas por um intervalo de tempo suficiente para permitir a recuperação completa da pressão arterial, normalmente entre 20-30 minutos.



**Figura 15:** Desenho esquemático da implantação de cateteres de polietileno para a investigação do efeito da 7-HC na hemodinâmica de animais wistar.

#### 4.8.2. Avaliação do efeito da 7-HC sobre a PAM e FC de ratos normotensos não-anestesiados

Para obtenção de uma curva dose-resposta, os animais foram mantidos em aclimatação por um período de no mínimo 30 minutos, para estabilização dos parâmetros cardiovasculares. Em seguida, nitroprussiato de sódio (NPS) (10  $\mu$ g/kg, i.v.) foi administrado, um clássico doador de óxido nítrico, para verificar a eficácia da implantação do cateter venoso. Após 15 minutos, diferentes doses da 7-HC (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg, i.v.) (Figura 1) foram administradas aleatoriamente com intervalos de tempo necessário para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores da linha de base. Os valores de PAM e FC foram obtidos antes (valores da linha de base) e após a administração da 7-HC e suas variações foram expressas em porcentagem (%) dos valores em delta ( $\Delta$ ).



**Figura 16:** Representação esquemática do protocolo para avaliação dos valores de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos wistar não anestesiados.

#### 4.9. AVALIAÇÃO DAS INFLUÊNCIAS DE 7-HC SOBRE A ELETROGÊNESE CARDÍACA

Os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina e cateteres de polietileno (PE) foram implantados na veia cava inferior via veia femoral esquerda para a administração intravenosa da 7-HC. A manutenção da anestesia foi realizada com isoflurano inalatório. Os animais eram colocados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica confeccionada em madeira. Os eletrodos foram colocados nos membros anteriores e posteriores segundo a padronização preconizada no triângulo de Einthoven (terra inserido na pata posterior direita) (JIN et al., 2012), visando obter as derivações eletrocardiográficas bipolares (D1, D2 e D3) e unipolares (aVR, aVL e aVF) do plano frontal. Em cada registro de ECG os seguintes parâmetros eram obtidos: frequência cardíaca (pelo intervalo RR), duração do intervalo P-R (início da onda P ao início do QRS) e duração do QRS.

#### 4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m) ou média (intervalo de confiança). As curvas concentração-resposta foram obtidas por regressão não linear. Também foram analisados os valores relativos aos efeitos promovidos por cada concentração individualmente.

As análises estatísticas foram feitas utilizando teste t de Student ou análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido de teste de Bonferroni, quando apropriado. Foram considerados significantes os valores de  $p < 0,05$ . O programa utilizado para análise dos dados foi o Graph PadPrism 5.0® (EUA).

# Resultados

## 5. RESULTADOS

### 5.1 EFEITO VASODILATADOR DAS CUMARINAS

As cumarinas 1,2-benzopirona, 3-hidroxycumarina, 4- hidroxycumarina, 6-hidroxycumarina, 7- hidroxycumarina, 6,7- dihidroxycumarina, 6-metoxi-7-hidroxycumarina, 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina, isoladas ou obtidas pela Sigma-Aldrich, tiveram seus efeitos vasculares investigados e foi possível observar que estas apresentaram um potencial efeito vasodilatador em artéria mesentérica isolada de rato.

A adição cumulativa das cumarinas (0.001  $\mu$ M – 300  $\mu$ M) em anéis de artéria mesentérica com endotélio funcional e pré-contraídos com Phe (1 $\mu$ M), promoveu uma vasodilatação dependente de concentração para todas as cumarinas testadas. A remoção do endotélio vascular dos anéis arteriais não alterou de maneira significativa a resposta vasodilatadora das cumarinas, à exceção da 1,2 benzopirona, que apresentou atenuação do efeito de modo significativo na ausência do endotélio funcional. Os valores referentes aos efeitos promovidos pela última concentração administrada de cada cumarina estão na tabela 9.

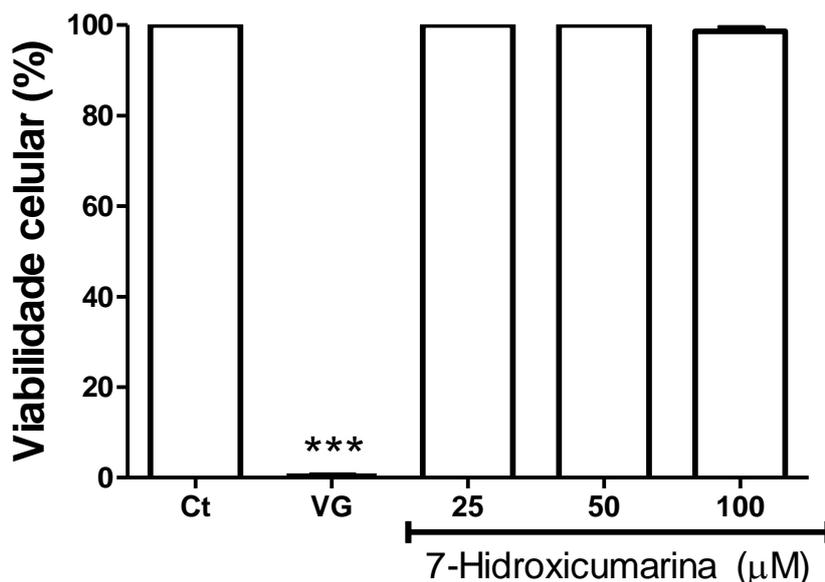
**Tabela 9:** Efeito vasodilatador das substâncias teste

SUBSTÂNCIAS TESTE	PRESEÇA DE ENDOTÉLIO (E+)	AUSÊNCIA DE ENDOTÉLIO (E-)	SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA
	EFEITO [300 $\mu$ M]	EFEITO [300 $\mu$ M]	
Coumarin ou 1,2-Benzopyrone	83,3 $\pm$ 6,4 (n=5)	58,8 $\pm$ 7 (n=5)	Com diferença significativa (p=0,0334)
3-Coumarinol ou 3-Hydroxycoumarin	91,4 $\pm$ 6,8 (n=5)	98,5 $\pm$ 3,3 (n=5)	Sem diferença significativa (p=0,4033)
4-Coumarinol ou 4-Hydroxycoumarin	68,6 $\pm$ 13,3 (n=5)	38,2 $\pm$ 5,1 (n=5)	sem diferença significativa (p=0,0533)
Grevillone ou ou 6-Hydroxycoumarin	98,4 $\pm$ 6,2; (n=5)	104,4 $\pm$ 6,4 (n=5)	Sem diferença significativa (p=0,5436)
<b>Umbelliferone ou 7-Hydroxycoumarin</b>	<b>94,9 <math>\pm</math> 6,8 (n=5)</b>	<b>96,2 <math>\pm</math> 7,1 (n=7)</b>	<b>Sem diferença significativa (p=0,622)</b>
Esculetin ou 6,7-Dihydroxycoumarin	109,2 $\pm$ 7,6 (n=5)	102,7 $\pm$ 6,8 (n=5)	Sem diferença significativa (p=0,5437)
Scopoletin ou 6-Methoxy-7-hydroxycoumarin	109,1 $\pm$ 3,5 (n=5)	95,3 $\pm$ 4,4 (n=5)	Sem diferença significativa (p=0,75)
Flaxetin ou 7,8-Drihydroxy-6-methoxycoumarin	93,7 $\pm$ 3,8 (n=5)	118,3 $\pm$ 102,3 (n=5)	Sem diferença significativa (p=0,4775)

Os valores de efeito promovido pela concentração de [300  $\mu$ M] são expressos como média  $\pm$  e.p.m. O teste *t* de *Student* não pareado foi usado para examinar a diferença entre o endotélio desnudo e endotélio intacto de cada grupo experimental; \* p< 0,05.

## 5.2. CITOTOXICIDADE DA 7-HC EM CÉLULAS DE MAMÍFERO

Inicialmente, após a escolha da 7-HC para o prosseguimento do estudo, foi avaliada a sua citotoxicidade em células de mamífero. Os efeitos da 7-HC na viabilidade celular foram determinados por um teste colorimétrico de Alamar Blue, 24 horas após o tratamento. Conforme revelado na figura 17, 7-HC a uma concentração de 100  $\mu\text{M}$  ou inferior não induziu efeito citotóxico em cardiomiócitos de ratos da linhagem H9c2.

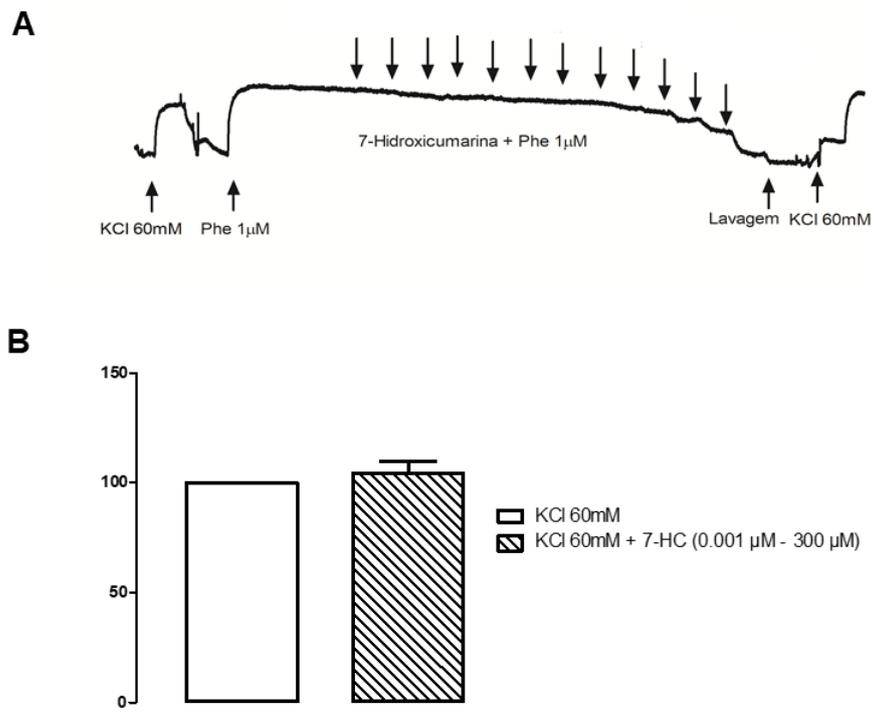


**Figura 17:** Efeito da 7-HC sobre a viabilidade de cardiomiócitos. Gráfico de barras demonstrando o efeito atóxico da 7-HC sobre cardiomiócitos de ratos da linhagem H9c2, nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{M}$ , em triplicatas. VG: Violeta de Genciana.

## 5.3 AVALIAÇÕES VASCULARES

### 5.3.1 Reversibilidade da contratilidade vascular após a adição da 7-HC

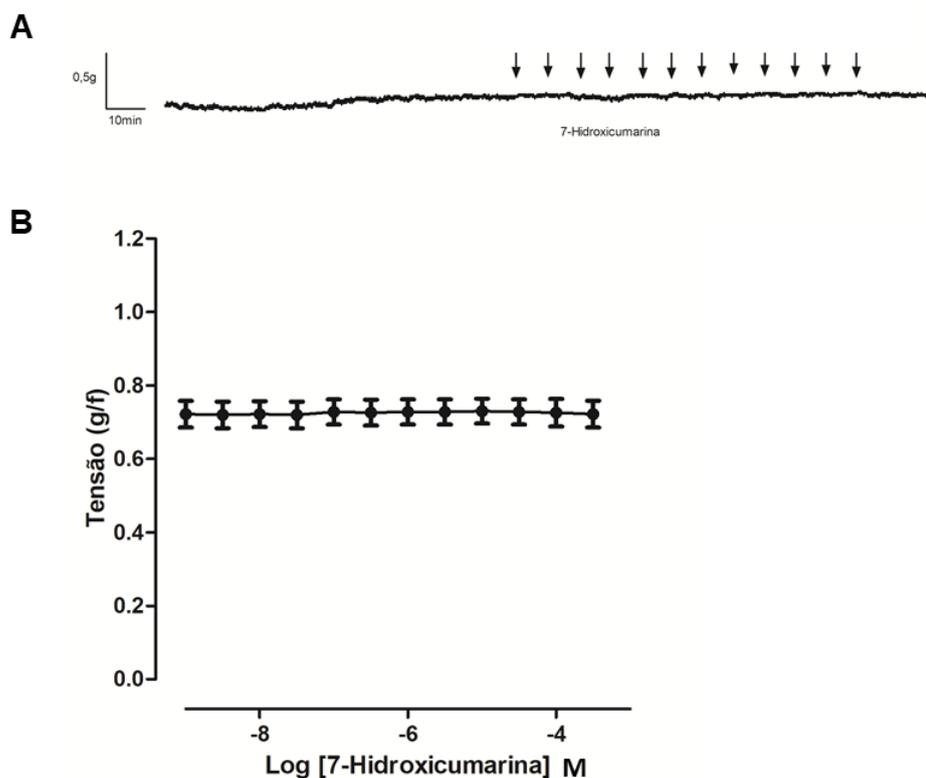
A contratilidade tecidual induzida pela solução tyrode com KCl à 60 mM antes e depois da adição das concentrações cumulativas da 7-HC em anéis de artéria mesentérica superior de ratos wistar, na ausência de endotélio vascular, foi obtida e demonstrada na figura 18. Como pode ser observado, após a adição cumulativa da 7-HC não promoveu alteração entre o  $\Delta$  da contratilidade tecidual induzida por KCl 60mM.



**Figura 18:** Influência da 7-HC sobre a capacidade contrátil vascular. Registro original da manutenção da capacidade contrátil do tecido vascular após administração cumulativa da 7-HC (0.001 µM – 300 µM) em anel de artéria mesentérica superior isolada de rato wistar, pré-contraídos com fenilefrina (Phe 1 µM), na ausência de endotélio vascular. As setas indicam o momento da adição das substâncias. Reversibilidade da contratilidade vascular após a adição de concentrações cumulativas de 7-HC em artéria mesentérica isolada de rato wistar. Gráfico de barras demonstrando a capacidade de reversibilidade da contração vascular com KCl 60 mM após adição cumulativa de 7-HC (0.001 µM – 300 µM) em artéria mesentérica isolada de rato wistar. “One-way” ANOVA de Medidas Repetidas

### 5.3.2 Efeitos da 7-HC em anéis de artéria mesentérica sobre o tônus basal vascular

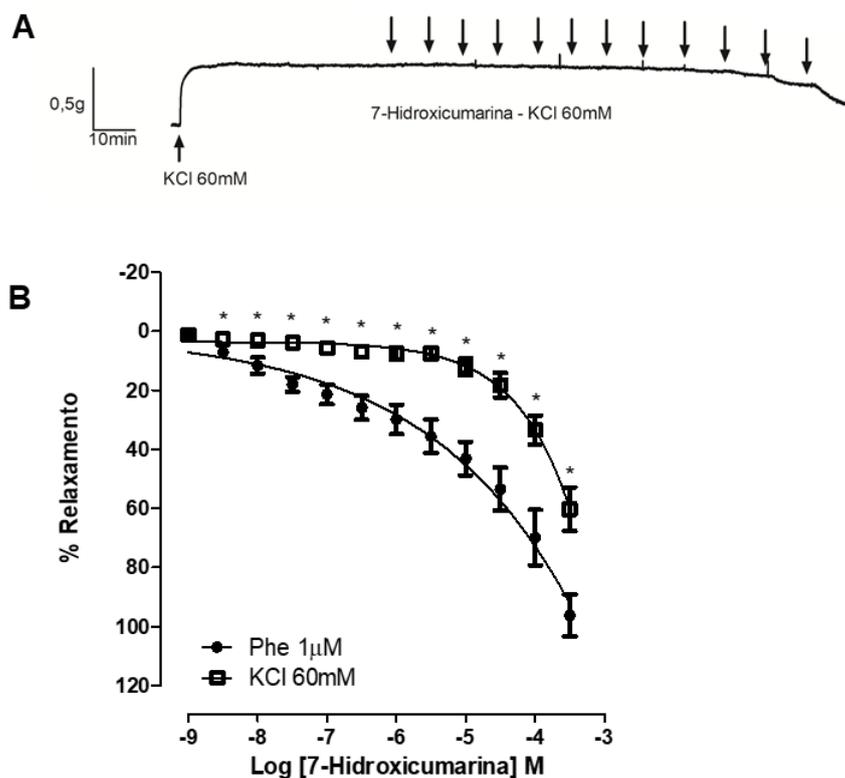
Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar, na presença do endotélio vascular funcional, a adição cumulativa 7-HC (0.001 µM – 300 µM) não promoveu efeito sobre o tônus muscular espontâneo (Figura 19).



**Figura 19:** Influência da 7-HC sobre o tônus basal. A) Registro original da reversão da contratilidade tecidual da 7-HC, em anel de artéria mesentérica superior isolada de rato wistar, pré-contraídos com fenilefrina (Phe 1  $\mu$ M), na ausência de endotélio vascular, após adição cumulativa de 7-HC (0.001  $\mu$ M – 300  $\mu$ M). As setas indicam o momento da adição das substâncias. B) Gráfico de barras demonstrando a capacidade de reversibilidade da contração vascular com KCl 60mM após adição cumulativa de 7-HC (0.001  $\mu$ M – 300  $\mu$ M). “One-way” ANOVA de medidas repetidas.

### 5.3.3 Efeito da 7-HC em artérias mesentéricas isoladas de ratos wistar contraídas por agente despolarizante KCl 60 mM

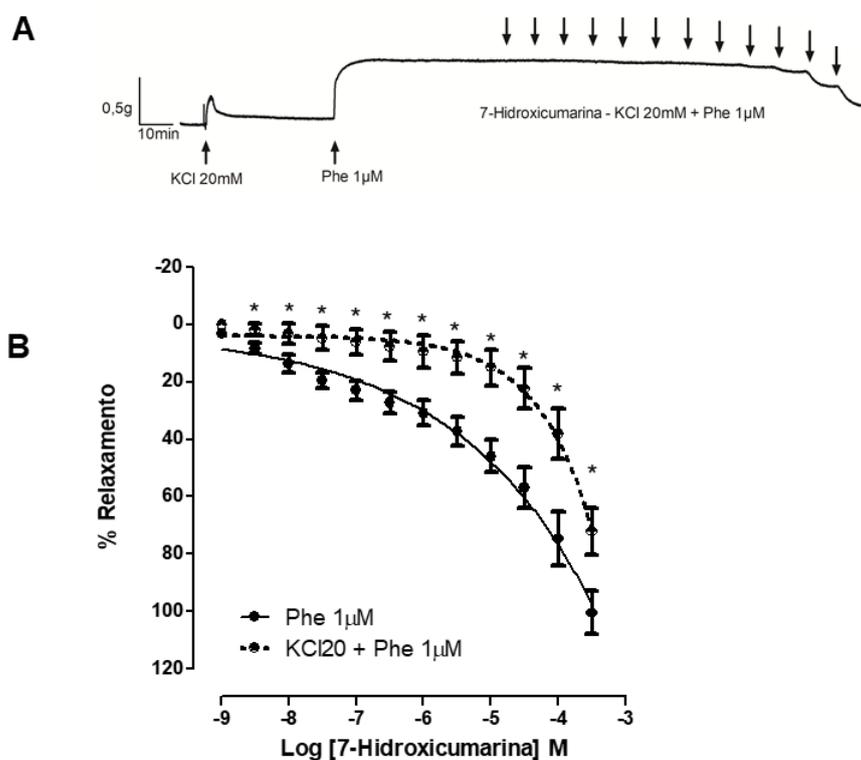
Em anéis mesentéricos, sem endotélio vascular, a pré-contração promovida pela solução de tyrode com KCl 60 mM, atenuou significativamente a resposta relaxante induzida pela adição cumulativa da 7-HC (0.001  $\mu$ M – 300  $\mu$ M) (Efeito da [300  $\mu$ M] =  $60,3 \pm 7,4\%$ , n=5) (\*\*p<0,01), quando comparada à resposta relaxante induzida pela 7-HC após contrações induzidas por Phe (Efeito da [300  $\mu$ M] =  $96,2 \pm 7,1\%$  n=7) (Figura 20).



**Figura 20:** Efeito de 7-HC em artéria mesentérica superior de ratos wistar pré-contraídos com solução de alto  $K^+$  extracelular (60 mM). A) Registro original do efeito relaxante da 7-HC com KCl 60 mM. B) Curvas concentração-resposta mostrando o efeito relaxante de 7-HC (0.001  $\mu$ M – 300  $\mu$ M), cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolado de ratos wistar, na ausência de endotélio, pré-contraídos com Phe 1 $\mu$ M ou com solução despolarizante de  $K^+$  (KCl 60mM). Os valores estão expressos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs Phe (1 $\mu$ M).

### 5.3.4 Participação dos canais para $K^+$ no relaxamento induzido pela 7-HC em artéria mesentérica

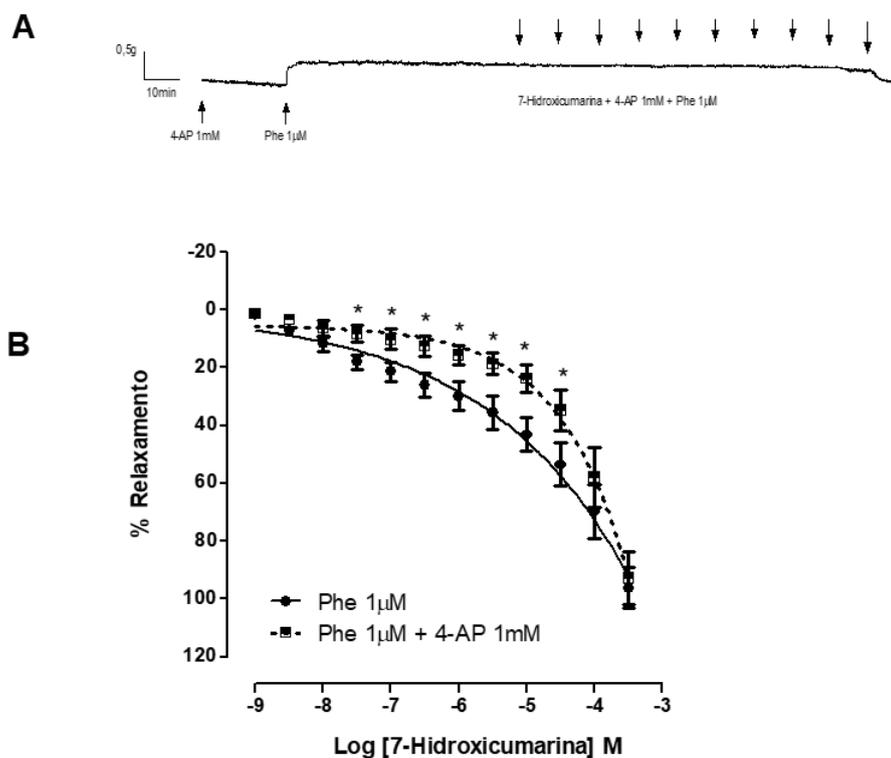
Para avaliação da participação de canais para  $K^+$  na resposta vasodilatadora induzida pela 7-HC, foram realizados experimentos com anéis mesentéricos, na ausência de endotélio funcional e pré-contraídos com Phe (1  $\mu$ M), na presença de uma solução de Tyrode com 20 mM de KCl. O bloqueio parcial do efluxo de  $K^+$  com o aumento da concentração  $K^+$  extracelular ( $[K^+]_e$ ) para 20 mM induziu uma diminuição estatisticamente significativa (\* $p < 0,05$ ) do efeito vasorrelaxante da 7-HC (0.001  $\mu$ M – 300  $\mu$ M) (Figura 21).



**Figura 21:** Efeito de 7-HC em artéria mesentérica superior de ratos wistar pré-contraídos com solução com aumento de  $K^+$  extracelular (20 mM). A) Registro original do efeito relaxante da 7-HC com Phe 1  $\mu$ M e KCl 20 mM. Curvas de concentração-resposta mostrando o efeito relaxante de 7-HC (0.001  $\mu$ M – 300  $\mu$ M), cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolado de ratos wistar, na ausência de endotélio, pré-contraídos com Phe 1  $\mu$ M com solução despolarizante de  $K^+$  (KCl 20 mM). Os valores estão expressos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs Phe (1  $\mu$ M).

### 5.3.5 Envolvimento dos canais para $K^+$ retificadores retardados na resposta vasorrelaxante induzida pela 7-HC em artéria mesentérica.

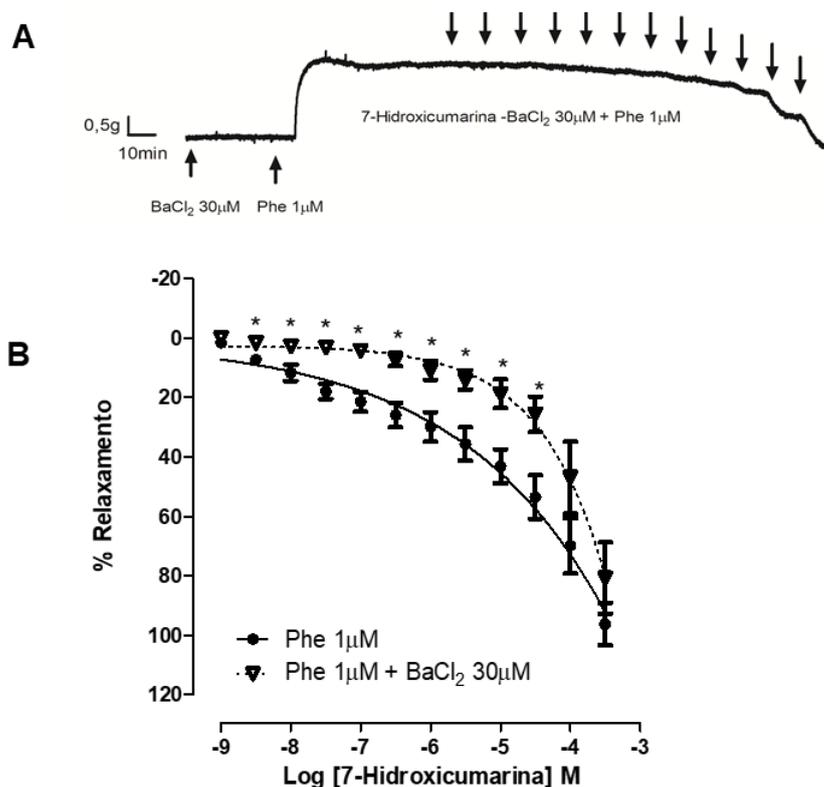
Para investigar a participação dos canais para  $K^+$  retificador retardado nos efeitos vasculares induzidos pela 7-HC (0.001  $\mu$ M – 300  $\mu$ M), foram realizados experimentos na presença de 4-aminopiridina (4-AP) (1mM), bloqueador destes canais. A presença do bloqueador 4-AP na concentração de 1 mM não promoveu alteração significativa do efeito vasodilatador induzido pela 7-HC, em artéria mesentérica de ratos, sem endotélio, pré-contraído com Phe (Efeito da [300  $\mu$ M] =  $104,2 \pm 9,6\%$  n= 5), quando comparada ao resultado obtido por contrações induzidas por Phe na ausência do 4-AP, na ausência do endotélio vascular (Efeito da [300  $\mu$ M] =  $96,2 \pm 7,1\%$  n= 7) (Figura 22).



**Figura 22:** Participação de canais de  $K^+$  retificadores retardados no relaxamento induzido pela 7-HC. A) Registro original da ação da 7-HC (0.001  $\mu$ M – 300  $\mu$ M), em anel de artéria mesentérica superior isolada de rato Wistar, pré-contraídos com Phe 1 $\mu$ M, na presença de 4-AP 1mM, na ausência de endotélio vascular funcional. As setas indicam o momento da adição das substâncias. B) Curvas de concentração-resposta mostrando o efeito relaxante de 7-HC (0.001  $\mu$ M – 300  $\mu$ M, cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolado de ratos wistar, na ausência de endotélio, pré-contraídos com Phe 1 $\mu$ M na presença de 4-aminipiridina (1mM). Os valores estão expressos como média  $\pm$  SEM.

### 5.3.6 Influência dos canais para $K^+$ retificadores de entrada ( $K_{ir}$ ) na resposta vasodilatadora induzida pela 7-HC.

Para avaliar a participação dos canais  $K_{ir}$  nos efeitos vasculares induzidos pela 7-HC, foram realizados experimentos na presença de  $BaCl_2$  30 $\mu$ M, bloqueador destes canais (D'AMBROSIO et al., 2002). Na presença de  $BaCl_2$ , a curva de relaxamento induzida pela 7-HC foi significativamente deslocada para a direita, embora não tenha causado alteração significativa na maior concentração testada de 7-HC (efeito da [300  $\mu$ M] =  $80,8 \pm 12,0\%$ , n=5), quando comparada ao resultado obtido por contrações induzidas por Phe, na ausência do bloqueador (Efeito da [300  $\mu$ M] =  $96,2 \pm 7,1\%$  n= 7)(Figura 23).

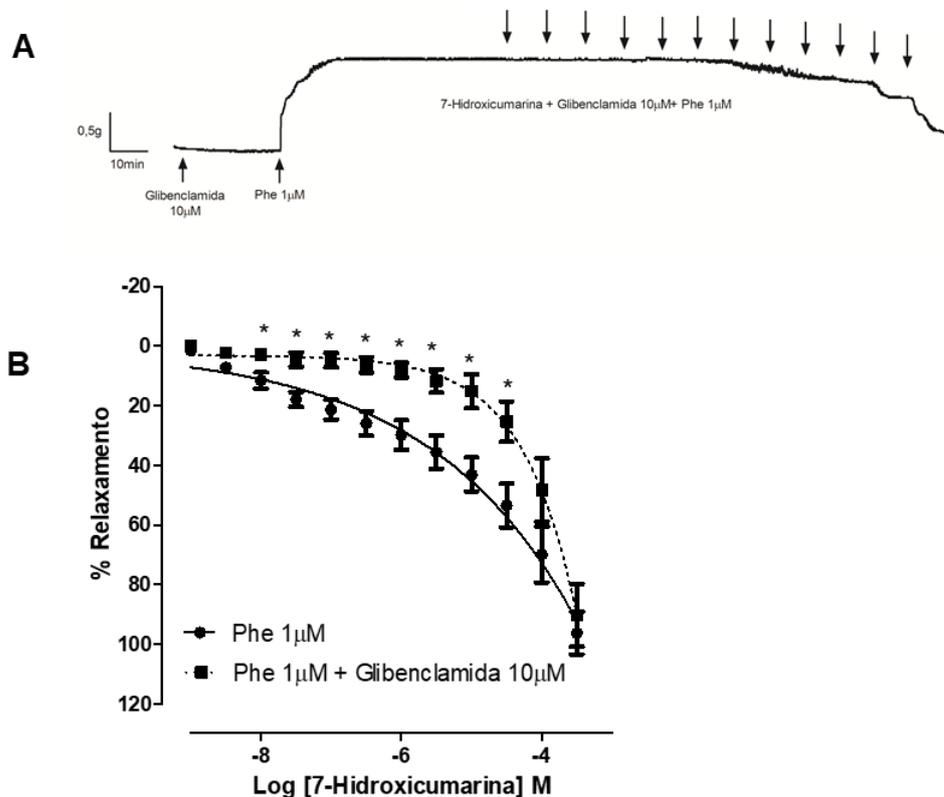


**Figura 23:** Participação de canais de K<sup>+</sup> retificadores de entrada no relaxamento vascular induzido pela 7-HC em artéria mesentérica isolada de ratos wistar. A) Registro original da ação da 7-HC (0.001 μM – 300 μM), em anel de artéria mesentérica superior isolada de rato wistar, pré-contraídos com Phe 1μM, na presença de BaCl<sub>2</sub> 30μM, na ausência de endotélio vascular funcional. As setas indicam o momento da adição das substâncias. B) Curvas de concentração-resposta mostrando o efeito relaxante de 7-HC (0.001 μM – 300 μM, cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolado de ratos wistar, na ausência de endotélio, pré-contraídos com Phe 1μM na presença de BaCl<sub>2</sub> (30μM). Os valores estão expressos como média ± SEM. \*p<0,05.

### 5.3.7. Influência dos canais para K<sup>+</sup> sensíveis a ATP (K<sub>ATP</sub>) na resposta vasodilatadora induzida pela 7-HC.

Para investigar a participação dos K<sub>ATP</sub> nos efeitos vasculares induzidos por 7-HC, foram realizados experimentos na presença de Glibenclamida 10μM (GLIB), que nesta concentração é considerado um bloqueador dos K<sub>ATP</sub> (INSUK et al., 2003). Na presença de GLIB, a curva de relaxamento induzida pela 7-HC foi significativamente deslocada para a direita, embora não tenha causado alteração significativa na maior concentração testada de 7-HC (efeito da [300 μM = 90,3 ± 10,5%, n=5]), quando comparada ao resultado obtido por contrações induzidas

por Phe 1  $\mu\text{M}$ , na ausência do bloqueador (Efeito da [300  $\mu\text{M}$ ] =  $96,2 \pm 7,1\%$  n=7)(Figura 24).



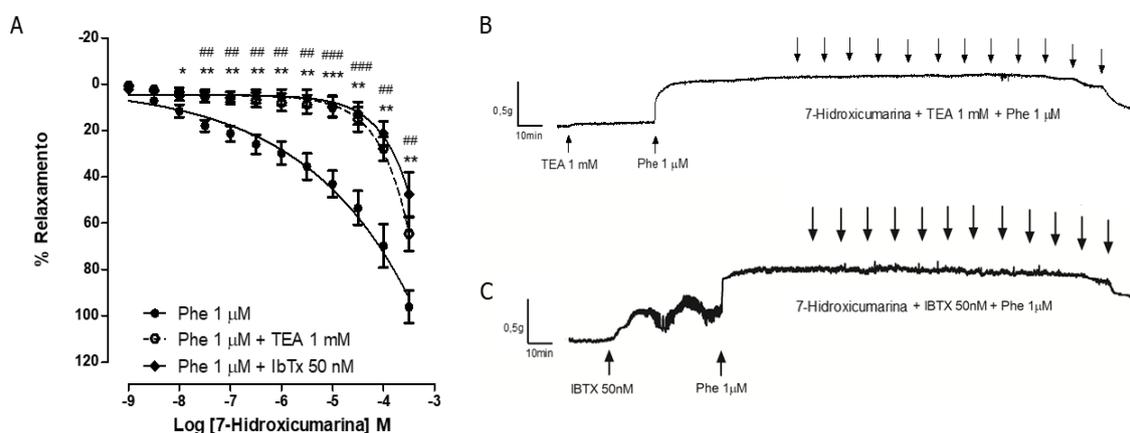
**Figura 24** Participação de canais de  $\text{K}^+$  sensíveis a ATP no relaxamento vascular induzido pela 7-HC em artéria mesentérica isolada de ratos wistar. A) Registro original da ação da 7-HC (0.001  $\mu\text{M}$  – 300  $\mu\text{M}$ ), em anel de artéria mesentérica superior isolada de rato wistar, pré-contraídos com Phe 1  $\mu\text{M}$ , na presença de Glibenclamide 10 $\mu\text{M}$ , na ausência de endotélio vascular funcional. As setas indicam o momento da adição das substâncias. B) Curvas de concentração-resposta mostrando o efeito relaxante de 7-HC (0.001  $\mu\text{M}$  – 300  $\mu\text{M}$ , cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolado de ratos wistar, na ausência de endotélio, pré-contraídos com Phe 1  $\mu\text{M}$  na presença de Glibenclamide (10 $\mu\text{M}$ ). Os valores estão expressos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs Phe (1 $\mu\text{M}$ ).

### 5.3.8 Participação dos canais $\text{BK}_{\text{Ca}}$ nos efeitos da 7-HC em anéis mesentéricos de ratos Wistar

Para investigar a participação dos  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  nos efeitos vasculares induzidos por 7-HC, foram realizados experimentos na presença de TEA 1mM, que nesta concentração é considerado um bloqueador não seletivo dos  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  (BRAYDEN, 1996), e na presença de Iberiotoxina (50nM) (IBTX), um bloqueador seletivo para  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  (FRIEDEN, SOLLINI, BÉNY, 1999). Na presença de TEA, a curva de

relaxamento induzida pela 7-HC foi deslocada para a direita e induziu uma redução significativa do efeito vasorrelaxante na maior concentração testada de 7-HC (efeito da  $[300 \mu\text{M}] = 64,6 \pm 7,5\%$ ,  $n=5$ ), quando comparada ao resultado obtido por contrações induzidas por Phe, na ausência do TEA (Efeito da  $[300 \mu\text{M}] = 96,2 \pm 7,1\%$ ,  $n=7$ )

Na presença de IBTX, um resultado semelhante foi observado. A curva de relaxamento induzida pela 7-HC foi deslocada para a direita e também induziu uma redução significativa do efeito vasorrelaxante na maior concentração testada de 7-HC (efeito da  $[300 \mu\text{M}] = 47,7 \pm 9,7\%$ ,  $n=7$ ), quando comparada ao resultado obtido por contrações induzidas por Phe, na ausência da IBTX (Efeito da  $[300 \mu\text{M}] = 96,2 \pm 7,1\%$ ,  $n=7$ )(Figura 25).

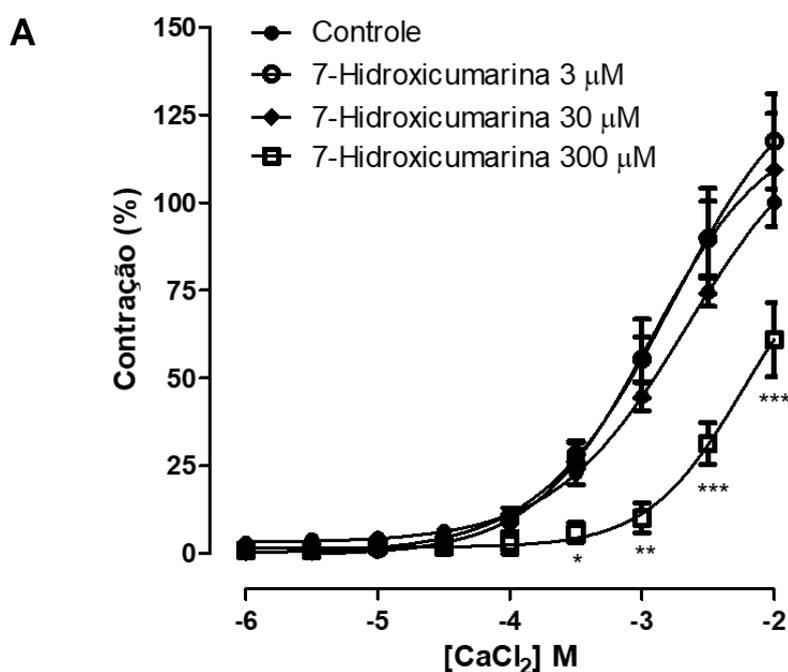


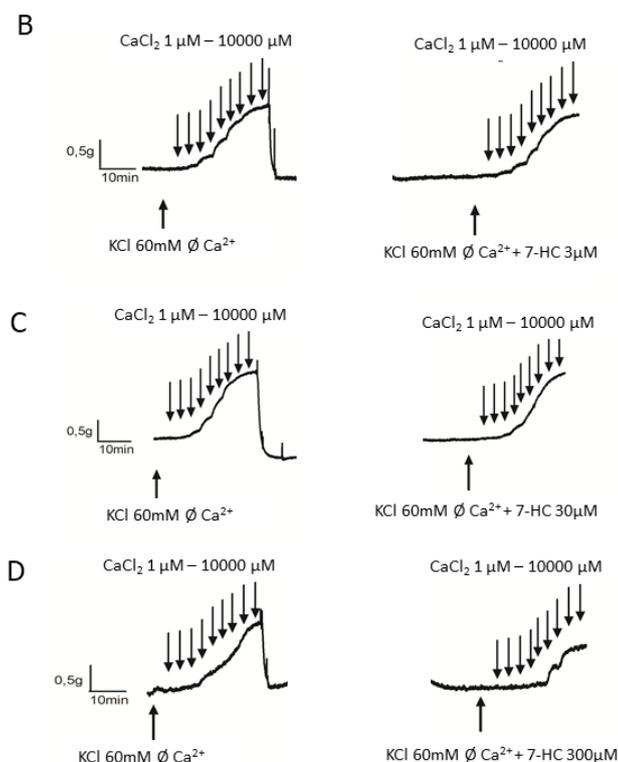
**Figura 25:** Participação de canais de  $BK_{Ca}$  no relaxamento vascular induzido pela 7-HC em artéria mesentérica isolada de ratos wistar. A) Curvas de concentração-resposta mostrando o efeito relaxante de 7-HC ( $0.001 \mu\text{M} - 300 \mu\text{M}$ , cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolado de ratos wistar, na ausência de endotélio, pré-contraídos com Phe  $1 \mu\text{M}$  na presença de TEA (1mM) e na presença de IBTX (50nM). B) Registro original da ação da de 7-HC ( $0.001 \mu\text{M} - 300 \mu\text{M}$ , cumulativamente) em anéis de artéria mesentérica superior isolado de ratos wistar, na ausência de endotélio, pré-contraídos com Phe  $1 \mu\text{M}$  na presença de TEA (1mM) e C) na presença de IBTX 50nM. As setas indicam o momento da adição das substâncias. Os valores estão expressos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; TEA (1mM) vs Phe ( $1 \mu\text{M}$ ) e IBTX (50nM) vs Phe ( $1 \mu\text{M}$ ).

### 5.3.9 Influência da 7-HC sobre o influxo de cálcio em artéria mesentérica

Para avaliar se 7-HC estaria influenciando no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para promover efeito vasodilatador em anéis de artéria mesentérica, foram realizados experimentos induzindo contrações com  $\text{CaCl}_2$  em meio despolarizante, mas em

ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ . A administração cumulativa de  $\text{CaCl}_2$  (1 - 10000  $\mu\text{M}$ ) promoveu uma contração, dependente de concentração, em anéis da artéria mesentérica superior isolada de ratos wistar na ausência de endotélio. Quando os anéis foram incubados com 3 concentrações de 7-HC ([3  $\mu\text{M}$ ], [30  $\mu\text{M}$ ] e [300  $\mu\text{M}$ ]), a curva concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$  foi significativamente atenuada apenas na concentração mais alta testada da cumarina, como mostra as alterações nos valores para efeitos induzidos por [3  $\mu\text{M}$ ]=117,4  $\pm$  13,6, [30  $\mu\text{M}$ ]= 109,3  $\pm$  16,1 e [300  $\mu\text{M}$ ]=60,9  $\pm$  10,6; n=5, quando comparadas ao controle 100  $\pm$  0,0 (Figura 26)

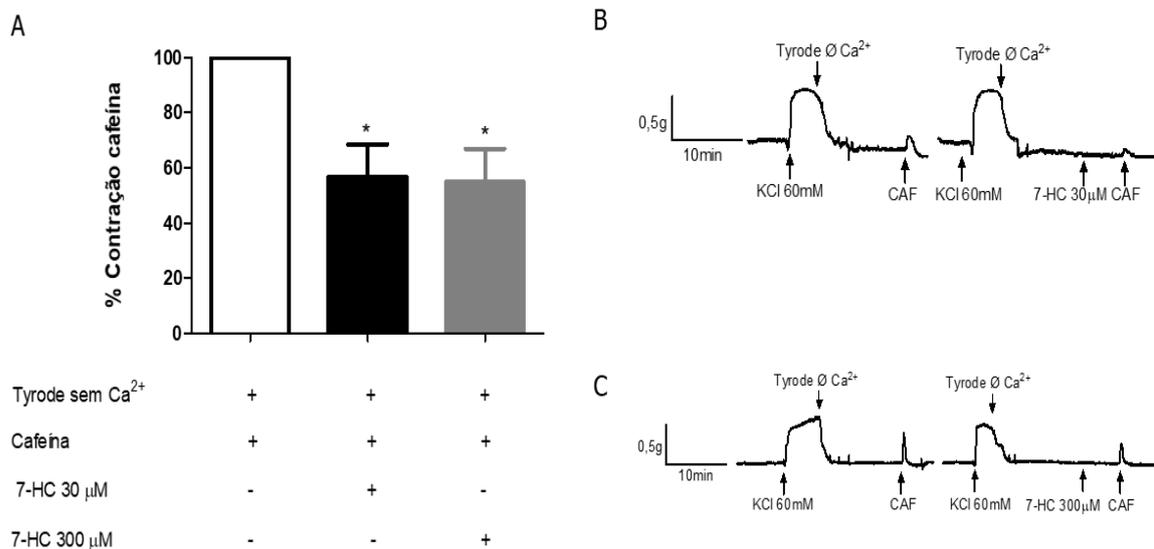




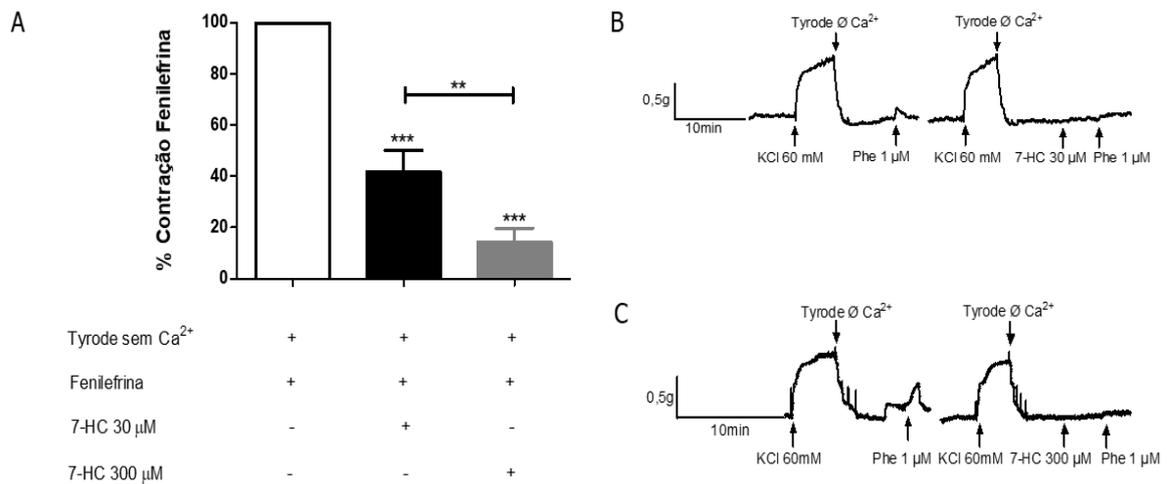
**Figura 26:** Influência da 7-HC sobre o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . A) Curvas concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$  em solução despolarizante (KCl 60mM) nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  em anéis da artéria mesentérica superior isolada de ratos wistar, na ausência de endotélio, na ausência (Controle) e na presença de concentrações isoladas de 7-HC (3, 30 e 300  $\mu\text{M}$ ). B) Registro original da ação de 7-HC (3  $\mu\text{M}$ ); C) de 7-HC (30  $\mu\text{M}$ ) e de D) 7-HC (300  $\mu\text{M}$ ) sobre o influxo de cálcio em anéis de artéria mesentérica superior isolado de ratos wistar, na ausência de endotélio, na presença de  $\text{CaCl}_2$  em solução despolarizante (KCl 60mM) nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$ . As setas indicam o momento da adição das substâncias. D) Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m de 5 experimentos para cada concentração. \* $p < 0,05$

### 5.3.10 Influência da 7-HC sobre a mobilização de cálcio intracelular

Para avaliar se 7-HC estaria influenciando a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para promover efeito vasodilatador em anéis de artéria mesentérica, foram realizados experimentos utilizando Phe (1  $\mu\text{M}$ ) (banho à temperatura de 37 °C) ou 20 mM de cafeína em meio livre de  $\text{Ca}^{2+}$ . 7-HC nas concentrações de  $3 \times 10^{-5}$  e  $3 \times 10^{-4}$  M inibiu as contrações transientes induzidas por CAF (20 mM) de modo independente da concentração nas mesmas condições experimentais (Figura 27) e nas mesmas concentrações, inibiu significativamente as contrações transientes induzidas por Phe (1  $\mu\text{M}$ ) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional, de modo dependente da concentração (Figura 28).



**Figura 27:** Efeito da 7-HC (30 e 300  $\mu\text{M}$ ) sob as contrações induzidas por CAF (20 mM) em meio livre de  $\text{Ca}^{2+}$ . A) Gráfico de barras demonstrando a influência da 7-HC (30 e 300  $\mu\text{M}$ ) frente às contrações transitentes induzidas por CAF (20 mM) em meio livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , em anéis de artéria mesentérica isolada de rato sem endotélio funcional ( $n = 6$ ).  $*p < 0,05$ . B e C) Registros originais do efeito da 7-HC (30 e 300  $\mu\text{M}$ ) frente às contrações transitentes induzidas por CAF (20 mM) em meio livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , em anéis de artéria mesentérica isolada de rato sem endotélio funcional ( $n = 6$ ).

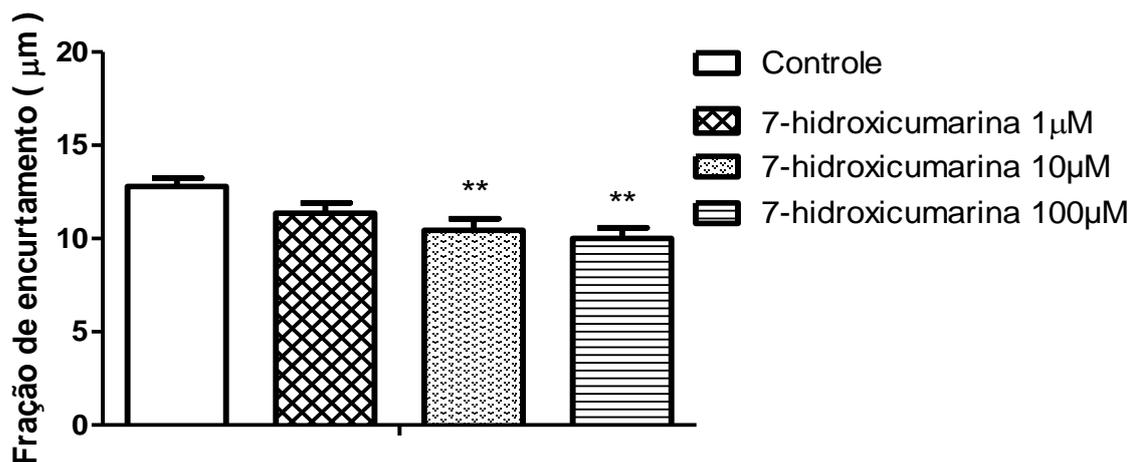


**Figura 28:** Influência de 7-HC (30 e 300  $\mu\text{M}$ ) sob contrações induzidas por Phe (1  $\mu\text{M}$ ). A) Efeito de 7-HC (30 e 300  $\mu\text{M}$ ) frente às contrações transitentes induzidas por Phe (1  $\mu\text{M}$ ) em meio livre de  $\text{Ca}^{2+}$ , em anéis de artéria mesentérica isolada de rato sem endotélio funcional ( $n = 6$ ). \* $p < 0,05$ . B e C) Registros originais do efeito de 7-HC (30 e 300  $\mu\text{M}$ ) frente às contrações transitentes induzidas por Phe (1  $\mu\text{M}$ ) em meio livre de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 5.4 AVALIAÇÕES CARDÍACAS

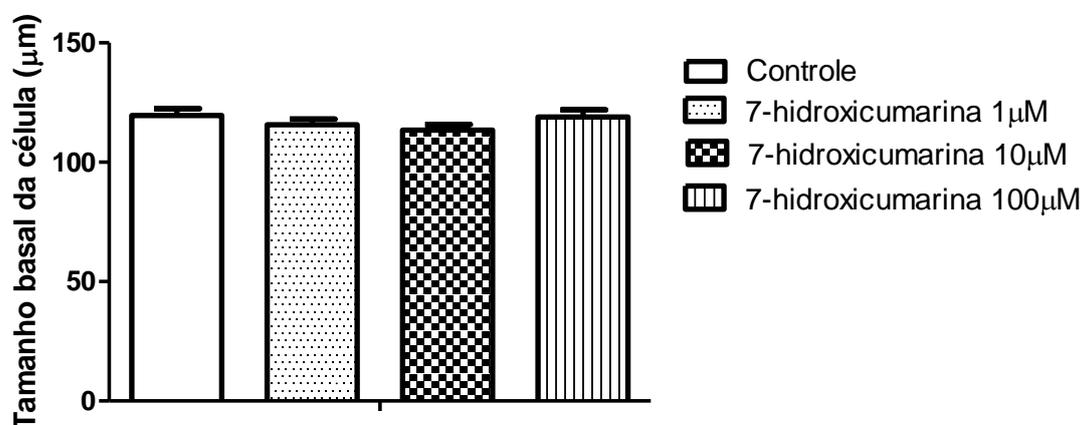
### 5.4.1 Efeito da 7-HC sobre a contratilidade de cardiomiócitos ventriculares

Para investigar os efeitos diretos da 7-HC em células cardíacas isoladas de animais wistar, 3 diferentes concentrações de 7-HC foram utilizadas para pré-tratamento de cardiomiócitos isolados de ventrículos esquerdos. A concentração de 1  $\mu\text{M}$  ( $11,36 \pm 0,45 \mu\text{M}$ ) não alterou significativamente a fração de encurtamento dos cardiomiócitos estimulados eletricamente. No entanto, uma redução estatisticamente significativa da contratilidade foi observada nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  ( $10,45 \pm 0,60 \mu\text{M}$ ) e 100  $\mu\text{M}$  ( $10,01 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ) quando comparada às células sem a administração da 7-HC (controle) ( $12,8 \pm 0,45 \mu\text{M}$ ;  $n=6$ ) (figura 29).



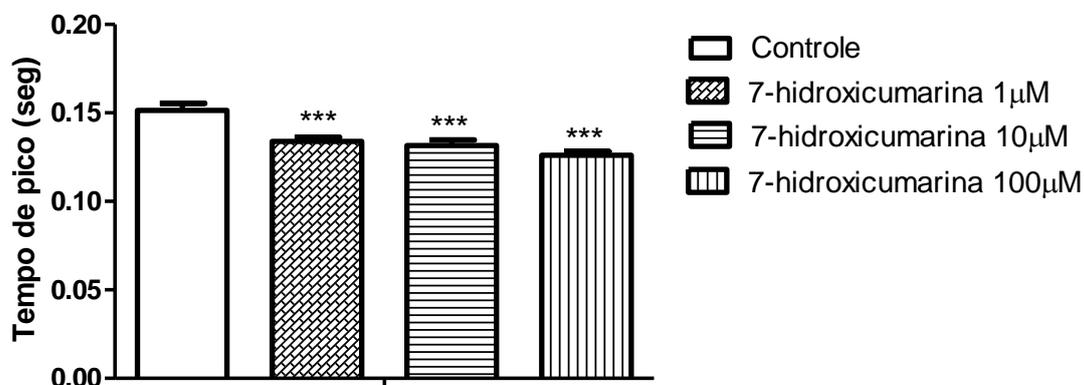
**Figura 29:** Influência da 7-HC (1, 10 e 100 μM) na contratilidade de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais wistar. Gráfico de barras, demonstrando a fração de encurtamento dos cardiomiócitos em μm por meio da medição da imagem gerada no monitor na ausência (controle) e na presença de 7-HC nas diferentes concentrações em animais wistar. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=6/ 55 células). \*p<0,05.

Um outro parâmetro que pode ser avaliado com esse protocolo é a capacidade da cumarina 7-HC, em diferentes concentrações, conseguir alterar o tamanho basal da célula. As concentrações de 1 μM ( $119 \pm 2,9 \mu\text{m}$ ; n=6), 10 μM ( $113,5 \pm 2,4 \mu\text{m}$ ; n=6) e 100 μM ( $115,6 \pm 2,4 \mu\text{m}$ ; n=6) e não causaram uma alteração significativa do tamanho basal celular, quando comparada ao grupo controle ( $119,6 \pm 2,9 \mu\text{m}$ ; n=6) (figura 30).



**Figura 30:** Influência da 7-HC (1, 10 e 100 μM) no tamanho dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais wistar. Gráfico de barras, demonstrando o tamanho dos cardiomiócitos em μm por meio da medição da imagem gerada no monitor na ausência (controle) e na presença de 7-HC nas diferentes concentrações em animais wistar. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=6/ 55 células).

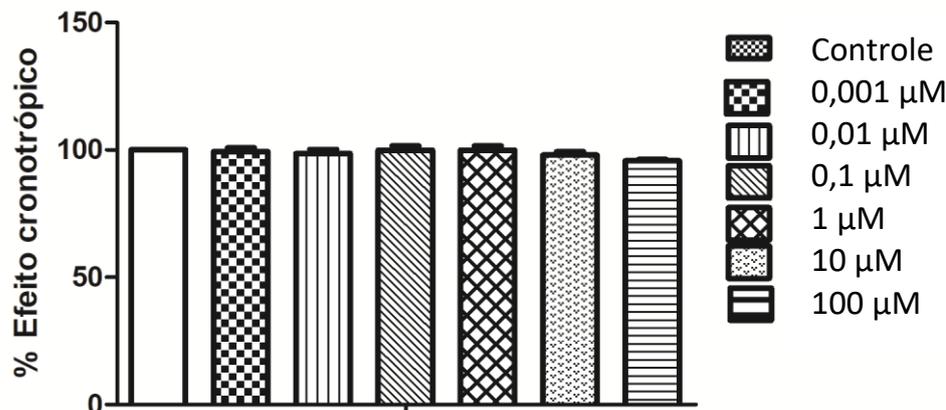
O tempo de pico de contração, medido em segundos (seg), é mais um parâmetro que pode ser avaliado nos ensaios de contratilidade de cardiomiócitos ventriculares. As concentrações de 1 $\mu$ M (0,126  $\pm$  0,002), 10 $\mu$ M (0,131seg  $\pm$  0,003) e 100 $\mu$ M (0,133seg  $\pm$  0,002) causaram uma alteração significativa do tempo de pico celular, quando comparada às células sem a administração da 7-HC (controle) (0,151seg  $\pm$  0,004; n=6) (figura 31).



**Figura 31:** Influência da 7-HC (1, 10 e 100  $\mu$ M) no tempo de pico de contração dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais wistar. Gráfico de barras, demonstrando o tempo de pico de contração dos cardiomiócitos em segundos por meio da medição da imagem gerada no monitor na ausência (controle) e na presença de 7-HC nas diferentes concentrações em animais wistar. Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. (n=6 ratos/ 55 células). \*p<0,05.

#### 5.4.2 Efeito da 7-HC sobre o cronotropismo cardíaco em átrios direitos isolados de ratos

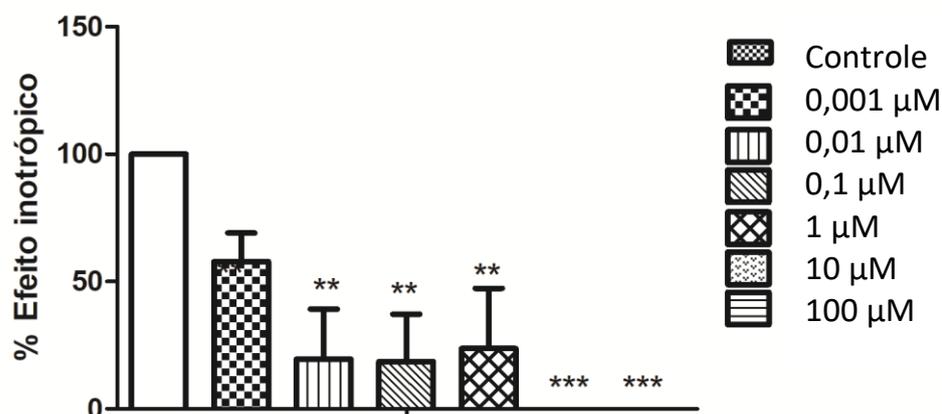
Para avaliar os efeitos cronotrópicos da 7-HC em átrios direitos isolados de ratos wistar, foram administradas seis diferentes concentrações: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100  $\mu$ M. Após administração cumulativa da 7-HC, nenhuma alteração significativa sobre a ritmicidade cardíaca foi observada (99,3%  $\pm$  1,44; 98,6%  $\pm$  1,53; 99,9%  $\pm$  1,63; 99,9%  $\pm$  1,63; 97,9%  $\pm$  1,32, respectivamente, n=5), quando comparado ao controle (figura 32).



**Figura 32:** Efeito da 7-HC sobre o cronotropismo cardíaco em átrios direitos isolados de ratos wistar. Gráfico de barras demonstrando a porcentagem de variação de resposta cronotrópica cardíaca induzida por 7-HC (0,001 - 100 µM), em ensaios com átrios direitos isolados de ratos wistar. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=5).

#### 5.4.3 Efeito da 7-HC sobre o inotropismo cardíaco em átrios esquerdos isolados de ratos

Para avaliar os efeitos inotrópicos da 7-HC em átrios esquerdos isolados de ratos wistar, foram administradas diferentes concentrações de 7-HC (0,001 - 100 µM). Seguindo da administração cumulativa de 7-HC foi possível observar um inotropismo negativo (57,8% ± 11,26; 19,6% ± 19,6; 18,57% ± 18,57; 23,67% ± 23,67; 0% ± 0; 0% ± 0, respectivamente, N=5), com uma redução estatisticamente significativa da força de contração cardíaca, quando comparadas ao controle (100% ± 0,0) a partir da segunda concentração (figura 33).

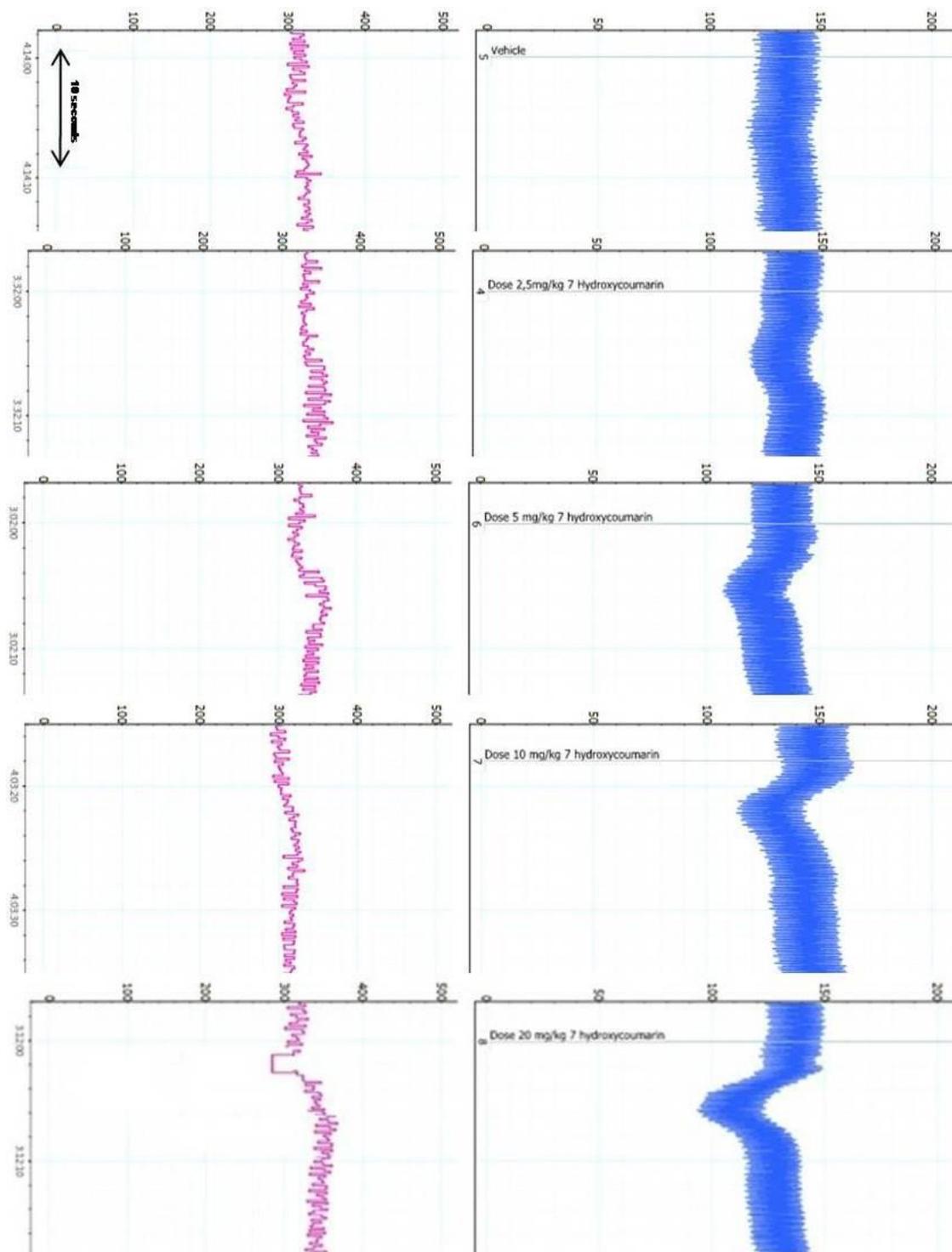


**Figura 33:** Efeito da 7-HC sobre o inotropismo cardíaco em átrios esquerdos isolados de ratos wistar. Gráfico de barras demonstrando a porcentagem de variação de resposta inotrópica cardíaca induzida por 7-HC (0,001 - 100 µM) em ensaios com átrios esquerdos isolados de ratos wistar. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=5). \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

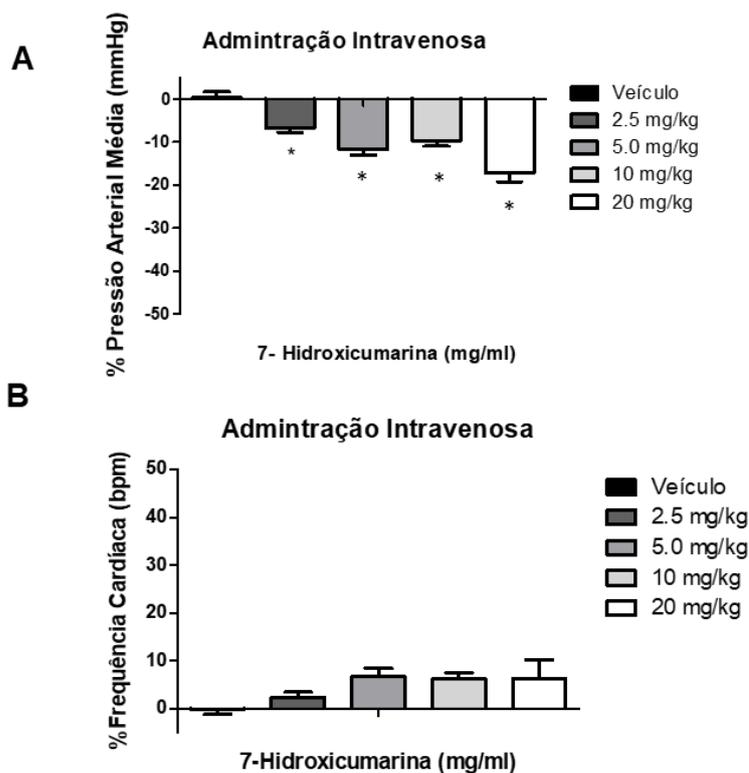
## 5.5 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

### 5.5.1 Efeitos da 7-hidroxicumarina na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca de ratos wistar

Injeções intravenosas em bolus de 7-HC (2,5; 5; 10 e 20mg/kg, i.v.), em ratos wistar não anestesiados, induziram hipotensão (% PAM =  $-6,86 \pm 0,88$ ;  $-11,6 \pm 1,3$ ;  $-9,7 \pm 1,3$ ;  $-17,2 \pm 2,1$  mmHg; n=5) de maneira significativa nas doses administradas de 2,5; 5; 10 e 20mg/kg, respectivamente (figuras 49 e 50). Em relação a frequência cardíaca, esta não foi alterada significativamente quando comparada ao controle (% FC =  $2,3 \pm 1,1$ ;  $6,6 \pm 1,8$ ;  $6,2 \pm 1,3$ ;  $6,2 \pm 3,98$  bpm; n= 5) para as doses de 2,5; 5; 10 e 20mg/kg, respectivamente (figuras 34 e 35).



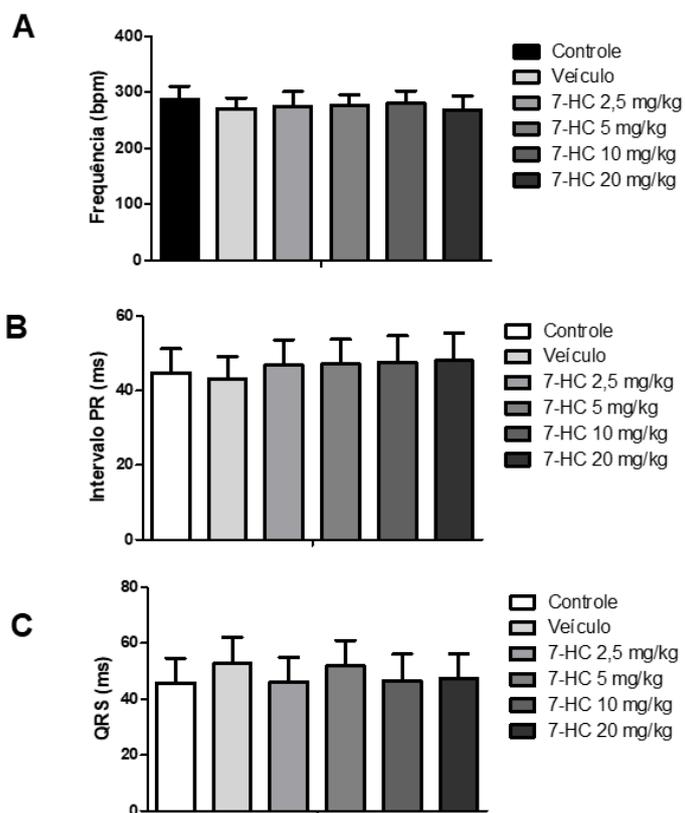
**Figura 34:** Registro original mostrando o efeito da administração intravenosa das doses de 2,5; 5; 10 e 20mg/Kg da 7-HC sobre a pressão arterial e sobre a frequência cardíaca em rato normotenso não anestesiado.



**Figura 35:** Efeito da 7-hidroxicumarina sobre a A) pressão arterial média e B) frequência cardíaca em ensaios *in vivo* utilizando a técnica de medida direta de pressão arterial em ratos wistar. \*  $p < 0,05$  vs veículo.

## 5.6. AVALIAÇÃO DOS REGISTROS ELETROCARDIOGRÁFICOS

A administração intravenosa de 4 diferentes doses de 7-HC não foi capaz de promover alteração eletrocardiográfica em nenhum dos parâmetros avaliados. Com relação à frequência cardíaca as doses de 2,5; 5, 10 e 20mg/kg não promoveram nenhuma alteração significativa (FC=  $275,2 \pm 26,4$ ;  $276,8 \pm 19,5$ ;  $280 \pm 22,9$ ;  $268 \pm 25,6$  bpm) quando comparadas ao veículo e ao controle ( $271,2 \pm 19,3$  e  $287,3 \pm 24,2$  bpm, respectivamente,  $n=6$ ). As doses de 2,5; 5, 10 e 20mg/kg não foram capazes de alterar de maneira significativa o intervalo PR (Intervalo PR=  $46,8 \pm 8,8$ ;  $47,2 \pm 6,6$ ;  $47,5 \pm 7,2$ ;  $48 \pm 7,5$  ms) quando comparadas ao veículo e ao controle ( $46,2 \pm 5,9$  e  $44,8 \pm 6,4$  ms, respectivamente), nem o intervalo QRS (Intervalo QRS=  $46,2 \pm 8,7$ ;  $52 \pm 8,9$ ;  $46,7 \pm 9,4$ ;  $47,5 \pm 8,8$  ms) quando comparadas ao veículo e ao controle ( $52,7 \pm 9,4$  e  $45,8 \pm 8,7$  ms, respectivamente) (Figura 36).



**Figura 366:** Efeito da 7-HC sobre a eletrogênese cardíaca. A) Influência de diferentes doses de 7-HC sobre a frequência cardíaca; B) sobre o intervalo PR e C) sobre o intervalo QRS.

# Discussão

## 6. DISCUSSÃO

Na primeira parte do século XX, uma grande quantidade de drogas eram produtos naturais, e até hoje, os produtos naturais servem como fontes cruciais para novos fármacos e, as cumarinas são compostos químicos encontrados em muitas plantas e exibem uma grande variedade de efeitos biológicos, entre eles atividades do sistema cardiovascular. Neste trabalho, oito cumarinas foram avaliadas quanto ao seu efeito vasodilatador e, dentre estas substâncias, a 7-hidroxicumarina (7-HC) foi selecionada e seus efeitos cardiovasculares foram avaliados empregando-se abordagens *in vivo* e *in vitro*. Nossos resultados sugerem que a 7-HC tem atividade cardíaca direta, tanto no nível celular quanto no tecido isolado, além de induzir efeito vasorelaxante, independente do endotélio, provavelmente envolvendo a ativação de canais de potássio ( $K_v$ ,  $K_{ir}$ ,  $K_{ATP}$  e  $BK_{Ca}$ ), redução do influxo de cálcio e da mobilização de cálcio intracelular. Além disso, a 7-HC reduziu a pressão arterial, sem causar taquicardia e sem alterar os parâmetros elétricos cardíacos, tornando-se uma molécula promissora com atividade cardiovascular.

Inicialmente, como parte dos objetivos, foram realizados ensaios para avaliar o potencial vasodilatador das oito substâncias a fim de selecionar a mais promissora para continuidade aos ensaios para elucidação acerca dos efeitos sobre o sistema cardiovascular e seus possíveis mecanismos de ação.

Investigamos se as cumarinas supracitadas teriam algum efeito sobre o tecido vascular isolado, através de ensaios utilizando artéria mesentérica isolada de ratos wistar pré-contraídas com agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina ( $1\mu\text{M}$ ). Dessa forma, foi possível perceber através da tabela 8 que diferentes cumarinas apresentaram um potencial efeito vasodilatador. Esse ensaio foi realizado pois, sabendo que a elevação da pressão arterial média pode ocorrer como resultado de um aumento do débito cardíaco (DC), um aumento da resistência vascular periférica total (RVPT) ou uma combinação de ambos (MAYET; HUGHES, 2003) a RVPT também tem um importante papel na regulação da pressão e substâncias podem agir sobre esse parâmetro contribuindo para o controle da hipertensão arterial. Em artérias de resistência e arteríolas, a exposição persistente à pressão sanguínea elevada estimula o aumento do tônus muscular para prevenir danos induzidos pela elevação da pressão arterial, num processo

que provavelmente envolve a hipertrofia das células do músculo liso, o remodelamento vascular, mudanças na composição da matriz extracelular e disfunção endotelial (JOSEPH et al., 2013).

A fim de investigar a participação de fatores endoteliais no efeito vasodilatador induzido pelas cumarinas, foram realizados ensaios na ausência e na presença do endotélio funcional. Nestas condições, o efeito vasodilatador de apenas uma das cumarinas estudadas, a 1,2 benzopirona foi reduzido de modo estatisticamente significativo quando comparado aos vasos com endotélio funcional, sugerindo que fatores endoteliais podem participar do mecanismo de ação envolvido no relaxamento induzido pela 1,2 benzopirona. Nas demais cumarinas, não houve alteração significativa após remoção do endotélio sugerindo que, possivelmente essas substâncias parecem não dependem dos fatores derivados do endotélio para induzirem o efeito vasodilatador em artéria mesentérica isolada de rato.

Em nossos ensaios, foi possível observar que as 8 cumarinas promoveram vasodilatação em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos wistar, entretanto a cumarina selecionada para continuidade dos ensaios foi a 7-hidroxycumarina (7-HC), isolada a partir da *Thypha domingensis*, uma vez que além de ter apresentado um promissor efeito vasodilatador e ter sido obtido um bom rendimento, a 7-HC é um metabólito da 1,2 benzopirona, e já foi descrita por apresentar efeitos cardíacos em ensaios de isquemia/reperfusão, induzindo aumento do fluxo coronariano devido a um efeito vasodilatador direto observado nesses vasos e efeito inotrópico positivo em coração de ratos (BACCARD et al., 2000). Dentre as 8 cumarinas deste estudo, duas cumarinas foram descritas por agirem no sistema cardiovascular, a escopoletina e a esculetina. A escopoletina apresentou efeito vasodilatador, ao inibir mobilização de cálcio intracelular em aorta isolada de rato (OLIVEIRA et al., 2001), entretanto, ela foi obtida por síntese que gerou baixo rendimento. Já com relação a esculetina, os estudos descreveram apenas seus efeitos antiproliferativos (PAN et al., 2003). Devido aos efeitos cardíacos e vasculares promissores descritos para a 7-HC, ela foi a cumarina escolhida para a elucidação dos seus mecanismos de ação.

A partir da escolha da 7-HC, foi realizado um ensaio de citotoxicidade para delinear quais concentrações seriam seguras para serem utilizadas.

Conforme demonstrado pelo ensaio de citotoxicidade em cardiomiócitos de ratos, a 7-HC mostrou-se atóxica nas concentrações testadas (25, 50 e 100 $\mu$ M), e levando-se em consideração que a máxima concentração utilizada em nossos ensaios cardíacos foi a de 100 $\mu$ M, demonstra-se que a 7-HC foi segura para ser utilizada em nossos ensaios biológicos sem apresentar alguma cardiotoxicidade. A violeta de genciana, utilizada como controle positivo, como esperado, mostrou alta citotoxicidade no ensaio.

Como foi previamente descrito, a 7-HC apresentou um potencial efeito vasodilatador em artéria mesentérica isolada de rato wistar e os experimentos com intuito de investigar o mecanismo de ação foram realizados em anéis na ausência do endotélio vascular funcional. A princípio, foi realizado um ensaio para avaliar a reversibilidade da contratilidade vascular após a adição cumulativa de 7-HC e, foi observada que a contratilidade tecidual foi mantida, mesmo após remoção da 7-HC da solução de banho tecidual, sugerindo que a 7-HC provavelmente não apresenta ações irreversíveis sobre a maquinaria contrátil ou possíveis efeitos tóxicos sobre o miócito vascular, pelo menos nas concentrações testadas.

Avaliamos o efeito induzido pela 7-HC sobre o tônus vascular basal na presença do endotélio vascular (Figuras 21 e 22). A administração cumulativa da 7-HC em solução contendo artérias sob tônus basal não foi capaz de alterar o nível de contratilidade tecidual. Esse resultado sugere que a 7-HC parece não apresentar atividade vasoconstritora ou vasodilatadora sobre o tônus basal e, para que possa exercer seu efeito vasorrelaxante, é fundamental que a artéria esteja pré-contraída. Mendelsohn (2005) em seu trabalho, trouxe a hipótese de que as anormalidades primárias em proteínas das células musculares lisas vasculares (CMLVs), que regulam o tônus vascular podem causar hipertensão. O tônus vascular elevado, observado na hipertensão humana e em vários modelos experimentais de hipertensão, aponta para alterações na expressão e função de canais de  $Ca^{2+}$  e/ou de  $K^+$  em CMLVs. Várias famílias de canais de  $Ca^{2+}$  e  $K^+$  são expressos em CMLVs e 3 foram relatados por estarem alterados em modelos animais de hipertensão: canais  $Ca^{2+}$  de tipo L ( $Ca_v1.2$ ) (TAJADA et al., 2013), canais de  $K^+$  dependentes de voltagem ( $K_v$ ) (COX, 2002), e os canais

de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de larga condutância ( $BK_{Ca}$ ) (YANG et al., 2013; ZHANG et al., 2018).

Desse modo, os resultados encontrados nesse trabalho são bastante relevantes, levando-se em consideração uma alteração do tônus vascular no estado hipertensivo e, dessa maneira a 7-HC provavelmente apresentaria um efeito mais pronunciado. Para avaliar o efeito da 7-HC em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com agente contracturante, cujo mecanismo de ação difere do induzido por fenilefrina para gerar aumento de tensão, foi avaliado o efeito da 7-HC em preparações pré-contraídas com solução despolarizante de KCl 60 (mM).

O acoplamento eletromecânico é caracterizado pela despolarização do potencial de repouso da membrana. Os canais para cálcio sensíveis a voltagem ( $Ca_v$ ), são ativados pela despolarização das células do músculo liso vascular quando a concentração extracelular de  $K^+$  é aumentada. O complexo cálcio-calmodulina, irá promover a fosforilação da cinase da cadeia leve de miosina e assim, dará início ao ciclo das pontes cruzadas, promovendo a contração (WANG; et al., 2008; Somlyo e Somlyo, 1968), ou seja, o aumento da concentração extracelular de  $K^+$  promove abertura dos canais para cálcio e conseqüentemente contração celular. Em nossos resultados houve uma atenuação significativa do vasorelaxamento induzido por 7-HC em vasos sanguíneos contraídos com KCl 60mM quando comparado ao efeito vasodilatador de 7-HC frente à fenilefrina ( $1\mu M$ ).

Os resultados do nosso estudo sugerem uma provável predileção da 7-HC em promover relaxamento sobre contrações induzidas por acoplamento fármaco-mecânico, em comparação ao acoplamento eletromecânico, além de uma possível participação de canais para  $K^+$  no efeito vasorelaxante induzido pela 7-HC.

Os canais para  $K^+$  têm um papel importante na regulação do tônus vascular, uma vez que é sabido que a ativação dos canais para  $K^+$  promove o relaxamento dos vasos sanguíneos através da hiperpolarização da membrana, levando a uma diminuição da probabilidade de abertura dos canais para cálcio

sensíveis a voltagem, diminuindo dessa maneira os níveis de cálcio intracelulares (TANAKA et al., 2000; WELLMAN, 2006).

Para avaliar a influência dos canais para  $K^+$  na resposta vascular induzida por 7-HC, os anéis mesentéricos foram incubados com uma solução despolarizante de tyrode com KCl 20mM e este procedimento diminui parcialmente o efluxo de  $K^+$  devido ao aumento da concentração extracelular de  $K^+$  de 4mM a 20mM, resultando em uma redução no gradiente eletroquímico (BROCHET; LANGTON, 2006). Essa redução do efluxo de  $K^+$  causa uma atenuação da resposta vasodilatadora induzida por substâncias que promovem abertura de canais para potássio (CLARK; FUCHS, 1997). Em nossos ensaios, ocorreu uma atenuação significativa da resposta vascular de 7-HC frente à solução de tyrode com KCl 20mM, sugerindo que a resposta vasorelaxante da 7-HC parece envolver a participação de canais para  $K^+$ . Entretanto, este protocolo não nos permite afirmar qual o tipo de canal para potássio está envolvido na resposta induzida por 7-HC, uma vez que há vários tipos de canais para potássio no músculo liso vascular. Tipos distintos de canais para  $K^+$  foram identificados no músculo liso vascular: canais para  $K^+$  dependentes de voltagem ( $K_v$ ), canais para  $K^+$  de larga e de intermediária condutância ativados por  $Ca^{2+}$  ( $BK_{Ca}$  e  $IK_{Ca}$ ), canais para  $K^+$  sensíveis a ATP ( $K_{ATP}$ ), canais para  $K^+$  de 2 poros ( $K2P$ ) e canais para  $K^+$  retificadores de entrada ( $K_{ir}$ ) (NELSON & QUAYLE, 1995; STANDEN & QUAYLE, 1998; JACKSON, 2017; DOGAN et al., 2019).

Buscando identificar quais os subtipos de canais para  $K^+$  envolvidos nas respostas vasculares de 7-HC, experimentos foram realizados com bloqueadores para os principais tipos de canais para potássio presentes na musculatura lisa vascular. O primeiro protocolo realizado com esse intuito foi com a pré-incubação dos anéis mesentéricos com a 4-aminopiridina (1mM), um bloqueador dos canais para potássio retificadores retardados ( $K_v$ ) (WANG; et al., 2008), e como mostrado no gráficos 27 e 28, não houve alteração significativa da resposta induzida por 7-HC na presença e na ausência do bloqueador, sugerindo que os  $K_v$  parecem não participar das respostas vasculares induzidas por 7-HC.

Um outro canal avaliado quanto ao seu envolvimento nos efeitos de 7-HC, foi o canal retificador de entrada ( $K_{ir}$ ). Nas preparações pré-incubadas com  $BaCl_2$  ( $30\mu M$ ), um bloqueador dos  $K_{ir}$  (KAWABATA et al., 2004) e com glibenclamida ( $10\mu M$ ), que nesta concentração bloqueia o  $K_{ATP}$  (INSUK et al., 2003), as curvas concentração-respostas da 7-HC foram significativamente deslocadas para a direita, sugerindo que possivelmente os  $K_{ir}$  e  $K_{ATP}$  façam parte do mecanismo de ação referente ao efeito vascular de 7-HC.

A incubação dos anéis mesentéricos com TEA (1mM), conhecido por ser um bloqueador não seletivo dos  $BK_{Ca}$  (BRAYDEN, 1996) provocou uma atenuação significativa da resposta de 7-HC, bem como um deslocamento da curva concentração-resposta para a direita e, para confirmar o envolvimento desses canais nos efeitos vasorelaxantes da 7-HC, experimentos com um bloqueador seletivo foi então utilizado. Na presença de iberiotoxina (50nM), bloqueador seletivo para  $BK_{Ca}$  (FRIEDEN; SOLINNI; BENY, 1999), a administração cumulativa de 7-HC apresentou uma resposta vasorelaxante significativamente atenuada e a curva concentração-resposta também deslocada para a direita. Dessa maneira, sugerimos um forte envolvimento dos  $BK_{Ca}$  nos efeitos vasculares induzidos pela 7-HC.

Como supracitado, o vasorelaxamento independente do endotélio vascular pode ocorrer através de uma via de sinalização celular envolvendo a ativação de canais para  $K^+$  diretamente no músculo liso vascular. Os canais para  $K^+$  são importantes para a manutenção da pressão sanguínea e do tônus vascular, estado contrátil das células musculares lisas vasculares (LEDOUX et al., 2006). A abertura dos canais de  $K^+$  em resposta a estímulos endógenos ou agentes farmacológicos resulta em efluxo de  $K^+$  a partir de CMLVs, levando a uma hiperpolarização da membrana plasmática e fechamento de canais de  $Ca^{2+}$ , levando à diminuição dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelulares e, eventualmente, a vasodilatação. Em contrapartida, o fechamento de canais de  $K^+$  despolariza a membrana plasmática, o que resulta na abertura de mais canais de  $Ca^{2+}$ , e leva a um aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelulares e uma consequente vasoconstrição (COX; RUSCH, 2002). Em conjunto, nossos resultados sugerem o envolvimento de canais para  $K^+$  nos efeitos de 7-HC, que provavelmente age promovendo a abertura dos canais para  $K^+$  levando à vasodilatação.

Como descrito anteriormente, o tônus vascular induzido por um aumento da concentração extracelular de  $K^+$  ocorre devido à abertura de canais para cálcio sensíveis à voltagem e, levando-se em consideração que embora de forma atenuada, a 7-HC conseguiu reverter a contração induzida por KCl 60mM, há a possibilidade de 7-HC interferir no influxo de cálcio para CMLV. Com base nesse resultado, um protocolo foi realizado para verificar a influência da 7-HC no influxo de cálcio e verificar se esta seria mais uma via de ação dessa cumarina. Dessa maneira, o efeito de 7-HC foi investigado sobre contrações induzidas por  $CaCl_2$ , em meio despolarizante nominalmente sem cálcio. Sob essas condições foi possível observar nos gráficos 35-38 que apenas na concentração de  $100\mu M$  ( $10^{-4}M$ ), 7-HC atenuou significativamente as contrações induzidas por  $CaCl_2$ . É possível que essa resposta possa ser resultado de um efluxo de  $K^+$  a partir de CMLVs causado pela ativação dos canais para  $K^+$ , o que levaria a uma hiperpolarização da membrana plasmática e fechamento de canais de  $Ca^{2+}$ , sugerindo que preferencialmente a 7-HC leva ao efluxo de  $K^+$  e em maiores concentrações pode, de forma não específica, reduzir o influxo de  $Ca^{2+}$ .

Tomados juntos, esses resultados sugerem que o efeito vasodilatador induzido por 7-HC também pode envolver o bloqueio dos canais  $Ca_v$ , resultando em uma diminuição no influxo de  $Ca^{2+}$  no músculo liso da artéria mesentérica superior de rato, levando ao relaxamento vascular. Possivelmente, a 7-HC ativa os  $K_v$ ,  $K_{ATP}$ ,  $BK_{Ca}$  e dos  $K_{ir}$ , induzindo uma hiperpolarização na célula muscular lisa vascular, dificultando a abertura dos canais para cálcio sensíveis à voltagem ( $CaV$ ) e conseqüentemente a entrada de cálcio na célula.

O retículo sarcoplasmático da maioria das células possui dois principais tipos de canais de liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular: os receptores de rianodina (RyRs) e os receptores 1,4,5-trifosfato de inositol ( $IP_3Rs$ ) (Go et al. 1995). Evidências demonstram que esses dois canais evoluíram de um ancestral comum canal devido ao fato de existir 40% de homologia entre RyR e  $IP_3R$  nas regiões transmembranares putativas, porém, embora eles apresentem estruturas semelhantes, estes dois canais possuem perfis fisiológicos e farmacológicos distintos.

Foram identificadas 3 isoformas dos RyRs (RyR1, RyR2 e RyR3) que são expressas em CMLVs (ESSIN; GOLLASCH, 2009), embora RyR2 e RyR3 sejam as isoformas mais predominantes (VAITHIANATHAN et al., 2010; WESTCOTT

et al., 2012). RYR normalmente encontra-se fechado sob baixas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (100–200 nM); na concentração submicromolar de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, o cálcio liga-se ao sítio de ligação de alta afinidade no RyR, aumentando a probabilidade de abertura do canal. A atividade do canal é máxima quando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico atinge 10  $\mu\text{M}$ , enquanto aumentos na concentração para além desse ponto, levam a uma redução na probabilidade de abertura do canal (BEZPROZVANNY et al., 1993).

Os canais  $\text{IP}_3\text{R}$  são formados por homo- ou heterotetrâmeros compostos de quatro subunidades. Três formas de  $\text{IP}_3\text{Rs}$  (tipos 1, 2 e 3) foram descritas (Nakagawa et al. 1991) e praticamente todos os tipos de células possuem, pelo menos, uma forma de  $\text{IP}_3\text{R}$ , enquanto muitas outras células expressam os três tipos. Nas CMLVs, a isoforma  $\text{IP}_3\text{R1}$  é a mais predominante (NARAYANAN; ADEBIYI; JAGGAR, 2012). O segundo mensageiro 1,4,5-trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) é conhecido por ativar os  $\text{IP}_3\text{Rs}$  (MARKS et al., 1990) de forma reversível, uma vez que, se o  $\text{IP}_3$  for retirado do meio o  $\text{IP}_3\text{Rs}$  se fecha, e quando o  $\text{IP}_3$  é novamente adicionado ao meio, o canal é reativado (BEZPROZVANNY et al., 1991).

Para avaliar se 7-HC influencia na mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  por RYR e  $\text{IP}_3\text{R}$  foram realizados 2 protocolos experimentais descritos por Sakata e Karaki, 1991, utilizando fenilefrina e cafeína para avaliar a influência de  $\text{IP}_3\text{R}$  e RYR, respectivamente, com o propósito de avaliar os efeitos de 7-HC sobre a liberação de cálcio dos estoques intracelulares de cálcio do retículo sarcoplasmático sensíveis a cafeína e fenilefrina. Nestes experimentos, 7-HC foi capaz de reduzir a liberação de cálcio intracelular de maneira independente da concentração, uma vez que as contrações promovidas pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares sensíveis a cafeína e fenilefrina foram inibidas por 7-HC. Estes resultados sugerem que 7-HC provavelmente reduz a concentração de cálcio no meio citosólico ao reduzir a saída de cálcio do retículo sarcoplasmático. Juntamente com a ativação dos canais para potássio  $\text{K}_v$ ,  $\text{K}_{\text{ATP}}$ ,  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  e  $\text{K}_{\text{ir}}$ , a redução da mobilização de cálcio intracelular, parece fazer parte dos mecanismos de vasorelaxamento induzidos pela 7-HC.

A pressão sanguínea é determinada por dois parâmetros físicos importantes, o débito cardíaco (DC) e da resistência vascular periférica total

(RVPT) (FIRTH et al., 2007). A regulação da pressão arterial é multifatorial e envolve vários sistemas de órgãos (SVENNINGSEN et al., 2014), incluindo vasos, coração, glândulas supra-renais, rins e sistema nervoso autônomo e central. Estes órgãos/sistemas modulam os principais determinantes da pressão arterial, como o DC, o volume de fluidos e a RPVT, assegurando um fluxo adequado de sangue para vários órgãos no corpo e quando prejudicada, essa regulação pode levar à hipertensão (COWLEY-JÚNIOR, 2006). Dessa maneira, tão importante quanto avaliar o efeito da 7-HC sobre os vasos sanguíneos e seus mecanismos de funcionamento é identificar as possíveis ações dessa substância sobre o coração.

Inicialmente, realizamos ensaios para investigar os efeitos de 7-HC em células cardíacas isoladas de animais wistar e 7-HC apresentou efeito sobre a contratilidade celular provocando redução significativa da contração, sem alterar o tamanho basal da célula e reduzindo de forma significativa o tempo do pico de contração nas 3 concentrações utilizadas (1, 10 e 100 $\mu$ M), ou seja, 7-HC fez com que o tempo necessário para atingir o pico de contração fosse menor, refletindo dessa maneira, uma alteração da sua capacidade contrátil.

Alterações na morfologia celular, podem refletir alteração no tamanho do músculo cardíaco e no volume das câmaras ventriculares (QUINTÃO-JÚNIOR; et al., 2012). Nossos dados demonstram que em nenhuma concentração houve alteração do tamanho basal da célula, sugerindo que 7HC não esteja influenciando na contratilidade basal do cardiomiócito.

A velocidade de contração nos cardiomiócitos está relacionada à liberação de cálcio dos estoques do retículo para o citoplasma (através dos receptores de Rianodina) (BERS, 2008), também devido à capacidade da miosina ATPase hidrolisar ATP (BERS, 2002) e a taxa de hidrólise do ATP regula a taxa de formação de pontes cruzadas (BERS, 2008). Dessa maneira, a redução da velocidade de contração pode ser justificada pela inibição da liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, entretanto experimentos futuros poderão elucidar melhor esse mecanismo.

Observando os resultados de 7-HC em reduzir a contratilidade em cardiomiócitos, ensaios foram realizados em átrios com o objetivo de avaliar se

os efeitos celulares induzidos por 7-HC eram representativos na função tecidual cardíaca isolada.

A automaticidade cardíaca é decorrente da atividade conjunta de correntes iônicas dependentes de voltagem (VERHEIJCK et al., 1999; MANGONI et al., 2012), transportadores (NCX), e liberação de cálcio através do retículo sarcoplasmático (LAKATTA; MALTSEV; VINOGRADOVA, 2010). Dada a complexidade dos processos celulares envolvidos na atividade rítmica, uma quantificação exata dos mecanismos que contribuem para a função de marca-passo é ainda objeto de debate (DIFRANCESCO, 2010). Em nossos ensaios com átrios direitos isolados de ratos wistar, tecidos estes que apresentam o nó sinoatrial, 7-HC não foi capaz de alterar a automaticidade cardíaca e esse resultado sugere que a 7-HC parece não ter influências sobre as células de marca-passo cardíaco. Estes dados corroboram de certa forma com os dados obtidos nos ensaios eletrocardiográficos, que também não demonstraram nenhuma alteração elétrica cardíaca induzida por 7-HC.

Por outro lado, a contração cardíaca é iniciada através da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, por meio dos canais de rianodina, num mecanismo conhecido como liberação de cálcio induzida por cálcio (LCIC) (FABIATO, 1983) e o aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular induz então, o deslizamento dos miofilamentos (REUTER et al., 2005). A configuração do potencial de ação cardíaco depende da condutância de diferentes canais iônicos que são diretamente dependentes de  $Ca^{2+}$ , ou indiretamente são regulados por ele (BÖGEHOLZ et al., 2012). Em átrios esquerdos isolados de ratos wistar, 7-HC apresentou efeitos inotrópicos negativos, ao reduzir de forma significativa a força de contração cardíaca nas concentrações de  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-6}$  M e abolindo completamente a contração nas concentrações de  $10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M, quando comparadas ao controle. Esses resultados corroboram com os nossos dados obtidos em cardiomiócitos, onde foi possível observar uma redução significativa da contratilidade das células, entretanto os mecanismos pelos quais a 7-HC conseguiu promover essa redução da contratilidade e o inotropismo negativo ainda serão investigados.

Ensaio subsequentes foram realizados para avaliar o potencial de ação cardiovascular deste composto natural. O primeiro dele teve como objetivo avaliar os efeitos desta cumarina sobre os parâmetros cardiovasculares como a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ensaios *in vivo* com ratos wistar não anestesiados. As principais constatações nestes experimentos foram a atividade hipotensora induzida pela 7-HC sem apresentar taquicardia.

O efeito hipotensor causado por pela 7-HC pode ser devido à diminuição da resistência vascular periférica, como foi demonstrado anteriormente nos experimentos *in vitro* através da avaliação do potencial efeito vasodilatador da 7-HC, e a ausência da taquicardia reflexa possivelmente é resultado de um efeito cardíaco direto promovido pela 7-HC. A avaliação do efeito da administração aguda de 7-HC sobre a PAM e FC de ratos wistar foi realizada em animais não anestesiados, uma vez que a anestesia altera de forma considerável os parâmetros cardiovasculares (PICOLLO et al., 2012).

Até o presente momento os achados sistêmicos e cardíacos deste trabalho demonstraram que 7-HC possui efeito hipotensor, não associado a uma taquicardia e apresenta atividade cardíaca direta, reduzindo a contratilidade em tecido cardíaco isolado bem como em cardiomiócitos isolados, o que justifica pelo menos em parte o seu efeito hipotensor observado no ensaio *in vivo*. Entretanto, 7-HC não foi capaz de alterar a ritmicidade cardíaca, demonstrando possivelmente não agir sobre o nó sinoatrial e esse resultado corrobora com os dados obtidos no ECG, que serão discutidos abaixo.

Ainda fazendo parte dos ensaios *in vivo*, foram realizados registros eletrocardiográficos. O Eletrocardiograma (ECG) tem como objetivo registrar a atividade elétrica cardíaca na superfície do tórax (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2003). O ECG normal de rato é semelhante ao do homem em detalhes essenciais. Embora as deflexões P, Q, R, S e T sejam bem vistas, no rato não há a presença do segmento ST e a onda T eleva-se continuamente em direção a onda S (SAMBHI, 1959). O ECG permite que sejam detectadas alterações no tempo e na intensidade das ondas elétricas cardíacas e ainda identificar lesões no miocárdio (NOLTE; MCKEE, 2004) e ele é uma importante ferramenta de análise pois mudanças nas ondas do ECG são ocasionadas por mudanças na propagação do potencial de ação que podem refletir alterações

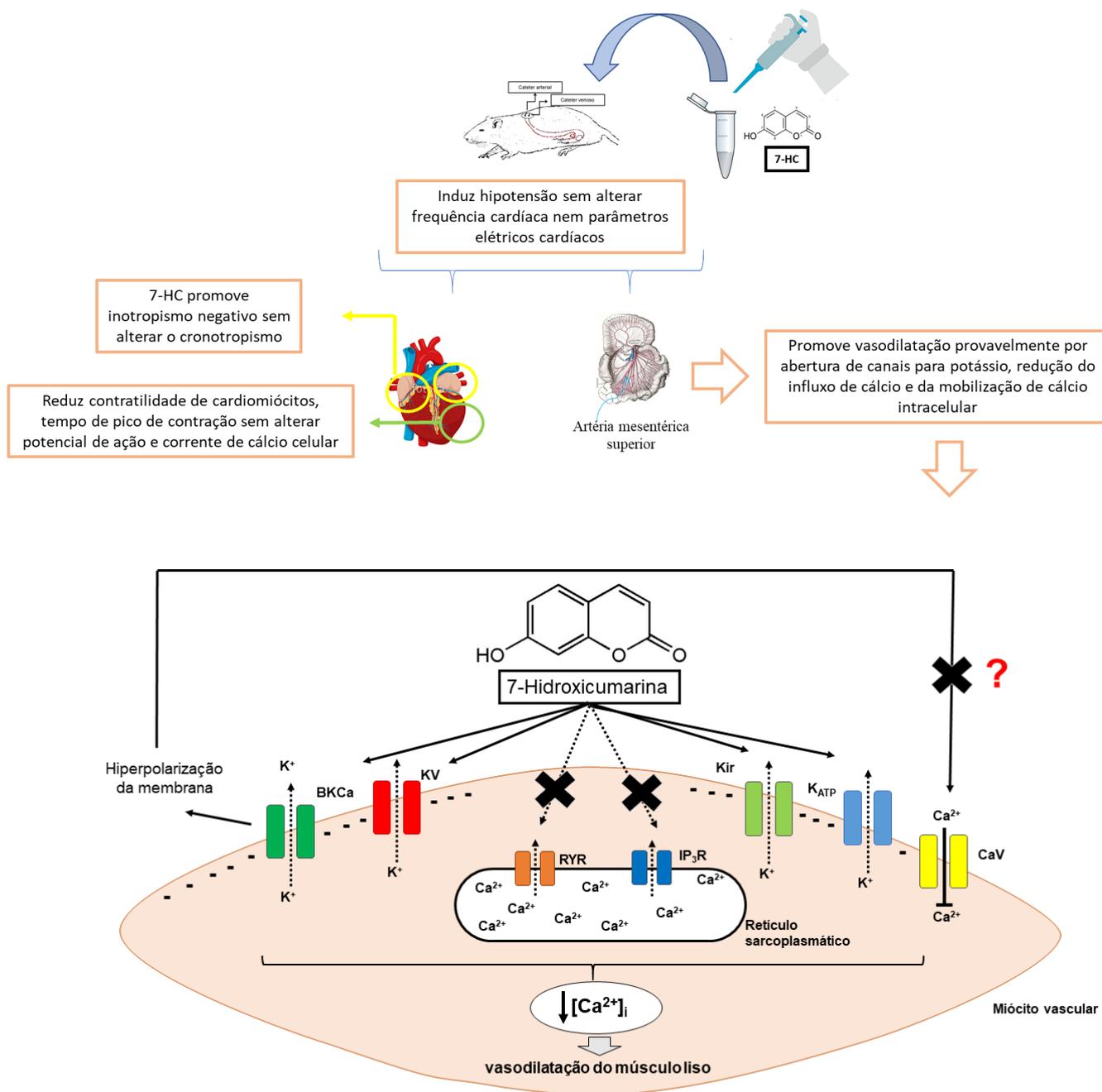
funcionais do músculo cardíaco (ARNOLDS et al., 2011; SCHWARZ, 2009). Em nossos resultados, a administração intravenosa de 4 doses de 7-HC (2,5; 5, 10 e 20mg/kg) não foi capaz de alterar de forma significativa nenhum dos parâmetros avaliados no ECG, sugerindo que a 7-HC não interfere na atividade elétrica cardíaca e, que nestas doses, possivelmente, não causa lesão ao músculo.

A 7- Hidroxicumarina mostra-se uma substância promissora uma vez que tem atividade cardíaca, tanto no nível celular quanto no tecido isolado, é também capaz de induzir efeito vasorelaxante, independente do endotélio, provavelmente envolvendo canais de potássio ( $K_{ir}$ ,  $K_{ATP}$  e  $BK_{Ca}$ ), redução da mobilização de cálcio intracelular e influxo de cálcio, além de reduzir a pressão arterial, sem alterar os parâmetros elétricos cardíacos (figura 37). Baseado nos dados apresentados e discutidos neste estudo, evidencia-se o potencial da 7-Hidroxicumarina para desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças cardiovasculares.

# Conclusões

## 7. CONCLUSÕES

- 1) As 8 cumarinas promoveram vasorelaxamento em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos wistar, entretanto a cumarina selecionada para continuidade dos ensaios foi a 7-Hidroxycumarina (7-HC);
- 2) Canais de potássio parecem ser ativados por 7-HC em anéis de artéria mesentérica, em particular o  $K_V$ ,  $BK_{Ca}$ ,  $K_{ATP}$  e  $K_{ir}$ , levando a vasodilatação
- 3) O efeito vasodilatador induzido por 7-HC também pode ser devido a uma possível influência da cumarina sobre a mobilização do cálcio dos estoques intracelulares, resultando em uma diminuição na saída de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático em artéria mesentérica superior de rato. 7-HC tem ação cardíaca direta sendo capaz de reduzir a força e velocidade de contração tanto em cardiomiócitos quanto no tecido atrial isolado, sem envolver modificações na eletrogênese cardíaca;
- 4) 7-HC apresenta ação hipotensora em ratos wistar, não anestesiados.



**Figura 37:** Representação esquemática dos efeitos cardiovasculares induzidos pela 7-HC e provável via de sinalização da resposta vasorelaxante induzida pela 7-HC em artéria mesentérica superior de ratos wistar. 1) Ativação de canais K<sub>V</sub>, K<sub>ATP</sub>, BK<sub>Ca</sub> e K<sub>ir</sub>; 2) Redução da mobilização de cálcio intracelular por mecanismos sensíveis a cafeína e fenilefrina; 3) Inibição do influxo de cálcio, provavelmente por conta da hiperpolarização induzida pela abertura dos canais para K<sup>+</sup>. Ca<sup>2+</sup>: Cálcio; K<sup>+</sup>: Potássio; BK<sub>Ca</sub>: Canais para potássio sensíveis a cálcio; CaV: Canais para cálcio sensíveis a voltagem; IP<sub>3</sub>R: Receptor de trifosfato de inositol; RYR: receptor de rianodina; K<sub>ir</sub>: Canais para potássio retificadores de entrada.

# Perspectivas

## 8. PERSPECTIVAS

1. Avaliar se a 7-HC apresenta influência sobre transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em miócitos recém dispersos de artéria mesentérica, bem como ações diretas sobre canais iônicos, através de ensaios utilizando microscopia confocal e registros eletrofisiológicos, respectivamente
2. Realizar a análise de similaridade morfológica entre a 7-HC e os canais para potássio utilizando técnicas de medida de similaridade química através de parâmetros do software SURFLAX-SIM.

# Referências

## 9. REFERÊNCIAS

- ARNOLDS, D.E. *et al.* The emerging genetic landscape underlying cardiac conduction system function. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 91, p. 578-585, 2011.
- BACCARD, N. *et al.* Effects of 7-hydroxycoumarin (umbelliferone) on isolated perfused and ischemic-reperfused rat heart. **Arzneimittelforschung**, v. 50, n. 10, 2000.
- BAO, L. *et al.* Mapping the BK<sub>Ca</sub> Channel's "Ca<sup>2+</sup> Bowl": Side-Chains Essential for Ca<sup>2+</sup> Sensing. **Journal of General Physiology**, v. 123, p. 475–489, 2004.
- BARTON, M.; HAUDENSCHILD, C. Endothelium and atherogenesis: endothelial therapy revisited. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 38, (Suppl. 2): S23–S25, 2001.
- BARTON, M.; BARETELLA, O.; MEYER, M.R. Obesity and risk of vascular disease: importance of endothelium-dependent vasoconstriction. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 3, p. 591–602, 2012.
- BAYLISS, W.N. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. **The Journal of Physiology**, v. 28, p. 220–231, 1902.
- BECKER, B.F. *et al.* Endothelial function and hemostasis. **Zeitschrift für Kardiologie**, v.89, n. 3, p. 160-167, 2000.
- BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v.415, n. 6868, p. 2002.
- BERS, D.M. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annual Review of Physiology**, v.70, p. 23-49, 2008.
- BEZPROZVANNY, I.; WATRAS, J.; EHRLICH, B.E. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5) P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. **Nature**, v. 351, p. 751-754, 1991.
- BEZPROZVANNY, I.B. *et al.* Activation of the calcium release channel (ryanodine receptor) by heparin and other polyanions is calcium dependent. **Molecular Biology Cell**, v.4, p.347–352, 1993.
- BITTNER, S. *et al.* From the Background to the Spotlight: TASK Channels in Pathological Conditions. **Brain Pathology**, v. 20, p. 999–1009, 2010.
- BÖGEHOLZ, N. *et al.* The physiology of cardiac calcium handling. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v.162, p. 278-282, 2012.
- BRAYDEN, J.E. Potassium channels in vascular smooth muscle. **Clinical Experimental Pharmacology Physiology**, v.23, p. 1069 – 1076, 1996.

BROCHET, D.X.P.; LANGTON, P.D. Dual effect of initial [K] on vascular tone in rat mesenteric arteries, **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v.453, n. 1, p. 33–41, 2006.

BUCKHEIT, R.W. *et al.* Comparative anti-HIV evaluation of diverse HIV-1-specific reverse transcriptase inhibitor-resistant virus isolates demonstrates the existence of distinct phenotypic subgroups. **Antiviral Research**, v. 26, p. 117-132, 1995.

BUCKINGHAM, S.D. *et al.* Structure and function of two-pore-domain K<sup>+</sup> channels: contributions from genetic model organisms. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 7, p.361–367, 2005.

CALIXTO, J.B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.91, n.3, 2019.

CARLSTRÖM, M.; WILCOX, C.S.; Arendshorst, W.J. Renal autoregulation in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 95, p.405–511, 2015.

CHANG, H.M.; BUT, P.H. Pharmacology and Application of Chinese Materia Medica. **World Scientific Publishing**, p.896, 1986.

CHEN, Y.F.; TSAI, H.Y.; WU, T.S. Antiinflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. **Planta Medica**, v.61, p. 2-8, 1995.

CHRISOBOLIS, S. *et al.* Role of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in K<sup>+</sup>-induced cerebral vasodilatation *in vivo*. **American Journal of Physiology**, v. 279, p.H2704–H2712, 2000.

CHRISOBOLIS, S; SOBEY, C.G. Inwardly rectifying potassium channels in the regulation of vascular tone. **Current drug targets**, v. 4, n. 4, p. 281-289, 2003.

CLARK, S.G.; FUCHS, L.C. Role of nitric oxide and Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, v.282, n.3, p.1473-1479, 1997.

COLLIER, M.L.; WANG, Y-X; KOTIKOFF, M.I. Calcium-Induced Calcium Release in Smooth Muscle: Loose Coupling between the Action Potential and Calcium Release. **Journal of General Physiology**, v.115, n.5, p. 653-662, 2000.

COX, R.H.; RUSCH, N.J. New expression profiles of voltage-gated ion channels in arteries exposed to high blood pressure. **Microcirculation**, v.9, p.243-257, 2002.

COWLEY-JÚNIOR, A.W. The genetic dissection of essential hypertension. **Nature Reviews Genetics**, v.7, p. 829-840, 2006.

CZELUSNIAK, K.E. *et al.* Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania*

*laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.14, n.2, 2012.

D'AMBROSIO, R.R; GORDON, D.S.; WINN, H.R. Differential role of  $K_{ir}$  channel and  $Na^+/K^+$ -pump in the regulation of extracellular  $K^+$  in rat hippocampus. **Journal of Neurophysiology**, v.87, p.87-102, 2002.

DIFRANCESCO, D. The Role of the Funny Current in Pacemaker Activity. **Circulation Research**, v.106, p.434-446, 2010.

DOGAN, M.F. *et al.* Potassium Channels in Vascular Smooth Muscle: A Pathophysiological and Pharmacological Perspective. **Fundamental and clinical Pharmacology**, v. 33, n.5, 2019.

ENYEDI, P.; CZIRJAK, G. Molecular background of leak  $K^+$  currents: two-pore domain potassium channels. **Physiology Reviews**, v. 90, n.2, p.559–605, 2010.

ESSIN, K.; GOLLASCH, M. Role of ryanodine receptor subtypes in initiation and formation of calcium sparks in arterial smooth muscle: comparison with striated muscle. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v.2009, 2009.

FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. **American Journal of Physiology- Cell Physiology**, v.245, n.1, p.1-14, 1983.

FÉLÉTOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? **British Journal of Pharmacology**, v.156, n.4, p. 545-562, 2009.

FRIEDEN, N.; SOLLINI, M. BÉNY, J.-L. Substance P and bradykinin activate different types of  $KCa$  currents to hyperpolarize cultured porcine coronary artery endothelial cells. **Journal of Physiology**, v.519, n.2, p.361-371, 1999.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

FYLAKTAKIDOU, K.C. *et al.* Natural and Synthetic Coumarin Derivatives with Anti-Inflammatory/ Antioxidant Activities. **Current Pharmaceutical Design**, v.10, p.3813-3833, 2004.

FURCHGOTT, R.F. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. **Bioscience Reports**, v. 19, n.4, p.235-51, 1999.

GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R. Physiology of the endothelium. **British Journal of Anaesthesia**, v.93, n.1, p.105-13, 2004.

GHATTA, S. *et al.* Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. **Pharmacology & therapeutics**, v. 110, n. 1, p. 103-116, 2006.

GHISDAL, P.; MOREL, N. Cellular target of voltage and calcium-dependent K<sup>+</sup> channel blockers involved in EDHF-mediated responses in rat superior mesenteric artery. **British journal of pharmacology**, v. 134, n. 5, p. 1021-1028, 2001.

GO, L.O. *et al.* Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. **Journal of Clinical Investigation**, v.95, p.888–894, 1995.

GODO, S.; SHIMOKAWA, H. Endothelial Functions. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 37, n. 9, p. e108–e114, 2017.

GOONETILLEKE, L.; QUAYLE, J. TREK-1 K<sup>+</sup> Channels in the Cardiovascular System: Their Significance and Potential as a Therapeutic Target. **Cardiovascular Therapy**, 2012, 30, 23–29

GRYGLEWSKI, R.J., Prostacyclin among prostanoids. **Pharmacological Reports**, v. 86, n.2, p.212-5, 2009.

GUADAGNIN, V. *et al.* Influência do estresse oxidativo sobre a regulação do tônus vascular e a eficácia das terapias antioxidantes. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.12, n.1, p.82-89, 2015.

GUÉGUINOU, M. *et al.* K<sub>Ca</sub> and Ca<sup>2+</sup> channels: The complex thought. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1843, n.10, p.2322-2333, 2014.

HE, J. *et al.* Imperatorin induces vasodilatation possibly via inhibiting voltage dependent calcium channel and receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> influx and release. **European Journal of Pharmacology**, v. 573, p. 170-175, 2007.

HIBINO, H. *et al.* Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. **Physiological Reviews** v. 90, n.1, p.291–366, 2010.

HOTWANI, K.; BALIGA, S.; SHARMA, K. Phytodentistry: use of medicinal plants. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, 2014.

HOULT, J.R.S.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. **General pharmacology: The Vascular System**, v.27, p.713-722, 1996.

HUGHES, A.D. Calcium channels in vascular smooth muscle cells. **Journal of Vascular Research**, v.35, p.353–370, 1995.

IGNARRO, L.J. *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.84, n.24, p. 9265-9, 1987.

INOUE, R. *et al.* Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. **Circulation Research**, v.99, p.119 - 131, 2006.

INSUK, S.O. *et al.* Molecular basis and characteristics of KATP channel in human corporal smooth muscle cells. **International Journal of Impotence Research**, v.15, p. 258–266, 2003.

JACKSON, W.F. Ion channel and vascular tonus. **Hypertension**, v.35, p.173-178, 2000.

JACKSON, W.F. Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. **Advances in Pharmacology**, v.78, p.89-144, 2017.

JACKSON, W.F. KV channels and the regulation of vascular smooth muscle tone. **Microcirculation**, v.25, 2018.

JIN, B.E. *et al.* A simple device to illustrate the Einthoven triangle. **Advances in Physiology Education**, v.36, p.4, p. 319-324, 2012.

JOSEPH, B. K. *et al.* Ion channel remodeling in vascular smooth muscle during hypertension: Implications for novel therapeutic approaches. **Pharmacological Research**, v. 70, n. 1, p. 126–138, 2013.

KAWABATA, A. *et al.* Distinct roles for protease-activated receptors 1 and 2 in vasomotor modulation in rat superior mesenteric artery. **Cardiovascular Research**, v.61, 683 - 692, 2004.

KEARNEY, P.M. *et al.* Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, p. 217-223, 2005.

KNOT, H.J., ZIMMERMANN, P.A. AND NELSON, M.T. Extracellular K<sup>+</sup> -induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K<sup>+</sup> channels. **The Journal of Physiology**, v.492, p.419–430, 1996.

KUANG, Q.; PURHONEN, P.; HEBERT, H. Structure of potassium channels. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.72, p.3677-3693, 2015.

KO, E.A. *et al.* Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. **Journal of Smooth Muscle Research**, v.44, n.2, p. 65-81, 2008.

KO, F.N. *et al.* Inhibition of platelet thromboxane formation and phosphoinositides breakdown by osthole from *Angelica pubescens*. **Thrombosis and Haemostasis**, v.62, p.996- 999, 1989.

KO, F.N. *et al.* Vasorelaxation of rat thoracic aorta caused by osthole isolated from *Angelica pubescens*. **European Journal of Pharmacology**, v.219, p. 29-34, 1992.

KOSUGE, T. *et al.* Studies on bioactive substances in crude drugs used for arthritic diseases in traditional chinese medicine - 2- Isolation and identification of antiinflammatory and analgesic principle from the root of *Angelica pubescens* Maxim. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.33, p. 5351-5354, 1985.

KUO, M.M. *et al.* Prokaryotic K<sup>+</sup> channels: from crystal structures to diversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n.5, p. 961-985, 2005.

LAKATTA, E.G.; MALTSEV, V.A.; VINOGRADOVA, T.M. A Coupled SYSTEM of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Clocks and Surface Membrane Voltage Clocks Controls the Timekeeping Mechanism of the Heart's Pacemaker. **Circulation Research**, v.106, p.659-673, 2010.

LEDOUX, J. *et al.* Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology (Bethesda)**, v.21, p.69 - 78,2006.

LEMMICH, J.; HAVELUND, S.; THASTRUP, O. Dihydrofurocoumarin glucosides from *Angelica archangelica* and *Angelica silvestris*. **Phytochemistry**, v.22, p.553-555, 1983.

LI, H.; YAO, Y.; LI, L. Coumarins as potential antidiabetic agents. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.10, p.1253-1264, 2017.

LI, Y. *et al.* Osthole attenuates pulmonary arterial hypertension in monocrotaline-treated rats. **Molecular Medicine Reports**, v.16, n.3, p.2823-2829, 2017.

LIM, S.S. *et al.* A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v.380, p. 2224-2260, 2012.

LOUTZENHISER, R.; BIDANI, A.; CHILTON, L. Renal myogenic response: kinetic attributes and physiological role. **Circulation Research**, v. 90, p.1316–1324, 2002.

MALTA, D.C. *et al.* **Doenças crônicas não-transmissíveis: mortalidade e fatores de risco no Brasil, 1990 a 2006 in Saúde Brasil 2008**. Ministério da Saúde, Brasília, 2009. p. 337–362

MANCIA, G. *et al.* ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **European Heart Journal**, v. 34, p. 2159-2219, 2013.

MARKS, A.R. *et al.* Smooth muscle and brain inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are structurally and functionally similar. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p.20719–20722, 1990.

MAYET, J.; HUGHES, A. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. **Heart**, v.89, n.9, p.1104-1109, 2003.

MAYLIE J. *et al.* Small Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels and Calmodulin. **Journal of Physiology**, v. 554, 255–261, 2004.

MCKEE, T.C. *et al.* New pyranocoumarins isolated from *Calophyllum lanigerum* and *Calophyllum teysmannii*. **Journal of Natural Products**, v.59, p.754-758, 1996.

MEIRA, C.S. *et al.* In vitro and in vivo antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine** (Stuttgart), v. 22, p. 969-974, 2015.

MENDELSON, M.E. In hypertension, the kidney is not always the heart of the matter. **The Journal of Clinical Investigation**, v.115, n.4, p.840-844, 2005.

MURRAY, R.D.H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, R.A. The Natural Coumarins. **John Wiley and Sons**, New York, 1982

MURRAY R.D.H. **Coumarins**. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, v.58, p.84-316. Springer-Verlag, New York, 1991.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19 1 million participants. **Lancet**, v.389, p. 37-55, 2017.

NAKAGAWA, T. *et al.* The subtypes of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are expressed in a tissue-specific and developmentally specific manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 6244–6248, 1991.

NAKASHIMA, M.; VANHOUTTE, P.M. Isoproterenol causes hyperpolarization through opening of ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle of the canine saphenous vein. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 272, p. 379–384, 1995.

NARAYANAN, D.; ADEBIYI, A.; JAGGAR, J.H. Inositol trisphosphate receptors in smooth muscle cells. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v.302, p.H2190- H210, 2012.

NELSON, M.T. *et al.* Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K<sup>+</sup> channels. **Nature**, v.344, p. 770– 773, 1990.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 37, n. 4, p. C799, 1995.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v.66, n.7, p. 1022–1037, 2003.

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

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v.79, n.3, p. 629-661, 2016.

NOLTE, E.; MCKEE, M. Does healthcare save lives? Avoidable mortality revised. London: **Nuffield Trust**, p.139, 2004.

NOMA, A. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. **Nature**, v. 305, p.147–148, 1983.

OLIVEIRA, E.J. *et al.* Intracellular calcium mobilization as a target for the spasmolytic action of scopoletin. **Planta Médica**, v.67, n.7, 2001.

ONUSKO, E. Diagnosing secondary hypertension. **American Family Physician**, v. 67, p.67-73, 2003.

OPARIL, S.; SCHMIEDER, R.E. New approaches in the treatment of hypertension. **Circulation Research**, v. 116, p.1074-1095, 2015.

PAN, S.L. *et al.* Esculetin inhibits Ras-mediated cell proliferation and attenuates vascular restenosis following angioplasty in rats. **Biochemical Pharmacology**, v.65, n.11, 2003.

PADTE, T.; PEDNEKAR, S.; SHEJWALKAR, P. Applications of Coumarins as Cardiovascular and Anti-Cancer Agents: A Short Review. **Journal of Cardiology & Cardiovascular Therapy**, v.8, n.5, 2017.

PARK, W.S. *et al.* Increased inhibition of inward rectifier K<sup>+</sup> channels by angiotensin II in small-diameter coronary artery of isoproterenol-induced hypertrophied model. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.27, p.1768–1775, 2007.

PARK, W.S. *et al.* Acute hypoxia induces vasodilation and increases coronary blood flow by activating inward rectifier K<sup>+</sup> channel. **Pflügers Archive: European Journal of Physiology**, v.454, p. 1023–1030, 2007.

PICCOLO, C. *et al.* Hemodynamic and thermoregulatory effects of xylazine-ketamine mixture persist even after the anesthetic stage in rats. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.4, 2012.

QUAYLE, J.M.; DART, C.; STANDEN, N.B. The properties and distribution of inward rectifier potassium currents in pig coronary arterial smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v.494, p.715–726, 1996.

QUAYLE, J.M.; NELSON, M.T.; STANDEN, N.B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. **Physiology Reviews**, v. 77, p.1165–1232, 1997.

QUINTÃO-JÚNIOR, J.F. *et al.* Morfologia e Contratilidade em Cardiomiócitos de Ratos com Baixo Desempenho para o Exercício Físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.98, n.5, p.431-436, 2012.

RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M.I.; REITZ, A.B. **Frontiers in medicinal chemistry**. United Arab Emirates, v.4., 2010.

RAUPE T. *et al.* Endothelial therapy of atherosclerosis and its risk factors. **Current Vascular of Pharmacology**, v. 1, p.111–121, 2003.

REUTER, H. *et al.* Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange in the regulation of cardiac excitation-contraction coupling. **Cardiovascular Research**, v.67, p.198-207, 2005.

RIVERS, R.J.; HEIN, T.W.; ZHANG, C.; KUO, L. Activation of barium-sensitive inward rectifier potassium channels mediates remote dilation of coronary arterioles. **Circulation**, v.104, p. 1749–1753, 2001.

RODRIGUES, T. *et al.* Counting on natural products for drug design. **Nature Chemistry**, v.8, n.6, p.531-541, 2016.

RUDY, B. *et al.* Voltage Gated Potassium Channels: Structure and Function of Kv1 to Kv9 Subfamilies. **Encyclopedia of Neuroscience**, p.397-425, 2009.

SAKATA, K. & KARAKI, H. Effects of a novel smooth muscle relaxant, KT –362, on contraction on cytosolic Ca<sup>2+</sup> level in the rat aorta. **British Journal of Pharmacology**, v.102, p.174-178, 1991.

SANTOS, M.J.C.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.8, p.30 - 40, 2001.

SCIO, E. Cumarinas encontradas no gênero *Kielmeyera* - Família Clusiaceae. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.85, n.1, p.27-31, 2004.

SAMBHI, M.; WHITE, F.E. The eletrocardiogram of the normal and hypertensive rat. **Circulation Research**, v.7, p. 129 – 134, 1959.

SCHWARZ, L. Eeletrocardiograma. **Revista Ilha Digital**, v.1, p.3-19, 2009.

SOBEY, C. G. Potassium Channel Function in Vascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, p. 28–38, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Sociedade Brasileira de Hipertensão. Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. In: Rev. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 95, n. 1, supl. 1, jan/mar 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretriz de interpretação de eletrocardiograma em repouso. In: Rev. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 80, supl. II, 2003.

SORENSEN, C. M. *et al.* Closure of multiple types of K<sup>+</sup> channels is necessary to induce changes in renal vascular resistance in vivo in rats. **Pflugers Archiv : European Journal of Physiology**, n. 462, p. 655–667, 2011.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.159, p.129-145, 1968.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **The Journal of Physiology**, v.522, n.2, p.177–185, 2000.

SOMLYO, A.V. *et al.* Smooth muscle myosin: regulation and properties. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, **Biological Sciences**, v.359, p.1921–1930, 2004.

SOUZA, C.P. *et al.* Chemoprophylaxis of schistosomiasis molluscicidal activity of natural products - tests with adult snails and eggs. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.56, p.333-338, 1984.

SOUZA, S.M. **Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados.** Dissertação. UFSC, Florianópolis, 2005, 13p.

STANDEN, N.B.; QUAYLE, J.M. K<sup>+</sup> channel modulation in arterial smooth muscle. **Acta Physiologica**, v.164, p. 549–557, 1998.

STROHL, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 39-41, 2000.

STROMGAARD, K. Natural Products as tools for studies of ligand-gated ion channel. **The Chemical Record**, v.5, p.229–239, 2005.

SVENNINGSEN, P. *et al.* T-type Ca<sup>2+</sup> channels facilitate NO-formation, vasodilatation and NO-mediated modulation of blood pressure. **Pflugers Archiv -European Journal of Physiology**, v.466, n.12, p.2205-2214, 2014.

SWARTZ, K.J. Sensing voltage across lipid membranes. **Nature**, v.456, n.7224, p.891–897, 2008.

TAJADA, S. *et al.* Down-regulation of Cav1.2 channels during hypertension: how fewer Cav1.2 channels allow more Ca<sup>2+</sup> into hypertensive arterial smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v.591, p.6175-6191, 2013.

TANAKA, Y. *et al.* Significant role of neuronal non-Ntype calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric. **British Journal of Pharmacology**, n.128, p.1602 - 1608, 1999.

TANAKA, Y. *et al.* NO-mediated MaxiK (Ca) channel activation produces relaxation of guinea pig aorta independently of voltage-dependent L-type Ca<sup>2+</sup> channels. **General Pharmacology**, v. 34, p. 159–165, 2000.

- TENG, C.M. *et al.* The relaxant action of osthole isolated from *Angelica pubescens* in guinea-pig trachea. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.349, p.202-208, 1994.
- TERAMOTO, N. Physiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 572, p. 617–624, 2006
- TYKOCKI, N.R.; BOERMAN, E.M.; JACKSON, W.F. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. **Comprehensive Physiology**, v.7, p.485-581, 2017.
- VAITHIANATHAN, T. *et al.* Subtype identification and functional characterization of ryanodine receptors in rat 19 cerebral artery myocytes. **American journal of physiology Cell Physiology**, v.299, p.264- 78, 2010 .
- VANHOUTTE PM. COX-1 and vascular disease. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.86, n.2, p.212-5, 2009.
- VEIGA-JÚNIOR, V.F. *et al.* Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, 2005.
- VERHEIJCK, E.E. *et al.* Contribution of L-type Ca<sup>2+</sup>current to electrical activity in sinoatrial nodal myocytes of rabbits. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v.276, n.3, p.1064-1077, 1999.
- VETTERKIND, S.; MORGAN, G. Regulation of Smooth Muscle Contraction. In: J. A Hill, E. N Olson, editors. *Muscle: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*, 2. London: **Elsevier Academic Press**, p. 1173–1180, 2012.
- WAUGH WH: Adrenergic stimulation of depolarized arterial muscle. **Circulation Research**, v.11, p. 264–276, 1962.
- WALSH, M.P. Regulation of vascular smooth muscle tone. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.72, p. 919 -936, 1994.
- WALSH, M.P.; COLE, W.C. The role of actin filament dynamics in the myogenic response of cerebral resistance arteries. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.33, p.1–12, 2013.
- WANG, S.P. *et al.* Vasorelaxant effect of isopropyl 3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoate, a novel metabolite from *Salvia miltiorrhiza*, on isolated rat mesenteric artery. **European Journal of Pharmacology**, v.579, p.283-288, 2008.
- World Health Organization. **Global Health Observatory (GHO) data: Raised Blood Pressure**. WHO, 2018. Disponível em [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/blood\\_pressure\\_prevalence\\_text/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/)  
Acesso em: 23 fev 2018.

WELLMAN, G.C. Ion channels and calcium signaling in cerebral arteries following subarachnoid hemorrhage. **Neurological Research**, v. 28, p. 690–702, 2006.

WESTCOTT, E.B. *et al.* Function and expression of ryanodine 22 receptors and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in smooth muscle cells of murine feed 23 arteries and arterioles. **The Journal of Physiology**, v.590, p.1849-69, 2012.

WILLIAMS, B. The year in hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 55, n. 1, p. 65-73, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, *et al.* **A global brief on hypertension: silent killer, global public health crisis: World Health Day**. 2013.

YANG, Y. *et al.* Function of BK<sub>Ca</sub> channels is reduced in human vascular smooth muscle cells from Han Chinese patients with hypertension. **Hypertension**, v.61, n.2, p.519-525, 2013.

YUGAR-TOLEDO, J.C. *et al.* Disfunção Endotelial e Hipertensão Arterial. **Revista Brasileira Hipertensão**, v.22, n.3, p.84-92, 2015

ZHANG, Y. *et al.* BK<sub>Ca</sub> channel activity and vascular contractility alterations with hypertension and aging via  $\beta$ 1 subunit promoter methylation in mesenteric arteries. **Hypertension Research**, v.41, n.2, p.96-103, 2018.