



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**JOSÉ MARDEN MENDES NETO**

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO  
CARDIOVASCULAR INDUZIDO POR (-)-MIRTENOL  
EM RATOS HIPERTENSOS E NORMOTENSOS**

**SÃO CRISTÓVÃO  
2020**

**JOSÉ MARDEN MENDES NETO**

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO  
CARDIOVASCULAR INDUZIDO POR (-)-MIRTENOL  
EM RATOS HIPERTENSOS E NORMOTENSOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Fisiológicas da Universidade  
Federal de Sergipe para a obtenção do grau de  
Doutor em Ciências Fisiológicas.

**Orientadora:** Profa. Dra. Sandra Lauton Santos

**São Cristóvão  
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

M538m Mendes Neto, José Marden  
Mecanismos envolvidos no efeito cardiovascular induzido por (-)-mirtenol em ratos hipertensos e normotensos / José Marden Mendes Neto ; orientadora Sandra Lauton Santos. – São Cristóvão, SE, 2020.  
142 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2020.

1. Hipertensão. 2. Bradicardia. 3. Eletrocardiografia. 4. Vasos sanguíneos - Dilatação. 5. Monoterpenos. I. Santos, Sandra Lauton, orient. II. Título.

CDU 612.17:616.12-008.331.1

**JOSÉ MARDEN MENDES NETO**

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO  
CARDIOVASCULAR INDUZIDO POR (-)-MIRTENOL  
EM RATOS HIPERTENSOS E NORMOTENSOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito a obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

---

**Orientadora: Profa. Dra. Sandra Lauton Santos (UFS)**

---

**1º Examinador(a): Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo (UFS)**

---

**2º Examinador(a): Prof. Dr. Márcio Roberto Viana Santos (UFS)**

---

**3º Examinador(a): Profa. Dra. Giuliana da Rocha Borges (UFS)**

---

**4º Examinador(a): Prof. Dr. Thales Nicolau Prímola Gomes (UFV)**

**SÃO CRISTÓVÃO  
2020**

## DEDICATÓRIA

Certa vez, li que o cume do sucesso humano e a maior fortuna na vida do homem é ter saúde mental. E isso é verdade! Por isso, este trabalho é dedicado a todas as pessoas que, como eu, passaram ou irão passar pela fase aguda da síndrome de *Burnout*. E que, mesmo na extrema angústia, não desistiram e não desistirão de viver e seguir em frente, acreditando em si e nos seus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus, por minha vida, a saúde, minha família e pela misericórdia em forma de milagres diários experimentados por mim e compartilhados com meus familiares. Agradeço também à Nossa Senhora de Fátima pelas intercessões (muitas intercessões), principalmente nos momentos mais difíceis deste trabalho;

Agradeço aos meus pais, Darci e Sandra Mendes, pelas orações, os exemplos de bondade, caridade, paciência e persistência, por sempre me apoiarem em todos os momentos da minha vida, especialmente no final deste doutorado. Também sou infinitamente grato aos meus amados irmãos, Mário David e Mayra, que se doaram me transmitindo força, coragem e carinho em todos os momentos difíceis. Muito obrigado pelos sorrisos!

Ao médico Dr. Fernando Vinícius Alves, por me incentivar, pelos momentos felizes e por acreditar em mim. Sou grato também à Sandra Alves, Aline Lima e Pablo Henrique pelas alegrias!

Aos meus familiares, especialmente a meu tio Marcelo Mendes e a minha avó Francinete, pelo incentivo, carinho, orações que foram essenciais em todos os momentos;

À minha saudosa avó Marli (*in memoriam*) pelo cuidado no meu ensino primário e por ter projetado esse momento, apesar da ausência de corpo, continua cuidando de mim diariamente!

Agradeço demais à querida profa. Dra. Sandra Lauton Santos, minha orientadora, que tão bem me recebeu no laboratório e construiu comigo uma relação de amizade. Muito obrigado por tornar possível este doutorado, pelas reflexões importantíssimas no desenvolvimento deste trabalho, por me ensinar a prezar pela qualidade, pelas palavras de incentivo e força quando mais precisei. Obrigado!

À profa. Dra. Darizy Flávia Silva Amorim, que foi minha professora de fisiologia na Universidade Federal da Paraíba, sua determinação e expertise foram essenciais para minha decisão em seguir o sonho acadêmico. Ainda mais por ter cedido os animais espontaneamente hipertensos para a concretização deste trabalho.

Às profas. Dra. Nadja de Azevedo Correia e Dra. Katy Líssias Gondim, inicialmente por terem observado potencial em mim nas aulas de farmacologia. Agradeço pelo carinho e exigência com que conduziram os três anos de minha iniciação científica e por terem antecipado este momento em minha vida. Vocês sempre serão um grande exemplo de profissionalismo e foram essenciais para que hoje me sinta doutor. Muitas saudades!

À querida aluna de iniciação científica Iolanda Maia, que tanto me ajudou na experimentação, desde o mestrado e em grande parte do doutorado. MUITÍSSIMO obrigado pelas parcerias e pelo incentivo! Também agradeço às alunas de iniciação científica Amanda, Raphaela, Natasha, Lívia, Érica, Juce e Paulo, pelas contribuições e cuidados com os animais.

Aos meus amigos, em Aracaju e na Paraíba, Gil, Rodrigo, Ana Luíza, Emílio, Rogério, Iri, Kelma, Maria, Paulo, Mônica Cabral, Maria do Carmo, Nadja, Katy, Valéria, Sabrina, Lú, Jana, Jéssica e Dani.

À querida amiga Dra. Raquel Britto, por sempre estar ao meu lado me transmitindo força e entusiasmo. Por todas as mensagens carinhosas todas as manhãs. Sou grato e como sinto saudades.

Aos prof. Dr. Márcio Roberto e Dr. Valter Joviniano que disponibilizaram o espaço e os equipamentos do laboratório para a execução dos experimentos *in vivo*.

Aos amigos Érik Aian e Dannilo, por toda a ajuda nas cirurgias e experimentos *in vivo*. Pelo desprendimento, aprendizado e amizade.

À grande amiga Míriam Geisa, pelo incentivo, carinho e palavras nas horas certas! Sou muito grato a você, especialmente pelo seu exemplo de não temer o novo!

Aos amigos do LaBCEO, por estarem sempre presentes, disponíveis em discutir resultados e indicar sugestões, gratidão a Sara, Míriam, Grace, Thássio, Lucas, Laiza, Paulyane, Salviano, Dr. Ricardo e de forma especial à Dra. Maraísa, Dr. Péligris e aos alunos de doutorado Rodrigo Miguel e Juci Freitas, pela ajuda na montagem do sistema de banho para órgão isolado, ainda no mestrado, que tornou possível tantos trabalhos (mestrados e doutorados), meu reconhecimento!

Aos professores da banca PROASA, Dr. Valter Joviniano, Dr. José Ronaldo, Dra. Renata Grespan, Dra. Cris Bani e o Dr. Luis Felipe, por todo acompanhamento e direcionamento, especialmente no delineamento experimental;

Aos professores da banca de qualificação, Dr. Valter Joviniano, Dr. Enilton Camargo (grande exemplo) e o Dr. Ricardo Amaral, pelas inferências importantíssimas que tornaram este trabalho melhor;

Aos professores da banca de defesa, Dr. Thales Nicolau Prímola e a Dra. Giuliana Borges, pela disponibilidade em participar deste momento e pelas reflexões, importantíssimas que tornaram este trabalho melhor;

À profa. Dra. Josimari Melo de Santana, pelos momentos de escuta e palavras de apoio;

Ao grande amigo Renivan, que sempre trabalhou com grande esforço. Obrigado pelas palavras de incentivo;

À querida amiga, Valéria da Alesco. Obrigado pelas palavras de incentivo e coragem;

Aos animais que doaram suas vidas em prol do conhecimento científico;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PROCFIS), por todas as possibilidades oferecidas aos seus discentes;

À Universidade Federal de Sergipe, à Capes/Fapitec, pelo incentivo e

Às pessoas que acreditam em mim!

**Obrigado! Marden**



## RESUMO

**Mecanismos envolvidos no efeito cardiovascular induzido por (-)-mirtenol em ratos hipertensos e normotensos, José Marden Mendes Neto, São Cristóvão, SE, Brasil, 2020.** As doenças cardiovasculares representam um grave problema de saúde pública, uma vez que são a principal causa de morbimortalidade no mundo. A doença hipertensiva é o principal distúrbio cardiovascular e estima-se que 1,13 bilhões de pessoas possuam a patologia. O tratamento farmacológico da hipertensão apresenta algumas limitações como, a indução de tolerância e efeitos adversos, que favorecem o abandono do tratamento, apenas um a cada cinco hipertensos controlam efetivamente a doença. O (-)-mirtenol, um monoterpene encontrado em vários óleos essenciais de plantas, desencadeia atividade ansiolítica, antioxidante, cardioprotetora e pode apresentar efeito anti-hipertensivo, tornando-se uma alternativa futura para o tratamento da hipertensão. Neste sentido, objetivou-se determinar os mecanismos envolvidos no efeito cardiovascular induzido por (-)-mirtenol em animais hipertensos (SHR) e normotensos (RWN). Utilizou-se animais SHR e RWN de 12 – 14 semanas, os parâmetros hemodinâmicos de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) foram aferidos após a administração oral e intravenosa do (-)-mirtenol, de forma aguda. A influência da substância no controle autonômico da função cardiovascular foi avaliada com a utilização de hexametônio. Com o eletrocardiograma, avaliou-se a atividade elétrica do coração após a administração intravenosa do (-)-mirtenol. O efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica superior foi analisado em sistema de banho para órgão isolado à 37°C. A administração intravenosa do (-)-mirtenol desencadeou efeito hipotensor dependente de dose em animais SHR e RWN ( $p < 0,05$ ), com maior efeito em animais hipertensos. Na FC, em animais SHR, a substância apresentou um efeito bifásico ( $p < 0,05$ ) e nos animais RWN, ocorreu taquicardia reflexa ( $p < 0,05$ ). Em SHR, o bloqueador ganglionar induziu maior queda na PA nas menores doses e inibiu a hipotensão na mais alta dose do (-)-mirtenol ( $p < 0,05$ ). Em animais RWN não houve alterações no efeito hipotensor na presença do hexametônio, apenas a taquicardia reflexa foi inibida ( $p < 0,05$ ). Em animais SHR, os intervalos PRi, QRS e QTc foram prolongados ( $p < 0,05$ ) e a amplitude da onda R foi reduzida ( $p < 0,05$ ), e nos animais RWN, apenas a amplitude da onda R foi reduzida ( $p < 0,05$ ). A administração oral do (-)-mirtenol em animais SHR desencadeou efeito hipotensor após 10 minutos da administração, semelhantemente, ao nifedipino, tal efeito diminuiu com o tempo e a bradicardia se manteve durante as 24 horas acompanhadas. O efeito hipotensor do (-)-mirtenol foi explicado, em parte, pela capacidade da substância em desencadear vasorrelaxamento em artéria mesentérica. Em animais SHR e RWN, o (-)-mirtenol ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-3}$  mol/L) desencadeou atividade vasodilatadora dependente de concentração na pré-contracção induzida por fenilefrina com maior efeito em animais SHR ( $p < 0,05$ ). O efeito vasorrelaxante máximo da substância, ocorreu de modo independente do endotélio vascular e envolveu: (I) o bloqueio do influxo de cálcio na musculatura lisa via canais para  $Ca^{2+}$  sensíveis a voltagem do tipo L, (II) a mobilização de  $Ca^{2+}$  intracelular e (III) a diminuição na sensibilidade da maquinaria contrátil ao íon. Nas menores concentrações a substância estimulou o vasorrelaxamento dependente do endotélio via óxido nítrico em SHR ( $p < 0,05$ ). Em conjunto, os resultados evidenciaram efeitos cardiovasculares benéficos do (-)-mirtenol em animais hipertensos e normotensos, tornando-se uma promissora alternativa para o desenvolvimento de um fármaco futuro.

**Palavras-chave:** Hipotensão; Bradicardia; Eletrocardiograma; Vasodilatação; Monoterpenos.

## ABSTRACT

**Mechanisms involved in cardiovascular effect induced by (-)-myrtenol in hypertensive and normotensive rats, José Marden Mendes Neto, São Cristóvão, SE, Brazil, 2020.** Cardiovascular diseases represent a serious public health problem, since they are the main cause of morbidity and mortality in the world. Hypertensive disease is the main cardiovascular disorder and it is estimated that 1.13 billion people have the pathology. The pharmacological treatment of hypertension has some limitations, such as the induction of tolerance and adverse effects, which favor the abandonment of treatment, only one in five hypertensive patients effectively control the disease. (-)-myrtenol, a monoterpene found in various essential oils of plants, induces anxiolytic, antioxidant, cardioprotective activity and can have antihypertensive effect, making it a future alternative for the treatment of hypertension. In this sense, the objective was to determine the mechanisms involved in the cardiovascular effect induced by (-)-myrtenol in hypertensive (SHR) and normotensive (NWR) animals. SHR and NWR animals from 12 - 14 weeks were used, the hemodynamic parameters of blood pressure (BP) and heart rate (HR) were measured after acute and intravenous administration of (-)-myrtenol. The influence of the substance on the autonomic control of cardiovascular function was evaluated with the use of hexamethonium. With the electrocardiogram, the electrical activity of the heart was evaluated after intravenous administration of (-)-myrtenol. The vasorelaxing effect on upper mesenteric artery rings was analyzed in an organ bath system isolated at 37 ° C. Intravenous administration of (-)-myrtenol triggered a dose-dependent hypotensive effect in SHR and NWR animals ( $p < 0.05$ ), with a greater effect in hypertensive animals. In SHR animals, the substance had a biphasic effect ( $p < 0.05$ ) on HR and in NWR animals, reflex tachycardia ( $p < 0.05$ ) occurred. In SHR, in the presence of the ganglionic blocker, hypotension increased at the lowest doses and decreased at the highest dose of (-)-myrtenol ( $p < 0.05$ ). In NWR animals there were no changes in the hypotensive effect in the presence of hexamethonium, only reflex tachycardia was inhibited ( $p < 0.05$ ). In SHR animals, the PRi, QRS and QTc intervals were prolonged ( $p < 0.05$ ) and the amplitude of the R wave reduced ( $p < 0.05$ ), and in NWR animals, only the amplitude of the R wave was reduced ( $p < 0.05$ ). Oral administration of (-)-myrtenol in SHR animals triggered a hypotensive effect after 10 minutes of administration, similarly to nifedipine, this effect decreased with time and bradycardia was maintained for 24 hours. The hypotensive effect of (-)-myrtenol was explained, in part, by the substance's ability to trigger vasorelaxation in the mesenteric artery. In SHR and NWR animals, (-)-myrtenol ( $10^{-6}$  -  $3 \times 10^{-3}$  mol/L) triggered concentration-dependent vasodilator activity in the pre-contraction induced by phenylephrine with greater effect in SHR animals ( $p < 0.05$ ). The maximum vasorelaxant effect of the substance occurred independently of the vascular endothelium and involved: (I) blocking the influx of calcium into smooth muscle via L-type voltage-sensitive  $Ca^{2+}$  channels, (II) intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization and (III) the decrease in the sensitivity of the contractile machinery to the ion. At lower concentrations, the substance stimulated endothelium-dependent vasorelaxation via nitric oxide in SHR ( $p < 0.05$ ). Together, the results showed beneficial cardiovascular effects of (-)-myrtenol in hypertensive and normotensive animals, making it a promising alternative for the development of a future drug.

**Keywords:** Hypotension; Bradycardia; Eletrocardiography; Vasodilatation; Monoterpenes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1.</b> Estrutura morfológica das células musculares lisas .....	<b>4</b>
<b>FIGURA 2.</b> Esquema representativo da organização citológica dos miócitos lisos com evidência às estruturas contráteis .....	<b>5</b>
<b>FIGURA 3.</b> Mecanismo de fosforilação e desfosforilação das cadeias leves de miosina de 20 kDa.....	<b>6</b>
<b>FIGURA 4.</b> Esquema representativo da interação entre os filamentos de actina e miosina após a fosforilação da cadeia leve de miosina regulatória (MLC <sub>20</sub> ).....	<b>7</b>
<b>FIGURA 5.</b> Representação esquemática da contração das células musculares lisas vasculares com a estimulação do aumento da concentração intracelular de Ca <sup>2+</sup> .....	<b>9</b>
<b>FIGURA 6.</b> Representação esquemática da contração das células musculares lisas vasculares por meio da sensibilização ao Ca <sup>2+</sup> .....	<b>11</b>
<b>FIGURA 7.</b> Esquema representativo da modulação do estado de contratilidade das células musculares lisas vasculares, por meio do endotélio vascular.....	<b>15</b>
<b>FIGURA 8.</b> Esquema representativo da estrutura molecular das sintases de óxido nítrico (NOS) e produção de óxido nítrico (NO) .....	<b>17</b>
<b>FIGURA 9.</b> Representação esquemática das reações para a síntese de óxido nítrico (NO) catalisada pela sintase de óxido nítrico (NOS).....	<b>18</b>
<b>FIGURA 10.</b> Representação esquemática da estrutura e subdivisão do sistema de condução elétrico do coração .....	<b>23</b>
<b>FIGURA 11.</b> Representação esquemática do potencial de ação na célula marcapasso no nódo sinusal em função do tempo .....	<b>24</b>
<b>FIGURA 12.</b> Representação esquemática das ondas, segmentos e intervalos de um traçado eletrocardiográfico normal .....	<b>26</b>
<b>FIGURA 13.</b> Esquema representativo do potencial de ação em cardiomiócitos ventriculares.....	<b>28</b>
<b>FIGURA 14.</b> Esquema representativo da neuromodulação autonômica no sistema cardiovascular.....	<b>30</b>
<b>FIGURA 15.</b> Esquema representativo dos mecanismos centrais de controle autonômico da frequência cardíaca e resistência vascular periférica total.....	<b>32</b>
<b>FIGURA 16.</b> Estrutura química do (-)-mirtenol .....	<b>39</b>

- FIGURA 17.** Efeito da administração intravenosa, *in bolus*, do (-)-mirtenol em (A) pressão arterial sistólica (PAS), em (B) pressão arterial diastólica (PAD) e em (C) frequência cardíaca (FC) em animais hipertensos não anestesiados .....53
- FIGURA 18.** Efeito da administração intravenosa, *in bolus*, do (-)-mirtenol em (A) pressão arterial sistólica (PAS), em (B) na pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC) em animais normotensos não anestesiados .....55
- FIGURA 19.** Efeito da administração intravenosa, *in bolus*, do (-)-mirtenol em (A) pressão arterial sistólica (PAS), em (B) na pressão arterial diastólica (PAD) e em (C) frequência cardíaca (FC) em animais hipertensos após o bloqueio ganglionar com hexametônio (30 mg/kg).....57
- FIGURA 20.** Efeito da administração intravenosa, *in bolus*, do (-)-mirtenol em (A) pressão arterial sistólica (PAS), em (B) pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC) em animais normotensos após o bloqueio ganglionar com hexametônio (30 mg/kg).....58
- FIGURA 21.** Traçados típicos da atividade elétrica do coração em animais SHR anestesiados .....59
- FIGURA 22.** Efeito do (-)-mirtenol (20 mg/kg) no componente elétrico do coração em animais SHR e RWN anestesiados, na ausência e presença do bloqueio ganglionar com hexametônio (30 mg/kg).....60
- FIGURA 23.** Efeito do (-)-mirtenol (20 mg/kg) no componente elétrico do coração em animais normotensos (RWN) anestesiados, na ausência e presença do bloqueio ganglionar com hexametônio (30 mg/kg).....61
- FIGURA 24.** Efeito da administração oral do (-)-mirtenol ou nifedipina nos parâmetros hemodinâmicos de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) em animais SHR não anestesiados.....63
- FIGURA 25.** Efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em artéria mesentérica superior isolada de animais SHR e RWN com (E+) e sem endotélio (E-) pré-contraídas com fenilefrina (FEN 1 µmol/L). .....65
- FIGURA 26.** Efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em artéria mesentérica superior isolada com endotélio preservado de animais SHR, na presença ou ausência de L-Name (A) e HDX (B), pré-contraídas com fenilefrina (FEN) .....67
- FIGURA 27.** Efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis com endotélio vascular preservado de artéria mesentérica na presença de atropina (A), indometacina (B) e ODQ (C).....69
- FIGURA 28.** Efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio vascular pré-contraídos com KCl 80 mmol/L ou fenilefrina (FEN) em animais SHR (A) e RWN (B) .....71

- FIGURA 29.** Efeito do (-)-mirtenol na curva de contração concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-2}$  mol/L).....**73**
- FIGURA 30.** Efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica de animais SHR (A) e RWN (B), na presença do BAYK 8644.....**74**
- FIGURA 31.** Efeito do (-)-mirtenol na contração transiente para  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por FEN em anéis, sem endotélio, de artéria mesentérica superior, em animais SHR (A) e RWN (B).....**75**
- FIGURA 32.** Efeito do (-)-mirtenol na curva de contração concentração-reposta para  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ( $10^{-5}$  –  $10^{-2}$  mol/L) em anéis de artéria mesentérica sem endotélio vascular ....**77**
- FIGURA 33.** Efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis sem endotélio vascular na presença ou ausência do TEA em (A) animais SHR e (B) RWN.....**78**
- FIGURA 34.** Resumo gráfico da atividade cardiovascular do (-)-mirtenol em animais SHR e RWN .....**93**

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Ferramentas farmacológicas utilizadas nos experimentos.....	<b>42</b>
<b>Tabela 2.</b> Composição da solução de Tyrode .....	<b>43</b>
<b>Tabela 3.</b> Solução isosmótica de KCl 20 mmol/L .....	<b>43</b>
<b>Tabela 4.</b> Solução isosmótica de KCl 80 mmol/L .....	<b>44</b>

**SIGLAS E ABREVIACÕES**

<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>AC</b>	Ciclase de adenilil
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AVE</b>	Acidente vascular encefálico
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BK<sub>Ca</sub></b>	Canais para potássio ativados pelo cálcio de grande condutância
<b>4Ca<sup>2+</sup>-CAM</b>	Complexo 4 íons cálcio com a proteína calmodulina
<b>CAD</b>	Caldesmon
<b>C<sub>v</sub></b>	Canais para cálcio sensível a voltagem
<b>CAM</b>	Calmodulina
<b>CE</b>	Célula endotelial
<b>CEPA</b>	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
<b>CGs</b>	Ciclase de guanilil solúvel
<b>CMLV</b>	Células musculares lisas vasculares
<b>COX</b>	Ciclo-oxigenase
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>CVLM</b>	Bulbo ventrolateral caudal
<b>DAC</b>	Doença da artéria coronária
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DC</b>	Débito cardíaco
<b>DCV</b>	Doenças cardiovasculares
<b>ECA</b>	Enzima conversora de angiotensina
<b>EDHF</b>	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
<b>EDRF</b>	Fator relaxante derivado do endotélio
<b>E<sub>máx</sub></b>	Efeito máximo
<b>eNOS</b>	Sintase de óxido nítrico endotelial
<b>E.P.M.</b>	Erro padrão da média
<b>EROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FEN</b>	Fenilefrina

<b>FC</b>	Frequência cardíaca
<b>GEFs</b>	Fatores de troca de nucleotídeos de guanina
<b>GMPc</b>	Guanosina monofosfato cíclico
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>HAS</b>	Hipertensão arterial sistêmica
<b>HDX</b>	Hidroxocobalamina
<b>HEXA</b>	Hexametônio
<b>HVE</b>	Hipertrofia ventricular esquerda
<b>IAM</b>	Infarto agudo do miocárdio
<b>IK<sub>Ca2+</sub></b>	Canais para potássio ativados pelo cálcio de condutância intermediária
<b>K<sub>v</sub></b>	Canal para potássio sensível à voltagem
<b>iNOS</b>	Sintase de óxido nítrico induzível
<b>IP<sub>3</sub></b>	1,4,5-trifosfato de inositol
<b>IP<sub>3</sub>R</b>	Receptor para o IP <sub>3</sub>
<b>L-Name</b>	N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginina metil éster
<b>LC<sub>20</sub></b>	Cadeia leve de 20 kDa
<b>LC<sub>17</sub></b>	Cadeia leve de 17 kDa
<b>M<sub>3</sub></b>	Receptor muscarínico M <sub>3</sub>
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativada por mitógeno
<b>MLC</b>	Cadeias leves de miosina
<b>MLCK</b>	Quinase das cadeias leves de miosina
<b>MLCP</b>	Fosfatase das cadeias leves de miosina
<b>NIF</b>	Nifedipino
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>nNOS</b>	Sintase de óxido nítrico neuronal
<b>NTS</b>	Núcleo do trato solitário
<b>ODQ</b>	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
<b>PA</b>	Pressão arterial
<b>PAD</b>	Pressão arterial diastólica
<b>PAM</b>	Pressão arterial média
<b>PAS</b>	Pressão arterial sistólica
<b>pD<sub>2</sub></b>	Logaritmo negativo da concentração que causa 50% do E <sub>máx</sub>
<b>PE</b>	Polietileno

<b>PGIS</b>	Enzima sintase de prostaciclina
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>Pi</b>	Fosfato inorgânico
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
<b>PKA</b>	Proteína quinase A dependente de AMPc
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>PKG</b>	Proteína quinase G dependente de GMPc
<b>PLC<math>\beta</math></b>	Fosfolipase C- $\beta$
<b>ROCC</b>	Canal para cálcio operado por receptor
<b>ROCK</b>	Proteína quinase associada a Rho
<b>RS</b>	Retículo sarcoplasmático
<b>RVLM</b>	Bulbo ventrolateral rostral
<b>RVPT</b>	Resistência vascular periférica total
<b>RWN</b>	Ratos Wistar Normotensos
<b>SERCA</b>	Cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático
<b>SHR</b>	Rato espontaneamente hipertenso, do inglês <i>Spontaneously Hypertensive Rats</i>
<b>SK<sub>Ca2+</sub></b>	Canais para potássio ativados pelo cálcio de baixa condutância
<b>SNA</b>	Sistema Nervoso Autônomo
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SOCC</b>	Canal para cálcio operado por estoque
<b>SRAA</b>	Sistema renina angiotensina aldosterona
<b>TEA</b>	Tetraetilamônio
<b>TRPV<sub>1</sub></b>	Canal potencial receptor transiente vanilóide tipo 1
<b>NE</b>	Norepinefrina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
2.1 Estrutura e mecanismo de contratilidade das células musculares lisas vasculares (CMLV) .....	3
2.1.1 Mecanismo de contratilidade dependente do aumento da concentração de $Ca^{2+}$ .....	8
2.1.2 Mecanismo de contratilidade em baixa concentração de $Ca^{2+}$ .....	10
2.2 Papel do endotélio vascular no vasorrelaxamento arterial .....	12
2.3 Atividade elétrica do coração e formação das ondas, intervalos e segmentos eletrocardiográficos .....	21
2.4 Regulação da Pressão arterial a curto prazo .....	29
2.5 Modelo animal experimental de hipertensão espontânea SHR .....	33
2.6 Produtos naturais e (-)-mirtenol.....	37
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>42</b>
3.1 Objetivo geral .....	42
3.2 Objetivos específicos .....	42
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
4.1 Animais.....	43
4.2 Agonistas e antagonistas utilizados .....	43
4.3 Sais e Soluções .....	44
4.4 Estudos <i>in vivo</i> .....	45
4.4.1 Procedimento anestésico-cirúrgico para a realização da abordagem experimental <i>in vivo</i> .....	45
4.4.2 Efeito do (-)-mirtenol nos parâmetros hemodinâmicos de PAS, PAD e FC em animais SHR e RWN não anestesiados .....	46
4.4.3 Efeito do (-)-mirtenol na PAS, PAD e FC na presença do hexametônio (30 mg/kg) em animais SHR e RWN não anestesiados .....	46
4.4.4 Efeito do (-)-mirtenol no eletrocardiograma (ECG) dos animais SHR e RWN sob anestesia .....	47
4.5 Estudos <i>ex vivo</i> .....	47
4.5.1 Obtenção e preparação dos anéis de artéria mesentérica superior isolada .....	47

4.5.2 Verificação da funcionalidade do endotélio .....	48
4.5.3 Investigação do efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica superior isolada com endotélio preservado ou removido, pré-contraídos com FEN, em animais SHR e RWN .....	48
4.5.4 Verificação da participação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) no efeito vasorrelaxante, dependente do endotélio vascular do (-)-mirtenol, em animais SHR .....	48
4.5.5 Verificação da participação da via NO/GMPc no efeito vasorrelaxante, dependente do endotélio, estimulado pelo (-)-mirtenol em animais SHR.....	49
4.5.6 Verificação da participação da via da ciclooxygenase (COX) e dos receptores muscarínicos no efeito vasorrelaxante, dependente do endotélio vascular, estimulado pelo (-)-mirtenol .....	49
4.5.7 Verificação da participação na mobilização do Ca <sup>2+</sup> no efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol, independente do endotélio vascular em animais SHR e RWN.....	49
4.5.8 Participação da sensibilização contrátil ao Ca <sup>2+</sup> estimulada pelo ortovanadato de sódio (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ), no efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol, independente do endotélio vascular em animais SHR e RWN.....	50
4.5.9 Participação dos canais para K <sup>+</sup> no efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica sem endotélio vascular de animais SHR e RWN.....	51
4.5.10 Análise estatística .....	51
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
5.1 Abordagem experimental <i>in vivo</i> .....	52
5.1.1. Efeito do (-)-mirtenol na PAS, PAD e FC, administrado por via i.v. em animais SHR e RWN não anestesiados.....	52
5.1.2 Efeito do (-)-mirtenol na PAS, PAD e FC de animais SHR e RWN não anestesiados após o bloqueio ganglionar com hexametônio (30 mg/kg) .....	56
5.1.3 Efeito do (-)-mirtenol na atividade elétrica do coração em animais SHR e RWN .....	59
5.1.4 Efeito na PAS, PAD e FC do (-)-mirtenol administrado por via oral em animais SHR não anestesiados.....	62
5.2 Abordagem experimental <i>ex vivo</i> .....	64
5.2.1 Efeito do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica superior isolada pré-contraídos com FEN, na presença e ausência do endotélio funcional em animais SHR e RWN .....	64

5.2.2 Efeito dependente do endotélio vascular desencadeado pelo (-)-mirtenol em artéria mesentérica superior isolada em animais SHR .....	66
5.2.2.1 Participação do NO no efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica com endotélio preservado.....	66
5.2.2.2 Efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol na presença de atropina, indometacina e ODQ .....	68
5.2.3 Efeito do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica superior isolada, na ausência do endotélio vascular, pré-contraídos com KCl 80 mmol/L em animais SHR e RWN .....	69
5.2.4 Participação dos canais para $Ca^{2+}$ sensíveis a voltagem no efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em animais SHR e RWN .....	72
5.2.5 Participação dos receptores intracelulares para $Ca^{2+}$ sensíveis ao $IP_3$ no efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em animais SHR e RWN.....	74
5.2.6 Efeito do (-)-mirtenol na resposta contrátil estimulada pela sensibilidade da maquinaria contrátil ao $Ca^{2+}$ .....	75
5.2.7 Participação dos canais para potássio no efeito vasorrelaxante do (-)- mirtenol em animais SHR e RWN .....	76
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>7. RESUMO GRÁFICO .....</b>	<b>93</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>9. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>95</b>
<b>10. LIMITAÇÕES.....</b>	<b>96</b>
<b>11. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>97</b>
<b>12. ANEXO I.....</b>	<b>123</b>
<b>13. ANEXO II.....</b>	<b>124</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) representam a principal causa de morbimortalidade no mundo e são responsáveis pela morte de 17,9 milhões de pessoas anualmente (WHO, 2019). No Brasil, no ano de 2016, cerca de 31% de todas as causas de morte foram ocasionadas por DCV. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento deste tipo de patologias são o aumento da expectativa de vida associado ao sedentarismo, má alimentação, consumo exacerbado de bebidas alcoólicas e fumo. Estimativas indicam que até 2030, cerca de um quinto da população mundial terá 65 anos de idade ou mais, favorecendo a prevalência das DCV, as quais terão um aumento exponencial na taxa de incidência (BUNDY *et al.*, 2017; COSTANTINO; PANENI; COSENTINO, 2016; RIBEIRO, *et al.*, 2016).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é a principal DCV e foi responsável por 10,5 milhões de mortes no mundo em 2016 (LEE *et al.*, 2018), caracteriza-se por apresentar valores elevados e sustentados de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), acima de 140 por 90 mmHg, para hipertensão em estágio 1 (SBH, 2016). Quando não controlada, a hipertensão torna-se o principal fator de risco para a ocorrência de eventos cardiovasculares de maior gravidade, os quais poderão ser fatais, tais como o acidente vascular encefálico (AVE), doença da artéria coronariana (DAC), infarto agudo do miocárdio (IAM), aneurisma aórtico e vasculopatias (WHELTON *et al.*, 2018).

A terapêutica atual para o tratamento da doença hipertensiva ocorre com a implementação de medidas não farmacológicas, principalmente, mudanças no estilo de vida do paciente, a exemplo: da prática de atividade física regular, dieta hipossódica, aumento do consumo de frutas e redução do etilismo. A minimização de lesões em órgãos alvo, principalmente, processos isquêmicos, ocasionados pela manutenção da pressão arterial (PA) elevada é o principal objetivo do gerenciamento da terapêutica para a hipertensão. Nesse sentido, para muitos pacientes, as intervenções não farmacológica não são suficientes para o controle efetivo da HAS, sendo requerida a utilização de um fármaco anti-hipertensivo (CHEN, *et al.*, 2018; LEAR *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2019).

Muitas moléculas foram identificadas e estão disponibilizadas na clínica para o tratamento da hipertensão, a exemplo dos betabloqueadores, os diuréticos, bloqueadores de canais para cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), vasodilatadores diretos e inibidores dos receptores de angiotensina (SBH, 2016). Porém esses medicamentos estão associados a múltiplas limitações de uso, dentre elas, os efeitos

adversos e a indução de tolerância que favorecem o abandono do tratamento e a dificuldade no controle da HAS. Cerca de 30 a 60 % dos pacientes que utilizam a abordagem medicamentosa para o tratamento da hipertensão, não controlam eficazmente a doença, tornando-se vulneráveis a ocorrência de eventos cardiovasculares fatais (BRAAM *et al.*, 2017).

Alternativas que objetivem o controle da hipertensão e a regressão do risco cardiovascular tornam-se cada vez mais necessárias (CHEN, *et al.*, 2018; DI-CHIARA *et al.*, 2017). A identificação de novas moléculas, especialmente as de origem natural, com propriedades anti-hipertensivas favorece o desenvolvimento de novos fármacos com alta capacidade em controlar a doença (MENDES-NETO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2018).

Entre as muitas substâncias naturais, os monoterpenos se destacam por apresentar grande potencial farmacológico, especialmente no sistema cardiovascular (BINU *et al.*, 2017; CRESPO *et al.*, 2017). A administração de doses crescentes do monoterpeno D-limoneno, desencadeou efeito hipotensor e bradicárdico em ratos sem anestesia (NASCIMENTO *et al.*, 2019). Em outro estudo, o (-)-borneol um monoterpeno alcóólico promoveu efeito vasorrelaxante dependente de concentração por ativar vias de sinalização dependentes do endotélio vascular (SANTOS, *et al.*, 2019)

O (-)-mirtenol (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O), um monoterpeno alcóólico (peso molecular de 150,23), encontrado no óleo essencial da *Myrtus communis* L. (*Myrtaceae*) apresenta múltiplas atividades biológicas já reportadas, a exemplo, de efeito ansiolítico em ratos (MOREIRA, *et al.*, 2014), atividade anti-inflamatória (VIANA, *et al.*, 2019), ação antibiótica (SELVARAJ *et al.*, 2019), proteção da mucosa gástrica (VIANA, *et al.*, 2019; VIANA, *et al.*, 2016) e, ainda, desencadeia uma resposta cardioprotetora em modelo de isquemia e reperfusão cardíaca (BRITTO *et al.*, 2018).

Os efeitos biológicos benéficos, apresentados pelo (-)-mirtenol no tratamento dos modelos de experimentação animal para o estudo das doenças, agregam a este monoterpeno um potencial farmacológico. As propriedades cardioprotetoras, tanto na prevenção de alterações na força ventricular quanto na capacidade de reverter lesões na atividade elétrica do coração em modelo de isquemia global cardíaco seguida de reperfusão, sugerem que esta molécula pode apresentar efeitos positivos na doença hipertensiva. Deste modo, investigar a atividade cardiovascular desta molécula é de grande importância, especialmente em animais com hipertensão essencial.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ESTRUTURA E MECANISMO DE CONTRATILIDADE DAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES (CMLV)

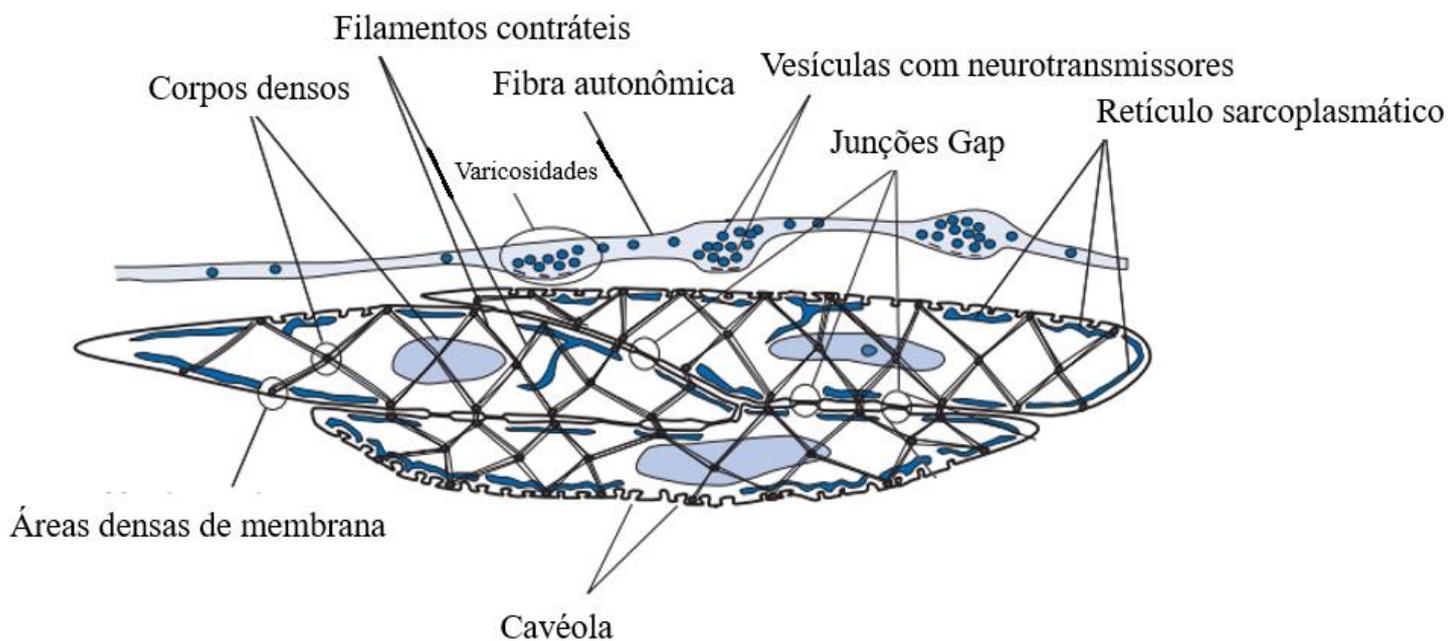
A musculatura lisa recebe essa denominação por não apresentar as estriações na sua estrutura, é responsável por revestir a parede de múltiplos órgãos e estruturas dos sistemas biológicos, a exemplo do intestino, do estômago, da bexiga, das vias aéreas e está presente em estruturas tubulares, como os vasos sanguíneos e ureteres. As células do músculo liso apresentam estrutura fusiforme e podem se organizar em um arranjo unitário, no qual, as junções gap, que permitem a passagem de ATP e íons, mantêm as células unidas nas múltiplas camadas de tecido muscular, formando um sincício, o que torna a resposta destas células a despolarização, coordenada (MAJESKY, 2016; SOMLYO; SIEGMAN, 2012; TASIAN; CUNHA; BASKIN, 2017) (Fig. 1).

Múltiplos aspectos distinguem as CMLV das células da musculatura esquelética e dos miócitos cardíacos, dentre os quais destacam-se, (1) o tamanho celular, as CMLV são menores que as células dos demais tipos musculares; (2) o citoplasma da musculatura lisa apresenta aspecto homogêneo na microscopia em função da ausência, nestas células, da organização das proteínas contráteis em sarcômeros, os filamentos de actina e miosina estão distribuídos por todo o citoplasma e (3) resposta lenta à contração (tesão) e relaxamento, a geração de força nas CMLV é mais lenta (FEHER, 2017; POLLARD, EARNSHAW, 2017).

As CMLV não apresentam junções neuromusculares, em contrapartida, as terminações nervosas formam varicosidades contendo neurotransmissores que são liberados e interagem com receptores localizados na membrana destas células. São identificadas pequenas invaginações na membrana plasmática, semelhante as encontradas nos cardiomiócitos, denominadas cavéolas, que aumentam a superfície da célula. Neste micro ambiente existe uma maior concentração de  $Ca^{2+}$ , o que é fundamental durante a contratilidade das CMLV (FEHER, 2012, FEHER 2017).

Os filamentos de miosina encontrados nas CMLV são filamentos da classe II, também denominados de filamentos grossos e são dispostos, paralelamente, por filamentos finos, compostos pelas proteínas globulares de actina em filamentos (F-actina), a

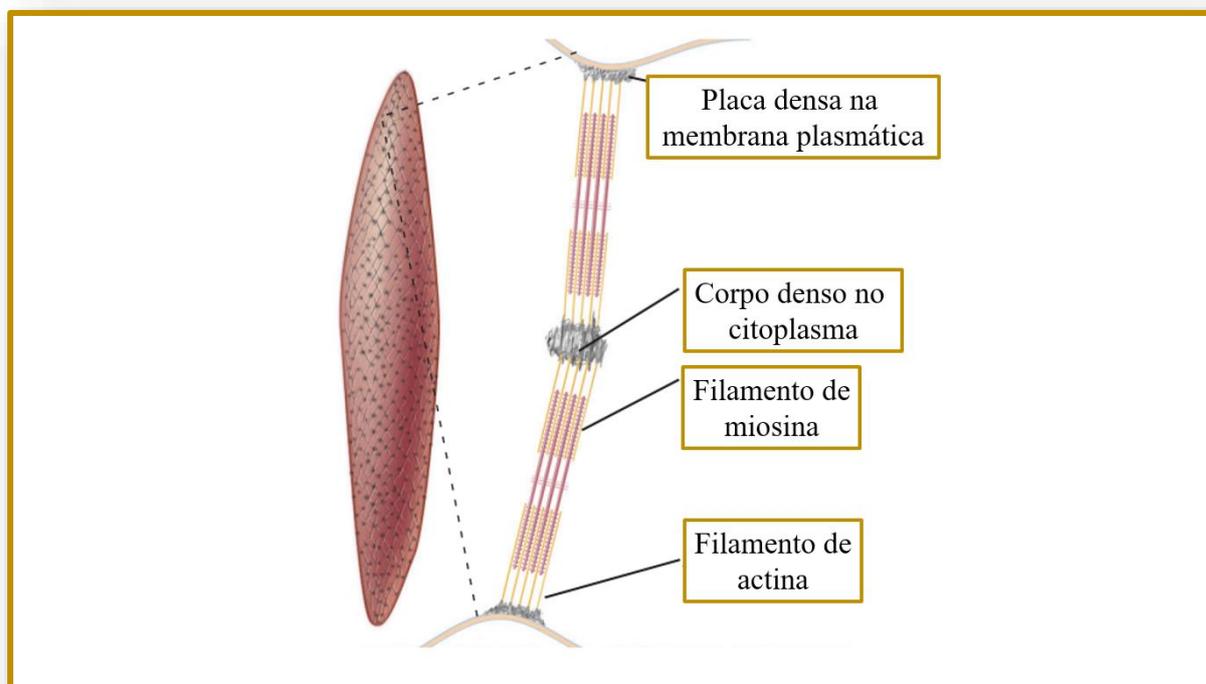
tropomiosina e duas proteínas com função regulatória, a calponina (CAP) e a caldesmon (CAD). Os filamentos finos estão dispostos obliquamente no citoplasma da célula, com uma de suas terminações ligada a estruturas na membrana plasmática, denominadas de placas densas e a outra terminação está associada a estruturas no citoplasma, os corpos densos, ambas estruturas formadas por proteínas (POLLARD; EARNSHAW; 2017) (Fig.2).



**Figura 1. Estrutura morfológica das células musculares lisas.** As células musculares lisas vasculares (CMLV) apresentam estrutura citológica própria, possuem um único núcleo localizado no centro da célula, os filamentos finos de contração estão ancorados em corpos densos no citoplasma e nas áreas densas na membrana plasmática. Esse tipo de célula não possui junções neuromusculares, porém, as fibras autonômicas se dispõem na superfície do tecido, formando as varicosidades. A membrana plasmática possui pequenas invaginações, denominadas de cavéolas, que possuem alta concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , essencial no processo de contração celular. Fonte: adaptado de FEHER, 2012.

Alguns estímulos favorecem a contratilidade das CMLV, dentre eles, a ativação de receptores localizados na membrana das células, a abertura de canais iônicos sensíveis ao estiramento e a despolarização da membrana com posterior abertura de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem (WEBB, 2003). A resposta de contração da musculatura lisa é mediada pela interação entre os filamentos grossos (miosina) e finos (actina) a partir da

atividade da proteína quinase das cadeias leves de miosina (MLCK) (TOUYZ *et al.*, 2018a).

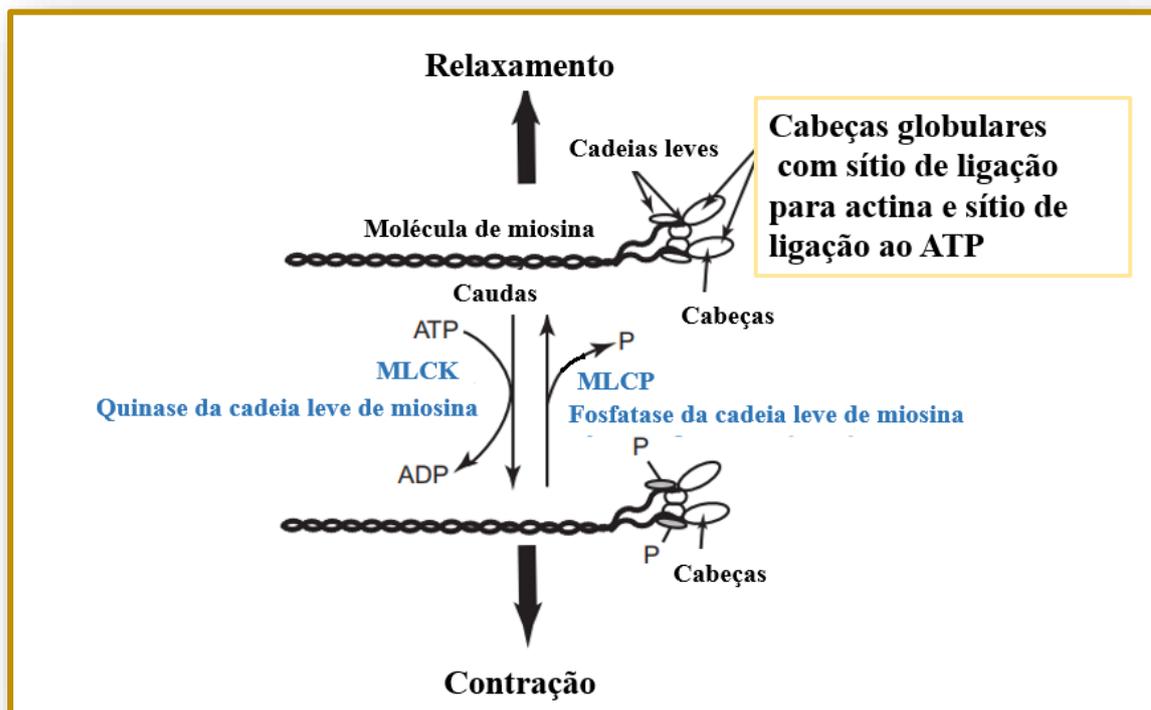


**Figura 2. Esquema representativo da organização citológica dos miócitos lisos com evidência às estruturas contráteis.** As células musculares lisas vasculares são células que possuem estrutura fusiforme com os filamentos de actina (filamentos finos) e miosina da classe II (filamentos grossos) distribuídos por todo o citoplasma, obliquamente. No detalhe aproximado, observa-se que os filamentos finos de actina possuem uma das pontas anexadas às placas densas localizadas na membrana plasmática das CMLV e a outra ponta está presa nos corpos densos, localizados no citoplasma destas células. Os filamentos de miosina estão localizados entre os filamentos de actina. Adaptado de (POLLARD; EARNSHAW, 2017).

Os filamentos de miosina compreendem uma superfamília de proteínas que interagem com os filamentos de actina e promovem a contração (geração de força) muscular com a utilização de energia proveniente da hidrólise do ATP (DASBISWAS *et al.*, 2018). Cerca de 30 classes de miosina já foram identificadas, as proteínas pertencentes a classe II, encontradas na musculatura esquelética, cardíaca e lisa, são constituídas por seis subunidades, duas cadeias pesadas de 230 kDa, que formam a estrutura caudal da proteína em  $\alpha$ -hélice e o domínio motor, formado pelas cabeças globulares, as quais possuem o sítio de ligação para a actina e o sítio de hidrólise do ATP. O filamento de miosina também é formado por dois pares de cadeia leves com tamanho de 20 kDa (MLC<sub>20</sub>)

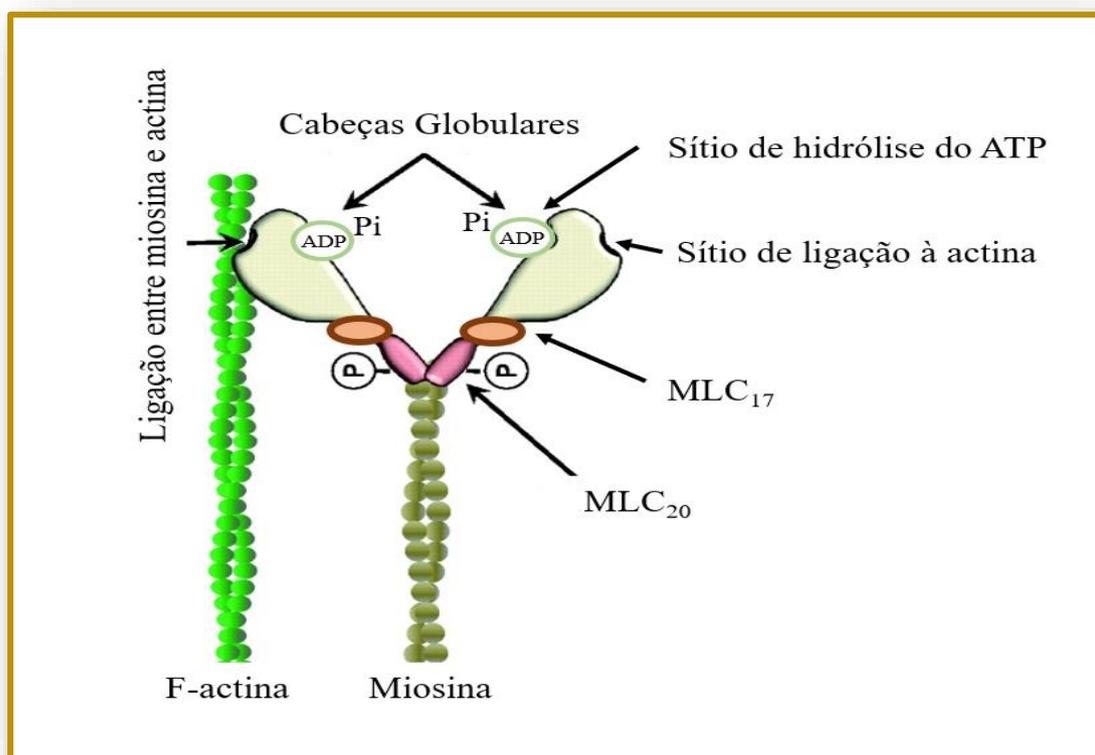
e 17 kDa (MLC<sub>17</sub>) (ALLEN; WALSH, 1994; SOMLYO; SIEGMAN, 2012) (Fig. 3 e 4). Após a fosforilação da MLC<sub>20</sub> ocorrerá formação de pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina com posterior contração (DASBISWAS *et al.*, 2018; EDDINGER; MEER, 2007).

O modelo de pontes cruzadas foi inicialmente proposto em 1971 por Lynn e Taylor, no qual, a actina foi descrita como um fator de troca de nucleotídeos dos filamentos de miosina, após a fosforilação da cadeia leve. Na ausência de nucleotídeos, a actina permanece fortemente ligada a miosina, já na presença do ATP, as pontes cruzadas entre os filamentos são desfeitas e voltam a se formar após a hidrólise do ATP em ADP + Pi (fosfato inorgânico) (Fig. 4). Apesar de existir a formação das pontes entre os filamentos de actina e miosina após a hidrólise do ATP em ADP e Pi, a ligação é do tipo fraca, sendo necessário a ausência total de nucleotídeos para o fortalecimento das pontes cruzadas e a geração de força (HOLMES GREVES 2000).



**Figura 3. Mecanismo de fosforilação e desfosforilação das cadeias leves de miosina de 20 kDa.** A miosina é um filamento complexo, formado por 6 subunidades, duas cadeias pesadas e dois pares de cadeias leves. A MLCK, quinase das cadeias leves de miosina promove a fosforilação das cadeias leves (MLC<sub>20</sub>), permitindo a formação das pontes cruzadas pela ligação entre as cabeças globulares de miosina e os filamentos de actina, com hidrólise de ATP. Fonte: adaptado de FEHER, 2017.

Os filamentos de actina, também denominados de filamentos finos, são expressos em quatro isoformas na musculatura lisa, acredita-se que apenas a alfa-actina e a gama-actina estejam envolvidas na contratilidade (CHACKO; LONGHURST, 1994; SOMLYO; SIEGMAN, 2012). Os filamentos finos são estruturas em hélice formada pela polimerização de moléculas de actina globular e estão associados a outras proteínas como a caldesmon, calponina e a tropomiosina, com algumas funções específicas. A proteína caldesmon (CAD) possui massa molecular de 90 kDa, é uma proteína de ligação ao filamento de actina e calmodulina e está envolvida na inibição da interação entre os filamentos de actina e miosina na contração da musculatura lisa (WANG, 2001). A calponina é uma proteína de 35 kDa, presente nos filamentos de actina, quando a proteína está desfosforilada, torna-se ativa, liga-se a actina e inibe a atividade da miosina ATPase (CARMICHAEL *et al.*, 1994; GERTHOFFER; POHL, 1994).



**Figura 4. Esquema representativo da interação entre os filamentos de actina e miosina após a fosforilação da cadeia leve de miosina regulatória (MLC<sub>20</sub>).** Para que ocorra a interação entre os filamentos de actina é necessário a fosforilação da cadeia leve regulatória (MLC<sub>20</sub>) pela enzima quinase das cadeias leves de miosina (MLCK), com isso, ocorre a formação de pontes cruzadas entre os filamentos de actina (F-actina) e miosina, após a hidrólise de ATP (ADP+Pi) nas cabeças globulares, localizadas no domínio motor. Cadeia leve de miosina de 17 kDa (MLC<sub>17</sub>). Adaptado de Mahn e colaboradores (2010).

### 2.1.1 Mecanismo de contratilidade dependente do aumento da concentração de $\text{Ca}^{2+}$

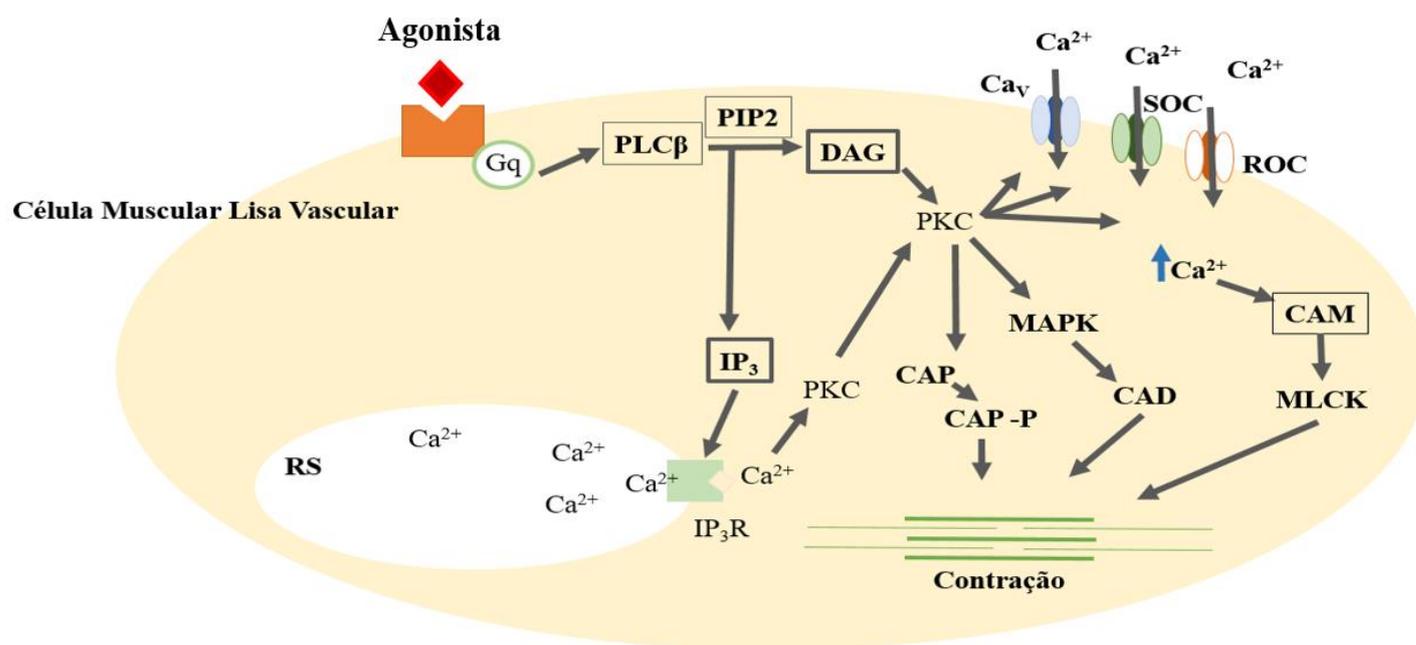
A contração das CMLV é controlada, principalmente, pelo aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma. No repouso, 140 nmol/L é a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , esse número poderá alcançar os valores de 500-700 nmol/L na presença de estímulos que promovam a contração da musculatura lisa (ALLEN; WALSH, 1994).

Moléculas vasoconstrictoras, a exemplo da fenilefrina (FEN), ativam um receptor do tipo GPCR acoplado a proteína G tipo q, cuja via de sinalização envolve a ativação da enzima fosfolipase C ( $\text{PLC}\beta$ ) responsável pela hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ), um fosfolípido da membrana, em dois segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG) e o inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). O  $\text{IP}_3$  ativa um receptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) no retículo sarcoplasmático (RS) e promove mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  deste estoque para o citoplasma, aumentando a concentração deste íon. O  $\text{Ca}^{2+}$  estimula a migração da PKC (proteína quinase C) do citoplasma para a membrana a qual se tornará ativa com a ligação ao DAG (AKATA, 2007).

A PKC é uma proteína quinase que se estrutura em um domínio regulatório N-terminal e um domínio catalítico C-terminal, possui quatro regiões, C1, C2, C3 e C4, que não variam entre as isoformas. As regiões C1 e C2 se localizam no domínio N-terminal regulatório e as demais regiões (C3 e C4) no domínio catalítico. Em artéria mesentérica de ratos, a PKC existente nas CMLV possui peso molecular de 74 kDa e se encontra inativada no citoplasma por meio de uma ligação a um pseudo-substrato no domínio regulatório, região C4, que mantém a proteína em uma conformação inativa. O aumento concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  favorece a ligação deste íon a região C2 da PKC estimulando o seu deslocamento para a membrana onde se liga, pela região C1, ao DAG tornando-se ativa (RINGVOLD; KHALIL, 2017).

A via de sinalização estimulada pela PKC (Fig. 5) desencadeia o aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  por meio da ativação de alguns canais na membrana plasmática, como, os canais sensíveis a voltagem ( $\text{Cav}$ ), os operados por estoque (SOC) e os ativados por receptor (ROC) (TOUYZ *et al.*, 2018). A elevação na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  possibilita a ligação deste íon a calmodulina (CAM), uma proteína pequena de 16,7 kDa que possui quatro sítios de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$  (KOLEDOVA; KHALIL, 2006). A formação do complexo de ligação  $4\text{Ca}^{2+}$ -CAM desencadeia uma mudança conformacional na proteína quinase da

cadeia leve de miosina (MLCK), a qual torna-se ativa e fosforila o resíduo Ser-19 da cadeia leve de miosina (MLC<sub>20</sub>) que promove a formação de pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina, conforme descrito anteriormente, possibilitando a contração (PFITZER, 2001).



**Figura 5. Representação esquemática da contração das células musculares lisas vasculares com a estimulação do aumento da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup>.** A ligação de um agonista ao receptor de membrana tipo GPCR acoplado a proteína Gq desencadeia a ativação da fosfolipase C (PLCβ) responsável pela hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>). A ativação do receptor sensível ao IP<sub>3</sub> ou IP<sub>3</sub>R no retículo sarcoplasmático (RS), promove a mobilização do cálcio deste estoque, que aumenta sua concentração no citoplasma e liga-se a PKC, favorecendo o deslocamento desta proteína quinase para a membrana onde será ativada pelo diacilglicerol (DAG). A PKC ativa a contração das células musculares lisas vasculares (CMLV) por meio da ativação do influxo de cálcio via estimulação da abertura dos canais sensíveis a voltagem (Ca<sub>v</sub>), dos canais sensíveis ao estoque de cálcio (SOC) e dos canais sensíveis a receptor (ROC), quatro íons cálcio irão se ligar a calmodulina (CAM) formando um complexo com posterior ligação e ativação da quinase das cadeias leves de miosina (MLCK), que irá fosforilar as cadeias leves de miosina e promover contração. A PKC também fosforila diretamente a proteína calponina (CAP) nos filamentos finos e assim promove contração por inibição da ação desta proteína. De forma similar, a ativação da quinase ativada por mitógeno (MAPK) também promove a fosforilação da proteína caldesmon (CAD), que também está presente nos filamentos finos, e posterior contração, uma vez que ao ser fosforilada a caldesmon é inibida (HYNYNEN; KHALIL, 2006). Fonte: próprio autor.

A PKC também promove a contração por fosforilar diretamente a proteína calponina, presente nos filamentos de actina, que normalmente iria inibir a miosina ATPase e conseqüentemente a contração. Também foi descrito que a PKC promove aumento da contração das CMLV por meio do estímulo da fosforilação da proteína caldesmon via MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), acredita-se que a PKC estimula o deslocamento do citoplasma para a membrana das proteínas quinases MEK e MAPK que formarão um complexo seguido de fosforilação da MEK pela PKC e posteriormente fosforilação da MAPK pela MEK. A MAPK ativada, fosforila a caldesmon nos filamentos finos e inibe a atividade desta proteína, que normalmente iria inibir a atividade da miosina ATPase (RINGVOLD; KHALIL, 2017).

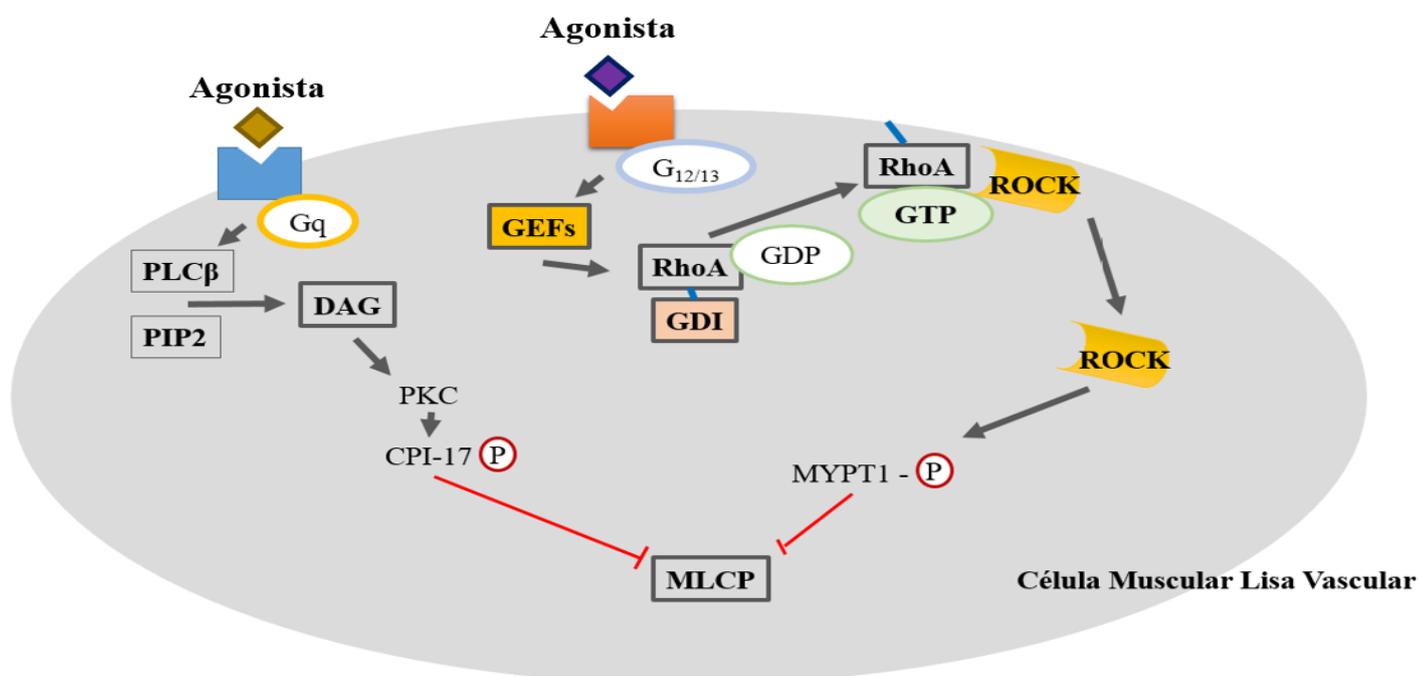
### 2.1.2 Mecanismo de contratilidade em baixa concentração de $\text{Ca}^{2+}$

A contração das CMLV poderá ocorrer em baixa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  por um mecanismo denominado de sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 6), que ocorre por meio da inibição da atividade da proteína denominada de fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP) (KUO; EHRLICH, 2015). Fisiologicamente, a atividade da MLCP promove a desfosforilação da  $\text{MLC}_{20}$  e inibição da contração muscular lisa. Vias de sinalização que regulem a atividade da MLCP favorecem a contração ao inibirem a desfosforilação da  $\text{MLC}_{20}$ , sendo este o mecanismo que promove a contração das CMLV na concentração transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Duas vias de sinalização, ao serem ativadas, promovem a inibição da MLCP e estão envolvidas na sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$ , uma delas é a DAG-PKC, estimulada pela interação de um agonista com o receptor acoplado a proteína G, e a outra, é a via RhoA/ROCK, que pode ser ativada pela proteína  $G_{\alpha_{12/13}}$  (KUO; EHRLICH, 2015; SOMLYO; SOMLYO, 2003).

A fosfatase MLCP é uma enzima que se estrutura em três subunidades, uma catalítica de 38 kDa, uma subunidade regulatória de 110 a 130 kDa denominada de MYPT1 e uma terceira subunidade de 20 kDa (HIRANO; HIRANO; KANAIDE, 2004). A atividade desta fosfatase é inibida por uma proteína de 17 kDa, a CPI-17 cuja fosforilação é estimulada pela PKC (RINGVOLD; KHALIL, 2017a). Outra via de inibição da atividade da MLCP ocorre com a atividade da RhoA/ROCK, a RhoA é uma pequena proteína com

peso molecular de 20 kDa, pertencente a família das GTPases monoméricas, que permanece inativada no citoplasma, formando o complexo GDP-RhoA-GDI até que os fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) catalisem a ativação da RhoA-GTP que será deslocada para a membrana plasmática onde ativa a ROCK (CAI; LI; ZHOU, 2016; SOMLYO; SOMLYO, 2003).

A ROCK é uma proteína quinase que sofre uma mudança conformacional a partir da ligação com a RhoA-GTP, essa alteração na conformação permite a ativação da proteína por autofosforilação. A ROCK ativa promove a inibição da atividade da MLCP por meio da fosforilação do domínio regulatório MYPT1 causando a sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$  da maquinaria contrátil e contração das CMLV (PFITZER, 2001; SOMLYO; SOMLYO, 2003).



**Figura 6. Representação esquemática da contração das células musculares lisas vasculares por meio da sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$ .** As CMLV poderão contrair em baixa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  por um mecanismo de sensibilização a este íon. A inibição da enzima fosfatase das cadeias leves de miosina (MLCP) leva a inativação da desfosforilação de tais cadeias permitindo a contração celular. Duas vias de sinalização atuam neste processo, a principal delas é a via RhoA/ROCK, cuja a ativação ocorre por meio da interação entre um agonista e o receptor de membrana acoplado a proteína  $G_{12/13}$  que ativa os fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs), promovendo a troca do GDP por GTP ativando a RhoA-GTP que será fixada na membrana onde se ligará a proteína quinase ROCK, a ligação entre a RhoA-GTP e ROCK promove uma alteração conformacional nesta última que se autofosforila. A ROCK ativada irá fosforilar a subunidade regulatória, o MYPT1 da MCLP, além de estimular o CPI-17 que também promoverá a inibição da MLCP. A proteína quinase C (PKC), promove inibição da MCLP por meio da fosforilação da proteína CIP-17 (PORRAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2017). Fonte: próprio autor

## 2.2. PAPEL DO ENDOTÉLIO VASCULAR NO VASORRELAXAMENTO ARTERIAL

As células endoteliais constituem uma monocamada de tecido epitelial que reveste a luz dos vasos sanguíneos e linfáticos. Na parede arterial formam a túnica íntima que está justaposta com as CMLV adjacentes, as quais, compõem a túnica média destes vasos (LOH *et al.*, 2018; WONG *et al.*, 2017).

No passado, acreditava-se que a função endotelial estava restrita apenas as de manter a estrutura vascular, permitir a passagem de micromoléculas do sangue para o interstício e a manutenção da fluidez sanguínea no compartimento vascular (HIGASHI, 2015). Desse modo, pouca importância foi dada a funcionalidade do endotélio.

Atualmente tem sido demonstrado que o endotélio apresenta múltiplas funções, indicando que o mesmo é um órgão dinâmico e estruturalmente complexo. O endotélio vascular participa de várias funções no sistema cardiovascular, como por exemplo, estimulação da angiogênese, controle da proliferação das CMLV, homeostase e coagulação, manutenção da perfusão tecidual e modulação do estado de contratilidade das CMLV (JOURDE-CHICHE *et al.*, 2019).

Estruturalmente, a membrana plasmática das células endoteliais (CE) apresenta microdomínios especializados, essenciais nas respostas celulares por agruparem canais iônicos e outras proteínas envolvidas em vias de sinalização. Estas estruturas são invaginações de membrana, denominadas de cavéolas, as quais são amplamente expressas nestas células, ocorrendo em um número de 80 por cada  $\mu\text{m}$  na membrana plasmática das CE (GRATTON; BERNATCHEZ; SESSA, 2004; LEO *et al.*, 2020a). Identificadas há mais de 50 anos, a partir do melhoramento de técnicas de microscopia, as cavéolas são invaginações circulares, semelhantes a balões, que podem medir de 50 - 100 nm de diâmetro, possuem lipídios específicos (colesterol e esfingolipídios) e a caveolina, como principal proteína. Existem seis isoformas da caveolina (tipo 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 2 $\alpha$ , 2 $\beta$ , 2 $\gamma$  e 3). Acredita-se que isoforma 1 (Cav-1) e a isoforma 3 (Cav-3) são proteínas essenciais para a estrutura e formação das cavéolas, já a isoforma 2 (Cav-2) está associada com a Cav-1, participando da estruturação do microdomínio, porém não é essencialmente necessária. A Cav-1 está envolvida com a ligação e inativação da enzima sintase de NO, isoforma

endotelial (eNOS), que em resposta ao atrito causado pelo fluxo sanguíneo, a tensão de cisalhamento na parede arterial, desprende-se da enzima que poderá ser ativada e produzir NO (LEO *et al.*, 2020b). A isoforma 3 (Cav-3) está presente, predominantemente, em células musculares, especialmente na musculatura lisa vascular e no tecido cardíaco, como já reportado, fornecendo estruturação as cavéolas nestes tecidos (FILIPPINI; SICA; D'ALESSIO, 2018; RESNICK *et al.*, 2003; STAN, 2002).

O endotélio vascular modula o estado de contratilidade das CMLV por sintetizar e liberar moléculas que irão desencadear vasodilatação ou vasoconstrição, os quais irão ativar sítios de ligação específicos nas células musculares lisas que compõem a túnica média arterial. As moléculas que causam vasorrelaxamento são denominadas de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e são principalmente, o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). Recentemente o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e o sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) também foram considerados como EDRFs (LOH *et al.*, 2018).

#### ✓ Óxido Nítrico

O NO é uma molécula gasosa solúvel envolvida em múltiplos processos biológicos, sendo sintetizado em células endoteliais (CE), neuronais e do sistema imunológico pela atividade da enzima sintase de NO (NOS). Existem três isoformas diferentes das NOS, a eNOS com massa molecular de 133 kDa, foi a primeira isoforma descrita em CE, a nNOS de massa molecular de 161 kDa, predominantemente encontrada no tecido neuronal, são as duas isoformas expressas de maneira constitutiva e a iNOS com 130 kDa de massa molecular, que é ativada principalmente no processo inflamatório (AHMAD *et al.*, 2018; ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; GARCIA; STEIN, 2006).

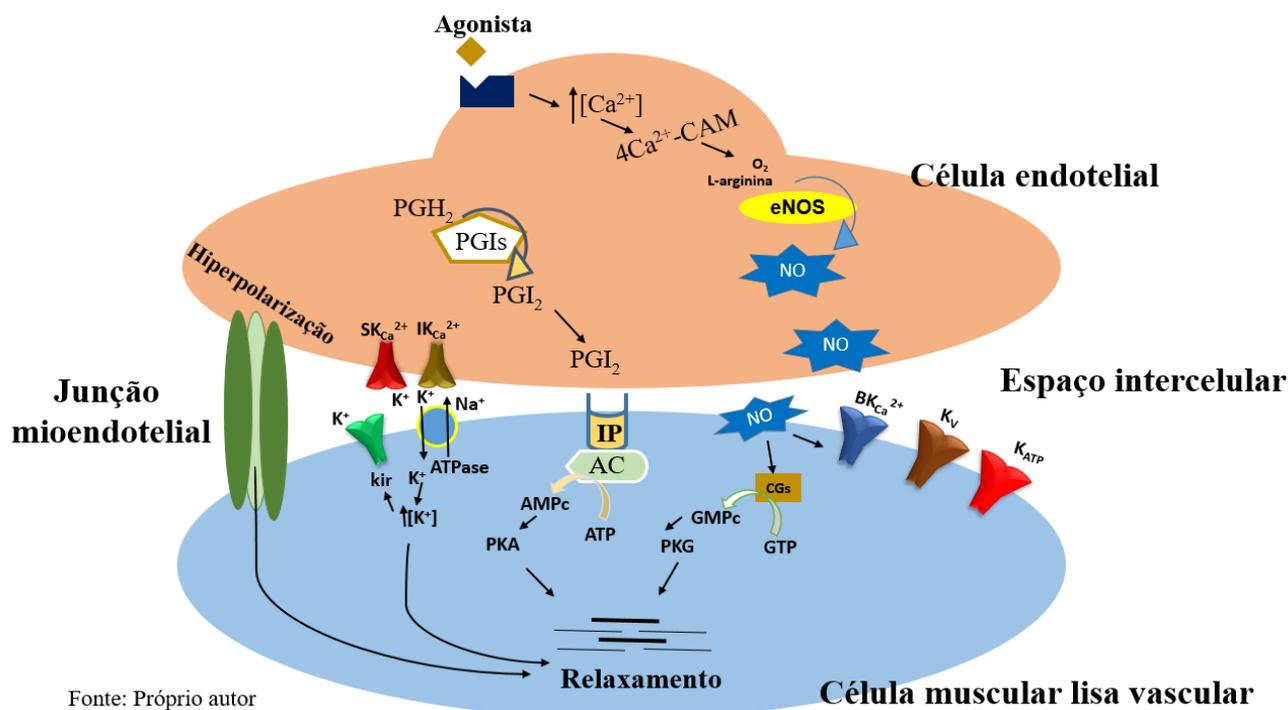
A estimulação da produção de NO promove múltiplos efeitos benéficos em modelos experimentais, especialmente no sistema cardiovascular, como por exemplo, atividade anti-hipertrofica em animais com hipertrofia ventricular esquerda (HVE), efeito cardioprotetor nas lesões de isquemia e reperfusão e efeito modulador do tônus vascular das CMLV causando vasorrelaxamento (JUGDUTT, 2002; PALMER; ASHTON;

MONCADA, 1988; SIMKO; SIMKO, 2000; TOTZECK; HENDGEN-COTTA; RASSAF, 2017).

Os efeitos do NO no sistema cardiovascular ocorrem mediante ativação de duas vias de sinalização distintas, na primeira delas, a molécula de NO pode desencadear o processo de S-nitrosilação de proteínas, o qual consiste na ligação entre o NO e um átomo de enxofre do resíduo de cisteína para formar um S-nitrositiol, esse processo é responsável por modificar a atividade e estabilidade da proteína (LEE *et al.*, 2012). Por exemplo, o NO pode inibir a condutância e o estado de abertura dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem do tipo L no coração, por meio da S-nitrosilação, e conseqüentemente, promover redução da contratilidade miocárdica (GONZALEZ *et al.*, 2009).

O NO também ativa a enzima ciclase de guanilil solúvel (CGs) que se localiza no citoplasma das CMLV. A CGs é uma proteína estruturada em duas subunidades homólogas,  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ , a região C-terminal de ambas se combinam para formar o domínio catalítico heterodimérico e na presença da ligação do NO ao grupamento heme na subunidade  $\beta 1$ , ocorre uma mudança conformacional que desencadeia a ativação do domínio catalítico promovendo a produção do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) a partir do trifosfato de guanosina (GTP) (DASGUPTA *et al.*, 2015; POTTER, 2011).

O GMPc é um segundo mensageiro responsável por ativar a proteína quinase G (PKG), que na musculatura lisa vascular desencadeia vasorrelaxamento por reduzir a concentração intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$ . A PKG fosforila a fosfolamban aumentando a recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$  para o RS por meio da desinibição da SERCA, estimula a hiperpolarização da membrana, por meio da abertura dos canais para  $\text{K}^{+}$  sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  de grande condutância ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) e conseqüentemente fechamento dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem (Fig. 7) (FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018).



Fonte: Próprio autor

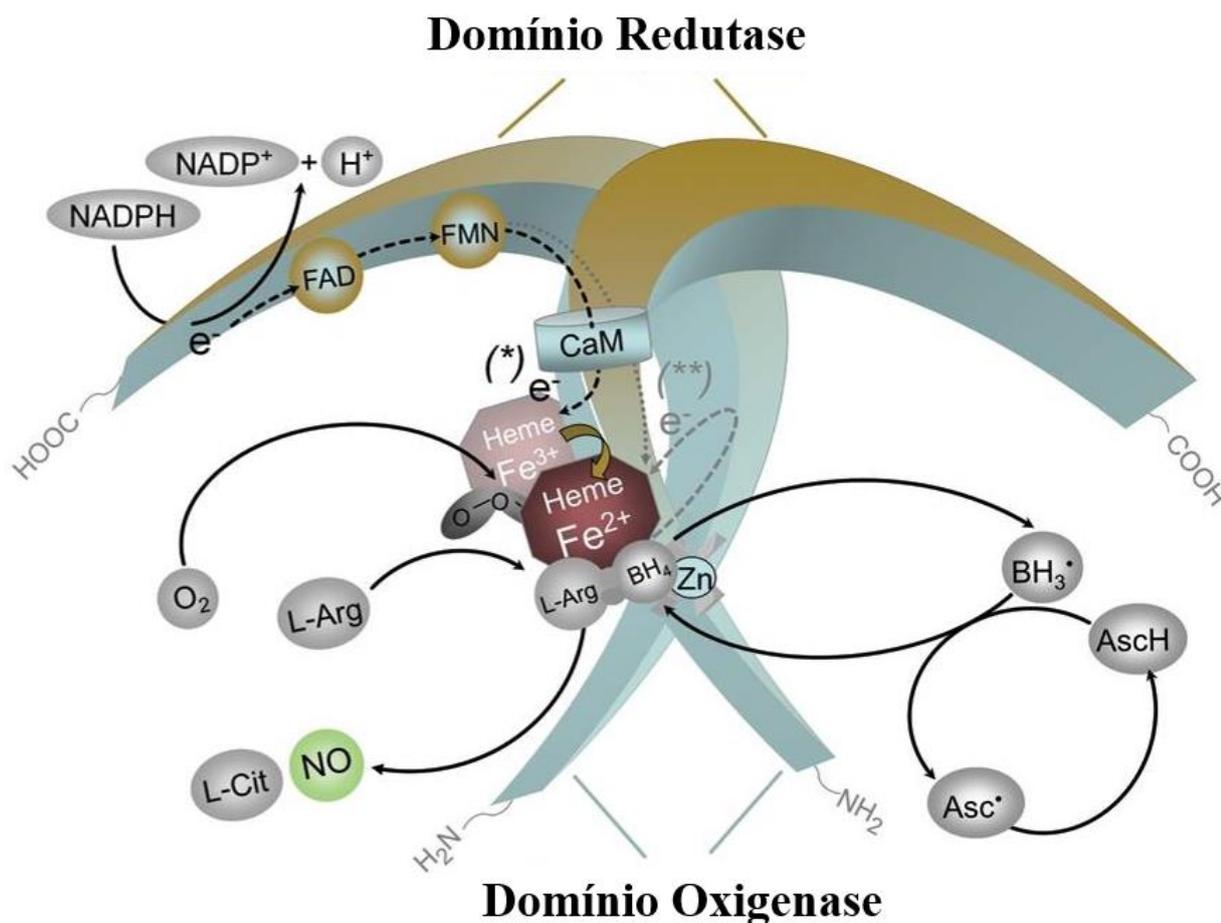
**Figura 7. Esquema representativo da modulação do estado de contratilidade das células musculares lisas vasculares, por meio do endotélio vascular.** Na parte superior, demonstra-se a célula endotelial (CE), a qual sintetiza e libera múltiplas moléculas responsáveis pela modulação do tônus vascular. No vasorrelaxamento, com o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ , estimulada pela interação entre um receptor da membrana plasmática e um agonista, por exemplo a acetilcolina e o receptor  $M_3$ , ocorre a formação do complexo  $4Ca^{2+}$ -CAM (ligação de quatro íons  $Ca^{2+}$  com a proteína calmodulina) e posterior ativação da NOS que sintetiza NO a partir do aminoácido L-arginina, na presença de  $O_2$  (oxigênio molecular), utilizando como fonte de energia o NADPH (nicotinamida dinucleotídeo fosfato). O NO difunde-se pelas membranas da CE e nas CMLV promove ativação do efluxo de  $K^+$  por meio da S-nitrosilação dos canais  $BK_{Ca}$ , além de se ligar a ciclase de guanilil solúvel (CGs), uma enzima que produz GMPc a partir de GTP, o GMPc é um segundo mensageiro que ativa a proteína quinase G (PKG) que desencadeia vasorrelaxamento por aumentar a recaptação de  $Ca^{2+}$  para o RS por fosforilação da fosfolamban e ativação da  $Ca^{2+}$ ATPase do RS (SERCA) e promove a inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  via canais para  $Ca^{2+}$  tipo L. Outro mecanismo que desencadeia vasorrelaxamento é a síntese de  $PGI_2$  formada a partir da clivagem do ácido araquidônico (AA) pela ação enzimática da sintase de prostaciclina (PGIs) a partir da prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ) no endotélio. A ativação do receptor IP nas CMLV estimulado pela  $PGI_2$  desencadeia a ativação da ciclase de adenilil (AC) que promove a produção de AMPc a partir do ATP, o AMPc é um segundo mensageiro que ativa uma proteína quinase denominada de PKA. PKA causa vasodilatação por ativar múltiplos mecanismos, um deles é a fosforilação da RhoA no resíduo Ser188, translocando a proteína para o citoplasma de modo a inibir a ativação da proteína quinase ROCK que iria estimular a contração das CMLV. A PKA também ativa o efluxo de  $K^+$ , hiperpolarizando a membrana plasmática, e assim inibe o influxo de  $Ca^{2+}$ . As junções mioendoteliais estão implicadas no vasorrelaxamento por promoverem a comunicação entre a CE e a CMLV, estas junções possibilitam a passagem de íons e pequenas moléculas e podem transferir o potencial de membrana do endotélio para a musculatura lisa adjacente. Os canais para  $K^+$  de baixa e intermediária condutância,  $SK_{Ca}$  e  $IK_{Ca}$ , respectivamente, são ativados pelo aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  e desencadeiam o efluxo de  $K^+$  que se acumula na face intercelular (entre a célula endotelial e a musculatura lisa vascular), o aumento da concentração de  $K^+$  aumenta a atividade da bomba  $Na^+/K^+$  ATPase com acúmulo de  $K^+$  no citoplasma das CMLV, esse íon ativará os canais para potássio retificadores internos ( $K_{ir}$ ) que promoverão o efluxo de  $K^+$ , consequentemente hiperpolarização da membrana das CMLV e assim contribuem para o vasorrelaxamento (MURTHY, 2006; PFITZER, 2001; ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015) Fonte: próprio autor.

O NO é sintetizado pela eNOS, primeira isoforma identificada nas células endoteliais vasculares. A forma ativa para a síntese de NO pela enzima é a estruturação em dímeros promovida pelo íon zinco, que estabiliza as duas unidades monoméricas (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; SULLIVAN; POLLOCK, 2003) (Fig. 8).

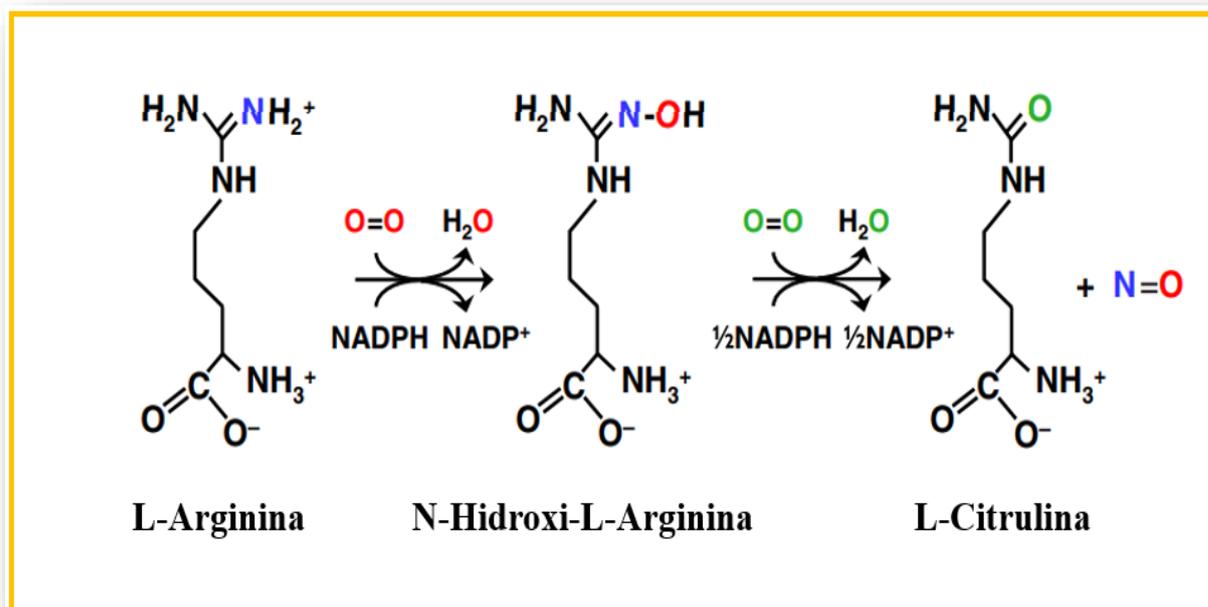
Nesta conformação, observa-se a existência de duas regiões distintas na proteína, um domínio redutase (C-terminal) e um domínio oxigenase (N-terminal), de 74 e 102 kDa de massa molecular, respectivamente. Alguns cofatores são essenciais para a síntese de NO, são eles, a tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), o mononucleotídeo de flavina (FMN) e o ferro protoporfirina IX (heme). O domínio oxigenase possui sítios de ligação para o BH<sub>4</sub>, a L-arginina, e o heme, já no domínio redutase há sítios de ligação para FMN, o FAD e a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) (FLEMING, 2010; FORSTERMANN; SESSA, 2012).

A síntese de NO ocorre após elevação da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> e formação do complexo 4Ca<sup>2+</sup>- CAM que estimula a liberação dos monômeros ligados a CAV-1 nas cavéolas e formação da estrutura em dímero. O complexo 4Ca<sup>2+</sup>- CAM facilita a transferência de elétrons do NADPH para as flavinas e destas para o grupo heme férrico (Fe<sup>3+</sup>) o qual se liga ao oxgênio molecular e então se oxida a Fe<sup>2+</sup> (heme ferroso), no domínio oxigenase, que catalisa a conversão do aminoácido L-arginina e O<sub>2</sub> em L-citrulina, com a liberação de NO (FORSTERMANN; SESSA, 2012; POULOS; LI, 2017).

As reações de síntese de NO ocorrem no domínio oxigenase, mais precisamente no grupo heme e caracterizam-se em duas reações consecutivas, inicialmente o aminoácido L-arginina é hidroxilado em N<sup>o</sup>-hidroxi-L-Arginina (NOHA) que posteriormente é convertida em L-citrulina com liberação de NO, em ambas as reações a fonte de elétrons é o NADPH e ocorrem na presença do O<sub>2</sub> (ROUSSEAU *et al.*, 2005) (Fig. 9).



**Figura 8. Esquema representativo da estrutura molecular das sintases de óxido nítrico (NOS) e produção de óxido nítrico (NO).** As enzimas sintases de óxido nítrico apresentam homologia em cerca de 50-60% na estrutura entre as isoformas. A isoforma endotelial eNOS é mais expressa no endotélio vascular e se encontra nas cavéolas ligadas à caveolina 1 (CAV-1) em unidades monoméricas, esta ligação inibe a interação entre a calmodulina e a eNOS em baixa concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para a síntese de NO é essencial a formação dimérica entre duas subunidades monoméricas, essa conformação é estimulada pelo complexo  $4\text{Ca}^{2+}$ - calmodulina que promove o desligamento entre os monômeros da eNOS com a CAV-1 e, posteriormente, a formação da estrutura em dímero estabilizado pelo íon zinco (Zn). No dímero, dois domínios são identificados, o domínio redutase, onde se ligam os cofatores flavina adenina dinucleotídeo (FAD), o mononucleotídeo de flavina (FMN) e há a transferência de elétrons da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) para as flavinas. Os elétrons são transferidos para o grupo heme férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) que se liga ao oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), há a formação do heme ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) – dióxido, que nesta fase se liga ao substrato L-arginina (L-Arg) e o cofator ( $\text{BH}_4$ ), posteriormente há a síntese de NO e do aminoácido L-citrulina (L-Cit). O ácido ascórbico (AscH) pode reduzir a trihidrobiopterina ( $\text{BH}_3$ ) e formar o cofator tetrahydrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ) (FLEMING, 2010). Fonte: adaptado de Forstermann; Sessa (2012).



**Figura 9. Representação esquemática das reações para a síntese de óxido nítrico (NO) catalisada pela sintase de óxido nítrico (NOS).** Inicialmente o aminoácido L-Arginina sofre hidroxilação e é convertida em N-hidroxi-L-Arginina (NOHA) com a utilização de dois elétrons do NADPH e uma molécula de O<sub>2</sub>. Na segunda reação, a NOHA é convertida em L-Citrulina também com a utilização de um elétron do NADPH na presença de O<sub>2</sub>, com liberação de NO. Fonte: adaptado de ROUSSEAU *et al.*, 2005

#### ✓ Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)

As primeiras análises sobre a participação da PGI<sub>2</sub> na redução da contratilidade vascular induzindo vasorrelaxamento ocorreram com a utilização de preparações contendo artéria coronária e posteriormente aorta, publicados por Dusting e colaboradores (1977) e Gryglewski e colaboradores (1986).

A síntese de PGI<sub>2</sub> ocorre no endotélio a partir da atividade enzimática da sintase de prostaciclina (PGIS), uma enzima pertencente a superfamília do citocromo P450 (LI, *et al.*, 2008). Esta enzima catalisa a conversão da prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), proveniente da ação da ciclo-oxigenase (COX) sobre o ácido araquidônico (AA), em PGI<sub>2</sub>. Para a síntese de PGI<sub>2</sub> é necessário a produção de AA na célula endotelial, o qual é sintetizado a partir da clivagem de fosfolipídios de membrana plasmática pela atividade da enzima PLA<sub>2</sub> e também por meio da hidrólise do DAG, pela enzima lipase de diacilglicerol que o convertem em um precursor do AA, o 2-araquidonilglicerol (REISENBERG *et al.*, 2012).

A PGI<sub>2</sub> sintetizada no endotélio irá interagir com um receptor de membrana na CMLV, denominado de receptor IP, o qual é acoplado a proteína Gs (Fig.7), a ativação deste receptor irá estimular a produção do segundo mensageiro o AMPc por meio da enzima ciclase de adenilil (AC) a partir do ATP. O AMPc ativará uma proteína quinase dependente dele, a proteína quinase A (PKA), que irá desencadear vasorrelaxamento por meio da ativação do efluxo de K<sup>+</sup>, uma vez que fosforila os canais para K<sup>+</sup> ativados pelo Ca<sup>2+</sup> de grande condutância (BK<sub>Ca</sub>) e os canais para K<sup>+</sup> sensíveis a voltagem (K<sub>V</sub>). A PKA também inibe a formação do complexo entre o Ca<sup>2+</sup> e a CAM que não ativará a MLCK e consequentemente a contração das CMLV (FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011; LOH *et al.*, 2018).

#### ✓ Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF)

Na década de 80, alguns pesquisadores observaram que a ACh desencadeava efeito vasorrelaxante em preparações de anéis de artéria isolada de coelho e que tal efeito foi reduzido e até inexistente após a fricção da luz interna do vaso. Posteriormente, ficou evidente que as CE apresentavam relaxamento estimulado por ACh a partir da síntese e liberação de um fator relaxante derivado do próprio endotélio, o qual recebeu a denominação, *endotelium derived relaxing factor*, do inglês (EDRF), pouco tempo depois, foi postulado que esse fator é o NO (VANHOUTTE, 2004).

Mais tarde, outros colaboradores, determinaram que além o NO, a PGI<sub>2</sub> também desencadeava um efeito vasorrelaxante em algumas preparações vasculares, por meio da ativação a produção de AMPc na musculatura lisa. Porém, em outros experimentos, ao inibir a produção de NO e PGI<sub>2</sub> os anéis vasculares continuavam relaxando na presença da ACh. Desse modo, passou-se a acreditar na existência de uma terceira via de sinalização responsável pelo efeito vasodilatador adicional, além das moléculas conhecidas. A CE ativa um mecanismo de hiperpolarização que é transferido para as CMLV favorecendo o vasorrelaxamento (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006).

Em preparações vasculares das artérias carótida e coronária o bloqueio da produção de NO e PGI<sub>2</sub> não inibiu de maneira total o vasorrelaxamento estimulado pela ativação dos receptores muscarínicos M<sub>3</sub> induzido por ACh, e a aferição do potencial de membrana das

CMLV evidenciou uma hiperpolarização após a adição do agonista muscarínico na preparação com endotélio vascular, evidenciando a existência de um mecanismo hiperpolarizante derivado do endotélio estimulado pela ACh (CORRIU *et al.*, 1998).

O aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na CE desencadeia a ativação dos canais para  $\text{K}^+$  sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  de baixa condutância ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ) e de intermediária condutância ( $\text{IK}_{\text{Ca}}$ ) conforme demonstrado na figura 7. Esses canais quando abertos promovem o efluxo dos íons  $\text{K}^+$  e hiperpolarização da membrana da CE, esta hiperpolarização é transferida para as CMLV por meio das junções mioendoteliais, causando hiperpolarização da membrana das CMLV e posterior inativação dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006).

A ativação do efluxo de  $\text{K}^+$  mediado pelos canais  $\text{IK}_{\text{Ca}}$  localizados na membrana da CE voltados para o espaço intercelular entre o endotélio e as CMLV, aumenta a concentração de  $\text{K}^+$  entre essas células desencadendo aumento da função da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase, que promoverá o aumento a concentração de  $\text{K}^+$  no citoplasma das CMLV. A elevação da concentração de  $\text{K}^+$  ativa os canais para potássio retificadores internos ( $\text{Kir}$ ), os quais permitem o efluxo de potássio e hiperpolarização da membrana das CMLV culminando em vasorrelaxamento (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009; TYKOCKI; BOERMAN; JACKSON, 2017) (Fig. 7).

Outra molécula, o sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) é produzida endogenamente e tem sido alvo de interesse de muitos grupos de pesquisa em demonstrar suas atividades biológicas. O  $\text{H}_2\text{S}$  é sintetizado a partir do aminoácido L-cisteína, pela atividade de três enzimas, a saber, a cistationina  $\beta$ -sintase (CBS), a cistationina  $\gamma$ -liase (CSE) e a sulfurtransferase 3-mercaptopiruvato (3-MST), esta última enzima, produz  $\text{H}_2\text{S}$  a partir da conversão do 3-mercaptopiruvato, proveniente da degradação da L-cisteína pela ação da enzima cisteína amino transferase (CAT) (DUNN *et al.*, 2016; KANAGY; SZABO; PAPAPETROPOULOS, 2017).

A CBS e a CSE são enzimas encontradas no citoplasma formadas por quatro subunidades idênticas (homotetrâmerica) dependentes da vitamina  $\text{B}_6$  (fosfato de piridoxal) e a primeira possui como cofator o grupo heme. A CBS possui três domínios estruturais, o N-terminal que liga-se ao grupo heme e a vitamina  $\text{B}_6$ , um domínio central, denominado de domínio catalítico, onde a L-cisteína é condensada a homocisteína para formar a

cistationina e o H<sub>2</sub>S e um domínio C-terminal, que é o domínio regulatório da enzima (GIMÉNEZ-MASCARELL *et al.*, 2018).

A enzima CSE não possui como cofator o grupo heme e a baixa concentração de Ca<sup>2+</sup> regula a atividade desta enzima. A formação de H<sub>2</sub>S pela CSE ocorre por meio da hidrólise da L-cisteína com formação de íons de amônia e pituvato ou a L-cisteína pode ser convertida em tiocisteína e posteriormente convertida em H<sub>2</sub>S e cisteína. A 3-MST, também é uma enzima encontrada no citoplasma e para sintetizar o H<sub>2</sub>S requer a formação do mercaptopiruvato pela ação da enzima cisteína aminotransferase (CAT) a partir do  $\alpha$ -cetogluturato (DUNN *et al.*, 2016).

Em conjunto com outras moléculas vasoativas, o H<sub>2</sub>S, modula o tônus da musculatura lisa vascular em artéria mesentérica. Acredita-se que o H<sub>2</sub>S ative os canais para potássio de baixa e intermediária condutância, SK<sub>Ca</sub> e IK<sub>Ca</sub>, nas CE e favoreça a transferência de hiperpolarização das CE para as CMLV, via junções mioendoteliais ou aumento da concentração de K<sup>+</sup> na face intercelular e consequentemente hiperpolarização, conforme já assinalado. Também há evidências da hiperpolarização da membrana plasmática das CMLV por meio da ativação pelo H<sub>2</sub>S dos canais para K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP (K<sub>ATP</sub>) e sensíveis ao Ca<sup>2+</sup> de grande condutância (BK<sub>Ca</sub>) (DUNN *et al.*, 2016). No estudo publicado por Morales-Loredo e colaboradores (2019), ficou evidente que a inibição da CSE com 30 mg/kg de  $\beta$ -cianoalanina (BCA), um inibidor não específico das enzimas que sintetizam o H<sub>2</sub>S, em ratos conscientes aumentou a pressão arterial média dos animais, assim como a resistência arterial mesentérica, sugerindo que o H<sub>2</sub>S participa da modulação do estado de contratilidade das CMLV neste leito vascular.

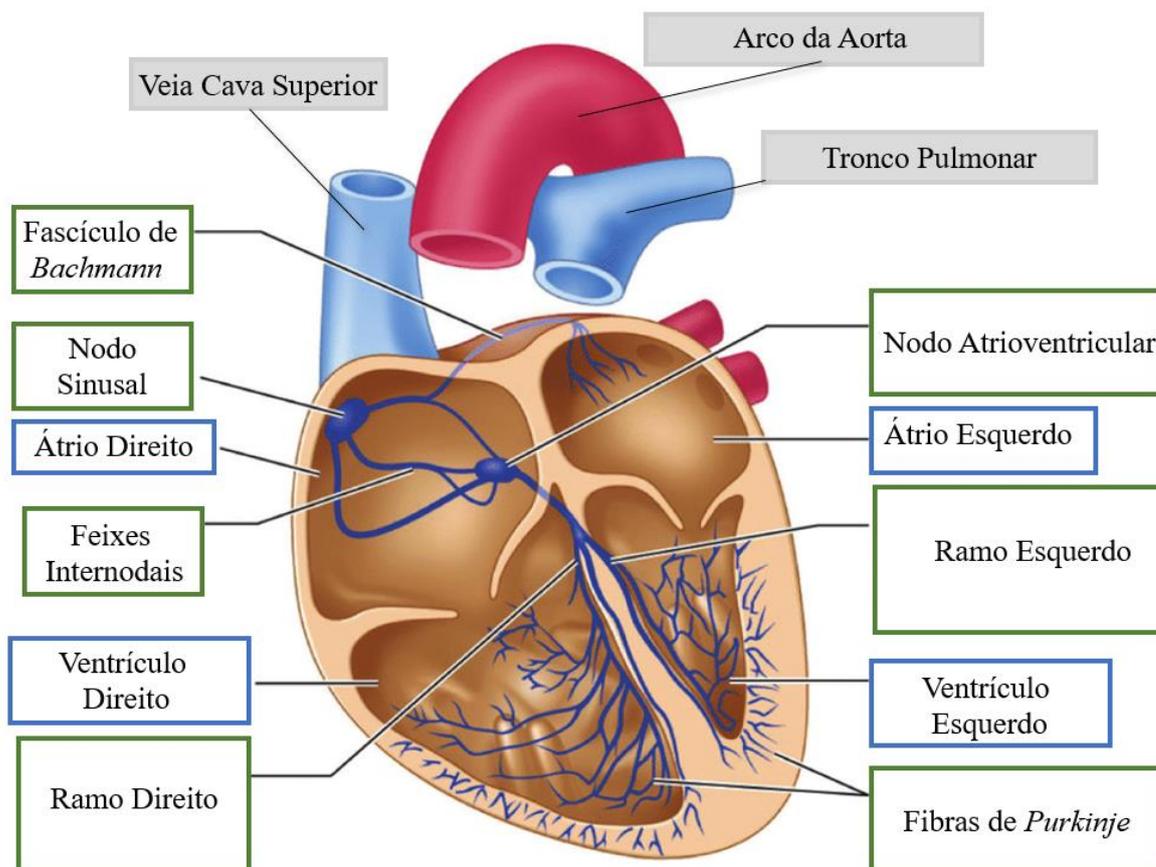
Além dos mecanismos envolvidos no controle da contratilidade vascular, o coração regula a pressão arterial, uma vez que o débito cardíaco (DC) é estabelecido por meio da geração e da condução do impulso elétrico, no sistema de condução elétrico do coração.

### **2.3 ATIVIDADE ELÉTRICA DO CORAÇÃO E FORMAÇÃO DAS ONDAS, INTERVALOS E SEGMENTOS ELETROCARDIOGRÁFICOS**

Por muitos anos, muitos pesquisadores tentaram explicar por que o coração fora do organismo permanecia batendo durante alguns minutos. Porém, foi em 1887 que Augustus

D. Waller, utilizando eletrodos em tubos de salina registrou algumas curvas de atividade elétrica do coração humano. No início do século XX (1903), Willem Einthoven conseguiu demonstrar que o coração possui atividade elétrica própria capaz de estimular a contratilidade, por meio da famosa teoria do triângulo de Einthoven, fato que revolucionou a medicina na época, uma vez que patologias cardíacas foram identificadas, efeitos tóxicos de alguns medicamentos foram testados e tipos de arritmias começaram a ser estudados, caracterizados e classificados (LÜDERITZ; DE LUNA, 2017). As descobertas de Einthoven sobre a atividade elétrica do coração renderam a este pesquisador o prêmio Nobel de fisiologia, no ano de 1924 (PAL, 2019).

O coração possui a capacidade de gerar e conduzir os impulsos elétricos de modo a garantir a contratilidade rítmica dos cardiomiócitos. Essa característica é possibilitada por meio da existência de um sistema de geração e condução do impulso elétrico do coração (Fig. 10) que se origina no átrio direito, abaixo do óstio da veia cava superior, em uma estrutura denominada de nó sinusal, ou nodo sinoatrial. Desta estrutura partem fibras de tecido de condução para o átrio esquerdo, denominada de fascículo de *Bachmann*, e três feixes de fibras intermodais para o nódo atrioventricular, que corresponde ao único ponto de comunicação elétrica entre os átrios e os ventrículos, o nodo atrioventricular e o feixe comum de His correspondem a junção atrioventricular. Após o feixe comum de His, no septo interventricular, há a divisão do sistema de condução elétrico do coração em ramo direito e ramo esquerdo, os quais se encerram nas fibras de *Purkinje*, estrutura que se insere nas paredes dos ventrículos (FEHER, 2012; GOLDBERGER; GOLDBERGER; SHVILKIN, 2018; HEERDT; CRYSTAL, 2013; PAL, 2019).

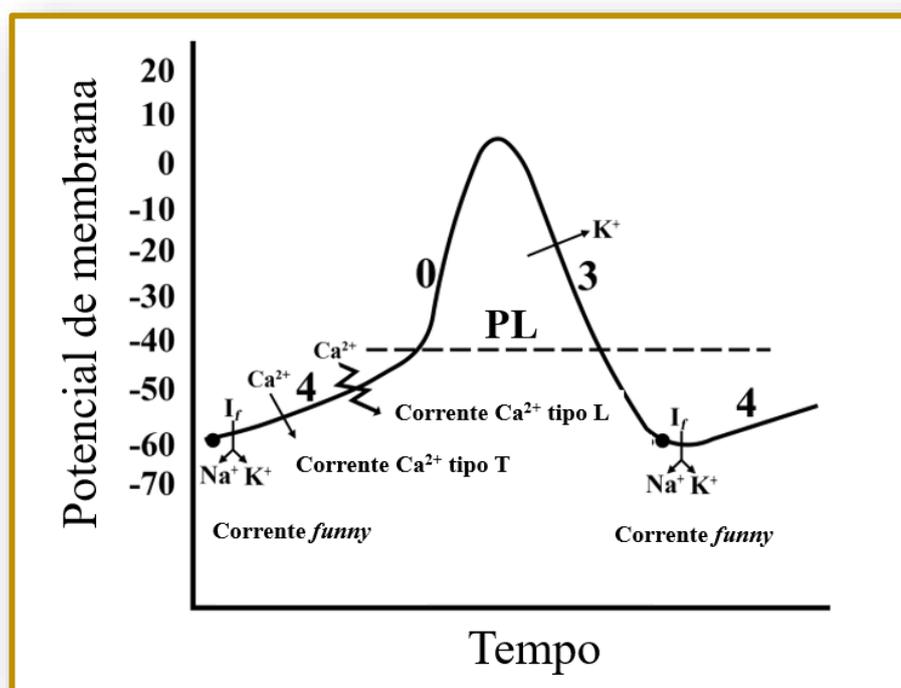


**Figura 10. Representação esquemática da estrutura e subdivisão do sistema de condução elétrico do coração.** Os impulsos elétricos são gerados no nodo sinusal e transmitidos para o sistema de condução elétrico adjacente. O fascículo de *Bachmann*, parte do nodo sinusal e conduz os impulsos para o tecido atrial esquerdo e os feixes internodais irão conduzir-los ao nódo atrioventricular. No nodo atrioventricular o impulso sofre um atraso para ser conduzido para os ventrículos. Após passar pelo feixe comum de HIS, o impulso alcança o ramo direito e esquerdo no septo interventricular e posteriormente as fibras de *Purkinje*, as quais se inserem nas paredes ventriculares e transmitem o estímulo elétrico para as células ventriculares. Fonte: adaptado de Goldberger; Goldberger; Shvilkin (2018).

O impulso elétrico é gerado no nodo sinusal, considerado o marcapasso cardíaco que controla a FC por toda a vida. Essa estrutura possui cerca de 8 mm de comprimento e 2 mm de largura, existem dois tipos de células que o compõe, as células pequenas e circulares com poucas organelas e as células delgadas, alongadas com número maior de organelas (RUDY, 2008).

As células circulares são as células marcapasso, responsáveis pela geração do impulso elétrico. A diferença de voltagem em função do tempo e os canais envolvidos no potencial de ação destas células estão apresentados esquematicamente na figura 11. O

potencial de ação possui três fases, a fase 4, denominada de despolarização diastólica espontânea, ou lenta despolarização diastólica, ocorre quando o potencial de membrana atinge -60 mV e vai até -40 mV, nesta faixa de potencial ocorre o influxo predominante de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  mediada pela corrente *funny* ( $I_f$ ), a qual permite o aumento progressivo do potencial de membrana, que ao atingir -50 a -40 mV permite a abertura de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T e tipo L. A fase 0 constitui a despolarização do potencial de ação e ocorre por meio do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado principalmente pelos canais tipo L e também aumento da atividade do trocador  $3\text{Na}^+ / 1\text{Ca}^{2+}$ , que promove o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e o influxo de  $\text{Na}^+$ . Na fase 3 ocorre a redução progressiva do influxo do  $\text{Ca}^{2+}$  e aumento do efluxo de  $\text{K}^+$ , mediado pelos canais retificadores retardados  $I_k$  ( $I_{kr}$  e  $I_{ks}$ ), que promove a hiperpolarização da membrana, pois o potencial tenderá a se aproximar do potencial de equilíbrio do  $\text{K}^+$  (-96 mV) (DIFRANCESCO, 1981; MURPHY; LAZZARA, 2016; PÉREZ-RIERA *et al.*, 2019).

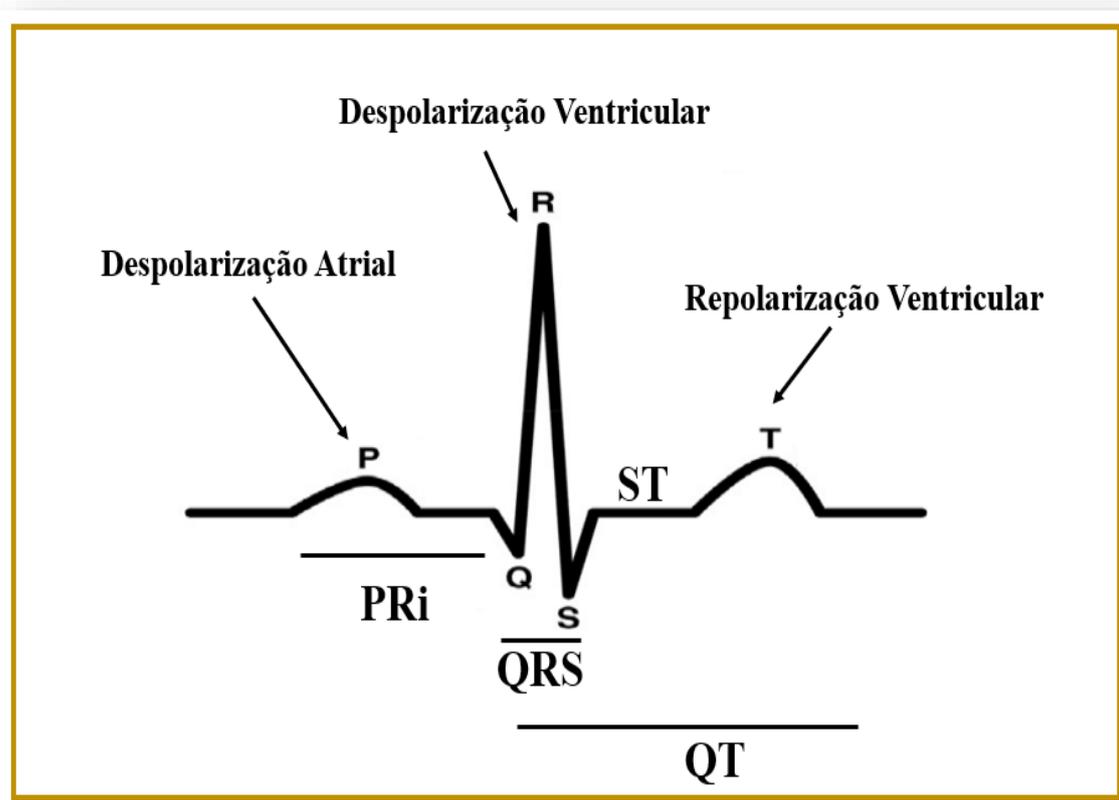


**Figura 11. Representação esquemática do potencial de ação na célula marcapasso no nó sinusal em função do tempo.** A corrente  $I_f$  é ativada quando o potencial de membrana atinge de cerca de -60 mV e progressivamente atinge o potencial limiar (PL) para a deflagração do potencial de ação por meio de uma corrente de influxo de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ). Posteriormente, a abertura dos canais para cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que possuem uma cinética de abertura lenta, permitirão o influxo de este íon na fase de despolarização, fase 0. Durante a fase 3 ou fase de repolarização, ocorrerá o efluxo de  $\text{K}^+$ , mediado pelos canais

para  $K^+$  retificadores retardados ( $I_{kr}$  e  $I_{ks}$ ). Fonte: adaptado de Pérez-Riera e colaboradores (2019).

O automatismo cardíaco consiste na capacidade do coração gerar e conduzir seus próprios impulsos elétricos para manter a FC na faixa entre 60 – 100 bpm, a partir da geração de potenciais de ação nas células do nódo sinusal. Como já reportado, o ECG evidencia a atividade elétrica do coração desde a geração do impulso até a condução por todo o tecido cardíaco. Nesse sentido, o intervalo PRi compreende ao início da onda P até o início do complexo QRS, é o tempo de geração e condução do estímulo elétrico desde o nódo sinusal até o nódo atrioventricular, passando por todo o tecido atrial (WIER, 2013) (Fig. 12).

O complexo QRS corresponde a despolarização ventricular, inicia-se com uma deflexão negativa, a onda Q, que representa a despolarização do terço médio do septo interventricular, que segue pela onda R, uma deflexão positiva, que corresponde a despolarização das paredes ventriculares, mais especificamente das fibras de *Purkinje*, a última onda do complexo é a onda S, uma deflexão negativa, que corresponde a despolarização da base das paredes ventriculares próximas aos átrios. Após o complexo QRS ocorre o seguimento ST que corresponde a sístole ventricular, é neste seguimento que os canais para  $Ca^{2+}$  se encontram abertos e permitem o influxo deste íon, desencadeando a contração dos cardiomiócitos. A última onda do ECG é a onda T, que representa a fase de repolarização ventricular, é uma onda em deflexão positiva que acompanha a orientação do complexo QRS e apresenta assimetria fisiológica (DE-AZEVEDO, 1999).



**Figura 12. Representação esquemática das ondas, segmentos e intervalos de um traçado eletrocardiográfico normal.** Evidencia-se a onda P que corresponde a despolarização atrial, o intervalo PRi que representa o tempo desde a geração do impulso elétrico no nódo sinusal, a passagem pelo tecido atrial até alcançar o nódo atrioventricular. O complexo QRS corresponde a despolarização ventricular, ou passagem do impulso por todo o sistema de condução ventricular (feixe comum de His, ramos direito e esquerdo e fibras de *Purkinje*). O segmento ST corresponde a entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  nos cardiomiócitos com posterior contração e a onda T que corresponde a repolarização ventricular. O intervalo QT corresponde a todo o potencial de ação nas células cardíacas ventriculares. Fonte: adaptado de Pal (2019).

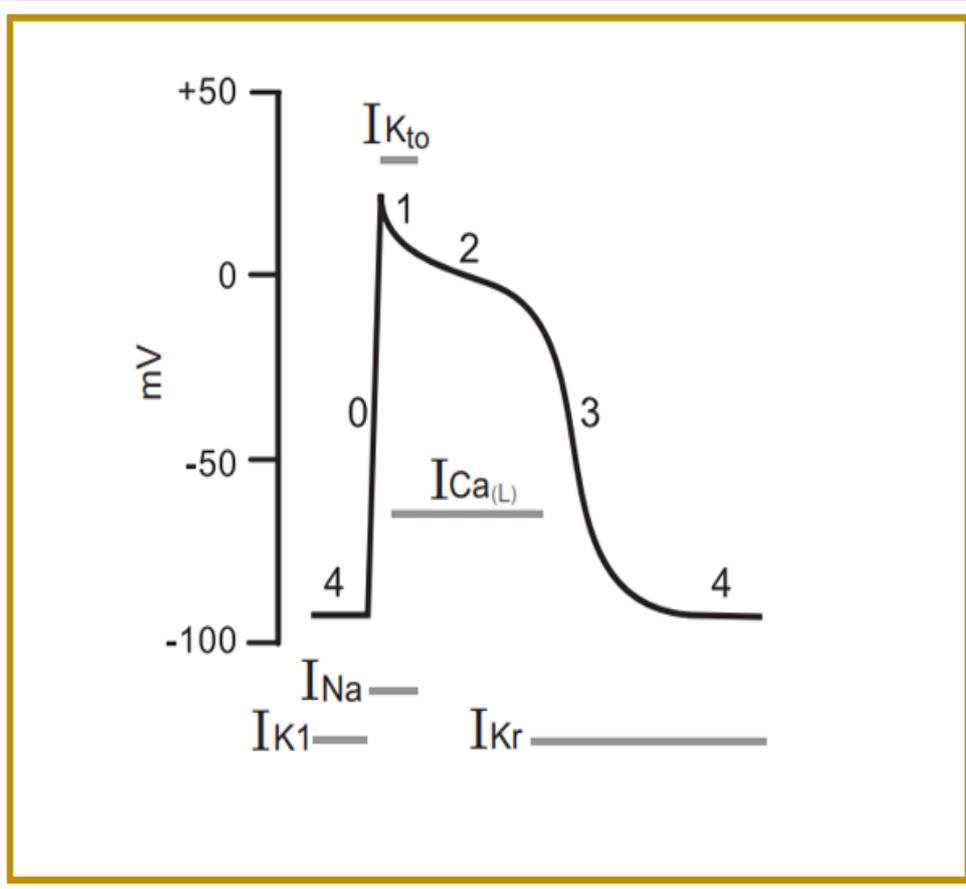
O potencial de ação dos cardiomiócitos ventriculares possui duração de 200 a 400 ms e difere do potencial de ação das células marcapasso, por apresentar uma fase de platô, uma repolarização mais prolongada e ausência da lenta despolarização diastólica. As células ventriculares apresentam 5 fases no potencial de ação, as fases 0, 1, 2, 3 e 4 (GRANT, 2009; PRIEST; MCDERMOTT, 2015) (Fig. 13).

No potencial de repouso há restauração do potencial de membrana da célula, a mesma se encontra na fase 4 do potencial de ação, nesta fase, a membrana é quase impermeável ao  $\text{Na}^+$  e ao  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo permeável ao  $\text{K}^+$  por meio de duas correntes,

denominadas de corrente de vazamento para  $K^+$ , promovidas pelo canal retificador retardado ( $I_K$ ) e pelo canal retificador interno ( $I_{K1}$ ). Quando a célula muscular cardíaca é estimulada até o limiar de excitabilidade, ocorre a abertura dos canais rápidos para  $Na^+$  sensíveis a voltagem ( $Na_{V1.5}$ ), desencadeando a despolarização rápida até que o potencial da membrana atinja cerca de +30 mV, caracterizando a fase 0 do potencial de ação. Também é na fase 0 que ocorrem tanto a abertura dos canais para  $Ca^{2+}$  tipo L, quando o potencial de membrana atinge cerca de 0 mV, que possuem cinética de abertura lenta e o fechamento dos canais para  $K^+$  ( $I_{K1}$ ) que serão novamente abertos quando o potencial da membrana atingir cerca de -20 mV e participarão da fase 3 do potencial de ação (FEHER, 2012; KLABUNDE, 2017; SHIH, 1994).

Durante a fase 1 do potencial de ação ocorre inativação dos canais rápidos para  $Na^+$  e ativação da repolarização incompleta mediada por uma corrente de  $K^+$  denominada de corrente transiente de efluxo ou transiente de saída ( $I_{to}$ ), no final desta fase os canais para  $Ca^{2+}$  já se encontram abertos e promovem o influxo deste íon para o citoplasma gerando a fase de platô, fase 2, que é o principal estímulo a contratilidade miocárdica, é nesta fase que a sístole cardíaca ocorre (NERBONNE; KASS, 2005).

Na fase 3 ocorre inativação dos canais para  $Ca^{2+}$  tipo L e o aumento do efluxo de  $K^+$ , inicialmente mediado pelos canais para  $K^+$  retificadores retardados de ativação ultrarrápida  $I_{Kur}$ , rápida  $I_{Kr}$  e lenta  $I_{Ks}$ , e posteriormente pela ativação do canal para  $K^+$  retificador interno ( $K_1$ ) que se manterá aberto também na fase 4 do potencial de ação (KLABUNDE, 2017; NERBONNE; KASS, 2005; SHIH, 1994).



**Figura 13. Esquema representativo do potencial de ação em cardiomiócitos ventriculares.** O potencial de ação é composto por 4 fases denominadas 0, 1, 2, 3 e 4. Na fase de repouso (4), o potencial de membrana se encontra em torno de -90 mV, mediado pela corrente para  $K^+$  retificadora interna ( $I_{K1}$ ). Após um estímulo despolarizante pelas células nodais ocorre alteração rápida do potencial de membrana no miócito ventricular até o limiar, cerca de -65 mV, e a membrana é despolarizada (fase 0) a partir da abertura dos canais rápidos para sódio sensíveis a voltagem que rapidamente se inativam. Uma repolarização transiente de efluxo de  $K^+$  é ativada por meio da abertura dos canais para  $K^+$  transientes de saída ( $K_{to}$ ) formando a fase 1, denominada de repolarização incompleta. Na fase 2, denominada de platô, ocorre o influxo de  $Ca^{2+}$  por meio dos canais para  $Ca^{2+}$  do tipo L, possibilitando que os cardiomiócitos se contraíam (chamada de sístole elétrica). Na fase 3, denominada de fase de repolarização completa, ocorre efluxo de  $K^+$ , inicialmente, pela abertura dos canais retificadores retardados rápidos ( $K_r$ ), ultrarrápidos ( $K_{ur}$ ) e lentos ( $K_s$ ) e posteriormente a corrente retificadora interna ( $K_1$ ) a qual terá condução máxima na fase 4. Fonte: adaptado de Klabunde (2017).

## 2.4 Regulação da Pressão Arterial a Curto Prazo

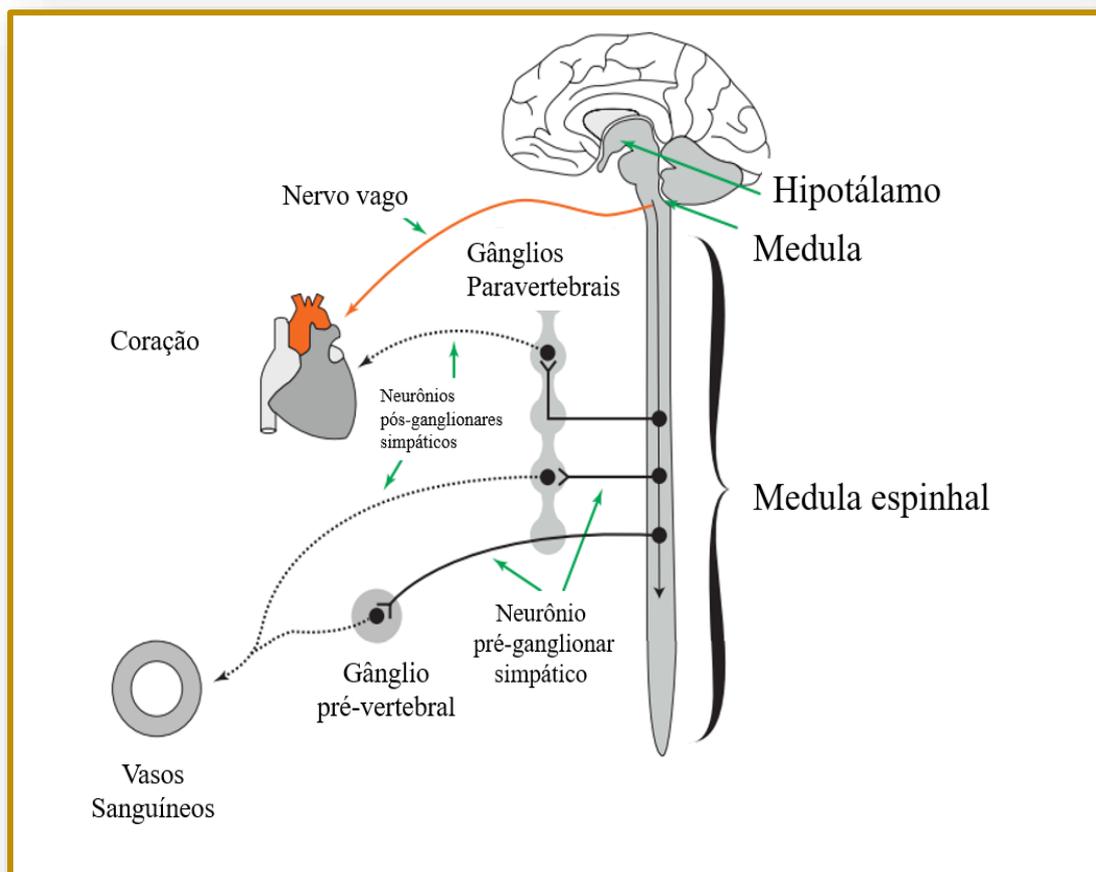
A regulação da PA está intimamente relacionada com as necessidades metabólicas de cada órgão e tecido do corpo, a manutenção da perfusão sanguínea com a adequada oferta de oxigênio e nutrientes garante o funcionamento do organismo (WOLFF *et al.*, 2016). A perfusão tecidual é complexa e para ocorrer adequadamente necessita da integração de múltiplos sistemas, por exemplo, a atividade neuroendócrina, renal e cardiovascular (SALMAN, 2016).

O controle, a curto prazo, da PA ocorre por meio de uma série de vias neurais diferenciadas que integram sinais mecânicos (barorreceptores) e químicos (quimiorreceptores) para modular a atividade reflexa do sistema nervoso autônomo (SNA), que subdivide-se em, simpático e parassimpático (SALMAN, 2016).

O SNA é um componente do sistema nervoso periférico responsável pela modulação e controle da atividade de múltiplas funções e sistemas do organismo, como por exemplo, a secreção glandular, a temperatura corporal, a função gastrintestinal e a função cardiovascular, especificamente, modificações na FC e na RVPT que alteram a PA (GORDAN; GWATHMEY; XIE, 2015).

A função cardiovascular é influenciada pela atividade autônoma simpática e parassimpática (Fig. 14), conforme já assinalado. As fibras eferentes parassimpáticas se originam de núcleos vagais (núcleo ambíguo e motor dorsal do vago) e conduzem estímulos parassimpáticos ao coração, via nervo vago, por meio de neurônios pré-ganglionares longos, que fazem sinapses em gânglios próximos ao nodo sinusal e ao nodo atrioventricular, que são componentes do sistema de condução elétrico do coração. O neurotransmissor liberado pelas terminações parassimpáticas é a ACh que ativa receptores muscarínicos  $M_2$ , nas células do tecido de condução elétrica, e desencadeiam redução da FC (cronotropia negativa) e diminuição da velocidade de condução do estímulo elétrico (dromotropia negativa). O SNA simpático apresenta efeitos antagônicos aos apresentados pela inervação parassimpática no sistema cardiovascular. Os neurônios pré-ganglionares simpáticos são mais curtos e surgem da região superior torácica (T1-T4) da medula espinal, fazem sinapses em gânglios paravertebrais em ambos os lados da coluna vertebral e no gânglio pré-vertebral cardíaco. Os neurônios pós-ganglionares simpáticos partem dos gânglios e inervam as estruturas cardiovasculares, como o nodo sinusal, o nodo

atriventricular, os cardiomiócitos ventriculares e os vasos sanguíneos. A ativação da neurotransmissão simpática eleva a FC (cronotropia positiva), força de contração (inotropia positiva), aumento da velocidade de condução do impulso elétrico (dromotropia) e aumento da resistência vascular periférica (DREW; SINOWAY, 2012; FRANCHINI; COWLEY, 2004).



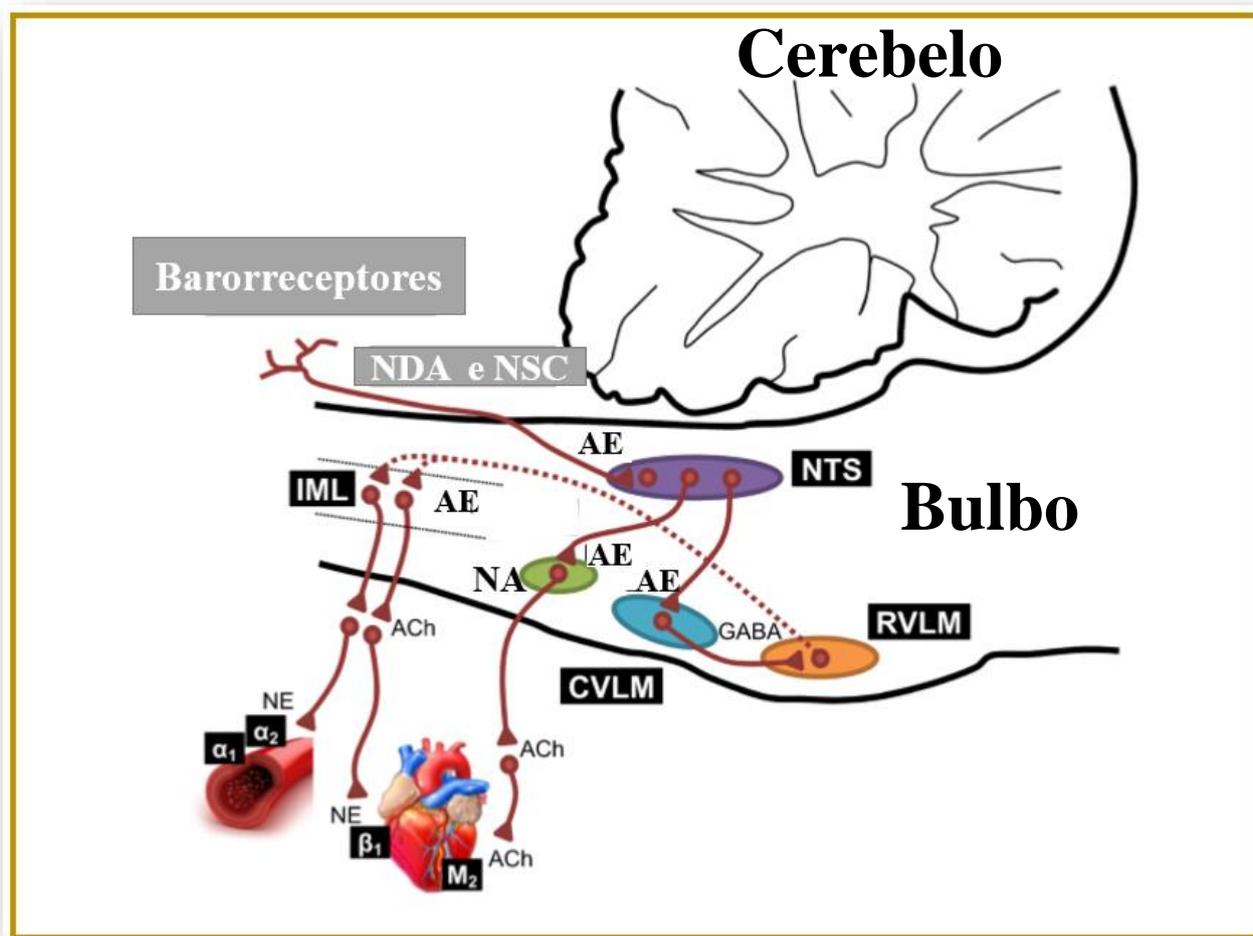
**Figura 14. Esquema representativo da neuromodulação autonômica no sistema cardiovascular.** Neurônios pré-ganglionares parassimpáticos partem de núcleos localizados na medula. Os núcleos, ambíguo e o motor dorsal do vago fazem sinapses com neurônios pós-ganglionares parassimpáticos vagais no tecido cardíaco que inervam o nódo sinusal e atrioventricular (detalhe em laranja). Neurônios pré-ganglionares simpáticos partem da medula espinhal para os gânglios paravertebrais e pré-vertebral onde fazem sinapses com neurônios pós-ganglionares simpáticos que inervam os vasos sanguíneos e o tecido cardíaco (GORDAN; GWATHMEY; XIE, 2015). Fonte: adaptado de Drew; Sinoway (2012).

### ✓ **Baroreflexo**

Os barorreceptores são mecanorreceptores que transmitem potenciais de ação por meio de fibras nervosas aferentes até o centro regulatório cardiovascular no tronco cerebral. Estes receptores sensíveis à pressão se localizam no arco aórtico e no seio da artéria carótida, permanecendo inseridas na parede vascular, mais especificamente na túnica adventícia e nas CMLV. Quando há um aumento da pressão arterial, a parede do vaso se distende e os barorreceptores são estimulados, acredita-se que a abertura dos canais para  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem estejam envolvidos neste processo, além do receptor de potencial transiente vanilóide tipo 1 (TRPV1) (CHAPLEAU, 2012; CHAPLEAU; LU; ABOUD, 2007). O reflexo barorreceptor promove alterações momento a momento na FC e RVPT, via modificações reflexas na estimulação do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático no sistema cardiovascular a depender da PA (SALMAN, 2016).

A transmissão aferente dos barorreceptores carotídeos é conduzida pelas fibras do nervo sinusal carotídeo (NSC), um ramo do nervo glossofaríngeo, e os sinais aferentes dos barorreceptores do arco aórtico são transmitidos pelo nervo depressor aórtico (NDA), um ramo do nervo vago (WEHRWEIN; JOYNER, 2013) (Fig. 15). O nervo vago é formado por três tipos de fibras, as fibras aferentes mielinizadas e não mielinizadas, tipo A C, respectivamente, e pelas fibras eferentes tipo B. Cerca de 60 a 80 % das fibras do nervo vago corresponde as fibras aferentes tipo C não mielinizadas (CZURA; ROSAS-BALLINA; TRACEY, 2007; YUAN; SILBERSTEIN, 2016).

Os impulsos aferentes dos barorreceptores fazem sinapses glutamatérgicas com neurônios de segunda ordem no núcleo do trato solitário (NTS), na região do bulbo dorsal, principal centro integrador de controle cardiovascular cuja função é de integração e retransmissão das informações aferentes (Fig. 15) (WEHRWEIN; JOYNER, 2013). Neurônios glutamatérgicos de segunda ordem partem do NTS para a região caudal ventrolateral do bulbo (CVLM) excitando neurônios gabaérgicos inibitórios que fazem sinapses com neurônios da região rostro ventrolateral de bulbo (RVLM), inibindo a neurotransmissão simpática que é estimulada pelos neurônios pré-sinápticos que partem do RVLM para a coluna intermédio-lateral da medula espinal (IML), a qual contém neurônios simpáticos pré-ganglionares (KAUFMAN; JONES, 2018; SALMAN, 2016).



**Figura 15. Esquema representativo dos mecanismos centrais de controle autonômico da frequência cardíaca e resistência vascular periférica total.** O sistema nervoso autônomo (SNA) modula a função cardiovascular por meio da transmissão simpática e parassimpática. O coração é innervado por neurônios pós-ganglionares simpáticos e parassimpáticos, os quais possuem atividade oposta. A estimulação simpática eleva a FC (frequência cardíaca) e aumenta a propagação do impulso elétrico, mediado pela estimulação dos receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos com norepinefrina (NE), já a estimulação de neurônios parassimpáticos desencadeia redução da FC e retardam a transmissão elétrica, por conta da estimulação dos receptores muscarínicos  $M_2$  ativados por ACh (acetilcolina). As artérias também apresentam varicosidades que contêm o neurotransmissor norepinefrina (NE), durante a estimulação simpática, este neurotransmissor é liberado e estimula a contração das células musculares lisas vasculares (CMLV) por meio da ativação dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, consequentemente ocorre aumento da resistência vascular periférica total (RVPT). A pressão arterial determinará qual subdivisão do SNA influenciará o sistema cardiovascular. No caso da elevação da PA, os barorreceptores que constituem terminações nervosas aferentes localizadas na túnica adventícia ou nas CMLV do arco aórtico e do seio da artéria coríntídea serão estimulados e aumentam a frequência de potenciais de ação por meio dos nervos sinusal carotídeo (NSC) e nervo depressor aórtico (NDA) para o principal centro integrador cardiovascular, o núcleo do trato solitário (NTS) onde fazem sinapses excitatórias com neurônios de segunda ordem. Do NTS partem neurônios excitatórios para a região caudal ventrolateral do bulbo (CVLM) que emitem neurônios inibitórios (gabaérgicos) para a região rostral ventrolateral do bulbo (RVLM), principal núcleo envolvido com a neurotransmissão simpática, os neurônios do RVLM são considerados pré-simpáticos e sua inibição desencadeia a inibição da neurotransmissão simpática, pois neurônios pré-sinápticos simpáticos localizados na coluna intermédia lateral da medula espinhal (IML) serão inibidos, assim como a descarga simpática nas CMLV e no coração. Em contrapartida núcleos envolvidos com a neurotransmissão parassimpática serão estimulados com projeções neuronais

excitatórias do NTS, aumentando a liberação de ACh no coração, consequentemente a FC, a condução elétrica e a pressão arterial serão reduzidas (KAUFMAN; JONES, 2018). Fonte: adaptado de Salman (2016).

Também há projeções neuronais de segunda ordem do NTS que estimulam corpos celulares de neurônios no núcleo ambíguo e no núcleo motor dorsal do vago, os quais são fibras vagais pré-ganglionares parassimpáticas que fazem sinapses com neurônios pós-ganglionares parassimpáticos próximos ao coração. Os neurônios pós-ganglionares parassimpáticos exercem controle sobre a atividade cardíaca, reduzindo a FC (cronotropia negativa) e retardando a condução elétrica no sistema de condução elétrico do coração (dromotropia negativa) por inervarem o nódo sinusal e atrioventricular (CHAPLEAU, 2012; GORDAN; GWATHMEY; XIE, 2015; KAUFMAN; JONES, 2018).

## 2.5 Modelos animais para o estudo experimental da hipertensão

A doença hipertensiva é a principal causa de morbimortalidade em países desenvolvidos ou em desenvolvimento e a utilização de modelos para experimentação animal apresenta múltiplas vantagens no estudo desta doença. Dentre as quais, destacam-se o fácil manejo e disponibilidade, o maior controle de variáveis, especialmente as relativas a aclimatação, alimentação e ingestão hídrica, além da possibilidade de se compreender minuciosamente os aspectos relativos a etiologia, fisiopatologia, efeitos de tratamento e complicações da doença (LEONG; NG; JAARIN, 2015).

Na hipertensão experimental existem alguns protocolos que induzem a patologia a partir da indução cirúrgica de animais, como por exemplo na hipertensão renovascular, ou com a utilização de uma substância química, como por exemplo, o bloqueio da síntese de NO com L- Name. Existe também o modelo de hipertensão essencial, denominado de SHR em que o animal tem a predisposição genética para o aumento da PA, cada modelo experimental apresenta aspectos específicos (LERMAN *et al.*, 2019).

No modelo de hipertensão induzido por L-Name, inibidor não seletivo das NOS, a patologia ocorre por inibição da produção de NO, obtida com a administração oral do L-Name (20 mg/kg, durante 7 dias). Após esse período, o animal apresentará elevação progressiva da PA, que atingirá um valor superior a 140 mmHg relacionada ao aumento da atividade simpática e consequente aumento da resistência arteriolar. Adicionalmente, o modelo evidenciará múltiplas lesões renais, a exemplo da isquemia e esclerose glomerulares (MOREIRA, *et al.*, 2016; VEERAPPAN; MALARVILI, 2019).

Outro modelo é o da hipertensão renal, também denominado de hipertensão renovascular (2K1C), que objetiva a redução do diâmetro da artéria renal esquerda (estenose da artéria renal) instalando um clip por meio de um procedimento cirúrgico. A diminuição do fluxo sanguíneo para o rim faz com que ocorra aumento da pressão arterial do animal estimulada pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), que influencia diretamente a fisiopatologia hipertensiva neste modelo. A renina consiste em uma enzima que é liberada na tentativa de manter a perfusão renal adequada, promove a produção de angiotensina I a partir do substrato, o angiotensinogênio, que sofre conversão em angiotensina II pela ação da ECA. A angiotensina II desencadeia aumento da PA via elevação da RVPT e da liberação da aldosterona, que aumenta a recaptação de sódio e água no rim (HERRMANN; TEXTOR, 2019; LEONG; NG; JAARIN, 2015).

Durante a década de 1960, um grupo de pesquisadores liderados pelo cientista Okamoto, da Faculdade de Medicina de Kyoto no Japão, interessados em estudar a hipertensão arterial, implementou esforços para o desenvolvimento de uma linhagem de ratos Wistar hipertensos. Em seus experimentos, observaram que alguns animais tinham a tendência de apresentar pressão arterial elevada com o passar do tempo. O grupo selecionou um animal macho com pressão arterial média entre 150 – 170 mmHg e um animal fêmea com PA média entre 130-140 mmHg e promoveu o acasalamento. Posteriormente, aferiram a PA da prole e acasalaram os irmãos com a pressão mais alta, até que todos os animais que nasceram apresentavam a doença hipertensiva. Esses animais foram denominados de ratos espontaneamente hipertensos, na língua inglesa *spontaneously hypertensive rats* (SHR). Os animais apresentam o tipo de hipertensão espontânea, isso quer dizer que não dependem de intervenções farmacológicas ou cirúrgicas para o estabelecimento da doença, porém exigem o acasalamento entre irmãos para a manutenção do modelo. Estes animais foram disponibilizados a muitos pesquisadores e laboratórios do mundo inteiro podem ter acesso a este tipo de animal para o desenvolvimento de estudo (DORIS, 2017; OKAMOTO; AOKI, 1963).

A similaridade na fisiopatologia entre a hipertensão primária humana e a doença hipertensiva essencial que acomete o animal SHR faz deste modelo experimental um dos mais utilizados e cientificamente aceitos para o estudo da hipertensão humana. A predisposição genética, o fator etiológico inespecífico, a elevação da resistência vascular periférica sem expansão de volume e a resposta similar aos medicamentos são

características que aproximam a hipertensão humana da doença apresentada pelo animal hipertenso (DICKHOUT; LEE, 1998).

Os animais SHR apresentam um período de pré-hipertensão que se estabelece entre a 6<sup>a</sup> e a 8<sup>a</sup> semana após o nascimento, no qual o valor média da PAS é de 147 mmHg, logo após esse período, inicia-se o estágio de hipertensão, entre a 12<sup>a</sup> e a 14<sup>a</sup> semanas, no qual a pressão se mantém em torno de 187 mmHg, com 16 semanas os animais entram no estágio de hipertensão sustentada (DROGGREL; BROWN, 1998). Além destes, há o estágio de hipertensão avançada ocorre após 12 a 14 meses de idade, no qual a pressão se mantém em 188 mmHg, em média (GRAY, 1984; OKAMOTO; AOKI, 1963). No estudo publicado por Anishchenko e colaboradores (2015), a PA dos animais SHR e WKY foi mesurada da 5<sup>a</sup> a 12<sup>a</sup> semana após o nascimento, os resultados demonstraram que a PA do animal eleva-se progressivamente a partir da 6<sup>a</sup> a 8<sup>a</sup> semana de idade até alcançar valores superiores a 200 mmHg para PAS a partir da 12<sup>a</sup> semana.

Dentre os múltiplos mecanismos que explicam a patogênese da hipertensão no animal SHR, destaca-se o aumento da atividade simpática no coração e nas artérias, que favorece o aumento da PA. A hiperestimulação da resposta simpática no animal hipertenso pode ser explicada pelo aumento da estimulação do RVLM, conforme já assinalado, a principal área estimulatória da função simpática e de controle cardiovascular no SNC. O estudo publicado por Gerald e colaboradores (2014) objetivou avaliar a influência da hiperpolarização da membrana celular dos neurônios localizados no RVLM nos parâmetros de PA e FC dos animais SHR (12 semanas) e demonstrou que o aumento da expressão de canais para  $K^+$  retificadores internos ( $K_{ir}$ ) em neurônios do RVLM desencadeou normalização da PA sem influenciar o reflexo barorreceptor nestes animais, indicando que existe um aumento na atividade estimulatória simpática que é determinante na manutenção dos valores elevados de PA.

Possivelmente, a hiperestimulação simpática no animal SHR está relacionada com a ativação tônica dos neurônios do RVLM que de maneira contínua ativa neurônios pré-ganglionares simpáticos na IML, conforme se observou no estudo publicado por Ito e colaboradores (2000), o qual avaliou a resposta dos parâmetros hemodinâmicos de PA e FC em animais SHR e normotensos, com idades entre 16 a 20 semanas, após a administração do ácido quinurênico, um metabólito neuroativo que antagoniza os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), no RVLM (BAGASRAWALA; ZECEVIC;

RADONJIĆ, 2016). Após a administração, a PA dos animais SHR reduziu até os valores de pressão mensurados em animais normotensos, indicando que a patogênese da hipertensão no animal SHR se relaciona a um aumento da excitação no RVLM.

Outro aspecto importante que explica a hiperestimulação simpática no animal SHR é a dessensibilização à inibição dos corpos celulares de neurônios no RVLM ao neurotransmissor ácido  $\gamma$ -aminibutírico (GABA), conforme foi evidenciado no estudo publicado por Smith e Barron (1990) que demonstraram uma resposta reduzida da PA em animais SHR (12-13 semanas de idade) em comparação aos animais normotensos na presença de metocloridrato de biculina, um antagonista dos receptores GABA, administrada bilateralmente no RVLM.

O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e sua inativação por meio da atividade das enzimas antioxidantes no RVLM também está determinando a doença hipertensiva em animais SHR. No estudo publicado por Tai e colaboradores (2005), ratos hipertensos de 10 a 12 semanas apresentaram maior concentração de ânion superóxido em comparação ao animal controle normotenso da mesma idade. A avaliação da expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) no RVLM, revelou que animais SHR apresentam reduzida expressão desta enzima que catalisa a dismutação do radical ânion superóxido em água e peróxido de hidrogênio, em comparação aos ratos sem patologia.

Animais hipertensos estão mais pré-dispostos ao desenvolvimento de arritmias cardíacas. As observações publicadas por Scridon e colaboradores (2017) que analisaram o risco de arritmias em função da idade entre animais SHR com 14, 24 e 48 semanas de idade, considerados jovens, adultos e idosos, respectivamente. A doença hipertensiva aumenta a incidência de arritmias independente da idade em comparação com os animais normotensos, porém a ocorrência de eventos arrítmicos mais graves como taquicardias ventriculares e fibrilações ocorrem no animal adulto (24 semanas) e idoso (48 semanas). Os animais com 14 semanas, considerados jovens, apresentaram um número maior de contrações ventriculares prematuras em comparação ao animal normotenso da mesma idade.

O aumento da PA no animal SHR também se associa à elevação da RVPT relacionada a um fenômeno conhecido como disfunção endotelial. Conforme já demonstrado, as CE desencadeiam o controle do tônus da musculatura lisa vascular por sintetizar e liberar NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF, moléculas que causam vasodilatação. No estudo

publicado por Jiang e colaboradores (2016), o vasorrelaxamento estimulado por ACh foi prejudicado em animais SHR com idade de 20 semanas em vasos de condutância e resistência, porém estas alterações ocorreram de forma mais intensa e precoce em artérias de condutância. A idade do animal é um fator que influencia o desenvolvimento de alterações no controle do tônus arterial por meio da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF), em ratos mais jovens, até 10 semanas de idade poucas alterações no controle do tônus da musculatura lisa são reportadas (BERNATOVA *et al.*, 2009).

Animais SHR também possuem alterações estruturais nas CMLV que promovem o aumento da concentração intracelular do  $Ca^{2+}$ , favorecendo a ocorrência de hipercontraturas e elevação da RVPT (BROWN *et al.*, 2018). Em miócitos lisos de artéria mesentérica de ratos hipertensos, a expressão dos canais para  $Ca^{2+}$  sensíveis a voltagem do tipo L é maior, favorecendo o maior influxo deste íon, além disso, estes canais possuem uma sensibilidade elevada a estimulação despolarizante ou farmacológica, especialmente ao agonista BAYK 8644, também se observa uma resposta maior a inibição pelo nifedipino, um antagonista destes canais (GARLAND; HILEY; DORA, 2011; KUBO; TAGUCHI; UEDA, 1998).

Os fármacos atualmente utilizados na terapêutica da hipertensão apresentam muitas limitações, conforme já assinalado. Neste sentido, a identificação de novas moléculas com propriedades biológicas, especialmente aquelas extraídas da natureza (produtos naturais) para o tratamento desta patologia torna-se necessário.

## **2.6 Produtos naturais e (-)-mirtenol**

A preocupação com os aspectos relacionados ao processo saúde-doença sempre existiu na humanidade. Desde a antiguidade o homem estava atento à relação entre o adoecimento e os aspectos que o favorecem, buscando compreender as múltiplas causas e as formas de combater as doenças, recorrendo a natureza para esse fim. A utilização de pão morfado para o tratamento de infecções epiteliais, o uso do pó da mirra (*Commiphora mirrha*) em lesões, ulcerações e queimaduras de pele, além da casca do salgueiro para o alívio da dor durante processos infecciosos na superfície corporal foram relatados na cultura egípcia e são exemplos da utilização primitiva de produtos originários da natureza no processo de adoecimento (CARY; PETERLIN, 2018; JÜTTE *et al.*, 2017).

Os produtos naturais são moléculas sintetizadas a partir do metabolismo secundário de espécies vegetais. Muitas plantas sintetizam estas substâncias a fim de se proteger contra as agressões de determinadas bactérias, fungos e insetos. Os produtos naturais são agrupados em muitas classes químicas a depender da estrutura molecular que apresentam, como, flavonoides, saponinas, terpenos, alcaloides, dentre outros e a identificação das atividades biológicas destas moléculas as tornam uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos (KATZ; BALTZ, 2016; RAO *et al.*, 2019).

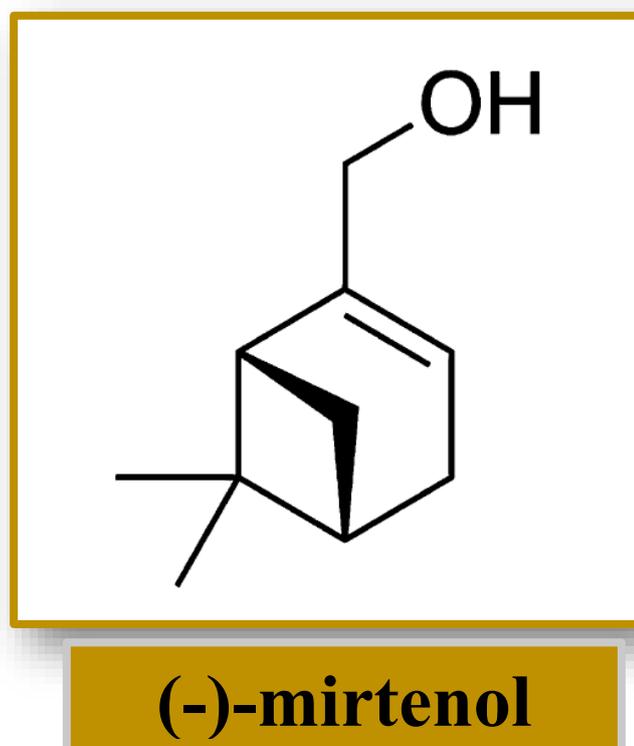
A indústria farmacêutica, sempre muito atenta a atividade biológica desenvolvida pelos produtos naturais, especialmente os derivados de plantas, sintetiza moléculas a partir da estrutura química de substâncias naturais (GUO, 2017). Assim, múltiplos fármacos comercializados possuem origem a partir do conhecimento da estrutura química e mecanismo de ação das substâncias naturais. Neste aspecto destacam-se vários fármacos como a codeína, um antitussígeno e analgésico, que é proveniente da planta *Papaver somniferum*; a artemisinina, um antimalárico encontrado no extrato da planta *Artemisia annua* (TU, 2016), a morfina, utilizada para promover analgesia, está entre os metabolitos produzidos pela planta *Papaver somniferum* (SVERRISDÓTTIR *et al.*, 2015) e a reserpina, um medicamento com propriedade anti-hipertensiva, extraído da planta *Rauwolfia serpentina* (SHAMON; PEREZ, 2016; WIENS; DE LUCA, 2016).

A identificação e demonstração da atividade biológica de substâncias naturais pode apontar um novo caminho terapêutico. Neste contexto, o (-)-mirtenol, um monoterpene alcóolico (Fig. 16) encontrado no óleo essencial de múltiplas plantas, dentre elas a *Myrtus communis* (Murta), *Rhodiola rósea*, *Paeonia lactiflora* e *Cyperus roduntus*, já é utilizado na indústria cosmética por conta da sua característica aromatizante em formulações, como por exemplo, cremes para mãos, loções de hidratação, perfumes, entre outros, apresenta alguns efeitos biológicos em modelos de experimentação animal (BEJESHK *et al.*, 2019).

Vários estudos já demonstraram os efeitos biológicos do (-)-mirtenol. Em modelo experimental de artrite crônica induzida por adjuvante completo de Freund, o tratamento dos animais, via oral, com (-)-mirtenol preveniu a formação de edema e o prejuízo do movimento da articulação, sendo esses efeitos relacionados a capacidade antioxidante da substância a partir da ativação da enzima SOD e inibição da migração de neutrófilos (GOMES *et al.*, 2017). Na asma induzida por ovalbumina em ratos, o tratamento com 50 mg/kg de (-)-mirtenol via intraperitoneal (i.p), desencadeou redução da inflamação por

meio da inibição das citocinas pró-inflamatórias IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  e aumento da atividade da enzima antioxidante SOD (AVOLIO *et al.*, 2014).

A identificação e demonstração da atividade biológica de substâncias naturais pode apontar um novo caminho terapêutico. Neste contexto, o (-)-mirtenol, um monoterpene alcóolico (Fig. 16) encontrado no óleo essencial de múltiplas plantas, dentre elas a *Myrtus communis* (Murta), *Rhodiola rósea*, *Paeonia lactiflora* e *Cyperus roduntus*, já é utilizado na indústria cosmética por conta da sua característica aromatizante em formulações, como por exemplo, cremes para mãos, loções de hidratação, perfumes, entre outros, apresenta alguns efeitos biológicos em modelos de experimentação animal (BEJESHK *et al.*, 2019).



**Figura 16. Estrutura química do (-)-mirtenol.** Peso molecular: 152,23 (VIANA, *et al.*, 2016).

Essa substância, na dose de 75 mg/kg também induziu efeito ansiolítico em animais por atuar diretamente no receptor gabaérgico, aumentando a afinidade do receptor pelo neurotransmissor GABA (MILANOS *et al.*, 2018; MOREIRA, *et al.*, 2014; VAN BREDERODE *et al.*, 2016). Em modelo experimental agudo de ulcera estomacal induzida por etanol, o pré-tratamento dos camundongos com a dose de 50 mg/kg de (-)-mirtenol reduziu as lesões no estomago desencadeadas pelo etanol por meio da ativação das enzimas antioxidantes SOD e CAT, bem como por meio a ativação da produção de NO e ativação

dos receptores gabaérgicos (VIANA, *et al.*, 2016). A substância também desencadeia efeito cicatrizante em modelo de ulcera crônica induzido por ácido acético, na dose de 50 mg/kg por meio da estimulação de depósito de colágeno, da ativação da proliferação celular e redução da atividade das metaloproteinases (VIANA, *et al.*, 2019).

Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, o pré-tratamento com (-)-mirtenol (50 mg/kg), via oral, durante 7 dias preveniu as lesões contráteis e elétricas em corações de ratos submetidos ao modelo de isquemia e reperfusão global, conforme descrito por Britto e colaboradores (2018), após 30 minutos do procedimento isquêmico, a substância restaurou a força ventricular esquerda do coração, diminuindo a área de necrose, bem como reduzindo a ocorrência de eventos arrítmicos e o restabelecimento do ritmo sinusal do coração sem a ocorrência de supradesnivelamento do segmento ST. Também ficou evidente que a substância diminuiu a formação de EROS e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes, como, SOD e CAT.

A toxicidade de algumas substâncias naturais pode apresentar-se como uma desvantagem e limitar a sua utilização (CHEN, *et al.*, 2016). Estudos toxicológicos demonstram alto grau de segurança na utilização do (-)-mirtenol em modelos animais. Na administração oral em ratos saudáveis, a  $DL_{50}$  foi de 2.457 mg/kg em animais machos e em fêmeas de 632 mg/kg (BELSITO *et al.*, 2008). Já avaliando a toxicidade do (-)-mirtenol em ratos saudáveis administrado por via i.p. evidenciou-se uma  $DL_{50}$  de 296 mg/kg (MOREIRA, *et al.*, 2014).

A metabolização do monoterpeneo  $\alpha$ -pineno, por meio da enzima citocromo P450 (CYP101) produz alguns metabólitos, inclusive o (-)-mirtenol (BELL *et al.*, 2003). Em humanos também foi mostrado que a administração oral do  $\alpha$ -pineno promove a posterior formação de (-)-mirtenol e trans-verbenol, entre outros metabólitos e a depuração renal do (-)-mirtenol ocorreu após 1,6 horas da administração do  $\alpha$ -pineno (SCHMIDT; GÖEN, 2017).

As múltiplas atividades biológicas descritas pela comunidade científica sobre o monoterpeneo (-)-mirtenol e a reduzida toxicidade fazem desta substância um potencial terapêutico para muitas patologias. Os efeitos biológicos benéficos apresentados pelo tratamento de patologias em diversos modelos animais com o (-)-mirtenol, a curiosidade sobre o possível efeito cardiovascular em animais com hipertensão e a necessidade de

desenvolver uma nova abordagem farmacológica para essa doença foram a motivação para o planejamento e desenvolvimento do presente estudo.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

- ✓ Caracterizar os mecanismos envolvidos no efeito cardiovascular induzido por (-)- mirtenol em animais normotensos e hipertensos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Caracterizar a atividade do (-)-mirtenol nos parâmetros hemodinâmicos dos animais;
- ✓ Avaliar o efeito da substância no controle autonômico da atividade cardiovascular;
- ✓ Determinar a ação do (-)-mirtenol na atividade elétrica do coração;
- ✓ Verificar a atividade desta molécula na reatividade vascular e identificar os mecanismos de ação envolvidos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados Ratos Wistar Normotensos (RWN) e Ratos Espontaneamente Hipertensos, “spontaneously hypertensive rats” (SHR) e com idade entre 12-14 semanas, pesando entre 250-300 g, obtidos do biotério setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe – UFS e do Biotério Central da Universidade Federal da Bahia, respectivamente.

Os animais permaneceram em condições controladas de aclimação  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , ciclo claro/escuro de 12/12 horas, livre acesso a ração para roedores (Nuvilab<sup>®</sup>) e água filtrada (*ad libitum*).

Todos os protocolos experimentais estiveram de acordo com as orientações em princípios éticos de experimentação animal estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFS com o número de protocolo 63/2016 (anexo I).

### 4.2 AGONISTAS E ANTAGONISTAS UTILIZADOS

**Tabela 1. Ferramentas farmacológicas utilizadas nos experimentos**

<b>Ferramenta farmacológica</b>	<b>Código</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
Cloridrato de acetilcolina	A6625	Ativação dos receptores muscarínicos
Cloridrato de L(-)fenilefrina	P6126	Ativação do receptor $\alpha_1$ -adrenérgico
1H-[1,2,4] Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalín-1-one – ODQ	3636	Inibidor da CGs (ciclase de guanilil solúvel)
Hidroxocobalamina – HDX	H1428000	Redução da biodisponibilidade de NO
Hexametônio	H1428000	Bloqueador ganglionar
Indometacina	D6899	Inibidor da ciclo-oxigenase (COX)
Atropina	A0132	Antagonista muscarínico
BAYK8644	B133	Agonista dos canais para $\text{Ca}^{2+}$ tipo L
Nifedipino	N7634	Bloqueador dos canais para $\text{Ca}^{2+}$ tipo L
Cloreto de tetraetilamônio	T2265	Bloqueador dos canais para $\text{K}^+$
Ortovanadato de sódio	450243	Inibidor das tirosinas fosfatases

Descrição das substâncias utilizadas com o respectivo código e o mecanismo de ação vascular.

Como reportado, todas as substâncias utilizadas nos procedimentos experimentais foram obtidas das empresas, Sigma<sup>®</sup>, Syntec<sup>®</sup> e Liquene<sup>®</sup> e para aplicação na abordagem da pesquisa foram diluídas observando as recomendações técnicas do fabricante e a possível interferência nos resultados. Nesse sentido, as concentrações dos diluentes dimetilsulfóxido (DMSO) ou cremofor<sup>®</sup> não excederam 0,03% em sua concentração final.

### 4.3 SAIS E SOLUÇÕES

Durante a execução dos protocolos experimentais os seguintes sais foram utilizados para a preparação das soluções nutritivas: NaCl, KCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Glicose e CaCl<sub>2</sub> (PIPINO *et al.*, 2018).

As soluções e os reagentes que as compõem, com suas respectivas concentrações, se encontram nas tabelas que seguem.

**Tabela 2.** Composição da solução de Tyrode

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO (mmol/L)
NaCl	158,3
KCl	4,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,42
MgSO <sub>4</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10
GLICOSE	5,6
CaCl <sub>2</sub>	2,0

Solução nutritiva de Tyrode modificada para artéria mesentérica superior isolada de ratos (ANJOS *et al.*, 2013; SANTOS-SOUSA *et al.*, 2017).

**Tabela 3.** Solução isosmótica de KCl (20 mmol/L).

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO (mmol/L)
NaCl	142,3
KCl	20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,42
MgSO <sub>4</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10
GLICOSE	5,6
CaCl <sub>2</sub>	2,0

Solução despolarizante isosmótica elaborada a partir da solução de Tyrode modificada para artéria mesentérica superior isolada de ratos.

**Tabela 4.** Solução isosmótica de KCl (80 mmol/L).

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO (mmol/L)
NaCl	82,3
KCl	80
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,42
MgSO <sub>4</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10
GLICOSE	5,6
CaCl <sub>2</sub>	2,0

Solução despolarizante isosmótica elaborada a partir da solução de Tyrode modificada para artéria mesentérica superior isolada para ratos.

#### 4.4. Estudos “*in vivo*”

##### 4.4.1 Procedimento anestésico-cirúrgico para a realização da abordagem experimental “*in vivo*”

Na abordagem experimental “*in vivo*” os animais foram submetidos a um procedimento anestésico-cirúrgico induzido por cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), para a implantação de dois cateteres. Os cateteres de poliuretano (PE) unidos, de PE 10 (0,28 mm de diâmetro interno e 0,61 mm de diâmetro externo) e PE 50 (0,58 mm de diâmetro interno e 0,96 mm de diâmetro externo), foram implantados na veia cava inferior, via veia femoral e na artéria aorta, ramo descendente abdominal via artéria femoral conforme descrito por Silva-Cutini e colaboradores (2019).

No decorrer do processo anestésico os animais foram observados até a ocorrência de acinesia, posteriormente, e de maneira individual, foram conduzidos ao laboratório para a realização do procedimento cirúrgico. Uma incisão na região inguinal esquerda possibilitou a identificação, separação e cateterização da artéria e veia femorais, com os dispositivos anteriormente descritos preenchidos com solução salina (SF 0,9%) e heparinizados (1:10 v/v), o cateter implantado na artéria, possibilitou a verificação da pressão pulsátil do animal por meio de um sistema pré-calibrado, que possui um conversor analógico-digital (ADInstruments, Austrália) responsável pela exposição do sinal no microcomputador, com o software (PowerLab, ADInstruments, Austrália). O cateter implantado na veia, possibilitou a administração das substâncias *in bolus*. Após a fixação, os cateteres foram exteriorizados na região cervical do animal (região *scapulae*). Os

animais foram submetidos aos protocolos experimentais 24 horas após o procedimento anestésico-cirúrgico, a partir da identificação da normalidade dos sinais vitais (SMITH, *et al.*, 2017).

#### **4.4.2. Efeito do (-)-mirtenol sobre os parâmetros hemodinâmicos de PAS, PAD e FC em animais SHR e RWN não anestesiados**

Após a conferência dos padrões fisiológicos dos animais, estes foram encaminhados aos procedimentos experimentais. O cateter que esteve implantado na artéria emitiu um sinal de pressão pulsátil, após a ambiência do animal durante 15 minutos.

Um grupo experimental de animais RWN e SHR foi utilizado para a avaliação do efeito do (-)-mirtenol administrada por via intravenosa (i.v.), nas doses de 3, 5, 10, 15 e 20 mg/kg, de forma aleatória e *in bolus*, através do cateter venoso, a seleção das doses ocorreu por meio de uma busca preliminar na literatura científica em estudos que já demonstraram efeitos cardiovasculares da classe dos monoterpenos e posteriormente ocorreu os destes das doses similares do (-)-mirtenol.

Os dados hemodinâmicos de PAS, PAD e FC foram verificados e registrados antes e imediatamente após a administração de cada dose. Aguardou-se o retorno dos valores basais da PA e FC antes da administração da dose subsequente.

Outro grupo de animais SHR foi avaliado quanto as alterações dos parâmetros hemodinâmicos após a administração oral (gavagem) do (-)-mirtenol nas doses de 20, 50 e 100 mg/kg e utilizou-se como controle positivo, o nifedipino (10 mg/kg). Os registros de PA e FC ocorreram de maneira contínua nos primeiros 30 minutos após a administração das substâncias e posteriormente nas horas 1, 2, 4, 6, 8 e 24.

#### **4.4.3 Efeito do (-)-mirtenol sobre a PAS, PAD e FC na presença do hexametônio (30 mg/kg) em animais SHR e RWN não anestesiados**

Para avaliar a influência da substância no controle central da PA e FC, administrou-se hexametônio (30 mg/kg, i.v. *in bolus*), que nesta dose desencadeia bloqueio ganglionar (SUN *et al.*, 2015). Após 30 minutos, foram readministradas, *in bolus*, as doses anteriormente descritas, de forma aleatória, do (-)-mirtenol. Os dados de PA e FC foram registrados antes e imediatamente após a administração de cada dose.

#### **4.4.4. Efeito do (-)-mirtenol sobre o eletrocardiograma (ECG) dos animais SHR e RWN sob anestesia.**

Após indução de anestesia com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e a completa acinesia dos animais, estes foram submetidos ao protocolo de aferição da atividade elétrica do coração, por meio da instalação de eletrodos subcutâneos no tórax. Os eletrodos foram conectados a um cardioscópio e a um amplificador que possui um conversor analógico-digital que emitiu os sinais a um software de aquisição, o Windaq Data Acquisition – Dataq Instruments (Akron, Ohio).

Os intervalos PRi, complexo QRS e QTc foram mensurados em ms e a amplitude da onda R foi descrita em mV, todos esses parâmetros foram analisados a partir da derivação DII do ECG conforme descrito por SMITH e colaboradores (2017). O intervalo QTc foi normalizado pelo intervalo R-R na equação de Framingham,  $QTc = (QT + 0,156 \times (1 - R-R))$  (PROVIDÊNCIA *et al.*, 2018).

A dose de 20 mg/kg do (-)-mirtenol foi administrada via i.v. *in bolus* e o traçado foi acompanhado durante 20 minutos.

Também investigou-se o efeito do bloqueio ganglionar com hexametônio (30 mg/kg, i.v, 30 minutos) nas respostas eletrocardiográficas desencadeadas pelo (-)- mirtenol (20 mg/kg).

### **4.5 Estudos “*ex vivo*”**

#### **4.5.1 Obtenção e preparação dos anéis de artéria mesentérica superior isolada**

Os animais RWN e SHR foram mortos por decapitação e submetidos a uma laparotomia, a artéria mesentérica foi identificada e removida no seu ramo superior. Em uma placa de *petri* com solução nutritiva, ocorreu a remoção do tecido adiposo que circunda todo o vaso e posteriormente a secção do mesmo em anéis com medida média de 3-4 mm de comprimento.

Hastes metálicas foram passadas na luz dos anéis, no plano paralelo, e um fio de algodão, possibilitou a conexão entre as hastes e os transdutores, pré-calibrados, de pressão no sistema de banho para órgãos isolados.

Após esse procedimento, os anéis foram imersos em solução nutritiva de Tyrode, anteriormente descrita, em cubas contendo 10 mL, aeradas intermitentemente com mistura

carbogênica, com temperatura controlada de 37°C e tensão basal de 0,75 g. Respeitou-se 1 hora de estabilização, com trocas sucessivas da solução nutritiva a cada 15 minutos, para a exclusão da interferência dos metabólitos sintetizados pelo vaso (DIAS *et al.*, 2007; SILVA, *et al.*, 2011; SILVA, *et al.*, 2015).

#### **4.5.2 Verificação da funcionalidade do endotélio**

A funcionalidade do endotélio foi aferida com a utilização de ACh (1 µmol/L) em anéis de artéria mesentérica superior pré-contraídos com FEN (1 µmol/L), conforme descrito por Dias e colaboradores (2007).

Após uma hora de estabilização, com manutenção de um tônus basal de 0,75 g, em antecedência a todos os protocolos de efeito vascular, uma pré-contração foi estimulada por FEN 1 µmol/L, um agonista dos receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos (BUSCHER *et al.*, 1999) e no platô da contração, foi administrada ACh 1 µmol/L, que ativa dos receptores muscarínicos ( $M_3$ ) nas células endoteliais (REN; NAKANE; CHIBA, 1993). O vasorrelaxamento induzido por ACh, igual ou superior a 80% da pré-contração com FEN, permitiu a consideração dos anéis com endotélio preservado. Além disso, foram considerados sem endotélio, aqueles anéis que relaxaram até 10% e excluídos dos protocolos experimentais os que relaxaram entre 10 – 80% na presença de ACh.

#### **4.5.3 Investigação do efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica superior isolada com endotélio preservado ou removido, pré-contraídos com FEN, em animais SHR e RWN.**

Para avaliar o efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica em animais RWN e SHR. Após o período de estabilização, os anéis com endotélio preservado ou removido foram pré-contraídos com FEN (1 µmol/L), um agonista dos receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, após o platô de contração, concentrações crescentes e cumulativas do (-)-mirtenol ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-3}$  mol/L) ou veículo, foram adicionadas as preparações. As curvas de vasorrelaxamento obtidas foram comparadas ponto a ponto.

#### **4.5.4 Verificação da participação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) no efeito vasorrelaxante, dependente do endotélio vascular do (-)-mirtenol, em animais SHR.**

Para analisar a possível participação das enzimas NOS no efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol, utilizou-se o inibidor inespecífico destas enzimas, o L-Name (10  $\mu\text{mol/L}$ ) (POULOS; LI, 2017). Os anéis mesentéricos com endotélio preservado, conforme descrito anteriormente, foram pré-incubados com L-Name, durante 30 minutos. Posteriormente, uma pré-contração foi estimulada com FEN (1  $\mu\text{mol/L}$ ), no componente tônico da contração, o (-)-mirtenol foi adicionado às preparações nas concentrações de ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-3}$  mol/L), e a atividade da substância foi comparada na presença e na ausência do inibidor (curva controle).

#### **4.5.5 Verificação da participação da via NO/GMPc no efeito vasorrelaxante, dependente do endotélio, estimulado pelo (-)-mirtenol em animais SHR**

Para avaliar a possível participação da via NO/GMPc no efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol, utilizou-se, o sequestrador de NO, a hidroxicoBALAMINA (HDX; 30  $\mu\text{mol/L}$ ) (KRUSZYNA *et al.*, 1998) e o inibidor da CGs, o ODQ (10  $\mu\text{mol/L}$ ) (BRITO *et al.*, 2017). Anéis com endotélio preservado foram pré-incubados, durante 30 minutos, com os inibidores acima descritos, e posteriormente, uma pré-contração induzida por FEN foi estimulada, e, no componente tônico da contração, o (-)-mirtenol ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-3}$  mol/L) foi adicionado às preparações. A resposta relaxante da substância, dependente do endotélio, foi comparada à resposta na ausência dos inibidores.

#### **4.5.6 Verificação da participação da via da ciclo-oxigenase (COX) e dos receptores muscarínicos no efeito vasorrelaxante, dependente do endotélio vascular, estimulado pelo (-)-mirtenol.**

Para avaliar a possível participação dos metabólitos da COX e da ativação dos receptores muscarínicos no efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol, anéis com endotélio presente, foram pré-incubados com indometacina (10  $\mu\text{mol/L}$ ), um inibidor da COX (LIMBU; COTTRELL; MCNEISH, 2018) ou atropina (1 nmol/L) que antagoniza os receptores muscarínicos (BOULANGER; MORRISON; VANHOUTTE, 1994), durante 30 minutos. Posteriormente, uma contração foi estimulada por FEN e no componente tônico da contração o (-)-mirtenol foi adicionado às preparações. As curvas foram comparadas ponto a ponto na presença e ausência destas ferramentas farmacológicas.

#### **4.5.7 Verificação da participação na mobilização do $\text{Ca}^{2+}$ no efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol, independente do endotélio vascular em animais SHR e RWN**

Para verificar a participação do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  no efeito vasorrelaxante desencadeado pelo (-)-mirtenol, independente do endotélio vascular, os anéis com endotélio removido foram expostos a uma solução despolarizante de KCl (80 mmol/L), na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , com 0,5 mmol/L de EDTA (um quelante para  $\text{Ca}^{2+}$ ) e uma curva de contração concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-2}$  mol/L) foi estimulada. Posteriormente, trocou-se o meio em que os anéis se encontravam a cada 15 minutos, durante 30 minutos. Após esse período, os anéis foram novamente expostos à solução despolarizante de KCl (80 mmol/L), livre de cálcio e com 0,5 mmol/L de EDTA na presença das concentrações do (-)-mirtenol ( $10^{-6}$  mol/L,  $10^{-5}$  mol/L,  $10^{-4}$  mol/L e  $3 \times 10^{-3}$  mol/L) de maneira isolada. Uma nova curva de contração, concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$  foi estimulada para cada concentração do (-)-mirtenol e comparadas entre si.

Na intenção de avaliar a participação dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem do tipo L na resposta vasodilatadora do (-)-mirtenol, independente do endotélio, utilizou-se um agonista destes canais, o BAYK 8644 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) (ARTIGAS *et al.*, 2003), que desencadeia uma contração por meio do aumento do influxo de cálcio. No componente tônico da contração estimulada por BAYK 8644, concentrações crescentes do (-)-mirtenol foram adicionadas às preparações ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-3}$  mol/L).

Para avaliar o efeito do (-)-mirtenol na mobilização do cálcio no RS, em um meio sem cálcio com EDTA (0,5 mmol/L), foi promovida uma contração transiente com FEN (1  $\mu\text{mol/L}$ ). Posteriormente, os anéis foram lavados durante 30 minutos, a cada 15 minutos, o (-)-mirtenol foi adicionado às cubas na concentração  $3 \times 10^{-4}$  mol/L, após 30 minutos, uma nova contração transiente com FEN foi estimulada. A resposta de contração máxima foi comparada na presença e ausência do (-)-mirtenol.

#### **4.5.8 Participação da sensibilização contrátil ao $\text{Ca}^{2+}$ estimulada pelo ortovanadato de sódio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), no efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol, independente do endotélio vascular em animais SHR e RWN.**

Uma curva para  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ( $10^{-5}$  –  $10^{-2}$  mol/L) foi estimulada após a verificação da ausência do endotélio funcional em anéis de artéria mesentérica superior, conforme descrito por Moreira e colaboradores (2016), o ortovanadato de sódio é um inibidor das tirosinas fosfatases amplamente utilizado (YU *et al.*, 2004). Posteriormente os anéis foram pré-incubados com uma solução de Tyrode até que o tônus basal fosse atingido, em seguida, concentrações isoladas do (-)-mirtenol foram adicionadas as preparações, após 30

minutos, uma nova curva para  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  foi estimulada. As respostas máximas para cada concentração do  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  foram comparadas.

#### **4.5.9 Participação dos canais para $\text{K}^+$ no efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica sem endotélio vascular de animais SHR e RWN.**

Para avaliar a participação dos canais para  $\text{K}^+$  no efeito do (-)-mirtenol, os anéis de artéria mesentérica com endotélio removido foram pré-incubados com TEA (1 mmol/L), durante 30 minutos, que nesta concentração bloqueia, de maneira inespecífica estes canais (BAILEY *et al.*, 2007; BELEZNAI *et al.*, 2011). Posteriormente, uma contração foi estimulada com FEN (1  $\mu\text{mol/L}$ ) e no tônus da contração, (-)-mirtenol foi adicionado às cubas nas concentrações de ( $10^{-6}$ -  $3 \times 10^{-3}$  mol/L).

#### **4.5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Inicialmente utilizou-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para atestar a normalidade dos dados

Nos gráficos que expõem os dados hemodinâmicos (PA e FC) ou os intervalos do ECG, as barras correspondem às médias aferidas. Nos gráficos contendo os dados de concentração-resposta, os pontos indicam a média de efeito máximo da concentração e os traçados verticais constituem o erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram inseridos no software Graph Pad Prism (6.0) no qual foram analisados estatisticamente e plotados os gráficos, foram considerados significativos os resultados com  $p < 0,05$ .

As curvas de concentração-resposta foram normalizadas pela equação logística de Hill, na qual a variável dependente foi a resposta de relaxamento ou contração (%), analisadas ponto a ponto a partir do efeito máximo de cada concentração.

Posteriormente a avaliação da normalidade dos dados, os mesmos foram comparados com a utilização de *t-Student* ou ANOVA de uma ou duas vias, em alguns casos para medidas repetidas, com pós-teste de Bonferroni, quando apropriado.

## 5. RESULTADOS

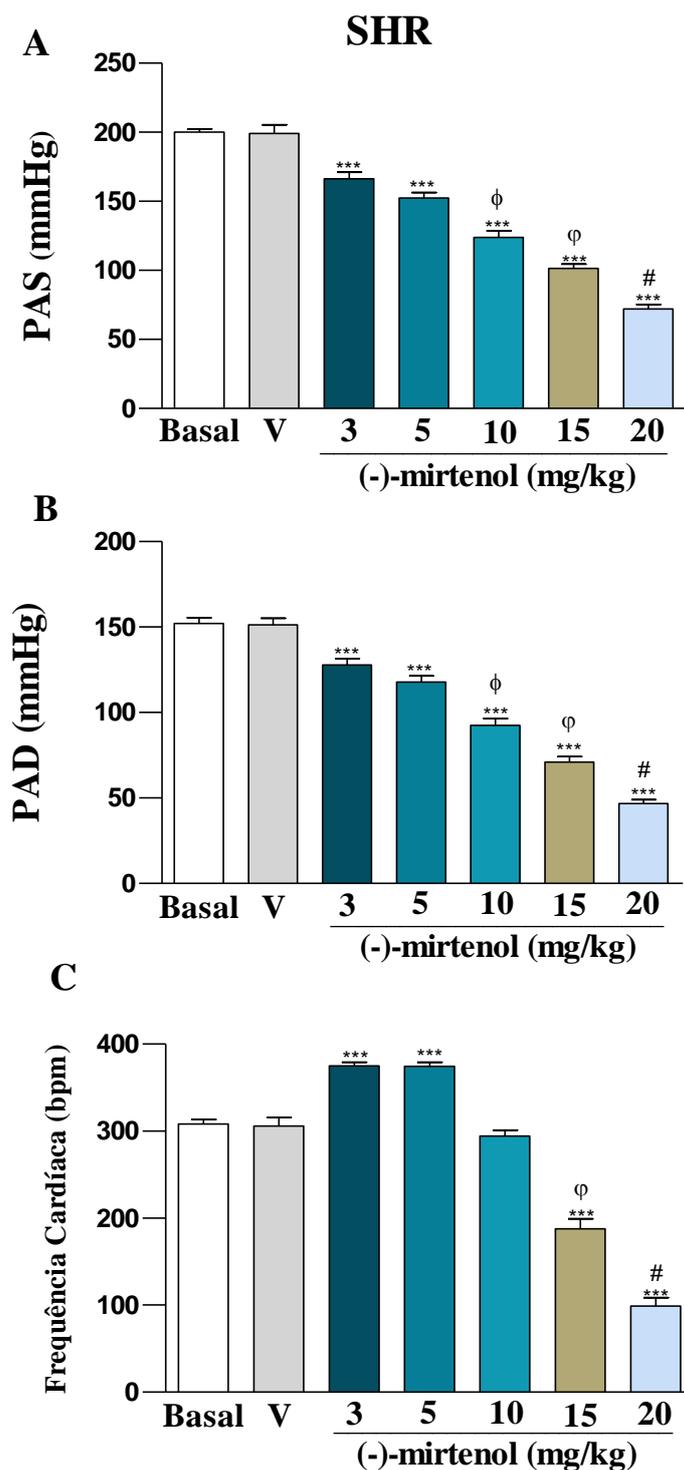
### 5.1 ABORDAGEM EXPERIMENTAL “*in vivo*”

#### 5.1.1 Efeito do (-)-mirtenol sobre a PAS, PAD e FC, administrado por via intravenosa em ratos SHR e RWN não anestesiados

Os valores hemodinâmicos basais da PAS e PAD dos animais hipertensos foram registrados em  $202,03 \pm 5,65$  mmHg e  $152,09 \pm 4,56$  mmHg, respectivamente.

Após a administração do (-)-mirtenol (3; 5; 10; 15 e 20 mg/kg, i.v., *in bolus*), observou-se uma resposta transiente hipotensora ( $p < 0,05$ ), dependente de dose, na PAS e PAD, respectivamente: 3 mg/kg ( $166,18 \pm 4,84$  e  $127,76 \pm 3,80$  mmHg), 5 mg/kg ( $152,43 \pm 3,98$  e  $117,58 \pm 3,58$  mmHg), 10 mg/kg ( $123,84 \pm 5,29$  e  $92,40 \pm 5,58$  mmHg), 15 mg/kg ( $101,43 \pm 3,55$  e  $71,05 \pm 3,63$  mmHg) e 20 mg/kg ( $71,88 \pm 2,94$  e  $46,67 \pm 1,73$  mmHg) (Fig. 17 A e B).

O valor aferido da FC basal dos animais hipertensos foi  $301 \pm 6,40$  bpm. Ao administrar as doses da substância, anteriormente descritas, verificou-se um efeito bifásico, caracterizado por taquicardia ( $p < 0,05$ ) nas doses de 3 mg/kg ( $375 \pm 4,04$  bpm) e 5 mg/kg ( $374,6 \pm 4,60$  bpm), as menores doses estudadas. Observou-se bradicardia ( $p < 0,05$ ) nas maiores doses administradas, 15 mg/kg ( $187,76 \pm 26$  bpm) e 20 mg/kg ( $98,96 \pm 10,84$  bpm). A dose de 10 mg/kg administrada não apresentou alteração quando comparada ao basal (Fig. 17 C).



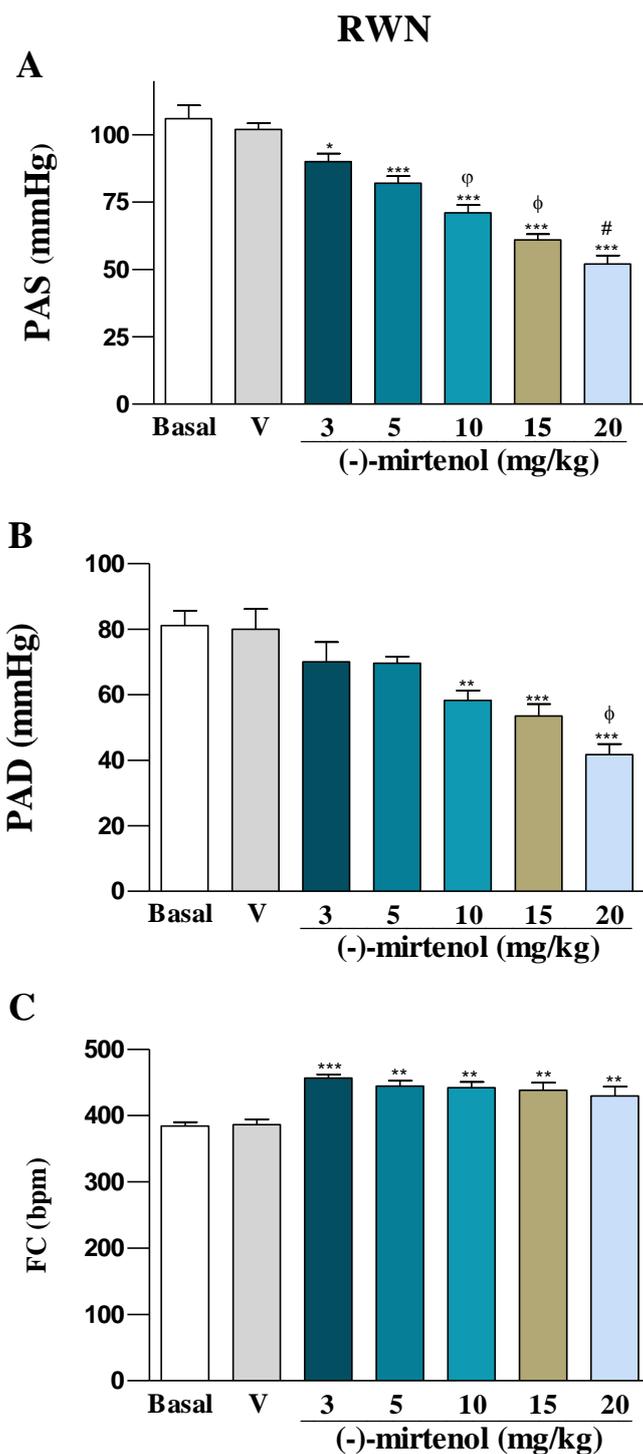
**Figura 17.** Efeito da administração intravenosa, *in bolus*, do (-)-mirtenol em (A) pressão arterial sistólica (PAS), em (B) pressão arterial diastólica (PAD) e em (C) frequência cardíaca (FC) em animais hipertensos não anestesiados. Os animais SHR receberam as doses do (-)-mirtenol ou veículo (V - cremofor 3%). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para  $n=6$ . ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida de pós teste de Bonferroni (\*\*\*)  $p<0,001$  comparado ao basal em A, B e C); ( $\phi$ )  $p<0,05$  comparado a 5 mg/kg em A e B); ( $\phi$ )  $p<0,05$  comparado a 10 mg/kg; # $p<0,05$  comparado a 15 mg/kg em A, B e C).

Em animais normotensos, os valores hemodinâmicos basais de PAS e PAD registrados, foram respectivamente,  $112,32 \pm 2,39$  e  $80,01 \pm 2,18$  mmHg (Fig. 18 A e B).

O (-)-mirtenol, administrado de maneira aleatória nas doses i.v. *in bolus* de 3, 5, 10, 15 e 20 mg/kg, desencadeou efeito hipotensor transiente ( $p < 0,05$ ), dependente de dose. Na PAS (Fig. 18 A), esse efeito iniciou-se a partir de 3 mg ( $90,28 \pm 3,01$  mmHg), em 5 mg/kg ( $82,01 \pm 2,77$  mmHg), 10 mg/kg ( $71,18 \pm 2,97$  mmHg), 15 mg/kg ( $61,32 \pm 2,16$  mmHg) e 20 mg/kg ( $52,09 \pm 3,20$  mmHg)

Na PAD (Fig. 18 B), o efeito hipotensor transiente ( $p < 0,05$ ) ocorreu a partir da dose de 10 mg/kg ( $58,29 \pm 2,97$  mmHg) e aumentou conforme a dose para  $53,51 \pm 3,66$  mmHg (15 mg/kg) e para  $41,77 \pm 3,20$  mmHg (20 mg/kg).

Na FC, o valor basal aferido antes da aplicação das doses do (-)-mirtenol foi de  $386,51 \pm 7,21$  bpm. O (-)-mirtenol, nas doses 3, 5, 10, 15 e 20 mg/kg, desencadeou efeito taquicárdico, o qual foi semelhante entre as doses (Fig. 18 C).



**Figura 18.** Efeito da administração intravenosa, *in bolus*, do (-)-mirtenol em (A) pressão arterial sistólica (PAS), em (B) na pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC) em animais normotensos não anestesiados. Os animais RWN receberam as doses do (-)-mirtenol ou o veículo (V - cremofor 3%). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para  $n=6$ . ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida de pós-teste de Bonferroni (\*\* $p < 0,001$  \* $p < 0,01$  \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo Basal);( $\phi p < 0,05$  comparado a 5 mg/kg em A); ( $\phi p < 0,05$  comparado a 10 mg/kg em A e a 15 mg/kg em B) e ( $\# p < 0,05$  comparado a 15 mg/kg em A).

### 5.1.2 Efeito do (-)-mirtenol sobre a PAS, PAD e FC de animais SHR e RWN não anestesiados, após o bloqueio ganglionar com hexametônio (30 mg/kg)

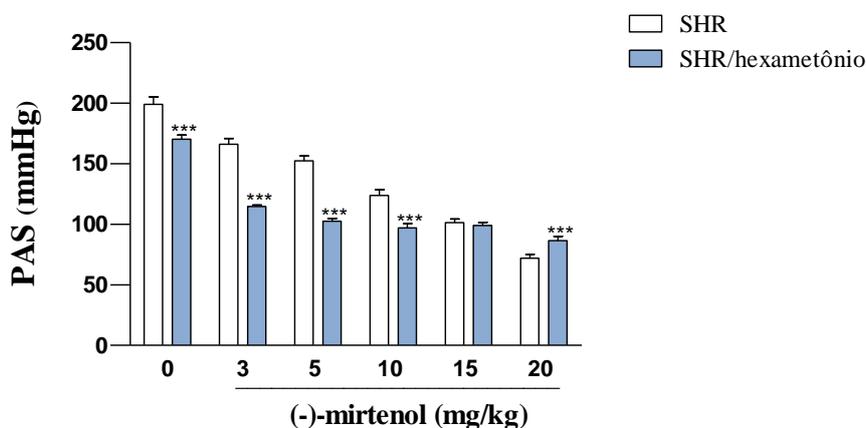
Para avaliar a possível influência do (-)-mirtenol nos mecanismos de controle autonômico da PA, administrou-se hexametônio na dose de 30 mg/kg, i.v., que nesta dose, desencadeia bloqueio ganglionar (SUN *et al.*, 2015).

Conforme se observa na figura 19, após 30 minutos da administração do hexametônio, os animais hipertensos apresentaram modificações nos parâmetros cardíacos avaliados ( $p < 0,05$ ), caracterizadas por hipotensão na PAS e PAD,  $170,21 \pm 3,39$  mmHg e  $131,34 \pm 2,83$  mmHg respectivamente, e bradicardia ( $269,99 \pm 6,30$  bpm). Ao avaliar os animais normotensos, os mesmos não apresentaram modificações na PA e FC após o tratamento com hexametônio (Fig. 20).

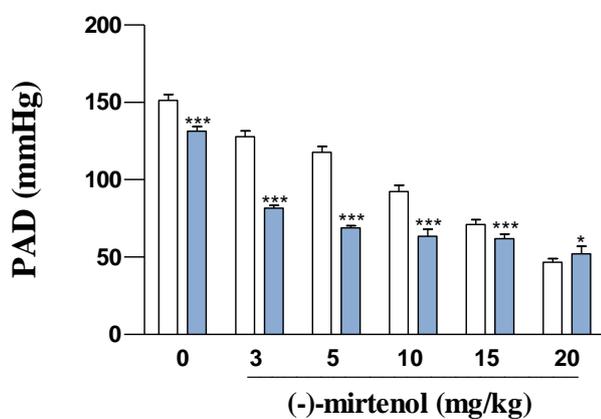
Em animais hipertensos, o pré-tratamento com hexametônio potencializou o efeito hipotensor do (-)- mirtenol nas doses 3, 5 e 10 mg/kg na PAS e em 3, 5, 10 e 15 mg/kg na PAD. Interessantemente, ocorreu inibição do efeito hipotensor da substância na dose de 20 mg/kg, tanto para a PAS quanto para a PAD, na presença do bloqueio ganglionar. Na FC observou-se que o hexametônio desencadeia inibição da resposta bifásica do (-)-mirtenol, inibindo a taquicardia nas doses de 3 e 5 mg/kg e a bradicardia nas doses de 15 e 20 mg/kg (Fig. 19).

Em animais normotensos, a administração de 30 mg/kg de hexametônio não alterou o efeito hipotensor da substância nas PAS e PAD. Porém o efeito taquicárdico do (-)- mirtenol foi inibido após o bloqueio ganglionar, conforme demonstrado na figura 20.

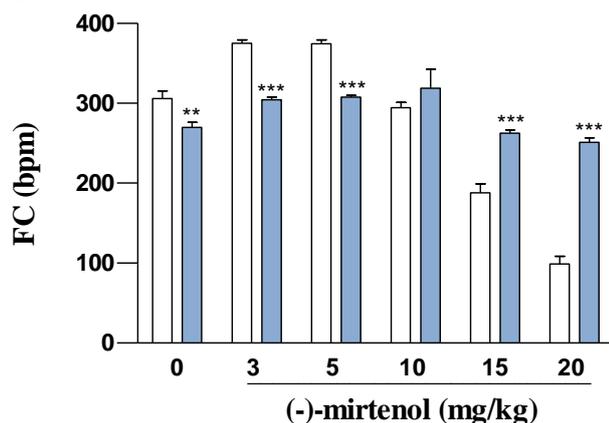
A



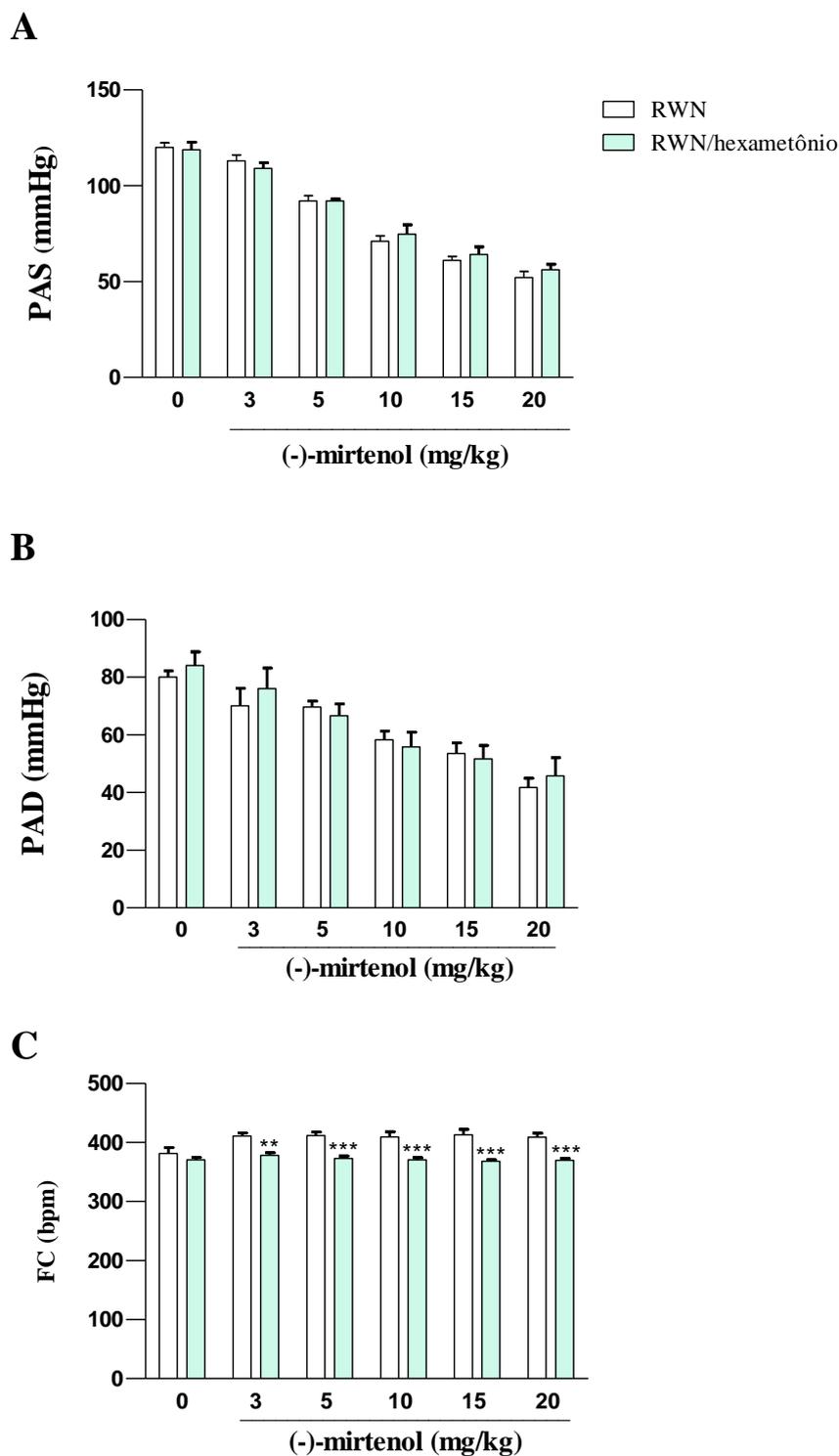
B



C



**Figura 19.** Efeito da administração intravenosa, *in bolus*, do (-)-mirtenol em (A) pressão arterial sistólica (PAS), em (B) na pressão arterial diastólica (PAD) e em (C) frequência cardíaca (FC) em animais hipertensos após o bloqueio ganglionar com hexametônio (30 mg/kg). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M para n=6. ANOVA de duas vias para medidas repetidas - \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 em comparação à ausência do hexametônio (30 mg/kg).



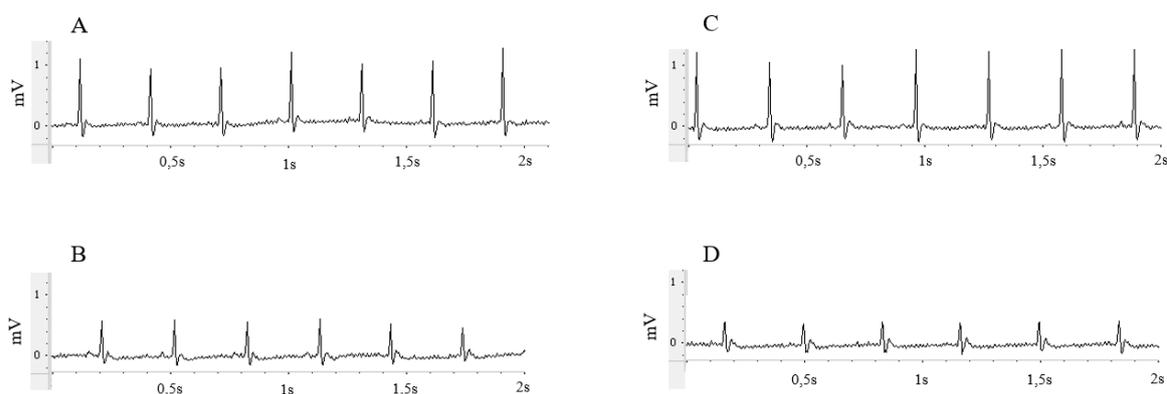
**Figura 20.** Efeito da administração intravenosa, *in bolus*, do (-)-mirtenol em (A) pressão arterial sistólica (PAS), em (B) pressão arterial diastólica (PAD) e (C) frequência cardíaca (FC) em animais normotensos após o bloqueio ganglionar com hexametônio (30 mg/kg). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M para  $n=6$ . ANOVA de duas vias para medidas repetidas - \*\* $p<0,01$  e \*\*\* $p<0,001$  em comparação à ausência do hexametônio.

### 5.1.3 Efeito do (-)-mirttenol na atividade elétrica do coração em animais SHR e RWN

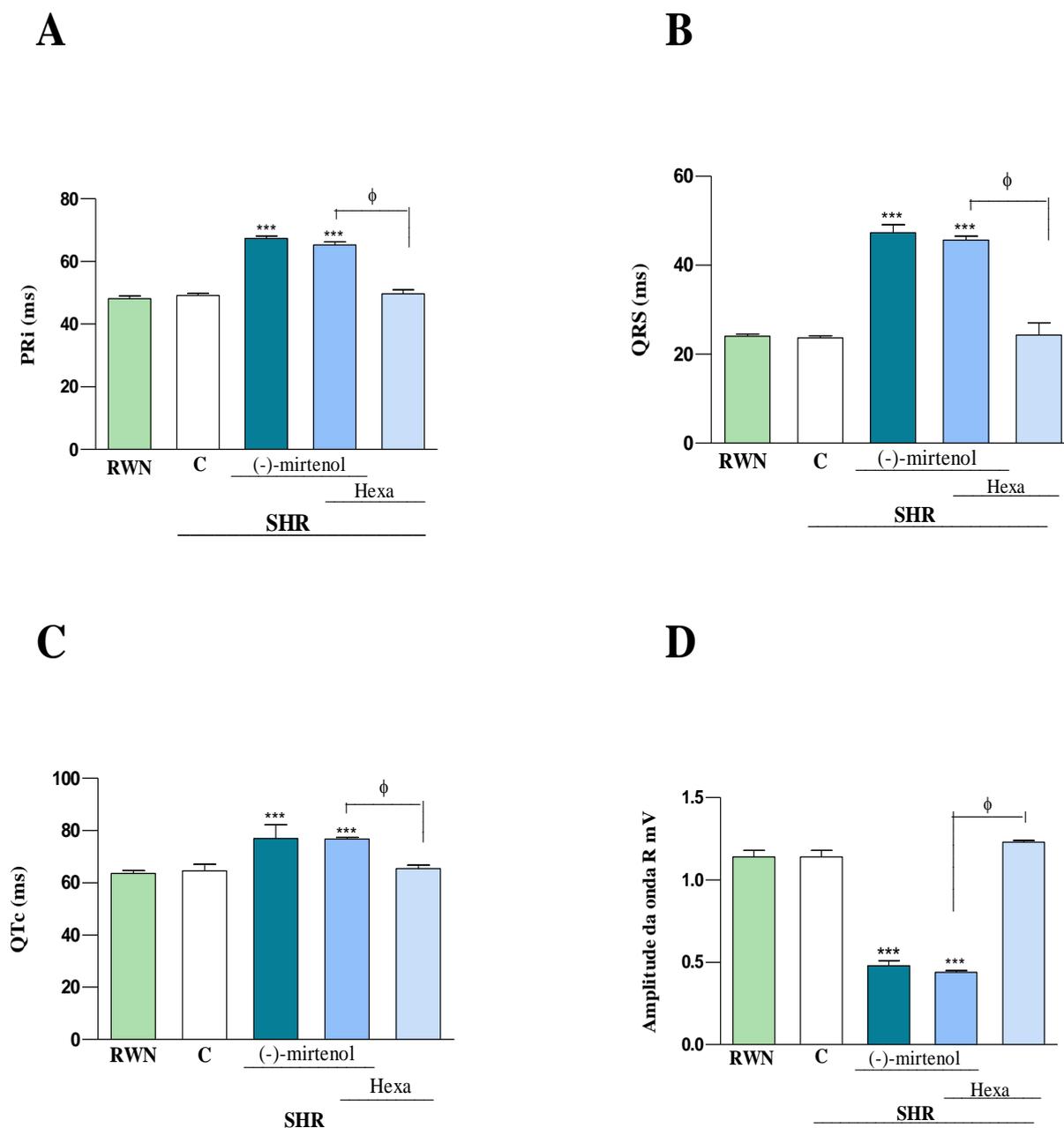
A atividade elétrica do coração foi registrada a partir da derivação DII no ECG (Fig. 21).

Em animais hipertensos os valores basais dos parâmetros eletrocardiográficos foram registrados: PRi em  $49,17 \pm 0,57$  ms, o QTc em  $59,62 \pm 1,39$  ms, o complexo QRS em  $16,67 \pm 0,45$  ms e a amplitude da onda R em  $1,14 \pm 0,04$  mV.

A administração de 20 mg/kg do (-)-mirttenol, i.v., desencadeou o prolongamento do intervalo PR ( $67,33 \pm 0,73$  ms), do intervalo QTc ( $76,97 \pm 5,27$  ms), alargamento do complexo QRS ( $47,33 \pm 1,81$  ms) e redução da amplitude da onda R ( $0,48 \pm 0,03$  mV). Subsequentemente, a administração do hexametônio na dose de 30 mg/kg, durante 30 minutos, não alterou o efeito do (-)- mirttenol nos parâmetros do ECG analisados (Fig. 22).



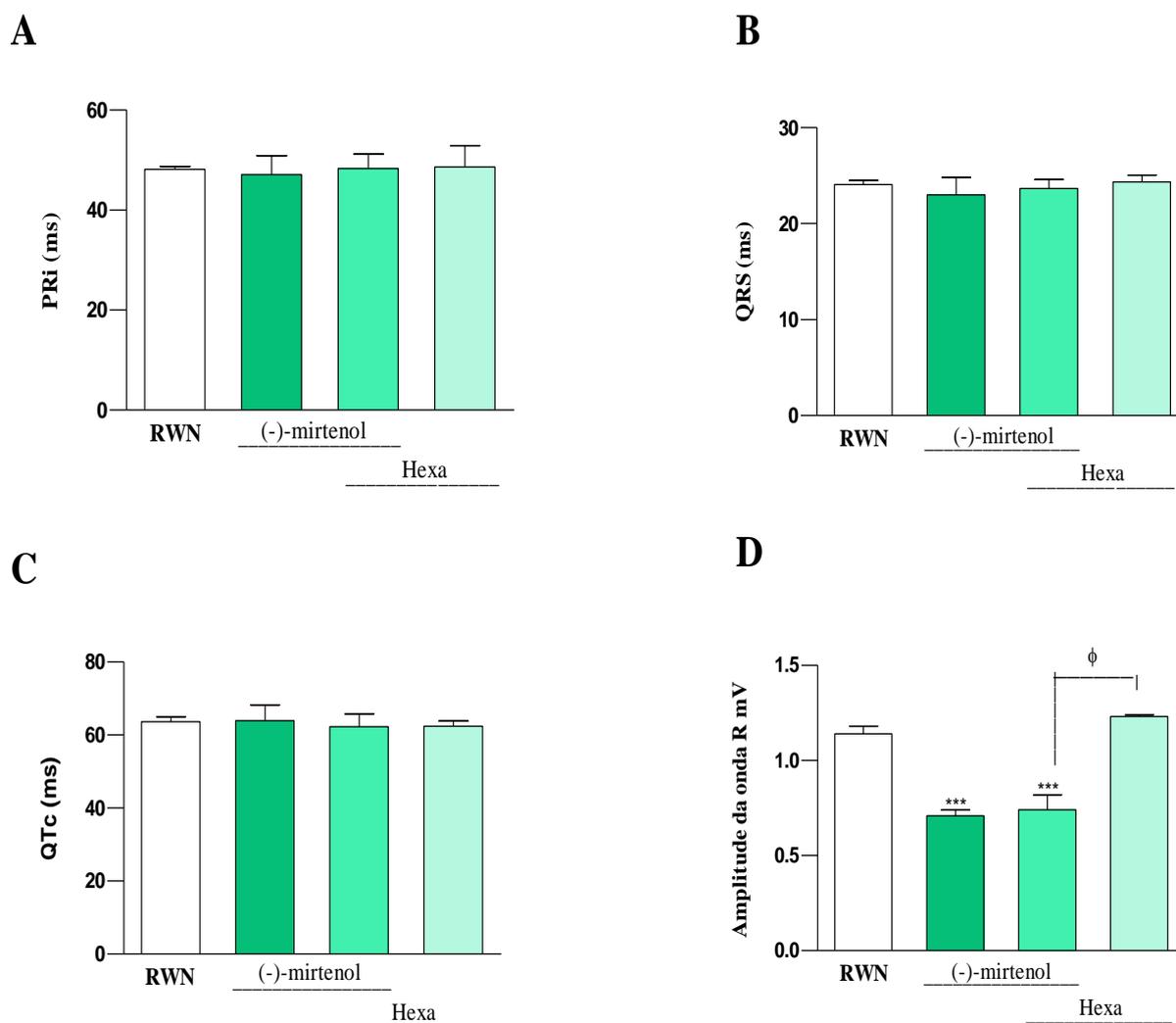
**Figura 21. Traçados típicos da atividade elétrica do coração em animais SHR anestesiados.** Em (A) animais SHR após administração de veículo (cremofor – 3%), em (B) SHR após a administração intravenosa do (-)-mirttenol 20 mg/kg, em (C) SHR após a administração do hexametônio (30 mg/kg) e em (D) SHR após a administração do (-)- mirttenol (20 mg/kg) na presença do hexametônio (30 mg/kg).



**Figura 22.** Efeito do (-)-mirtenol (20 mg/kg) no componente elétrico do coração em animais SHR e RWN anestesiados, na ausência e presença do bloqueio ganglionar com hexametônio (30 mg/kg). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M para  $n=8$ . ANOVA de uma via seguida de pós teste de Bonferroni \*\*\* $p<0,001$  (-)-mirtenol 20 mg/kg em comparação ao grupo SHR e  $\phi p<0,001$  (-)-mirtenol na presença do hexametônio em comparação ao grupo tratado apenas com hexametônio.

Em animais normotensos os valores médios basais (em ms) dos intervalos PRi, QRS e QTc, bem como a amplitude da onda R (mV) também foram registrados,

respectivamente:  $49,17 \pm 0,57$ ;  $16,67 \pm 0,45$ ;  $59,62 \pm 4,27$  e  $1,14 \pm 0,04$ . O (-)- mirtenol não desencadeou alterações nos intervalos PRi, QRS e QTc em animais normotensos, porém, promoveu redução da amplitude da onda R e esse efeito não foi modificado com tratamento dos animais com 30 mg/kg de hexametônio (Fig. 23).



**Figura 23. Efeito do (-)-mirtenol (20 mg/kg) no componente elétrico do coração em animais normotensos (RWN) anestesiados, na ausência e presença do bloqueio ganglionar com hexametônio (30 mg/kg).** Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M para  $n=8$ . ANOVA de uma vias seguida de pós teste de Bonferroni \*\*\*  $p<0,001$  (-)- mirtenol 20 mg/kg em comparação ao grupo RWN e  $\phi p<0,001$  (-)-mirtenol na presença do hexametônio em comparação ao grupo tratado apenas com hexametônio (D).

#### **5.1.4 Efeito na PAS, PAD e FC do (-)-mirtenol administrado via oral em animais SHR não anestesiados**

Para verificar se a substância, administrada por via oral (gavagem) nas doses de 20, 50 e 100 mg/kg, apresenta efeito farmacológico similar nos parâmetros hemodinâmicos do animal aos evidenciados na administração i.v., o (-)-mirtenol foi administrado por via oral em SHR.

Antes da administração oral da substância, do veículo ou do nifedipino (10 mg/kg), os valores basais da PA e FC foram registrados em,  $204,62 \pm 2,35$  mmHg (PAS),  $144,35 \pm 1,15$  mmHg (PAD) e  $400 \pm 12$  bpm (FC), conforme se observa na figura 24 A, B e C.

Os parâmetros cardiovasculares foram aferidos em função do tempo. Durante a primeira meia hora, as medidas foram mensuradas de dez em dez minutos, e subsequentemente, após 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas.

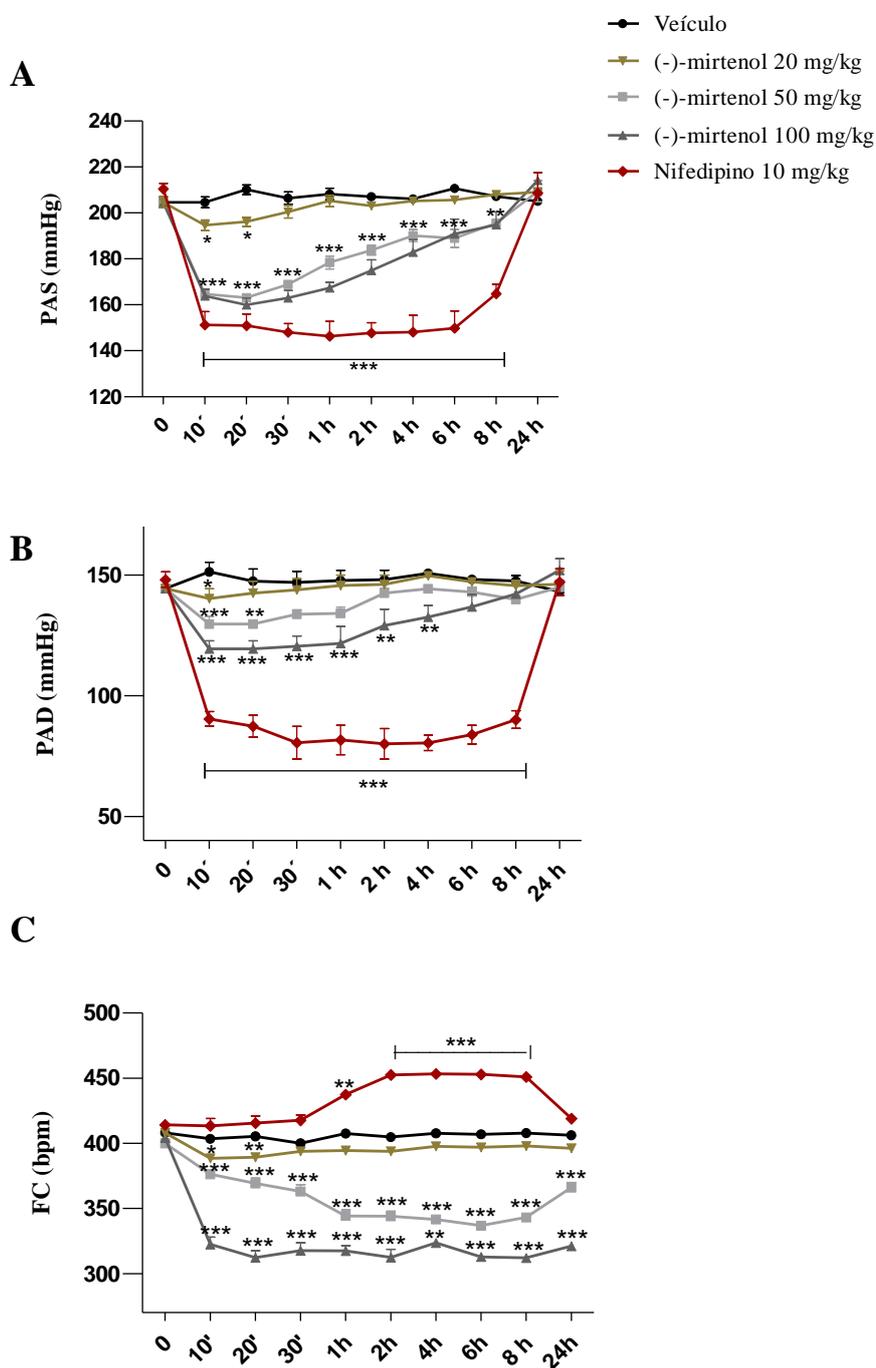
Os efeitos, hipotensor e bradicárdico, do (-)-mirtenol na dose de 20 mg/kg foram modestos em comparação ao veículo, ocorrendo nos primeiros 20 minutos na PAS e FC e na PAD nos primeiros 10 minutos.

Na dose de 50 mg/kg, o (-)-mirtenol desencadeou efeito hipotensor na PAS que se manteve no intervalo entre os 10 minutos iniciais até 8 horas após a administração. Na PAD, a hipotensão ocorreu nos primeiros 20 minutos. A bradicardia desenvolvida no animal SHR após 50 mg/kg aumentou, conforme o tempo, com pico após 6 horas, após esse período reduziu em 8 e 24 horas.

A administração oral de 100 mg/kg do (-)-mirtenol apresenta efeito hipotensor semelhante na PAS e superior na PAD comparado a dose de 50 mg/kg, com início de ação, nos primeiros 10 minutos. Esse efeito se manteve em 8 horas na PAS e foi até 4 horas na PAD. O efeito bradicárdico iniciou-se em dez minutos e se manteve durante as 24 horas acompanhadas.

O nifedipino (10 mg/kg), um agente anti-hipertensivo, reduziu a PAS e PAD com efeito iniciado em 10 minutos e mantido até 8 horas, após a administração. Na FC o

fármaco desencadeou efeito taquicárdico, iniciado na primeira hora e foi mantido até 8 horas de acompanhamento.



**Figura 24.** Efeito da administração oral do (-)-mirtenol nos parâmetros hemodinâmicos de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) em animais SHR não anestesiados. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M para  $n=8$ . ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de pós-teste de Bonferroni \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$  e \*\*\*  $p<0,001$  em comparação ao grupo veículo.

## 5.2 ABORDAGEM EXPERIMENTAL “*ex vivo*”

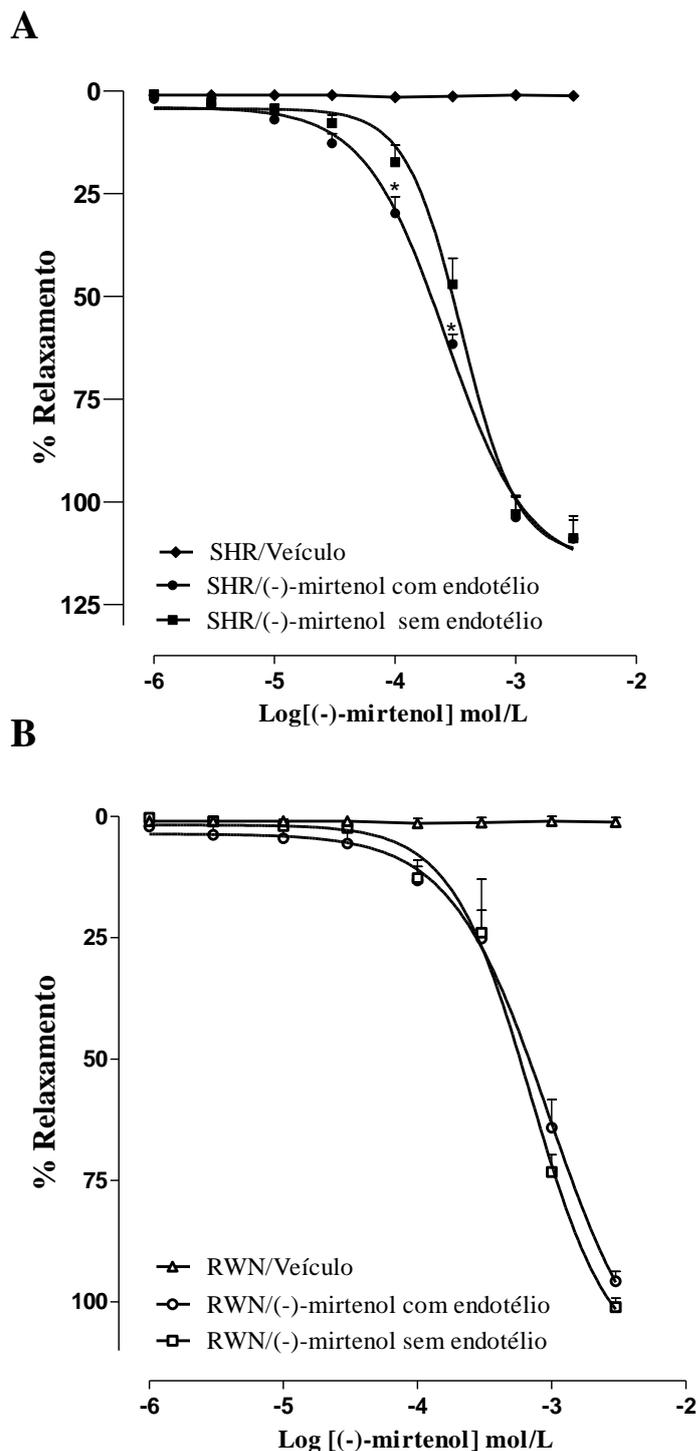
### 5.2.1 Efeito do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica superior isolada pré-contráidos com FEN, na presença ou ausência do endotélio funcional em animais SHR e RWN.

O (-)-mirtenol, nas concentrações ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-3}$  mol/L) ou veículo foi adicionado de forma crescente e cumulativa nas cubas contendo anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais hipertensos e normotensos pré-contráidas com FEN ( $1 \mu\text{mol/L}$ ). Conforme demonstrado na figura 25, o veículo não apresentou atividade vasorrelaxante nestas preparações.

A administração do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica de animais hipertensos (Fig. 25 A) desencadeia vasorrelaxamento ( $p < 0,05$ ) dependente de concentração tanto na presença quanto na ausência do endotélio. O  $E_{\text{máx}}$  da substância não foi alterado após a remoção do endotélio ( $E_{\text{máx}}$  endotélio funcional,  $118,03 \pm 6,48$  e  $E_{\text{máx}}$  após remoção do endotélio  $118,83 \pm 5,42$ ). Porém, ao se avaliar as menores concentrações, observou-se um efeito maior na presença do endotélio vascular, evidenciado pela redução do valor do  $pD_2$  ( $pD_2$  endotélio funcional,  $-3,65 \pm 0,02$  e  $pD_2$  após a remoção do endotélio,  $-3,22 \pm 0,02$ ).

Em animais normotensos, a administração crescente e cumulativa do (-)-mirtenol, também desencadeou efeito vasorrelaxante ( $p < 0,05$ ), dependente de concentração sem distinção no  $E_{\text{máx}}$  na presença ou ausência do endotélio ( $E_{\text{máx}}$  endotélio funcional,  $95,78 \pm 2,03$  e  $E_{\text{máx}}$  após remoção do endotélio  $101,12 \pm 1,84$ ), assim como sem alterações no valor do  $pD_2$  ( $pD_2$  endotélio funcional,  $-3,22 \pm 0,03$  e  $pD_2$  após a remoção do endotélio,  $-3,25 \pm 0,05$ ) (Fig. 25 B).

O efeito vasodilatador em animais hipertensos foi maior em comparação com os animais normotensos em todas as concentrações do (-)-mirtenol estudadas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 25. Efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em artéria mensentérica superior isolada de (A) animais hipertensos (SHR) e (B) normotensos (RWN) com e sem endotélio pré-contraídas com fenilefrina (FEN 1  $\mu\text{mol/L}$ ). Curvas dose-resposta que demonstram a atividade vasorrelaxante da substância ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-6}$  mol/L) em SHR (A) e RWN (B). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6). ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de pós-teste de Bonferroni  $*p < 0,05$  para as menores concentrações do (-)-mirtenol em anéis com endotélio em comparação aos anéis sem endotélio dos animais SHR.**

## 5.2.2 Efeito dependente do endotélio vascular desencadeado pelo (-)-mirtenol em mesentérica superior isolada de animais SHR.

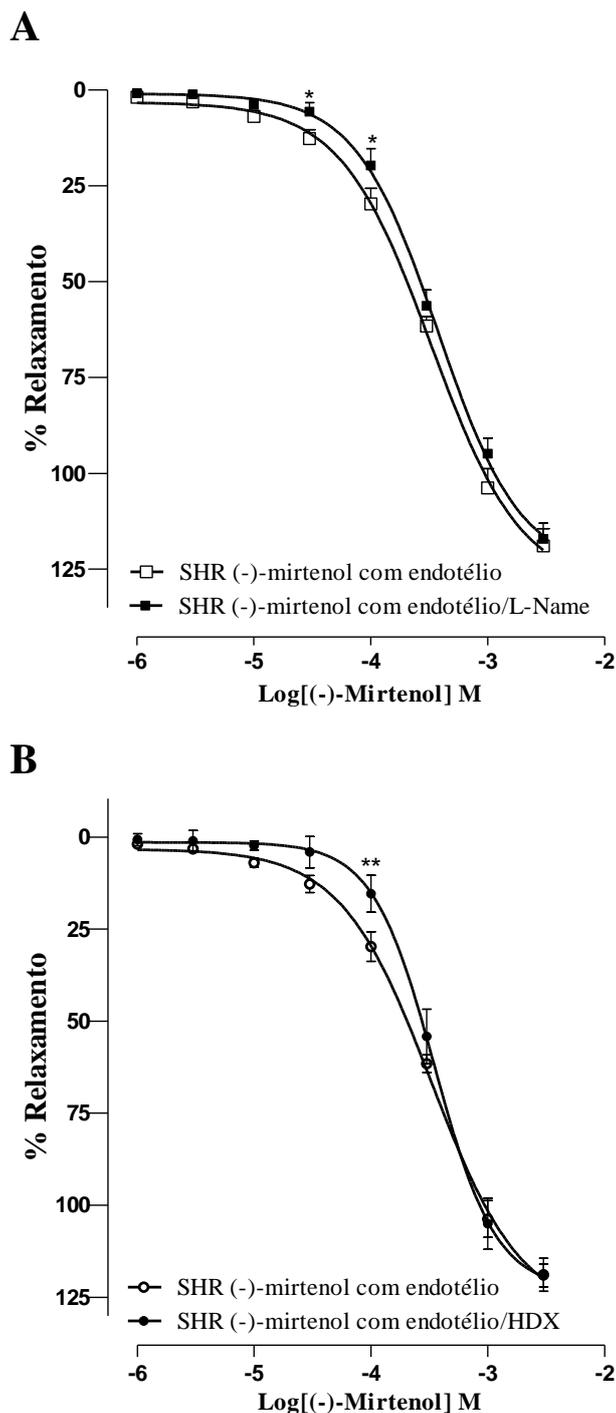
### 5.2.2.1 Participação do NO no efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica com endotélio preservado.

O (-)-mirtenol apresentou menor valor do  $pD_2$  em anéis de mesentérica com função endotelial preservada nos animais SHR. Um dos mecanismos de ação envolvidos nesta resposta, possivelmente, se relaciona com a produção de NO.

Para avaliar a participação do NO no efeito vasorrelaxante estimulado por (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica com endotélio preservado, estes foram pré-tratados com L-Name (100  $\mu\text{mol/L}$ ) durante 30 minutos, tempo necessário para a inibição da atividade das NOS, de forma inespecífica (KIROGLU *et al.*, 2017). Também foi utilizada hidroxocobalamina (30  $\mu\text{mol/L}$ ), durante 30 minutos, uma molécula que reduz a biodisponibilidade de NO, por meio de uma ligação na forma radicalar (ARAÚJO *et al.*, 2019).

Durante a inibição da produção de NO com L-Name (Fig 26 A), ocorreu redução do efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol nas mais baixas concentrações ( $p < 0,05$ ) evidenciado pelo deslocamento da curva para a direita e aumento do valor do  $pD_2$  ( $pD_2$  na ausência do L-Name,  $-3,65 \pm 0,02$  e  $pD_2$  na presença do L-Name,  $-3,55 \pm 0,04$ ) sem nenhuma alteração no  $E_{m\acute{a}x}$  ( $E_{m\acute{a}x}$  na ausência do L-Name,  $118,03 \pm 6,48$  e  $E_{m\acute{a}x}$  na presença do L-Name,  $117,00 \pm 5,19$ ).

Semelhantemente, na presença do sequestrador de NO na forma radicalar, a hidroxocobalamina (30  $\mu\text{mol/L}$ ), ocorreu redução do efeito vasorrelaxante da substância nas mais baixas concentrações ( $p < 0,05$ ), conforme se observou o deslocamento da curva para a direita e aumento do valor do  $pD_2$  ( $pD_2$  na ausência da HDX,  $-3,65 \pm 0,02$  e  $pD_2$  na presença da HDX,  $-3,53 \pm 0,03$ ). Sem nenhuma alteração no  $E_{m\acute{a}x}$  da substância ( $E_{m\acute{a}x}$  na ausência do HDX,  $118,03 \pm 6,48$  e  $E_{m\acute{a}x}$  na presença do HDX,  $119,09 \pm 3,10$ ) (Fig. 26 B).

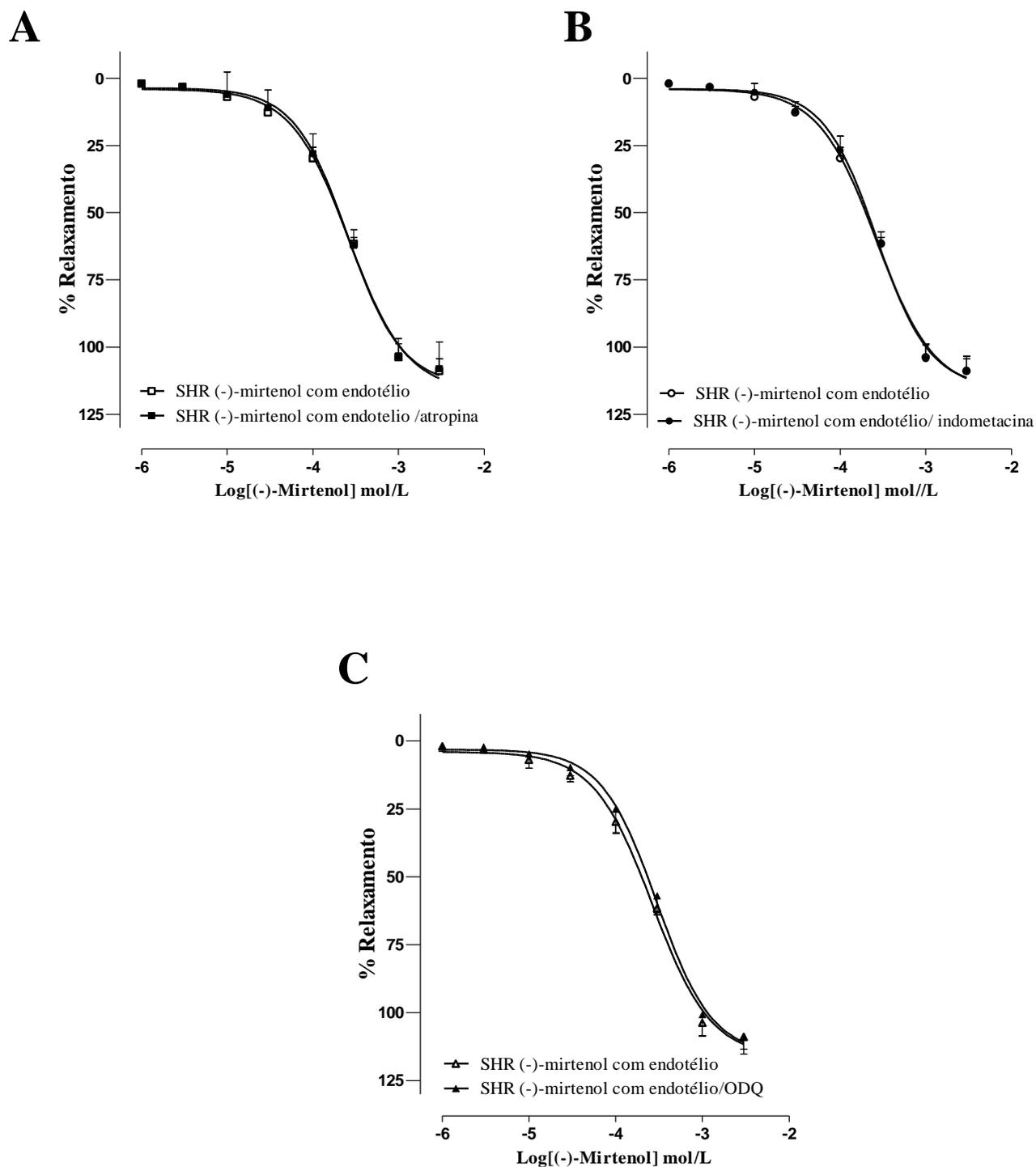


**Figura 26. Efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em artéria mensentérica superior isolada com endotélio preservado de animais SHR, na presença ou ausência de L-Name 100  $\mu\text{mol/L}$  (A) e hidroxocobalamina 30  $\mu\text{mol/L}$  (HDX) (B), pré-contraídas com fenilefrina (FEN). Curvas dose-respostas que demonstram a atividade vasorrelaxante da substância ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-3}$  mol/L). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6). As análises foram feitas com ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguida de pós-teste de Bonferroni, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  em comparação a curva de relaxamento para (-)- mirtenol em anéis com endotélio. L-Name = inibidor inespecífico das óxido nítrico sintases e HDX = sequestrador de óxido nítrico**

### 5.2.2.2 Efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol na presença de atropina, indometacina e ODQ.

Para melhor caracterizar o efeito vasorrelaxante dependente do endotélio apresentado por (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica dos animais SHR, utilizou-se algumas ferramentas farmacológicas (Fig. 27 A), como a atropina (1 nmol/L), um antagonista dos receptores muscarínicos ( $M_3$  no endotélio) que inibe o vasorrelaxamento dependente da liberação de mediadores endoteliais. A indometacina (10  $\mu\text{mol/L}$ ) causa inibição da ciclo-oxigenase, enzima responsável pela produção de mediadores vasorrelaxantes a partir do ácido aracdônico (Fig. 27 B) e o ODQ (10  $\mu\text{mol/L}$ ) que desencadeia inibição da GCs, da via descendente de relaxamento do NO (Fig. 27 C).

A inibição dos receptores muscarínicos ( $M_3$ ) com atropina ( $E_{\text{máx}}$  117,21  $\pm$  7,18 e  $\text{pD}_2$  -3,65  $\pm$  0,03), da produção de  $\text{PGI}_2$  com indometacina ( $E_{\text{máx}}$  119,54  $\pm$  5,11 e  $\text{pD}_2$  -3,64  $\pm$  0,03), e da atividade enzimática da ciclase de guanilil solúvel com ODQ ( $E_{\text{máx}}$  115,39  $\pm$  6,32 e  $\text{pD}_2$  -3,66  $\pm$  0,02), não alteraram o  $E_{\text{máx}}$  (118,03  $\pm$  6,48) e o  $\text{pD}_2$  (-3,65  $\pm$  0,02) da resposta vasorrelaxante dependente do endotélio induzida pelo (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica superior isolada.



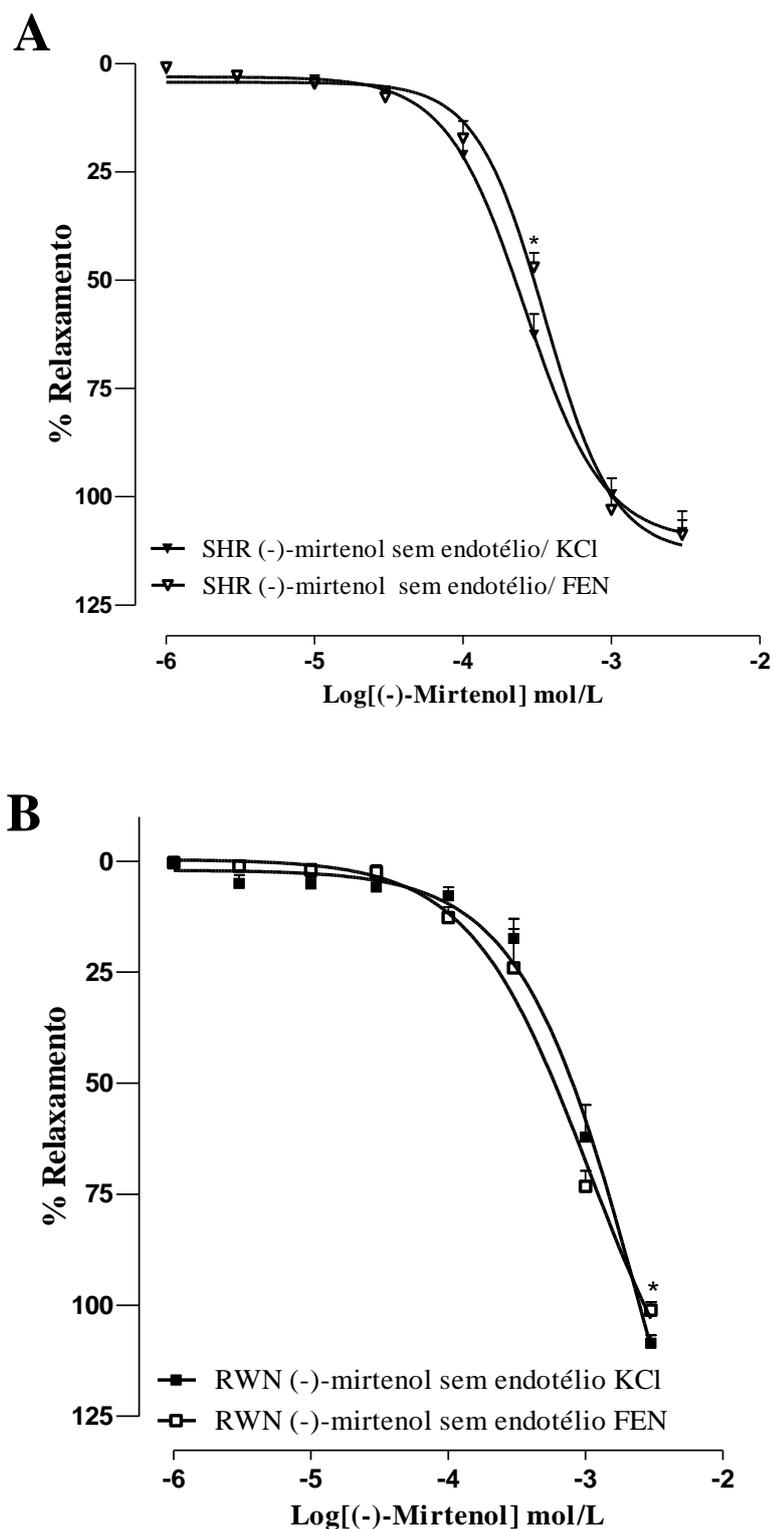
**Figura 27. Efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis com endotélio vascular preservado de artéria mesentérica de SHR na presença de atropina 1 nmol/L (A), indometacina 10  $\mu$ mol/L (B) e ODQ 10  $\mu$ mol/L (C). Curvas concentração-resposta do (-)-mirtenol ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-3}$  mol/L). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6). As análises foram feitas com ANOVA de duas vias para medidas repetidas com pós-teste de Bonferroni e não foram diferentes do efeito do (-)-mirtenol em anéis com endotélio preservado dos animais SHR. Atropina = antagonista muscarínico, indometacina = inibidor da ciclo-oxigenase e ODQ = inibidor da ciclase de guinilil solúvel.**

### 5.2.3 Efeito do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica superior isolada, na ausência do endotélio vascular, pré-contraídos com KCl 80 mmol/L em animais SHR e RWN.

Os anéis de artéria mesentérica dos animais SHR e RWN foram pré-contraídos com uma solução despolarizante isosmótica de KCl 80 mmol/L (conforme descrito na abordagem metodológica), uma vez que a modificação da concentração extracelular de  $K^+$  altera o potencial de membrana desencadeando uma despolarização com posterior influxo de cálcio através dos  $Cav$ , assim, as células musculares lisas vasculares irão se contrair. Concentrações crescentes e cumulativas do (-)-mirtenol foram administradas às cubas ( $10^{-6}$  -  $3 \times 10^{-3}$  mol/L), a resposta obtida foi comparada àquela encontrada com a utilização da contração com FEN 1  $\mu$ mol/L (Fig. 28).

Em animais hipertensos, o efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol na pré-contração induzida por KCl 80 mmol/L ( $E_{m\acute{a}x}$   $118,03 \pm 2,76$  e  $pD_2$   $-3,60 \pm 0,02$ ) foi maior nas concentrações mais baixas ( $p < 0,05$ ) quando comparado à resposta da substância na contração induzida por FEN1  $\mu$ mol/L ( $E_{m\acute{a}x}$   $118,83 \pm 5,42$  e  $pD_2$   $-3,49 \pm 0,02$ ), conforme comparação do efeito máximo das concentrações e deslocamento da curva para a esquerda (Fig. 28 A).

Nos animais normotensos, o efeito vasorrelaxante promovido pelo (-)-mirtenol foi superior na mais alta concentração na pré-contração induzida por KCl 80 mmol/L ( $E_{m\acute{a}x}$   $117,31 \pm 4,13$  e  $pD_2$   $-3,24 \pm 0,04$ ) em comparação à contração por FEN 1  $\mu$ mol/L ( $E_{m\acute{a}x}$   $101,12 \pm 1,84$  e  $pD_2$   $-3,25 \pm 0,05$ ), conforme se observa o efeito máximo da maior concentração (Fig. 28 B).



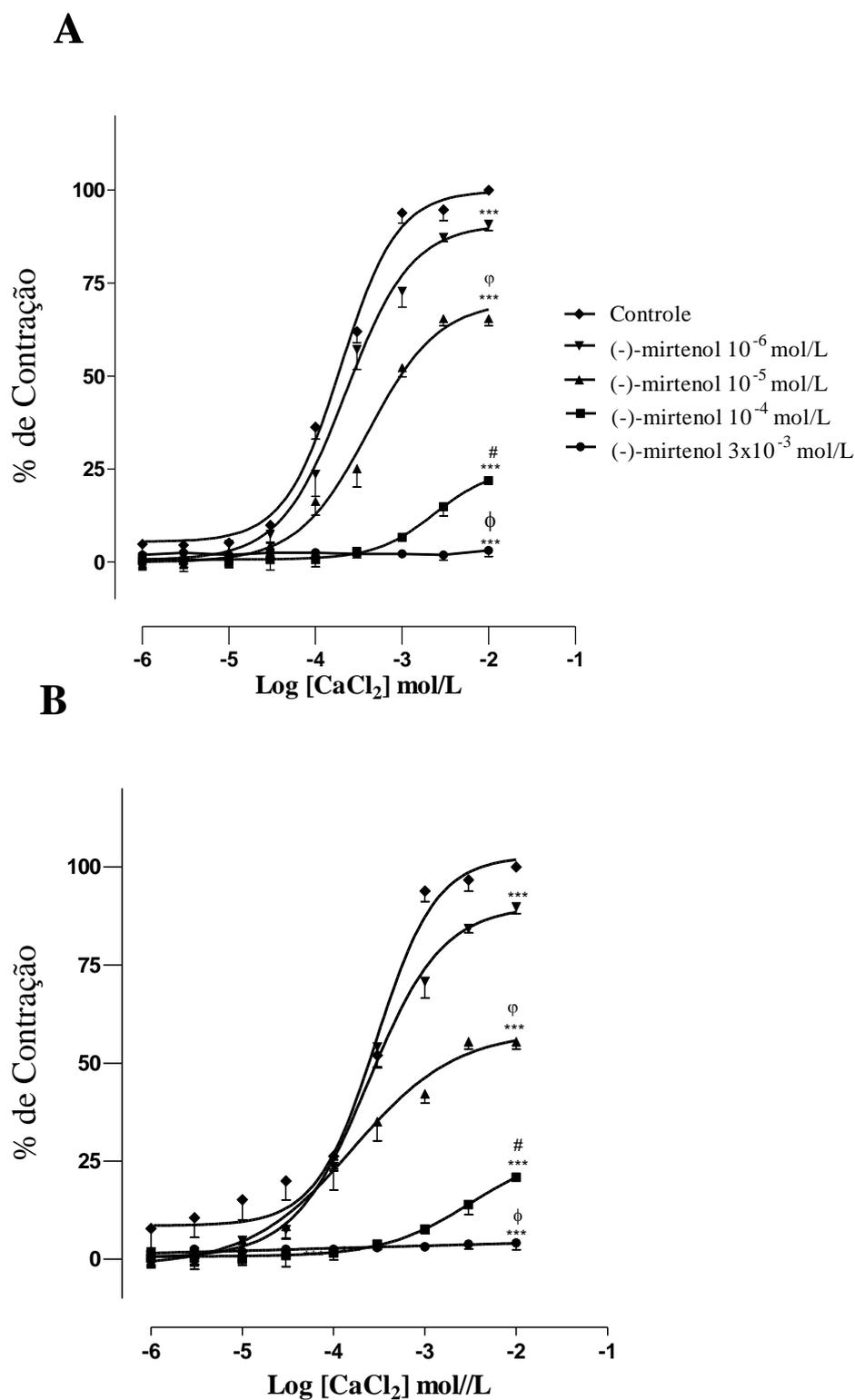
**Figura 28.** Efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio vascular pré-contraídos com KCl 80 mmol/L ou fenilefrina (FEN) 1  $\mu$ mol/L em animais SHR(A) e RWN (B). Os valores estão representados como média  $\pm$  E.P.M. (n=6). ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0.05$  em comparação ao efeito máximo da concentração no grupo FEN 1  $\mu$ mol/L.

#### 5.2.4 Participação dos canais para $\text{Ca}^{2+}$ sensíveis a voltagem no efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em animais SHR e RWN.

O efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol pode ser explicado, em parte, pela interferência da substância na mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular, a partir do bloqueio do influxo deste íon através da membrana plasmática. Para testar essa hipótese, curvas para  $\text{CaCl}_2$ , de maneira crescente e cumulativa, foram estimuladas nas concentrações de ( $10^{-6} - 10^{-2}$  mol/L).

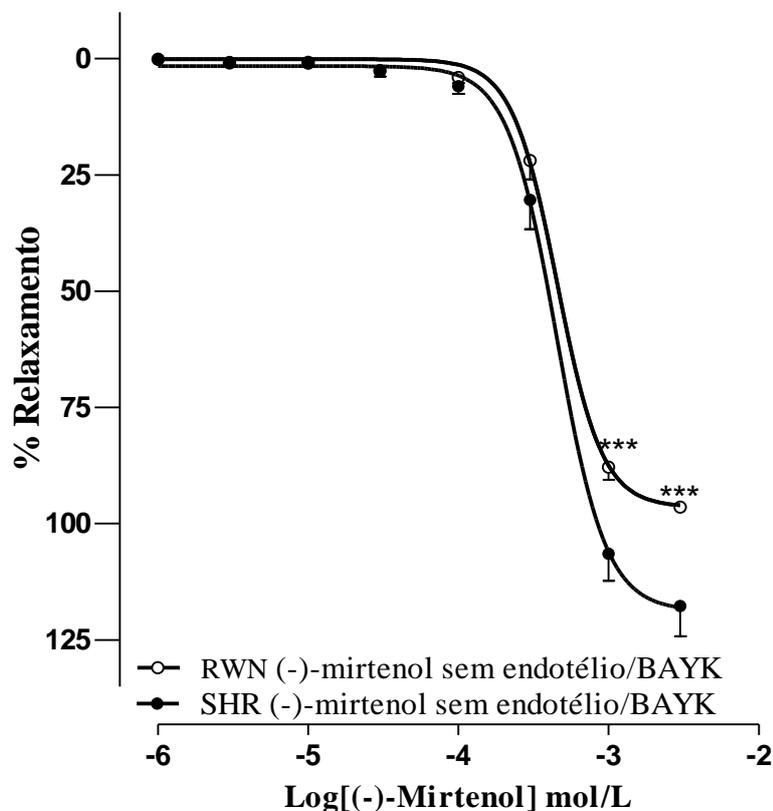
Conforme se observa na figura 29, tanto em animais SHR (A) quanto em animais RWN (B), o (-)-mirtenol ( $10^{-6} - 3 \times 10^{-3}$  mol/L), de maneira dependente de concentração, desencadeia inibição ( $p < 0,001$ ) da curva de contração induzida por  $\text{CaCl}_2$  em comparação ao controle, a curva de contração concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$ .

Para melhor caracterizar o efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol no influxo de cálcio, utilizou-se um agonista dos canais cálcio sensíveis a voltagem do tipo L, o BAYK 8644 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ). O (-)-mirtenol desencadeou efeito vasorrelaxante, dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior isolada, pré-contraídas com o agonista dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Fig. 30) em animais hipertensos ( $E_{\text{máx}} 117,73 \pm 6,48$  e  $\text{pD}_2 -3,35 \pm 0,02$ ) e normotensos ( $E_{\text{máx}} 96,00 \pm 0,99$  e  $\text{pD}_2 -3,34 \pm 0,01$ ), entretanto apresentou maior efeito em animais SHR em concentrações mais altas ( $p < 0,001$ ).



**Figura 29.** Efeito do (-)-mirtenol na curva de contração concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-6}$  –  $10^{-2}$  mol/L) em (A) hipertensos (SHR) e (B) normotensos (RWN). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M de contração para  $\text{CaCl}_2$ . ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de pós-teste de Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao

controle,  $\varphi p < 0,001$  em comparação a  $10^{-6}$  mol/L,  $\# p < 0,01$  comparado a  $10^{-5}$  mol/L e  $\phi p < 0,001$  comparado a  $10^{-4}$  mol/L de (-)-mirtenol.

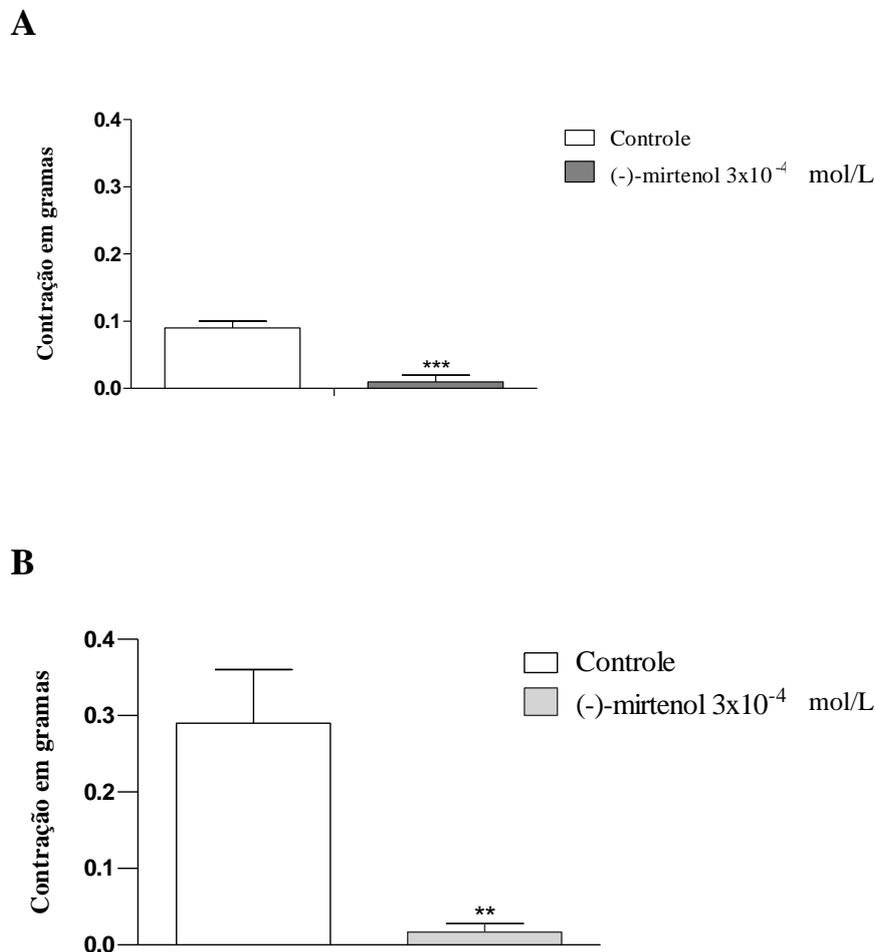


**Figura 30. Efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica em (A) animais hipertensos (SHR) e (B) normotensos (RWN), na presença do BAYK 8644  $10 \mu\text{mol/L}$ . Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. Análise por ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de pós-teste de Bonferroni  $*** p < 0,001$  comparado as maiores concentrações. BAYK 8644 = agonista dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.**

### 5.2.5 Participação dos receptores intracelulares para $\text{Ca}^{2+}$ sensíveis ao $\text{IP}_3$ no efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em animais SHR e RWN.

Os receptores sensíveis ao  $\text{IP}_3$  se localizam no retículo sarcoplasmático e, quando ativados, mobilizam o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e elevam a concentração desse íon no citoplasma. Desse modo, propôs-se pesquisar a possível participação da inibição destes receptores no efeito vasorrelaxante independente do endotélio vascular desencadeado pelo (-)-mirtenol.

Em animais SHR (A) e RWN (B) a substância inibe ( $p < 0,001$ ) a contração transiente para  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por FEN em meio livre de cálcio na concentração de  $3 \times 10^{-4}$  mol/L (Fig. 31).



**Figura 31.** Efeito do (-)-mirtenol na contração transiente para  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por FEN em anéis, sem endotélio, de artéria mesentérica superior, em animais SHR (A) e WT (B). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. Foi utilizado teste t-Student para \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em comparação ao grupo controle.

### 5.2.6 Efeito do (-)-mirtenol na resposta contrátil estimulada pela sensibilidade da maquinaria contrátil ao $\text{Ca}^{2+}$ em animais SHR e RWN.

Para avaliar o possível efeito do (-)-mirtenol na sensibilização da maquinaria contrátil das CMLV ao  $\text{Ca}^{2+}$ , utilizou-se o ortovanadato de sódio, que desencadeia a inibição competitiva da proteína tirosina fosfatase, induzindo contração na musculatura lisa vascular em baixa concentração para  $\text{Ca}^{2+}$  (MIRONOVA *et al.*, 2017).

Uma curva concentração-contração para  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ( $10^{-5}$  –  $10^{-2}$  mol/L) foi estimulada em anéis de artéria mesentérica com endotélio removido em animais SHR (Fig. 32 A) e RWN (Fig. 32 B). A pré-incubação dos anéis com (-)-mirtenol nas concentrações de  $10^{-4}$  e  $3 \times 10^{-3}$  mol/L desencadeou inibição da curva de contração para  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , conforme se observa na figura abaixo.

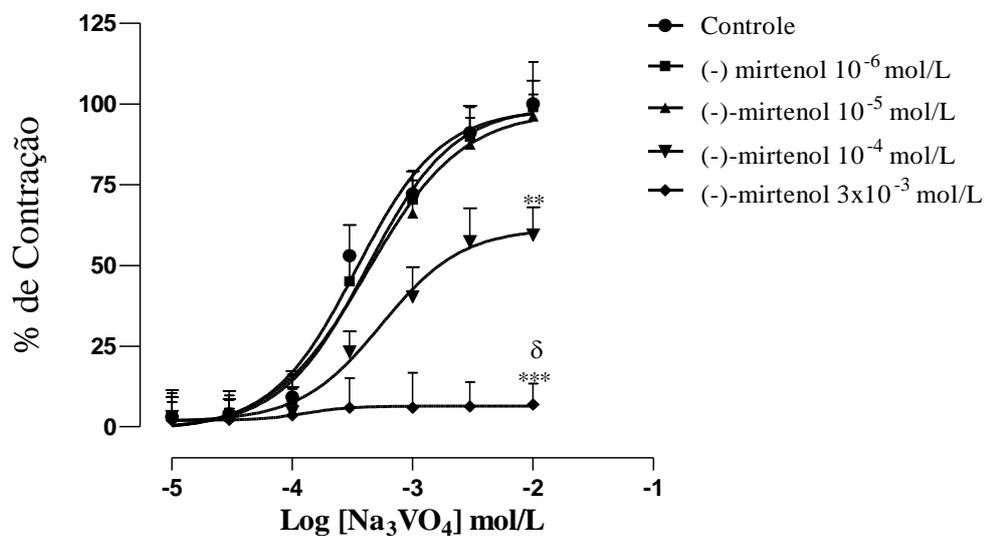
### 5.2.7 Participação dos canais para potássio no efeito vasorrelaxante do (-)- mirtenol em animais SHR e RWN.

Para avaliar a participação dos canais para  $\text{K}^+$  no efeito vasorrelaxante independente do endotélio vascular promovido por (-)-mirtenol, utilizou-se o TEA 1 mmol/L. Esta substância promove o bloqueio dos canais para potássio de maneira inespecífica (BAILEY *et al.*, 2007; BELEZNAI *et al.*, 2011).

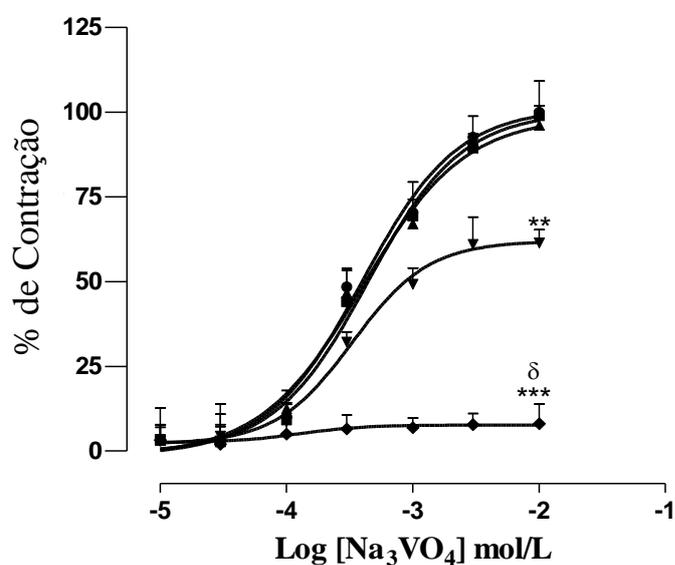
Em animais SHR (Fig. 33 A) o efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica isolada ( $E_{\text{máx}}$   $118,83 \pm 5,42$  e  $pD_2$   $-3,49 \pm 0,02$ ) não foi alterado na presença do bloqueador dos canais para  $\text{K}^+$  TEA 1 mmol/L ( $E_{\text{máx}}$   $119,32 \pm 8,67$  e  $pD_2$   $-3,46 \pm 0,07$ ).

O efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica superior isolada com endotélio removido ( $E_{\text{máx}}$   $101,12 \pm 1,84$  e  $pD_2$   $-3,25 \pm 0,05$ ) em animais RWN também não foi modificado após bloqueio inespecífico dos canais para  $\text{K}^+$  com TEA ( $E_{\text{máx}}$   $104,00 \pm 5,97$  e  $pD_2$   $-3,23 \pm 0,07$ ) conforme se observa na figura 33 B.

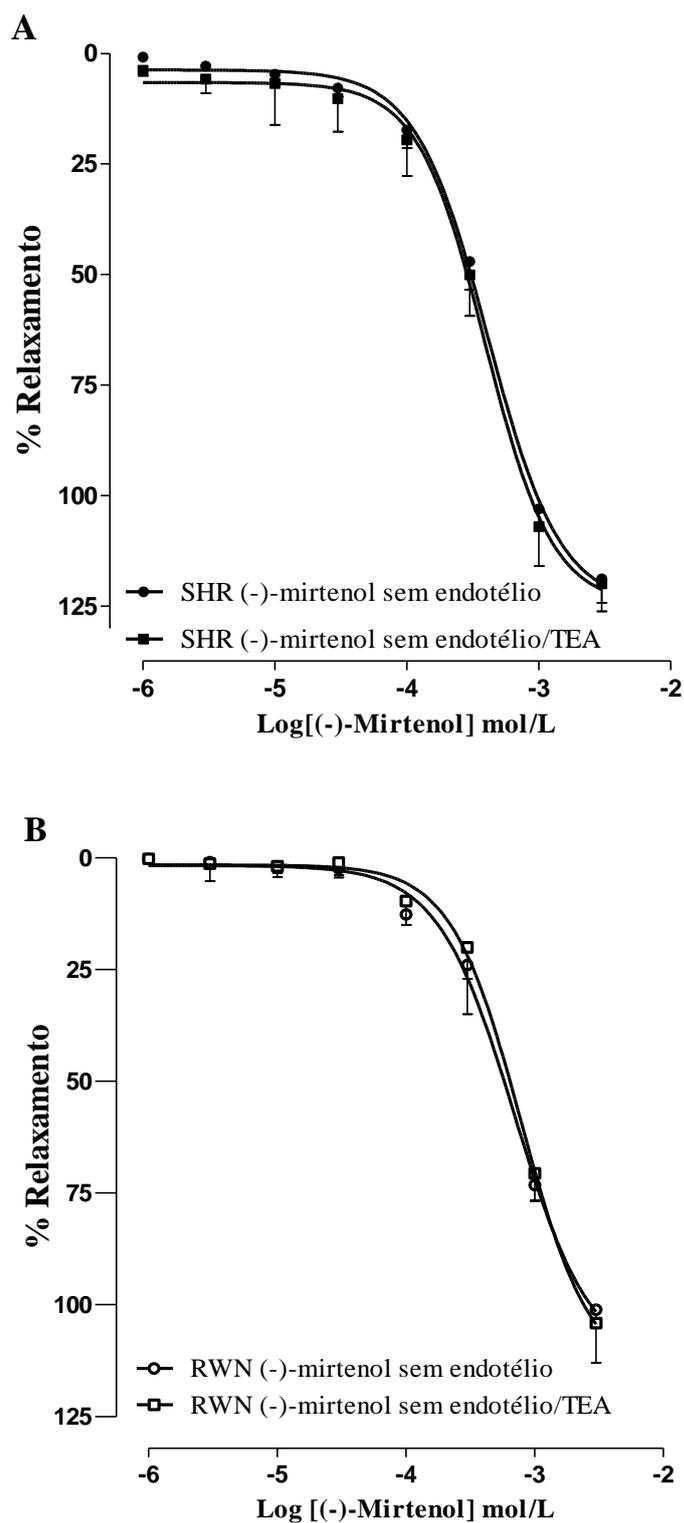
A



B



**Figura 32. Efeito do (-)-mirtenol na sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  com  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ( $10^{-5}$  –  $10^{-2}$  mol/L) em anéis de artéria mesentérica sem endotélio vascular, em (A) animais hipertensos (SHR) e (B) normotensos (RWN). Os valores são representados como média  $\pm$  E.P.M. de contração para  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  na presença do (-)- mirtenol. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida da pós-teste de Bonferroni. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em comparação ao controle e  $\delta p < 0,0001$  em comparação à concentração de  $10^{-4}$  mol/L.**



**Figura 33. Efeito vasorrelaxante do (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica sem endotélio vascular na presença ou ausência do TEA 1  $\mu\text{mol/L}$  em (A) animais hipertensos (SHR) e (B) normotensos (RWN). Os valores correspondem a média  $\pm$  E.P.M. (n=6). As análises foram feitas com ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de pós-teste de Boferroni e não se apresentaram distintas. TEA = bloqueador inespecífico dos canais para potássio.**

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo possibilitou a identificação e o entendimento dos efeitos cardiovasculares do (-)- mirtenol em animais hipertensos e normotensos, bem como a descrição dos mecanismos de ação envolvidos. Com a utilização de duas abordagens metodológicas, *in vivo* e *ex vivo*, foi possível a descrição da atividade desta substância na PA, na FC, na atividade elétrica do coração e no estado de contratilidade das CMLV em animais com hipertensão essencial, somando-se aos efeitos biológicos já descritos deste monoterpene em outras contribuições.

O primeiro desafio a ser superado nesta pesquisa foi a decisão pelo modelo de HAS a utilizar. A doença hipertensiva é a principal causa de morbimortalidade no mundo e a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos são necessários para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes e com reduzidos efeitos adversos. Modelos animais são cada vez mais utilizados em estudos de novas moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos (LERMAN *et al.*, 2019).

A HAS apresentada pelo animal SHR se assemelha com a doença em humanos, desde a sua instalação, a progressão e a resposta farmacológica, sendo o modelo animal mais utilizado atualmente (DORIS, 2017; DORNAS; SILVA, 2011). A similaridade entre a hipertensão genética no SHR e nos humanos foi a razão de se ter optado por trabalhar com esse modelo animal.

Os dados hemodinâmicos de PA e FC dos animais SHR apresentados no presente trabalho evidenciam a instalação da doença hipertensiva neste modelo animal, uma vez que se aproximam dos valores obtidos em outros estudos. No trabalho publicado por FLORES- FLORES e col. (2016) os registros hemodinâmicos aferidos por pletismografia de cauda, evidenciaram valores de 180 mmHg para PAS, 150 mmHg para a PAD e 400 bpm para a FC. No estudo de LV e colaboradores (2013) também com a utilização da técnica não invasiva de aferição da PA com a pletismografia de cauda, os dados hemodinâmicos registrados foram de 215 mmHg para PAS e 170 mmHg para a PAD. De forma similar ao presente estudo, DE-BARROS *et al.* (2015) utilizaram a técnica invasiva para mensurar a PAM dos animais SHR, através da canulação da aorta abdominal e demonstraram o valor de 150 mmHg.

A avaliação dos parâmetros de PA e FC apresentados pelos animais RWN também demonstra que esses animais apresentavam normotensão. Conforme observado no trabalho de DANTAS e colaboradores (2015), que mensurou as variáveis hemodinâmicas de animais Wistar utilizando a medida direta da pressão arterial, através da artéria aorta abdominal, o registro da PAM foi de 108 mmHg e a FC foi de 369 bpm. No trabalho de BASTOS e col. (2010) a canulação da aorta abdominal de ratos normotensos permitiu o registro da PAM em 117 mmHg. Já no estudo publicado por Santos e col. (2010), a avaliação das variáveis hemodinâmicas em ratos normotensos do biotério setorial da Universidade Federal de Sergipe demonstrou valores de PAM de 106,77 mmHg e FC de 344,30 bpm.

Neste estudo os animais SHR e RWN foram submetidos a um procedimento cirúrgico com anestesia induzida por cetamina e xilazina, porém respeitou-se o período de 24 horas para o início dos experimentos funcionais, tempo necessário para que houvesse a completa metabolização e eliminação dos anestésicos, uma vez que os mesmos alteram a função cardiovascular. Tanto a cetamina quanto a xilazina são metabolizados no fígado e excretadas na urina. A cetamina apresenta tempo de meia vida de 2 horas e xilazina de 1 hora (VEILLEUX-LEMIEUX *et al.*, 2013).

Os anestésicos usados em experimentação com animais alteram a função hemodinâmica e foram utilizados de maneira cautelosa no decorrer deste trabalho pois, a avaliação destas variáveis não refletirá a verdadeira reposta apresentada pelo animal, especialmente na investigação do efeito cardiovascular dos produtos naturais. Conforme demonstrado pelos autores, BENCZE; BEHULIAK; ZICHA, (2013), utilizando animais RWN e SHR com 20 semanas, identificaram que os anestésicos cetamina-xilazina, isoflurano e pentobarbital, influenciaram vias de sinalização que controlam a PA. Os anestésicos alteraram os parâmetros hemodinâmicos por meio da potencialização do efeito hipotensor do captopril; da indução de hipotensão relacionada a redução do efeito inibitório da produção de NO por L-Name e da diminuição o efeito hipotensor do pentolínio, um bloqueador ganglionar.

A seleção das doses do (-)- mirtenol utilizadas neste estudo ocorreu inicialmente por meio de uma busca em outros trabalhos que já demonstraram o efeito biológico deste monoterpene. Para avaliar o efeito ansiolítico do (-)-mirtenol, Moreira e col. (2014) utilizaram as doses de 25, 50 e 75 mg/kg, via i.p e as três doses da substância induziram

efeito ansiolítico, sem alterar o comportamento motor dos animais, como também não induziram alterações neurotóxicas ou relaxantes musculares. Em outro trabalho, utilizando a dose de 50 mg/kg durante 7 dias por via oral, Britto e col. (2018), demonstraram que o pré-tratamento com (-)- mirtenol foi eficaz em restabelecer o desempenho contrátil ventricular do coração e normalizar o ECG, em função de um efeito antioxidante nas lesões de isquemia e reperfusão. No estudo de Viana e colaboradores (2016), em modelo de úlcera gástrica induzido por etanol, o efeito do pré-tratamento, 1 hora antes, com (-)-mirtenol (25, 50 e 100 mg/kg, v.o.) mostrou efeito protetor gástrico dependente de dose relacionado a ativação das vias dependente de NO, da ativação dos receptores GABAérgicos e estimulação da produção de prostaglandinas.

A toxicidade da substância também foi considerada na seleção das doses do estudo, a fim de se utilizar a substância com segurança. No trabalho publicado por Bhatia e col. (2008) a dose letal (DL<sub>50</sub>) para ratos machos e fêmeas foi respectivamente de 2,45 g/kg e 0,63 g/kg. A administração de 2 g/kg de (-)- mirtenol em ratos, ocasionou redução da motilidade, ocorrência de tremores e adoção de posição abdominal anômala (supina), tais efeitos foram observados em 1 a cada 5 animais machos e 3 em cada 5 fêmeas.

Muitos estudos evidenciam o potencial anti-hipertensivo dos produtos naturais no modelo SHR. Camargo e col. (2018), utilizando um tratamento sub-crônico com o monoterpeneo linalool (100 mg/kg, v.o) durante 21 dias, evidenciaram o efeito anti-hipertensivo da substância a partir do 15º dia de tratamento. Esse efeito foi justificado pela capacidade do linalool de influenciar a reatividade vascular em artéria mesentérica, uma vez que a substância reduziu a contração mediada por FEN, que envolve o influxo de cálcio, via ativação dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos. A avaliação do vasorrelaxamento independente do endotélio, mostrou que a substância aumentou o efeito vasorrelaxante do NPS, o qual ativa a CGs, envolvida na via descendente relaxante do NO, esse efeito se relaciona com a ativação da proteína quinase G (PKG) e posterior inibição do influxo de cálcio.

Em outro trabalho, o efeito anti-hipertensivo do extrato metanólico da *Solanum capsicoides* foi avaliado no tratamento sub-crônico de 3 semanas, em animais SHR e Kyoto (WKY). A avaliação do extrato por HPLC evidenciou a presença de alguns constituintes químicos e o composto majoritário foi o cilstadiol. A administração do extrato (100 mg/kg, v.o. diariamente) desencadeou diminuição da PA sem alterações na FC, a partir do 15º dia

de tratamento. Já a administração aguda i.v. nas doses de 5, 10, 20 e 40 mg/kg, induziu um efeito hipotensor e taquicárdico. Os efeitos na PA foram justificados pela atividade direta do extrato na redução da resistência vascular por meio da ativação da enzima ciclase de guanilil solúvel e subsequentemente a inibição do influxo de cálcio, por ativar a PKG em animais normotensos. Nos animais hipertensos, o efeito vasorrelaxante do extrato ocorreu por meio da ativação da adenilato ciclase, com subsequente aumento do AMPc, ativação da PKA que consequentemente ativa da receptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e promove do efluxo de potássio (SIMÕES *et al.*, 2016).

O efeito hipotensor induzido pelo (-)-mirtenol neste trabalho, pode ser explicado pela constituição química da molécula, estudos demonstram o efeito hipotensor de muitos monoterpenos. O (-)-mirtenol é um monoterpeno alcóolico pertencente a classe química dos terpenos (VAN BREDERODE *et al.*, 2016). Essas moléculas, especialmente no sistema cardiovascular, apresentam múltiplos efeitos biológicos, como por exemplo, o reportado por De-Barros e col. (2015), que demonstraram um efeito hipotensor do ácido labdênico em animais SHR e normotensos em várias doses, com efeito maior na dose de 10 mg/kg. Essa resposta foi atribuída a capacidade da substância em causar vasorrelaxamento nos anéis de aorta e também a um efeito inibitório na regulação simpática, pois a resposta hipotensora do ácido labdênico foi inibida na presença do bloqueio ganglionar com hexametônio.

Em humanos, o (-)-mirtenol é uma das moléculas sintetizadas a partir do metabolismo do monoterpeno,  $\alpha$ -pineno. Segundo Schmidt e Goen (2017), após uma a três horas da administração oral de cápsulas contendo  $9,0 \pm 0,4$  mg de  $\alpha$ -pineno, o (-)-mirtenol foi detectado no plasma de voluntários na concentração de  $1,7 \mu\text{g/L}$ . Esse achado indica que os efeitos biológicos do  $\alpha$ -pineno no sistema cardiovascular podem ocorrer em função das substâncias provenientes do seu metabolismo, especialmente o (-)-mirtenol. Menezes e colaboradores (2010), verificaram que a administração de  $\alpha$ -pineno (1, 5, 10 e 20 mg/kg, i.v.) em animais normotensos, desencadeou efeito hipotensor dependente de dose.

No presente estudo a administração oral do (-)-mirtenol exigiu a utilização de doses maiores para a verificação do efeito da substância em comparação as doses administradas por via i.v., possivelmente por reduzir a biodisponibilidade da molécula, essa característica

pode ser explicada pelas limitações existentes na via de administração oral, dentre as quais, a exposição das moléculas ao suco gástrico e o metabolismo de primeira passagem (PARK *et al.*, 2009).

O perfil da resposta hipotensora na administração oral foi semelhante ao efeito do controle positivo, o nifedipino 10 mg/kg, um bloqueador de canais para cálcio utilizado como anti-hipertensivo na clínica. Ambos apresentaram efeito hipotensor nos primeiros 10 min após a administração, sugerindo que possa estar havendo um mecanismo de ação similar, especialmente no estado de contratilidade das CMLV. A atividade destas substâncias na FC em SHR mostrou-se distinta, o (-)-mirtenol desencadeou efeito bradicárdico sustentado e o nifedipino induziu taquicardia característica após 1 hora da administração. Essa atividade já foi descrita em estudos anteriores que utilizaram este bloqueador de canais para  $Ca^{2+}$  como controle positivo, tanto em animais quanto em humanos (DI-FILIPPO *et al.*, 2005; SPIESSER-ROBELET *et al.*, 2015).

A hipotensão desencadeia uma resposta reflexa, caracterizada pela estimulação do SNA simpático por meio da ativação de neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na coluna intermediolateral da medula espinal (IML) via estimulação por neurônios glutamatérgicos que se projetam do RVLM. No sistema cardiovascular, a estimulação simpática desencadeia taquicardia, aumento da contratilidade ventricular e elevação da resistência vascular periférica, tanto pela estimulação direta adrenérgica no nódo sinoatrial, nódo atrioventricular e em cardiomiócitos ventriculares, quanto pela inervação simpática vascular e aumento do estado de contratilidade das CMLV (COLOMBARI *et al.*, 2001; FELDMAN; MCCRIMMON; MORRISON, 2013).

Porém, em animais SHR, observou-se que o efeito hipotensor do (-)-mirtenol nas maiores doses foi acompanhado de bradicardia, sugerindo que essa substância possui um efeito no componente autonômico da função cardiovascular. Nesse sentido, foi proposto o bloqueio ganglionar com hexametônio, o qual é um antagonista dos receptores nicotínicos ganglionares do SNA, simpático e parassimpático (BERG, 2015; MESTIVIER; DABIRÉ; CHAU, 2001). Já foi descrito que o hexametônio altera os parâmetros hemodinâmicos dos animais. Sun e col. (2015) demonstraram que a administração i.v. na dose de 25 mg/kg do bloqueador ganglionar causou redução da PA e FC em animais SHR e RWN. Esses resultados corroboram, em parte, com os demonstrados neste estudo, o hexametônio

reduziu a PA e FC dos animais SHR, porém apenas a FC dos animais RWN diminuiu com o bloqueio.

O bloqueio ganglionar promovido por hexametônio, ao inibir a resposta taquicárdica reflexa do (-)-mirtenol, promoveu maior efeito hipotensor nas menores doses da substância, pois a taquicardia reflexa, provavelmente, estava contrapondo-se a resposta vasorrelaxante da substância. A maior dose do (-)-mirtenol desencadeou um efeito hipotensor e bradicárdico influenciando diretamente o controle autonômico da função cardiovascular, uma vez que, esses efeitos foram reduzidos na presença do hexametônio.

A fisiopatologia da hipertensão no SHR se relaciona com alterações nos mecanismos de controle central da PA. Nestes animais, neurônios Do bulbo ventrolateral rostral (RVLM) que desempenham ativação da transmissão simpática, estão dessensibilizados ao neurotransmissor inibitório GABA, contribuindo para a hiperestimulação simpática no SHR, elevação da PA e FC (ITO *et al.*, 2000; SMITH; BARRON, 1990). A estimulação dos receptores GABA e consequente influxo de cloreto é o mecanismo de ação anti-hipertensivo de algumas moléculas no RVLM (AVOLIO *et al.*, 2014; LI, *et al.*, 2016). O (-)-mirtenol possui efeito ansiolítico administrado por via intraperitoneal em ratos, via aumento da interação do neurotransmissor inibitório GABA com o seu receptor no SNC (MOREIRA, *et al.* 2014). No trato gastrintestinal, especialmente no estômago, a ativação do receptor GABA<sub>A</sub> desencadeia gastroproteção contra lesões ulcerativas induzidas pelo etanol. O (-)-mirtenol promoveu gastropoteção em camudongos via estimulação da transmissão GABAérgica (VIANA, *et al.*, 2016).

A estimulação de fibras eferentes vagais que inervam o nódo sinusal e atrioventricular possibilita o controle parassimpático da FC, cujo efeito é uma resposta bradicárdica. Essa resposta pode ser ativada pela estimulação de fibras aferentes vagais, fibras tipo C, por exemplo (YUAN; SILBERSTEIN, 2016). No estudo publicado por De- Siqueira e colaboradores (2014) o óleo essencial de *Aniba rosaeodora*, o qual é composto por uma fração de 87% do monoterpeno linalol, foi administrado em animais normotensos nas doses (1, 5, 10 e 20 mg/kg, i.v.) e desencadeou efeito hipotensor e bradicárdico. Esse efeito foi inibido após a vagotomia bilateral e o pré-tratamento perineural com capsaicina, um agonista dos receptores TRPV1 que ativa as fibras-C vagais e promove bradicardia por meio da estimulação parassimpática via nervo vago (KOLLARIK *et al.*, 2003). Em outro estudo, com a utilização do  $\beta$ -citronellol, um

monoterpeno encontrado em alguns óleos essenciais, observou-se uma resposta hipotensora e bradicárdica nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg i.v. em animais normotensos, tal efeito foi inibido após a vagotomia bilateral e a estimulação das fibras-C aferentes vagais com capsaicina (RIBEIRO-FILHO *et al.*, 2016). O efeito bradicárdico do (-)-mirtenol pode envolver a estimulação do nervo vago, por meio da ativação das fibras C aferentes e pode explicar a manutenção do efeito bradicárdico após a administração oral.

A atividade da substância na FC em SHR não foi totalmente inibida pelo bloqueio ganglionar, sugerindo que o (-)-mirtenol possui outro mecanismo de ação bradicárdico. Nesse sentido avaliou-se a atividade da maior dose do (-)-mirtenol, 20 mg/kg, na atividade elétrica do coração.

Na avaliação do ECG, os animais SHR não apresentaram alterações no traçado basal em comparação com os animais RWN, ambos com 12 semanas. Esse achado mostra-se distinto dos dados publicados por Hazari e colaboradores (2009), que compararam os parâmetros eletrocardiográficos entre os SHR e RWN, com 11 semanas e observaram que os valores basais (PRi, QRS e QTc) no SHR estavam prolongados. Porém esses autores utilizaram uma abordagem com análise por telemetria, na qual os animais não se encontravam anestesiados, o que foi diferente do método utilizado no presente trabalho.

O PR compreende o intervalo de tempo desde a geração do impulso elétrico no nó sinoatrial, a passagem do impulso por todo o tecido atrial, despolarizando-o, até a chegada ao nó atrioventricular. O complexo QRS corresponde ao tempo de passagem do impulso pelas estruturas que compõem o sistema de condução nos ventrículos (feixe comum de His, ramo direito, ramo esquerdo e fibras de purjunke), despolarizando-as. O intervalo QTc é definido pela relação entre o intervalo QT e a FC, e corresponde a despolarização e repolarização ventricular, em outras palavras, compreende todo o potencial de ação nas células ventriculares. E a amplitude da onde R corresponde a passagem do impulso pelas células de *Purkinje* que se localizam nos ventrículos (ANDERSON *et al.*, 2013; BAKKER; CHRISTOFFELS; MOORMAN, 2010; GOODYER; WU, 2018; KONOPELSKI; UFNAL, 2016).

O prolongamento do PRi indica a ocorrência de um bloqueio na corrente de influxo de  $Ca^{2+}$  ( $I_{Ca,L}$ ) no tecido de condução atrial e caracteriza o tipo de arritmia sinusal denominada de bloqueio átrio-ventricular de primeiro grau (PRYSTOWSKY, 1988). O monoterpeno (-) - terpinen - 4-ol administrado por via i.v. na veia jugular direita

desencadeou nas doses de 1 e 10 mg/kg em animais RWN bradicardia e prolongamento do PRi, este efeito foi justificado pela ação da substância em bloquear os canais  $Ca_v$  em cardiomiócitos (GONDIM *et al.*, 2017).

Possivelmente o efeito do (-)-mirtenol em prolongar o complexo QRS esteja associado a diminuição da corrente de  $Na^+$ . Substâncias que bloqueiam a corrente de influxo de sódio, mediada pelos  $Nav$ , são responsáveis pela diminuição da condução ventricular e prolongamento do complexo QRS (HARMER; VALENTIN; POLLARD, 2011; RODEN, 2014). O  $Nav$  1.5 é o principal subtipo encontrado em cardiomiócitos responsável pelo influxo de sódio e consequentemente despolarização celular. Os autores, Wang e col. (2015), demonstraram que a administração i.v. dos alcaloides, isorubijervina e rubijervina 1 mg/kg, causou bradicardia intensa associada a ausência do complexo QRS no traçado eletrocardiográfico, esse efeito foi justificado pela capacidade das substâncias de reduzirem a corrente de  $Na^+$  em 41% mediada pelo subtipo do canal  $Nav$  1.5. Alcaloides diterpênicos, isolados das raízes da planta *Aconitum coreanum* reduziram a corrente para  $Na^+$  em cardiomiócitos de cobaia, além de desencadear o prolongamento do potencial de ação (XING *et al.*, 2014).

O prolongamento do intervalo QTc foi observado em outros estudos que utilizaram monoterpenos e bloqueadores de canais para  $Ca^{2+}$ . De modo semelhante ao apresentado pelo (-)-mirtenol, o monoterpeno d-limoneno administrado por via i.v. (10, 20 e 40 mg/kg) desencadeou bradicardia relacionada ao prolongamento do intervalo QTc, possivelmente por um efeito bloqueador dos canais para  $Ca_v$  tipo L (NASCIMENTO *et al.*, 2019). A utilização do bepridil nas doses de 1, 2 e 3 mg/kg, um bloqueador dos canais para  $Ca^{2+}$ , utilizado no tratamento da angina do peito, promoveu prolongamento do intervalo QTc em humanos (PRYSTOWSKY, 1992; SOMBERG *et al.*, 1985).

Possivelmente, a resposta hipotensora do (-)-mirtenol relaciona-se, em parte, com a estimulação pela substância de modificações na resistência vascular periférica total (RVPT), tendo em vista que a PA é o produto da relação entre o DC e a RVPT. O estado de contratilidade das CMLV compreende a resistência vascular, de modo que, a interferência de substâncias nos mecanismos que controlam o tônus vascular podem estimular o vasorrelaxamento (WEHRWEIN; JOYNER, 2013).

Muitos produtos naturais causam hipotensão e tem esse efeito justificado pela capacidade vasorrelaxante que induzem. O extrato das sementes de *Swietenia macrophylla*

apresentou atividade anti-hipertensiva em animais SHR que se relacionou com a estimulação de uma reposta vasorrelaxante em anéis de aorta torácica, em parte, por meio da estimulação da produção de NO e PGI<sub>2</sub>, vias que dependem da integridade do endotélio vascular para serem ativadas. A atividade vasorrelaxante independente do endotélio ocorreu por meio da estimulação do efluxo de íons K<sup>+</sup>, bloqueio do influxo de Ca<sup>2+</sup> e inibição a contração transiente (CH'NG *et al.*, 2018). O monoterpene, β-pineno, desencadeia efeito hipotensor em animais hipertensos por meio do vasorrelaxamento em artéria mesentérica. O mecanismo de ação ocorreu por meio da inibição do influxo de Ca<sup>2+</sup> através do bloqueio dos canais Cav tipo L e da redução da sensibilidade ao Ca<sup>2+</sup> pela maquinaria contrátil (MOREIRA *et al.*, 2016).

A evidência da modulação do estado de contratilidade das CMLV a partir da liberação de mediadores endoteliais fez com que se buscasse identificar o mediador envolvido na resposta vasorrelaxante proporcionada pelo (-)-mirtenol. É bem reportado na literatura que o NO é uma das moléculas que modulam o estado de contratilidade musculatura lisa arterial. Assim avaliou-se a participação do NO no efeito relaxante dependente do endotélio vascular, estimulado por esta substância em animais SHR. Inicialmente, foi proposto a inibição da produção de NO com L-Name, um inibidor não seletivo das NOS (KIROGLU *et al.*, 2017) e posteriormente o sequestro da forma radicalar da molécula com HDX (KIROGLU *et al.*, 2017; ROCHELLE *et al.*, 1995). A inibição do efeito vasorrelaxante dependente do endotélio estimulado por (-)-mirtenol na presença de L-Name e da HDX indica que a substância estimula a produção de NO como parte do efeito vasorrelaxante em animais hipertensos.

A progressão da doença hipertensiva no animal SHR ocasiona algumas alterações vasculares que comprometem a vasodilatação dependente do endotélio. Os autores Anishchenko e col. (2015) observaram o efeito da administração i.v. de ACh na PA de animais SHR e verificaram que após 9 a 12 semanas de vida os animais apresentaram redução da resposta hipotensora dependente do endotélio, em cerca de 14-16% em comparação aos animais normotensos. Ao estudar a modulação do endotélio no tônus das CMLV em artéria mesentérica de animais SHR, Jiang e colaboradores (2016) demonstraram uma resposta reduzida em 26% ao vasorrelaxamento dependente do endotélio estimulado por ACh nestes animais, que se relacionou a redução da biodisponibilidade de NO e alterações na via de sinalização vasorrelaxante para PGI<sub>2</sub> e EDHF.

Na patogênese da hipertensão, a redução da biodisponibilidade de NO está associada ao aumento da formação do radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ) que, em células endoteliais, reage com NO e produz peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2013). O tratamento de células endoteliais com a enzima SOD restabeleceu a biodisponibilidade de NO (GRUNFELD *et al.*, 1995). Substâncias naturais podem apresentar capacidade antioxidante por neutralizar radicais livres e impedir que tais moléculas interajam com proteínas ou lipídios e danifiquem estruturas celulares ou podem estimular a atividade das enzimas antioxidantes (PISOSCHI *et al.*, 2016).

Desse modo, o efeito vasorrelaxante, dependente do endotélio estimulado pelo (-)-mirtenol em SHR, pode ocorrer em decorrência da estimulação da enzima SOD endotelial, pois já foi demonstrado que o pré-tratamento com 50 mg/kg da substância restaurou a atividade desta enzima antioxidante em um modelo de isquemia e reperfusão cardíaca (BRITTO *et al.*, 2018).

Alguns terpenos promovem vasorrelaxamento dependente do endotélio por meio da ativação da produção e liberação de moléculas relaxantes derivadas do endotélio. Como por exemplo, o  $\alpha$ -terpineol, que desencadeou relaxamento em artéria mesentérica superior isolada a partir do estímulo à produção do NO (RIBEIRO, *et al.*, 2010). Em outro estudo, a utilização das substâncias triterpênicas (ácido oleanólico, ácido maslínico e o eritrodíol) encontrados no azeite de oliva, promoveram vasorrelaxamento em animais SHR, que foi inibido com a adição de L-Name, indicando a participação do NO na atividade vasorrelaxante destas substâncias. Além disso o vasorrelaxamento, dependente do endotélio, estimulado por essas substâncias mostrou-se maior com a adição da enzima SOD por aumentar a biodisponibilidade de NO (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2006).

Os receptores muscarínicos localizados no endotélio vascular ( $M_3$ ), quando ativados, aumentam a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  e promovem aumento da produção de NO e  $PGI_2$ , moléculas que causam vasorrelaxamento (GUEDES *et al.*, 2002; SATERNOS *et al.*, 2018). Nesse sentido, produtos naturais podem ativar os receptores  $M_3$  para desencadear vasorrelaxamento dependente do endotélio. A atropina, um antagonista destes receptores e indometacina, um inibidor não seletivo da COX, não alteraram o efeito vasorrelaxante dependente do endotélio estimulado por (-)-mirtenol, indicando que não há participação destas vias no efeito (LÓPEZ *et al.*, 2017).

Resultado similar foi apresentado pelo monoterpene rotundifolona em artéria mesentérica de ratos. A substância desencadeia efeito vasorrelaxante mediado nas menores concentrações via estimulação da produção de mediadores liberados pelo endotélio vascular (SILVA et al., 2011). No estudo publicado por Guedes e col. 2002, ficou evidente que a rotundifolona desencadeia efeito vasorrelaxante em mesentérica via ativação da produção de NO no endotélio por meio da ativação dos receptores muscarínicos.

Outro monoterpene, o  $\alpha$ -terpineol, desencadeia efeito vasorrelaxante em anéis de artéria mesentérica de ratos que foi reduzido após a remoção do endotélio vascular, indicando que a substância estimulou a produção de mediadores endoteliais para causar esse efeito. O envolvimento da produção de NO foi estudado com a utilização de L-Name e HDX que inibiram o efeito vasorrelaxante, dependente do endotélio, do  $\alpha$ -terpineol, indicando que a substância estimula a produção de NO para causar vasodilatação na artéria mesentérica (RIBEIRO, et al., 2010).

O efeito vasorrelaxante máximo desencadeado pelo (-)-mirtenol ocorre por meio de um mecanismo independente do endotélio vascular. A substância está promovendo relaxamento por modificar mecanismos diretos nas CMLV. Em animais SHR o efeito do (-)-mirtenol foi mais potente na contração induzida por KCl em comparação à FEN, já nos animais RWN o efeito da substância foi superior na contração induzida por KCl.

O aumento da concentração de  $K^+$  no meio extracelular promove a despolarização da membrana com posterior influxo de  $Ca^{2+}$  e contração das CMLV. A FEN é um agonista  $\alpha 1$ - adrenérgico que também aumenta o influxo do íon  $Ca^{2+}$  por meio da abertura dos canais para  $Ca^{2+}$  fosforilados pela PKC, como por exemplo os Cav do Tipo L e os canais operados por receptor (TOUYZ *et al.*, 2018). Provavelmente um dos mecanismos de ação vasorrelaxante, independente do endotélio proporcionado pelo (-)-mirtenol é o bloqueio do influxo de  $Ca^{2+}$ , tendo em vista que este é um mecanismo de contração compartilhado entre a solução de KCl e a FEN.

Todas as concentrações estudadas do (-)-mirtenol inibiram a curva de contração concentração-resposta para  $CaCl_2$  nos animais SHR e RWN. Esse efeito indica, possivelmente, que um dos mecanismos de ação vasorrelaxante, independente do endotélio vascular, é a inibição do influxo de  $Ca^{2+}$ . Além disso, o (-)-mirtenol promoveu efeito vasorrelaxante após a contração tônica promovida por BAYK 8644, um agonista específico

dos canais para Cav tipo L, indicando que o mecanismo de ação vasorrelaxante do (-)-mirtenol é o bloqueio dos canais para Ca<sup>2+</sup> tipo L (TIKHONOV; ZHOROV, 2009).

Efeito semelhante foi observado em animais SHR nos quais a administração de 1-nitro-phenylethane promoveu resposta vasorrelaxante por meio da interferência no influxo de Ca<sup>2+</sup> nas concentrações de 100 e 600 µg/mL, por meio da inibição da curva para CaCl<sub>2</sub>. Essa substância também inibiu a contração estimulada pelo PDB (12,13-forbol dibutirato), um agonista da PKC, proteína quinase que promove contração das CMLV por meio da fosforilação e ativação dos canais para Ca<sup>2+</sup> e da inibição da fosfatase das CLM (INTERAMINENSE *et al.*, 2013; RINGVOLD; KHALIL, 2017). O monoterpene β-pineno, causou efeito vasorrelaxante independente do endotélio vascular, em animais hipertensos por meio da inibição do influxo de Ca<sup>2+</sup>, uma vez que desencadeou vasorrelaxamento na contração estimulada por BAK8644 (MOREIRA *et al.*, 2016).

Os animais SHR apresentam alterações na expressão de canais iônicos que envolvem o aumento do tônus vascular nas CMLV. No estudo de Pratt e colaboradores (2002) ficou evidente que as CMLV possuem aumento da expressão da subunidade α1C, formadora do poro dos canais para Ca<sup>2+</sup> sensíveis a voltagem do tipo L, tornando essas células muito responsivas ao BAYK 8644. Essa característica, possivelmente explica a resposta vasorrelaxante superior desencadeada pelo (-)-mirtenol em anéis de artéria mesentérica sem endotélio pré-contraídas com o BAYK 8644 em animais SHR.

Outro mecanismo que foi avaliado no efeito independente do endotélio vascular, foi a contração transiente estimulada por FEN em meio livre de Ca<sup>2+</sup>. Como descrito, a FEN, ao ativar o receptor α1-adrenérgico nas células musculares lisas irá estimular a atividade da fosfolipase C, enzima que promove a síntese de dois segundos mensageiros o DAG e IP<sub>3</sub> a partir do PI(4,5)P<sub>2</sub>. O IP<sub>3</sub> ativa a mobilização do cálcio no RS por ativar um receptor sensível (IP<sub>3</sub>R) e uma contração transiente (fásica) é observada, mediada apenas pela mobilização do RS, tendo em vista que o Ca<sup>2+</sup> foi removido do meio extracelular (TOUYZ *et al.*, 2018). Na maior concentração o (-)-mirtenol inibiu a contração transiente mediada pelo IP<sub>3</sub>, indicando que essa molécula foi capaz de causar vasorrelaxamento por bloquear o receptor sensível ao IP<sub>3</sub> no RS.

Esse resultado apresenta similaridade com os apresentados no estudo publicado por Silva-Filho e col. (2012), o monoterpene (-)-borneol induziu efeito vasorrelaxante,

independente do endotélio vascular, em parte, por meio da inibição da contração física estimulada por FEN de maneira dependente de concentração.

As CMLV podem contrair em baixas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  por meio da inibição da fosfatase das cadeias leves de miosina (MLCP), conforme assinalado. A utilização do inibidor não seletivo das proteínas tirosina fosfatases, o  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  desencadeia contração por meio da inibição da desfosforilação das cadeias leves de miosina (KIM; LEE; LEE, 2019). Parte do mecanismo vasorrelaxante do (-)-mirtenol ocorre por meio da redução da sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  pela maquinaria contátil das CMLV, de modo semelhante a outros monoterpenos já estudados, como por exemplo, o  $\beta$ -citronellol na musculatura lisa de traqueia e o (-)- $\beta$ -pineno em anéis de artéria mesentérica com endotélio vascular removido (MOREIRA *et al.*, 2016; VASCONCELOS *et al.*, 2016).

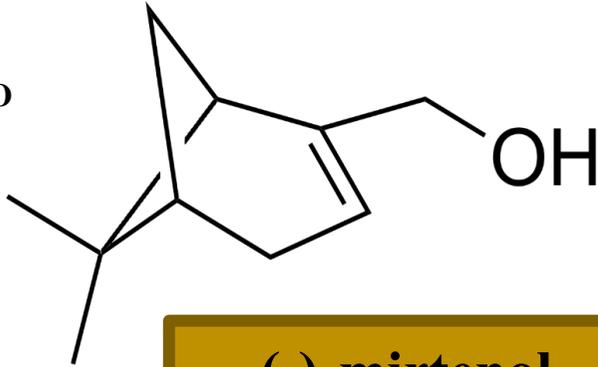
Outro mecanismo envolvido no vasorrelaxamento proporcionado por alguns terpenos é o estímulo à abertura dos canais para  $\text{K}^+$  com consequente efluxo deste íon que promove hiperpolarização e vasorrelaxamento em CMLV. No estudo de MOREIRA e colaboradores (2016), a atividade vascular do monoterpeno,  $\beta$ -pineno, não foi alterada após exposição dos anéis de artéria mesentérica ao TEA 1mmol/L em animais hipertensos. De forma similar, o monoterpeno alcoólico, linalol, induziu efeito vasorrelaxante independente do endotélio em animais hipertensos, que não foi alterado na presença do bloqueio dos canais para  $\text{K}^+$  (ANJOS *et al.*, 2013). Esses resultados corroboram o presente estudo, no qual não se observou nenhuma alteração no efeito vasorrelaxante independente do endotélio proporcionado pelo (-)-mirtenol na presença do TEA.

Em síntese, o (-)-mirtenol apresenta efeitos mais pronunciados em animais com hipertensão essencial com mecanismos de ação adicionais. Fato muito animador para que outros estudos sejam implementados, principalmente os que promovam a redução da dose desta substância, afim de se despertar o interesse da indústria farmacêutica para se investir em pesquisas mais minuciosas para a aplicabilidade desta molécula em ensaios clínicos para o tratamento da doença hipertensiva em seres humanos.

7. RESUMO GRÁFICO



Óleos Essenciais



(-)-mirtenol

Constituinte Principal

Atividades Biológicas

Atividade Cardiovascular

Efeito Hemodinâmico

ECG

Efeito Vasoativo

RWN



- Hipotensão
- Taquicardia reflexa

↓ • AR

- Músculo liso: (mobilização e sensibilidade ao Ca<sup>2+</sup>)

SHR



- Hipotensão
- Taquicardia reflexa
- Bradicardia

↑ • PRi  
 ↑ • QRS  
 ↑ • QTc  
 ↓ • AR

- Endotelial: (NO)
- Musculo liso: (mobilização e sensibilidade ao Ca<sup>2+</sup>)

Figura 34. Resumo gráfico dos mecanismos envolvidos no efeito cardiovascular induzido por (-)-mirtenol em animais hipertensos (SHR) e normotensos (RWN). AR= amplitude da onda R.

## 8. CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados apresentados no presente trabalho mostram que o (-)-mirtenol apresenta efeitos cardiovasculares benéficos em animais com a doença hipertensiva instalada e com efeitos mais pronunciados nestes animais em comparação aos normotensos. A substância apresenta ação hipotensora e um efeito bifásico na FC em animais SHR os quais são modulados pelo hexametônio. Além disso, promove o prolongamento dos intervalos no ECG e desencadeia efeito vasorrelaxante, em parte por mecanismo dependente do endotélio com participação do NO em SHR. Nos animais normotensos o (-)-mirtenol apresenta ação hipotensora e efeito taquicárdico reflexo, este último inibido por hexametônio. Além disso apresenta redução da amplitude da onda R no ECG e induz vasorrelaxamento de forma independente do endotélio.

Neste sentido, a molécula estudada torna-se uma interessante alternativa para o controle da doença hipertensiva com grande potencial para ser direcionada à hipertensão humana. Porém, mais estudos são necessários para que este produto natural venha a ser disponibilizado clinicamente para o tratamento da hipertensão arterial sistêmica.

## 9. PERSPECTIVAS

- ✓ Caracterizar melhor o efeito da substância no controle central da PA e FC, injetando-a diretamente no bulbo ventrolateral rostral;
- ✓ Proceder a vagotomia bilateral e o tratamento perivagal para melhor descrever o efeito na FC e no controle autonômico da função cardiovascular;
- ✓ Caracterizar a atividade elétrica do coração com o animal acordado, por telemetria, para tentar aproximar este estudo das condições mais frequentes de indivíduos em tratamento ambulatorial ou na emergência e
- ✓ Preparar o complexo de inclusão do (-)-mirtenol em  $\beta$ -ciclodextrina para analisar a possibilidade de diminuição da dose por via oral e melhora da sua eficácia.

## 10. LIMITAÇÕES

Apesar das recomendações e consertos do fabricante, a dificuldade de funcionamento do equipamento para a aferição da pressão arterial caudal (pletismógrafia) dos animais não permitiram a execução de estudos hemodinâmicos subcrônicos com a administração oral do (-)-mirtenol. Assim como, o processo de ambiência do animal espontaneamente hipertenso no biotério exigiu um longo período até a adaptação e posterior acasalamento, o que dificultou a aquisição dos dados iniciais mais precocemente.

## 11. REFERÊNCIAS

AHMAD, A.; DEMPSEY, S.; DANEVA, Z.; AZAM, M.; LI, N.; LI, P.; RITTER, J. Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2605, 2018.

AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and the Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of vascular tone. **Journal of anesthesia**, v. 21, n. 2, p. 220–31, 2007.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593, 2001.

ALLEN, B. G.; WALSH, M. P. The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 19, n. 9, p. 362–368, 1994.

ALVES-SANTOS, T. R.; XAVIER, F. E.; DUARTE, G. P.; DOS-SANTOS B. R.; MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S. Mechanisms underlying the vasorelaxant effect of trans-4-methoxy- $\beta$ -nitrostyrene in the rat mesenteric resistance arteries. **European journal of pharmacology**, v. 853, p. 201–209, 2019.

ANDERSON, R. H.; BOYETT, M. R.; DOBRZYNSKI, H.; MOORMAN, A. F. M. The anatomy of the conduction system: implications for the clinical cardiologist. **Journal of cardiovascular translational research**, v. 6, n. 2, p. 187–96, 2013.

ANISHCHENKO, A. M.; ALIEV, O. I.; SIDEKHMENOVA, A. V.; SHAMANAIEV, A. Yu.; PLOTNIKOV, M. B. Dynamics of Blood Pressure Elevation and Endothelial Dysfunction in SHR Rats During the Development of Arterial Hypertension. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 159, n. 5, p. 591–593, 2015.

ANJOS, P. J. C.; LIMA, A. O.; CUNHA, P. S.; DE-SOUSA, D. P.; ONOFRE, A. S. C.; RIBEIRO, T. P.; MEDEIROS, I. A.; ANTONIOLLI, A. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SANTOS, M. R. V. Cardiovascular effects induced by linalool in normotensive and hypertensive rats. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 68, n. 5–6, p. 181–90, 2013.

ARAÚJO, A. V.; ANDRADE, F. A.; PAULO, M.; DE-PAULA, T. D.; POTJE, S. R.; PEREIRA, A. C.; BENDHACK, L. M. NO donors induce vascular relaxation by different

cellular mechanisms in hypertensive and normotensive rats. **Nitric Oxide**, v. 86, p. 12–20, 2019.

ARTIGAS, P.; FERREIRA, G.; REYES, N.; BRUM, G.; PIZARRO, G. Effects of the enantiomers of BayK 8644 on the charge movement of L-type Ca channels in guinea-pig ventricular myocytes. **The Journal of membrane biology**, v. 193, n. 3, p. 215–27, 2003.

AVOLIO, E.; MAHATA, S. K.; MANTUANO, E.; MELE, M.; ALÒ, R.; FACCILOLO, R. M.; TALANI, G.; CANONACO, M. Antihypertensive and neuroprotective effects of catestatin in spontaneously hypertensive rats: interaction with GABAergic transmission in amygdala and brainstem. **Neuroscience**, v. 270, p. 48–57, 2014.

BAILEY, T. W.; HERMES, S. M.; WHITTIER, K. L.; AICHER, S. A.; ANDRESEN, M. C. A-type potassium channels differentially tune afferent pathways from rat solitary tract nucleus to caudal ventrolateral medulla or paraventricular hypothalamus. **The Journal of physiology**, v. 582, n. Pt 2, p. 613–28, 2007.

BAGASRAWALA, I. Z.; RADONJIC N.; NEVENA V. N-Methyl D-Aspartate Receptor Antagonist Kynurenic Acid Affects Human Cortical Development. **Frontiers in Neuroscience**. v.10, p. 32 - 45, 2016.

BAKKER, M. L.; CHRISTOFFELS, V. M.; MOORMAN, A. F. M. The cardiac pacemaker and conduction system develops from embryonic myocardium that retains its primitive phenotype. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 56, n. 1, p. 6–15, 2010.

BASTOS, J. F. A.; MOREIRA, I. J. A.; RIBEIRO, T.P.; MEDEIROS, I. A.; ANTONIOLLI, A. R.; DE-SOUSA, D. P.; SANTOS, M. R. V. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 106, n. 4, p. 331–7, 2010.

BEJESHK, M. A.; SAMAREHFEKRI, M.; NAJAFIPOUR, H.; ROSTAMZADEH, F.; JAFARI, E.; RAJIZADEH, M. A.; MASOUMI-ARDAKANI, Y. Anti-inflammatory and anti-remodeling effects of myrtenol in the lungs of asthmatic rats: Histopathological and biochemical findings. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 47, n. 2, p. 185–193, 2019.

BELEZNAI, T. Z.; YAROVA, P. L.; YUILL, K. H; DORA, K. A. Smooth muscle Ca(2+)-activated and voltage-gated K<sup>+</sup> channels modulate conducted dilation in rat isolated small mesenteric arteries. **Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)**, v. 18, n. 6, p. 487–500,

2011.

BELL, S. G.; CHEN, X.; SOWDEN, R. J.; XU, F.; WILLIAMS, J. N.; WONG, L.L.; RAO, Z.. Molecular recognition in (+)-alpha-pinene oxidation by cytochrome P450cam. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 3, p. 705–14, 2003.

BELSITO, D.; BICKERS, D.; BRUZE, M.; CALOW, P.; GREIM, H.; HANIFIN, J. M.; ROGERS, A. E.; SAURAT, J. H.; SIPES, I. G.; TAGAMI, H. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic and non-cyclic terpene alcohols when used as fragrance ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. S1–S71, 2008.

BENCZE, M; BEHULIAK, M; ZICHA, J. The impact of four different classes of anesthetics on the mechanisms of blood pressure regulation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Physiological research**, v. 62, n. 5, p. 471–8, 2013.

BERG, T. Voltage-Sensitive K(+) Channels Inhibit Parasympathetic Ganglion Transmission and Vagal Control of Heart Rate in Hypertensive Rats. **Frontiers in neurology**, v. 6, p. 260, 2015.

BERNATOVA, I.; CONDE, M. V.; KOPINCOVA, J.; GONZÁLEZ, M. C.; PUZSEROVA, A.; ARRIBAS, S. M. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: focus on methodological aspects. **Journal of Hypertension**, v. 27, n. Suppl 6, p. S27–S31, 2009.

BHATIA, S. P.; MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on myrtenol. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46 Suppl 1, p. S237-40, 2008.

BINU, P.; PRIYA, N.; ABHILASH, S.; VINEETHA, R. C.; NAIR, R. H. Studies on curative efficacy of monoterpene eugenol on anti- leukemic drug arsenic trioxide induced cardiotoxicity. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 91, p. 559–566, 2017.

BOULANGER, C. M.; MORRISON, K. J.; VANHOUTTE, P. M. Mediation by M3-muscarinic receptors of both endothelium-dependent contraction and relaxation to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **British journal of pharmacology**, v. 112, n. 2, p. 519–24, 1994.

BRAAM, B.; TALER, S. J; RAHMAN, M.; FILLAUS, J. A.; GRECO, B. A.; FORMAN,

J. P.; REISIN, E.; COHEN, D. L.; SAKLAYEN, M. G.; HEDAYATI, S. S. Recognition and Management of Resistant Hypertension. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 12, n. 3, p. 524–535, 2017.

BRITO, T. S.; BATISTA-LIMA, F. J.; DE-SIQUEIRA, R. J. B.; COSKER, F.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C. Endothelium-independent vasodilator effect of 2-nitro-1-phenyl-1-propanol on mesenteric resistance vessels in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 806, p. 52–58, 2017.

BRITTO, R. M.; SILVA-NETO, J. A.; MESQUITA, T. R. R.; VASCONCELOS, C. M. L.; DE-ALMEIDA, G. K. M.; JESUS, I. C. G.; SANTOS, P. H.; SOUZA, D. S.; MIGUEL-DOS-SANTOS, R.; DE SÁ, L. A.; DOS-SANTOS, F. S. M.; PEREIRA-FILHO, R. N.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; GUATIMOSIM, S.; LAUTON-SANTOS, S. Myrtenol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through antioxidant and anti-apoptotic dependent mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, p. 557–566, 2018.

BROWN, I. A. M.; DIEDERICH, L. G.; MIRANDA E.; DELALIO, L. J.; MURPHY, S. A.; CORTESE-KROTT, M. M.; HALL, J. L.; LE, T. H.; ISAKSON, B. E. Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.38, n. 9, p. 1969-1985, 2018.

BUNDY, J. D.; LI, C.; STUHLIK, P.; BU, X.; KELLY, T. N.; MILLS, K. T.; HE, H.; CHEN, J.; WHELTON, P. K.; HE, J. Systolic Blood Pressure Reduction and Risk of Cardiovascular Disease and Mortality: A Systematic Review and Network Meta-analysis. **JAMA cardiology**, v. 2, n. 7, p. 775–781, 2017.

BÜSCHER, R.; HERRMANN, V.; RING, K. M.; KAILASAM, M. T.; O'CONNOR, D. T.; PARMER, R. J.; INSEL, P. A. Variability in phenylephrine response and essential hypertension: a search for human alpha(1B)-adrenergic receptor polymorphisms. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 291, n. 2, p. 793–8, 1999.

CAI, A.; LI, L.; ZHOU, Y. Pathophysiological effects of RhoA and Rho-associated kinase on cardiovascular system. **Journal of Hypertension**, v. 34, n. 1, p. 3–10, 2016.

CAMARGO, S. B.; SIMÕES, L. O.; DE-AZEVEDO M. C. F.; DE-MELO J. A.; FREGONEZE, J. B.; EVANGELISTA, A.; VILLARREAL, C. F.; DE-SOUZA ARAÚJO, A. A.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SILVA, D. F. Antihypertensive potential of linalool

and linalool complexed with  $\beta$ -cyclodextrin: effects of subchronic treatment on blood pressure and vascular reactivity. **Biochemical Pharmacology**, v. 151, p. 38-46, 2018.

CARMICHAEL, J. D.; WINDER, S. J.; WALSH, M. P.; KARGACIN, G. J. Calponin and smooth muscle regulation. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1415–1419, 1994.

CARY, D. C.; PETERLIN, B. M.. Natural Products and HIV/AIDS. **AIDS research and human retroviruses**, v. 34, n. 1, p. 31–38, 2018.

CH'NG, Y. S.; LOH, Y. C.; TAN, C. S.; AHMAD, M.; ASMAWI, M. Z.; WAN OMAR, W. M.; YAM, M. F. Vasodilation and Antihypertensive Activities of *Swietenia macrophylla* (Mahogany) Seed Extract. **Journal of medicinal food**, v. 21, n. 3, p. 289–301, 2018.

CHACKO, S.; LONGHURST, P.A. Regulation of actomyosin and contraction in smooth muscle. **World Journal of Urology**, v. 12, n. 5, 1994.

CHAPLEAU, M. W. Baroreceptor reflexes. *In: Primer on the Autonomic Nervous System*. OREGON -EUA: Elsevier, 2012. p. 161–165.

CHAPLEAU, M. W.; LU, Y.; ABOUD, F. M. Mechanosensitive Ion Channels in Blood Pressure-Sensing Baroreceptor Neurons. *In: ANDRADE, L. O. Plasma Membrane Repair: Current Topics in membrane*. OREGON - EUA: Elsevier, 2007. p. 541–567.

CHEN, D. Q.; CHEN, H.; CHEN, L.; TANG, D. D; MIAO, H.; ZHAO, Y. Y. Metabolomic application in toxicity evaluation and toxicological biomarker identification of natural product. **Chemico-Biological Interactions**, v. 252, p. 114–130, 2016.

CHEN, H.; SHEN, F. E.; TAN, X. D.; JIANG, W. B.; GU, Y. H.. Efficacy and Safety of Acupuncture for Essential Hypertension: A Meta-Analysis. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 24, p. 2946–2969, 2018.

COLOMBARI, E.; SATO, M. A.; CRAVO, S. L.; BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R.; LOPES, O. U. Role of the Medulla Oblongata in Hypertension. **Hypertension**, v. 38, n. 3, p. 549–554, 2001.

CORRIU, C.; FÉLÉTOU, M.; PUYBASSET, L.; BEA, M. L.; BERDEAUX, A.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-Dependent Hyperpolarization in Isolated Arteries

Taken from Animals Treated with NO-Synthase Inhibitors. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 32, n. 6, p. 944–950, 1998.

COSTANTINO, S.; PANENI, F.; COSENTINO, F. Ageing, metabolism and cardiovascular disease. **The Journal of physiology**, v. 594, n. 8, p. 2061–73, 2016.

CRESPO, R.; WEI, K.; RODENAK-KLADNIEW, B.; MERCOLA, M.; RUIZ-LOZANO, P.; HURTADO, C. Effect of geraniol on rat cardiomyocytes and its potential use as a cardioprotective natural compound. **Life sciences**, v. 172, p. 8–12, 2017.

CZURA, C. J.; ROSAS-BALLINA, M.; TRACEY, K. J. Cholinergic Regulation of Inflammation. *In: ADER, R. Psychoneuroimmunology*. New York: Elsevier, 2007. p. 85–96.

DANTAS, B. P. V.; ALVES, Q. L.; DE-ASSIS, K. S.; RIBEIRO, T. P.; DE-ALMEIDA, M. M.; DE-VASCONCELOS, A. P.; DE-ARAÚJO, D. A. M.; DE-ANDRADE B. V.; DE-MEDEIROS, I. A.; ALENCAR, J. L.; SILVA, D. F. Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvacrol in normotensive rat. **Vascular pharmacology**, v. 67, n. 69, p. 48–58, 2015

DASBISWAS, K.; HU, S.; SCHNORRER, F.; SAFRAN, S. A.; BERSHADSKY, A. D. Ordering of myosin II filaments driven by mechanical forces: experiments and theory. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1747, p. 20170114, 2018.

DASGUPTA, A.; BOWMAN, L.; D'ARSIGNY, C. L.; ARCHER, S. L. Soluble guanylate cyclase: a new therapeutic target for pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 97, n. 1, p. 88–102, 2015.

DE-BARROS, C. A.; ANTONIO-JUNIOR, C.; SIQUEIRA, R. J. C.; INTERAMINENSE, L. F. L.; ALVES-SANTOS, T. R.; DUARTE, G. P.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.. Cardiovascular effects of a labdenic diterpene isolated from *Moldenhawera nutans* in conscious, spontaneously hypertensive rats. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 4, p. 582–7, 2015.

DE-SIQUEIRA, R. J.; RODRIGUES, K. M. S.; DA-SILVA, M. T. B.; CORREIA-JUNIOR, C. A. B.; DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. J. C.; AGUIAR-DOS-SANTOS, A.; MAIA, J. G. S.; DA-CUNHA, P. J. S.; LAHLOU, S. Linalool-rich rosewood oil

induces vago-vagal bradycardic and depressor reflex in rats. **Phytotherapy research : PTR**, v. 28, n. 1, p. 42–8, 2014.

DE-AZEVEDO, D. F. **Iniciação à eletrocardiografia**. Hospital das Clínicas - SP, 1999. p. 190.

DI-CHIARA, T.; SCAGLIONE, A.; CORRAO, S.; ARGANO, C.; PINTO, A.; SCAGLIONE, R. Education and hypertension: impact on global cardiovascular risk. **Acta cardiologica**, v. 72, n. 5, p. 507–513, 2017.

DI-FILIPPO, C.; LAMPA, E.; FORGIONE, A.; CAPUANO, A.; ROSSI, F.; D'AMICO, M. Effects of nifedipine controlled release on blood pressure and heart rate of spontaneously hypertensive rats. Comparison with nifedipine standard and with amlodipine. **Italian heart journal. Supplement: official journal of the Italian Federation of Cardiology**, v. 6, n. 5, p. 285–90, 2005.

DIAS, K. L. G.; CORREIA, N. A.; PEREIRA, K. K. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CAVALCANTE, K. V. M.; ARAÚJO, I. G. A.; SILVA, D. F.; GUEDES, D. N.; NETO, M. A.; BENDHACK, L. M.; MEDEIROS, I. A.. Mechanisms involved in the vasodilator effect induced by diosgenin in rat superior mesenteric artery. **European journal of pharmacology**, v. 574, n. 2–3, p. 172–8, 2007.

DICKHOUT, J. G.; LEE, R. M. K. W. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 274, n. 3, p. H794–H800, 1998.

DIFRANCESCO, D. A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. **The Journal of Physiology**, v. 314, n. 1, p. 359–376, 1981.

DOGGREL, S. A. BROWN, L. Rats models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. **Cardiovascular research**, v.39, n. 1, p. 89-105, 1998.

DORIS, P. A. Genetics of hypertension: an assessment of progress in the spontaneously hypertensive rat. **Physiological genomics**, v. 49, n. 11, p. 601–617, 2017.

DORNAS, W. C.; SILVA, M. E. Animal models for the study of arterial hypertension. **Journal of Biosciences**, v. 36, n. 4, p. 731–737, 2011.

DREW, R. C.; SINOWAY, L. I. Autonomic Control of the Heart. *In*: DREW, R. C.; SINOWAY, L. I. Primer on the Autonomic Nervous System. EUA: Elsevier, 2012. p. 177–

180.

DUNN, W. R.; ALEXANDER, S. P.H.; RALEVIC, V.; ROBERTS, R. E. Effects of hydrogen sulphide in smooth muscle. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 158, p. 101–113, 2016.

DUSTING, G. J.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Prostacyclin (PGX) is the endogeneous metabolite responsible for relaxation of coronary arteries induced by arachidonic acid. **Prostaglandins**, v. 13, n. 1, p. 3–15, 1977.

EDDINGER, T. J.; MEER, D. P. Myosin II isoforms in smooth muscle: heterogeneity and function. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 293, n. 2, p. C493–508, 2007.

FARAH, C.; MICHEL, L.Y. M.; BALLIGAND, J. L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 5, p. 292–316, 2018.

FEHER, J. Smooth Muscle. *In*: FEHER, J. **Quantitative Human Physiology**. EUA: Elsevier, 2012a. p. 283–293.

FEHER, J. Smooth Muscle. *In*: FEHER, J. **Quantitative Human Physiology**. EUA: Elsevier, 2017. p. 351–361.

FELDMAN, J. L.; MCCRIMMON, D.R.; MORRISON, S.F. Neural Control of Respiratory and Cardiovascular Functions. *In*: FELDMAN, J. L. **Fundamental Neuroscience**. EUA: Elsevier, 2013. p. 749–766.

FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. **British journal of pharmacology**, v. 164, n. 3, p. 894–912, 2011.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: an update. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 117, n. 4, p. 139–55, 2009.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 6, p. 1215–25, 2006.

FILIPPINI, A.; SICA, G.; D’ALESSIO, A. The caveolar membrane system in endothelium: From cell signaling to vascular pathology. **Journal of Cellular**

**Biochemistry**, v. 119, n. 7, p. 5060–5071, 2018.

FLEMING, I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 793–806, 2010.

FLORES-FLORES, A.; HERNÁNDEZ-ABREU, O.; RIOS, M. Y.; LEÓN-RIVERA, I.; AGUILAR-GUADARRAMA, B.; CASTILLO-ESPAÑA, P.; PEREA-ARANGO, I.; ESTRADA-SOTO, S. Vasorelaxant mode of action of dichloromethane-soluble extract from *Agastache mexicana* and its main bioactive compounds. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 2807–2813, 2016.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FRANCHINI, K. G.; COWLEY, A. W. Autonomic Control of Cardiac Function. *In*: ROBERTSON, D. **Primer on the Autonomic Nervous System**. EUA: Elsevier, 2004. p. 134–138.

GARCIA, X.; STEIN, F. Nitric Oxide. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 55–57, 2006.

GARLAND, C. J. HILEY, C. R. DORA, K. A. EDHF: spreading the influence of the endothelium. **British journal of pharmacology**. v. 164, n. 3, p. 839-52, 2011.

GERALDES, V.; ROSA-GONÇALVES, B.; LIU, N.; PATON, B.; ROCHA, J. F. R. Essential role of RVL medullary neuronal activity in the long term maintenance of hypertension in conscious SHR. **Autonomic Neuroscience**. v.186, p. 22-31, 2014.

GERTHOFFER, W. T.; POHL, J. Caldesmon and calponin phosphorylation in regulation of smooth muscle contraction. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1410–1414, 1994.

GIMÉNEZ-MASCARELL, P.; MAJTAN, T.; OYENARTE, I.; EREÑO-ORBEA, J.; MAJTAN, J.; KLAUDINY, J.; KRAUS, J. P.; MARTÍNEZ-CRUZ, L. A.. Crystal structure of cystathionine  $\beta$ -synthase from honeybee *Apis mellifera*. **Journal of Structural Biology**, v. 202, n. 1, p. 82–93, 2018.

GOLDBERGER, A. L.; GOLDBERGER, Z. D.; SHVILKIN, A. Mini-Review Demon. *In*: GOLDBERGER, A. L.; GOLDBERGER, Z. D.; SHVILKIN, A. **Goldberger's Clinical**

**Electrocardiography.** BOSTON: Elsevier, 2018. p. 1– 53.

GOMES, B. S.; NETO, B. P. S.; LOPES, E. M. ; CUNHA, F. V. M.; ARAÚJO, A. R.; WANDERLEY, C. W. S.; WONG, D. V. T.; JÚNIOR, R. C. P. L.; RIBEIRO, R. A.; SOUSA, D. P.; VENES, R. M., J.; OLIVEIRA, R. C. M.; OLIVEIRA, F. A. Anti-inflammatory effect of the monoterpene myrtenol is dependent on the direct modulation of neutrophil migration and oxidative stress. **Chemico-biological interactions**, v. 273, p. 73–81, 2017.

GONDIM, A. N. S.; LARA, A.; SANTOS-MIRANDA, A.; ROMAN-CAMPOS, D.; LAUTON-SANTOS, S.; MENEZES-FILHO, J. E. R.; DE-VASCONCELOS, C. M. L.; CONDE-GARCIA, E. A.; GUATIMOSIM, S.; CRUZ, J. S. (-)-Terpinen-4-ol changes intracellular Ca<sup>2+</sup> handling and induces pacing disturbance in rat hearts. **European Journal of Pharmacology**, v. 807, p. 56–63, 2017.

GONZALEZ, D. R.; TREUER, A.; SUN, Q. A.; STAMLER, J. S.; HARE, J. M. S-Nitrosylation of cardiac ion channels. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 54, n. 3, p. 188–95, 2009.

GOODYER, W. R.; WU, S. M. Fates Aligned: Origins and Mechanisms of Ventricular Conduction System and Ventricular Wall Development. **Pediatric cardiology**, v. 39, n. 6, p. 1090–1098, 2018.

GORDAN, R.; GWATHMEY, J. K.; XIE, L. H. Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. **World Journal of Cardiology**, v. 7, n. 4, p. 204, 2015.

GRANT, A. O. Cardiac Ion Channels. **Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology**, v. 2, n. 2, p. 185–194, 2009.

GRATTON, J. P.; BERNATCHEZ, P.; SESSA, W. C. Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. **Circulation research**, v. 94, n. 11, p. 1408–17, 2004.

GRAY, S. D. Spontaneous Hypertension in the Neonatal Rat. A Review. **Clinical and Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice**, v. 6, n. 4, p. 755–781, 1984.

GRUNFELD, S.; HAMILTON, C. A.; MESAROS, S.; MCCLAIN, S. W.; DOMINICZAK, A. F.; BOHR, D. F.; MALINSKI, T. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 26, n. 6 Pt 1, p. 854–7, 1995.

GRYGLEWSKI, R. J.; MONCADA, S.; PALMER, R. M. J. Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 87, n. 4, p. 685–694, 1986.

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, I. A. Muscarinic agonist properties involved in the hypotensive and vasorelaxant responses of rotundifolone in rats. **Planta medica**, v. 68, n. 8, p. 700–4, 2002.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 2, p. 119–136, 2017.

HARMER, A. R.; VALENTIN, J. P.; POLLARD, C. E. On the relationship between block of the cardiac Na<sup>+</sup> channel and drug-induced prolongation of the QRS complex. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 2, p. 260–273, 2011.

HAZARI, M. S.; HAYKAL-COATES, N.; WINSETT, D. W.; COSTA, D. L.; FARRAJ, A. K. Continuous Electrocardiogram Reveals Differences in the Short-Term Cardiotoxic Response of Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats to Doxorubicin. **Toxicological Sciences**, v. 110, n. 1, p. 224–234, 2009.

HEERDT, P. M.; CRYSTAL, G. J. Cardiovascular Physiology. *In*: HEMMINGS, H. C. J.; TALMAGE, D. E. **Pharmacology and Physiology for Anesthesia**. NEW YORK: Elsevier, 2013. p. 351–365.

HERRMANN, S. M.; TEXTOR, S. C. Renovascular Hypertension. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 48, n. 4, p. 765–778, 2019.

HIGASHI, Y. Assessment of Endothelial Function. **International Heart Journal**, v. 56, n. 2, p. 125–134, 2015.

HIRANO, K.; HIRANO, M.; KANAIDE, H. Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity in vascular smooth muscle. **Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanshi**, v. 40, n. 6, p. 219–36, 2004.

HOLMES, K. C.; GEEVES, M. A. The structure of muscle contraction. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**. v.355, n. 1396, p. 419-431, 2000.

HYNYNEN, M. M.; KHALIL, R. A. The vascular endothelin system in hypertension--recent patents and discoveries. **Recent patents on cardiovascular drug discovery**, v. 1,

n. 1, p. 95–108, 2006.

INTERAMINENSE, L. F. L.; RAMOS-ALVES, F. E.; DE-SIQUEIRA, R. J. B.; XAVIER, F. E.; DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. J. C.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. C.; LAHLOU, S. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of Aniba canelilla, in superior mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 709–716, 2013.

ITO, S.; KOMATSU, K.; TSUKAMOTO, K.; SVED, A. F. Excitatory amino acids in the rostral ventrolateral medulla support blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 35, n. 1 Pt 2, p. 413–7, 2000.

MOREIRA, I. J. A.; MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BONJARDIM, L. R.; SANTANA-FILHO, V. J.; PASSOS-JÚNIOR, D. B.; LAUTON-SANTOS, S.; LUCA-JÚNIOR, W.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; VIANA-SANTOS, M. R. Characterization and Antihypertensive Effect of the Complex of (-)- $\beta$ -pinene in  $\beta$ -cyclodextrin. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 837–845, 2016.

JIANG, J.; ZHENG, J. P.; LI, Y.; GAN, Z.; JIANG, Y.; HUANG, D.; LI, H.; LIU, Z.; KE, Y. Differential contribution of endothelium-derived relaxing factors to vascular reactivity in conduit and resistance arteries from normotensive and hypertensive rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 38, n. 4, p. 393–398, 2016.

JOURDE-CHICHE, N.; FAKHOURI, F.; DOU, L.; BELLIN, J.; BURTEY, S.; FRIMAT, M.; JARROT, P. A.; KAPLANSKI, G.; LE-QUINTREC, M.; PERNIN, V.; RIGOTHIER, C.; SALLÉE, M.; FREMEAUX-BACCHI, V.; GUERROT, D.; ROUMENINA, L. T. Endothelium structure and function in kidney health and disease. **Nature reviews. Nephrology**, v. 15, n. 2, p. 87–108, 2019.

JUGDUTT, B. I. Nitric oxide and cardioprotection during ischemia-reperfusion. **Heart failure reviews**, v. 7, n. 4, p. 391–405, 2002.

JÜTTE, R.; HEINRICH, M.; HELMSTÄDTER, A.; LANGHORST, J.; MENG, G.; NIEBLING, W.; POMMERENING, T.; TRAMPISCH, H. J. Herbal medicinal products – Evidence and tradition from a historical perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 207, p. 220–225, 2017.

KANAGY, N. L.; SZABO, C.; PAPAPETROPOULOS, A. Vascular biology of hydrogen sulfide. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 312, n. 5, p. C537–C549, 2017.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, n. 2–3, p. 155–76, 2016.

KAUFMAN, J.A.; JONES, T.B. Viscerosensory Pathways. *In*: HAINES, D. E.; MIHAILOFF, G. A. **Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications**. ARIZONA: Elsevier, 2018. p. 278 - 285.

KIROGLU, O. E.; OZU, O. Y.; EMRE, M.; BAYEL, I.; KUMCU, E. K.; SEÇILMIS, M. A. Residual NO modulates contractile responses and membrane potential in isolated rat mesenteric arteries. **Nitric oxide : biology and chemistry**, v. 71, p. 21–26, 2017.

KIM, U. J. LEE, B. H.; LEE, K. H. Neuroprotective effects of a protein tyrosine phosphatase inhibitor against hippocampal excitotoxic injury. **Brain Research**. v.19, n.10, p. 133-139, 2019.

KISHI, T.; HIROOKA, Y.; KIMURA, Y.; ITO, K.; SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Circulation**, v. 109, n. 19, p. 2357–62, 2004.

KLABUNDE, R. E. Cardiac electrophysiology: normal and ischemic ionic currents and the ECG. **Advances in Physiology Education**, v. 41, n. 1, p. 29–37, 2017.

KOLEDOVA, V. V.; KHALIL, R. A. Ca<sup>2+</sup>, Calmodulin, and Cyclins in Vascular Smooth Muscle Cell Cycle. **Circulation Research**, v. 98, n. 10, p. 1240–1243, 2006.

KOLLARIK, M.; DINH, Q T.; FISCHER, A.; UNDEM, B. J. Capsaicin-sensitive and -insensitive vagal bronchopulmonary C-fibres in the mouse. **The Journal of Physiology**, v. 551, n. 3, p. 869–879, 2003.

KONOPELSKI, P.; UFNAL, M. Electrocardiography in rats: a comparison to human. **Physiological research**, v. 65, n. 5, p. 717–725, 2016.

KRUSZYNA, H.; MAGYAR, J. S.; ROCHELLE, L. G.; RUSSELL, M. A.; SMITH, R. P.; WILCOX, D. E. Spectroscopic studies of nitric oxide (NO) interactions with cobalamins: reaction of NO with superoxocobalamin(III) likely accounts for cobalamin

reversal of the biological effects of NO. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 285, n. 2, p. 665–71, 1998.

KUBO, T.; TAGUCHI, K.; UEDA, M. L-Type Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive Rats: Effects of Calcium Agonist and Antagonist. **Hypertension Research**. v. 21, n. 1, p. 33 - 37, 1998.

KUO, I. Y.; EHRLICH, B. E. Signaling in muscle contraction. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 2, p. a006023, 2015.

LEAR, S. A.; HU, W.; RANGARAJAN, S.; GASEVIC, D.; LEONG, D.; IQBAL, R.; CASANOVA, A.; SWAMINATHAN, S.; ANJANA, R. M.; KUMAR, R.; ROSENGREN, A.; WEI, L.; YANG, W.; CHUANGSHI, W.; HUAXING, L.; NAIR, S.; DIAZ, R.; SWIDON, H.; GUPTA, R.. The effect of physical activity on mortality and cardiovascular disease in 130 000 people from 17 high-income, middle-income, and low-income countries: the PURE study. **Lancet (London, England)**, v. 390, n. 10113, p. 2643–2654, 2017.

LEE, T. Y.; CHEN, Y. J.; LU, C. T.; CHING, W. C.; TENG, Y. C.; HUANG, H. D.; CHEN, Y. J.: a database of cysteine S-nitrosylation. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 28, n. 17, p. 2293–5, 2012.

LEO, F.; HUTZLER, B.; RUDDIMAN, C. A.; ISAKSON, B. E.; CORTESE-KROTT, M. M. Cellular microdomains for nitric oxide signaling in endothelium and red blood cells. **Nitric Oxide**, 2020.

LEONG, X. F.; NG, C. Y.; JAARIN, K.. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. **BioMed research international**, v. 2015, p. 528757, 2015.

LERMAN, L. O.; KURTZ, T. W.; TOUYZ, R. M.; ELLISON, D. H.; CHADE, A. R.; CROWLEY, S. D.; MATTSON, D. L.; MULLINS, J. J.; OSBORN, J.; EIRIN, A.; RECKELHOFF, J. F.; IADECOLA, C.; COFFMAN, T. M. Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 73, n. 6, p. e87–e120, 2019.

LI, H. B.; LU, Y.; LIU, J. J.; MIAO, Y. W.; ZHENG, T. Z.; SU, Q.; QI, J.; TAN, H.;

YUAN, Z.; ZHU, G. Q.; KANG, Y. M.. Salusin  $\beta$  Within the Nucleus Tractus Solitarii Suppresses Blood Pressure Via Inhibiting the Activities of Presympathetic Neurons in the Rostral Ventrolateral Medulla in Spontaneously Hypertensive Rats. **Cardiovascular toxicology**, v. 16, n. 3, p. 223–34, 2016.

LI, H.; HORKE, S.; FORSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 6, p. 313–319, 2013.

LI, Y. C.; CHIANG, C. W.; YEH, H. C.; HSU, P. Y.; WHITBY, F. G.; WANG, L. H.; CHAN, N. L. Structures of Prostacyclin Synthase and Its Complexes with Substrate Analog and Inhibitor Reveal a Ligand-specific Heme Conformation Change. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 5, p. 2917–2926, 2008.

LIMBU, R.; COTTRELL, G. S.; MCNEISH, A. J. Characterisation of the vasodilation effects of DHA and EPA, n-3 PUFAs (fish oils), in rat aorta and mesenteric resistance arteries. **PLoS one**, v. 13, n. 2, p. e0192484, 2018.

LOH, Y. C.; TAN, C. S.; CH'NG, Y. S.; YEAP, Z. Q.; NG, C. H.; YAM, M. F. Overview of the Microenvironment of Vasculature in Vascular Tone Regulation. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, 2018.

LÓPEZ, R. M.; LÓPEZ, J. E.; LÓPEZ, J. S.; CASTILLO, M. C.; GUEVARA, G.; MORALES, J. A.; LÓPEZ, O. A.; LOZANO, J.; CASTILLO, E. F. Effects of indomethacin on prostanoid synthesis and vasomotor responsiveness in endothelium-denuded abdominal and thoracic aortas of Wistar rats. **Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. : 1993)**, v. 39, n. 3, p. 210–219, 2017.

LUDERITZ, B.; DE-LUNA, A. B.. The history of electrocardiography. **Journal of Electrocardiology**, v. 50, n. 5, p. 539, 2017.

LV, G. Y.; ZHANG, Y. P.; GAO, J. L.; YU, J. J.; LEI, J.; ZHANG, Z. R.; LI, B.; ZHAN, R. J.; CHEN, S. H. Combined antihypertensive effect of luteolin and buddleoside enriched extracts in spontaneously hypertensive rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 507–13, 2013.

MAHN, K.; OJO, O. O.; CHADWICK, G.; AARONSON, P. I.; WARD, J. P. T.; LEE, T. H.  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and structural and functional remodelling of airway smooth muscle in asthma. **Thorax**, v. 65, n. 6, p. 547–552, 2010.

MAJESKY, M. W. Vascular Smooth Muscle Cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 36, n. 10, 2016.

MENDES-NETO, J. M.; AMARAL, R. G.; MAIA, M. I. A.; DOS-SANTOS, S. A., DA-SILVA, E.A.; MENEZES, M. G. V.; LAUTON-SANTOS, S. Cardiovascular Effect of Diosgenin: Progress and Challenge. **Saudi Journal of Biomedical Research.**, v. 04, p. 309–318, 2019.

MENEZES, I. A.; BARRETO, C. M.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R. DE-SOUSA, D. P. Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. **Z. Naturforsch C. J. Biosci.** v. 65, n. 10, p.562-566, 2010.

MESTIVIER, D.; DABIRÉ, H.; CHAU, N. P. Effects of autonomic blockers on linear and nonlinear indexes of blood pressure and heart rate in SHR. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 281, n. 3, p. H1113–H1121, 2001.

MILANOS, S.; KUENZEL, K.; GILBERT, D. F.; JANZEN, D.; SASI, M.; BUETTNER, A.; FRIMURER, T. M.; VILLMANN, C. Structural changes at the myrtenol backbone reverse its positive allosteric potential into inhibitory GABAA receptor modulation. **Biological chemistry**, v. 399, n. 6, p. 549–563, 2018.

MIRONOVA, G. Y.; AVDONIN, P. P.; GONCHAROV, N. V.; JENKINS, R. O.; AVDONIN, P. V. Inhibition of protein tyrosine phosphatases unmasks vasoconstriction and potentiates calcium signaling in rat aorta smooth muscle cells in response to an agonist of 5-HT<sub>2B</sub> receptors BW723C86. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 483, n. 1, p. 700–705, 2017.

MORALES-LOREDO, H.; BARRERA, A.; GARCIA, J. M.; PACE, C. E.; NAIK, J. S.; GONZALEZ BOSCH, L. V.; KANAGY, N. L. Hydrogen sulfide regulation of renal and mesenteric blood flow. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 317, n. 5, p. H1157–H1165, 2019.

MOREIRA, I. J. A.; MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J; BONJARDIM, L. R; DE-SANTANA-FILHO, V. J.; PASSOS-JÚNIOR, D. B.; LAUTON-SANTOS, S.; LUCA-JÚNIOR, W. L.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; VIANA-SANTOS, M. R. Characterization and Antihypertensive Effect of the Complex of (-)- $\beta$ - pinene in  $\beta$ -cyclodextrin. **Current pharmaceutical**

**biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 837–45, 2016

MOREIRA, M. R. C.; SALVADORI, M. G. S. S.; DE-ALMEIDA, A. A. C.; DE-SOUSA, D.P.; JORDÁN, J.; SATYAL, P.; DE-FREITAS, R. M.; DE-ALMEIDA, R. N.. Anxiolytic-like effects and mechanism of (-)-myrtenol: a monoterpene alcohol. **Neuroscience letters**, v. 579, p. 119–24, 2014.

MURPHY, C.; LAZZARA, R.. Current concepts of anatomy and electrophysiology of the sinus node. **Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology**, v. 46, n. 1, p. 9–18, 2016.

MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 345–374, 2006.

NASCIMENTO, G. A.; DE-SOUZA, D. S.; LIMA, B. S.; VASCONCELOS, C. M. L.; ARAÚJO, A. A. S.; DURÇO, A. O.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; ALMEIDA, J. Roberto G. S.; OLIVEIRA, A. P.; DE-SANTANA-FILHO, V. J.; BARRETO, A. S.; SANTOS, M. R. V.. Bradycardic and Antiarrhythmic Effects of the D-Limonene in Rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2019.

NERBONNE, J. M.; KASS, R. S. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 4, p. 1205–1253, 2005.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. **Japanese Circulation Journal**, v. 27, n. 3, p. 282–293, 1963.

PAL, S.. ECG Monitoring: Present Status and Future Trend. *In*: MCQUENN, C.; BORON, W. F.; BOULPAEP, E. L.; BRADSHAW, R. A. **Encyclopedia of Biomedical Engineering**. ARIZONA: Elsevier, 2019. p. 363–379.

PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664–6, 1988.

PARK, E. J.; LEE, H. S.; OH, S. R.; LEE, H. K.; LEE, H. S. Pharmacokinetics of verproside after intravenous and oral administration in rats. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 4, p. 559–564, 2009.

PÉREZ-RIERA, A. R.; BARBOSA-BARROS, R.; DAMINELLO-RAIMUNDO, R.; DE ABREU, L. C.; NIKUS, K. Current aspects of the basic concepts of the electrophysiology of the sinoatrial node. **Journal of Electrocardiology**, v. 57, p. 112–118, 2019.

PFITZER, G.. Invited Review: Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 1, p. 497–503, 2001.

PIPINO, C.; BONOMINI, M.; DI-PIETRANTONIO, N.; DI-TOMO, P.; DI-SILVESTRE, S.; FAILLI, P.; MONTAGNANI, M.; DI-PIETRO, N.; ADDABBO, F.; PALMERINI, C.; POTENZA, M. A.; MANDATORI, D.; PANDOLFI, A. Calcimimetic R-568 vasodilatory effect on mesenteric vascular beds from normotensive (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats. Potential involvement of vascular smooth muscle cells (vSMCs). **Plos One**, v. 13, n. 8, p. e0202354, 2018.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; CIMPEANU, C.; PREDOI, G. Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 56, n. 4, p.1-36, 2016.

POLLARD, D. T. EARNSHAW, C. W.; JOHNSON T. G. Muscles. *In*: POLLARD, T. D.; EARNSHAW, C. W.; JOHNSON T. G **Cell Biology**. NEW HAVEN: Elsevier, 2017. p. 671–691.

PORRAS-GONZÁLEZ, C.; ORDÓNEZ, A.; CASTELLANO, A.ntonio; URENA, J. Regulation of RhoA/ROCK and sustained arterial contraction by low cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels during prolonged depolarization of arterial smooth muscle. **Vascular Pharmacology**, v. 93–95, p. 33–41, 2017.

POTTER, L. R. Guanylyl cyclase structure, function and regulation. **Cellular signalling**, v. 23, n. 12, p. 1921–6, 2011.

POULOS, T. L.; LI, H. Nitric oxide synthase and structure-based inhibitor design. **Nitric oxide : biology and chemistry**, v. 63, p. 68–77, 2017.

PRATT, P. F.; BONNET, S.; LUDWIG, L. M.; BONNET, P.; RUSCH, N. J. Upregulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in mesenteric and skeletal arteries of SHR. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 40, n. 2, p. 214–9, 2002.

PRIEST, B. T; MCDERMOTT, J. S. Cardiac ion channels. **Channels**, v. 9, n. 6, p. 352–359, 2015.

PROVIDÊNCIA, R.; KARIM, N.; SRINIVASAN, N.; HONARBAKHS, S.; VIDIGAL FERREIRA, M. J.; GONÇALVES, L.; MARIJON, E.; LAMBIASE, P. D. Impact of QTc formulae in the prevalence of short corrected QT interval and impact on probability and

diagnosis of short QT syndrome. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 104, n. 6, p. 502–508, 2018.

PRYSTOWSKY, E. N. Effects of bepridil on cardiac electrophysiologic properties. **The American journal of cardiology**, v. 69, n. 11, p. 63D-67D, 1992.

PRYSTOWSKY, E. N. The effects of slow channel blockers and beta blockers on atrioventricular nodal conduction. **Journal of clinical pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 6–21, 1988.

RAO, T.; TAN, Z.; PENG, J.; GUO, Y.; CHEN, Y.; ZHOU, H.; OUYANG, D. The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. **Pharmacological Research**, v. 146, p. 104283, 2019.

REISENBERG, M.; SINGH, P. K.; WILLIAMS, G.; DOHERTY, P. The diacylglycerol lipases: structure, regulation and roles in and beyond endocannabinoid signalling. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1607, p. 3264–3275, 2012.

REN, L. M.; NAKANE, T.; CHIBA, S. Muscarinic receptor subtypes mediating vasodilation and vasoconstriction in isolated, perfused simian coronary arteries. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 22, n. 6, p. 841–6, 1993.

RESNICK, N.; YAHAV, H.; SHAY-SALIT, A.; SHUSHY, M.; SCHUBERT, S.; ZILBERMAN, L. C. M.; WOFOVITZ, E. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 81, n. 3, p. 177–199, 2003.

RIBEIRO-FILHO, H. V.; DE-SOUZA S. C. M.; DE-SIQUEIRA, R. J. B.; LAHLOU, S.; DOS-SANTOS, A. A.; MAGALHÃES, P. J. C. Biphase cardiovascular and respiratory effects induced by  $\beta$ -citronellol. **European journal of pharmacology**, v. 775, p. 96–105, 2016.

RIBEIRO, A. L. P.; DUNCAN, B. B.; BRANT, L. C. C.; LOTUFO, P. A.; MILL, J. G.; BARRETO, S. M. Cardiovascular Health in Brazil: Trends and Perspectives. **Circulation**, v. 133, n. 4, p. 422–33, 2016.

RIBEIRO, T. P.; PORTO, D. L.; MENEZES, C. P.; ANTUNES, A. A.; SILVA, D. F.; DE-SOUSA, D. P.; NAKAO, L. S.; BRAGA, V. A.; MEDEIROS, I. A. Unravelling the

cardiovascular effects induced by alpha-terpineol: a role for the nitric oxide-cGMP pathway. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 37, n. 8, p. 811–6, 2010.

RINGVOLD, H. C.; KHALIL, R. A. Protein Kinase C as Regulator of Vascular Smooth Muscle Function and Potential Target in Vascular Disorders. *Advances in Pharmacology* v.78, 2017. p. 203–301.

ROCHELLE, L. G.; MORANA, S. J.; KRUSZYNA, H.; RUSSELL, M. A.; WILCOX, D. E.; SMITH, R. P. Interactions between hydroxocobalamin and nitric oxide (NO): evidence for a redox reaction between NO and reduced cobalamin and reversible NO binding to oxidized cobalamin. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 275, n. 1, p. 48–52, 1995.

RODEN, D. M. Pharmacology and Toxicology of Nav1.5-Class 1 Antiarrhythmic Drugs. **Cardiac Electrophysiology Clinics**, v. 6, n. 4, p. 695–704, 2014.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, R.; PERONA, J. S.; HERRERA, M. D.; RUIZ-GUTIERREZ, V. Triterpenic compounds from “orujo” olive oil elicit vasorelaxation in aorta from spontaneously hypertensive rats. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2096–102, 2006.

ROUSSEAU, D.; LI, D.; COUTURE, M.; YEH, S. Ligand-protein interactions in nitric oxide synthase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 1, p. 306–323, 2005.

RUDY, Y. Molecular Basis of Cardiac Action Potential Repolarization. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1123, n. 1, p. 113–118, 2008.

SALMAN, I. M. Major Autonomic Neuroregulatory Pathways Underlying Short- and Long-Term Control of Cardiovascular Function. **Current Hypertension Reports**, v. 18, n. 3, p. 18, 2016.

SANTOS, A. F.; MACHADO, R. R.; MENDES-NETO, J. M.; MENEZES, M. G. V.; SILVA, G. B. A.; LAUTON-SANTOS, S.. Efeito antioxidante da diosmina: revisão integrativa. **ABCS Health Sciences**, v. 43, n. 3, 2018.

SANTOS-SOUSA, S.; JESUS, R. L. C.; SIMÕES, L. O.; VASCONCELOS, W. P.; MEDEIROS, I. A.; VERAS, R. C.; CASAIS-E-SILVA, L. L.; SILVA, D. F. NO production and potassium channels activation induced by *Crotalus durissus cascavella*

underlie mesenteric artery relaxation. **Toxicol**, v. 133, p. 10–17, 2017.

SANTOS, M. R. V.; MOREIRA, F. V.; FRAGA, B. P.; DE-SOUZA, D. P.; BONJARDIM, L. R.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 764–771, 2011.

SATERNOS, H. C.; ALMARGHALANI, D. A.; GIBSON, H. M.; MEQDAD, M. A.; ANTYPAS, R. B.; LINGIREDDY, A.; ABOUALAIWI, W. A. Distribution and function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system. **Physiological genomics**, v. 50, n. 1, p. 1–9, 2018.

SCHMIDT, L.; GOEN, T.. Human metabolism of  $\alpha$ -pinene Human metabolism of  $\alpha$ -pinene and metabolite kinetics after oral administration. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 677–687, 2017.

SCRIDON, A.; PUERTAS, R. D.; MANATI, W.; FOUILLOUX-MEUGNIER, E. L.; ORÉA, E.; CHAPUIS, V.; JULIEN, B.; BARRÈS, C. C.; TABIB, A. C. P. Age-dependent ventricular arrhythmias risk, structural and molecular remodeling in systemic arterial hypertension. **Mechanisms of Ageing and Development**. v.166, n. 2, p.48-54, 2017.

SELVARAJ, A.; JAYASREE, T.; VALLIAMMAI, A.; PANDIAN, S. K. Myrtenol Attenuates Biofilm and Virulence by Suppressing sarA Expression Dynamism. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2027, 2019.

SHAMON, S. D.; PEREZ, M. I. Blood pressure-lowering efficacy of reserpine for primary hypertension. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2016.

SHIH, H. T. Anatomy of the action potential in the heart. **Texas Heart Institute journal**, v. 21, n. 1, p. 30–41, 1994.

SILVA-CUTINI, M. A.; ALMEIDA, S. A.; NASCIMENTO, A. M.; ABREU, G. R.; BISSOLI, N. S.; LENZ, D.; ENDRINGER, D. C.; BRASIL, G. A.; LIMA, E. M.; BIANCARDI, V. C.; ANDRADE, T. U. Long-term treatment with kefir probiotics ameliorates cardiac function in spontaneously hypertensive rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 66, p. 79–85, 2019.

SILVA-FILHO, J. C.; OLIVEIRA, N. Neyl. P. M.; ARCANJO, D. D. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; CAVALCANTI, S. C. H.; VIANA-SANTOS, M. R.; OLIVEIRA, R. C. M.; OLIVEIRA, A. P. Investigation of mechanisms involved in (-)-borneol-induced

vasorelaxant response on rat thoracic aorta. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 110, n. 2, p. 171–7, 2012.

SILVA, D. F.; ARAÚJO, I. G. ; ALBUQUERQUE, J. G. F.; PORTO, D. L.; DIAS, K. L. G.; CAVALCANTE, K. V. M.; VERAS, R. C.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ARAÚJO, D. A. M.; CRUZ, J. S.; CORREIA, N. A.; DE-MEDEIROS, I. A. Rotundifolone-induced relaxation is mediated by BK(Ca) channel activation and Ca(v) channel inactivation. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 109, n. 6, p. 465–75, 2011.

SILVA, D. F.; DE-ALMEIDA, M. M.; CHAVES, C. G.; BRAZ, A. L.; GOMES, M. A.; PINHO-DA-SILVA, L.; PESQUERO, J. L.; ANDRADE, V. A.; LEITE, M. F.; DE-ALBUQUERQUE, J. G. F.; ARAUJO, I. G. A.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CRUZ, J. S.; CORREIA, N. A.; DE-MEDEIROS, I. A. TRPM8 Channel Activation Induced by Monoterpenoid Rotundifolone Underlies Mesenteric Artery Relaxation. **PLoS one**, v. 10, n. 11, p. e0143171, 2015.

SIMKO, F.; SIMKO, J. The potential role of nitric oxide in the hypertrophic growth of the left ventricle. **Physiological research**, v. 49, n. 1, p. 37–46, 2000.

SIMÕES, L. O.; CONCEIÇÃO-FILHO, G.; RIBEIRO, T. S.; JESUS, A. M.; FREGONEZE, J. B.; SILVA, A. Q. G.; PETREANU, M.; CECHINEL-FILHO, V.; NIERO, R.; NIERO, H.; TAMANAHA, M. S.; SILVA, D. F. Evidences of antihypertensive potential of extract from *Solanum capsicoides* All. in spontaneously hypertensive rats. **Phytomedicine**, v. 23, n. 5, p. 498–508, 2016.

SMITH, J. K.; BARRON, K. W. GABAergic responses in ventrolateral medulla in spontaneously hypertensive rats. **The American journal of physiology**, v. 258, n. 2 Pt 2, p. R450-6, 1990.

SMITH, S. A.; MIZUNO, M.; VONGPATANASIN, W.; MITCHELL, J. H.; DOWNEY, R.M. Mineralocorticoid receptor antagonists attenuate exaggerated exercise pressor reflex responses in hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 313, n. 4, p. H788–H794, 2017.

SOMBERG, J.; TORRES, V.; FLOWERS, D.; MIURA, D.; BUTLER, B.; GOTTLIEB, S. Prolongation of QT interval and antiarrhythmic action of bepridil. **American heart journal**, v. 109, n. 1, p. 19–27, 1985.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325–58, 2003.

SOMLYO, A.V.; SIEGMAN, M. J. Smooth Muscle Myocyte Ultrastructure and Contractility. *In*: HILL, J. A.; OSLON, E. N. **Muscle, Fundamental Biology and Mechanisms of Disease**. NEW YORK: Elsevier, 2012. p. 1117–1132.

SPIESSER-ROBELET, L.; MARTIN, B.; CARCELLER, A. M.; BUSSIERES, J. F.; TOUZIN, K.; AUDIBERT, F.; LACHANCE, C.; FERREIRA, E. Adverse effects and hemodynamic effects of nifedipine as a tocolytic. **Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction**, v. 44, n. 7, p. 614–20, 2015.

STAN, R. V. Structure and function of endothelial caveolae. **Microscopy Research and Technique**, v. 57, n. 5, p. 350–364, 2002.

SULLIVAN, J. C.; POLLOCK, J. S. NOS 3 subcellular localization in the regulation of nitric oxide production. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 179, n. 2, p. 115–122, 2003.

SUN, W.; ZHOU, B.; GONG, J. X.; KONG, X. Q.; LI, P.. Hexamethonium attenuates sympathetic activity and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 5, p. 7116–7122, 2015.

SVERRISDÓTTIR, E.; LUND, T. M.; OLESEN, A. E.; DREWES, A. M.; CHRISTRUP, L. L.; KREILGAARD, M. A review of morphine and morphine-6-glucuronide's pharmacokinetic–pharmacodynamic relationships in experimental and clinical pain. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, p. 45–62, 2015.

TAI, M. H.; WANG, L. L.; WU, K. L. H.; CHAN, J. Y. H. Increased superoxide anion in rostral ventrolateral medulla contributes to hypertension in spontaneously hypertensive rats via interactions with nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 38, n.4, p. 450–462, 2005.

TAN, X.; PAN, Y.; SU, W.; GONG, S.; ZHU, H.; CHEN, H.; LU, S. Acupuncture therapy for essential hypertension: a network meta-analysis. **Annals of translational medicine**, v. 7, n. 12, p. 266, 2019.

TASIAN, G.; CUNHA, G.; BASKIN, L. Smooth muscle differentiation and patterning in the urinary bladder. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 80, n. 2–3, p. 106

– 17, 2010.

TIKHONOV, D. B.; ZHOROV, B. S. Structural model for dihydropyridine binding to L-type calcium channels. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 28, p. 19006–17, 2009.

TOTZECK, M.; HENDGEN-COTTA, U. B.; RASSAF, T. Nitrite-Nitric Oxide Signaling and Cardioprotection. *In*: SANTULLI, G. **Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Medicine**. NEW YORK: SPRINGER, 2017, p. 335–346.

TOUYZ, R. M.; ALVES-LOPES, R.; RIOS, F. J.; CAMARGO, L. L.; ANAGNOSTOPOULOU, A.; ARNER, A.; MONTEZANO, A. C. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovascular research**, v. 114, n. 4, p. 529–539, 2018.

TU, Y. Artemisinin-A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 55, n. 35, p. 10210–26, 2016.

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, n. 2, p. 485–581, 2017.

VASCONCELOS, T. B.; RIBEIRO-FILHO, H. V.; LUCETTI, L. T.; MAGALHÃES, P. J. C.  $\beta$ -Citronellol, an alcoholic monoterpene with inhibitory properties on the contractility of rat trachea. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 49, n. 2, p.23-29, 2016.

VAN BREDERODE, J.; ATAK, S.; KESSLER, A.; PISCHETSRIEDER, M.; VILLMANN, C.; ALZHEIMER, C. The terpenoids Myrtenol and Verbenol act on  $\delta$  subunit-containing GABAA receptors and enhance tonic inhibition in dentate gyrus granule cells. **Neuroscience letters**, v. 628, p. 91–7, 2016.

VANHOUTTE, P. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 6, p. 503–508, 2004.

VEERAPPAN, R.; MALARVILI, T. Chrysin Pretreatment Improves Angiotensin System, cGMP Concentration in L-NAME Induced Hypertensive Rats. **Indian journal of clinical biochemistry : IJCB**, v. 34, n. 3, p. 288–295, 2019.

VEILLEUX-LEMIEUX, D.; CASTEL, A.; CARRIER, D.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Pharmacokinetics of ketamine and xylazine in young and old Sprague-Dawley rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 52, n. 5, p. 567–70, 2013.

VIANA, A. F. S. C.; LOPES, M. T. P.; OLIVEIRA, F. T. B.; NUNES, P. I. G.; SANTOS, V. G.; BRAGA, A. D.; SILVA, A. C. A.; DE-SOUSA, D. P.; VIANA, D. A.; RAO, V. S.; OLIVEIRA, R. C. M.; SANTOS, F. A. (-)-Myrtenol accelerates healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats and in human gastric adenocarcinoma cells. **European journal of pharmacology**, v. 854, p. 139–148, 2019.

VIANA, A. F. S. C.; DA-SILVA, F. V.; FERNANDES, H. B.; OLIVEIRA, I. S.; BRAGA, M. A.; NUNES, P. I. G.; VIANA, D. A.; DE-SOUSA, D. P.; RAO, V. S.; OLIVEIRA, R. C. M.; ALMEIDA-SANTOS, F. Gastroprotective effect of (-)-myrtenol against ethanol-induced acute gastric lesions: possible mechanisms. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 8, p. 1085–1092, 2016.

WANG, C. L. A. Caldesmon and Smooth-Muscle Regulation. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 35, n. 3, p. 275–288, 2001.

WANG, G.; RONG, M. Q.; LI, Q.; LIU, Y. P.; LONG, C. B.; MENG, P.; YAO, H. M.; LAI, R.; LUO, X. D. Alkaloids from *Veratrum taliense* Exert Cardiovascular Toxic Effects via Cardiac Sodium Channel Subtype 1.5. **Toxins**, v. 8, n. 1, 2015.

WEBB, R. C. SMOOTH MUSCLE CONTRACTION AND RELAXATION. v. 27, n. 4, p. 201–206, 2003.

WEHRWEIN, E. A.; JOYNER, M. J. Regulation of blood pressure by the arterial baroreflex and autonomic nervous system. *In*: BUIJS, R. M.; SWAAB, D. F. **Autonomic Nervous System**. NEW YORK: ELSEVIER, 2013. p. 89–102.

WHELTON, P. K.; CAREY, R. M.; ARONOW, W. S.; CASEY, D. E.; COLLINS, K. J.; DENNISON-HIMMELFARB, C.; DEPALMA, S. M.; GIDDING, S.; JAMERSON, K. A.; JONES, D. W.; MACLAUGHLIN, E. J.; MUNTNER, P.; OVBIAGELE, B.; SMITH, S. C.; SPENCER, C. C.; STAFFORD, R. S.; TALER, S. J.; THOMAS, R. J.; WILLIAMS, K. Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Pr. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 71, n. 6, p.

e13–e115, 2018.

WIER, A. Automaticity: nature excitation of heart. *In*: WIER, A. **Cardiovascular Physiology**. 2013, ARIZONA:ELSEVIER, p. 31-51.

WIENS, B.; DE-LUCA, V. Molecular and biochemical characterization of a benzenoid/phenylpropanoid meta / para - O -methyltransferase from Rauwolfia serpentina roots. **Phytochemistry**, v. 132, p. 5–15, 2016.

WHO. WORLD HEALTH ORZANIZATION. HYPERTENSION BULLETIN. Disponível em:< <https://www.who.int/> acessado em 12/10/2019 às 19:34

WOLFF, C. B.; COLLIER, D. J.; SHAH, M.; SAXENA, M.; BRIER, T. J.; KAPIL, V.; GREEN, D.; LOBO, M. A. Discussion on the Regulation of Blood Flow and Pressure. *In*: ELWELL, T. S.; HARRISON, D. K. **Oxygen Transport to Tissue. Advances in Experimental Medicine and Biology**. NEW YORK: SPRINGER, 2016. p. 129–135.

WONG, B. W.; MARSCH, E.; TREPS, L.; BAES, M.; CARMELIET, P. Endothelial cell metabolism in health and disease: impact of hypoxia. **The EMBO journal**, v. 36, n. 15, p. 2187–2203, 2017.

XING, B. N. ; JIN, S. S.; WANG, H.; TANG, Q. F.; LIU, J. H.; LI, R. Y.; LIANG, J. Y.; TANG, Y. Q.; YANG, C. H. New diterpenoid alkaloids from Aconitum coreanum and their anti-arrhythmic effects on cardiac sodium current. **Fitoterapia**, v. 94, p. 120–126, 2014.

YU, J.; OGAWA, K.; TOKINAGA, Y.; MIZUMOTO, K.; KAKUTANI, T.; HATANO, Y. The Inhibitory Effects of Isoflurane on Protein Tyrosine Phosphorylation–modulated Contraction of Rat Aortic Smooth Muscle. **Anesthesiology**, v. 101, n. 6, p. 1325–1331, 2004.

YUAN, H.; SILBERSTEIN, S. D. Vagus Nerve and Vagus Nerve Stimulation, a Comprehensive Review: Part II. **Headache**, v. 56, n. 2, p. 259–66, 2016.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of pharmacological sciences**, v. 129, n. 2, p. 83–94, 2015.

**12. ANEXO I – Aprovação e liberação da execução do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal – Universidade Federal de Sergipe – UFS.**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
 COORDENAÇÃO DE PESQUISA  
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Atividade cardiovascular do (-)-Mirtenol em ratos hipertensos cardiovascular activity of (-)-Mirtenol in hypertensive rats", registrada com o nº 63/2016, sob a responsabilidade da Profª. Drª. Sandra Lauton Santos que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 24/01/2017.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/03/2017, Término: 30/12/2019
Espécie/linhagem/raca	Rato heterogênico/Wistar -SHR
Nº de animais	142
Peso/Idade	250 e 300g / 12 a 14 semanas
Sexo	M
Origem	Biotério Setorial do DFS/UFS ( ratos wistar). Biotério Central do departamento de fisiologia e farmacologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

*Josemar Sena Batista*

Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA  
 Coordenador do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloisio de Campos"  
 Jardim Rosa Elze - São Cristóvão - SE  
 49100-000  
 Fones: 3212 6661/6606

13. ANEXO II – Publicação de dados preliminares da presente tese e prêmio destaque no 51º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Maceió – AL, 2019

