



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

OTACÍLIO BENVINDO DEOCLECIANO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RELAXANTE DE
17-NOR-SUBINCANADINA E, UM ALCALÓIDE ISOLADO DE
Aspidosperma ulei MARKGR. SOBRE A MUSCULATURA LISA
CAVERNOSA DE COELHOS.**

FORTALEZA

2008

OTACÍLIO BENVINDO DEOCLECIANO JÚNIOR

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RELAXANTE DE
17-NOR-SUBINCANADINA E, UM ALCALÓIDE ISOLADO DE *Aspidosperma ulei*
MARKGR. SOBRE A MUSCULATURA LISA CAVERNOSA DE COELHOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Vietla Satyanarayana Rao

FORTALEZA

2008

D465a Deocleciano Júnior, Otacílio Benvindo
Avaliação da atividade relaxante de 17-*nor*-subincanadina E, um alcalóide isolado de *Aspidosperma ulei* Markgr sobre a musculatura lisa cavernosa de coelhos / Otacílio Benvindo Deocleciano Júnior. – Fortaleza, 2008.
116 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao
Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2008.

1. Aspidosperma. 2. Disfunção Erétil. 3. Tono Muscular.
4. Farmacologia. I. Rao, Vietla Satyanarayana (Orient.)
II. Título

CDD: 615.32372

OTACÍLIO BENVINDO DEOCLECIANO JUNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RELAXANTE DE 17-NOR-SUBINCANADINA E, UM
ALCALÓIDE ISOLADO DE *Aspidosperma ulei* MARKGR. SOBRE A
MUSCULATURA LISA CAVERNOSA DE COELHOS.**

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências da Saúde da referida Universidade.

A citação de qualquer texto dessa tese é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas de ética.

Aprovada em: 11 de Junho de 2008

Banca Examinadora

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará - UFC

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãos e amigos pelo apoio e compreensão durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Vietla Satyanarayana Rao pela orientação.

Ao Professor Nilberto Robson Falcão do Nascimento, a sua inestimável colaboração na realização deste estudo foi fundamental na minha formação científica.

À Roberta Dalcico, pelo amor e dedicação durante a finalização deste trabalho. Os seus ensinamentos ficarão para sempre marcados no meu coração.

À professora Adriana Rolim por ter me confiado a continuação dos seus estudos e pela amizade, respeito e o senso de humildade e justiça.

À professora Maria Angelina Medeiros, pelo incentivo desde o período da graduação, pela amizade, estar sempre disposta a oferecer apoio científico e emocional.

Ao Professor Edilberto Rocha Silveira e Dr. Daniel Esdras de Andrade Uchoa pelo fornecimento do alcalóide isolado.

À Professora Flávia Almeida e todos os amigos do Laboratório de Produtos Naturais, Danilo, Cíntia, Silveria, Iana, Tiago Olinda, Marjorie, Ana Carla, Deive, Carol Melo, Alana, Karine, Talita, Natália e D. Marta.

Aos Professores Pedro Jorge Caldas Magalhães, Jairo Diniz e Cléa Florêncio, por terem participado da banca no exame de qualificação.

De forma especial agradeço à Karina Moreira, Clauber Mota e Paula Priscila Costa pelas incontáveis horas de trabalho realizados na UECE e pelas várias madrugadas passadas no laboratório.

À professora Cláudia Ferreira Santos pelos inestimáveis ensinamentos e ajuda.

Aos alunos do Laboratório de Produtos Naturais, Tiago Melo, Patrícia, Sâmia, Daniel, Saulo, Rafaela e Rhaendell por todos os bons momentos.

Aos alunos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da Universidade Estadual do Ceará, Léo, Vitor, Ilana e Holivania.

Aos funcionários do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e o Juciê pela presteza na entrega dos animais.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Alana, Íris, Chiquinho, Fernando, Marta e Joana.

À secretária da Pós-Graduação, Aura Rhanes, pela amizade, eficiência e gentileza.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento e realização deste trabalho.

A CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Tudo o que o homem faz com motivos pessoais é sem valor para o Eterno. Para atingirmos a salvação e a união com Deus, havemos de agir sem motivos egoístas, sem tomar em consideração o nosso próprio Eu pessoal, entregando-nos a Vontade Divina como um instrumento na mão de Deus e, assim, cumprindo o nosso dever por ser dever, sem pedir recompensas.

Bhagavad Gita

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RELAXANTE DE 17-NOR-SUBINCANADINA E, UM ALCALÓIDE ISOLADO DE *Aspidosperma ulei* MARKGR. SOBRE A MUSCULATURA LISA CAVERNOSA DE COELHOS. Otacílio Benvindo Deocleciano Junior. Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia

Estudos anteriores demonstraram que uma fração rica (F(3-5)) em alcalóides indólicos extraída das cascas da raiz de *Aspidosperma ulei* Markgr. exibe função pró-erétil *in vivo* e relaxamento em corpos cavernosos de coelhos *in vitro*. Um estudo recente demonstrou que 17-nor-subincanadina E (SEC), um alcalóide extraído das cascas do caule da mesma planta, apresentou atividade pró-erétil *in vivo*. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito desse alcalóide sobre o tônus de diferentes tipos de musculatura lisa de coelhos e investigar o mecanismo de ação da substância sobre o músculo liso cavernoso *in vitro*. Os tecidos foram montados em banhos de 5 ml contendo solução de Krebs-Henseleit (CO₂ 5% - O₂ 95%; 37°C). A resposta relaxante máxima induzida por SEC (1 – 100 µg/ml) em segmentos de corpos cavernosos de coelhos contraídos com fenilefrina (PHE-10µM) foi de 100%, e apresentou um efeito relaxante preferencial para esse tecido, IC₅₀[7, 174 (3,155 – 16,31) µg/ml]. SEC promoveu também relaxamento em anéis de aorta na presença e na ausência de endotélio, IC₅₀[29,76 (90,32 – 115,6) µg/ml] e IC₅₀[26,13 (75,83 – 119,9) µg/ml], respectivamente, anéis de traquéia IC₅₀[60,25 (0,330 – 109,8) µg/ml] e em segmentos de duodeno IC₅₀[76,78 (33,09 – 178,2) µg/ml]. O relaxamento induzido por SEC (1 – 100 µg/ml) não foi afetado por bloqueadores adrenérgicos (fentolamina e guanetidina), muscarínicos (atropina), ou bloqueadores dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP})(glibenclâmida) e ativados por cálcio (K_{Ca}) (apamina e iberiotoxina) e nem na presença de L-NAME; a adição de ODQ (30 µM) bloqueou o relaxamento induzido por SEC (79,1% ± 4,5%; p<0,05). Observou-se também um aumento dos níveis teciduais de AMPc (331,95% ± 26,1%; p<0,05) e GMPc (21,5% ± 4,2%; p<0,05). SEC (10 µg/ml e 30 µg/ml) potencializou o relaxamento induzido por gliceriltrinitrato (GTN) e forskolina (FK) e foi capaz de diminuir o relaxamento induzido pela estimulação por campo elétrico (ECE) (65,0% ± 10,9%; p< 0,05). SEC 15 µg/ml bloqueou a contração induzida por CaCl₂ 1 - 300 mM em corpos cavernosos de coelhos pré-contraídos com K⁺ (40 mM), 0 Ca⁺⁺. Nossos resultados indicam que SEC manifesta atividade relaxante preferencial no músculo liso cavernoso a nível periférico e que esse efeito está aparentemente relacionado com um aumento dos níveis de AMPc e GMPc e um possível bloqueio do fluxo de cálcio. Estes dados sugerem que *Aspidosperma ulei* Markgr. pode ser explorada como uma alternativa para o tratamento da disfunção erétil.

Palavras-chave: *Aspidosperma*. Disfunção Erétil. Tono Muscular. Farmacologia.

ABSTRACT

EVALUATION OF ACTIVITY OF 17-*nor*-SUBINCANADINA E AN ISOLATED ALKALOID FROM *Aspidosperma ulei* MARKGR ON CAVERNOUS SMOOTH MUSCLE OF RABBITS. Otacilio Benvindo Deocleciano Junior. Principal Advisor: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao. Dissertation submitted in partial fulfillment to obtain the Master's Degree in Pharmacology, Post-Graduate Programme in Pharmacology, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, 2008.

Past studies have shown that the indole alkaloidal rich fraction (F(3-5)) from *Aspidosperma ulei* Markgr. root bark displays pro-erectile function in vivo and a relaxant effect on isolated rabbit corpus cavernosum in vitro. Also, a recent study demonstrated the in vivo pro-erectile like activity of 17-*nor*-subincanadina E (SEC), an alkaloid isolated from stem bark of this plant. This study aimed to assess further the effect of SEC on the smooth muscle tone (spontaneous or induced) in vitro, utilizing the strips of tracheal, intestinal, vascular and corpus cavernosal tissues of rabbits. An attempt was also made to study the possible mechanism of SEC on rabbit corpus cavernosum (RbCC). RbCC strips, were mounted in organ baths containing Krebs solution. After equilibration, the tissues were precontracted with phenylephrine (10 μ M) or potassium (40mM). SEC (1-100 μ g/ml) caused a concentration dependent relaxation in the isolated rabbit corpus cavernosum precontracted with phenylephrine and displayed comparatively greater relaxant effect on corpus cavernosum IC₅₀ [7,174 (3,155-16,31) μ g/ml], SEC produced concentration-dependent relaxations of the aortic rings in endothelium intact and denuded IC₅₀[29,76 (90,32–115,6) μ g/ml] and IC₅₀[26,13 (75,83–119,9) μ g/ml], respectively, trachea rings IC₅₀[60,25 (0,330-109,8) μ g/ml], and of spontaneous motility in segments of duodenum IC₅₀[76,78 (33,09–178,2) μ g/ml]. The relaxant effect of SEC (1-100 μ g/ml) on phenylephrine contraction was unaffected in the presence of adrenergic blockers (phentolamine and guanethidine), muscarinic blocker (atropine), K_{ATP} channel blocker (glibenclamide), Ca²⁺-dependent K⁺ channel blockers (apamin and iberiotoxin), and in the presence of N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME 100 μ M)). However, the SEC relaxation was significantly attenuated by ODQ (30 μ M) (79.1% $\pm$ 4.5%, p <0.05). Incubations of RbCC with SEC (10 and 30 μ g/mL) caused significant increases of cGMP (21.5% $\pm$ 4.2%, p <0.05) and cAMP (331.95% $\pm$ 26.1%, p <0.05) levels. Preincubation with SEC (10 and 30 μ M) also significantly enhanced the relaxation response to the exogenous NO-donor (GTN) and an activator of adenylyl cyclase (forskolin). the relaxations evoked by electrical stimulation was significantly decreased by SEC (10 μ g/mL) (65.0% $\pm$ 10.9%, p <0.05). The phasic component of the contraction induced by K⁺ 40 mM as well as the maximal contraction elicited by increasing external Ca²⁺ concentrations in depolarized corpora cavernosa was inhibited by SEC (15 μ g/mL). Our results indicate that SEC can induce comparatively a greater relaxant effect on rabbit cavernosal tissue in vitro via a mechanism that involves an increase of cAMP and cGMP levels and a blocking effect on calcium flux. These data suggest that *Aspidosperma ulei* Markgr. can be explored as an alternative for the treatment of erectile dysfunction.

Keywords: *Aspidosperma*. Erectile Dysfunction. Muscle Tonus. Pharmacology.

LISTA DE FIGURAS

1	<i>Aspidosperma ulei</i> Markgf. (A) árvores, (B) frutos e (C) flores.....	25
2	Alcalóides presentes na fração (F(3-5)) extraída das cascas da raiz de <i>Aspidosperma ulei</i>	27
3	Mecanismo molecular periférico envolvendo ereção e detumescência.....	39
4	SEC (17-nor-subincanadina E)	47
5	Isolamento de SEC (17-nor-subincanadina E).....	48
6	Cromatograma de AU-8 obtido a partir da fração 10/2.....	49
7	Esquema do banho de tecido isolado.....	50
8	Montagem dos anéis de aorta em banho isolado.....	51
9	Montagem dos anéis de traquéia em banho isolado.....	52
10	Esquema do banho isolado de corpo cavernoso e da aplicação do estímulo elétrico.....	53
11	Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC na contração induzida por fenilefrina 10µM em segmentos de corpos cavernosos de coelhos.....	56
12	Efeito de SEC sobre a contração induzida por fenilefrina em corpo cavernoso de coelhos.....	57
13	Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC na contração induzida por fenilefrina 10 µM em anéis de aorta de coelhos com endotélio.....	57
14	Efeito de SEC sobre a contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta na ausência e na presença de endotélio.....	58
15	Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC na contração induzida por carbacol 10 µM em anéis de traquéia de coelhos.....	58
16	Efeito de SEC sobre a contração induzida por carbacol em anéis de traquéia de coelhos.....	59

17	Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC (1-100 µg/ml) sobre a atividade espontânea de segmento de duodeno de coelhos.....	60
18	Efeito de SEC sobre a atividade espontânea de duodeno.....	60
19	Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC na contração induzida por fenilefrina 10µM na presença de apamina 0,1 µM, iberitoxina 0,1 µM e glibenclamida 10mM em segmentos de corpos cavernosos de coelhos.....	61
20	Efeito sobre a contração induzida por fenilefrina na presença de apamina, iberitoxina e glibenclamida.....	62
21	Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC (1 – 100 µg/ml) na contração induzida por fenilefrina 10 µM em corpos cavernosos de coelhos pré-tratados com atropina (10 µM).....	63
22	Efeito sobre a contração induzida por fenilefrina na presença de atropina.....	64
23	Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC na contração induzida por solução despolarizante de K ⁺ 40mM (A) e na presença de guanetidina e fentolamina (10 µM) (B) em segmentos de corpos cavernosos de coelhos.....	64
24	Efeito sobre a contração induzida por potássio 40mM na presença de guanetidina e fentolamina.....	65
25	Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC na contração induzida por fenilefrina 10 µM (A) e na presença de L-NAME 100 µM (B) em segmentos de corpos cavernosos de coelhos.....	66
26	Efeito sobre a contração induzida por fenilefrina na presença de L-NAME.....	67
27	Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC na contração induzida por fenilefrina 10 µM na presença de ODQ 30 µM em segmentos de corpos cavernosos de coelhos.....	68
28	Efeito sobre a contração induzida por fenilefrina na presença de OQD.....	69
29	Registro fisiográfico representativo do efeito relaxante de NO (1 - 3000 mM) em segmentos de corpos cavernosos pré-contraídos com fenilefrina 10 µM (A) e na presença de SEC 10 µg/ml e 30 µg/ml (B e C). O traçado acima é representativo de quatro experimentos.....	70

30	Efeito de SEC sobre o relaxamento induzido por NO.....	71
31	Registro fisiográfico representativo do efeito relaxante de forskolina (10^{-9} - 10^{-5} M) em segmentos de corpos cavernosos pré-contraídos com fenilefrina 10 μ M (A) e na presença de SEC 10 μ g/ml e 30 μ g/ml (B e C, respectivamente).....	71
32	Efeito de SEC sobre o relaxamento induzido por Forskolina.....	72
33	Efeito de SEC sobre a dosagem de GMPc tecidual.....	73
34	Efeito de SEC sobre a dosagem de AMPc tecidual.....	74
35	Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC sobre o relaxamento induzido por estímulo elétrico transmural (ECE) em corpos cavernosos isolados de coelho pré-contraídos por fenilefrina (10 μ M).....	75
36	Efeito sobre o relaxamento induzido por estímulo elétrico (ECE).....	76
37	Efeito de concentrações cumulativas de CaCl_2 (1 - 100 mM) em corpos cavernosos isolados de coelhos pré-contraídos por solução despolarizante de K^+ 40 mM; 0 Ca^{++} na presença e na ausência de SEC 3,5 μ g/ml.....	77
38	Registro fisiográfico representativo do efeito de concentrações cumulativas de CaCl_2 (1-100 μ g/ml) na contração induzida por solução despolarizante de K^+ 40mM, 0 Ca^{++} na presença ou ausência de SEC 3,5 μ g/ml.....	78
39	Efeito de concentrações cumulativas de CaCl_2 (1-100 mM) em corpos cavernosos isolados de coelhos pré-contraídos por solução despolarizante de K^+ 40 mM; 0 Ca^{++} na presença e na ausência de SEC 7,5 μ g/ml.....	79
40	Registro fisiográfico representativo do efeito de concentrações cumulativas de CaCl_2 (1 - 300 μ g/ml) na contração induzida por solução despolarizante de K^+ 40mM, 0 Ca^{++} na presença ou ausência de SEC 7,5 μ g/ml.....	80
41	Efeito de concentrações cumulativas de CaCl_2 (1 - 100 mM) em corpos cavernosos isolados de coelhos pré-contraídos por solução despolarizante de K^+ 40 mM; 0 Ca^{++} na presença e na ausência de SEC 15 μ g/ml.....	81
42	Registro representativo do efeito de concentrações de CaCl_2 (1-300 μ g/ml) na contração induzida por K^+ 40mM, 0 Ca^{++} na presença ou ausência de SEC 15 μ g/ml.....	82

LISTA DE TABELAS

1	Exemplo das diferentes classes de alcalóides, sua origem e utilização.....	21
2	Concentração inibitória 50% em base µg/ml, com seus respectivos IC95%, de SEC em corpo cavernoso, aorta, traquéia e duodeno de coelhos, pré-contraídos com fenilefrina ou carbacol.	61

LISTA DE ABREVIATURAS

A.	Aspidosperma
Ach	Acetilcolina
Atrop	Atropina
AC	Adenilato ciclase
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca⁺²	Cálcio
Cl⁻	Cloreto
CCD	Cromatografia em camada delgada
CO₂	Dióxido de carbon
DE	Disfunção erétil
ECE	Estimulação por campo elétrico
FDA	Food and Drug Administration
FK	Forskolin
GC	Guanilato ciclase
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
Hz	Hertz
IBTX	Iberiotoxina

IC₅₀	Concentração inibitória 50%
IP₃	Trifosfato de inositol
K⁺	Potássio
K_{ATP}	Canal de potássio dependente de ATP
K_{Ca}	Canal de potássio de alta condutância dependente de cálcio
KHS	Solução de Krebs-Henseleit
L-Arg	L-Arginina
L-NAME	L-nitro arginina metil éster
M	Molar
M₃	Receptor muscarínico tipo 3
MG⁺⁺	Magnésio
NA	Noradrenalina
NANC	Não adrenérgico não colinérgico
NIH	National Institute of Health
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS_e	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS_n	Óxido nítrico sintase neuronal
ODQ	1H-[1,2,4]Oxidiazol[4,3-a]quinoxalina-1-one
P	Probabilidade
pH	Potencial de hidrogênio

PHE	Fenilefrina
PDE	Fosfodiesterase
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGE_R	Receptor para prostaglandina E
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína cinase dependente de GMP _c
PLC	Fosfolipase C
R_{máx}	Resposta máxima
RMN	Ressonância magnética nuclear
SEC	17- <i>nor</i> -subincanadina E
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Nitroprussiato de sódio
TTX	Tetrodotoxina
μg	Micrograma (s)
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Plantas medicinais.....	18
1.2	Alcalóides.....	20
1.3	O gênero <i>Aspidosperma</i>.....	22
1.4	<i>Aspidosperma ulei</i> markgf.....	24
1.5	Fisiologia do músculo liso.....	29
1.6	O tecido erétil.....	37
1.7	Disfunção erétil.....	40
2	JUSTIFICATIVAS.....	42
3	OBJETIVOS.....	43
4	MATERIAIS.....	
4.1	Animais.....	43
4.2	Aparelhos e instrumentos laboratoriais.....	43
4.3	Drogas e reagentes.....	44
4.4	Soluções.....	45
5	MÉTODOS.....	46
5.1	Isolamento de 17-nor-subincanadina e (SEC).....	46
5.2	Efeito de SEC sobre a musculatura lisa de coelhos.....	49
5.2.1	Efeito de SEC sobre a contração induzida por fenilefrina em corpo cavernoso de coelhos.....	50
5.2.2	Efeito de SEC sobre a contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta na ausência e na presença de endotélio.....	50

5.2.3 Efeito de SEC sobre a contração induzida por carbacol em anéis de traquéia.....	51
5.2.4 Efeito de SEC sobre a atividade espontânea de duodeno.....	52
5.3 Efeito de SEC em corpos cavernosos de coelhos.....	52
5.3.1 Efeito sobre a contração induzida por fenilefrina ou potássio.....	53
5.3.2 Dosagem de GMPc e AMPc tecidual.....	53
5.3.3 Efeito sobre o relaxamento induzido por campo elétrico.....	54
5.3.4 Efeito de SEC sobre contrações induzidas por CaCl_2 , numa solução despolarizante zero cálcio.....	55
5.4 Análise estatística.....	55
6 RESULTADOS.....	56
7 DISCUSSÃO.....	84
8 CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS.....	95
APÊNDICE.....	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Este papiro foi encontrado nas proximidades da câmara mortuária de Ramsés II; enumera mais ou menos 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal. Durante o período anterior à era cristã, vários filósofos podem ser destacados por suas obras sobre história natural. Dentre esses, sobressai-se Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, que se caracterizou por tomar a natureza como guia na escolha dos remédios (VILELA, 1977).

O uso de plantas medicinais no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a civilização humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país, e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL *et al.*, 2002).

As plantas medicinais são uma das mais antigas armas empregadas para o tratamento das doenças humanas e consistem em uma estratégia alternativa na procura de novos agentes terapêuticos, uma vez que muito já se conhece a respeito de seu uso por parte da sabedoria popular. Com os avanços científicos, esta prática milenar perdeu espaço para os medicamentos sintéticos; entretanto, o alto custo destes fármacos e os efeitos colaterais apresentados contribuíram para o ressurgimento da fitoterapia (PINTO *et al.*, 2002).

O uso das plantas medicinais pela população mundial ainda tem sido muito significativo nos últimos tempos. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que cerca de 80% da população mundial utiliza, preferencialmente, a medicina tradicional nos cuidados primários da saúde, sendo que a maior parte das terapias tradicionais envolve o uso das plantas *in natura* ou produtos manufaturados a partir de seus extratos ou princípios ativos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1991).

No Brasil, cerca de 20% de nossa população consome 63% dos medicamentos disponíveis e o restante encontra nos produtos de origem natural,

especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recurso terapêutico. Desta forma torna-se essencial inventariar o potencial medicinal da flora do país para sua preservação e uso sustentável, ressaltando ser indispensável a busca pela conservação da espécie medicinal ameaçada (GUARRERA; MARIGNOLI, 2005).

A investigação de produtos naturais e de seus diversos metabólitos continua sendo uma fonte potencial para o desenvolvimento de novas substâncias com uso terapêutico e também que funcionem como ferramentas farmacológicas indispensáveis para a compreensão de fenômenos moleculares complexos.

A exploração dos recursos vegetais pode levar à identificação de metabólitos secundários valiosos, que sirvam como drogas, ou conduzir ao desenvolvimento de novas drogas terapêuticas. O isolamento das primeiras substâncias puras derivadas de plantas começou no século XVIII. Este século, juntamente com o XIX, caracterizou-se pelos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcalóides. É desta época o isolamento da morfina (1806), quinina e estriquinina (1820) (PINTO *et al.*, 2002).

Diante da carência financeira, a fitoterapia é uma alternativa viável para a maioria dos brasileiros. Se por um lado existe a necessidade de intensificação de estudos com potenciais florísticos do Brasil, visando à descoberta ou comprovação de plantas usadas popularmente, por outro é preciso reverter os conhecimentos adquiridos em benefícios das pessoas e obter um maior envolvimento da classe médica (MARINHO *et al.*, 2007).

A Universidade Federal do Ceará vem realizando, de forma integrada, um extenso trabalho de pesquisa sobre a flora nordestina, estudando diversos produtos de origem natural. Dentre esses, as espécies produtoras de alcalóides são de especial importância, dada a evidente atividade farmacológica dessas substâncias.

1.2 Alcalóides

Alcalóides (termo lingüisticamente derivado da palavra árabe *alquali*, denominação vulgar da planta da qual a soda foi originalmente extraída) são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos, encontrados predominantemente nas angiospermas (KUTCHAN, 1995; EVANS, 1996).

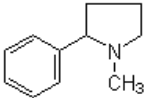
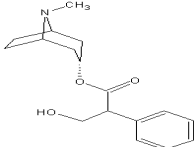
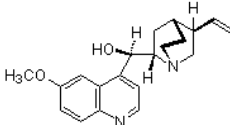
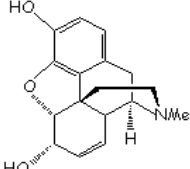
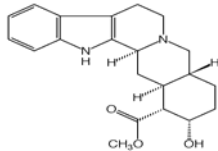
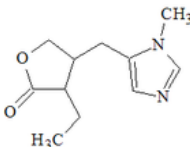
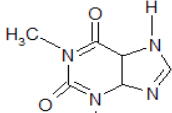
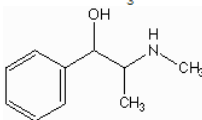
Os alcalóides constituem-se num vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, representando cerca de 20% das substâncias naturais

descritas. Esse grupo químico tem apresentado um grande impacto através dos tempos na economia, na medicina e em outros setores sociais e políticos. Os índios da bacia amazônica utilizam o extrato seco da planta conhecida como curare, contendo o alcalóide tubocurarina, para preparar dardos e flechas envenenados a serem empregados na caça e nas guerras (ROBBERS; TYLER; SPEEDIE, 1997).

Os alcalóides podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal, contudo, em um ou mais órgãos haverá o acúmulo preferencial dessas substâncias. As funções destes compostos nas plantas não estão bem esclarecidas. Inicialmente, foram atribuídos aos alcalóides os papéis de proteção, resultante da toxicidade elevada que conferem ao vegetal. No entanto, acredita-se que os alcalóides atuem também como reserva da síntese de proteínas, estimulantes ou reguladores do crescimento, do metabolismo interno ou da reprodução, sendo, ainda, agentes finais da desintoxicação e da transformação simples de outras substâncias, cujo acúmulo pode ser nocivo ao vegetal (HENRIQUES; KERBER; MORENO, 2001).

O amplo espectro das atividades biológicas reportadas aos alcalóides pode ser relacionado com sua variedade estrutural (tabela 1).

Tabela 1 – Exemplo das diferentes classes de alcalóides das plantas.

Classe	Exemplo	Origem
Piperidínicos		<i>Nicotiana spp</i>
Tropânicos		<i>Atropa belladonna L</i>
Quinolínicos		<i>Cinchona spp.</i>
Isoquinolínicos		<i>Papaver somniferum L.</i>
Indólicos		<i>Pausinystalia yohimbe</i>
Classe	Exemplo	Origem
Imidazólicos		<i>Pilocarpus spp.</i>
Purínicos		<i>Camellia sinensis</i>
Aminas alcaloídicas		<i>Ephedra spp</i>

Fonte : Dicionário de Especialidades Farmacêuticas 2006/2007.

Diversos alcalóides são utilizados em terapêutica atualmente, puros (por exemplo, os alcalóides indólicos, que são sempre usados na sua forma purificada) ou em associação, e também na forma de derivados. Outros são utilizados como matéria-prima para a síntese de fármacos (SIMÕES *et al.*, 2004).

Os alcalóides do tipo indólico por sua vez, possuem grande importância econômica devido às suas atividades farmacológicas. A atividade dos alcalóides

indólicos é, geralmente, mediada pela sua interação com um ou mais receptores específicos. Podem atuar como agonistas ou antagonistas parciais nos receptores α -adrenérgicos (ioimbina), serotoninérgico (reserpina), colinérgico (atropina) e dopaminérgico (ergotamina) (SIMÕES *et al.*, 2004).

Sabe-se que plantas do gênero *Aspidosperma* são detentoras de alcalóides, principalmente do tipo indólico (JÁCOME; SOUZA; OLIVEIRA, 2003). Até 1956 eram conhecidos apenas quatro alcalóides indólicos isolados de espécies de *Aspidosperma*. Atualmente, esse número ultrapassa 100 alcalóides (PEREIRA *et al.*, 2007).

1.3 O Gênero *Aspidosperma*

Plantas da família *Apocynaceae* estão incluídas fitogeneticamente na ordem *Gentiales* e subclasse *Asteridae*, sendo consideradas como espécies dicotiledôneas bem evoluídas e caracterizadas normalmente pela presença de látex. Na flora brasileira são catalogadas como apocináceas mais de 400 espécies em 41 gêneros, sendo 32 destes encontrados apenas na Amazônia (PEREIRA *et al.*, 2007).

Na família *Apocynaceae*, as espécies do gênero *Aspidosperma* são encontradas apenas na América, principalmente entre o México e a Argentina. Além da qualidade de suas madeiras, as cascas de espécies do gênero *Aspidosperma* são usadas comumente na forma de infusões pela medicina popular da região Amazônica. A baixa toxicidade e a ausência de contra-indicações dessas infusões têm contribuído enormemente para a difusão do uso das cascas de *Aspidosperma* (WENIGER *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2004).

Como exemplos, a espécie *A. ramiflorum* é empregada no tratamento de leishmaniose (FERREIRA *et al.*, 2004). A espécie *A. nitidum* é utilizada como anticonceptiva (RIBEIRO *et al.*, 1999), no tratamento de inflamações de útero e ovário, em diabetes, em problemas estomacais, contra câncer, febre e reumatismo. Cascas de *A. nitidum*, *A. album*, *A. discolor*, *A. excelsum* e *A. polineuron* são usadas por nativos de diferentes locais da Amazônia no tratamento da malária. A atividade antimalárica atribuída a essas espécies foram comprovadas por testes *in vitro* e *in vivo* (CARVALHO *et al.*, 1991).

Cascas de *A. quebracho blanco* são usadas na região andina como afrodisíaco e contra febre. No Brasil, essa espécie é usada também em casos de enfisema, bronquite e pneumonia, bem como no tratamento de disfunção erétil, contra sintomas da hiperplasia prostática benigna e em dispnéia asmática e cardíaca (DEUTSCH *et al.*, 1994).

A família *Apocynaceae* caracteriza-se quimicamente pela ocorrência freqüente de estruturas alcalóidicas. No caso de espécies de *Aspidosperma*, há predominantemente a ocorrência de alcalóides indólicos de considerável diversidade estrutural. Segundo a literatura, alcalóides indólicos constituem bons marcadores quimiotaxonômicos para a classificação botânica das espécies de *Aspidosperma* (PEREIRA *et al.*, 2007).

Biologicamente, muitos alcalóides indólicos agem provavelmente nos sistemas neurotransmissores opiáceos, GABAérgicos, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos (RIVAS *et al.*, 1999). Por isso, são empregados largamente como hipotensor arterial, simpatolítico, diurético, vasoconstrictor periférico, estimulante respiratório, anestésico, agente bloqueador adrenérgico, espasmogênico intestinal, sedativo e relaxante do músculo esquelético (GARRET *et al.*, 1995). Além disso, são responsáveis pelos efeitos alucinógenos do tabaco, de bebidas e rapés utilizados por nativos da Amazônia, bem como pelas propriedades sedativas do maracujá (ALLEN; HOLMSTEDT, 1980).

Ensaios biológicos de muitos alcalóides monoterpênicos isolados das cascas de *A. quebracho-blanco* indicaram atividade bloqueadora α -adrenérgica e ação inibitória de contrações de músculo liso de tecidos de diferentes animais além de ação hipotensora e analgésica. Alcalóides das cascas das raízes e das folhas de *A. pyrifolium* apresentam efeito hipotensivo forte na pressão arterial. Esse efeito foi atribuído a alcalóides indólicos presentes nos extratos dessa espécie (CRAVEIRO; MATOS; SERUR, 1983).

Muitos alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* apresentam efeitos mutagênicos em *Salmonella typhimurium*, em culturas de células mamárias e em células pulmonares, além de efeitos inibitórios sobre monoamino oxidase em tecido animal, crescimento e mitose de fibroblastos cardíacos (NUNES *et al.*, 1992). A atividade desses alcalóides em células de eucariontes e procariontes tem sido atribuída à sua capacidade de intercalação quando interagem com o DNA. Outros alcalóides são parasitocidas e apresentam citotoxicidade em células

cancerosas. Testes contra a doença de Chagas mostram que esses alcalóides são ativos contra epimastigotos de *Trypanosoma cruzi* (PICADA *et al.*, 1997; RIVAS *et al.*, 1999).

1.4 *Aspidosperma ulei* Markgf

De acordo com Braga (1979), *Aspidosperma ulei* Markgf, popularmente conhecida como Pitiá, apresenta-se como uma “árvore com casca áspera e acinzentada. Folhas alternas, pecioladas, lanceoladas, glabras. Flores alvacentas, pequenas, agrupadas em panículas multifloras terminais. Frutos capsulares, coriáceos, com sementes achatadas e aladas.” (figura 1).

A**B****C**

Figura 1 - *Aspidosperma ulei* Markgf. (A) árvores, (B) frutos e (C) flores.

Fotos: Prof. Edilberto R. Silveira.

Em um artigo publicado em 1954, Banerjee e Lewis utilizaram uma solução de alcalóides extraídos do caule de *Aspidosperma ulei* e os resultados encontrados foram os seguintes:

1. Diminuição do efeito espasmogênico da acetilcolina no íleo e útero de ratas e cobaias e no duodeno de coelhos e redução do efeito espasmogênico da histamina no íleo e útero de ratas e cobaias;
2. Antagonismo do efeito espasmogênico da adrenalina no útero de coelhas;
3. Diminuição dos batimentos cardíacos em coração isolado de coelho e vasoconstrição em ratos;
4. Efeito estimulante central:
 - Aumento da temperatura retal em camundongos
 - Convulsões tônicas seguidas de morte em camundongos
 - “Scratching” das patas traseiras, salivação e lacrimejamento em coelhos.
5. Atividade amebicida.

Outros dois trabalhos de Schmutz, Hunziker e Hirt (1957) e Lehner e Schmutz (1961), utilizando a casca da raiz de *Aspidosperma ulei*, mostraram a presença dos alcalóides uleína, 1,2-dihidro-olivacina e 1,2-dihidro-elipticina. A uleína tem atividade tripanomiscida (ABREU E SILVA *et al.*, 2002) e interfere na contratilidade da musculatura lisa vascular e não vascular e na contração induzida pelo cálcio em útero e em aorta, aparentemente por uma ação direta sobre os canais de cálcio (SOARES *et al.*, 2004).

Apesar de a uleína ser o marcador da *Aspidosperma ulei*, este alcalóide não é exclusivo desta espécie; existem relatos da presença da uleína nas espécies *A. australe*, *A. campus-belus*, *A. desamnthum*, *A. excelsum*, *A. eburneum*, *A. gomesianum*, *A. formosamum*, *A. multiflorum*, *A. olivaceum*, *A. parvifolium*, *A. pyricollum*, *A. subcanum*, *A. tomentosum*, *Alstonia scholaris*, *Alstonia undulifolia*, *Himatanthus lancifolius*, *Plumeiai lancifolia* (GARCIA RUBEN; BROWN JR., 1976; FRANÇA; BROWN; SANTOS, 2000; ABREU E SILVA *et al.*, 2002; MASSIOT *et al.*, 1992; JÁCOME; SOUZA; OLIVEIRA, 2003; SOARES *et al.*, 2004; MACABEO *et al.*, 2005).

O estudo de uma fração rica em alcalóides (SF₃₋₅) (figura 2) das cascas da raiz de *A. ulei* demonstrou um efeito pró-erétil em camundongos (CAMPOS *et al.*, 2006). O resultado desse estudo aponta que SF₃₋₅ facilita a ereção peniana de camundongos possivelmente através da modulação central de dopamina e de um bloqueio de receptores α_2 pré-sinápticos, com um subsequente aumento na liberação de óxido nítrico nos nervos e artérias penianas. Esse estudo comprovou o uso tradicional de extratos de *Aspidosperma* em disfunção erétil.

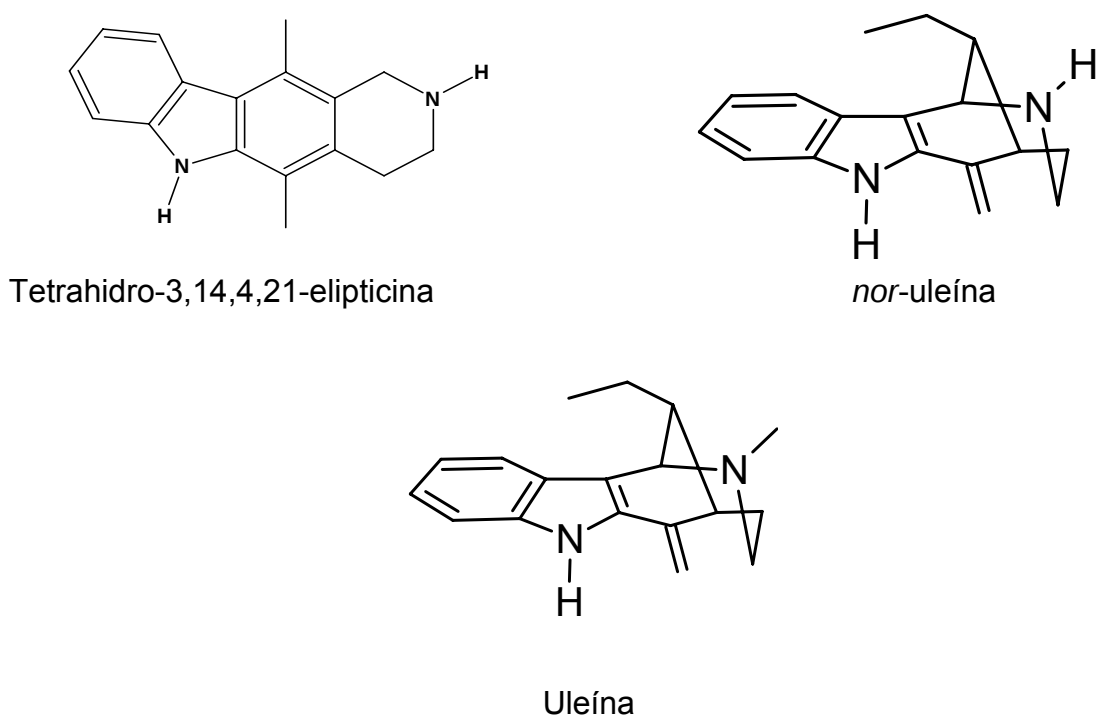


Figura 2 - Alcalóides presentes na fração (F(3-5)) extraída das cascas da raiz de *A. ulei*.

Campos *et al.* (2007) verificaram o possível efeito relaxante de (F(3-5)) em tiras de corpos cavernosos isoladas de coelhos pré-contraídas com solução de potássio (K^+ 60 mM), prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$ $10^{-3}M$), e fenilefrina (10 μM). A fração SF₃₋₅ (1 - 300 $\mu g/ml$) relaxou tiras de corpos cavernosos de forma dose-dependente e de modo reversível. Esse efeito relaxante não foi afetado na presença de atropina, L-NAME, ODQ e em preparações pré-incubadas com tetrodotoxina, apamina,

caribdotoxina e glibenclamida. Os autores discutem que o efeito relaxante dessa fração possa estar relacionado pelo menos em parte a um bloqueio do influxo de cálcio ou de sua função.

Estudos recentes mostraram uma atividade pró-eretil de um alcalóide indólico isolado das cascas do caule de *Aspidosperma ulei* - 17-nor-subincanadina E (SEC). Neste experimento a clonidina (100 µg/kg/i.p), uma droga agonista dos receptores α_2 , inibiu as ereções induzidas por SEC (25 mg/kg/i.p.), mostrando que SEC pode estar atuando através do sistema noradrenérgico. O haloperidol (2 mg/kg/i.p) não induziu nenhuma resposta sexual nos camundongos. Os dados obtidos após o tratamento combinado com SEC revelaram que o haloperidol, um antagonista dopaminérgico não seletivo, inibe as ereções induzidas por SEC. Baseado nos dados mencionados os autores sugeriram que o sistema dopaminérgico pode ser responsável pela expressão do comportamento sexual induzido por SEC em camundongos (CAMPOS *et al.*, 2007).

Nesse mesmo estudo, a injeção intraperitoneal do alcalóide (25 mg/kg/i.p.) mostrou resultados semelhantes à ioimbina (2 mg/Kg). Uma vez que a ioimbina atua tanto no sistema noradrenérgico como dopaminérgico (RODRÍGUEZ-MANZO, 1999) é provável que SEC possua as mesmas ações, por também se tratar de um alcalóide indólico. Além disso, os agonistas dopaminérgicos aumentam a atividade da NO sintase e sabe-se que o NO participa na condução de importantes sinais intra e extracelulares da função erétil (HEATON, 2000). Considerando isto, foi utilizado um inibidor da NO sintase (L-NAME – 10 mg/kg/i.p), e verificou-se uma diminuição da atividade de SEC.

Sendo assim, de acordo com os resultados obtidos no estudo anteriormnte descrito, constatou-se que SEC induz ereção peniana em camundongos e que os sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e nitrérgico podem estar envolvidos nesta ação.

Pelo exposto, verifica-se que os estudos *in vitro* e *in vivo* sobre a atividade das drogas na musculatura lisa cavernosa requerem conhecimentos dos mecanismos envolvidos na contração e relaxamento muscular. Sendo assim, os próximos itens destinam-se a descrever tais mecanismos, e a fisiologia do músculo liso.

1.5 Fisiologia do músculo liso

As células musculares não estriadas ou lisas são um dos principais componentes das vias aéreas, vasculatura, canal alimentar, trato urogenital e outros sistemas. O músculo liso deve desenvolver força ou se encurtar para gerar motilidade ou para alterar as dimensões de um órgão. O músculo liso também deve ser capaz de realizar contrações econômicas (isto é, consumindo o mínimo de trifosfato de adenosina, ATP), sustentadas ou tônicas, para manter as dimensões dos órgãos contra as cargas impostas. Por exemplo, os vasos sanguíneos devem ser capazes de resistir à pressão arterial. Em órgãos ocos, as células dos músculos lisos são mecanicamente acopladas, o que lhes permite funcionar de um modo altamente coordenado (BERNE; LEVY, 2004).

O músculo liso é uma estrutura de grande importância para os profissionais da área de saúde uma vez que seu comportamento anormal participa de uma gama de enfermidades como hipertensão, aterosclerose, coronariopatia, asma, distúrbios intestinais, disfunção erétil, entre outras (MURPHY; BRAYDEN, 1995).

A atividade contrátil do músculo liso cavernoso, vascular, traqueal e intestinal pode ser alterada por um grande número de compostos orgânicos, que podem ser estimulantes ou relaxantes. Produtos naturais também são potencialmente ativos em processos celulares alterando a conformação de canais iônicos, interferindo em mecanismos de transdução ativados por proteína G ou mesmo funcionando como bloqueadores de canais (DRUMOND; HUGES, 1987).

A membrana da célula muscular lisa contém muitos tipos diferentes de proteínas receptoras que podem iniciar ou inibir o processo contrátil (KNOT *et al.*, 1996). Dessa forma, o músculo liso pode ser ativado por múltiplos tipos de sinais: por sinais nervosos, por estimulação hormonal ou por estiramento do músculo (KOTECHA; NEILD, 1995; MEISS, 1989; SATO, 1994; NIXON; MIGNERI; SOMLYO, 1994).

O controle nervoso dos músculos lisos é feito pelo sistema nervoso autônomo. As divisões simpáticas e parassimpáticas apresentam diferenças anatômicas, farmacológicas e funcionais. Estas divisões, frequentemente antagônicas, funcionam integradamente para a manutenção da constância do meio interno, ou seja, da homeostase (LIVINGSTON, 1991). No que diz respeito às

diferenças funcionais, o mediador neuromuscular no simpático é principalmente a noradrenalina e no parassimpático a acetilcolina (ZHANG; LANG, 1994).

Um exemplo do controle do músculo liso pelo sistema parassimpático é o trato respiratório, que recebe inervação colinérgica parassimpática através do nervo vago, que quando estimulado produz uma rápida broncoconstrição, que é bloqueada pela atropina. Apesar de existir uma grande população de receptores muscarínicos nas vias aéreas, estudos *in vitro* demonstram claramente que os receptores M_3 atuam de maneira importante na resposta contrátil desse tecido (WHITE, 1995).

Em músculo liso existem evidências da participação de uma outra via neuronal que não é de natureza adrenérgica e nem colinérgica. Foi proposto que o óxido nítrico (NO) atua como um neurotransmissor não-adrenérgico não-colinérgico (NANC) das fibras nervosas pós-ganglionares parassimpáticas, innervando uma variedade de músculos lisos incluindo os corpos cavernosos e o músculo liso vascular (TODA; AYAJIKI; OKAMURA, 2005). A descoberta da inervação nitrérgica das células do músculo liso vascular tem revelado um novo entendimento do controle neurogênico na função desse músculo. O sistema de transdução de sinais que promove o relaxamento do músculo liso vascular é produzido sistema nitrérgico através ativação da guanilato ciclase, com a conseqüente produção de GMPc (SCHMIDT *et al.*, 1993).

O acoplamento excitação-contração no músculo liso pode ser de dois tipos: eletromecânico e farmacomecânico. No primeiro caso (eletromecânico) a contração se origina em decorrência da despolarização da membrana, e no segundo (farmacomecânico) ocorre através da estimulação por fármacos, neurotransmissores, autacóides e hormônios receptores de membrana, sem que haja alterações no potencial de membrana (E_m) ou necessitando-as em valores muito baixos (REMBOLD, 1996). O desencadeamento da contração pode ocorrer pela combinação dos dois mecanismos (SOMLYO; SOMLYO, 1968; RASSMUNSEN *et al.*, 1987).

No acoplamento eletromecânico, a regulação da força de contração depende do E_m . A despolarização da membrana ativa canais de cálcio tipo L, dependentes de voltagem, com conseqüente aumento no influxo de cálcio. O aumento na concentração de cálcio intracelular leva à contração. A hiperpolarização desativa estes canais, diminui o influxo de cálcio e leva ao relaxamento muscular (REMBOLD, 1996).

A despolarização da membrana pode ocorrer tanto diretamente – por estimulação elétrica ou pelo aumento na concentração extracelular de potássio (HERMSMEYER; STUREK; RUSCH, 1988) – como indiretamente, por ação de um agonista (CHEN; REMBOLD, 1995).

O acoplamento farmacomecânico refere-se à regulação da força de contração independente da mudança no potencial transmembrana. Envolve alterações na concentração de cálcio intracelular e na força de contração (além daquela induzida pela despolarização) ou na resposta celular ao cálcio. No acoplamento farmacomecânico, a alteração na concentração de cálcio intracelular pode ocorrer tanto por liberação de cálcio como por influxo de cálcio mediados por receptor (REMBOLD; WEAVER; LINDEN, 1991; MAJERUS, 1992; LEE; AARHUS, 1993; EXTON, 1994; REMBOLD, 1996).

Norepinefrina (HAEUSLER; DE PEYER, 1989; NELSON *et al.*, 1988; NEILD; KOTTECHA, 1987), histamina (DROOGMANS; RAEYMAEKERS; CASTEELS, 1977; CASTEELS; SUZUKI, 1980; KEEF; ROSS, 1986; KEEF; BOWEN, 1989), 5-hidroxitriptamina (NEILD; KOTTECHA, 1987) e endotelina (McPHERSON; AGNUS, 1991) despolarizam a célula do músculo liso e, conseqüentemente, ativam canais de cálcio tipo L. A ativação desses canais aumenta o influxo de Ca^{++} , o que leva à contração.

Na contração induzida por agonistas farmacológicos parece existir pouco envolvimento do Ca^{++} extracelular para iniciar a contração. Ações de tais agonistas dependem mais do Ca^{++} liberado de estoques intracelulares, pelo mecanismo de liberação de cálcio induzida por cálcio e também pela produção de IP_3 (SOMLYO, 1985; HAROOTUNIAN *et al.*, 1991; VALDIVIA *et al.*, 1992; MISSIAEN *et al.*, 1992; ROJAS *et al.*, 1992; NOGUEIRA; D'OCÓN, 1993; STORK; COCKS, 1994). Esses agonistas farmacológicos podem também aumentar diretamente a condutância através de canais de Ca^{++} tipo L sem alterações no potencial de membrana (NELSON *et al.*, 1988).

Estudo em cultura de células musculares lisas de traquéia de uma variedade de espécies têm demonstrado que bradicinina, carbacol e histamina, induzem uma hidrólise dos fosfolípidios da membrana e a geração de inositol-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG), alterando as concentrações intracelulares de cálcio. Esse aumento nas concentrações intracelulares de cálcio desenvolve um papel fundamental na contração muscular observada *in vitro* (AMRANI *et al.*, 1995).

Em preparações musculares lisas intestinais, a ativação de receptores muscarínicos geralmente produz contração *in vitro*. A estimulação com carbachol, por exemplo, produz uma contração inicialmente fásica, seguida por um componente tônico, ambos reduzidos por nifedipina ou pela retirada de cálcio extracelular (OHTA, 1991). Estudos em estimulação nervosa colinérgica mostram que, no músculo liso intestinal, a resposta obtida é um aumento na condutância do sódio e do cálcio, promovendo despolarização e aumentos na descarga de potenciais de ação (HOYLE; BURNSTOCK, 1989).

No músculo liso intestinal, bem como em outros tipos de músculo liso, os adrenoceptores são membros de uma família de receptores acoplados a proteínas G intermediárias de sistemas efetores (SCHWINN, 1993). A norepinefrina atua na supressão da liberação de acetilcolina de fibras nervosas colinérgicas pela ativação dos receptores α_2 , podendo também atuar através da hiperpolarização e diminuição da atividade elétrica espontânea (BULBRING; TOMITA, 1987).

Seja no acoplamento eletromecânico ou farmacomecânico, o mediador final é geralmente um aumento da concentração de Ca^{++} no citoplasma, o qual é necessário para fosforilação das cadeias leves de miosina que desencadeará o processo contrátil. A elevação da concentração intracelular de cálcio $[\text{Ca}^{++}]_i$ pode ser produzida pelos seguintes eventos: (1) Influxo de Ca^{++} através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (canais lentos ou canais tipo L e canais rápidos ou canais tipo T); (2) Liberação do Ca^{++} existente em estoques intracelulares (retículo sarcoplasmático), induzida pelo cálcio ou pelo inositol trifosfato (IP_3) ou ambos; (3) Troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ operando de maneira reversa; (4) Inibição da bomba de $\text{Ca}^{++}\text{ATPase}$; (5) Entrada de cálcio operada por receptor (SPERELAKIS, 1993; PACAUD; LOIRAND, 1995).

Estabelecida uma contração, o relaxamento das células musculares lisas pode acontecer por vários tipos de processos que, na maior parte dos casos, passa por redução da $[\text{Ca}^{++}]_i$. Nas células musculares lisas, a liberação de óxido nítrico (NO) dos nervos e do endotélio inicia uma cascata de sinalização, pela qual a ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) eleva os níveis de GMPc, que por sua vez pode interagir com proteínas efetoras como: canais iônicos, fosfodiesterases e proteínas quinases. Esse mecanismo está bem estabelecido em células da musculatura lisa cavernosa (ÜCKERT *et al.*, 2004).

A redução na $[Ca^{2+}]$ citoplasmática mediada pelo GMPc pode ser produzida por alguns mecanismos como: abertura de canais de K^+ , que causa hiperpolarização da célula e posterior diminuição do influxo de Ca^{2+} pelos canais tipo-L (THORNBURY *et al.*, 1991; ROBERTSON *et al.*, 1993); diminuição direta do influxo de Ca^{2+} através de canais do tipo-L independente da alteração no potencial da membrana (E_m) como os efeitos do 8-bromo-GMPc em células musculares vasculares (ISHIKAWA; HUME; KEEF, 1993); ativação da bomba Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático e da membrana plasmática, dependentes de GMPc com conseqüente diminuição do Ca^{2+} livre no citoplasma (POPESCU *et al.*, 1985; TWORT; VAN BREEMEN, 1988); aumento da atividade trocadora Na^+/Ca^{2+} (ITOH; KURIYAMA; UENO, 1983).

Dessa forma, substâncias que aumentam as concentrações de GMPc relaxam o músculo liso por uma redução da $[Ca^{2+}]_i$ em células isoladas e tecidos intactos (RAPOPORT *et al.*, 1985; KARAKI *et al.*, 1988; WORD *et al.*, 1991; MCDANIEL *et al.*, 1992).

Também pode ocorrer relaxamento muscular liso por hiperpolarização celular devida a aumento da probabilidade de abertura de canais K_{Ca} e K_{ATP} mediada por aumento da concentração de AMPc (ANWER *et al.*, 1992; QUAYLE *et al.*, 1994). Entretanto, assim como o GMPc, o AMPc também pode ser considerado capaz de diminuir a $[Ca^{2+}]_i$ por diminuição do influxo de Ca^{2+} , apresentando efeitos diretos sobre os canais de Ca^{2+} do tipo-L (REMBOLD, 1996). O mecanismo primário para a diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ provocada pela elevação do AMPc é a ativação da proteína quinase G (GMPc-dependente) (LINCOLN *et al.*, 1990).

Outra ação do AMPc pode ser a diminuição da sensibilidade ao Ca^{2+} intracelular. A ativação de proteínas-quinases dependentes de AMPc produz fosforilação da quinase de cadeia leve da miosina em determinados sítios *in vitro* e isso pode diminuir sua sensibilidade ao cálcio.

Embora o mecanismo mais aceito para a regulação da contração de músculo liso seja o da ativação da quinase da cadeia leve de miosina dependente de $[Ca^{++}]_i$ (HARTSHORNE, 1987; RASMUSSEN; TAKUWA; PARK, 1987), evidências sugerem que a regulação entre $[Ca^{++}]_i$ e a fosforilação da cadeia leve de miosina é variável e depende da forma de estimulação (REMBOLD, 1990, 1992; TANG *et al.*, 1992). A dependência relativa da fosforilação da cadeia leve da miosina da $[Ca^{++}]_i$ foi chamada de sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{++} . Esta

sensibilidade é alta quando um aumento relativamente pequeno na $[Ca^{++}]_i$ induz um grande aumento na fosforilação da miosina. Inversamente, a sensibilidade é baixa quando um aumento relativamente grande na $[Ca^{++}]_i$ induz um pequeno aumento na fosforilação da miosina (KITAZAWA; SOMLYO, 1990; HIMPENS; STULL *et al.*, 1990; OZAKI *et al.*, 1991; HIMPENS; MISSIAEN; CASTEELS, 1995).

1.6 O Tecido erétil

O tecido erétil dos corpos cavernosos é composto por inúmeros espaços lacunares interconectados, revestidos por células endoteliais, além de trabéculas, que formam as paredes das lacunas e consistem em bandas espessas de músculo liso e uma estrutura formada por fibroblastos, colágeno e elastina (KRANE; GOLDSTEIN; SAENZ DE TEJADA, 1989). Os corpos cavernosos são divididos por um septo perfurado, que os permite funcionar como uma unidade.

A ereção desejada inicia-se por um estímulo psíquico e uma resposta neurológica que irá mediar uma série de alterações vasculares. O estado de flacidez peniana corresponde um momento de contração de sua musculatura lisa, que opõe resistência à entrada de fluxo de sangue arterial nas cavernas; quando esta contração desaparece, o fluxo arterial aumenta e surge a ereção. No tecido erétil, um balanço entre os fatores contráteis e relaxantes controla o grau do tônus da vasculatura e do músculo liso dos corpos cavernosos e determina o estado funcional do pênis: detumescência e flacidez, tumescência e ereção (CANOGIA, 1992).

A presença e distribuição das fibras noradrenérgicas na vasculatura peniana (artérias e veias) e músculo cavernoso foi descrita em vários estudos (BENSON *et al.*, 1980). Os receptores α_1 noradrenérgicos estão localizados na membrana pós-sináptica e são responsáveis pelo efeito contrátil da noradrenalina (NA) no tecido erétil, já os receptores α_2 estão localizados na membrana pré-sináptica nas terminações nervosas noradrenérgicas e inibem a função noradrenérgica (DHABUWALA; RAMAKRISHNA; ANDERSSON, 1985).

Além da inervação noradrenérgica, todos os tecidos penianos de animais e humanos recebem uma rica inervação colinérgica (DAIL, 1993; HEDLUND; ALM; ANDERSSON, 1999; HEDLUND *et al.*, 2000). A acetilcolina (Ach) liberada desses nervos atua em receptores muscarínicos localizados no músculo liso cavernoso e endotélio (TRAISH *et al.*, 1995). O receptor muscarínico existente no músculo liso

cavernoso é o subtipo M₂ (TOSELLI; MORELAND; TRAISH, 1994; TRAISH *et al.*, 1995).

Furchgott e Zawadski (1980) relataram que a Ach relaxava leitos vasculares apenas na vigência de um endotélio íntegro, sugerindo que essas células produziam uma substância responsável pela resposta inibitória evocada pela Ach, através de receptores M₃ localizados no endotélio. Essa substância foi denominada de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Estudos subseqüentes revelaram que o EDRF era química e farmacologicamente indistinguível do NO (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987; IGNARRO *et al.*, 1987a, 1987b).

Um importante papel para o NO no relaxamento dos corpos cavernosos e na vasculatura é largamente aceito (BURNETT, 1997; TODA; AYAJIKI; OKAMURA, 2005). O NO pode ser produzido pelo endotélio e/ou pela inervação NANC dos corpos cavernosos.

Existe um consenso de que o NO é um pré-requisito para a geração e manutenção da pressão intracavernosa e da ereção peniana. A síntese de NO e a conseqüente ligação do NO à guanilil ciclase (GC) é essencial para o processo erétil. (ANDERSSON, 2001).

Estudos revelaram que a infusão de inibidores da NOS em ratos antagoniza a ereção peniana induzida pela estimulação elétrica das terminações NANC do músculo liso trabecular cavernoso (ANDERSSON; WAGNER, 1995). Os inibidores da GC também inibem o relaxamento dos corpos cavernosos induzido por estimulação elétrica, bem como por ACh ou por doadores de NO, confirmando a via do GMPc no mecanismo de relaxamento do corpo cavernoso (IGNARRO *et al.*, 1990; PICKARD; POWELL; ZAR, 1991; KIM *et al.*, 1991; HOLMQUIST; HEDLUND; ANDERSON, 1992; HAYASHIDA *et al.*, 1996; RECIO *et al.*, 1998; HEDLUND; ALM; ANDERSSON, 1999).

A figura abaixo resume os mecanismos envolvidos no controle da ereção e os possíveis locais de ação de drogas pró-eréteis.

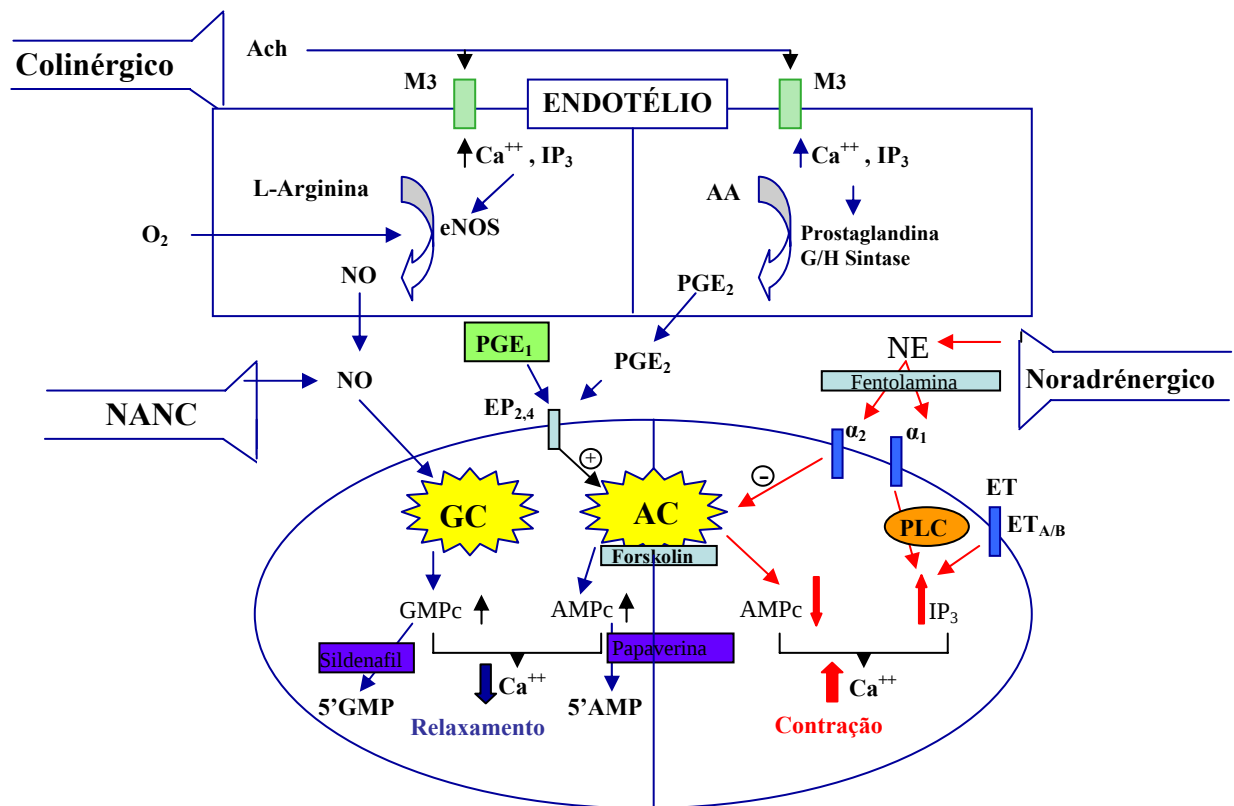


Figura 3 - Mecanismo periférico envolvendo ereção e detumescência. Esquema conceitual envolvendo mecanismos de regulação do tônus da musculatura lisa cavernosa, bem como o mecanismo de ação do tratamento farmacológico da disfunção erétil. AC – adenilato ciclase, AA – ácido araquidônico, eNOS – óxido nítrico sintase endotelial, NO – óxido nítrico, GC – Guanilato ciclase, L-Arg – L-arginina, IP_3 – Inositol trifosfato, PLC – Fosfolipase C.

1.7 Disfunção erétil

Segundo o Instituto Nacional de Saúde Norte-Americano, a disfunção erétil (DE) é conceituada como a incapacidade persistente de obter ou manter uma ereção adequada para permitir uma relação sexual satisfatória, é, portanto, diferente de perda da libido, ejaculação precoce ou ausência de orgasmo (NIH, 1993). Estima-se que, em âmbito mundial, aproximadamente 100 milhões de homens apresentem DE. No Brasil, estima-se que 11 milhões de homens sofram de algum grau de DE (GONÇALVES *et al.*, 2007).

Estudos populacionais como o *Massachusetts Male Aging Study*, utilizando questionários para avaliação da qualidade da ereção, demonstram um aumento da incidência de DE relacionado com a faixa etária (CHAPPELL *et al.*, 1998). Um estudo de coorte de base populacional realizado na cidade de Salvador comprovou que a incidência de DE aumenta com a idade, variando de 33 novos casos por ano por 1.000 homens entre 40 e 49 anos a até 190 novos casos por ano para cada grupo de 1.000 homens com idade entre 60 e 69 anos. Fazendo-se uma projeção desses dados, estima-se a ocorrência anual de aproximadamente 1.025.600 novos casos de DE em todo o Brasil (FERREIRA; SANTOS, 2005).

Quando o óxido nítrico passou a ser reconhecido como mediador da ereção, em 1992, um considerável número de pesquisas voltou-se para o entendimento dos mecanismos dessa patologia e um grande número de publicações foi realizado nesse campo. Concomitante com a evidência científica, uma grande campanha tem sido lançada nos últimos anos para chamar a atenção do homem para a importância do seu bem estar sexual (CIRINO *et al.*, 2005).

A causa da disfunção erétil masculina é classificada com frequência como psicológica ou orgânica. A etiologia orgânica, o maior grupo, compreende os casos de origem vascular, neurológica ou hormonal (MILLER, 2000). Neste, há que se incluir a DE por anormalidades ou lesões que compreendem o músculo liso cavernoso. A de causa psicológica ocorre por inibição central do mecanismo de ereção, sem que haja um componente físico definido (MELMAN, 1999).

Recentemente, os inibidores seletivos para fosfodiesterase 5, sildenafil, tadalafil e vardenafil tornaram-se a opção de tratamento para a disfunção erétil, mas o uso dessas drogas apresenta contra-indicações, como a administração

concomitante de nitratos ou de bloqueadores α -adrenérgicos. Além disso, existem relatos de distúrbios visuais e cardiovasculares não desejados, presumivelmente devido à expressão diferencial de enzimas fosfodiesterase em vários tecidos, e à seletividade dessas enzimas.

Portanto, formas alternativas de tratamento médico permanecem clinicamente interessantes, incluindo extrato de plantas, que muitos pacientes preferem como modalidade de tratamento.

A pesquisa por produtos naturais pode freqüentemente dar contribuições substanciais para inovação das drogas, uma vez que provê novas estruturas químicas e/ou mecanismos de ação. Muitos extratos de plantas são tradicionalmente empregados em diferentes culturas para melhorar a performance sexual. Existem evidências de que alguns alcalóides derivados de plantas tais como papaverina, apomorfina, berberina e ioimbina podem ser úteis para a impotência e a disfunção erétil. Recentemente, atividade pró-erétil de substâncias presentes nas espécies do gênero *Aspidosperma*, estes estudos dão suporte ao uso tradicional do gênero *aspidosperma* para o tratamento da disfunção erétil.

2 JUSTIFICATIVAS

Há um crescente interesse das diferentes especialidades médicas pelo uso cada vez maior de produtos de origem natural; sendo assim, a introdução de substâncias naturais com atividade pró-eretil vem se tornando cada vez mais relevante, pela facilidade com a qual podem ser encontradas e principalmente pelo baixo custo quando comparadas aos medicamentos atualmente prescritos.

Estudos iniciais com frações ricas em alcalóides da planta *Aspidosperma ulei* Markgf têm se mostrado promissores no relaxamento da musculatura lisa peniana. O presente estudo teve como objetivo geral a investigação do efeito relaxante sobre musculatura lisa de 17-*nor*-subincanadina E (SEC), um alcalóide indólico isolado das cascas do caule de *Aspidosperma ulei* Markgf.

3 OBJETIVOS

1. Avaliar o efeito de SEC em diferentes tipos de tecido muscular liso corpo cavernoso, aorta, traquéia e duodeno *in vitro*;
2. Verificar o possível efeito relaxante de SEC sobre a musculatura lisa cavernosa de coelhos *in vitro* pré-contraídos com fenilefrina ou potássio;
3. Elucidar o envolvimento dos sistemas adrenérgico, colinérgico e nitrérgico, bem como o envolvimento dos canais de potássio e cálcio na ação da droga.
4. Determinar os níveis de nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc.

4 MATERIAIS

4.1 Animais

Foram utilizados coelhos Nova Zelândia, pesando entre 2,0 – 3,0 kg, obtidos no setor de Cunicultura do curso de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. Os procedimentos obedeceram aos padrões e critérios da Comissão de Ética em pesquisa animal da Universidade Federal do Ceará, sob protocolo N° 39/04 (Anexo A).

4.2 Aparelhos e instrumentos laboratoriais

Produto	Origem
Agitadores magnéticos	Fanem, Brasil
Agulhas descartáveis	BD, Brasil
Balança analítica	Marte AL 200, Brasil
Balança para pesagem de animais	Filizola, Brasil
Banho Maria	Quimis, Brasil
Bomba para aeração	Rebello & Ferreira, Brasil
Cronômetros	Technos, Brasil
Material cirúrgico	Edlo, Brasil
PHmêtro	Alalion-MP 608, Brasil
Pipetas automáticas	Jencons , UK
Pipetas Pasteur	Unilab, Brasil
Ponteiras plásticas para pipetas	Unilab, Brasil
Polígrafo	Ugo Basile, EUA
Seringas descartáveis	BD, Brasil
Transdutores isométricos	Ugo Basile, Varese Itália
Vidrarias	Vidrolabor, Brasil

4.3 Drogas e reagentes

Produto	Origem
Acetilcolina	Sigma, EUA
Apamina	Sigma, EUA
Bicarbonato de sódio	Vetec, Brasil
Cloreto de cálcio	Vetec, Brasil
Cloreto de cálcio hexahidratado	Vetec, Brasil
Cloreto de magnésio Hexahidratado	Quimex, Brasil
Cloreto de potássio	Vetec, Brasil
Cloreto de sódio	Vetec, Brasil
Fenilefrina	Sigma, EUA
Fentolamina	Sigma, EUA
Forskolina	Sigma, EUA
Fosfato de sódio dibásico	Synth, Brasil
Glibenclamida	Sigma, EUA
Glicose	Vetec, Brasil
Guanetidina	Sigma, EUA
Iberiotoxina	Prof. Gerhard Malnic
Indometacina	Prodome, Brasil
L-NAME	Sigma, EUA
ODQ	Sigma, EUA
SEC	UFC, Brasil
Sulfato de magnésio	Quimex, Brasil
Sulfato de sódio	Vetec, Brasil
Tiopental Sódico	Cristália, Brasil

4.4 Soluções

As seguintes soluções foram preparadas com sais de pureza analítica:

- Krebs-Henseleit

Composição em mmol/L: NaCl 120; KCl 4,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 1,43; NaHCO₃ 25,0; KH₂PO₄ 1,17 e Glicose 11.

- Krebs-Henseleit sem Ca⁺⁺

Composição em mmol/L: NaCl 120; KCl 4,7; MgCl₂ 1,43; NaHCO₃ 25,0; KH₂PO₄ 1,17 e Glicose 11.

- Krebs-Henseleit despolarizante (K⁺ 40mM)

Composição em mmol/L: NaCl 120; KCl 40; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 1,43; NaHCO₃ 25,0; KH₂PO₄ 1,17 e Glicose 11.

- Carbogênio

Mistura gasosa de CO₂ a 5% e O₂ a 95%.

5 MÉTODOS

5.1 Isolamento de 17-*nor*-subincanadina E (SEC)

A planta, conhecida como pitiá, foi coletada pelo professor Edilberto Rocha Silveira (Departamento de Química Orgânica e Inorgânica – UFC) na localidade de Garapa em Acarape no Estado do Ceará. A espécie foi identificada no Herbário Prisco Bezerra da UFC e catalogada (exsicata nº 30823).

O isolamento de 17-*nor*-subincanadina E (SEC) foi realizado no laboratório de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, que se encontra sob supervisão do professor Edilberto Rocha Silveira.

Quatro quilos das cascas do caule de *Aspidosperma ulei* foram extraídos, por maceração, com 10 L de etanol por 24 horas. A extração foi repetida 3 vezes e as soluções etanólicas foram evaporadas a pressão reduzida e reunidas, fornecendo o extrato denominado ApCCE (435,32 g, 10,88 %).

Aproximadamente 20 gramas (20,7g) de ApCCE foram suspensos em 200mL de HCl 2M e colocados sob agitação por 30 min. A suspensão foi filtrada em funil de Bücher sob vácuo e extraída com CH₂Cl₂ (3 x 200 mL cada). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e rotaevaporado, fornecendo 776,9 mg de uma fração denominada ApCCE-A.

À fase aquosa ácida foi adicionado NH₄OH até alcançar pH 9, observado em papel de pH. A solução foi filtrada em papel de filtro, extraída com CH₂Cl₂ (3 x 200 mL cada) e seca com Na₂SO₄ anidro e rotaevaporado, fornecendo 781,8 mg de uma fração denominada APCCE-B.

ApCCE-A (350 mg) foi adsorvido em 500 mg de gel de sílica e acondicionado em uma coluna de vidro (⊙ = 2,5 cm) contendo 2,5 g de gel de sílica. Obtiveram-se 10 frações após a eluição com uma mistura de CH₂Cl₂/MeOH (100 : 0 a 98 : 2).

A fração 10 (153,0 mg) foi adsorvida em 500 mg de gel de sílica e acondicionada em uma coluna de vidro (⊙ = 2,5 cm) contendo 2,5 g de gel de sílica. Obtiveram-se 3 subfrações após a eluição com uma mistura de CH₂Cl₂:CH₃OH (98 : 2 a 94 : 6).

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico (sub-fração 10/2) da casca da raiz de *Aspidosperma ulei* permitiu o isolamento de um sólido claro, de ponto de fusão 229,1-230,4°C , denominado AU-8.

AU-8 apresentou-se como um alcalóide através de ressonância magnética nuclear (RMN). Dados de RMN mostraram que AU-8 tratava-se de 17-*nor*-subincanadina E, posteriormente chamado de SEC (figura 4).

A figura 5 ilustra o processo de obtenção do alcalóide.

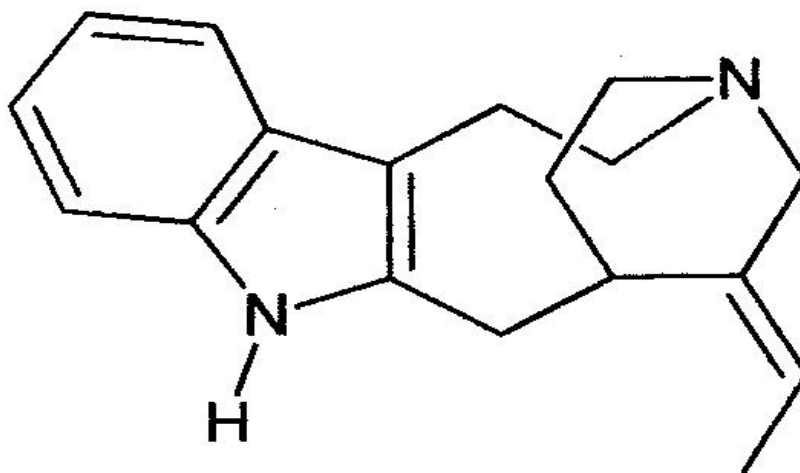


Figura 4 - SEC (17-*nor*-subincanadina E)

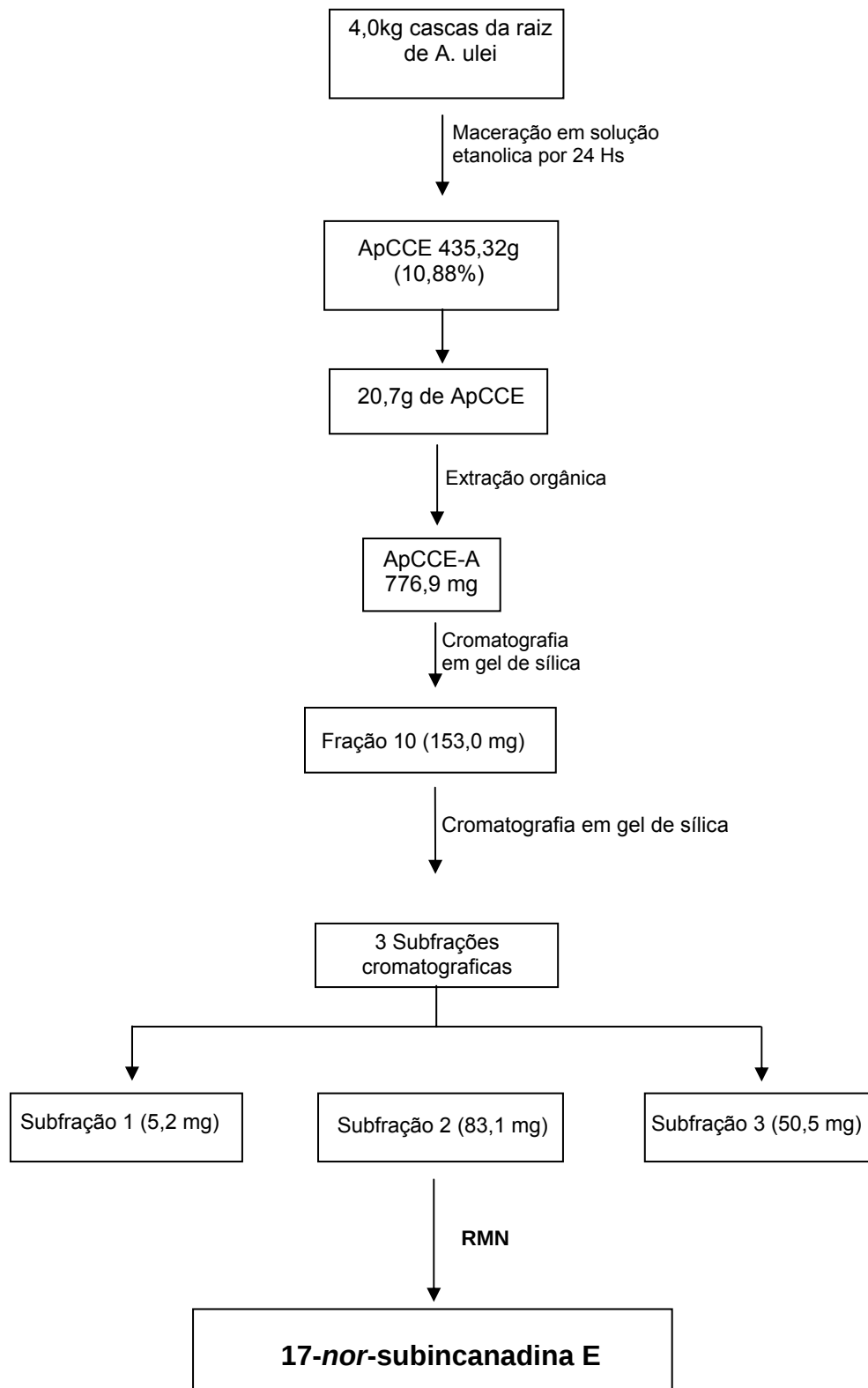


Figura 5 - Isolamento de SEC (17-nor-subincanadina E)

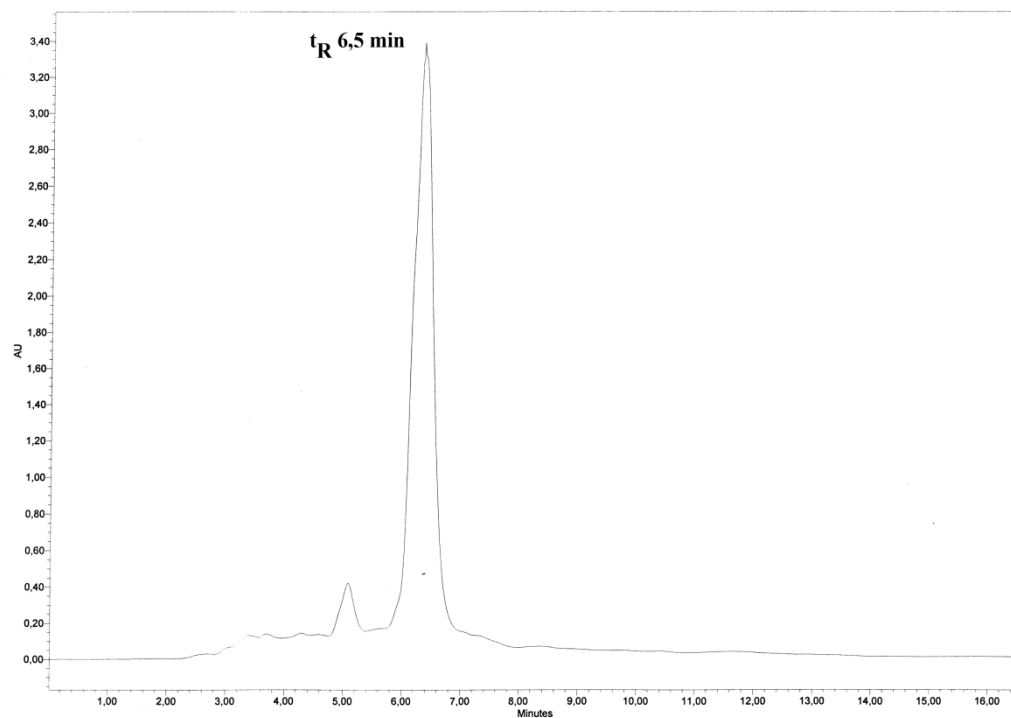


Figura 6 - Cromatograma de SEC obtido a partir da fração 10/2.

5.2. Efeito de SEC sobre a musculatura lisa de coelhos

Foram utilizados coelhos machos New Zeland adultos (2 - 3 kg). Após injeção com tiopental sódico (Tiopentax; 40 mg/kg i.v.) pela veia marginal, o pênis, a traquéia, a aorta torácica e o duodeno foram retirados e imediatamente colocados em solução de Krebs-Henseleit. Cada segmento de tecido foi montado em banhos isolados de 5 ml contendo solução de Krebs-Henseleit aquecida a 37°C e borbulhada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os tecidos foram conectados a um transdutor de força. A tensão aplicada aos tecidos foi periodicamente ajustada até estabilização e a solução nutritiva trocada a cada 15 min durante este período. As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (Ugo-Basile, Varese, Itália) e registradas em um polígrafo de 2 canais, com o objetivo de investigar a atividade da droga em estudo (Figura 7).

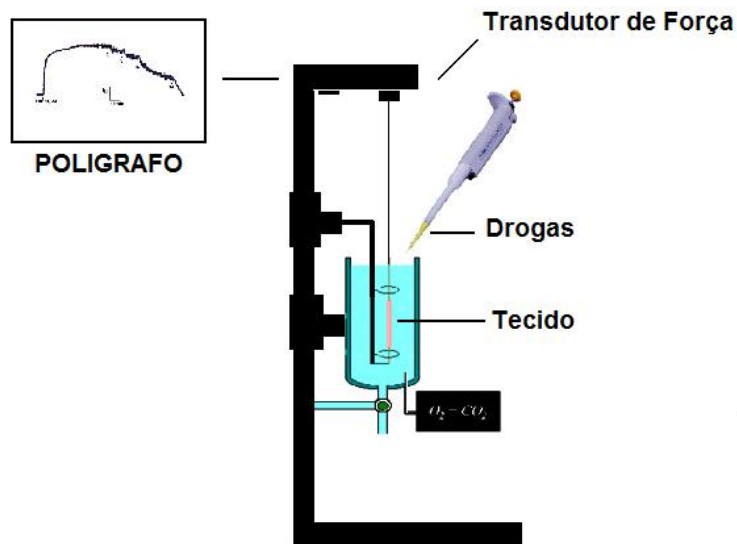


Figura 7 - Esquema do banho de tecido isolado.

5.2.1 Efeito de SEC sobre a contração induzida por fenilefrina em corpo cavernoso de coelhos

Cada segmento de corpo cavernoso foi montado em banhos isolados (como descrito previamente). Após 1 de estabilização, o tecido foi pré-contraído com fenilefrina (PHE 10 μ M); no platô da contração induzida por essa substância, SEC foi adicionado nas concentrações de 1 - 100 μ g/ml. A atividade do alcalóide foi observada pela construção de curvas de concentração-resposta.

5.2.2 Efeito de SEC sobre a contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta na ausência e na presença de endotélio

Segmentos de aorta de aproximadamente 4 mm, com ou sem endotélio, foram montados como descrito anteriormente. Após um período de equilíbrio de 1 hora com lavagens sucessivas a cada 15 min, observaram-se os efeitos de SEC (1 - 100 μ g/ml) sobre anéis de aorta pré-contraídos por fenilefrina (PHE 10 μ M), (Figura 8).

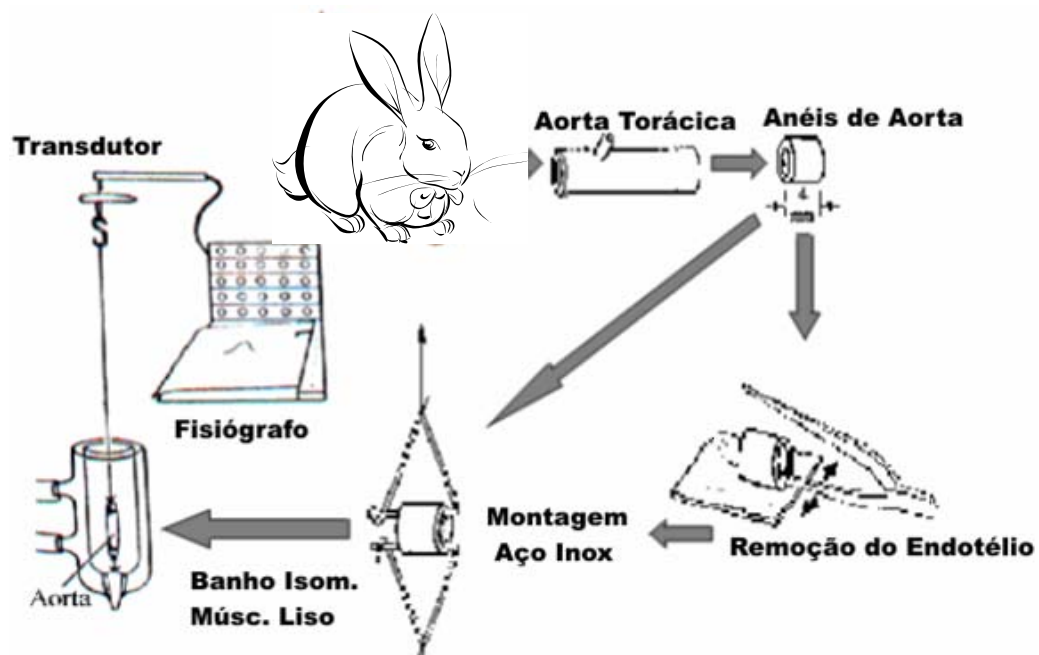


Figura 8 - Montagem dos anéis de aorta em banho isolado.

5.2.3 Efeito de SEC sobre a contração induzida por carbacol em anéis de traquéia

A traquéia foi removida e dissecada, seguindo o procedimento experimental descrito por Castillo e De Beer (1947). Cuidadosamente o tecido foi cortado transversalmente entre os segmentos de cartilagem, e 6 anéis foram laçados e acoplados a um transdutor isométrico. O tecido foi mantido em solução de Krebs-Henseleit em banhos de 5 ml (Figura 9). Após um período de equilíbrio de 1 hora com lavagens sucessivas a cada 15 min, observaram-se os efeitos de SEC (1-100 $\mu\text{g/ml}$) sobre a contração induzida por carbacol (CCH 10 μM).

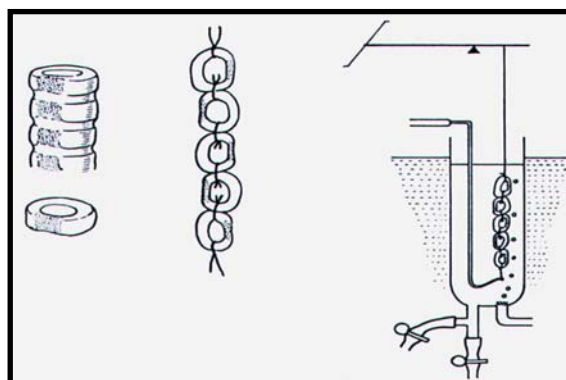


Figura 9 - Montagem dos anéis de traquéia em banho isolado (CASTILLO; De BEER, 1947).

5.2.4 Efeito de SEC sobre a atividade espontânea de duodeno

Cerca de 2 cm do segmento proximal do duodeno foram removidos e dispostos em uma placa de petri. Após a retirada, a luz duodenal foi lavada com solução fisiológica. O segmento duodenal foi submetido a uma tensão de 2g em um banho contendo 10 ml de solução de Hrebs-Henseleit. Após a estabilização, observaram-se os efeitos de SEC (1 - 100 µg/ml) sobre a atividade espontânea do tecido.

5.3 Efeito de SEC em corpos cavernosos de coelhos

5.3.1 Efeito sobre a contração induzida por fenilefrina ou potássio

Após 60 minutos de estabilização, o tecido cavernoso foi pré-contraído com fenilefrina (PHE 10 µM) ou com potássio (K^+ 40 mM); no platô da contração induzida por essas substâncias, observaram-se os efeitos de SEC (1 - 100 µg/ml) na presença de um bloqueador dos canais de potássio dependente de ATP (glibenclamida 10 µM) e de inibidores dos canais de potássio cálcio-dependentes de alta, intermediária e baixa condutância (iberiotoxina e apamina 0,1 µM) e na presença de um bloqueador muscarínico (atropina 10 µM), e de antagonistas noradrenérgicos (fentolamina 10 µM e guanetidina 10 µM). Foram observados também os efeitos de SEC (1 - 100 µg/ml) na presença de um inibidor da guanilato cिलcase solúvel e um inibidor da óxido nítrico sintase, ODQ 30 µM e L-NAME respectivamente, e a atividade de SEC 10 µg/ml e 30 µg/ml sobre o relaxamento induzido por NO (1 - 3000 nM) e Forskolina.

5.3.2 Dosagem de GMPc e AMPc tecidual

Foram utilizados coelhos machos New Zeland adultos (2 - 3 kg). Após injeção com tiopental sódico (Tiopentax; 40 mg/kg i.v.) pela veia marginal, o pênis, a traquéia, a aorta torácica e o duodeno foram retirados e imediatamente colocados em solução de Krebs-Henseleit. Cada segmento de tecido foi montado em banhos isolados de 5 ml contendo solução de Krebs-Henseleit aquecida a 37°C e borbulhada com 95% de O_2 e 5% de CO_2 . Os tecidos foram conectados a um

transdutor de força. Em presença de SEC (17-*nor*-subincanadina E), um alcalóide isolado das cascas do caule de *Aspidosperma ulei* MARKGR. , foram realizados os seguintes protocolos:

- Medida de GMPc e AMPc basal

Após o período de estabilização, aproximadamente 1 hora, as tiras de corpos cavernosos foram congeladas em nitrogênio líquido.

- Medida de GMPc e AMPc após pré-contração com fenilefrina

Após o período de estabilização, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-7} M. Após 10 minutos da adição do agonista contrátil, a contração atingiu seu platô, e o tecido cavernoso foi congelado em nitrogênio líquido.

- Medida de GMPc e Ampc após a exposição ao alcalóide

Após o período de estabilização e pré-contração com fenilefrina (10^{-7} M), foi adicionado SEC 7,5 µg/ml e 15 µg/ml. Após a obtenção de um platô de relaxamento, o que ocorreu em cerca de 20 min, as tiras de corpos cavernosos foram congeladas em nitrogênio líquido. Todas as amostras foram mantidas a -20°C até o dia do experimento.

- Homogeneização do tecido e dosagem de proteínas

O tecido congelado foi homogeneizado em solução de Krebs gelado. Após completa maceração do tecido, alíquotas de todas as amostras foram separadas para dosagem de proteínas pelo método de Bradford, 1976.

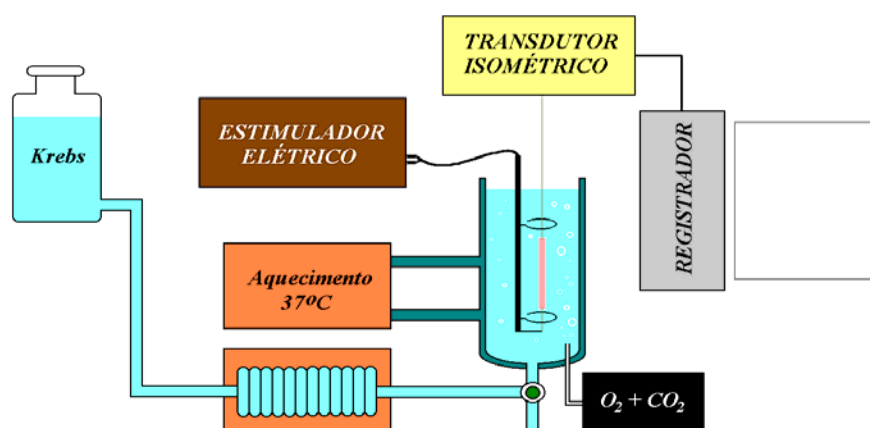
- Preparação da amostra

Ao macerado de tecido foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) (resultando em uma concentração final do TCA de 10%). O TCA foi utilizado para

precipitar proteínas; após a adição do TCA, as amostras foram agitadas e posteriormente centrifugadas a 2000 xg por 15 minutos a 4°C. Removemos o sobrenadante e descartamos o precipitado. O sobrenadante foi lavado com éter dietílico saturado de água (em um volume 4 vezes maior que o volume da amostra) e a fração etílica (superior) foi descartada. Este processo foi repetido por quatro vezes. Ao final das lavagens secamos as amostras em atmosfera de nitrogênio a 60°C e as ressuspendemos no tampão de ensaio do “kit” imunoenzimático para dosagem de GMPc e AMPc. Utilizamos o método de não-acetilação da amostra para dosagem, em fentomoles de GMPc e AMPc por poço. Posteriormente, calculamos a concentração dos nucleotídeos por mg de proteínas do tecido tecido.

5.3.3 Efeito sobre o relaxamento induzido por campo elétrico

O campo elétrico (ECE) utilizado para estimulação do tecido foi gerado por uma voltagem de 30 V, com uma frequência variante (0,5, 1, 2, 4, 8 e 16 Hz), na forma de pulso de onda quadrado (1,0 ms duração do pulso), usando um estimulador Grass S6 (Astro-Med Industrial Park; RI, USA). O estímulo elétrico foi aplicado em segmentos de corpos cavernosos pré-contráidos com fenilefrina 10µM



(controle) e na presença de SEC (1-10 µg/ml) (figura 10).

Figura 10 - Esquema do banho isolado de corpo cavernoso e da aplicação do estímulo elétrico.

5.3.4 Efeito de SEC sobre contrações induzidas por CaCl_2 , numa solução despolarizante zero cálcio

Após 60 min de estabilização, a solução de Krebs-Henseleit normal foi trocada por solução despolarizante (K^+ 40 mM) sem cálcio em sua composição. Curvas cumulativas de cálcio (CaCl_2 1 - 300 mM) foram registradas na ausência (controle) e na presença de SEC (3,5; 7,5 e 15 $\mu\text{g/ml}$) adicionado à solução 10 minutos antes do início da curva.

5.4 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média ($\bar{X} \pm \text{EPM}$) onde n representa o número de experimentos. São considerados estatisticamente significantes os resultados que apresentam probabilidade de ocorrência da hipótese nula menor que 5% ($p < 0,05$). Para comparação de dois grupos usamos teste *t* de Student pareado ou não-pareado. Para comparação de mais de dois grupos experimentais foram utilizados ANOVA e teste de múltipla comparação, citados apropriadamente na seção de resultados e/ou nas legendas das figuras. A concentração da substância capaz de produzir 50% do seu efeito máximo (IC_{50}) foi calculada por uma transgressão não linear.

6 RESULTADOS

6.1 Efeito de SEC sobre a musculatura lisa de coelhos

6.1.1 Efeito de SEC sobre a contração induzida por fenilefrina em corpo cavernoso de coelhos

SEC relaxou tiras de corpos cavernosos pré-contraídas com fenilefrina 10 μ M. A resposta relaxante máxima induzida por SEC em segmentos de corpos cavernosos de coelhos contraídos com fenilefrina 10 μ M foi de 100% (SEC 100 μ g/mL; ** $p < 0,01$ vs controle), Como visto na figura 12. A figura 11 mostra o relaxamento induzido pelo alcalóide e a recuperação do tecido após 30 min de lavagem.

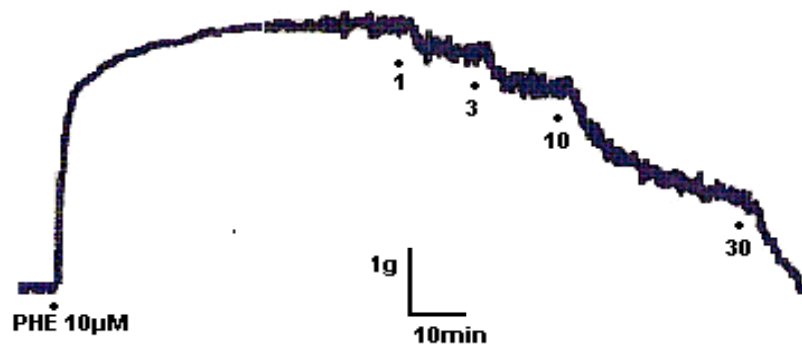


Figura 11 - Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC na contração induzida por fenilefrina 10 μ M em segmentos de corpos cavernosos de coelhos

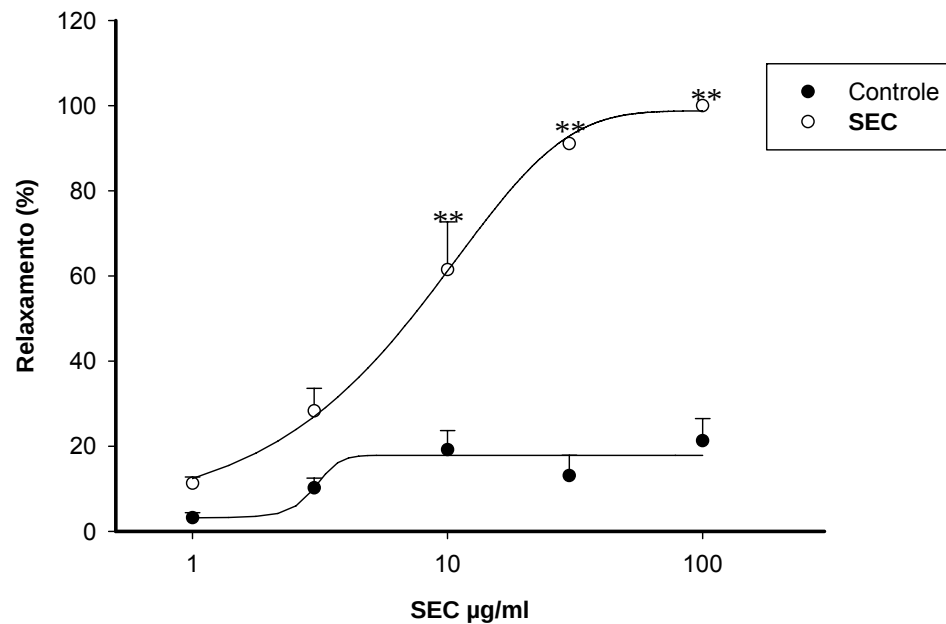


Figura 12 - Curva dose-resposta do efeito de SEC (1-100 µg/mL) na contração induzida por fenilefrina 10 µM em corpos cavernosos de coelhos. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (N=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 10 µM. ** $p < 0,01$, teste *t* de Student pareado.

6.1.2 Efeito de SEC sobre a contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta na ausência e na presença de endotélio

SEC relaxou anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina 10 µM. Esse relaxamento foi observado tanto na presença quanto na ausência de endotélio. A resposta relaxante máxima induzida por SEC em anéis de aorta contraídos com fenilefrina na presença de endotélio foi de $100\% \pm 0,00\%$ SEC (100 µg/mL), e na ausência do endotélio foi de $91,67\% \pm 8,33\%$ (SEC 100 µg/mL), como visto na figura 14. A figura 13 mostra o relaxamento induzido por SEC e a recuperação do tecido após 30 min de lavagem.

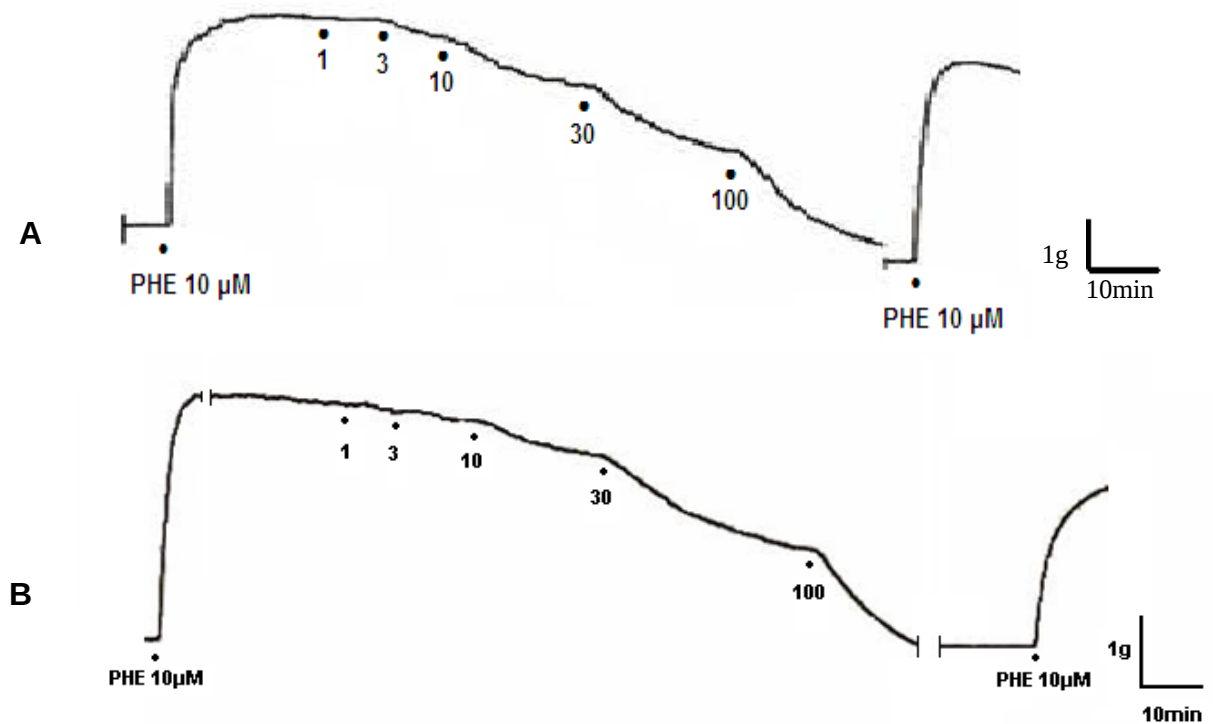


Figura 13 - Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC na contração induzida por fenilefrina 10 μ M em anéis de aorta de coelhos com endotélio (A) e sem endotélio (B), bem como a recuperação do tecido após um período de 30 minutos de lavagem.

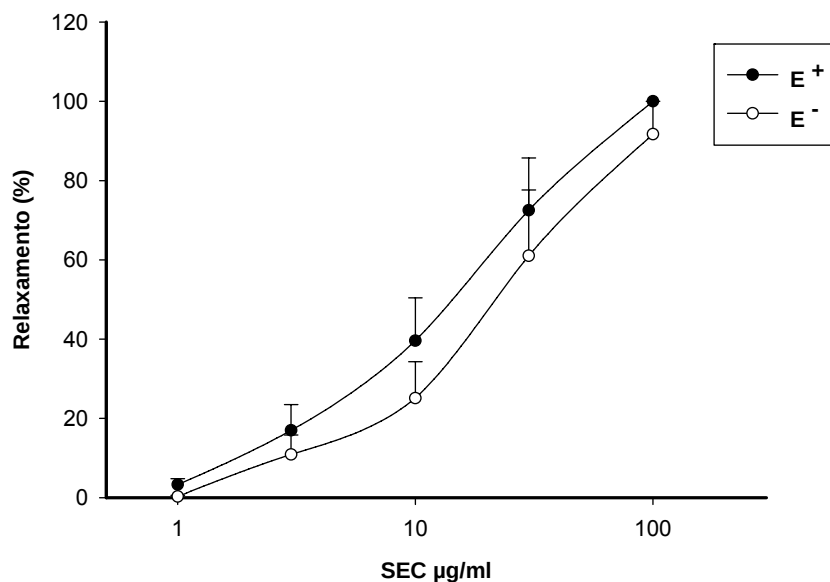


Figura 14 - Curva dose-resposta do efeito de SEC (1-100 μ g/mL) na contração induzida por fenilefrina 10 μ M em anéis de aorta de coelhos. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (N=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 10 μ M. $p > 0,05$, teste t de Student não-pareado.

6.1.3 Efeito de SEC sobre a contração induzida por carbacol em anéis de traquéia de coelhos

SEC relaxou anéis de traquéia pré-contraídos com carbacol 10 μ M. A resposta relaxante máxima induzida por SEC em anéis de traquéia contraídos com carbacol foi de $95,92\% \pm 1,53\%$ (SEC 100 μ g/ml), como visto na figura 16. A figura 15 mostra o relaxamento induzido por SEC (1 - 100 μ g/mL) e a recuperação do tecido após 30 min de lavagem.

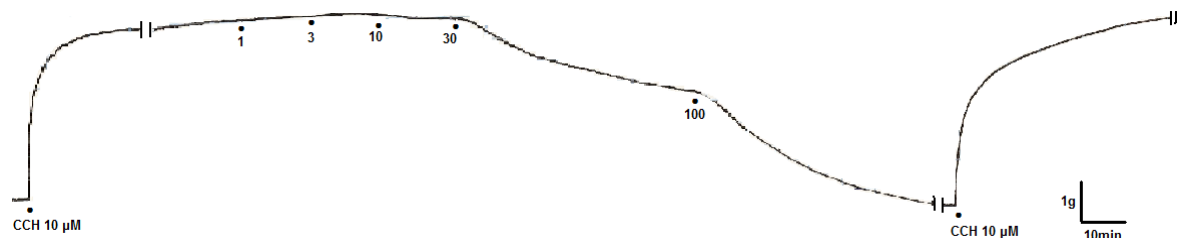


Figura 15 - Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC na contração induzida por carbacol 10 μ M em anéis de traquéia de coelhos, e a recuperação do tecido após um período de 30 minutos de lavagem. O traçado acima é representativo de quatro experimentos.

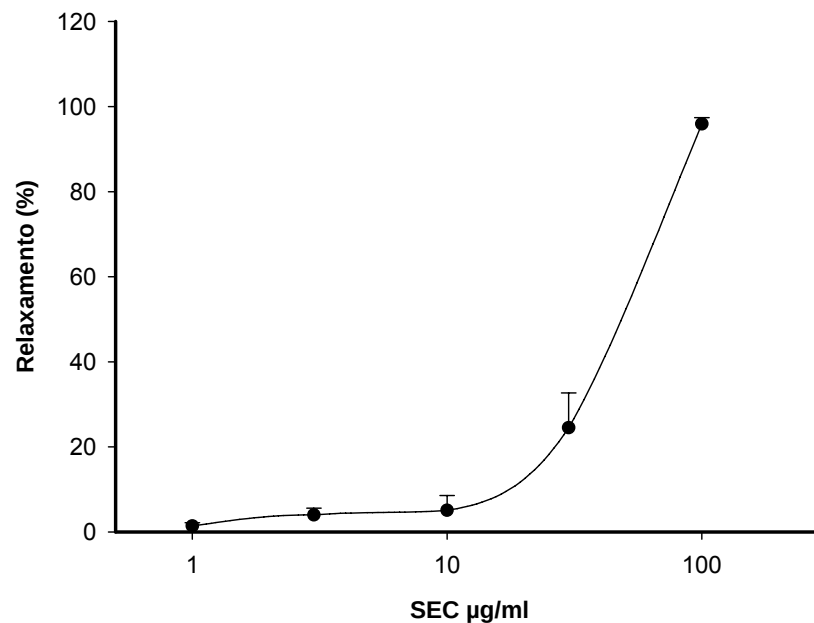


Figura 16 - Curva dose-resposta do efeito de SEC (1-100 µg/mL) na contração induzida por carbacol (CCH) 10µM em anéis de traquéia de coelhos. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (N=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com carbacol 10 µM.

6.1.4 Efeito de SEC sobre a atividade espontânea de duodeno

SEC inibiu a atividade espontânea em segmentos de duodeno de coelhos. A resposta inibitória máxima induzida por SEC na atividade espontânea desse tecido foi de $93,40\% \pm 6,60$ (SEC 100 µg/ml), como visto na figura 18. A figura 17 mostra o relaxamento induzido por SEC (1 - 100 µg/mL) em segmentos de duodeno.

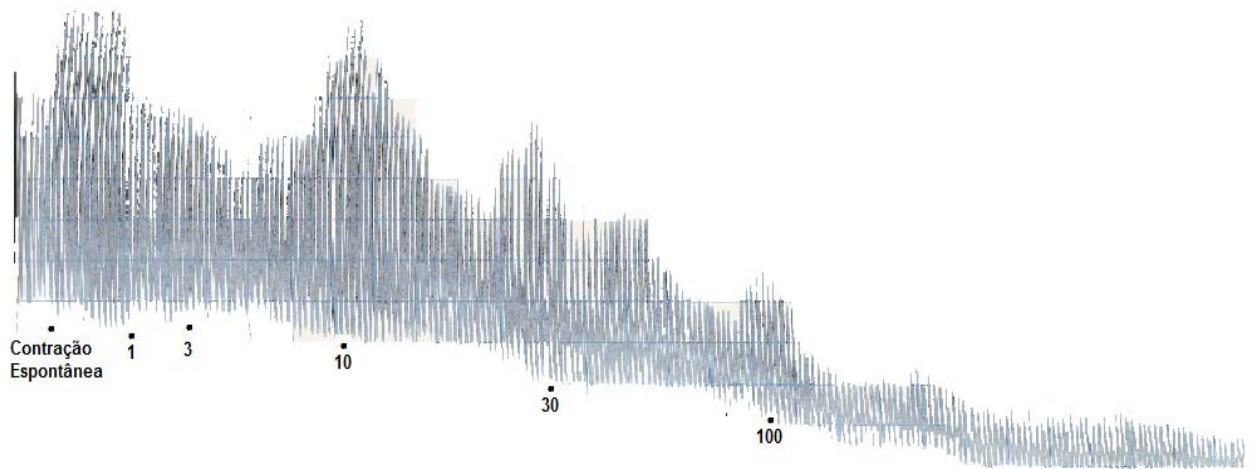


Figura 17 - Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC (1-100 µg/ml) sobre a atividade espontânea de segmento de duodeno de coelhos.

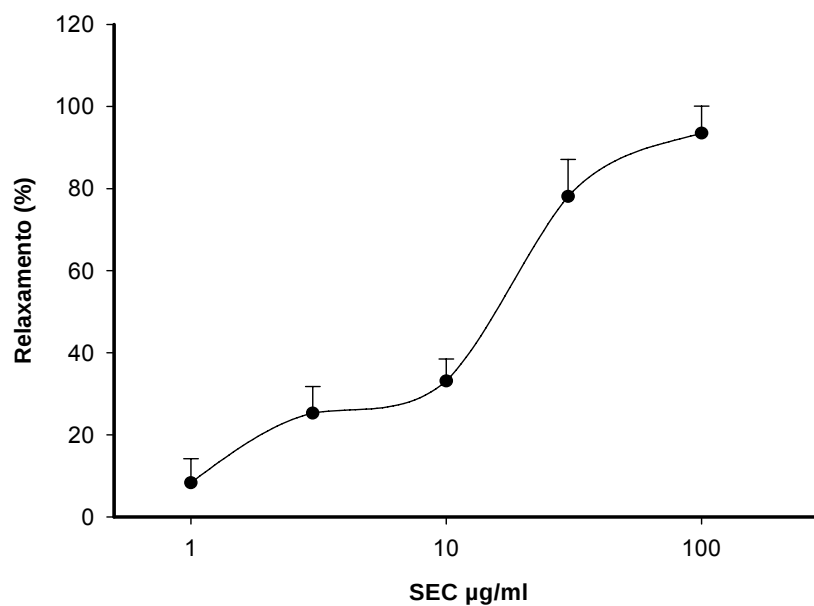


Figura 18 - Curva dose-resposta do efeito de SEC (1-100 µg/mL) sobre a atividade espontânea de segmentos de duodeno de coelhos. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (N=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos.

Os dados obtidos a partir dos experimentos acima descritos permitiram a obtenção de curvas dose-resposta do alcalóide nos diferentes tecidos musculares

estudados e os conseqüentes valores de IC_{50} ($IC_{95\%}$). Esses resultados estão mostrados na tabela 3.

Tabela 2 - Concentração inibitória 50% em base $\mu\text{g/ml}$, com seus respectivos $IC_{95\%}$, de SEC em corpo cavernoso, aorta, traquéia e duodeno de coelhos, pré-contráídos com fenilefrina ou carbacol.

ESTÍMULO	TECIDO	IC_{50} ($IC_{95\%}$) - $\mu\text{g/ml}$
Fenilefrina (10 μM)	Corpo cavernoso	7,174 (3,155 - 16,31)
Fenilefrina (10 μM)	Aorta E ⁺	26,15 (6,088 - 112,4)
Fenilefrina (10 μM)	Aorta E ⁻	29,76 (12,26 – 72,27)
Carbacol (10 μM)	Traquéia	60,25 (0,330 - 109,80)
Atividade Espontanea	Duodeno	76,78 (33,09 - 178,2)

CI_{50} : concentração inibitória 50%. Concentração necessária para produzir 50% da resposta relaxante máxima
 $IC_{95\%}$: Intervalo de confiança de 95%.

6.2 Efeito de SEC em corpos cavernosos de coelhos

6.2.1 Efeito sobre a contração induzida por fenilefrina na presença de apamina, iberiotoxina e glibenclamida

SEC relaxou tiras de corpos cavernosos pré-contráídos com fenilefrina 10 μM mesmo na presença dos inibidores dos canais de potássio apamina 0,1 μM e iberiotoxina 0,1 μM e glibenclamida 10mM. A resposta relaxante máxima induzida por SEC (100 $\mu\text{g/ml}$) em segmentos de corpos cavernosos de coelhos pré-contráídos por fenilefrina 10 foi de 100% e de 89,36 % $\pm$ 1,69 na presença da associação dos inibidores apamina, iberiotoxina e glibenclamida, como visto na figuraa 20. A figura 21, mostra o relaxamento induzido por SEC (1 – 100 $\mu\text{g/mL}$) na presença dos inibidores.

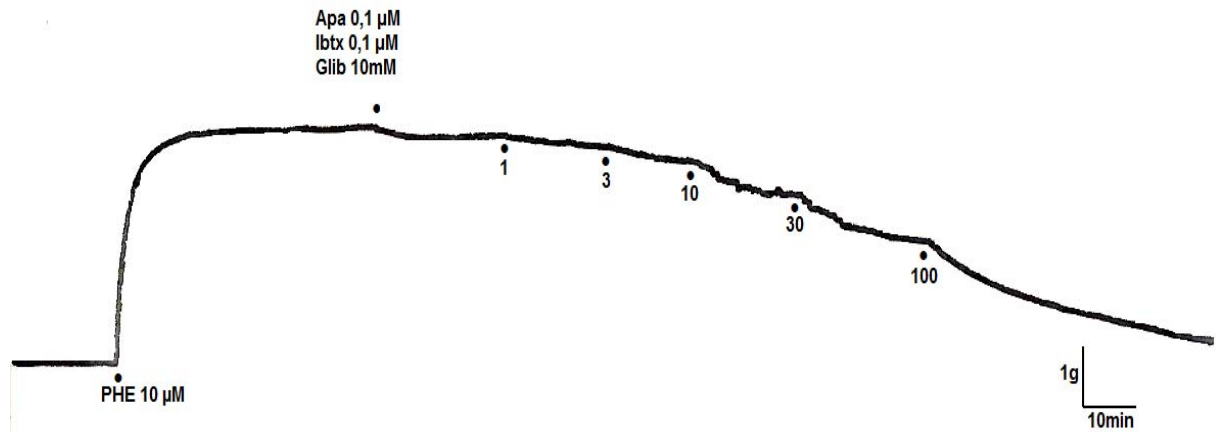


Figura 19 - Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC na contração induzida por fenilefrina 10µM na presença de apamina 0,1 µM, iberiotoxina 0,1 µM e glibenclamida 10mM em segmentos de corpos cavernosos de coelhos. O traçado acima é representativo de quatro experimentos.

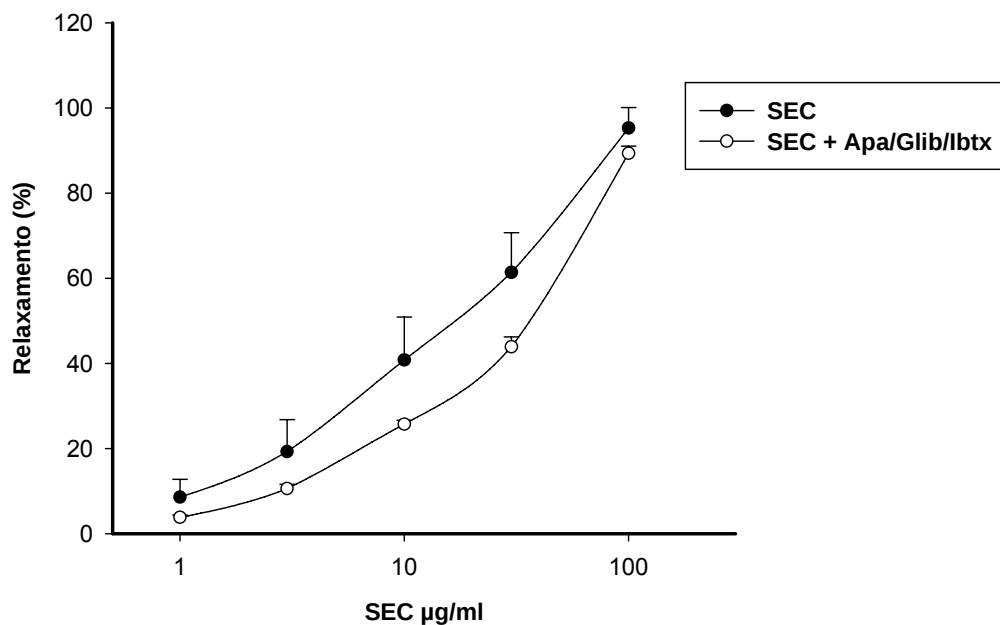


Figura 20 - Curva dose-resposta do efeito de SEC (1 - 100 µg/mL) em segmentos de corpos cavernosos de coelhos pré-contráídos por solução despolarizante de K⁺ 40 mM. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (N=4) da relaxamento (%).

porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com solução despolarizante de K^+ 40mM. $p > 0,05$, teste t de Student não-pareado.

6.2.2 Efeito sobre a contração induzida por fenilefrina na presença de atropina

Mesmo na presença de Atropina 10 μ M, SEC relaxou tiras de corpos cavernosos pré-contraídas com fenilefrina 10 μ M. A resposta relaxante máxima induzida por SEC em segmentos de corpos cavernosos de coelhos contraídos com fenilefrina 10 μ M pré-tratados com atropina 10 μ M foi de $100 \pm 0,00\%$ (SEC 100 μ g/ml), como visto na figura 23. A figura 22 mostra o relaxamento induzido por SEC (SEC 1 - 100 μ g/mL) na ausência e na presença de atropina.

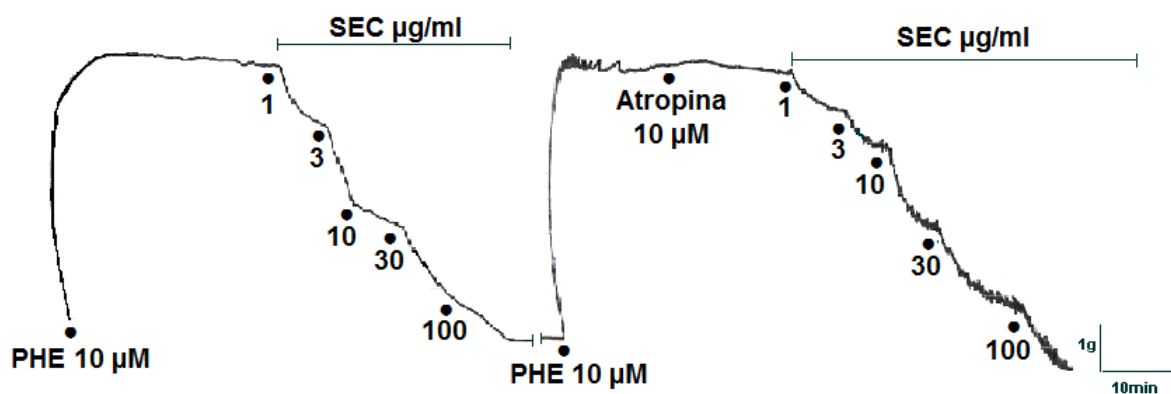


Figura 21 - Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC (1-100 μ g/ml) na contração induzida por fenilefrina (PHE) 10 μ M em corpos cavernosos de coelhos e pré-tratados com atropina (10 μ M).

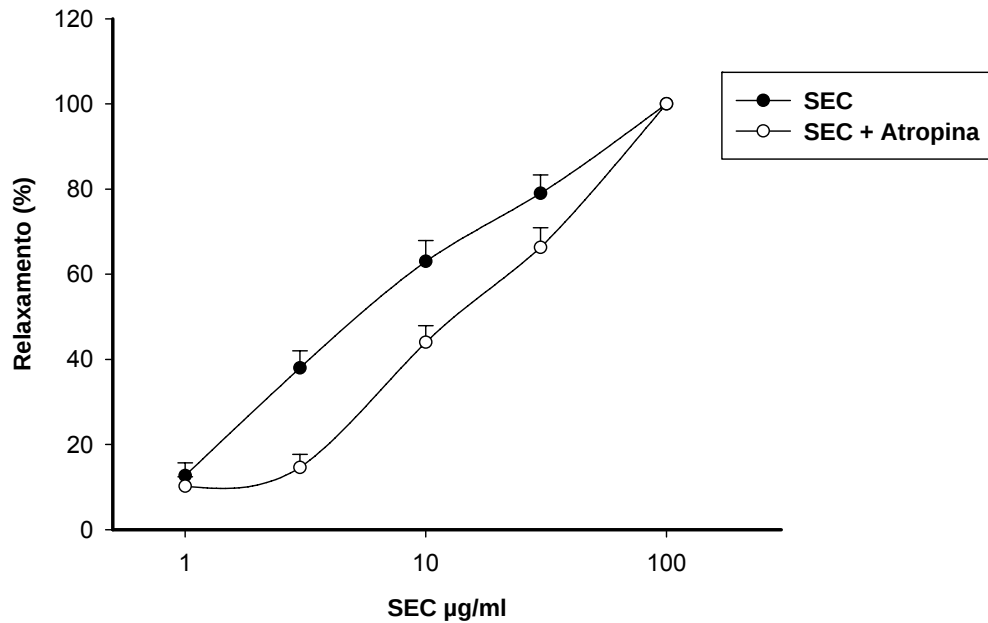


Figura 22 - Curva dose-resposta do efeito de SEC (1-100 µg/mL) em segmentos de corpos cavernosos de coelhos pré-contráídos com fenilefrina 10 µM na presença de atropina (10 µM). Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (N=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 10 µM. $p > 0,05$, teste t de Student pareado.

6.2.3 Efeito sobre a contração induzida por potássio 40mM na presença de guanetidina e fentolamina

A presença de um agente simpatolítico (guanetidina) e de um bloqueador de receptores adrenérgicos (fentolamina), não bloqueou o relaxamento induzido por SEC. A resposta relaxante máxima induzida por SEC 100 µg/mL em segmentos de corpos cavernosos de coelhos contraídos por K^+ na presença dos bloqueadores do sistema adrenergico foi de 100,0% (SEC 100µg/ml), como visto na figura 25. A figura 24 mostra o relaxamento induzido por SEC na ausência e na presença dos inibidores A e B respectivamente.

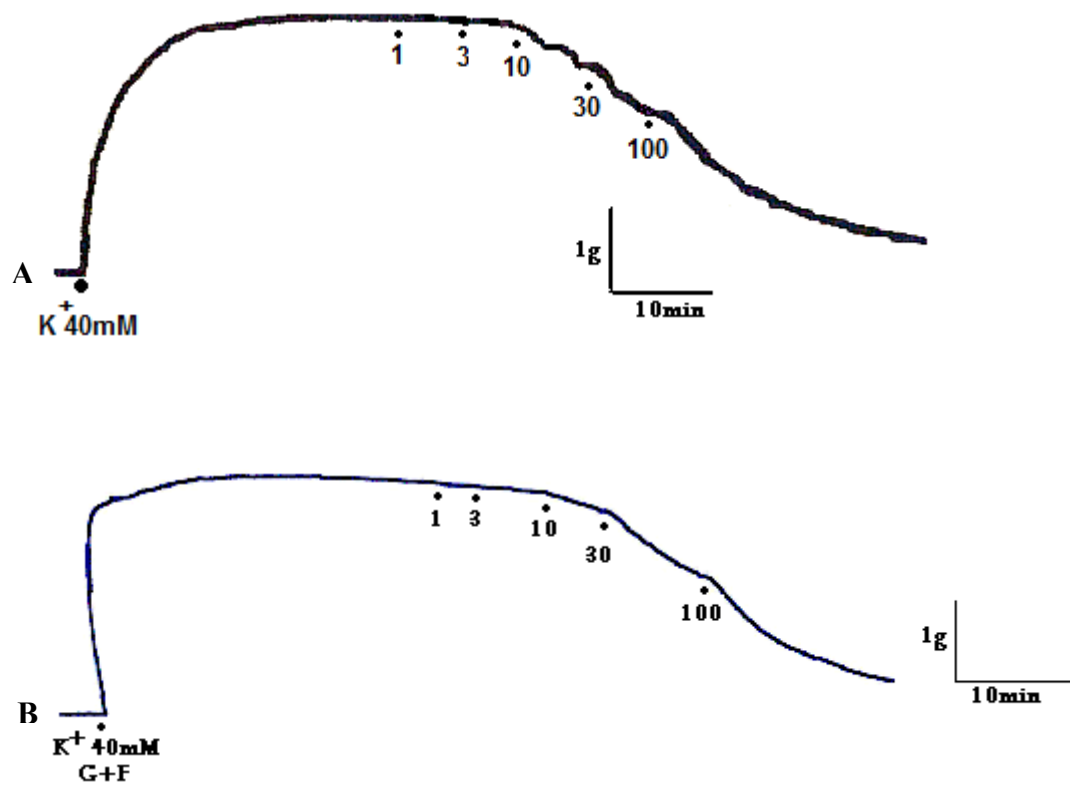


Figura 23 - Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC na contração induzida por solução despolarizante de $K^+ 40mM$ (A) e na presença de guanetidina e fentolamina ($10\mu M$) (B) em segmentos de corpos cavernosos de coelhos. O traçado acima é representativo de quatro experimentos.

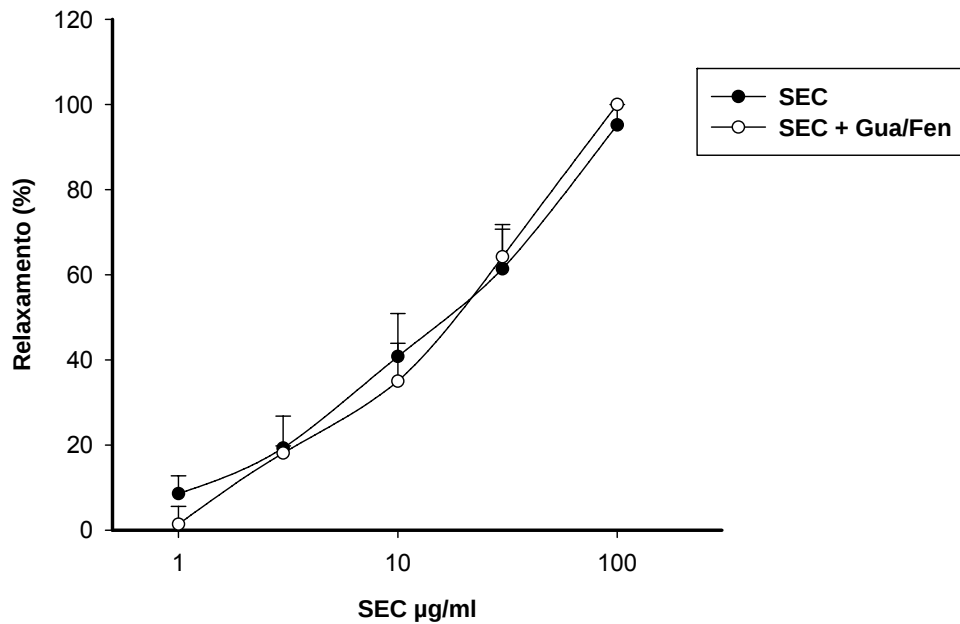


Figura 24 - Curva dose-resposta do efeito de SEC (1-100 µg/ml) em segmentos de corpos cavernosos de coelhos pré-contraídos por solução despolarizante de K^+ 40mM na ausência e na presença de guanetidina e fentolamina (10µM). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com solução despolarizante de K^+ 40mM. $p > 0,05$, teste t de Student não pareado.

6.2.4 Efeito sobre a contração induzida por fenilefrina na presença de L-NAME

SEC relaxou tiras de corpos cavernosos pré-contraídas com fenilefrina 10 µM mesmo na presença de L-NAME 100 µM, um bloqueador da óxido nítrico sintase (NOS). A resposta relaxante máxima induzida por SEC (300 µg/ml) em segmentos de corpos cavernosos de coelhos pré-contraídos com fenilefrina foi de $67,93\% \pm 4,9$ e de $62,37\% \pm 1,64$ na presença de L-NAME 100 µM, como visto na figura 27. A figura 26 mostra o registro fisiográfico do efeito relaxante de SEC sobre a musculatura lisa cavernosa na ausência (A) e na presença de L-NAME.

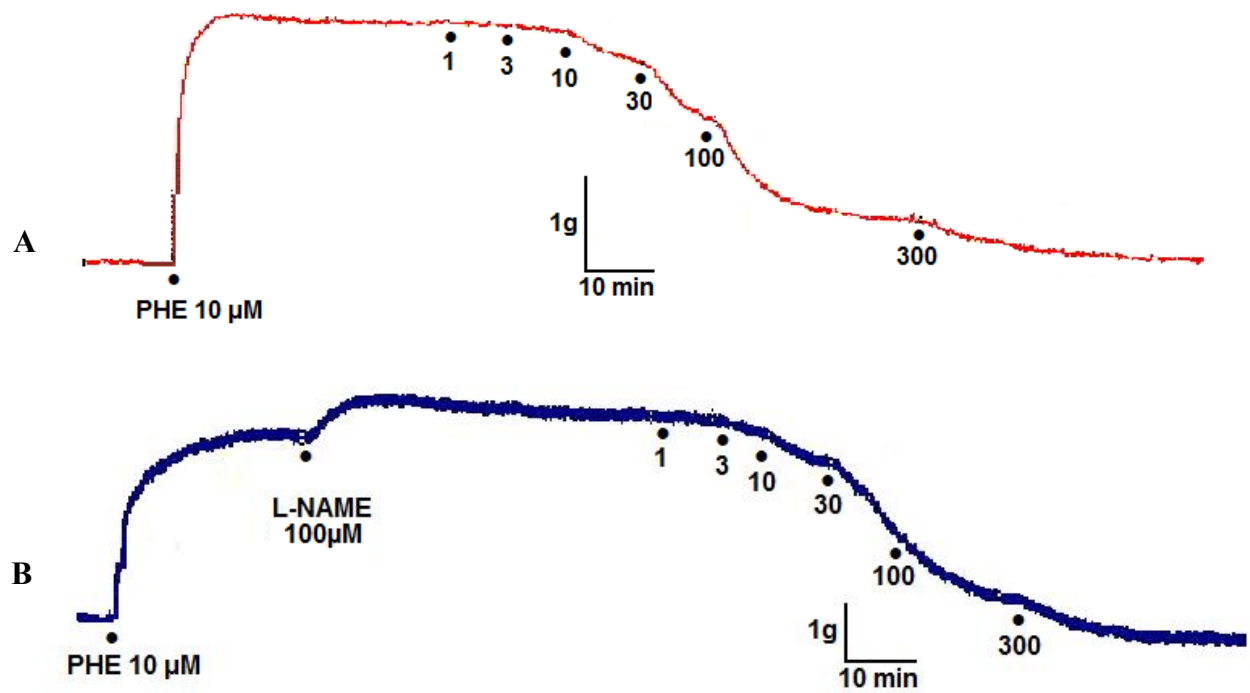


Figura 25 - Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC na contração induzida por fenilefrina 10 µM (A) e na presença de L-NAME 100 µM (B) em segmentos de corpos cavernosos de coelhos.

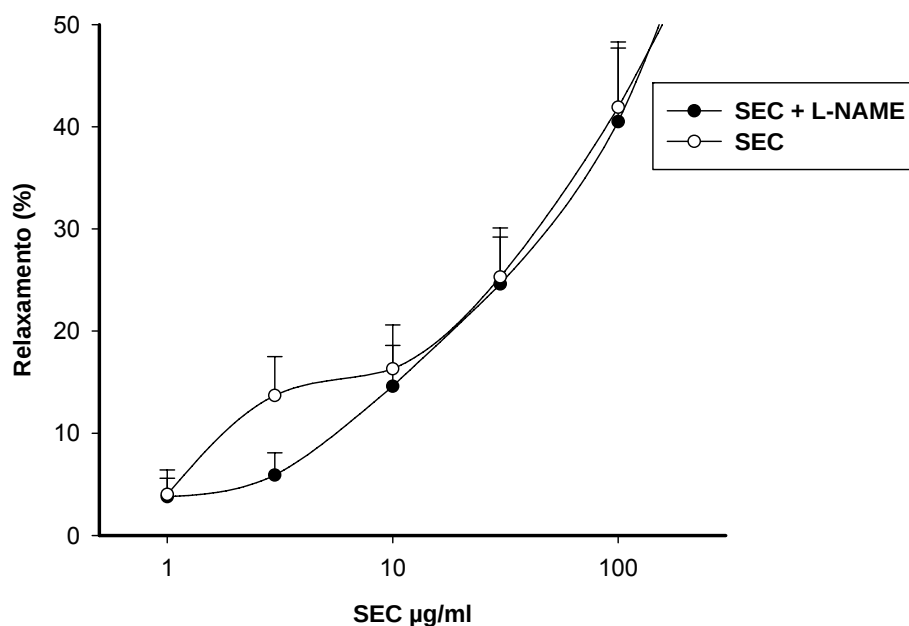


Figura 26 - Curva dose-resposta do efeito de SEC (1-300 µg/ml) em segmentos de corpos cavernosos de coelhos pré-contraídos com fenilefrina 10 µM na ausência e na presença de L-NAME (100 µM). Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (n=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 10 µM.). $p > 0,05$, teste *t* de Student pareado.

6.2.5 Efeito sobre a contração induzida por fenilefrina na presença de ODQ

A adição de ODQ 30 µM, um bloqueador da guanilato ciclase solúvel, inibiu o relaxamento induzido por SEC em corpos cavernosos de coelhos. A resposta relaxante máxima induzida por SEC 100 µg/ml em segmentos de corpos cavernosos de coelhos pré-contraídos com fenilefrina foi de 100% e de 79,1% ± 4,5 na presença de ODQ 30µM, como visto nas figuras 29. A figura 28 mostra o relaxamento induzido por SEC na presença de ODQ 30 µM.

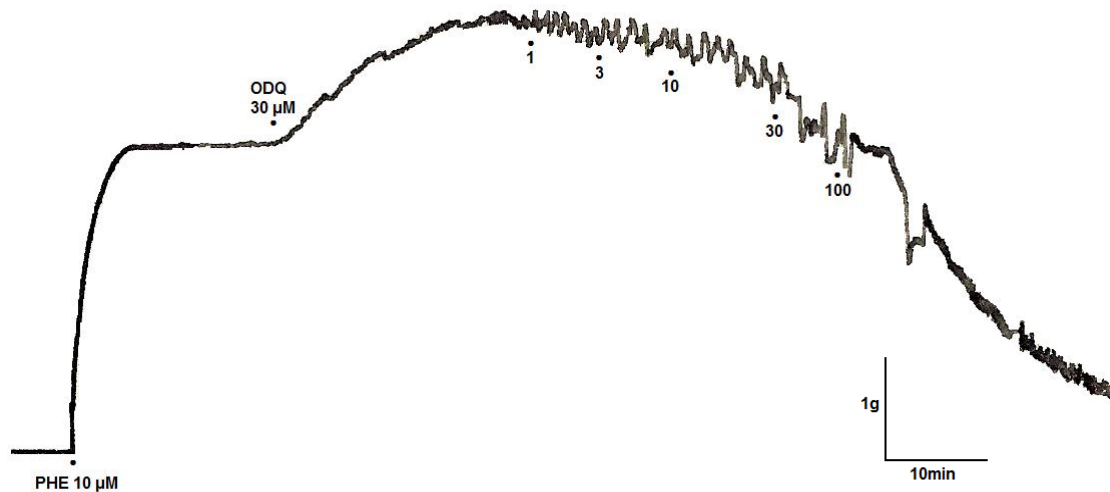


Figura 27 - Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC na contração induzida por fenilefrina 10 μM na presença de ODQ 30 μM em segmentos de corpos cavernosos de coelhos.

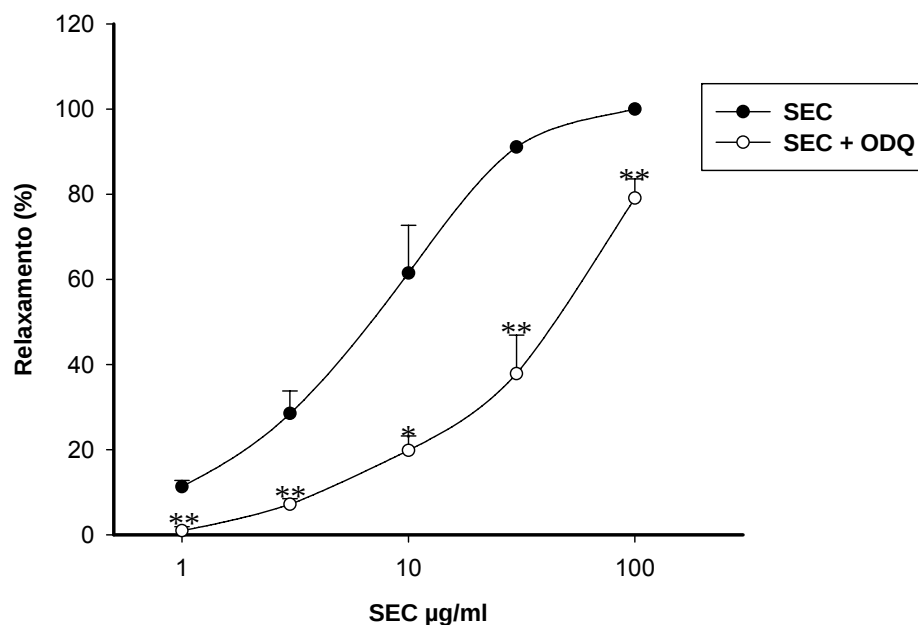


Figura 28 - Curva dose-resposta do efeito de SEC (1-100 $\mu\text{g/ml}$) em segmentos de corpos cavernosos de coelhos pré-contraídos com fenilefrina 10 μM na ausência e na presença de ODQ (30 μM). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n=4$) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 10 μM .). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, teste t de Student não pareado.

6.2.7 Efeito sobre o relaxamento induzido por óxido nítrico (NO)

A pré-incubação do tecido com SEC 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ potencializou o efeito relaxante induzido por NO. A resposta relaxante máxima induzida por NO (1 - 3000 nM) foi de $61,15 \% \pm 7,8$ e na presença de SEC 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ de $73,67 \% \pm 6,9$ e $87,19 \% \pm 2,9$ respectivamente, como visto na figura 33. A figura 32, mostra o efeito de NO sobre a musculatura lisa de coelhos na ausência de SEC (A) e na presença de SEC 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ (B) e (C) respectivamente.

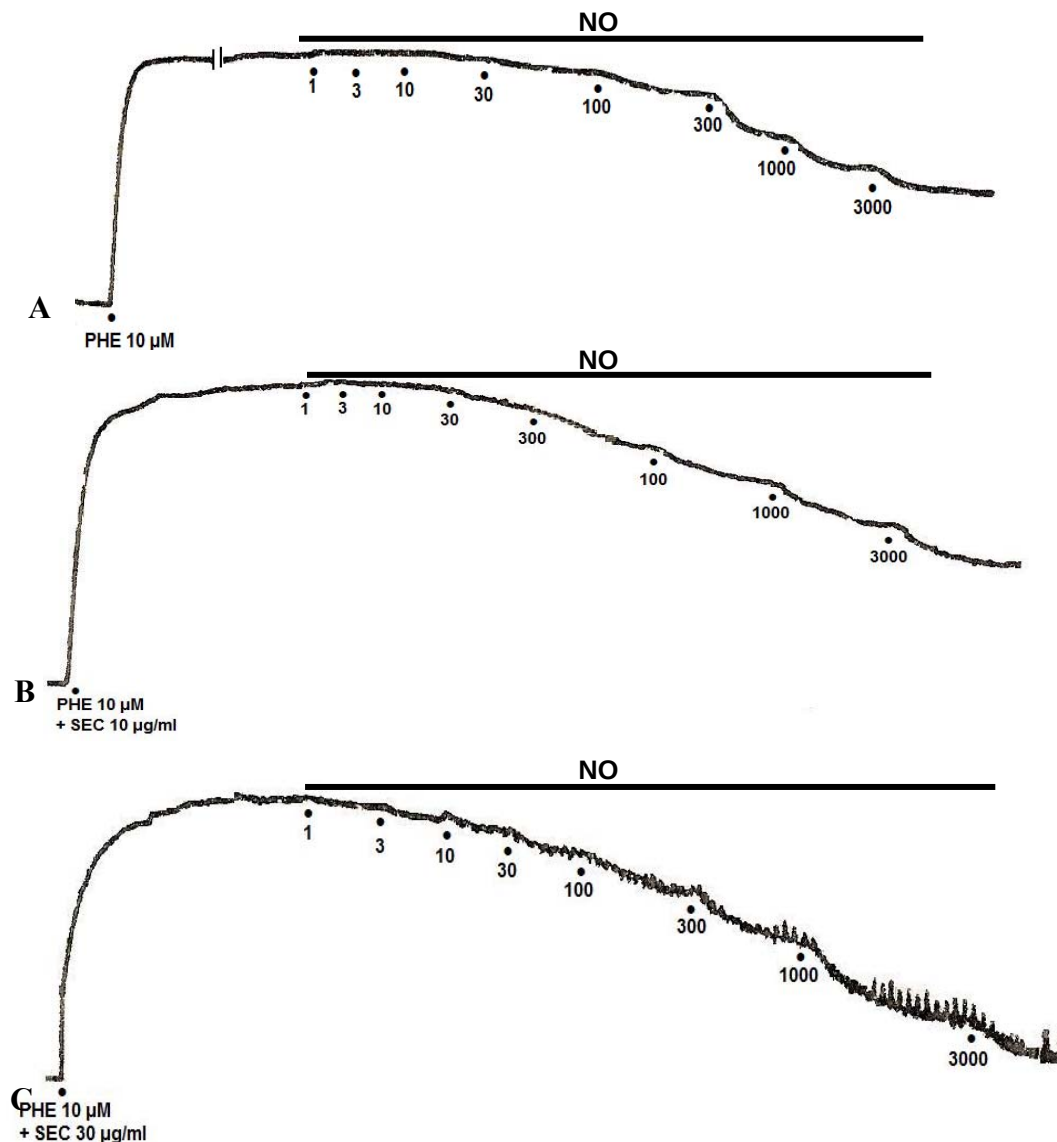


Figura 29 - Registro fisiográfico representativo do efeito relaxante de NO (1 - 3000 nM) em segmentos de corpos cavernosos pré-contraídos com fenilefrina 10 μM (A) e na presença de SEC 10 $\mu\text{g/ml}$ e 30 $\mu\text{g/ml}$ (B e C, respectivamente).

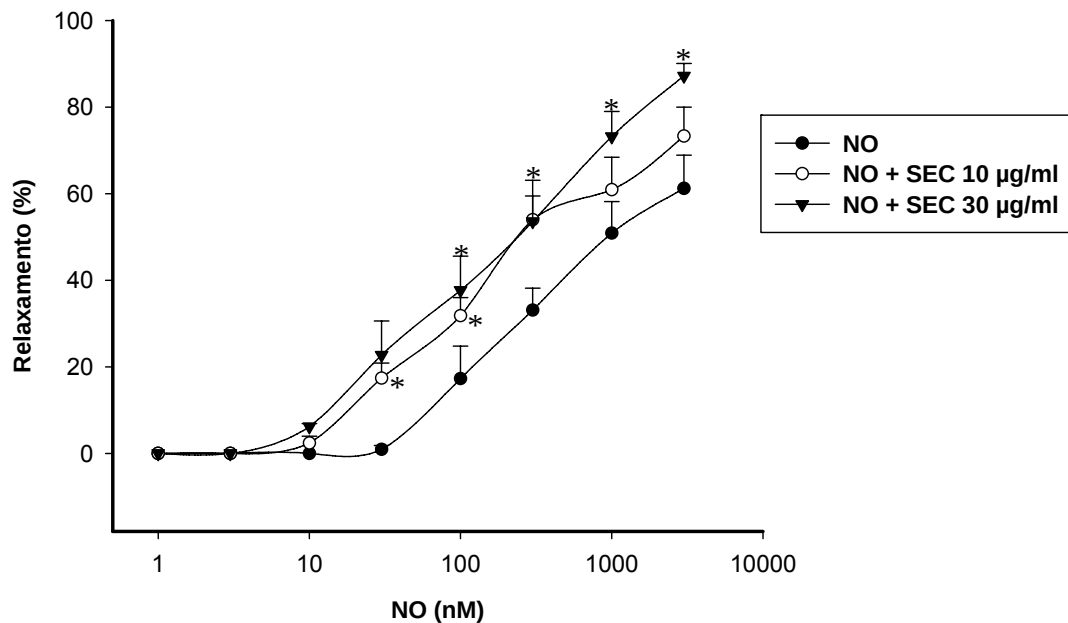


Figura 30 - Relaxamento induzido por NO (1-3000 mM) em segmentos de corpos cavernosos de coelhos pré-contráídos com fenilefrina 10 µM (controle) e após a pré-incubação com SEC 10 µg/ml e SEC 30 µg/ml. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 10 µM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ANOVA seguida de Tukey.

6.2.8 Efeito sobre o relaxamento induzido por forskolina

SEC 30 µg/ml potencializou o relaxamento induzido por forskolin, um ativador da adenilato ciclase, como visto na figura 35. A figura 34 mostra o efeito de forskolin na ausência (A) e na presença de SEC 10 e 30 µg/ml (B) e (C) respectivamente.

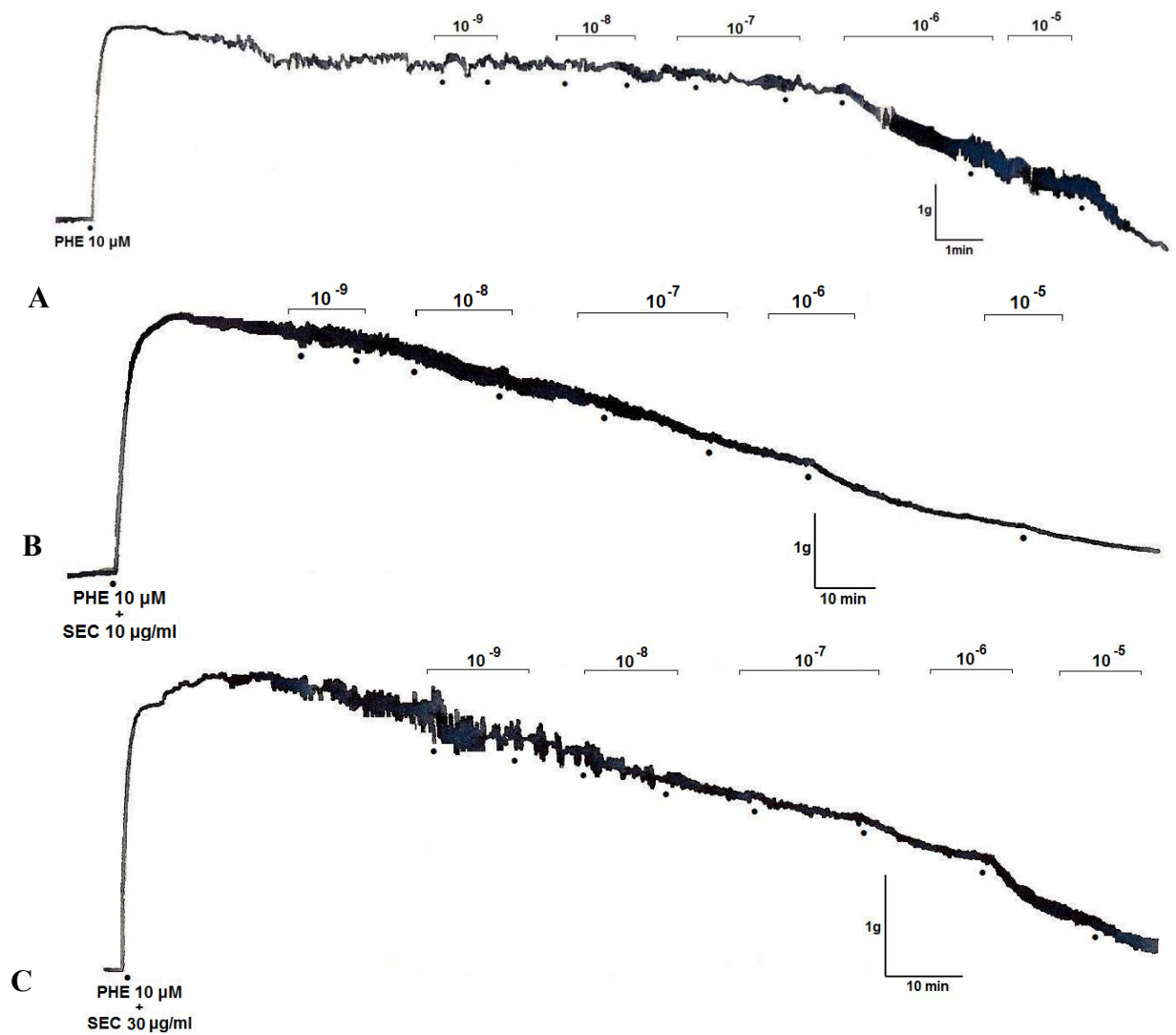


Figura 31 - Registro fisiográfico representativo do efeito relaxante de forskolina (10^{-9} - 10^{-5} M) em segmentos de corpos cavernosos pré-contraídos com fenilefrina 10 µM (A) e na presença de SEC 10 µg/ml e 30 µg/ml (B e C, respectivamente).



9 8 7 6 5 4

Figura 32 - Curva dose-resposta do efeito de Forskolina em segmentos de corpos cavernosos de coelhos pré-contráídos com fenilefrina 10 μ M (controle) e após a pré-incubação com SEC 10 μ g/ml e SEC 30 μ g/ml. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 10 μ M. * $p < 0,05$, ANOVA seguida de Tukey.

6.2.9 Efeito sobre a dosagem de GMPc e AMPc tecidual

Os níveis basais de GMPc dosados em corpos cavernosos de coelhos pré-contráídos com fenilefrina 10 μ M foi de 8,3 % $\pm$ 2,9 %, na presença de SEC 7,5 e 15 μ g/ml foi de 8,5 % $\pm$ 1,0 e 21,5 % $\pm$ 4,2 % respectivamente, e na presença de SNP 1 μ M foi de 43,6 % $\pm$ 1,8 %, como mostrado na figura 36. Os níveis basais de AMPc dosado em corpos cavernosos de coelhos pré-contráídos com fenilefrina 10 μ M foi de 117,3 % $\pm$ 7,9 %; na presença de SEC 15 μ g/ml foi de 331,95 % $\pm$ 26,1 e na presença de forskolina 1 μ M foi de 1933,9 % $\pm$ 116,4 %, como mostrado na figura 37.

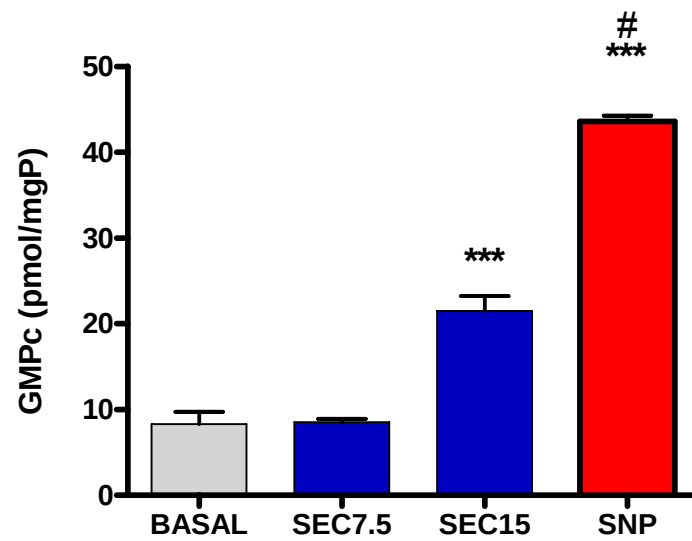


Figura 33 - Medida de GMPc em tiras de corpos cavernosos de coelhos expostas a salina (controle), SEC (7,5 ou 15 $\mu\text{g/ml}$), SNP (1 μM) *** $p < 0,001$ vs. controle, ANOVA seguido de Tukey ($n=4$ em duplicata). # $p < 0,001$ SNP vs. SEC15. Os níveis de GMPc são expressos como média $\pm$ SEM.

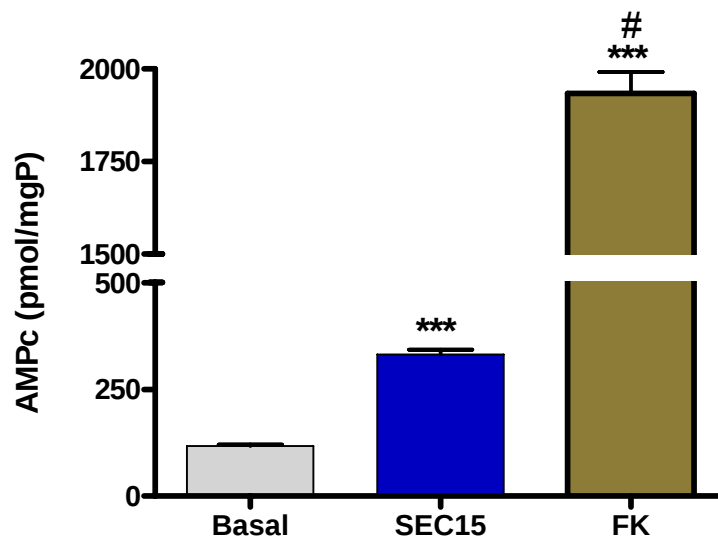


Figura 34 - Medida de AMPc em tiras de corpos cavernosos de coelhos expostas a salina (controle), SEC (15 $\mu\text{g/ml}$) ou forskolina (1 μM). *** $p < 0,001$ vs. controle, ANOVA seguido de Tukey ($n=4$ em duplicata). # $p < 0,001$ FK vs. SEC15. Os níveis de AMPc são expressos como média $\pm$ SEM.

6.2.10. Efeito sobre o relaxamento induzido por estímulo elétrico (ECE)

SEC inibiu o relaxamento induzido pelo estímulo elétrico. A resposta relaxante máxima obtida na maior frequência utilizada (16 Hz) foi de $65,0 \pm 10,9\%$ e de $0,7 \pm 0,7\%$ para a frequência mínima (2Hz). A incubação dos tecidos em SEC afetou a resposta ao ECE (figuras 38 e 39).

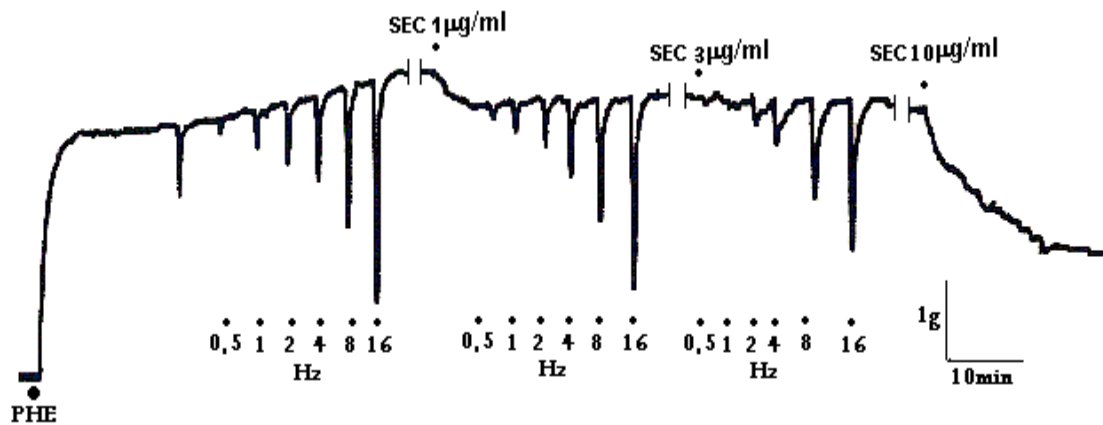


Figura 35 - Registro fisiográfico representativo do efeito de SEC sobre o relaxamento induzido por estímulo elétrico transmural (ECE) em corpos cavernosos isolados de coelho pré-contraídos por fenilefrina (10µM).

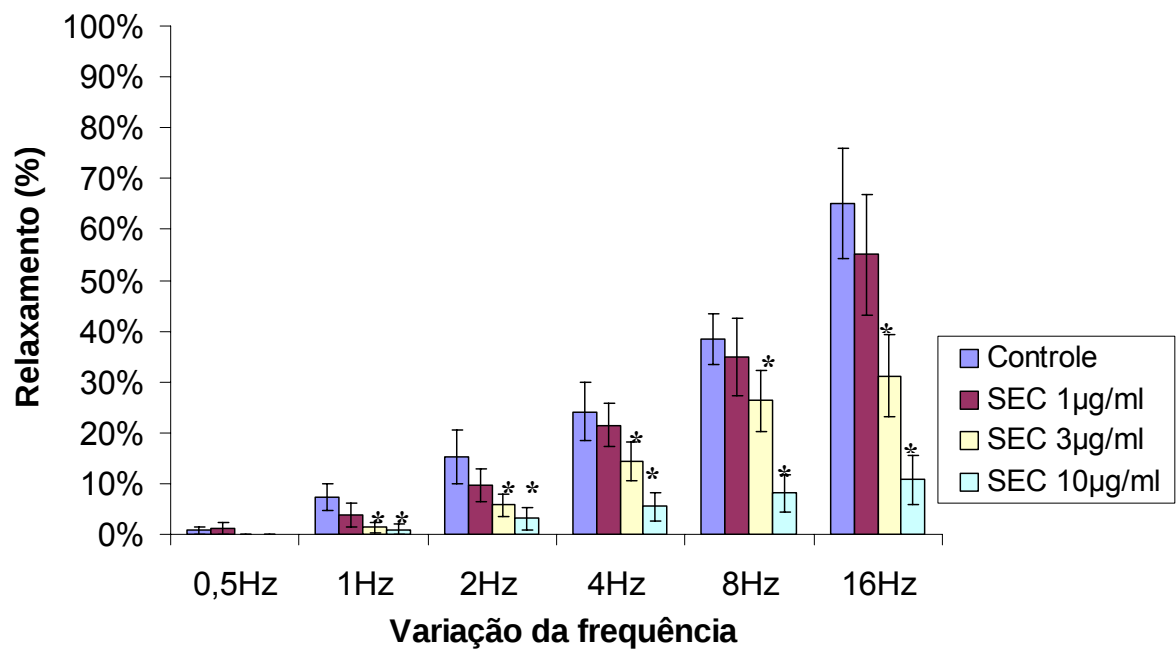
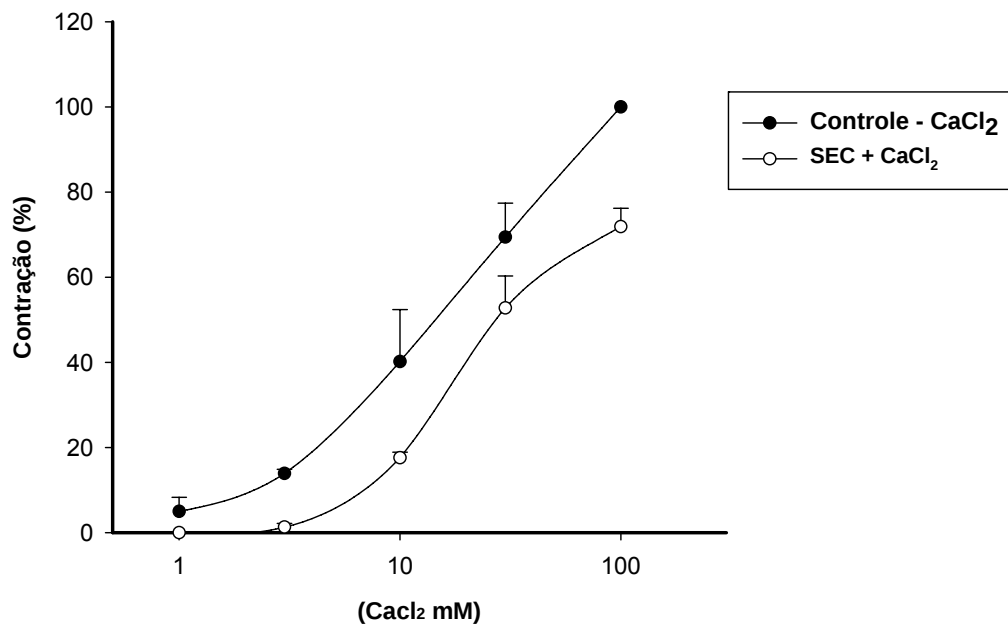


Figura 36 - Relaxamento induzido por ECE (0,5-16Hz) antes e após incubação com SEC (1 – 10 µg/ml) em corpos cavernosos isolados de coelho pré-contraídos por fenilefrina (10 µM). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (N=4) da porcentagem do relaxamento induzido por ECE. *p<0,05, teste *t* de student pareado.

6.2.11 Efeito de SEC sobre contrações induzidas por CaCl_2 , numa solução despolarizante zero cálcio

A contração induzida pela adição cumulativa de cálcio não foi revertida pela pré-incubação do tecido com SEC (3,5 $\mu\text{g/mL}$). A figura 40 mostra a contração induzida por CaCl_2 na ausência e na presença de SEC 3,5 $\mu\text{g/mL}$. A figura 41



mostra o registro fisiografico do efeito de SEC sobre a contração induzida por CaCl_2 .

Figura 37 - Efeito de concentrações cumulativas de CaCl_2 (1 - 100 mM) em corpos cavernosos isolados de coelhos pré-contraídos por solução despolarizante de K^+ 40 mM; 0 Ca^{++} na presença e na ausência de SEC 3,5 $\mu\text{g/mL}$. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (N=4) da porcentagem de contração dos tecidos induzidos por CaCl_2 (1-100 mM). $p > 0,05$, teste t de student pareado.

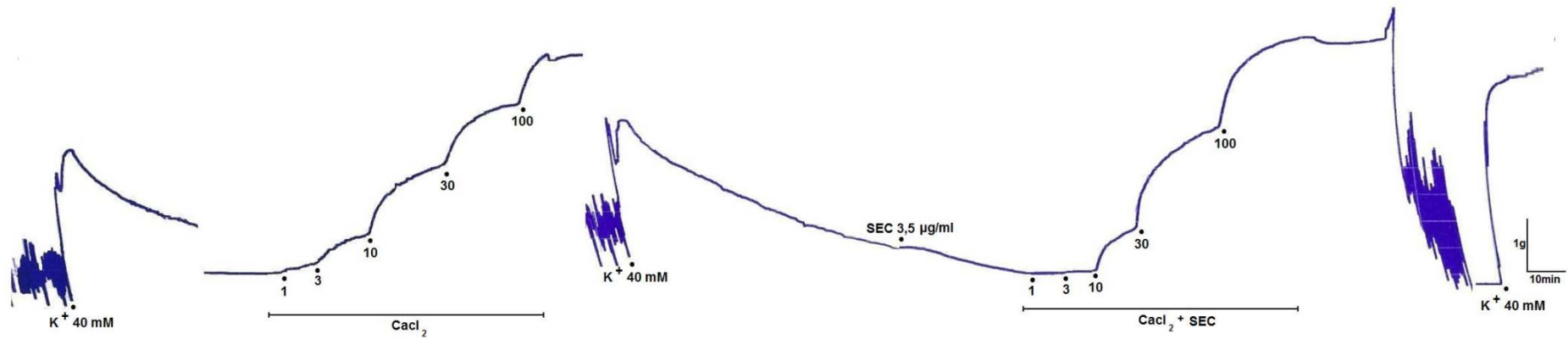


Figura 38 - Registro fisiográfico representativo do efeito de concentrações cumulativas de $CaCl_2$ (1 - 100 $\mu g/ml$) na contração induzida por solução despolarizante de K^+ 40mM, 0 Ca^{++} na presença ou ausência de SEC 3,5 $\mu g/ml$; o gráfico também evidencia a recuperação do tecido após 30 min de lavagem.

A contração induzida pela adição cumulativa de cálcio não foi revertida pela pré-incubação do tecido com SEC (7,5 µg/mL). A figura 42 mostra a contração induzida por CaCl_2 na ausência e na presença de SEC 7,5 µg/mL. A figura 43 mostra o registro fisiografico do efeito de SEC sobre a contração induzida por CaCl_2 .

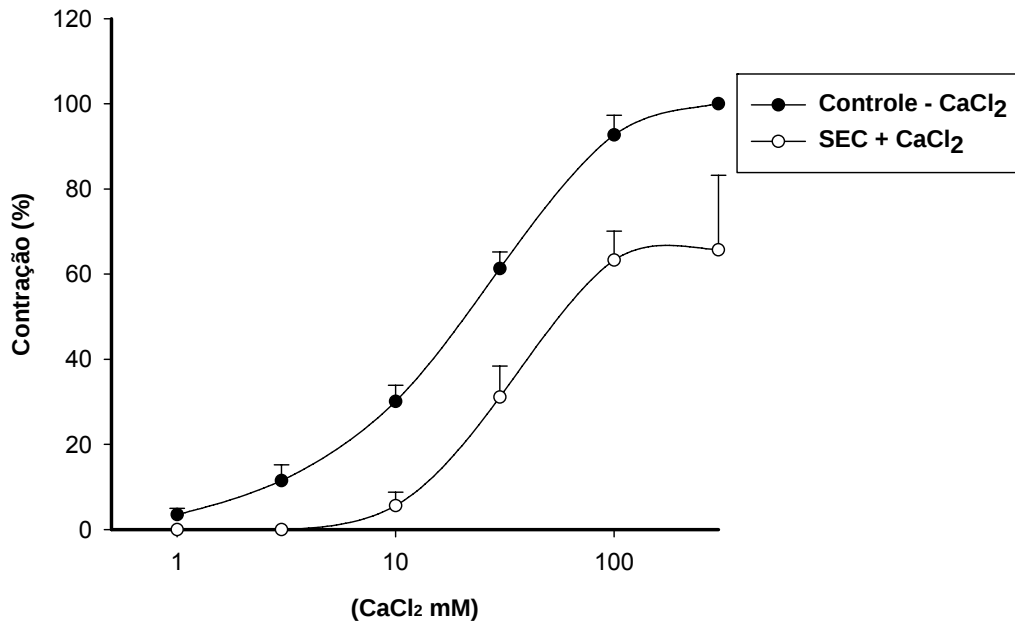


Figura 39 - Efeito de concentrações cumulativas de CaCl_2 (1 - 100 mM) em corpos cavernosos isolados de coelhos pré-contraídos por solução despolarizante de K^+ 40 mM; 0 Ca^{++} na presença e na ausência de SEC 7,5 µg/ml. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (N=4) da porcentagem de contração dos tecidos induzidos por CaCl_2 (1-100 mM). $p > 0,05$, teste t de student pareado

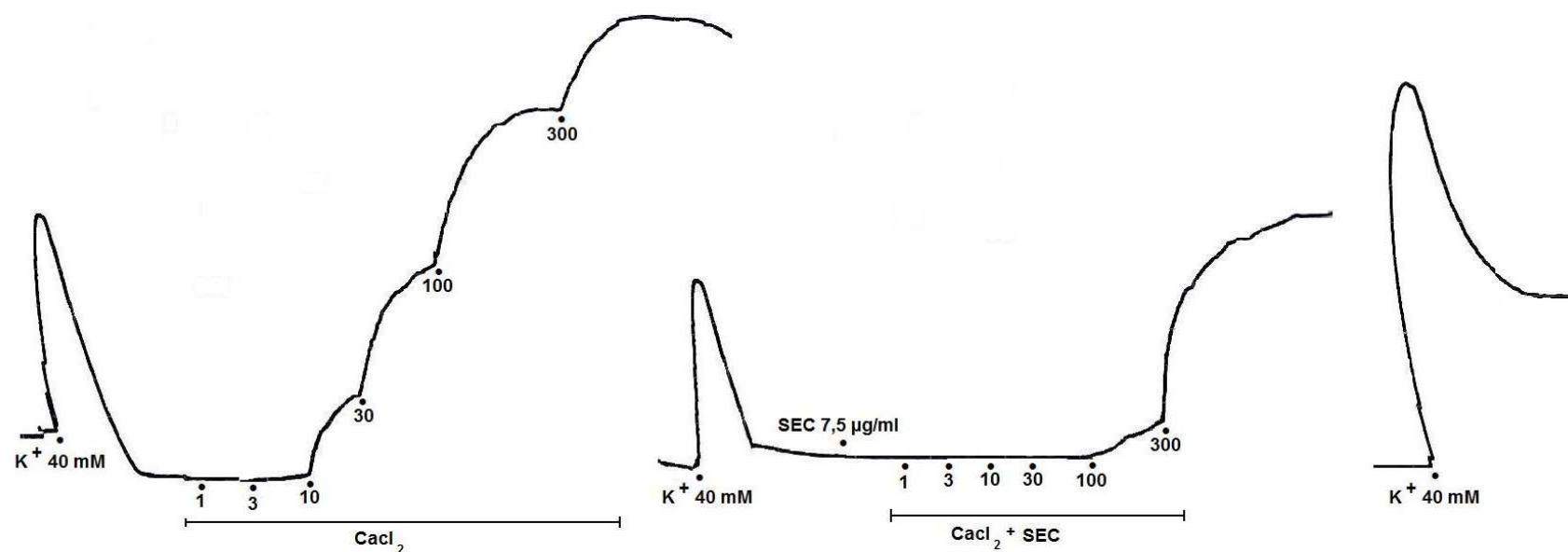


Figura 40 - Registro fisiográfico representativo do efeito de concentrações cumulativas de CaCl₂ (1-300 µg/ml) na contração induzida por solução despolarizante de K⁺ 40mM, 0 Ca⁺⁺ na presença ou ausência de SEC 7,5 µg/ml; o gráfico também evidencia a recuperação do tecido após 30 min de lavagem. O traçado acima é representativo de 4 experimentos.

A contração induzida pela adição cumulativa de cálcio foi revertida pela pré-incubação do tecido com SEC (15 $\mu\text{g/mL}$). A figura 44 mostra a contração induzida por CaCl_2 na ausência e na presença de SEC 15 $\mu\text{g/mL}$. A figura 45 mostra o registro fisiografico do efeito de SEC sobre a contração induzida por CaCl_2 .

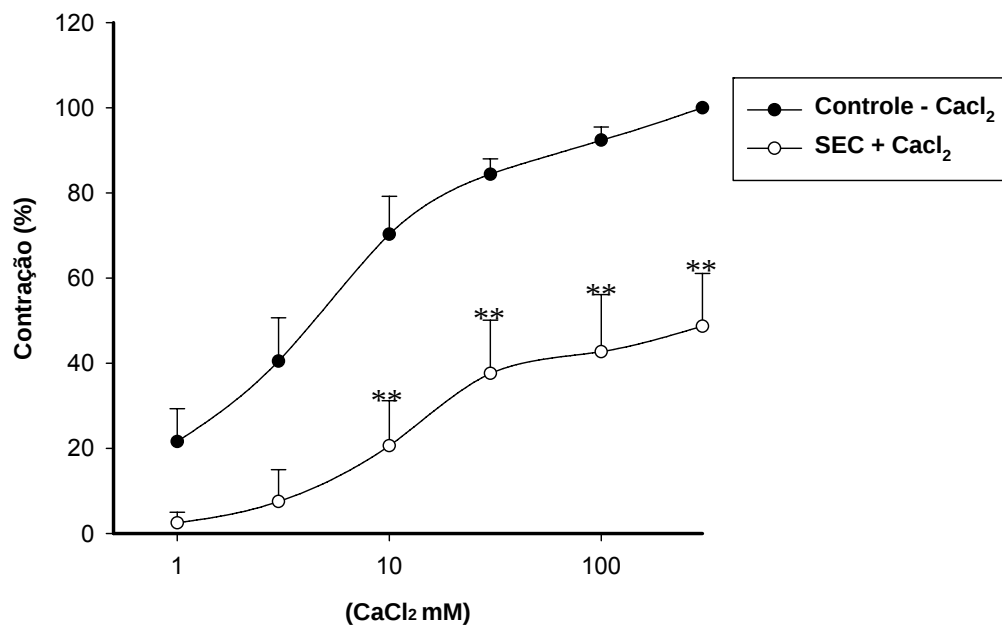


Figura 41 - Efeito de concentrações cumulativas de CaCl_2 (1-100 mM) em corpos cavernosos isolados de coelhos pré-contraídos por solução despolarizante de K^+ 40 mM; 0 Ca^{++} na presença e na ausência de SEC 15 $\mu\text{g/mL}$. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (N=4) da porcentagem de contração dos tecidos induzidos por CaCl_2 (1-100 mM). ** $p < 0,01$, teste t de student pareado.

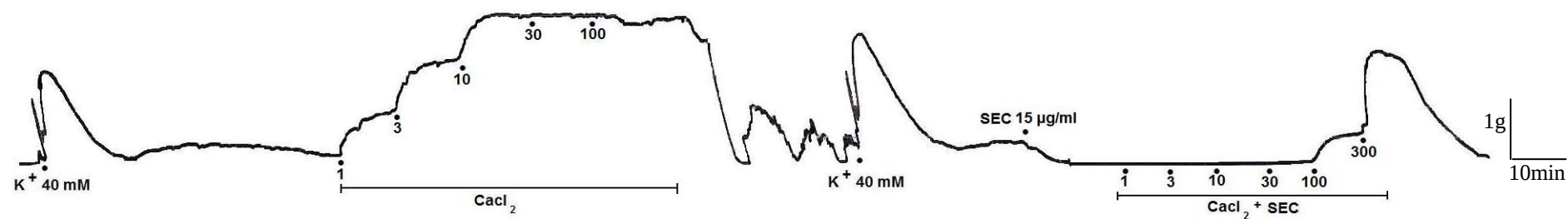


Figura 42 - Registro fisiográfico representativo do efeito de concentrações cumulativas de $CaCl_2$ (1-300 μ g/ml) na contração induzida por solução despolarizante de K^+ 40mM, 0 Ca^{++} na presença ou ausência de SEC 15 μ g/ml. O traçado acima é representativo de 4 experimentos.

7 DISCUSSÃO

A disponibilidade atual de novos medicamentos para o tratamento da disfunção erétil oferece a possibilidade de múltiplas intervenções farmacológicas para o tratamento da impotência. Agentes administrados por via oral, como o sildenafil, tadalafila e vardenafila, embora apresentem a vantagem da conveniência, não manifestam efeito sobre a libido e o desejo sexual.

Pesquisas no campo de produtos naturais podem levar a farmacoterapias mais seguras e eficazes no tratamento da disfunção erétil. Em estudos clínicos, a ioimbina, um alcalóide presente em diferentes espécies do gênero *Aspidosperma*, incluindo *A. quebracho-blanco* apresentou uma comprovada eficácia na disfunção erétil, significativamente maior do que o placebo. As respostas positivas variaram de 34% a 73% para a ioimbina e de 9% a 28% para o placebo (ERNST; PITTLER, 1998).

Neste sentido, estudos anteriores realizados no nosso laboratório demonstraram que uma fração rica em alcalóides indólicos extraída das cascas da raiz de *Aspidosperma ulei* exibe uma ação pró-erétil nos camundongos *in vivo* e um relaxamento em corpos cavernosos de coelhos *in vitro* (CAMPOS *et al.*, 2006, 2007). Continuando essa linha de pesquisa, Campos *et al.* (2007) demonstraram um efeito pró-erétil *in vivo* de SEC (17-nor-subincanadina E), um alcalóide isolado das cascas do caule da mesma planta. Para verificar o mecanismo subjacente na atividade pró-erétil de SEC, o presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade relaxante de SEC no tecido corpo cavernoso *in vitro* e analisar o mesmo efeito em diferentes tipos de tecido muscular liso como o traqueal, o intestinal e o vascular.

Os experimentos foram realizados com corpo cavernoso, aorta, traquéia e duodeno de coelhos montados em banhos de registro isométrico, aos quais SEC foi adicionado nas concentrações de 1 - 100 µg/ml. A atividade do alcalóide foi observada pela construção de curvas de concentração-resposta.

As vantagens desse método para estudos farmacológicos incluem a fácil preparação, poucos equipamentos necessários e o fato de obterem-se curvas concentração-efeito reprodutíveis quando se estudam agentes contráteis ou relaxantes. A resposta à estimulação farmacológica através da adição de agentes contráteis como a fenilefrina, KCl ou outras substâncias é o método mais comum

utilizado para contrair o músculo liso *in vitro* e para analisar a potência e a eficácia de agentes relaxantes (MORELAND, 2001).

Como a ereção peniana envolve o relaxamento vascular e muscular liso durante a estimulação sexual, a aplicação de modelos *in vitro* aumentou significativamente o nosso entendimento dos eventos bioquímicos que ocorrem em nível celular (ANDERSON; WAGNER, 1995). Estes modelos permitem o esclarecimento dos vários neurotransmissores, fatores vasoativos e as vias de sinalização envolvidas nesse processo (MORELAND *et al.*, 2001).

No presente estudo, SEC na concentração de 1 a 100 ug/ml produziu um relaxamento da contração induzida por fenilefrina em corpos cavernosos de coelhos (100%), relaxamento de anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina na presença (100%) e na ausência de endotélio (91,67%), relaxamento em anéis de traquéia pré-contraídos com carbacol ($95,92\% \pm 1,55\%$) e diminuição da atividade espontânea do duodeno ($93,4\% \pm 6,6\%$). Os dados mostram claramente que o alcalóide em estudo é capaz de causar um relaxamento em quatro diferentes tipos de musculatura lisa, que esse relaxamento é reversível e ocorre de maneira dose-dependente.

A seletividade de uma droga para um desejado local de ação é um fator chave para determinar os efeitos colaterais desta droga. Ao comparar as doses de IC_{50} para os tecidos estudados, verificou-se que SEC apresentou uma IC_{50} menor para o corpo cavernoso [7,174 (3,155 - 16,31) $\mu\text{g/ml}$] quando comparado à IC_{50} de aorta [26,15 (6,088 - 112,4) $\mu\text{g/ml}$], traquéia [60,25 (0,330 - 109,80) $\mu\text{g/ml}$] e duodeno [76,78 (33,09 - 178,2) $\mu\text{g/ml}$], indicando que o tecido muscular liso cavernoso é mais sensível às ações relaxantes de SEC, o que sugere uma seletividade de SEC para este tecido.

Alguns estudos da literatura pesquisada relatam que várias substâncias usadas em disfunção erétil também apresentam efeito sobre outros tecidos vasculares. Os inibidores de fosfodiesterase (sildenafil, tadalafil e vardenafil), por exemplo, são capazes de relaxar aortas de rato isoladas pré-contraídas com fenilefrina (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Embora a ação relaxante das substâncias citadas acima se estenda a outros leitos vasculares, a maior seletividade das mesmas para o tecido cavernoso faz com que possam ser usadas com segurança na maioria dos pacientes com disfunção erétil orgânica, sem efeitos colaterais pronunciados. De maneira semelhante, é possível que SEC, atuando com maior seletividade para

corpo cavernoso, possa futuramente vir a ser empregada nos mesmos casos de disfunção.

Tendo em vista a aparente seletividade da substância em estudo para o corpo cavernoso, um dos objetivos do nosso estudo foi verificar o possível efeito relaxante de SEC em corpos cavernosos de coelhos pré-contraídos com potássio e fenilefrina, e então elucidar o provável envolvimento dos sistemas neuroefetores adrenérgico, colinérgico e nitrérgico, que por excelência é o principal mediador envolvido na fisiologia da ereção, bem como o papel na ativação de canais de potássio e cálcio nesse mecanismo relaxante.

Vários tipos distintos de canais de potássio têm sido descritos na musculatura lisa cavernosa. As correntes de potássio têm um papel importante na determinação do potencial de membrana, nas células excitáveis, incluindo a muscular lisa do corpo cavernoso. Os canais de potássio dependentes de cálcio (K_{Ca}) e canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) têm sido bem caracterizados no músculo liso cavernoso e parecem ser importantes moduladores da atividade desse músculo (CHRIST *et al.*, 2000).

Campos *et al.* (2007), demonstrou que a associação de glibenclamida, um bloqueador específico do canal de potássio regulado por ATP, apamina um bloqueador dos canais de potássio considerados ativos em baixa condutância e caribdotoxina, um bloqueador potente do canal K_{Ca} de alta condutância, não exerceu influência sobre o relaxamento da musculatura lisa cavernosa de coelhos induzido por uma fração rica em alcalóides indólicos extraídos das cascas da raiz de *A. ulei* (SF₃₋₅).

Sendo assim, para avaliar se SEC relaxa o corpo cavernoso de coelhos via ativação de canais de potássio, foram realizados experimentos com bloqueadores específicos. Foi utilizada uma associação de glibenclamida, iberiotoxina (bloqueador dos canais K_{Ca} de alta condutância) e apamina. A associação glibenclamida/iberiotoxina/apamina não exerceu qualquer influência sobre o relaxamento induzido por SEC em tiras de corpo cavernoso de coelho pré-contraídas com fenilefrina, tornando improvável a participação dos canais K_{ATP} e K_{Ca} no efeito relaxante de SEC.

O sistema nervoso autônomo é o responsável pelo controle do relaxamento do músculo liso cavernoso. Os neurotransmissores envolvidos na regulação do tônus do corpo cavernoso, nas condições fisiológicas mais importantes

são a noradrenalina, a acetilcolina e o óxido nítrico. Há também alguns neuropeptídeos envolvidos nesse processo de controle do músculo liso cavernoso, diretamente ou via interação com neurônios colinérgicos e adrenérgicos. Os corpos cavernosos possuem receptores adrenérgicos do tipo α_1 e α_2 . A liberação endógena de noradrenalina pelas terminações nervosas simpáticas mantém o tônus da artéria cavernosa, assim o fluxo sanguíneo para os corpos cavernosos é mantido num nível baixo o suficiente para impedir a intumescência. Assim, o bloqueio simpático mostrou ser um facilitador da ereção e provavelmente explica o efeito de intumescência produzido por antagonistas α_1 intracavernosos (NAYLOR, 1998).

A participação do sistema adrenérgico foi verificada no presente estudo através da pré-contração do tecido com solução despolarizante de potássio (K^+ 40mM) na presença de guanetidina e fentolamina (10 μ M). A guanetidina bloqueia os neurônios adrenérgicos, interrompendo a liberação fisiológica de noradrenalina dos neurônios simpáticos pós-ganglionares, e a fentolamina é um antagonista competitivo de receptores α_1 e α_2 adrenérgicos (KATZUNG, 2006). Mesmo na presença dos bloqueadores de receptores adrenérgicos, SEC causou relaxamento nos segmentos de corpos cavernosos de coelhos, indicando que o bloqueio desses receptores não é o mecanismo provável para a atividade relaxante do alcalóide.

A Ach, o neurotransmissor parassimpático, relaxa o músculo liso cavernoso, estimulando a liberação de NO através da ativação dos receptores muscarínicos M_3 do endotélio vascular (TRAISH, 1990). A estimulação do receptor M_3 induz uma resposta rápida de relaxamento no corpo cavernoso quando o endotélio está íntegro, e esses efeitos são bloqueados pela inibição da óxido nítrico sintase. Para examinar a participação do sistema colinérgico, o tecido foi pré-contráido com fenilefrina (10 μ M) na presença de atropina (10 μ M), um agente antagonista dos receptores muscarínicos que bloqueia seletivamente os efeitos da atividade nervosa parassimpática (RANG; DALE, 2004). A falência do antagonista dos receptores muscarínicos (atropina) em reduzir o relaxamento induzido por SEC sugere que a liberação de Ach não contribui para esse relaxamento e provavelmente exclui o envolvimento dos nervos colinérgicos no mecanismo de ação de SEC.

Para examinar se SEC estaria atuando na via NO/GMPc/L-arg através da inibição da NOS, foram realizados experimentos em que os corpos cavernosos foram pré-contráidos com fenilefrina 10 μ M na presença de L-NAME, um inibidor inespecífico da NO sintase. De acordo com os resultados apresentados, os

relaxamentos evocados por SEC não foram afetados de maneira significativa pela infusão de L-NAME, indicando que a substância em estudo relaxa a preparação de corpo cavernoso de coelho por uma via independente da liberação de NO.

Foram realizados experimentos com banho de corpos cavernosos de coelhos utilizando o ODQ (1H-[1,2,4] Oxadiazole [4,3-a]quinoxalin-1-one), para substanciar a investigação e definir se SEC estaria agindo através do sistema NO/guanilato ciclase solúvel (GCs)/GMPc. A GCs, um dos receptores fisiológicos para o NO, contém um grupamento heme, com o qual o NO interage para ativar a enzima (GERZER *et al.*, 1981). A ativação da GCs pelo NO resulta na conversão de GTP em GMPc, segundo mensageiro que medeia o relaxamento induzido por vários vasodilatadores como o nitroprussiato de sódio (SNP), bem como por drogas como Ach, que atuam por estimular a liberação de NO (RAPOPORT; MURAD, 1983; SCHULTZ; SCHULTZ; SCHULTZ, 1977).

O ODQ é um potente e seletivo inibidor da guanilato ciclase solúvel (GC_s) estimulada pelo NO. Essa substância inibe por mecanismo competitivo a estimulação promovida pelo NO, no seu sítio de ligação, através da oxidação reversível da fração heme (SCHRAMMEL *et al.*, 1996). Esse composto não bloqueia a GC particulada ou NOS e constitui uma excelente ferramenta para a demonstração do envolvimento do GMPc em vários processos biológicos como, por exemplo, relaxamento de corpo cavernoso de coelho (TEIXEIRA *et al.*, 1998; TEIXEIRA *et al.*, 2001).

No presente estudo, a participação da via NO/GCs/GMPc foi avaliada através da pré-contracção de tiras de corpos cavernosos de coelhos com fenilefrina 10 µM na presença de ODQ 30 µM. A inibição da guanilato ciclase solúvel com ODQ 30 µM resultou em uma redução significativa da resposta relaxante de SEC (1-100 µg/ml) indicando que este alcalóide poderia então estar atuando através de um mecanismo dependente da via NO/GC/GMPc.

Uma das hipóteses é a de que o alcalóide teria alguma ação positiva sobre a enzima guanilato ciclase solúvel, possivelmente através da ligação direta à proteína, com a conseqüente ativação da mesma. Tendo em vista que a introdução de um agente inibidor da GCs foi capaz de reverter parcialmente o relaxamento induzido por SEC.

Estudos realizados com a substância 3-(5'-hidroximetil-2'-fúril)-1-benzil indazol, um ativador de guanilato ciclase conhecido como YC-1, mostraram que, de maneira semelhante a SEC, este composto relaxou tiras de corpos cavernosos pré-contráidas com fenilefrina, e este relaxamento foi parcialmente inibido pelo ODQ. Estes resultados sugeriram que YC-1 se liga à guanilato ciclase solúvel em um sítio diferente do óxido nítrico (HSIEH *et al.*, 2003).

No presente estudo, como a diminuição do relaxamento produzido por SEC na presença de ODQ não foi total, pode-se esperar que, se o alcalóide de fato produz alguma ativação da enzima, seria também através da ligação de SEC a um sítio distinto do sítio para o NO, uma vez que L-NAME, um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), não afeta o relaxamento induzido por SEC.

Foi também avaliado o efeito relaxante de óxido nítrico (1 - 3000 mM) – na presença do alcalóide (10 e 30 µg/ml) em corpos cavernosos de coelhos. Verificou-se que SEC nas duas concentrações potencializou o efeito relaxante do agente doador de NO. Esse efeito poderia provavelmente ser devido ao fato de que SEC e NO estariam agindo de forma sinérgica ativando a GCs ou que SEC estaria de alguma forma inibindo a fosfodiesterase.

Os dados que apontam para SEC como possível ativador da guanilato ciclase solúvel ou inibidor de PDE são corroborados pelos achados dos imuno-ensaios, que verificaram um aumento nas concentrações de GMPc nos corpos cavernosos submetidos à ação do alcalóide.

Resultados semelhantes foram verificados por HSIEH *et al.*, (2003) mostrando que YC-1 e nitroprussiato de sódio (um doador de NO) causaram um aumento concentração-dependente nos níveis de GMPc em culturas de células musculares lisas de corpo cavernoso de coelho. Além disso, YC-1 (HSIEH *et al.*, 2003) e SEC (CAMPOS *et al.*, 2007) demonstraram efeito pró-erétil *in vivo*, tendo ambos evocado ereção peniana em ratos. Esses dados sugerem que as propriedades pró-eréteis semelhantes de SEC e YC-1 podem estar subsidiadas por eventos bioquímicos também semelhantes.

Antes da utilização clínica de inibidores de PDE-5 para o tratamento da disfunção erétil, compostos que atuam através dos mecanismos dependentes de AMPc foram amplamente utilizados em pacientes com disfunção erétil. Alguns desses agentes ainda são clinicamente relevantes, principalmente em pacientes que não toleram o tratamento com inibidores de PDE. Esses compostos são:

prostaglandina E1 (PGE-1), polipeptídeo intestinal vasoativo e forskolin, um diterpeno extraído da *Coleus forskolii* que estimula a enzima adenilato ciclase (AC) por um mecanismo independente da ativação da proteína-G (ÜCKERT *et al.*, 2004).

Também foi avaliado o efeito relaxante de um ativador da adenilato ciclase – forskolin (10^{-9} – 10^{-5} M) – na presença do alcalóide (10 e 30 µg/ml). Verificou-se que SEC nas duas concentrações potencializou o efeito relaxante do forskolin. Esse efeito poderia ser devido ao aumento na produção de AMPc por SEC como mostrado no imuno-ensaio. Além do aumento nas concentrações de GMPc, os imuno-ensaios também mostraram um acréscimo nos níveis de AMPc no tecido erétil submetido às ações de SEC (15 µg/ml).

O aumento nos níveis de AMPc pode ser explicado pelo fato de que uma elevação dos níveis de GMPc induzida pela inibição da fosfodiesterase ou pela ativação da GCs pode causar uma inibição alostérica da fosfodiesterase-3 (PDE-3), enzima que hidrolisa AMPc, com um conseqüente aumento dos níveis desse nucleotídeo (ÜCKERT *et al.*, 2004). Esta seria a hipótese mais provável para um aumento de AMPc no presente estudo.

Dentre as diversas formas de estimulação de um tecido excitável destaca-se a Estimulação por Campo Elétrico (ECE). No presente estudo, foram observadas as atividades de SEC sobre o relaxamento tecidual evocado por ECE. A estimulação por campo elétrico (ECE) relaxa o músculo liso dos corpos cavernosos pela formação endógena e liberação de NO e GMPc. A musculatura lisa cavernosa relaxa em resposta a ECE na presença de atropina e guanetidina; esse efeito é abolido na presença de tetrodotoxina (TTX), L-NAME, oxihemoglobina e azul de metileno e restaurado na presença de L-arginina. Após a estimulação elétrica do corpo cavernoso de coelho, são observados níveis teciduais aumentados de nitrito e citrulina (IGNARRO *et al.*, 1990; BUSCH *et al.*, 1992). Com a inibição da NOS ou o bloqueio da condução axonal, observa-se bloqueio na geração desses metabólitos do NO.

Nesse estudo, a ECE causou relaxamento dos segmentos de corpo cavernoso de coelho de modo freqüência dependente, sendo tais respostas transitórias e de desenvolvimento rápido, em preparações pré-contraídas por fenilefrina 10 µM. O nível máximo de relaxamento das preparações foi alcançado a freqüências de 8 – 16 Hz. Na presença de SEC (1 - 10 µg/ml) houve uma diminuição

significativa do relaxamento do tecido cavernoso evocado pela ECE de forma dose dependente.

De forma semelhante, um estudo realizado por Hallén, Wiklund e Gustafsson (2007) mostrou que os inibidores seletivos de fosfodiesterase-5 (IPDE-5) de forma inesperada possuem efeito inibitório sobre a liberação neuronal de NO induzida pela estimulação por campo elétrico, provavelmente através de um feedback negativo induzido por GMPc; esse feedback negativo explicaria porque o priapismo não é visto durante a terapia com inibidores de PDE-5.

Outra hipótese para explicar o mecanismo pelo qual SEC poderia ser responsável pela inibição do relaxamento do corpo cavernoso evocado pela ECE seria a de que o alcalóide estaria atuando também através do bloqueio no influxo do cálcio, uma vez que o cálcio é essencial para a exocitose de vesículas contendo neurotransmissores envolvidos no relaxamento da musculatura lisa cavernosa, entre eles NO.

Existem também evidências para o papel da entrada do cálcio na contração tônica das células musculares lisas do corpo cavernoso e essa contração tônica pode ser abolida por bloqueadores de canais de cálcio voltagem dependentes, tais como nifedipina, ou pela remoção do cálcio extracelular. (CAMPOS *et al.*, 2007). No presente estudo, foram realizados experimentos para evidenciar o papel do cálcio no relaxamento induzido pelo alcalóide através da observação da contração do tecido cavernoso após a adição cumulativa de CaCl_2 (1 – 300 mM) na ausência e na presença de SEC (3,5; 7,5 e 15 $\mu\text{g/ml}$).

SEC parece bloquear o influxo extracelular de cálcio, isso é reforçado pelo fato de que SEC na concentração de 15 $\mu\text{g/ml}$ impediu as contrações na musculatura lisa cavernosa despolarizada, em um meio zero cálcio, geradas por concentrações cumulativas de cálcio no meio, comprovando um possível envolvimento de SEC no bloqueio do influxo de íons cálcio.

Estudos anteriores mostraram que uma fração rica em alcalóides indólicos extraídos das cascas da raiz de *Aspidosperma ulei* (SF_{3-5}) e SEC causaram uma diminuição do influxo de $^{45}\text{Ca}^{++}$ basal e estimulado em fatias de córtex de ratos (dados não publicados).

Este estudo representa a primeira tentativa de investigar o mecanismo relaxante de SEC (17-nor-subincanadina E) sobre a musculatura lisa cavernosa de coelhos. Como sugerido até o presente momento, SEC poderia estar atuando

através da ativação da guanilato ciclase solúvel ou da inibição da fosfodiesterase, entretanto, podem existir outros mecanismos de ação que contribuem para o efeito relaxante de SEC, como o possível bloqueio do influxo de cálcio para as células.

SEC promoveu o relaxamento de diferentes tipos de músculo liso, e mostrou, entre tecidos vasculares, um maior grau de relaxamento para o tecido cavernoso do que em anéis de aorta de coelho. Os dados do presente trabalho, combinados com estudos anteriores realizado *in vivo*, sugerem que *Aspidosperma ulei* Markgr. pode ser explorada como uma alternativa para o tratamento da disfunção erétil. Entretanto, é preciso avaliar a segurança desse produto em associação com drogas anti-hipertensivas.

Um grande número de mecanismos foram identificados para a regulação local da contratilidade da musculatura lisa peniana. Moléculas que possuem participação ativa nesse mecanismo podem ser consideradas alvos para o desenvolvimento de drogas para o tratamento da disfunção erétil.

8 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1. O alcalóide SEC (17-nor-subincanadina E), nas concentrações de 1 a 100 µg/mL, demonstrou atividade relaxante *in vitro* nos tecidos estudados – corpo cavernoso, aorta, traquéia e duodeno - esse relaxamento é reversível e ocorre de maneira dose-dependente.
2. A IC₅₀ obtida revelou uma sensibilidade maior do corpo cavernoso para as ações relaxantes de SEC.
3. SEC induziu relaxamento *in vitro* de corpos cavernosos pré-contraídos com fenilefrina e potássio. É improvável que o efeito relaxante de SEC seja devido a uma ação nos sistemas adrenérgico, colinérgico ou canais de potássio.
4. O alcalóide aumentou os níveis de GMPc e AMPc, apresentando um comportamento semelhante aos ativadores de guanilato ciclase ou inibidores de PDEs.
5. A atividade relaxante sobre a musculatura lisa cavernosa desse alcalóide pode também estar relacionada a um possível bloqueio do influxo extracelular de cálcio nas células.

REFERÊNCIAS

ABREU E SILVA, M.; OLIVEIRA, A. B.; SOUZA FILHO, J. D.; CHIARI, E.; BRAGA, F.C.; LOMBARDI, J.A. Isolamento de alcalóides de *Aspidosperma tomentosum* biomonitorado por testes *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*. In: SEMANA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFMG, 3., 2001, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2001.

AMRANI, Y.; MAGNIER, C.; ENOUF, J.; WUYTACK, F.; BRONNER, C. Ca^{++} increase and Ca^{++} -influx in human tracheal smooth muscle cells: role of Ca^{2+} -pools controlled by sarco-endoplasmic reticulum Ca^{++} -ATPase 2 isoform. **Br. J. Pharmacol.**, v.115, p. 1204-1210, 1995.

ANDERSSON, K. E. Pharmacology of penile erection. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, n. 3, p. 417- 450, 2001.

ANDERSSON, K. E.; WAGNER, G. Physiology of penile erection. **Physiol. Rev.**, v. 75, n. 1, p. 191-236, 1995.

ANWER, K.; TORO, L.; OBERTI, C.; STEFANI, E.; SANBORN, B. M. Calcium activated potassium channels in pregnant rat myometrium: modulation by α -adrenergic agents. **Am. J. Physiol.**, v. 263, n. 32, p.1049 -1056, 1992.

BANERJEE, J. N.; LEWIS, J. J. Pharmacological studies in the apocynaceous genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc., *Aspidosperma ulei* MGF. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 7, n. 1, p. 42-45, 1954.

BENSON, G. S.; MCCONNELL, J.; LIPSHULTZ, L. I.; CORRIERE, J. R.; WOOD, J. Neuromorphology and neuropharmacology of the human penis: an in vitro study. **J. Clin. Invest.**, v. 65, n. 2, p. 506 -513, 1980.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. (Ed.). **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BURNETT, A. L. Role of nitric oxide in the physiology of erection. **Biol. Reprod.**, v. 52, p. 485-489, 1997.

BUSCH, P. A.; ARONSON, W. J.; BUGA, G. M.; RAJFER, J.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. **J. Urol.**, v. 147, p. 1650 -1655, 1992.

CAMPOS, A. R.; DEOCLECIANO, O. B.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. 15R-16,17-Seco-subincanadine E, a Pro-erectile Indole Alkaloid Isolated from *Aspidosperma ulei* Stem Bark. In: EUROPEAN TRADITIONAL MEDICINE INTERNATIONAL CONGRESS, 2007, Vince. **Evidence-based complementary and alternative medicine**. Vince, 2007. v. 4, p. 56-56.

CAMPOS, A. R.; LIMA JUNIOR, R. C. P.; UCHOA, D. E. A. ; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 104, n. 1, p. 240-244, 2006.

CARVALHO, L. H.; BRANDÃO, M. G. L.; SANTOS-FILHO, D.; LOPES, J. L. C.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, p.11-13, 1991.

CASTEELS, R.; SUZUKI, H. The effect of histamine on the smooth muscle cells of the ear artery of the rabbit. **Eur. J. Physiol.**, v. 387, n. 1, p. 17-25, 1980.

CHAPPELL, M. C.; IYER, S. N.; DIZ, D. I.; FERRARIO, C. M. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. **Hypertension**, v. 31, p. 362–367, 1998.

CHEN, X. L.; REMBOLD, C. M. Phenylephrine contracts rat tail artery by one electromechanical and three pharmacomechanical mechanisms. **Am. J. Physiol.**, v. 268, n. 1, pt. 2, p. H74-H81, 1995.

CHRIST, G. J.; WANG, H. Z.; VENKATESWARLU, Z.; ZHAO, W.; DAY, N. S. Gap junctions and ion channels: relevance to erectile dysfunction. **Int. J. Imp. Res.**, v. 12, p. S12 - S20, 2000.

CIRINO, G.; FUSCO, F.; IMBIMBO, C.; MIRONE, V. Pharmacology of erectile dysfunction in man. **Pharmacol. Therap.**, v. 111, n. 2, p. 400-423, 2005.

CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; SERUR, L. M.; Isolation and characterisation of the monoterpenoid indole alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. **Phytochemistry**, v. 22, p.15-26, 1983.

DAIL, W. G. Autonomic innervation of male reproductive genitalia. In: MAGGI, C. A. (Ed.). **Nervous control of the urogenital system**. London: Harwood Academic, 1993. cap. 3. p. 69-101.

DEUTSCH, H. F.; EVENSON, M. A.; DRESCHER, P.; SPARWASSER, C.; MADSEN, P. O. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 12, n. 10, p. 1283-1287, Oct. 1994.

DHABUWALA, C. B.; RAMAKRISHNA, C.V.; ANDERSSON, G. F. Beta adrenergic receptors in human cavernous tissue. **J. Urol.**, v. 133, n. 4, p. 721-723, 1985.

DROOGMANS, G.; RAEYMAEKERS, L.; CASTEELS, R. Electro- and pharmacomechanical coupling in the smooth muscle cells of the rabbit ear artery. **J. Gen. Physiol.**, v. 70, n. 2, p. 129-148, 1977.

ERNST, E.; PITTLER, M. H. Yohimbine for erectile dysfunction: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **J. Urol.**, v. 159, p. 433-436, 1998.

EVANS, W. C. **Trease and evan's farmacology**. 14th ed. London: WB Saunders, 1996.

EXTON, H. Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 56, p. 349-369, 1994.

FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. S. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, p. 499-507, 2005.

FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; GOBBI FILHO, L.; PINTO, L. H. B.; OLIVEIRA, A. J. B. Anti-leishmanial activity of alkaloidical extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.

FRANÇA, O. O.; BROWN, R. T.; SANTOS, C. A. Uleine and demethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 208-210, 2000.

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

GARCIA RUBEN, M. F.; BROWN JR., K. S. Alkaloids of three *Aspidosperma* species. **Phytochemistry**, v. 15, n. 6, p. 1093 -1095, 1976.

GERZER, R.; BÖHME, E.; HOFMANN, F.; SCHULTZ, G. Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. **FEBS Letters**, v.132, n. 1, p. 71-74, 1981.

GUARRERA, P.M.; MARIGNOLI, G.F.S. Ethnobotanical and thnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy). **J. Ethnopharmacol.**, v. 96, p. 429-444, 2005.

HAEUSLER, G.; DE-PEVER, E. Rabbit aorta: electrical properties and agonist-induced depolarization. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 166, n. 2, p. 175-182, 1989.

HALLÉN, K.; WIKLUND, N. P.; GUSTAFSSON, L. E. Inhibitors of phosphodiesterase 5 (PDE 5) inhibit the nerve-induced release of nitric oxide from the rabbit corpus cavernosum. **Br. J. Pharmacol.**, v.150, n. 3, p. 353–360, 2007.

HAROOTUNIAN, A. T. ; KAO, P. ; PARANJAPE, S.; ADAMS, S. R.; POTTER, B. V. L.; TSIEN, R. Y. Cytosolic Ca²⁺ oscillations in REF52 fibroblasts: Ca(2+)- stimulated IP₃ production or voltage-dependent Ca²⁺ channels as key positive feedback elements. **Cell Calcium**, v. 12, n. 2/3, p. 153-164, 1991.

HARTSHORNE. D. Biochemistry of the contractile process in smooth muscle. In JOHNSON, L R. (Ed.) **Physiology of the gastrointestinal tract**. 2nd ed. New York: Raven Press, 1987. p. 423-482.

HAYASHIDA, H.; OKAMURA, T.; TOMOYOSHI, T.; TODA, N. Neurogenic nitric oxide mediates relaxation of canine corpus cabernosum. **J. Urol.**, v.155, p. 1122-1127,1996.

HEATON, J. P. Apomorphine: an update of clinical trial results. **Int. J. Impot. Res.**, v. 12, n. 4, p. S67-S73, 2000.

HEDLUND, P.; ALM, P.; ANDERSSON, K. E. NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. **Br. J. Pharmacol.**, v.127, n. 2, p. 349-360,1999.

HEDLUND, P.; ASZODI, A.; PFEIFER, A.; ALM, P.; HOFMANN, F.; AHMAD, M.; FASSLER, R.; ANDERSSON, K.E. Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 5, p. 2349–2354, 2000.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2001.

HERMSMEYER, K.; STUREK, M.; RUSCH, N. Calcium channel modulation by dihydropyridines in vascular smooth muscle. **N. York Acad. Sci.**, v. 522, p. 25-31, 1988.

HIMPENS, B.; KITWAZA, T.; SOMLYO A. P. Agonist-dependent modulation of Ca²⁺ sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. **Pflugers Arch.**, v. 417, n. 1, p. 21-28, 1990.

HIMPENS, B.; MISSIAEN, L.; CASTEELS, R. Ca²⁺ homeostasis In vascular smooth muscle. **J. Vasc. Res.**, v. 32, n. 4, p. 207-219, 1995.

HOLMQUIST, F.; HEDLUND, H.; ANDERSON, K. E. Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. **J. Physiol.**, v. 449, p. 295-311, 1992.

HOYLE, C. H. V.; BURNSTOCK, G. Neromuscular transmission in the gastrointestinal tract. In: MACKLOUF, M. G. (Ed.). **Handbook of physiology**. Washington, D. C.: American Physiological Society, 1989. v. 1, p. 435-463, 1989.

HSIEH, G. C.; O'NEILL, A. B.; MORELAND, R. B.; SULLIVAN, J. P.; BRIONI, J. D. YC-1 potentiates the nitric oxide/cyclic GMP pathway in corpus cavernosum and facilitates penile erection in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 458, n. 1-2, p. 183-189, 2003.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 9265-9269, 1987a.

IGNARRO, L. J.; BUSH, P. A.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; FUKUTO, J. M.; RAJFER, J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 170, p. 843-850, 1990.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ. Res.**, v. 61, p. 866-879, 1987b.

ISHIKAWA, T.; HUME, J. R.; KEEF, K. D. Regulation of Ca^{2+} channels by cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, v. 73, n. 6, p. 1128-1137, 1993.

ITOH, T.; KURIYAMA, H.; UENO, H. Mechanisms of the nitroglycerine-induced vasodilation in vascular smooth muscles of the rabbit and pig. **J. Physiol.**, v. 343, p. 233-252, 1983.

JÁCOME, R. L. R. P.; SOUZA, R. A.; OLIVEIRA, A. B. Comparação cromatográfica entre o extrato de *Aspidosperma parvifolium* e o fitoterápico "Pau-Pereira". **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13, p. 39-41, 2003.

KARAKI, H.; CSATO, K.; OZAKI, H.; MURAKAMI, K. Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 156, n. 2, p. 259-266, 1988.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KEEF, K. D.; BOWEN, S. M. Effect of ACh on electrical and mechanical activity in guinea pig coronary arteries. **Am. J. Phys.**, v. 257, p. H1096-H1103, 1989.

KEEF, K. D.; ROSS, G. Rhythmic coronary arterial contractions: changes with time and membrane potential. **Am. J. Physiol.**, v. 250, n. 3, p. H524-H529, 1986.

KIM, N.; AZADOI, K. M.; GOLDESTINE, I.; SAENZ DE TEJADA, I. A oxide nitric-like factor mediates neurogenic relaxation of penile smooth muscle. **J. Clin. Invest.**, v. 88, n. 1, p. 112-118, 1991.

KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. P. Desensitization and muscarinic resensitization of force and myosin light chain phosphorylation to cytoplasmic Ca^{2+} in smooth muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 172, p. 1291-1297, 1990.

KOTECHA, N.; NEILD, T. O. Actions of vasodilator nerves on arteriolar smooth muscle and neurotransmitter release from sympathetic nerves in the guinea-pig small intestine. **J. Physiol.**, v. 489, n. 3, p. 849-855, 1995.

KRANE, R. J.; GOLDSTEIN, I.; SAENZ DE TEJADA, I. Impotence. **N. Engl. J. Med.**, v. 321, p. 1648-1659, 1989.

KUTCHAN, T. Alkaloid biosynthesis: the basis for metabolic engineering of medicinal plants. **Plant Cell**, v. 77, p. 1059-1070, 1995.

LEE, H. C.; AARHUS, R. Wide distribution of an enzyme that catalyzes the hydrolysis of cyclic ADP-ribose. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1164, n. 1, p. 68-74, 1993.

LEHNER, H.; SHCMUTZ, J. Dihydro-olivacin um dihydro-ellipticin (u-alkaloid D) aus *Aspidosperma ulei* MGF. **Helvetica Chim. Acta**, v. 44, n. 2, p. 444 - 446, 1961.

MACABEO, A. P. G.; KROHN, K.; GEHLE, D.; READ, R. W.; BROPHY, J. J.; CORDELL, G. A.; FRANZBLAU, S. G.; AGUINALDO, A. M. Indole alkaloids from the leaves for Philippine *Alstonia scholaris*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 10, p. 1158-1162, 2005.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. R.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, maio 2002.

MAJERUS, P. W. Inositol phosphate biochemistry. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 61, p. 225-250, 1992.

MARINHO, M. L.; ALVES, M. S.; RODRIGUES, M. L. C.; ROTONDANO, T. E. F.; VIDAL, I. F.; SILVA, W. W.; ATHAYDE, A. C. R. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 9, n. 3, p. 64-69, 2007.

MASSIOT, G.; BOUMENJDEL, A.; NUZILLARD, J. M.; RICHARD, B.; MEN-OLIVIER, L. L.; DAVID, B.; HADI, H. A. Alkaloids from *Alstonia undulifolia*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 3, p. 1078-1079, 1992.

MCDANIEL, N. L.; CHEN, X. L.; SINGER, H. A.; MURPHY, R. A.; REMBOLD, C. M. Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing $[Ca^{2+}]_i$ and uncoupling stress from myosin phosphorylation. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. C461-C467, 1992.

MCPHERSON, G. A.; ANGUS, J. A. Evidence that acetylcholine-mediated hyperpolarization of the rat small mesenteric artery does not involve the K⁺ channel opened by cromakalim. **Br. J. Pharmacol.**, v. 103, n. 1, p. 1184-1190, 1991.

MEISS, R. A. Mechanical properties of gastrointestinal smooth muscle. In: SCHULTZ, S. G., WOOD, J. D.; RAUNER, B. B. (Ed.). **Handbook of physiology**. Baltimore: American Physiological Society, 1989. cap. 8, p. 273-329.

MISSIAEN, I. ; DE SMEDT, H. ; DROOGMANS, G. ; CASTEELS, R. Ca²⁺ release induced by inositol 1,4,5- triphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal Ca²⁺ in permeabilized cells. **Nature**, v. 357, p. 599-602, 1992.

MURPHY, M. E.; BRAYDEN, J. E. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. **J. Physiol.**, v. 486, p. 47-58, 1995.

NAYLOR, A. M. Endogenous neurotransmitters mediating penile erection. **Br. J. Urol.**, v. 81, p. 424-431, 1998.

NEILD, T. O.; KOTECHEA, N. Relation between membrane potential and contractile force in smooth muscle of the rat tail artery during stimulation by norepinephrine, 5-hydroxytryptamine, and potassium. **Circ. Res.**, v. 60, n. 5, p. 791-795, 1987.

NELSON, M. T.; STANDEN, N. B.; BRAYDEN, J. E.; WORLEY, J. F. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. **Nature**, v. 336, n. 6197, p. 382-385, 1988.

NIH Consensus Conference. Impotence. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 270, p. 83-90, 1993.

NIXON, G. F.; MIGNERI, G. A.; SOMLYO, A. V. Immunogold localization of inositol 1,4,5-triphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle. **J. Muscle Res. Cell Motil.**, v. 15, n. 6, p. 682-700, 1994.

NOGUEIRA, M. A.; D'OCON, M. P. Participation of intracellular calcium stores in serotonin-induced contractions in rat aorta. **Pharmacology**, v. 47, p. 145-151, 1993.

OZAKI, H.; GERTHOFFER, W. T.; PUBLICOVER, N.; FUSEYANI, N.; SANDERS, K. M. Time-dependent changes in Ca^{2+} sensitivity during phasic contraction of caruncle antral smooth muscle. **J. Physiol.**, v. 440, p. 207-224, 1991.

PACAUD, P.; LOIRAND, G. Release of Ca^{2+} by Noradrenaline and ATP from the same Ca^{2+} store sensitive to both InSP3 and Ca^{2+} in rat portal vein mYQcytes. **J. Physiol.**, v. 484, n. 3, p. 549- 555, 1995.

PALMER, R. J. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

PEREIRA, M.; JÁCOME, R. P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B. ; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Quím. Nova**, v. 30, n. 4, p. 979-983, 2007.

PICADA, J. N.; SILVA, K. V. C. L.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, A. T.; HENRIQUES, J. A. P.; Genotoxic effects of structurally related beta-carboline alkaloids. **Mutat. Res.**, v.379, p.135,1997.

PICKARD, R. S.; POWELL, P. H.; ZAR, M. A. The effects of inhibition of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 104, p. 755-759, 1991.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Quím. Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

POPESCU, L. M.; FORIL, C. P.; HINESCU, M.; PANOIU, C.; CİNTEZA, M.; GHERASIM, L. Nitroglycerin stimulates the sarcolemmal Ca^{++} -extrusion ATPase of coronary smooth muscle cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 34, n. 10, p. 1857-1860, 1985.

QUAYLE, J. M.; BONEV, A. D.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcitonin gene-related peptide activated ATPsensitive K^{+} currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A. **J. Physiol.**, v. 475, p. 9-13, 1994.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. **Circ. Res.**, v. 52, n. 3, p. 352-357, 1983.

RAPOPORT, R. M.; WALDMAN, S. A.; SCHWARTZ, K.; WINQUIST, R. J. E.; MURAD, F. Effects of atrial natriuretic factor, sodium nitroprusside, and acetylcholine on cyclic GMP levels and relaxation in rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 115, n. 2/3, p. 219-229, Sept. 1985.

RASMUSSEN, H.; TAKUWA, Y. E.; PARK, S. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. **FASEB J.**, v. 1, n. 3, p. 177-185, Sept. 1987.

RECIO, P.; LOPEZ, P. G.; HERNABDEZ, M.; PRIETO, D.; CONTRERAS, J.; GARCIA-SACRISTAN, A. Nitrgenic relaxation of the horse corpus cavernosum. Role of GMPc. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 351, p. 85-94, 1998.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: BARANY, M. (Ed.). **Biochemistry of smooth muscle contraction**. Chicago: Academic Press, 1996. p. 227-239.

_____. Modulation of the $[Ca^{2+}]$ sensitivity of myosin phosphorylation in intact swine arterial smooth muscle. **J. Physiol.**, v. 429, p. 77-94, Oct. 1990.

_____. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, n. 2, p. 129-137, 1992.

REMBOLD, C. M.; WEAVER, B. A.; LINDEN, L. Adenosine triphosphate induces a low $[Ca^{2+}]$ sensitivity of phosphorylation and an unusual form of receptor desensitization in smooth muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 9, p. 5407-5411, 1991.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke**: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia central. Manaus: INPA, 1999.

RIVAS, P.; CASSELS, B. K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y. Effects of some beta-carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 122, n. 1, p. 27-31, 1999.

ROBBERS, J. E.; TYLER, V. E.; SPEEDIE, M. K. **Pharmacognosia e farmacobiotecnologia**. New York: Williams & Wilkins, 1996.

ROBERTSON, B. E.; SCHUBERT, R.; HESCHELER, J.; NELSON, M. T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. C299-C303, 1993.

RODRÍGUEZ-MANZO, G. Yohimbine interacts with the dopaminergic system to reverse sexual satiation: further evidence for a role of sexual motivation in sexual exhaustion. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 372, n. 1, p. 1–8, 1999.

ROJAS, E.; NASSAR-GENTINA, V.; POLLARD, M. E.; LUXORO, M. Mechanisms of calcium release from terminal cisternae in crustacean muscle. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 311, p. 305-317, 1992.

SCHMUTZ, J.; HUNZIKER, F.; HIRT, R. Ulein, das hauptalkaloid von *Aspidosperma ulei* Mg. **Helvetica Chim. Acta**, v. 40, n. 5, p. 1189-1200, 1957.

SCHRAMMEL, A.; BEHRENDT, S.; SCHMIDT, K.; KOESLING, D.; MAYER, B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinolaxin-1-one as a heme site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Mol. Pharmacol.**, v. 50, n. 1, p. 1 – 5, 1996.

SCHULTZ, K-D.; SCHULTZ, K.; SCHULTZ, G. Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. **Nature**, v. 265, p. 750-751, 1977.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2004.

SOARES, K. C. N.; MASUDA, E. T.; RATTMANN, Y. D.; SOUZA, M.; VELA, W. M.; RIECK, L.; DA SILVA-SANTOS, J. E. Efeitos da uleína sobre a contratilidade do músculo liso: envolvimento dos canais de cálcio. In: CONGRESSO DE BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL, 36., 2004, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 2004.

SOMLYO, A. P. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of Smooth Muscle. **Circ. Res.**, v. 57, n. 4, p. 479-507, Oct. 1985.

SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 159, p. 129-145, 1968.

SPERELAKIS, N. Excitation-contraction coupling in cardiac muscle and smooth muscle. In: SPERELAKIS, N.; BANKS, R. O. (Ed.). **Physiology**. Boston: Little Brown, 1993.

STORK, A. P.; COCKS, T. M. Pharmacological reactivity of human epicardial coronary arteries: phasic and tonic responses to vasoconstrictor agents differentiated by nifedipine. **Br. J. Pharmacol.**, v. 113, n. 4, p. 1093-1098, Dec. 1994.

STULL, J. T.; HSU, L. C.; TANSEY, M. G.; KAMM, K. E. Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 27, p. 16683-16690, 1990.

TANG, D. C.; STULL, T.; KUBOTA, Y.; KAMM, K. E. Regulation of the calcium dependence of smooth muscle contraction. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 17, p. 11839-11845, 1992.

TEIXEIRA, C. E.; BENTO, A. C.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; TEIXEIRA, A. S.; VON EICKESTEDT, V.; MUSCARÁ, M. N.; ARANTES, E. C.; GIGLIO, J. R.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. *Tityus serrulatus* venom scorpion relaxes the isolated rabbit corpus cavernosum by activating NANC nitrenergic nerves fibers. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, p. 816-820, 1998.

TEIXEIRA, C. E.; TEIXEIRA, E.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. The role of nitric oxide on the relaxations of rabbit corpus cavernosum induced by *Androctonus australis* and *Buthotus judaicus* scorpion venoms. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 633-639, 2001.

THORNBURY, K. D.; WARD, S. M.; DALZIEL, H. H.; CARL, A.; WESTFALL, D. P.; SANDERS, K. M. Nitric oxide and nitrosocysteine mimic nonadrenergic, noncholinergic hyperpolarization in canine proximal colon. **Am. J. Physiol.**, v. 261, n. 3, pt. 1, p. G553-G557, Sept. 1991.

TODA, N.; AYAJIKI, K.; OKAMURA, T. Nitric oxide penile erectile function. **Pharmacol. Therap.**, v. 106, n. 2, p. 233-266, 2005.

TOSELLI, P.; MORELAND, R.; TRAISH, A. M. Detection of m2 muscarinic acetylcholine receptor mRNA in human corpus cavernosum by in-situ hybridization. **Life Sci.**, v. 55, n. 8, p. 621-627, 1994.

TRAISH, A. M.; NETSUWAN, N.; DALEY, J.; PADMAN-NATHAN, P.; GOLDSTEIN, I.; SÁENZ DE TEJADA, I. A heterogenous population of α -1-Ars mediates contraction of human corpus cavernosum smooth muscle to norepinephrine. **J. Urol.**, v. 153, n. 1, p. 222-227, Jan. 1994.

TWORT, C. H.; VAN BREEMEN, C. Cyclic guanosine monophosphate-enhanced sequestration of Ca^{2+} by sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle. **Circ. Res.**, v. 62, n. 5, p. 961-964, 1988.

ÜCKERT, S.; HEDLUND, P.; WALDKIRCH, E.; SOHN, M.; JONAS, U.; ANDERSSON, K-E.; STIEF, C. G. Interactions between cGMP- and cAMP-pathways are involved in the regulation of penile smooth muscle tone. **World J. Urol.**, v. 22, n. 4, p. 261–266, 2004.

VALDIVIA, C. ; VAUGHAN, D. ; POTTER, B. V. ; CORONADO, R. Fast release of ^{45}Ca induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle: evidence for two types of Ca^{2+} release channels. **Biophys. J.**, v. 61, n. 5, p. 1184-1193, 1992.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 78, n. 2-3, p. 193-200, 2001.

WHITE, M. V. Mucarinic receptors in human airways. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 95, n. 5, pt. 2, p. 1065-1068, 1995.

WORD, R. A.; CASEY, M. L.; KAMM, K. E.; STULL, J. T. Effects of cGMP on $[\text{Ca}^{2+}]_i$, myosin light chain phosphorylation, and contraction in human myometrium. **Am. J. Physiol.**, v. 260, p. C861- C867, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the assessment of herbal medicines**. Geneva, 1991.

ZHANG, Y.; LANG, R. J. Effects of intrinsic prostaglandins on the spontaneous contractile and electrical activity of the proximal renal pelvis of the guinea-pig. **Br. J. Pharmacol.**, v. 113, p. 431- 438, 1994.

APÊNDICE A

Tabela 1. Efeito de SEC na contração induzida por fenilefrina 10 μ M no corpo cavernoso de coelhos. A adição cumulativa de SEC (1 - 100 μ g/mL) produziu relaxamento dos tecidos pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M). Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=4) da porcentagem da resposta máxima obtida. **p<0,01, teste *t* de Student.

DOSE (SEC μ g/mL)	% DE RELAXAMENTO	
	Controle	SEC
1 μ g/mL	3,2 $\pm$ 1,2	11,3 $\pm$ 1,5
3 μ g/mL	10,2 $\pm$ 2,3	28,3 $\pm$ 5,3
10 μ g/mL	19,2 $\pm$ 4,5	61,5 $\pm$ 11,2**
30 μ g/mL	13,1 $\pm$ 4,8	91,1 $\pm$ 0,0**
100 μ g/mL	21,3 $\pm$ 5,2	100,0 $\pm$ 0,0**

Tabela 2. Efeito de SEC na contração induzida por fenilefrina 10 μ M em anéis de aorta de coelhos na presença e na ausência de endotélio A adição cumulativa de SEC (1 - 100 μ g/mL) produziu relaxamento dos tecidos pré-contraídos. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=4) da porcentagem da resposta máxima. p > 0,05.

DOSE (SEC μ g/mL)	% DE RELAXAMENTO	
	Com Endotélio	Sem endotélio
1 μ g/mL	3,3 $\pm$ 1,5	0,30 $\pm$ 0,30
3 μ g/mL	17,0 $\pm$ 6,5	10,9 $\pm$ 4,9
10 μ g/mL	39,6 $\pm$ 10,8	25,1 $\pm$ 9,2
30 μ g/mL	72,5 $\pm$ 13,2	61,0 $\pm$ 16,6
100 μ g/mL	100,0 $\pm$ 0,0	91,7 $\pm$ 8,3

Tabela 3. Efeito de SEC na contração induzida por carbacol (CCH) 10 μ M em anéis de traquéia de coelhos. A adição cumulativa de SEC (1 - 100 μ g/mL) produziu relaxamento dos tecidos pré-contraídos. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=4) da porcentagem da resposta máxima.

DOSE (SEC μ g/mL)	% RELAXAMENTO MÁXIMO
1 μ g/mL	1,4 $\pm$ 0,8
3 μ g/mL	4,0 $\pm$ 1,6
10 μ g/mL	5,1 $\pm$ 3,5
30 μ g/mL	24,5 $\pm$ 8,2
100 μ g/mL	95,9 $\pm$ 1,5

Tabela 4. Efeito de SEC sobre a atividade espontânea de segmentos de duodeno de coelhos. A adição cumulativa de SEC (1 - 100 μ g/mL) produziu uma inibição na atividade espontânea do tecido. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=4) da porcentagem da resposta máxima.

DOSE (SEC μ g/mL)	% RELAXAMENTO MÁXIMO
1 μ g/mL	8,3 $\pm$ 5,9
3 μ g/mL	25,3 $\pm$ 6,5
10 μ g/mL	33,1 $\pm$ 5,4
30 μ g/mL	78,1 $\pm$ 9,0
100 μ g/mL	93,5 $\pm$ 6,6

Tabela 5. Efeito de SEC (1 – 100 µg/mL) em corpos cavernosos de coelhos isolados pré-contráídos com fenilefrina (PHE) 10 µM na presença de glibenclamida (10 µM), apamina e iberiotoxina (0,1µM). A pré-incubação com a associação apamina/iberiotoxina/glibenclamida não alterou a resposta de SEC. Os dados mostram média ± erro padrão (n=4) da porcentagem da resposta máxima obtida. $p > 0,05$.

DOSE (SEC µg/mL)	% DE RELAXAMENTO	
	SEC	SEC + APA/IBTX/GLIB
1 µg/mL	8,6 ± 4,2	3,83 ± 0,56
3 µg/mL	19,3 ± 7,5	10,59 ± 1,01
10 µg/mL	40,8 ± 10,1	25,73 ± 0,92
30 µg/mL	61,4 ± 9,3	43,91 ± 2,34
100 µg/mL	95,3 ± 4,8	89,36 ± 1,69

Tabela 6. Efeito de SEC (1 – 100 µg/mL) em corpos cavernosos de coelhos isolados pré-contráídos com fenilefrina (PHE) 10 µM na presença de atropina (10 µM). A pré-incubação com atropina (10 µM) não alterou a resposta de SEC. Os dados mostram média ± erro padrão (n=4) da porcentagem da resposta máxima obtida, $p > 0,05$.

DOSE (SEC µg/mL)	% DE RELAXAMENTO	
	SEC	SEC + ATROPINA (10µM)
1 µg/mL	12,7 ± 3,0	10,2 ± 2,2
3 µg/mL	38,0 ± 4,0	14,6 ± 3,1
10 µg/mL	63,0 ± 4,9	44,0 ± 3,9
30 µg/mL	79,0 ± 4,3	66,3 ± 4,6
100 µg/mL	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0

Tabela 7. Efeito de SEC (1 – 100 µg/mL) em corpos cavernosos de coelhos isolados pré-contraídos com K⁺ 40 mM na presença de guanetidina e fentolamina (10 µM).. A pré-incubação com guanetidina (10 µM) e fentolamina (10 µM) não alterou a resposta de SEC. Os dados mostram média ± erro padrão (n=4) da porcentagem da resposta máxima obtida, p > 0,05.

DOSE	% DE RELAXAMENTO	
	SEC	SEC + GUA + FEN (10µM)
1 µg/mL	8,6 ± 4,2	1,4 ± 0,7
3 µg/mL	19,3 ± 7,5	18,1 ± 1,7
10 µg/mL	40,8 ± 10,1	35,0 ± 8,9
30 µg/mL	61,4 ± 9,3	64,2 ± 7,6
100 µg/mL	95,2 ± 4,8	100,0 ± 0,0

Tabela 8. Efeito de SEC (1 – 100 µg/mL) em corpos cavernosos de coelhos isolados pré-contraídos com fenilefrina 10 µM na presença de ODQ (30 µM). A pré-incubação com ODQ diminuiu a resposta de SEC. Os dados mostram média ± erro padrão (n=4) da porcentagem da resposta máxima obtida, *p < 0,05; **p < 0,01.

DOSE	% DE RELAXAMENTO	
	SEC	SEC + ODQ
1 µg/mL	11,3 ± 1,5	0,96 ± 0,96**
3 µg/mL	28,3 ± 5,3	7,15 ± 1,33**
10 µg/mL	61,5 ± 11,2	19,82 ± 3,39*
30 µg/mL	91,1 ± 0,0	37,85 ± 9,03**
100 µg/mL	100,0 ± 0,0	79,1 ± 4,51**

Tabela 9. Efeito de SEC (1 – 300 $\mu\text{g/mL}$) em corpos cavernosos de coelhos isolados pré-contraídos com fenilefrina 10 μM na presença de L-NAME (100 μM). A pré-incubação com L-NAME não alterou a resposta de SEC. Os dados mostram média $\pm$ erro padrão (n=4) da porcentagem da resposta máxima obtida, $p > 0,05$.

DOSE	% DE RELAXAMENTO	
	SEC	SEC + L-NAME
1 $\mu\text{g/mL}$	3,8 $\pm$ 1,84	4,01 $\pm$ 2,42
3 $\mu\text{g/mL}$	5,9 $\pm$ 2,65	13,7 $\pm$ 3,88
10 $\mu\text{g/mL}$	14,6 $\pm$ 4,01	16,3 $\pm$ 4,27
30 $\mu\text{g/mL}$	24,6 $\pm$ 5,5	25,3 $\pm$ 3,9
100 $\mu\text{g/mL}$	40,5 $\pm$ 7,8	41,9 $\pm$ 5,8
300 $\mu\text{g/mL}$	67,9 $\pm$ 4,9	62,3 $\pm$ 1,64

Tabela 10. Medida de GMPc em tiras de corpos cavernosos de coelhos expostas a salina (controle), SEC (7,5 ou 15 $\mu\text{g/ml}$), SNP (1 μM) *** $p < 0,001$ vs. controle, ANOVA seguido de Tukey (n=4 em duplicata). # $p < 0,001$ SNP vs. SEC15. Os níveis de GMPc são expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

	Basal	SEC 7,5 $\mu\text{g/ml}$	SEC 15 $\mu\text{g/ml}$	SNP 1 μM
GMPc (%)	8,3 $\pm$ 2,9	8,5 $\pm$ 1,0	21,5 $\pm$ 4,2**	43,6 $\pm$ 1,8

Tabela 11. Medida de AMPc em tiras de corpos cavernosos de coelhos exposto a salina (controle), SEC (15 $\mu\text{g/ml}$) ou forskolina (1 μM). *** $p < 0,001$ vs. controle, ANOVA seguido de Tukey (n=4 em duplicata). # $p < 0,001$ FK vs. SEC15. Os níveis de AMPc são expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

	Basal	SEC 7,15 $\mu\text{g/ml}$	FK 1 μM
AMPc (%)	117,3 $\pm$ 7,9	331,95 $\pm$ 26,1**	1933,9 $\pm$ 116,4

Tabela 12. Efeito do relaxamento induzido por GTN (1-3000 mM) em segmentos de corpos cavernosos de coelhos pré-contráídos com fenilefrina 10 μ M (controle) e após a pré-incubação com SEC 10 μ g/ml e SEC 30 μ g/ml Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina 10 μ M, * $p < 0,05$.

DOSE	% DE RELAXAMENTO		
	GTN (controle)	GTN + SEC 10 μ g/ml	GTN + SEC 30 μ g/ml
1 mM	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
3 mM	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
10 mM	0,0 $\pm$ 0,0	2,4 $\pm$ 1,6	6,2 $\pm$ 0,7
30 mM	0,93 $\pm$ 0,92	17,4 $\pm$ 3,5	22,7 $\pm$ 7,9*
100 mM	17,3 $\pm$ 7,5	31,8 $\pm$ 4,2*	37,7 $\pm$ 7,9*
300 mM	33,1 $\pm$ 5,1	54,0 $\pm$ 9,1*	53,6 $\pm$ 5,9*
1000 mM	50,9 $\pm$ 7,3	60,9 $\pm$ 7,5	73,2 $\pm$ 5,8*
3000 mM	61,2 $\pm$ 7,7	73,3 $\pm$ 6,7	87,2 $\pm$ 2,9*

Tabela 13. Efeito do relaxamento induzido por Forskolina em segmentos de corpos cavernosos de coelhos pré-contráídos com fenilefrina 10 μ M (controle) e após a pré-incubação com SEC 10 μ g/ml e SEC 30 μ g/ml Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=4) da porcentagem de relaxamento dos tecidos contraídos com fenilefrina (10 μ M), * $p < 0,05$.

DOSE	% DE RELAXAMENTO		
	FK (controle)	FK + SEC 10 μ g/ml	FK + SEC 30 μ g/ml
10 ⁻⁹ M	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	4,82 $\pm$ 2,8
3.10 ⁻⁹ M	1,1 $\pm$ 1,8	2,0 $\pm$ 1,2	12,4 $\pm$ 6,1
10 ⁻⁸ M	1,1 $\pm$ 1,8	5,4 $\pm$ 2,1	15,2 $\pm$ 7,0
3.10 ⁻⁸ M	2,7 $\pm$ 1,6	9,4 $\pm$ 2,5	18,9 $\pm$ 8,9
10 ⁻⁷ M	6,2 $\pm$ 3,6	13,5 $\pm$ 4,7	28,4 $\pm$ 10,0*
3.10 ⁻⁷ M	12,0 $\pm$ 4,1	19,2 $\pm$ 4,7	40,7 $\pm$ 10,2*
10 ⁻⁶ M	16,7 $\pm$ 4,7	36,1 $\pm$ 6,9	43 $\pm$ 7,0*
3.10 ⁻⁶ M	41,2 $\pm$ 3,2	64,6 $\pm$ 8,1	81,6 $\pm$ 10,*7
10 ⁻⁵ M	62,6 $\pm$ 1,5	85,2 $\pm$ 8,9	87,7 $\pm$ 7,1*
3.10 ⁻⁵ M	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0	100 $\pm$ 0,0

Tabela 14. Efeito de SEC no relaxamento de corpos cavernosos de coelhos induzido por estímulo elétrico em resposta à contração induzida por fenilefrina. A adição cumulativa de SEC (1-10 $\mu\text{g/ml}$) produziu um efeito inibitório do relaxamento induzido pelo estímulo elétrico em tecidos pré-contraídos com fenilefrina (10 μM). Os dados mostram média $\pm$ erro padrão ($n=4$) da porcentagem da resposta máxima obtida.

TRATAMENTO	% DE RELAXAMENTO					
	0,5 Hz	1Hz	2Hz	4Hz	8Hz	16Hz
Controle	$0,7 \pm 0,7$	$7,3 \pm 2,7$	$15,2 \pm 5,1$	$24,2 \pm 5,6$	$38,4 \pm 4,9$	$65,0 \pm 10,9$
SEC 1 $\mu\text{g/ml}$	$1,1 \pm 1,1$	$3,8 \pm 2,3$	$9,7 \pm 3,3$	$21,5 \pm 4,3$	$35,0 \pm 7,7$	$55,1 \pm 11,9^*$
SEC 3 $\mu\text{g/ml}$	$0,0 \pm 0,0$	$1,4 \pm 1,0^*$	$5,8 \pm 2,2^*$	$14,3 \pm 3,8^*$	$26,3 \pm 6,0^*$	$31,2 \pm 8,2^*$
SEC 10 $\mu\text{g/ml}$	$0,0 \pm 0,0$	$1,0 \pm 1,0^*$	$3,1 \pm 2,1^*$	$5,4 \pm 2,7^*$	$8,1 \pm 3,7^*$	$10,8 \pm 4,9^*$

Tabela 15. Efeito de concentrações cumulativas de CaCl_2 (1 – 100 mM) em corpos cavernosos isolados de coelhos pré-contraídos por solução despolarizante de K^+ 40 mM, 0 Ca^{++} , na presença ou na ausência de SEC (3,5 $\mu\text{g/mL}$). A adição cumulativa de SEC inibiu de forma significativa as contrações induzidas por CaCl_2 (1 – 300 mM) em corpos cavernosos de coelhos. Os dados mostram média $\pm$ erro padrão ($n=4$) da porcentagem da resposta máxima obtida.

CaCl_2	% DE RELAXAMENTO	
	Controle	SEC (3,5 $\mu\text{g/mL}$)
1mM	$5,0 \pm 3,3$	$0,0 \pm 0,0$
3mM	$13,9 \pm 1,0$	$1,3 \pm 0,9$
10mM	$40,2 \pm 12,2$	$17,6 \pm 1,3$
30mM	$69,4 \pm 8,8$	$52,8 \pm 7,5$
100mM	$100,0 \pm 0,0$	$71,9 \pm 4,3$

Tabela 16. Efeito de concentrações cumulativas de CaCl_2 (1 – 300 mM) em corpos cavernosos isolados de coelhos pré-contraídos por solução despolarizante de K^+ 40 mM, 0 Ca^{++} , na presença ou na ausência de SEC (7,5 $\mu\text{g/mL}$). A adição cumulativa de SEC inibiu de forma significativa as contrações induzidas por CaCl_2 (1 – 300 mM) em corpos cavernosos de coelhos. Os dados mostram média $\pm$ erro padrão (n=4) da porcentagem da resposta máxima obtida.

CaCl_2	% DE RELAXAMENTO	
	Controle	SEC (7,5 $\mu\text{g/mL}$)
1 mM	3,5 $\pm$ 1,5	0,0 $\pm$ 0,0
3 mM	11,3 $\pm$ 3,7	0,0 $\pm$ 0,0
10 mM	30,1 $\pm$ 3,8	5,6 $\pm$ 3,2
30 mM	61,3 $\pm$ 3,9	31,1 $\pm$ 7,3
100 mM	92,7 $\pm$ 4,6	63,3 $\pm$ 16,8
300 mM	100,0 $\pm$ 0,0	65,7 $\pm$ 17,5

Tabela 17. Efeito de concentrações cumulativas de CaCl_2 (1 – 300 mM) em corpos cavernosos isolados de coelhos pré-contraídos por solução despolarizante de K^+ 40 mM, 0 Ca^{++} , na presença ou na ausência de SEC (15 $\mu\text{g/mL}$). A adição cumulativa de SEC inibiu de forma significativa as contrações induzidas por CaCl_2 (1 – 300 mM) em corpos cavernosos de coelhos. Os dados mostram média $\pm$ erro padrão (n=4) da porcentagem da resposta máxima obtida.

CaCl_2	% DE RELAXAMENTO	
	Controle	SEC (15 $\mu\text{g/mL}$)
1 mM	21,6 $\pm$ 7,7	2,5 $\pm$ 2,5
3 mM	40,5 $\pm$ 10,1	7,5 $\pm$ 7,5
10 mM	70,3 $\pm$ 8,9	20,6 $\pm$ 10,6
30 mM	84,8 $\pm$ 3,6	37,6 $\pm$ 12,5
100 mM	92,4 $\pm$ 3,1	42,7 $\pm$ 13,4
300 mM	100,0 $\pm$ 0,0	48,7 $\pm$ 12,4