



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

FELIPE MACÁRIO DOS SANTOS RODRIGUES

ESTUDO FARMACOLÓGICO DO EFEITO VASORRELAXANTE DA BETA-FENILETILAMINA EM AORTA ISOLADA DE RATO

FORTALEZA

2016

FELIPE MACÁRIO DOS SANTOS RODRIGUES

ESTUDO FARMACOLÓGICO DO EFEITO VASORRELAXANTE DA BETA-FENILETILAMINA EM AORTA ISOLADA DE RATO

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

Coorientadora: Dra. Teresinha Silva de Brito

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R613e Rodrigues, Felipe Macário dos Santos.
Estudo farmacológico do efeito vasorrelaxante da beta-feniletilamina em aorta isolada de rato / Felipe Macário dos Santos Rodrigues. – 2016.
60 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães.
Coorientação: Profa. Dra. Teresinha Silva de Brito.
1. beta-feniletilamina. 2. vasorrelaxamento. 3. farmacologia. I. Título.

CDD 615

FELIPE MACÁRIO DOS SANTOS RODRIGUES

ESTUDO FARMACOLÓGICO DO EFEITO VASORRELAXANTE DA BETA-FENILETILAMINA EM AORTA ISOLADA DE RATO

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

Coorientadora: Dra. Teresinha Silva de Brito

Aprovada em: 27/06/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Teresinha Silva de Brito
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Patrícia Andréa da Fonseca Magalhães
Doutora em Ciências Farmacêuticas

AGRADECIMENTOS

Ao criador de tudo que existe, serei grato todos os dias por ter nascido no seio de uma família maravilhosa, pela minha saúde, pela minha determinação e fé.

À minha família, obrigado pelo apoio e incentivo nos meus estudos.

Aos meus amigos de faculdade, dos quais já sinto saudades. Agradeço a todos por tornar a faculdade o melhor período da minha vida. Obrigado pelos momentos de descontração e de estudo ao longo desses cinco anos.

Ao Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, obrigado por ter me aceitado no laboratório e pela orientação.

Aos integrantes do Laboratório de Farmacologia do Músculo liso: Teresinha, Franzé, Kalinne, Alfredo, Tiago, Emanuella, Tatyane e Daniel obrigado pelos ensinamentos durante esses dois anos, pelo apoio nos experimentos e pelo bom ambiente de trabalho que todos vocês contribuíram durante esse tempo.

À Fernanda, em especial, obrigado pela minha indicação ao laboratório e pela realização dos primeiros experimentos deste estudo.

À Banca Examinadora, obrigado pela presença e disponibilidade.

RESUMO

A beta-feniletilamina (β - FEA) é uma amina cuja estrutura química assemelha-se à do 1-nitro-2-feniletano, o qual possui grupo nitro ao invés de amina. 1-Nitro-2-feniletano induz vasodilatação por estimular a enzima guanilato ciclase. A β -FEA é uma amina traço pois encontra-se em baixas concentrações nos tecidos de mamíferos. O objetivo deste estudo foi avaliar os potenciais efeitos vasorrelaxantes da β -FEA em aorta isolada de ratos Wistar. Contrações isométricas foram obtidas a partir de anéis isolados de artéria aorta e registradas por sistema de aquisição de dados. Em preparações com endotélio intacto mantidas em tônus basal, β -FEA (10-3000 μ M) induziu efeito contrátil dependente de concentração, e a retirada do endotélio vascular potencializou esse efeito. Por outro lado, em preparações com endotélio intacto contraídas pelo agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina, β -FEA (1-300 μ M) induziu relaxamento com valor de CE_{50} de 85,61 [70,81 – 101,5] μ M. Entretanto, apenas relaxou levemente a contração induzida por K^+ (60 mM) ou pelo mimético do tromboxano A_2 , U-46619 (0,3 μ M) e não relaxou a contração induzida clonidina (100 μ M), agonista α_2 -adrenérgico. Os efeitos vasorrelaxantes da β -FEA foram significativamente ($p < 0,05$, teste de Holm-Sidak) reduzidos pela retirada mecânica do endotélio ou pelo tratamento prévio com L-NAME (100 μ M), ODQ (10 μ M), indometacina (10 μ M), TEA (5 mM), ou 4-aminopiridina (1 mM), mas não pelo pré-tratamento com propranolol (5 μ M), MDL-12,330A (3 μ M) ou glibenclamida (10 μ M). Em meio sem cálcio contendo EGTA, a resposta contrátil da fenilefrina foi significativamente reduzida pela β -FEA (100 μ M). Além disso, a β -FEA (300 μ M), inibiu a contração induzida pela restauração dos níveis de Ca^{2+} extracelular após depleção dos estoques intracelulares. Assim como a β -FEA, prazosin (0,1 – 30 nM) induziu vasodilatação em anéis de aorta, cuja curva concentração-efeito foi deslocada para a direita pelo ODQ ($p < 0,05$, teste de Holm-Sidak). Portanto, a β -FEA (1-300 μ M) apresenta atividade bifásica sendo a ação vasodilatadora dependente da participação da via NO/guanilato ciclase/canais de potássio. Além disso, é possível que o bloqueio do receptor α_1 -adrenérgico esteja envolvido no seu efeito vasorrelaxante, embora uma caracterização mais aprofundada de seu efeito vasodilatador seja necessária.

Palavras- chave: β -feniletilamina. Vasodilatação. Guanilato ciclase. Adrenoreceptores

ABSTRACT

Beta-phenylethylamine (β -FEA) is an amine possessing a chemical resemblance with 1-nitro-2-phenylethane, which contains a nitro group in place of the amine group. 1-Nitro-2-phenylethane induces vasodilation by stimulating guanylate cyclase. β -FEA is a trace amine because it is found in low concentrations in mammalian tissues. The aim of this study was to evaluate the potential vasorelaxing effects of β -FEA in isolated aorta of Wistar rats. Isometric contractions were carried out from rings of isolated aorta and recorded in a data acquisition system. In endothelium-intact aortic preparations kept at baseline tonus, β -FEA (10-3000 μ M) induced concentration-dependent contractile effect, and removal of the vascular endothelium potentiated such effect. Otherwise, in endothelium-intact aortic preparations precontracted with the α_1 -adrenergic agonist phenylephrine, β -FEA (1-3000 μ M) induced relaxation with EC_{50} value of 85.61 [70.81 to 101.5] μ M. However, only slightly relaxed the contraction induced by K^+ (60 mM) or by the thromboxane A_2 mimetic U-46619 (0.3 μ M) and not relaxed the contraction induced by the α_2 -adrenoceptor agonist clonidine (100 μ M). Vasorelaxing effect of β -FEA was significantly reduced ($p < 0.05$, Holm-Sidak test) by mechanical removal of endothelium and by previous treatment with L-NAME (100 μ M), ODQ (10 μ M), indomethacin (10 μ M), TEA (5 mM) or 4-aminopyridine (1 mM), but not by propranolol (5 μ M), MDL 12,330A (3 μ M) or glibenclamide (10 μ M). In a calcium free medium containing EGTA, the contractile response to phenylephrine was significantly reduced by β -FEA (100 μ M). Moreover, β -FEA (300 μ M) inhibited the contraction induced by restoration of the extracellular Ca^{2+} levels after depletion of its internal stores. Similar to β -FEA, prazosin (0.1 to 30 nM) induced vasodilation in aortic rings and its concentration-effect curve was shifted to the right after treatment with ODQ. Therefore, β -FEA (1-300 μ M) has vasodilatory actions in rat isolated aorta that seems to involve a role for the NO/guanylate cyclase/ K^+ channels pathway. It is probable that a putative α_1 -adrenergic receptor blocking action is involved in the vasorelaxant effect of β -FEA, although further characterization of such effect is required.

Keywords: β -phenylethylamine. Vasodilation. Guanylate cyclase. Adrenoceptor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Contração do músculo liso.....	12
Figura 2. Relaxamento do músculo liso.	14
Figura 3. Ação dos vasodilatadores por vias de segundo mensageiro.	16
Figura 4. Estrutura molecular da β -FEA, à esquerda, e do 1-nitro-2- feniletano, a direita.....	20
Figura 5. Demonstração esquemática do sistema utilizado nos experimentos de contratilidade in vitro em artéria aorta isolada de rato.	25
Figura 6. Esquematização da montagem de anéis de aorta de rato no sistema de contratilidade in vitro.....	25
Figura 7. Curvas concentração-efeito à β -FEA no tônus basal ou em preparações previamente contraídas com fenilefrina.	32
Figura 8. Efeito da β -FEA em contrações induzidas por fenilefrina, potássio ou U-46619.....	33
Figura 9. Efeito da inibição de receptores beta-adrenérgicos na vasodilatação induzida pela β -FEA.....	34
Figura 10. Participação de fatores derivados do endotélio no efeito vasodilatador da β -FEA.....	35
Figura 11. Curva concentração-efeito à β -FEA no tônus basal em preparações de anéis de aorta com endotélio intacto e removido.....	37
Figura 12. Efeito vasorrelaxante da β -FEA em aorta contraída com fenilefrina na ausência e na presença de inibidor da via guanilato ciclase/GMPc/PKG e de inibidor da via adenilato ciclase/AMPC/PKA.	38
Figura 13. Efeito dos bloqueadores de canais para potássio na vasodilatação induzida pela β -FEA.....	39
Figura 14. Efeito da inibição da guanilato ciclase sobre o relaxamento induzido por bloqueador alfa-adrenérgico.....	40
Figura 15. Efeito da β -FEA sobre as contrações transitórias induzidas pela fenilefrina em anéis de aorta de rato mantidos em meio sem Ca^{2+}	41
Figura 16. Efeito da β -FEA sobre a contração induzida pela restauração do Ca^{2+} extracelular após depleção dos estoques intracelulares de Ca^{2+}	42

Figura 17. Efeitos do pré-tratamento com β -FEA na curva concentração-efeito à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio intacto.....	44
Figura 18. Efeitos do pré-tratamento com β -FEA na curva concentração-efeito à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio removido.....	45
Figura 19. Efeito da β -FEA sobre a curva concentração-efeito para o K^+	46
Figura 20. Efeito da β -FEA sobre uma contração sustentada de clonidina 100 μ M. ...	47
Figura 21. Recuperação da resposta contrátil ao potássio após exposição à β -FEA em anéis de aorta isolada de rato.	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 O músculo liso	11
1.2 Aminas traço	17
1.3 Beta-feniletilamina (β -FEA)	19
2. OBJETIVOS	22
2.1 Gerais	22
2.2 Específicos	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Local da pesquisa	23
3.2 Animais	23
3.3 Soluções e drogas.....	23
3.4 Experimentos com anéis de aorta de rato	24
3.5 Protocolos experimentais	26
3.5.1 Avaliação dos efeitos contráteis e relaxantes da β -FEA em aorta isolada de rato.....	26
3.5.2 Avaliação do efeito da β -FEA em contrações induzidas por fenilefrina, potássio ou U-46619	26
3.5.3 Caracterização do potencial efeito relaxante da β -FEA em preparações de anéis de aorta isolada previamente contraídas com fenilefrina	26
3.5.4 Avaliação da influência da remoção do endotélio nos efeitos contráteis da β -FEA em anéis de aorta isolada de rato.....	27
3.5.5 Avaliação do efeito da inibição da guanilato ciclase sobre o relaxamento induzido por bloqueador alfa-adrenérgico	27

3.5.6 Avaliação do efeito da β -FEA sobre as contrações transitórias induzidas por fenilefrina em anéis de aorta mantidos em meio sem Ca^{2+}	28
3.5.7 Avaliação do efeito inibitório da β -FEA nas contrações da aorta isolada de rato induzidas pela restauração de Ca^{2+} extracelular após depleção dos estoques intracelulares	28
3.5.8 Avaliação da influência do endotélio nos efeitos da β -FEA na curva concentração-efeito induzida por fenilefrina em anéis de aorta	29
3.5.9 Avaliação do efeito da β -FEA sobre a curva concentração-efeito para o K^+	29
3.5.10 Avaliação do efeito da β -FEA sobre uma contração sustentada de clonidina 100 μM	30
3.5.11 Avaliação da recuperação da resposta contrátil ao potássio após exposição à β -FEA em anéis de aorta isolada de rato	30
3.6 Análise estatística	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Efeitos contráteis e relaxantes da β -FEA em aorta isolada de rato	32
4.2 Efeito da β -FEA em contrações induzidas por fenilefrina, potássio ou U-46619	33
4.3 Efeito relaxante da β -FEA em preparações mantidas na presença de propranolol	32
4.4 Participação de fatores derivados do endotélio no efeito vasodilatador da β -FEA	35
4.5 Influência da remoção do endotélio nos efeitos contráteis da β -FEA em anéis de aorta	37
4.6 Papel das vias de formação de nucleotídeos cíclicos no efeito vasorrelaxante da β -FEA em contrações induzidas por fenilefrina em aorta isolada de ratos	38
4.7 Papel dos canais para potássio na vasodilatação induzida pela β -FEA	39

4.8 Efeito da inibição da guanilato ciclase sobre o relaxamento induzido por bloqueador alfa-adrenérgico	40
4.9 Efeito da β -FEA sobre as contrações transitórias induzidas por fenilefrina em anéis de aorta mantidos em meio sem Ca^{2+}	41
4.10 Efeito inibitório da β -FEA nas contrações da aorta isolada de rato induzidas pela restauração de Ca^{2+} extracelular após depleção dos estoques intracelulares em meio com tapsigargina, nifedipina e EGTA	42
4.11 Influência do endotélio nos efeitos da β -FEA na curva concentração-efeito induzida por fenilefrina em anéis de aorta	43
4.12 Efeito da β -FEA sobre a curva concentração-efeito para o K^+	46
4.13 Efeito da β -FEA sobre uma contração sustentada de clonidina 100 μM	47
4.14 Recuperação da resposta contrátil ao potássio após exposição à β -FEA em anéis de aorta isolada de rato	48
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO.....	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 O músculo liso

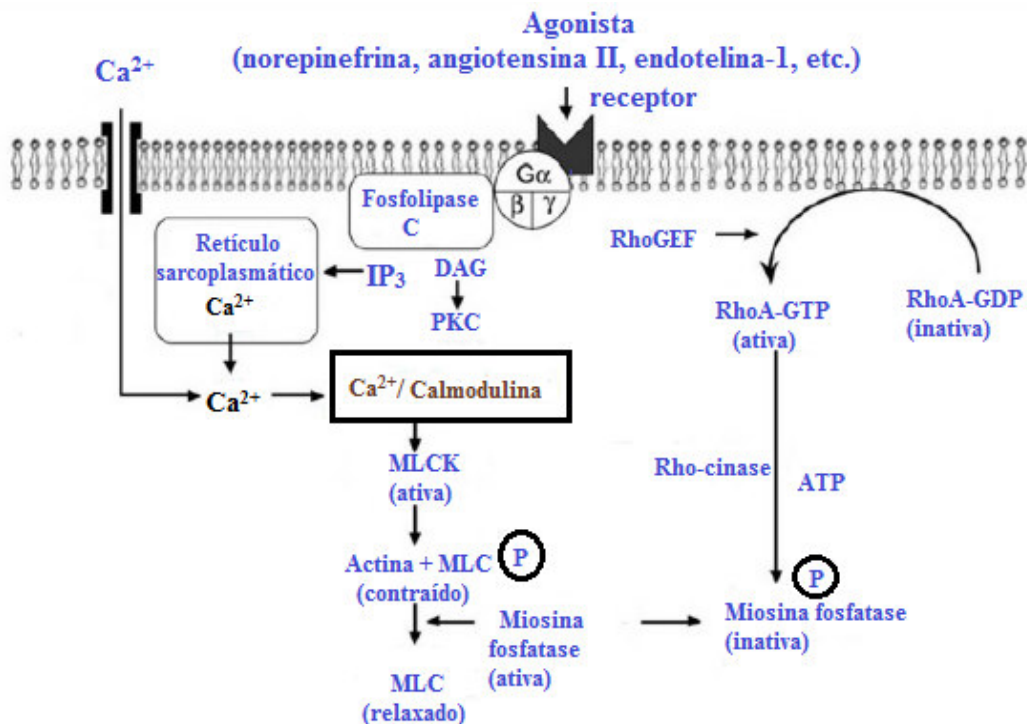
O músculo liso está presente em órgãos ocos, como as vias aéreas, a vasculatura e o trato urogenital. Ele divide-se em dois grupos baseado em seu comportamento contrátil: músculo liso unitário e músculo liso multiunitário. No músculo liso unitário, as células musculares lisas são acopladas eletricamente de modo que a estimulação elétrica de uma célula é seguida pela estimulação das células musculares lisas adjacentes. Isso leva à onda de contração, como no músculo liso da bexiga. Em contrapartida, as células musculares lisas multiunitárias não estão acopladas eletricamente, de modo que a estimulação de uma célula não resulta, obrigatoriamente, na ativação de células musculares lisas adjacentes. O vaso deferente do trato genital masculino e a íris do olho são exemplos de músculo liso multiunitário. Porém, o músculo liso é bastante diverso com as classificações de unitário e multiunitário, visto que os termos unitário e multiunitário evidenciam demasiada simplificação, pois a maioria dos músculos lisos é modulada pela combinação de elementos neurais com, pelo menos, algum grau de ligação célula-célula e por ativadores ou inibidores produzidos localmente, que promovem, também, resposta coordenada dos músculos lisos (BERNE; LEVY, 2009).

A contração do músculo liso modifica as dimensões de alguns órgãos, o que resulta, por exemplo, na propulsão do conteúdo do intestino (peristalse) ou no aumento da resistência ao fluxo (como na vasoconstrição). Além disso, o músculo liso contrai-se em resposta a sinais elétricos ou hormonais e exibe a capacidade de permanecer contraído por períodos extensos, em níveis baixos de consumo de energia, o que é importante para funções como manutenção do tônus vascular e, portanto, da pressão sanguínea (BERNE; LEVY, 2009).

No músculo liso, são necessárias várias etapas que envolvem, quase sempre, aumento da concentração de Ca^{2+} no citoplasma para que a contração ocorra. Este aumento pode ser resultante do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular, através de canais iônicos presente na membrana plasmática, e da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (Figura 1). Em seguida, são necessários quatro íons Ca^{2+} para a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina, que, em combinação com a cinase de cadeia leve da miosina (MLCK), formarão um complexo, responsável pela fosforilação da

cadeia leve de miosina (MLC) de 20-kDa. A MLC fosforilada ativa a ATPase da miosina, promove a interação entre actina e miosina, aumentando assim o número de ciclos de pontes cruzadas e permitindo contração muscular (WEBB, 2003).

Figura 1. Contração do músculo liso.



Vários agonistas (neurotransmissores, hormônios, etc.) se ligam aos seus receptores específicos para ativar a contração do músculo liso. Após essa ligação, há um aumento da atividade da fosfolipase C (PLC) através do acoplamento com proteína G. A PLC produz dois potentes segundos mensageiros: diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP_3). O IP_3 se liga ao seu receptor específico no retículo sarcoplasmático, promovendo a liberação de cálcio (Ca^{2+}). O DAG juntamente com Ca^{2+} ativa a proteína cinase C (PKC) que fosforila proteínas alvo específicas. Na maioria dos músculos lisos, PKC tem efeitos de promoção de contração, tais como a fosforilação de canais de Ca^{2+} ou outras proteínas que regulam o ciclo das pontes cruzadas. Quando no citoplasma, o Ca^{2+} se liga a calmodulina formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina, que causa ativação da cinase de cadeia leve de miosina (MLCK). Esta fosforila a cadeia leve de miosina (MLC) que em conjugação com a actina forma as pontes cruzadas. No entanto, a elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} é transitória, e a resposta contrátil é mantida por mecanismos de sensibilização dos miofilamentos contráteis ao Ca^{2+} promovida pela inibição da miosina fosfatase (MLCP) pela Rho-cinase. Este mecanismo de sensibilização ao Ca^{2+} é iniciada ao mesmo tempo que a PLC é ativada e envolve a ativação da proteína de ligação ao GTP de RhoA. A natureza precisa da ativação de RhoA pelo receptor acoplado à proteína G não é totalmente claro, mas envolve um fator de troca de guanina-nucleotídeo (RhoGEF) e migração de RhoA para a membrana plasmática. Após a ativação, RhoA aumenta a atividade da Rho-cinase que conduz a inibição da fosfatase de miosina, promovendo o estado contrátil, uma vez que a MLC permanece fosforilada. Fonte: (WEBB, 2003).

Canais presentes no sarcolema permitem a entrada de Ca^{2+} a partir do meio extracelular que pode ser desencadeada após despolarização da membrana. Essa despolarização proporciona alteração da conformação espacial de determinadas

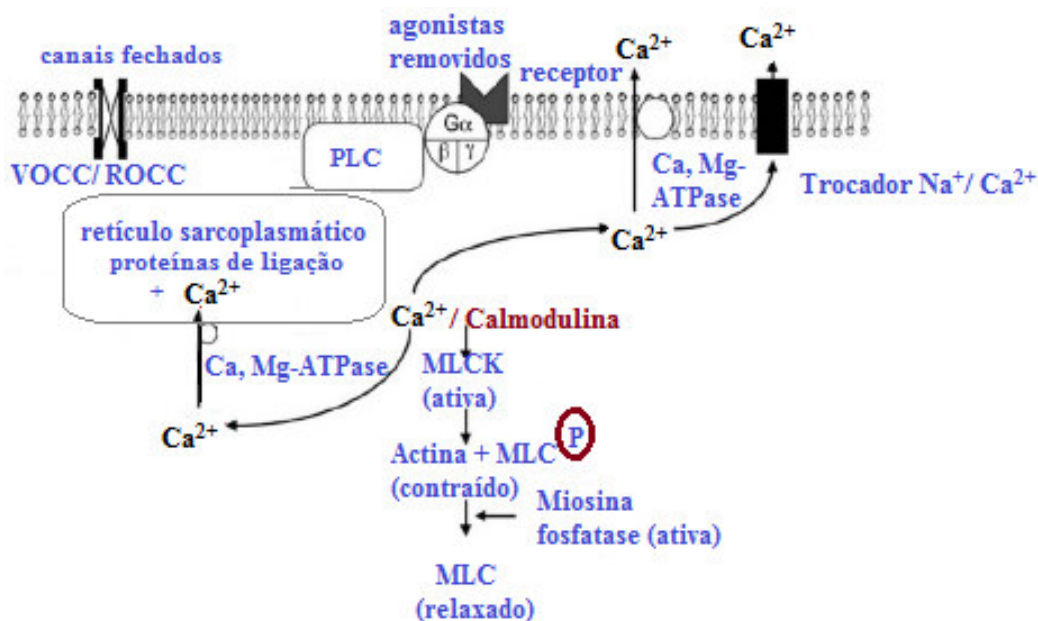
proteínas presentes na membrana, que funcionam como poros e, uma vez abertos, permitem a passagem seletiva de Ca^{2+} pelos chamados VOCCs (sigla em inglês para *Voltage-Operated Calcium Channels*). Esse íon, impulsionado pelo seu gradiente eletroquímico, entra no citoplasma promovendo aumento da sua concentração intracelular com indução dos fenômenos já assinalados anteriormente para promoção da contração. Outros canais também podem ser abertos na membrana, independentemente das alterações do potencial transmembrana. Por exemplo, após ligação de determinadas substâncias ao seu receptor na membrana, ocorre a abertura dos chamados canais para Ca^{2+} operados por receptor (ROCCs, do inglês *Receptor-Operated Calcium Channels*), mecanismo denominado acoplamento farmacomecânico (SOMLYO; SOMLYO, 1994). O principal mecanismo do acoplamento farmacomecânico envolve a ativação da fosfolipase C por ativação de receptores acoplados à proteína G heterotrimérica liberando o inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e o diacilglicerol (DAG) como segundos mensageiros. O IP_3 difunde-se para o citoplasma e abre canais para Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático, liberando o Ca^{2+} ali armazenado (AKATA, 2007a). Também existe a possibilidade de abertura de canais para Ca^{2+} operados por estresse mecânico, quando ocorre, por exemplo, estiramento do tecido visceral por presença de conteúdo no lúmen do órgão envolvido. Além desses, ainda existem os canais para Ca^{2+} regulados por estoques (SOCC, do inglês *Store-Operated Calcium Channel*) que parecem ser envolvidos com a regulação da concentração intracelular de Ca^{2+} após a depleção dos estoques intracelulares desse íon (BERRIDGE, 2008).

O aumento da sensibilidade do aparato contrátil ao cálcio também está envolvido na contração das células musculares lisas. Nesse caso, ocorre o aumento da afinidade dos miofilamentos contráteis baseados no nível de fosforilação da MLC_{20} . A fosforilação da MLC_{20} aumenta a força do ciclo das pontes cruzadas e é regulada pela fosfatase de cadeia leve da miosina (MLCP). A via RhoA/Rho-cinase sinaliza a sensibilização ao Ca^{2+} das proteínas contráteis, uma vez que ela inibe a desfosforilação da cadeia leve da miosina, ao inibir a atividade da MLCP, mantendo assim a força.

Entretanto, o relaxamento do músculo liso vascular é iniciado pela remoção do Ca^{2+} do citosol, incluem-se aí os mecanismos relacionados ao sequestro de Ca^{2+} de volta para seus estoques intracelulares ou o seu bombeamento para o meio extracelular

através de transportadores de membrana, e/ou pela estimulação da MLCP (Figura 2). Portanto, o estado de fosforilação da cadeia leve da miosina é determinante para que a contração ocorra, sendo regulado pela atividade de ambas as enzimas, a cinase de cadeia leve da miosina dependente de Ca^{2+} e a fosfatase de cadeia leve da miosina (SOMLYO; SOMLYO, 2003 ; HILGERS; WEBB, 2005).

Figura 2. Relaxamento do músculo liso.



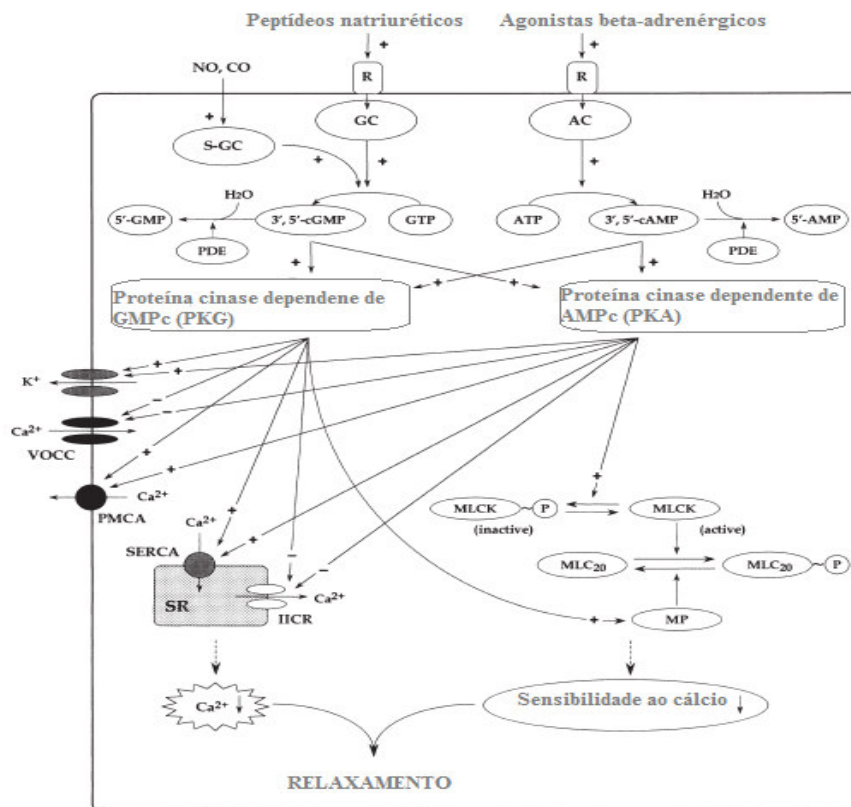
O relaxamento do músculo liso ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de uma substância que estimula a inibição do mecanismo contrátil. De qualquer forma, o processo de relaxamento requer uma diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular e o aumento da atividade da miosina fosfatase (MLCP). O Ca^{2+} do citosol é removido pelo retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática que contém Ca, Mg-ATPase . Trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ também estão localizados na membrana plasmática e ajudam na redução intracelular de Ca^{2+} . Durante o relaxamento, os canais para Ca^{2+} operados por receptor e voltagem se fecham, resultando em uma diminuição da entrada de Ca^{2+} na célula. Fonte: (WEBB, 2003).

Dentre os mecanismos que medeiam o relaxamento do músculo liso, destaca-se a participação dos nucleotídeos cíclicos. A vasodilatação sob condições fisiológicas, por exemplo, é mediada pelo aumento a nível citosólico de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). A ativação das enzimas adenilil ciclase (AC) e guanilil ciclase (GC) leva à síntese de AMPc e GMPc, respectivamente. O GMPc medeia a ação de vasodilatadores endógenos que

exercem importantes funções no controle do tônus vascular, como o óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO) ou peptídeos natriuréticos. O aumento dos níveis de GMPc promove a ativação da proteína cinase dependente de GMPc (PKG) que, por sua vez, reduz tanto a concentração intracelular de Ca^{2+} quanto a sensibilidade ao Ca^{2+} nos miofilamentos contráteis, causando vasorrelaxamento. Vários mecanismos têm sido relatados para explicar como a PKG medeia a redução da concentração de Ca^{2+} intracelular, incluindo: ativação da recaptção de Ca^{2+} pelos estoques intracelulares (através da fosforilação da fosfolambam e ativação das Ca^{2+} -ATPases); o aumento do efluxo de Ca^{2+} (via ativação da Ca^{2+} -ATPase presente na membrana plasmática e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$); a inibição da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (via fosforilação mediada pela PKG dos receptores de IP_3 e/ou inibição da síntese de IP_3), a hiperpolarização da membrana via ativação direta ou indireta de canais para K^+ e inibição direta dos canais para cálcio operados por voltagem (VOCCs) (AKATA, 2007b) (Figura 3).

Do mesmo modo, o aumento dos níveis de AMPc influenciam na mobilização celular do Ca^{2+} através da ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA), incluindo inibição da ativação de fosfolipase C (PLC) e canais para Ca^{2+} , estimulação da Ca^{2+} -ATPase presente na membrana plasmática e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, estimulação da recaptção do Ca^{2+} para dentro do retículo sarcoplasmático (via fosforilação da fosfolambam mediada pela PKA) e ativação de canais para K^+ . Além disso, o aumento dos níveis de AMPc reduzem a sensibilidade ao Ca^{2+} nos miofilamentos, provavelmente pela fosforilação da cinase de cadeia leve de miosina (MLCK) e assim diminuindo a afinidade do complexo Ca^{2+} /Calmodulina. (AKATA, 2007b).

Figura 3. Ação dos vasodilatadores por vias de segundo mensageiro.



A figura representa o relaxamento da célula muscular lisa vascular via ativação da GC ou AC, tendo como resultado a formação dos nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc, que conseqüentemente ativam as proteínas cinases PKG e PKA. Tanto a PKG como a PKA reduz a concentração intracelular de Ca^{2+} e a sensibilidade ao Ca^{2+} nos miofilamentos contráteis, causando vasorrelaxamento, por meio da ativação da recaptação de Ca^{2+} pelos estoques intracelulares, do aumento do efluxo de Ca^{2+} (via ativação da Ca^{2+} -ATPase presente na membrana plasmática e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$), da inibição da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, da hiperpolarização da membrana via ativação direta ou indireta de canais para K^+ e da inibição direta dos canais para cálcio operados por voltagem (VOCCs). Sinal positivo indica estimulação; sinal negativo indica inibição; AC, adenilil ciclase; AMP, adenosina monofosfato; ATP, adenosina trifosfato; 3', 5'-cAMP, adenosina monofosfato cíclico; CO, monóxido de carbono; GC, guanilil ciclase; GMP, guanosina monofosfato; 3', 5'-cGMP, guanosina monofosfato cíclico, IP_3R , receptor de IP_3 ; MLCK, cinase de cadeia leve da miosina; PDE, fosfodiesterase; NO, óxido nítrico.; PMCA, Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática; SERCA, Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático; RS, retículo sarcoplasmático; sGC, guanilil ciclase solúvel; VOCC, canal para Ca^{2+} operado por voltagem; PKG, proteína cinase G; PKA, proteína cinase A. Fonte: Adaptado de Akata (2007b).

1.2 Aminas traço

As aminas traço são uma família de aminas biogênicas presentes no sistema nervoso central em baixas concentrações (0,1-10 nM), representando menos que 1% do total de aminas biogênicas. As moléculas geralmente consideradas aminas traço incluem a tiramina, a triptamina, a octopamina e a beta-feniletilamina (β -FEA) (BERRY, 2004).

O termo “amina biogênica” foi introduzido para designar o grupo de aminas que exercem efeitos biológicos importantes como mensageiros químicos, tais como, hormônios, neuromoduladores ou neurotransmissores. As primeiras aminas biogênicas descobertas foram as catecolaminas, estas incluem a epinefrina, a noraepinefrina e a dopamina, as quais são derivadas da tirosina. Outras aminas biogênicas bem conhecidas são a histamina e a serotonina, as quais são derivadas da histidina e do triptofano, respectivamente (ZUCCHI et al., 2006).

As aminas traço são produzidas em bactérias, fungos, células vegetais, e podem ser encontradas em alguns alimentos, principalmente no chocolate, no queijo e no vinho tinto (BRANCHEK; BLACKBURN, 2003). No sistema nervoso central, aminas traço podem produzir respostas semelhantes à anfetamina, por exemplo, euforia, irritabilidade, diminuição do apetite, insônia e tremores. Já as respostas cardiovasculares incluem taquicardia e efeitos vasomotores, os quais podem conduzir a hipertensão ou hipotensão, dependendo da dosagem, de condições clínicas e experimentais e do organismo a ser estudado (ZUCCHI et al., 2006).

Efeitos endócrinos também foram relatados: p-tiramina, beta-feniletilamina e octopamina, cada uma, pode inibir a secreção de prolactina em células da pituitária anterior cultivadas *in vitro* e *in vivo* (BECÚ-VILLALOBOS et al., 1992); beta-feniletilamina aumenta o hormônio adrenocorticotrófico plasmático (ACTH) e os níveis de corticosterona produzidos em ratos em resposta ao estresse (KOSA et al., 2000); octopamina produz um efeito semelhante à insulina sobre a absorção da glicose em adipócitos, músculo esquelético e miocárdio (VISENTIN et al., 2001).

Concentrações fisiologicamente relevantes de aminas traço podem funcionar como neuromoduladores endógenos da neurotransmissão monoaminérgica central (BERRY, 2004). Além disso, ao longo dos anos, um papel fisiopatológico para as aminas traço na gênese de diversas desordens neurológicas ou mentais tem sido

defendido. A deficiência em beta-feniletilamina foi correlacionada com a depressão, e o decréscimo do seu catabolismo tem sido associado com a esquizofrenia (ZUCCHI et al., 2006).

Os efeitos farmacológicos da β -FEA, da tiramina e de outras aminas traço têm sido atribuídos à capacidade de induzir a liberação de noradrenalina a partir de terminações nervosas simpáticas e, em geral, por competir com as catecolaminas por locais de ligação de serotonina nos seus receptores cognatos, transportadores ou locais de armazenamento (PATERSON; JUORIO; BOULTON, 1990). No entanto, a demonstração de como as aminas traço manifestam seus efeitos fisiológicos e comportamentais foi substancialmente modificada com a descoberta de uma nova família de receptores acoplados à proteína G que são referidos como sendo específicos para aminas traço e chamados de receptor associado às aminas traço (TAAR). Esses receptores são ativados por uma variedade de aminas biogênicas, anfetaminas e aminas traço (ZUCCHI et al., 2006).

A descoberta do primeiro receptor, o TAAR1, foi realizada independentemente por dois grupos de investigadores, Borowsky et al. (2001) e Bunzow et al. (2001), através de abordagens semelhantes (ZUCCHI et al., 2006). Relatos de que TAARs são expressos nos vasos sanguíneos (BOROWSKY et al, 2001; BUNZOW et al., 2001) despertou o interesse nas ações vasculares de aminas traço, tais como a β -FEA. A inibição da captação de noradrenalina e o aumento do efluxo de noradrenalina estimulada pela β -FEA foram apenas observados em sinaptossomas de cérebro expressando TAARs, sugerindo que as ações simpaticomiméticas das aminas traço podem ser devidas à interação com TAARs (XIE; WESTMORELAND; MILLER, 2008). Além disso, em artérias de condutância isoladas, os aumentos induzidos pela β -FEA no tônus basal foram atribuídos a ativação de TAARs em grande parte devido ao fato de que RNAm para esses receptores foi encontrado e expressado nesses mesmos vasos (FEHLER et al., 2010).

1.3 Beta-feniletilamina (β -FEA)

A molécula da β -FEA é importante fisiologicamente por ser considerada protótipo das drogas simpaticomiméticas. Quimicamente, é constituída por um anel benzênico possuindo uma cadeia lateral composta de dois carbonos saturados que termina no grupamento amina (Figura 4). Substituições químicas podem ser feitas tanto no anel benzênico, como no grupo amina terminal ou nos átomos de carbono que compõem essa cadeia lateral. Por exemplo, a presença de dois grupos -OH no anel benzênico (nas posições meta- e para- em relação à cadeia lateral) produz os fármacos conhecidos como catecolaminas tais como a norepinefrina, a epinefrina, o isoproterenol e a dopamina. Em geral, as substituições químicas na molécula da β -FEA determinam, para esses análogos adrenérgicos, diferentes afinidades e eficácias para os subtipos de receptores adrenérgicos, englobando atividades que são caracterizadas tipicamente como oriundas de receptores alfa ou beta (GOODMAN; GILMAN, 2005).

É provável que a β -FEA exerça vasoconstrição pela ativação de receptores tais como os TAARs. Famílias completas de receptores de humanos, ratos e camundongos têm sido clonadas, mas apenas dois deles, TAAR1 e TAAR4, parecem ser sensíveis a ativação por amina traço (LINDEMANN; HOENER, 2005).

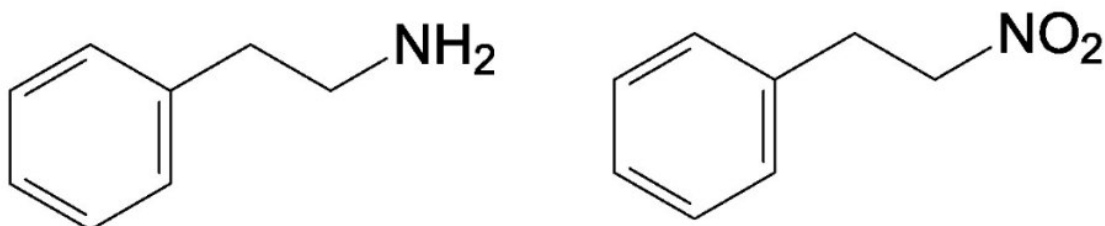
Além dos efeitos vasoconstritores da β -FEA em aorta de rato demonstrado por Fehler et al., (2010), tem sido relatado que ela pode causar vasorrelaxamento por meio da liberação de óxido nítrico (NO) em leitos vasculares mesentéricos (ANWAR et al., 2012). Entretanto, Narang et al., (2014), demonstrou que o relaxamento induzido pela β -FEA sobre contrações induzidas por agonistas α -adrenérgicos, em preparações com endotélio intacto de artéria mesentérica isolada, não foi alterado pela administração prévia de L-NAME, inibidor da óxido nítrico sintase e nem pela remoção do endotélio.

Ademais, dada a relação entre as amina traço e monoaminas, algumas patologias neurológicas que envolvem alterações na função de monoaminas estão sendo associadas com a disfunção de sinalização da β -FEA, além de outras amina traço. A β -FEA, por exemplo, está relacionada a três distúrbios psicológicos, dentre eles estão o déficit de atenção, a depressão e a esquizofrenia. A redução do nível de excreção urinária de β -FEA foi encontrado em crianças com déficit de atenção, em comparação com pessoas saudáveis, uma observação que foi acompanhada por níveis reduzidos dela em indivíduos com a mesma patologia (IRSFELD; SPADAFORE; PRUSS, 2013). Esta

diminuição de excreção urinária de β -FEA também foi encontrada em pacientes com transtornos depressivos (PEI; ASIF-MALIK; CANALES, 2016). Além disso, o estudo de Xier e Miller (2008), onde foi observado que β -FEA alterava o transportador da serotonina pela interação com TAAR, pode apontar em uma alternativa mais segura no tratamento da depressão pela inibição seletiva de recaptção de serotonina sob a forma de β -FEA.

De forma interessante, há também analogia química entre β -FEA e o nitrocomposto 1-nitro-2-feniletano (Figura 4), composto raro na natureza, mas que é encontrado como constituinte majoritário do óleo essencial da planta amazônica *Aniba canelilla* (DE SIQUEIRA et al., 2010) e da árvore africana *Dennettia tripetala* (OYEMITAN et al., 2013). A diferença básica entre essas moléculas reside apenas na presença de grupo amina no primeiro e grupo nitro no segundo. De Siqueira et al., (2010) demonstraram que 1-nitro-2-feniletano é capaz de iniciar resposta hipotensora resultante de ação vasodilatadora direta. Além disso, em recente estudo, foi caracterizado as ações farmacológicas desse composto em anéis de aorta de rato, tecido no qual esse composto induz efeitos vasodilatadores de forma dependente de concentração através da estimulação da via guanilato ciclase/GMPc (BRITO et al., 2013).

Figura 4. Estrutura molecular da β -FEA, à esquerda, e do 1-nitro-2- feniletano, a direita.



Fonte: Cedido por Batista-Lima F. J..

Assim, dada a importância fisiológica da β -FEA como precursora de catecolaminas, além de ser uma substância endógena e, levando em consideração a semelhança química entre a β -FEA e o 1-nitro-2-feniletano, surgiu o interesse em realizar o estudo farmacológico do potencial efeito vasorrelaxante da β -FEA na musculatura lisa vascular. Além disso, apesar de ser uma amina traço, sua concentração no organismo pode aumentar em pacientes que usam inibidores da monoamina oxidase (IMAO), enzima responsável pela degradação de monoaminas (REYNOLDS; RAUSCH; RIEDERER, 1980) e em diabéticos (MOSNAIM et al., 1982). Portanto será interessante investigar e caracterizar seus efeitos periféricos, no caso o efeito vascular.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

- Caracterizar os potenciais efeitos vasorrelaxantes da beta-feniletilamina no comportamento funcional da musculatura lisa vascular de aortas isoladas de ratos Wistar.

2.2 Específicos

- Esclarecer o(s) provável(is) mecanismo(s) da potencial ação vasorrelaxante da β -FEA em aorta de rato;
- Investigar a influência da via enzimática NO-GMP_C no potencial efeito vasorrelaxante da β -FEA;
- Investigar o envolvimento de outras vias celulares como a via adenilil ciclase-AMPC no potencial efeito vasorrelaxante induzido pela β -FEA;
- Avaliar a participação dos canais para potássio no potencial efeito vasorrelaxante da β -FEA;
- Avaliar o papel de vias de regulação da concentração intracelular de cálcio no potencial efeito vasorrelaxante induzido pela β -FEA;
- Investigar suposto antagonismo alfa-adrenérgico envolvido no potencial efeito vasorrelaxante da β -FEA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local da pesquisa

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

3.2 Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos Wistar machos, com massa corporal entre 200 e 300 g, os quais foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Eles foram mantidos em condições de temperatura constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com um ciclo de 12 h claro/12 h escuro e com livre acesso à comida e água. Os animais foram tratados com respeito às normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC e em conformidade com as normas de manipulação de animais de laboratório preconizadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os procedimentos aqui descritos foram analisados e tiveram a aprovação prévia da referida comissão local sob número de protocolo #22/2014 (em anexo).

3.3 Soluções e drogas

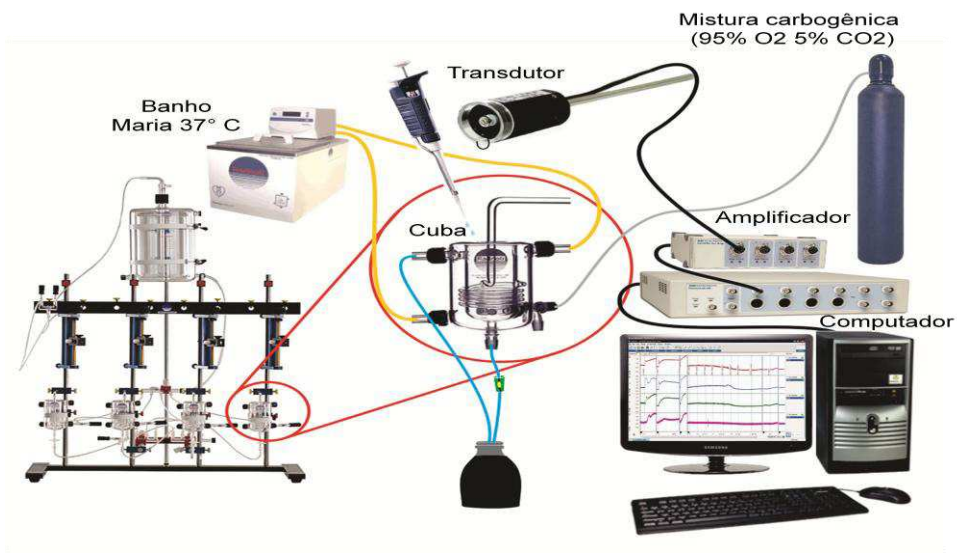
O meio de perfusão utilizado nos experimentos *in vitro* foi a solução de Krebs-Henseleit modificada (pH 7,4) com a seguinte composição (mM): NaCl 118; KCl 5; NaH_2PO_4 1,18; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,18; CaCl_2 2,50; NaHCO_3 25,0 e glicose 11,1. Em alguns experimentos essa solução foi alterada para um meio sem cálcio. Para isso, a solução sem cálcio foi preparada pela omissão de CaCl_2 da solução de Krebs e pela adição do EGTA, um quelante de cálcio. As soluções utilizadas nos experimentos deste estudo foram preparadas pela diluição das substâncias em seu respectivo diluente e armazenadas em freezer.

A beta-feniletilamina empregada nesse trabalho foi adquirida da empresa Sigma-aldrich Brasil com grau de pureza analítico. As soluções de β -FEA foram, diariamente, preparadas e dissolvidas na solução de Krebs e homogeneizadas no agitador tipo vórtex imediatamente antes da utilização.

3.4 Experimentos com anéis de artéria aorta isolada de rato

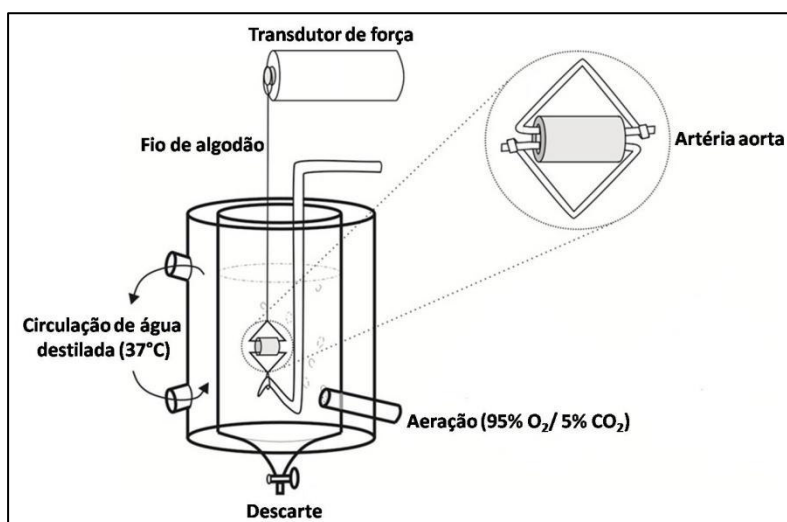
Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg) e em seguida sacrificados por exsanguinação. A aorta torácica foi removida cuidadosamente e transferida para uma placa de Petri contendo o meio de perfusão à temperatura ambiente. Depois de retirado os tecidos adjacentes, a aorta foi cortada transversalmente em segmentos cilíndricos em forma de anel (1 x 5 mm), os quais foram presos a peças triangulares de fio de aço (0,3 mm de diâmetro) e posteriormente suspensos em um sistema de banho para órgãos isolados contendo 5 mL de solução fisiológica de Krebs-Henseleit modificada, pH 7,4, oxigenadas continuamente com mistura carbogênica (O₂ 95%; CO₂ 5%) e aquecidas a 37°C (Figura 6). Anéis de aorta com ou sem endotélio, foram mantidos sob tensão de 1 g e a tensão foi registrada por meio de um transdutor de força isométrica conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, AD Instruments, Austrália), como esquematizado na figura 5. A retirada do endotélio foi realizada por raspagem cuidadosa da luz vascular, onde os segmentos de artéria aorta isolada, presos a peças triangulares de fio de aço, eram friccionados levemente em papel toalha. Para confirmar, preparações sem endotélio ou com endotélio foram tratadas, no início dos experimentos, com fenilefrina (0,1 µM), e após o estabelecimento de um platô de contração foram tratadas com 1 µM de acetilcolina. A falta de efeito vasorrelaxante induzido por acetilcolina foi tomada como evidência de que a preparação estava funcionalmente desprovida de endotélio. Após um período de equilíbrio (60 minutos), para a adaptação dos tecidos às novas condições, contrações controles foram induzidas pelo aumento hipertônico da concentração de KCl para 60 mM na solução extracelular no banho. As preparações foram consideradas equilibradas quando duas contrações sucessivas mostraram amplitudes semelhantes.

Figura 5. Demonstração esquemática do sistema utilizado nos experimentos de contratilidade in vitro em artéria aorta isolada de rato.



Fonte: Laboratório Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI).

Figura 6. Esquemática da montagem de anéis de aorta de rato no sistema de contratilidade in vitro.



Fonte: Laboratório Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI), cedido por Batista-Lima, F. J..

3.5 Protocolos experimentais

3.5.1 Avaliação dos efeitos contráteis e relaxantes da β -FEA em aorta isolada de rato

Para avaliar o efeito contrátil da β -FEA em aorta isolada de rato, curvas concentração-efeito foram realizadas pela exposição de preparações com endotélio intacto e mantidas em tônus basal a adição cumulativa de β -FEA (10-3000 μ M), acrescentadas ao banho e mantidas a uma mesma concentração por 5 minutos. A amplitude da curva de concentração-efeito à β -FEA foi registrada como percentual da contração inicial de K^+ (60 mM). Já para avaliar o provável efeito relaxante da β -FEA, os anéis de aorta isolada de rato com endotélio intacto foram previamente contraídos com fenilefrina (PHE; 1 μ M) e, em seguida, expostos às concentrações cumulativas de β -FEA (1-300 μ M), adicionadas ao banho e mantidas a uma mesma concentração por 5 minutos.

3.5.2 Avaliação do efeito da β -FEA em contrações induzidas por fenilefrina, potássio ou U-46619

Para avaliar o provável efeito relaxante da β -FEA sobre diferentes estímulos contráteis, preparações de anéis de aorta com endotélio intacto foram previamente contraídos com PHE (1 μ M), agonista α_1 -adrenérgico que causa contração através de um acoplamento farmacomecânico, com K^+ (60 mM), solução despolarizante que causa contração através de um acoplamento eletromecânico (SOMLYO; SOMLYO, 1994), ou com U-46619 (0,3 μ M), análogo do tromboxano A_2 que promove contração principalmente por ativação da via RhoA/Rho-cinase (WILSON et al., 2005). Em seguida, curvas concentração-efeito foram obtidas pela adição cumulativa de β -FEA (1-300 μ M), adicionadas ao banho e mantidas a uma mesma concentração por 5 minutos.

3.5.3 Caracterização do potencial efeito relaxante da β -FEA em preparações de anéis de aorta isolada previamente contraídas com fenilefrina

Para avaliar o mecanismo de ação do provável efeito vasorrelaxante da β -FEA, anéis de aorta isolada de rato com endotélio intacto foram previamente incubados com diversos antagonistas farmacológicos antes da adição de PHE (1 μ M), a qual induz

resposta contrátil nessas preparações. Os anéis de aorta com endotélio intacto foram previamente tratados com propranolol (5 μM), inibidor não seletivo do receptor beta-adrenérgico, L-NAME (100 μM), inibidor não específico da enzima óxido nítrico sintase, indometacina (10 μM), inibidor da enzima cicloxigenase, MDL-12330A (3 μM), inibidor da enzima adenilil ciclase, ODQ (10 μM), inibidor seletivo da enzima guanilil ciclase, tetraetilamônio (5 mM), um bloqueador não específico de canais para K^+ , glibenclamida (10 μM), bloqueador seletivo dos canais para K^+ sensíveis a ATP, 4-aminopiridina (1 mM), um bloqueador seletivo de canais para K^+ operados por voltagem. Após 10 a 15 minutos da incubação com antagonistas farmacológicos, as preparações foram estimuladas com PHE (1 μM) e então construídas as curvas concentração-efeito à β -FEA (1-300 μM). Em determinados experimentos foi retirado o endotélio vascular, sem adição prévia de antagonistas farmacológicos, para estudar a participação de fatores derivados do endotélio no efeito vasodilatador da β -FEA, e então realizado o mesmo protocolo de indução de contração pela fenilefrina e obtenção da curva concentração-efeito à β -FEA (1-300 μM).

3.5.4 Avaliação da influência da remoção do endotélio nos efeitos contráteis da β -FEA em anéis de aorta isolada de rato

Com o objetivo de investigar a influência do endotélio no efeito contrátil da β -FEA, anéis de aorta com endotélio removido em tônus basal foram induzidos às curvas concecitração-efeito à β -FEA (1-600 μM), adicionada ao banho e mantida em uma mesma concentração por 5 minutos. Em seguida, foi realizado o mesmo protocolo em anéis de aorta com endotélio intacto e induzidos às curvas concentração-efeito à β -FEA (10-3000 μM) para efeitos de comparação. A amplitude da curva de concentração-efeito à β -FEA foi registrada como percentual da contração inicial de K^+ (60 mM).

3.5.5 Avaliação do efeito da inibição da guanilato ciclase sobre o relaxamento induzido por bloqueador alfa-adrenérgico

Com o objetivo de investigar suposto antagonismo alfa-adrenérgico da β -FEA, decidimos comparar seus efeitos com os do prazosin (conhecido antagonista alfa-adrenérgico). Anéis de aorta isolada com endotélio intacto foram previamente tratados com ODQ (10 μM), inibidor seletivo da enzima guanilil ciclase, após 10 minutos do

prévio tratamento, esses anéis de aorta isolada foram induzidos a uma contração de PHE (0,3 μM), esta concentração foi menor do que a utilizada nos experimentos com β -FEA porque na presença do ODQ a contração tende a ser maior, logo optamos por diminuir a concentração para obtermos uma amplitude comparável com as contrações induzidas nos experimentos com a amina traço. Em seguida, foram obtidas curvas concentração-efeito ao prazosin (0,1 - 30 nM), um antagonista de receptor α_1 -adrenérgico, foram adicionadas ao banho concentrações cumulativas de prazosin e mantidas em uma mesma concentração por 5 minutos.

3.5.6 Avaliação do efeito da β -FEA sobre as contrações transitórias induzidas por fenilefrina em anéis de aorta mantidos em meio sem Ca^{2+}

Com a intenção de avaliar o efeito da β -FEA sobre as contrações transitórias induzidas pela liberação de Ca^{2+} intracelular, os anéis de aorta com endotélio intacto foram mantidas em solução de Krebs sem Ca^{2+} e posteriormente adicionado EGTA (1 mM), após 10 minutos, eles foram estimulados com PHE (1 μM). Após este processo, os anéis de aorta foram estimulados com K^+ (60 mM) com o objetivo de repor novamente os estoques intracelulares de Ca^{2+} . Em seguida, os tecidos foram novamente expostos ao meio de perfusão sem Ca^{2+} , seguido pela adição de EGTA (1 mM) por 5 minutos e posteriormente adicionado β -FEA (100 μM) também por 5 min para o estímulo com PHE (1 μM). Experimentos controle também foram realizados seguindo o mesmo protocolo descrito acima, retirando-se apenas a β -FEA (100 μM) para avaliar se sua presença interferiria na amplitude de contração. A amplitude destas contrações de PHE foi registrada como percentual da contração inicial de K^+ (60 mM) em meio de perfusão normal.

3.5.7 Avaliação do efeito inibitório da β -FEA nas contrações da aorta isolada de rato induzidas pela restauração de Ca^{2+} extracelular após depleção dos estoques intracelulares

Com a intenção de avaliar o efeito da β -FEA nas contrações induzidas pela restauração de Ca^{2+} extracelular após depleção dos estoques intracelulares, anéis de aorta isolada com endotélio intacto foram mantidas em solução de Krebs sem Ca^{2+} e posteriormente adicionado EGTA (1 mM) e tapsigargina (1 μM) para posterior

estimulação com noradrenalina (1 μM). Este procedimento foi repetido por três vezes, mantendo a preparação em meio sem Ca^{2+} , até que a contração fásica induzida por noradrenalina praticamente desaparecesse, sugerindo a depleção dos estoques intracelulares de Ca^{2+} . Posteriormente, após remoção de noradrenalina e na presença de EGTA (0,1 mM), tapsigargina (1 μM) e nifedipina (1 μM) adicionados 5 minutos antes da adição de $\beta\text{-FEA}$ (300 μM) por 10 minutos para em seguida a concentração extracelular de Ca^{2+} fosse restaurada para 2,5 mM, induzindo uma contração sustentada pela influxo de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} operados por estoques (SOCC). Experimentos controle também foram realizados seguindo o mesmo protocolo descrito acima, retirando-se apenas a $\beta\text{-FEA}$ (300 μM) para avaliar se sua presença interferiria na amplitude de contração. A amplitude destas contrações induzidas pela restauração extracelular de Ca^{2+} foi registrada como percentual da contração inicial de K^+ (60 mM) em meio de perfusão normal.

3.5.8 Avaliação da influência do endotélio nos efeitos da $\beta\text{-FEA}$ na curva concentração-efeito induzida por fenilefrina em anéis de aorta

Com o objetivo de avaliarmos os efeitos inibitórios da $\beta\text{-FEA}$ sobre as contrações induzidas por PHE e a influência do endotélio nestes efeitos, anéis de aorta isolada com e sem endotélio foram previamente tratados com $\beta\text{-FEA}$ nas concentrações de 30, 100 e 300 μM , por cerca de 15 minutos antes da estimulação com concentrações crescentes de PHE (1 nM a 30 μM), adicionadas ao banho e mantidas em uma mesma concentração por 5 minutos, para obtenção da curva concentração-efeito à PHE. Experimentos controle foram realizados seguindo o mesmo procedimento descrito na ausência de $\beta\text{-FEA}$. A amplitude da curva de concentração-efeito à PHE foi registrada como percentual da contração inicial de K^+ (60 mM).

3.5.9 Avaliação do efeito da $\beta\text{-FEA}$ sobre a curva concentração-efeito para o K^+

Com o objetivo de avaliarmos o efeito da $\beta\text{-FEA}$ sobre as contrações induzidas por K^+ , anéis de aorta com endotélio intacto foram previamente tratados com $\beta\text{-FEA}$ nas concentrações de 30, 100 e 300 μM , por cerca de 15 minutos antes da estimulação com concentrações crescentes de K^+ (10-120 mM), adicionadas ao banho e mantidas em uma mesma concentração por 5 minutos, para obtenção da curva concentração-efeito para o K^+ . Experimentos controle foram realizados seguindo o

mesmo procedimento descrito na ausência de β -FEA. A amplitude da curva de concentração-efeito para o K^+ foi registrada como percentual da contração inicial de K^+ (60 mM).

3.5.10 Avaliação do efeito da β -FEA sobre uma contração sustentada de clonidina 100 μ M

Para avaliarmos o efeito da β -FEA sobre contrações induzidas por agonista α_2 -adrenérgico, induzimos uma prévia contração com clonidina (100 μ M), incubada ao banho por cerca de 10 a 15 minutos, em anéis de aorta isolada com endotélio removido, pois na presença do endotélio a clonidina não foi capaz de induzir uma contração expressiva. Em seguida, curvas concentração-efeito foram realizadas por adições cumulativas de β -FEA (1-300 μ M) acrescentadas ao banho e mantidas em uma mesma concentração por 5 minutos.

3.5.11 Avaliação da recuperação da resposta contrátil ao potássio após exposição à β -FEA em anéis de aorta isolada de rato

Com o objetivo de avaliarmos a recuperação da resposta contrátil do tecido após exposição da maior concentração da β -FEA (300 μ M) utilizada nos experimentos que avaliaram seu efeito relaxante, algumas preparações que inicialmente haviam sido estimuladas com K^+ (60 mM) foram lavadas com solução fisiológica de Krebs-Henseleit por diversas vezes até estabilização da preparação, e então adicionou-se novamente K^+ (60 mM). A comparação da amplitude da contração final com a da contração obtida inicialmente antes do experimento foi utilizada para avaliar a capacidade de recuperação do tecido.

3.6 Análise estatística

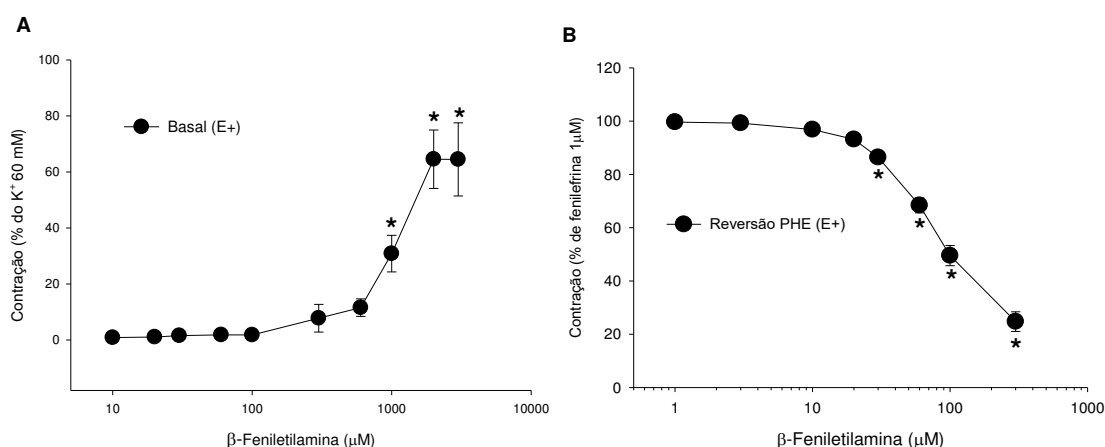
A maior parte dos valores foi expressa pelas médias aritméticas \pm erro padrão da média (E.P.M.), com a representação do número de observações experimentais (n). A significância estatística foi considerada quando a probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade for menor que 5% ($p < 0,05$), o que foi avaliado através de análise de variância (ANOVA) seguida de um teste de múltipla comparação, conforme apropriado. Os testes foram aplicados com a utilização do programa SigmaStat (Systat Software Inc, USA) e os gráficos confeccionados com o programa SigmaPlot (Systat Software Inc, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos contráteis e relaxantes da β -FEA em aorta isolada de rato

Curvas concentração-efeito foram obtidas após adição de β -FEA (10-3000 μM) ($n = 9$) em preparações isoladas de anéis de aorta de rato com endotélio intacto. A adição de β -FEA foi realizada em preparações com endotélio intacto e mantidas em tônus basal (Fig. 7A) ou em preparações pré-contraídas com fenilefrina (PHE; 1 μM ; Fig. 7B). No tônus basal, a β -FEA apresentou efeito contrátil significativo na concentração de 1000 μM ($p < 0,05$, Holm-Sidak; Fig. 7A), com CE_{50} de 868,79 [475,66 - 1586,72] μM e E_{max} de $64,48 \pm 13,04\%$ em relação a contração de referência induzida por K^+ (60 mM). Quando a β -FEA (1-300 μM) foi adicionada sobre a contração induzida por fenilefrina ($n = 21$), resposta relaxante foi registrada (Fig. 7B). Esse efeito se tornou significativo na concentração de 30 μM de β -FEA e alcançou efeito máximo com 300 μM ao reduzir a contração para $24,7 \pm 3,70\%$ da magnitude observada imediatamente antes da adição de β -FEA. A CE_{50} para o efeito relaxante foi 85,61 [70,81 - 101,5] μM . (Figura 7B).

Figura 7. Curvas concentração-efeito à β -FEA no tônus basal ou em preparações previamente contraídas com fenilefrina.



(A) Representação gráfica mostrando uma curva concentração-efeito à β -FEA (10-3000 μM) ($n = 9$) na ausência de estímulo contrátil (basal) em preparações de anéis de aorta isolados de rato, com endotélio intacto, onde a β -FEA começou a apresentar um efeito contrátil significativo na concentração de 1000 μM (* $p < 0,05$; ANOVA de uma via). Em comparação, o painel (B) mostra uma curva concentração-efeito à β -FEA (1 - 300 μM) sobre pré-contrações induzidas por fenilefrina (1 μM), onde essa contração foi relaxada para $24,7 \pm 3,70\%$ em relação a contração máxima imediatamente antes da adição de β -

FEA. O (n) representa o número de observações experimentais. Os dados são expressos como média \pm E.P.M.

4.2 Efeito da β -FEA em contrações induzidas por fenilefrina, potássio ou U-46619

β -FEA (1 - 300 μ M) relaxou discretamente a contração induzida por K^+ 60 mM (n = 6) com $E_{m\acute{a}x}$ $95,4 \pm 2,1\%$ e por U-46619 0,3 μ M (n = 4) com $E_{m\acute{a}x}$ $84,3 \pm 4,1\%$ em relação a contração máxima obtida imediatamente antes da adição de β -FEA (Figura 8). Estes efeitos foram pouco expressivos quando comparado ao efeito da β -FEA em contração induzida por fenilefrina (vide item 4.1).

Figura 8. Efeito da β -FEA em contrações induzidas por fenilefrina, potássio e U-46619.

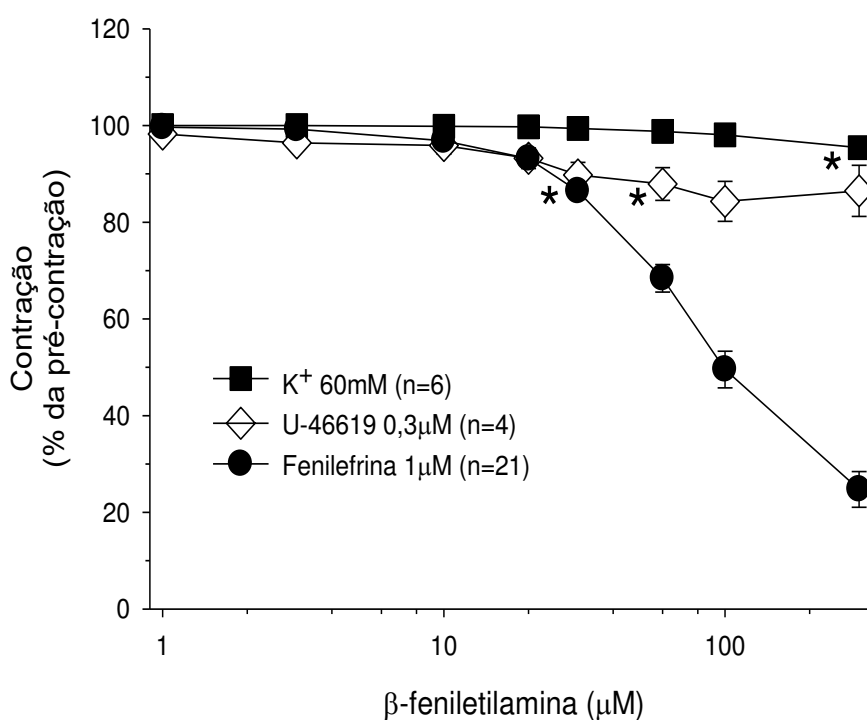


Gráfico mostrando valores médios dos efeitos vasorrelaxantes da β -FEA (1 - 300 μ M) em anéis de aorta isolada de rato com endotélio pré-contraídos com K^+ 60 mM (■, n = 6), U-46619 0,3 μ M (◇, n = 4) ou fenilefrina 1 μ M (●, n = 21). A β -FEA relaxou contrações induzidas por fenilefrina, entretanto, não foi capaz de promover relaxamento considerável quando a contração foi induzida por K^+ , pelo mimético do tromboxano A_2 , U-46619. O (n) representa o número de observações experimentais. Os dados são expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,001$; teste de Holm-Sidak.

4.3 Efeito relaxante da β -FEA em preparações mantidas na presença de propranolol

O pré-tratamento com propranolol 5 μ M (n = 5) não alterou significativamente o efeito relaxante da β - FEA (CE_{50} 90,75 [68,42-120,4] μ M; $p > 0,05$, Mann-Whitney; Figura 9) e E_{max} de $19,84 \pm 2,74\%$.

Figura 9. Efeito da inibição de receptores beta-adrenérgicos na vasodilatação induzida pela β - FEA.

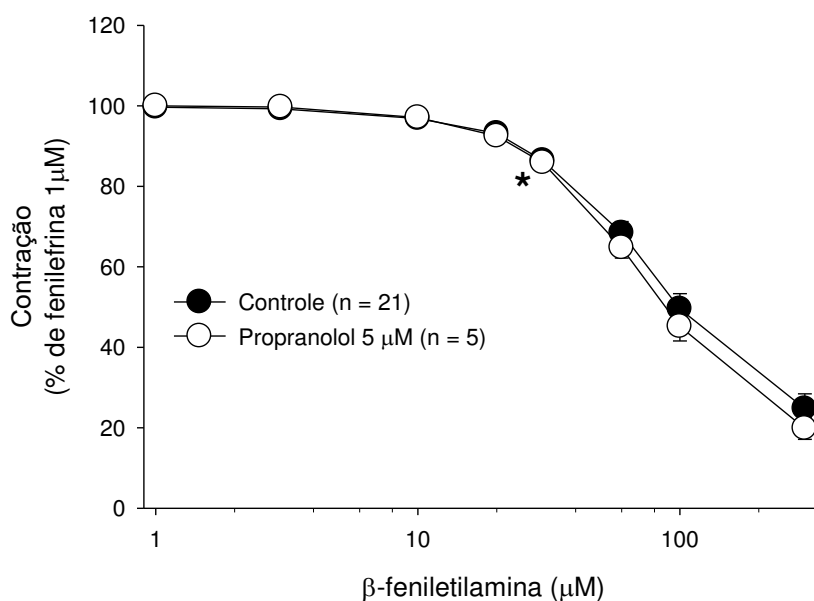
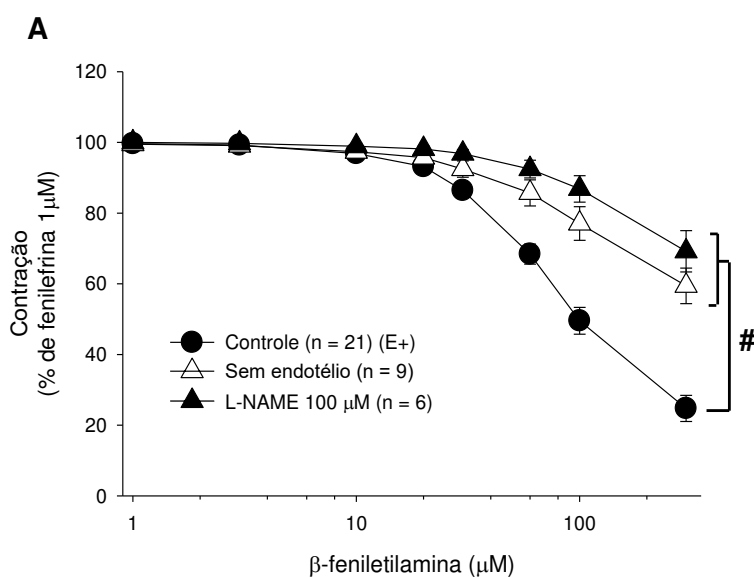


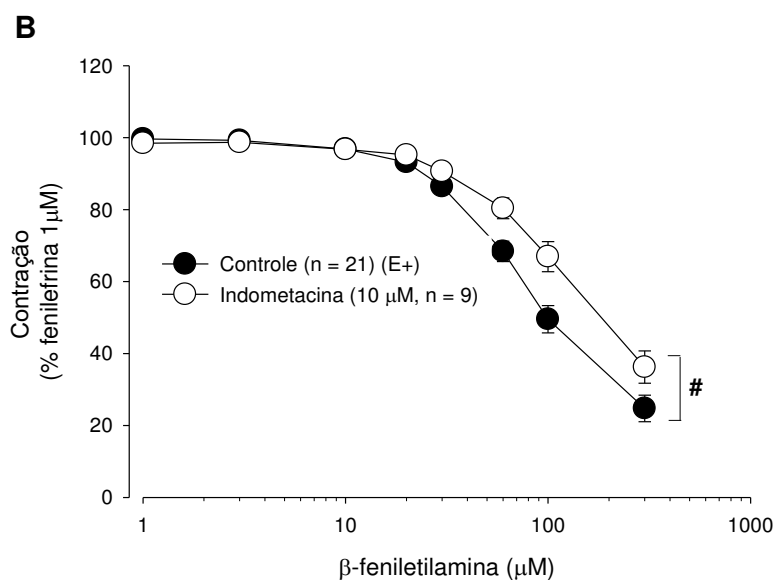
Gráfico mostra a curva à β - FEA na ausência (●, n = 21) e presença (○, n = 5) de propranolol 5 μ M. O prévio tratamento com propranolol não alterou significativamente o efeito relaxante da β - FEA. * primeira concentração com efeito relaxante significativo ($p < 0,05$; ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak).

4.4 Participação de fatores derivados do endotélio no efeito vasodilatador da β -FEA

A remoção do endotélio ($n = 9$) diminuiu significativamente ($p < 0,05$; teste de Holm-Sidak) o efeito relaxante da β -FEA, uma vez que a resposta contrátil à PHE ($1 \mu\text{M}$) na concentração máxima usada de β -FEA ($300 \mu\text{M}$) foi reduzida para $59,4 \pm 5,03\%$. Similar à remoção do endotélio, a presença de L-NAME ($100 \mu\text{M}$; $n = 6$), inibidor inespecífico de óxido nítrico sintase, ou de indometacina ($10 \mu\text{M}$; $n = 9$), inibidor inespecífico da enzima cicloxigenase, também reduziu o efeito relaxante máximo da β -FEA ($300 \mu\text{M}$) para $69,2 \pm 5,85\%$ ($p < 0,05$; teste de Holm-Sidak; Figura 10A) e $36,2 \pm 4,5\%$ ($p < 0,05$, teste de Holm-Sidak; Figura 10B), respectivamente. Esses valores foram significativamente maiores que aqueles observados nas preparações controle ($24,7 \pm 3,70\%$; vide item 4.1 acima).

Figura 10. Participação de fatores derivados do endotélio no efeito vasodilatador da β -FEA.





Curva concentração-efeito à β - FEA (1 - 300 μM) sobre uma pré-contração induzida por fenilefrina 1 μM em preparações com endotélio íntegro sem adição prévia de qualquer outra substância (A e B, ●, n = 21), comparada a segmentos cujo endotélio foi removido (A, Δ , n = 9), ou na presença de L-NAME 100 μM (A, \blacktriangle , n = 6) ou de indometacina (B, ○, n = 9). Os efeitos vasorrelaxantes da β -FEA foram significativamente reduzidos pela retirada mecânica do endotélio, pelo tratamento prévio com L-NAME (100 μM) ou com indometacina (10 μM). # p < 0,05; ANOVA de duas vias com pós-teste de Holm-Sidak, em comparação à curva controle.

4.5 Influência da remoção do endotélio nos efeitos contráteis da β -FEA em anéis de aorta

Em preparações com endotélio intacto mantidas em tônus basal, a adição de β -FEA (10-3000 μ M) (n = 9) produziu contração de forma dependente de concentração e a curva concentração-efeito é mostrada novamente na Fig 11. Na ausência do endotélio, o efeito contraturante foi observado na faixa de concentração de 1 a 600 μ M (n = 9), tendo o efeito contrátil apresentado CE_{50} de 9,62 [2,73-33,82] μ M e E_{max} de $95,52 \pm 7,60\%$ (Figura 11). Esses valores foram significativamente diferentes daqueles observados em preparações com endotélio intacto (CE_{50} de 868,79 [475,66 - 1586,72] μ M e E_{max} de $64,48 \pm 13,04\%$; vide item 4.1) ($p < 0,05$; Mann-Whitney).

Figura 11. Curva concentração-efeito à β -FEA no tônus basal em preparações de anéis de aorta com endotélio intacto e removido

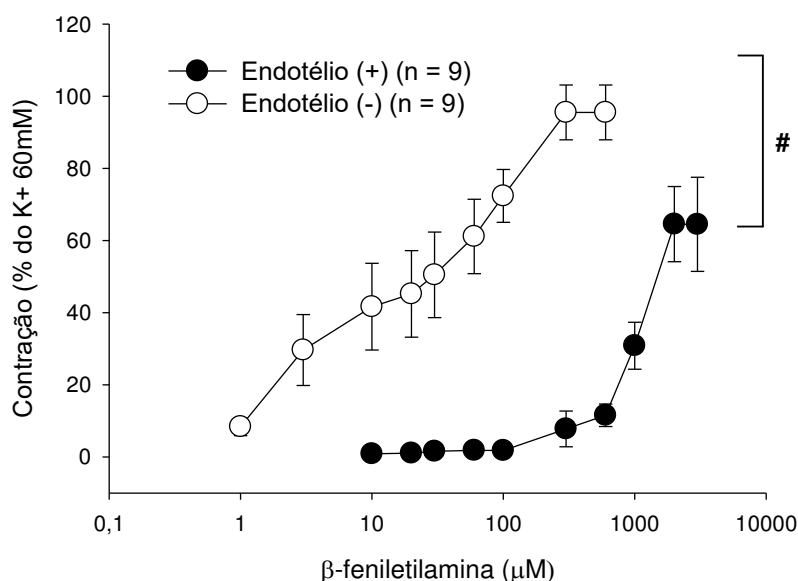
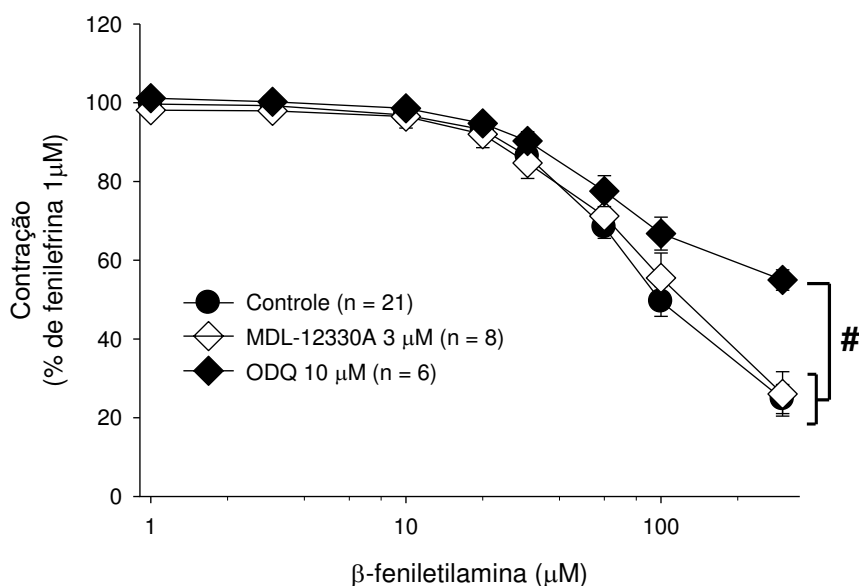


Gráfico mostrando a curva concentração-efeito à β -FEA (10-3000 μ M) (\bullet , n = 9), na presença do endotélio em comparação com a curva concentração-efeito à β -FEA (1-600 μ M) (\circ , n = 9), na ausência do endotélio, realizadas no basal. A remoção do endotélio vascular potencializou o efeito contrátil da β -FEA, deslocando a curva para a esquerda e reduzindo significativamente os valores de CE_{50} . # $p < 0,05$; Mann-Whitney.

4.6 Papel das vias de formação de nucleotídeos cíclicos no efeito vasorrelaxante da β -FEA em contrações induzidas por fenilefrina em aorta isolada de ratos

O tratamento dos anéis de aorta com ODQ 10 μ M (inibidor da guanilato ciclase, n = 6) diminuiu significativamente ($p < 0,05$; teste de Holm-Sidak) a resposta vasodilatadora induzida pela β - FEA, uma vez que a contração induzida pela PHE (1 μ M), na concentração máxima usada de β -FEA (300 μ M) foi reduzida para um $E_{m\acute{a}x}$ $59,95 \pm 3,2\%$. No entanto, o tratamento dos anéis de aorta com MDL-12330A 3 μ M (inibidor da adenilato ciclase, n = 8) não reduziu significativamente o efeito relaxante da β -FEA com valor de CE_{50} 124,36 [77,14-200,49] μ M ($p > 0,05$; Mann-Whitney; Figura 12).

Figura 12. Efeito vasorrelaxante da β -FEA em aorta contraída com fenilefrina na ausência e na presença de inibidor da via guanilato ciclase/GMPc/PKG e de inibidor da via adenilato ciclase/AMPc/PKA.

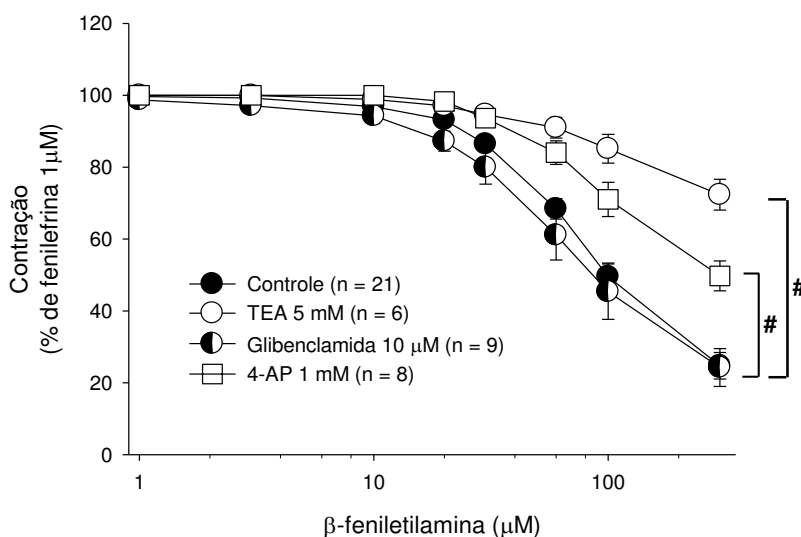


Efeito da β - FEA (1 - 300 μ M) sobre uma pré-contração induzida por fenilefrina 1 μ M em preparações com endotélio íntegro sem adição prévia de qualquer outra substância (\bullet , n = 21), comparada a segmentos na presença de MDL-12330A 3 μ M (B, \diamond , n = 8), ou de ODQ 10 μ M (B, \blacklozenge , n = 6). O efeito vasorrelaxante da β - FEA foi significativamente reduzido pelo prévio tratamento com ODQ, entretanto não foi alterado pelo prévio tratamento com MDL-12330A. # $p < 0,05$; ANOVA de duas vias com pós-teste de Holm-Sidak, em comparação à curva controle.

4.7 Papel dos canais para potássio na vasodilatação induzida pela β -FEA

O tratamento de anéis de aorta com endotélio intacto pré-tratados com glibenclamida (inibidor de canais de potássio ativados por trifosfato de adenosina [ATP]; 10 μ M, n = 9) não alterou significativamente o efeito relaxante provocado pela β -FEA, visto que os valores de CE_{50} de 79,5 [48,23 – 131,07] μ M não foram diferentes daqueles obtidos de preparações controle (p > 0,05; Mann-Whitney). Entretanto, o efeito relaxante da β -FEA foi significativamente diminuído pelo tratamento com tetraetilamônio (TEA, um bloqueador não específico de canais para K^+ ; 5 mM, n = 6; p < 0,05; teste de Holm-Sidak) ou com 4-aminopiridina (4-AP, um bloqueador seletivo de canais para K^+ operados por voltagem; 1 mM, n = 8), uma vez que a resposta contrátil à PHE (1 μ M) na concentração máxima usada de β -FEA (300 μ M) foi reduzida para $E_{m\acute{a}x}$ 72,34 \pm 4,3% e para $E_{m\acute{a}x}$ 49,74 \pm 4,15%, respectivamente (Figura 13), valores maiores que aqueles produzidos pela β -FEA e observados na ausência de TEA e 4-AP (24,7 \pm 3,70%; vide item 4.2 acima).

Figura 13. Efeito dos bloqueadores de canais para potássio na vasodilatação induzida pela β -FEA.

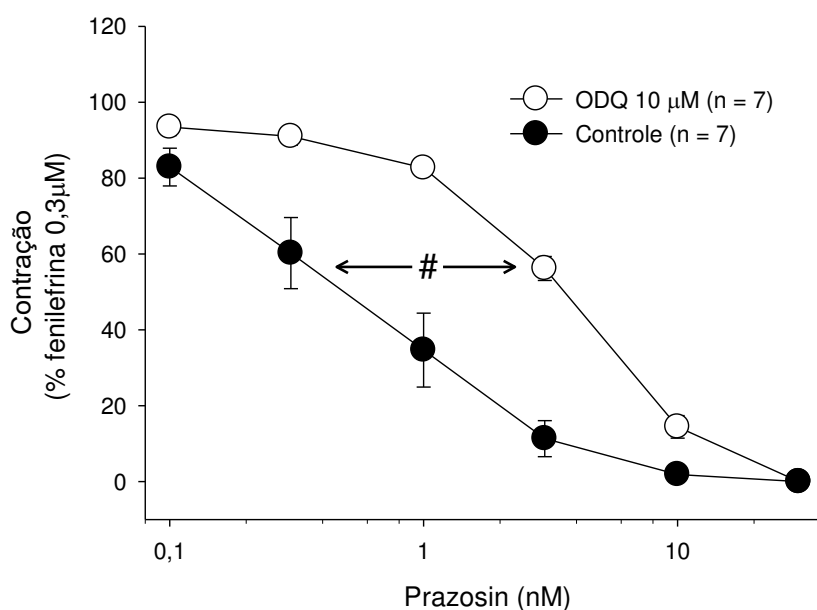


Efeito da β -FEA (1 - 300 μ M) sobre uma pré-contracção induzida por fenilefrina 1 μ M em preparações com endotélio íntegro sem adição prévia de qualquer outra substância (\bullet , n = 21), comparada a segmentos na presença de TEA 5 mM (\circ , n = 6), glibenclamida 10 μ M (\bullet , n = 9) ou de 4-AP 1 mM (\square , n = 8). O efeito vasorrelaxante da β - FEA foi significativamente reduzido pelo prévio tratamento com TEA (5 mM) ou 4-aminopiridina (1 mM), mas não pelo pré-tratamento com glibenclamida (10 μ M). # p < 0,05; ANOVA de duas vias com pós-teste de Holm-Sidak, em comparação à curva controle.

4.8 Efeito da inibição da guanilato ciclase sobre o relaxamento induzido por bloqueador alfa-adrenérgico

Adição de prazosin (0,1 - 30 nM), um antagonista de receptor α -1 adrenérgico, a anéis de aorta pré-contraídos com PHE 0,3 μ M induziu relaxamento completo do estímulo contrátil (Fig. 14). A CE_{50} para esse efeito foi de 0,50 [0,21-1,22] nM, valor significativamente aumentado pelo pré-tratamento com ODQ 10 μ M (n = 7), inibidor da guanilato ciclase, para 3,53 [2,84-4,38] nM (p < 0,05, ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak; Figura 15), sem alteração do efeito relaxante máximo.

Figura 14. Efeito da inibição da guanilato ciclase sobre o relaxamento induzido por bloqueador alfa-adrenérgico.



Curva concentração-efeito ao Prazosin (0,1 - 30 nM) sobre uma pré-contracção induzida por PHE 0,3 μ M na ausência (●, n = 7) e na presença de ODQ 10 μ M (○, n = 7). O tratamento prévio com ODQ deslocou significativamente a curva concentração efeito do prazosin para direita, diminuindo a sua potência farmacológica. # p < 0,05; ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak.

4.9 Efeito da β -FEA sobre as contrações transitórias induzidas por fenilefrina em anéis de aorta mantidos em meio sem Ca^{2+}

Em meio sem adição prévia de Ca^{2+} e com EGTA 1 mM, a adição de PHE (1 μM) induziu contração fásica, isto é, contração transitória não sustentada com magnitude de $43,6 \pm 1,4\%$ ($n = 6$) da contração controle (K^+ 60 mM em meio contendo Ca^{2+}). Na presença de β -FEA 100 μM ($n = 9$), a contração fásica de PHE foi correspondente a $26,5 \pm 2,8\%$, valor significativamente menor que aquele obtido na ausência da β -FEA ($p < 0,05$; ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak; Fig. 15).

Figura 15. Efeito da β -FEA sobre as contrações transitórias induzidas pela fenilefrina em anéis de aorta de rato mantidos em meio sem Ca^{2+} .

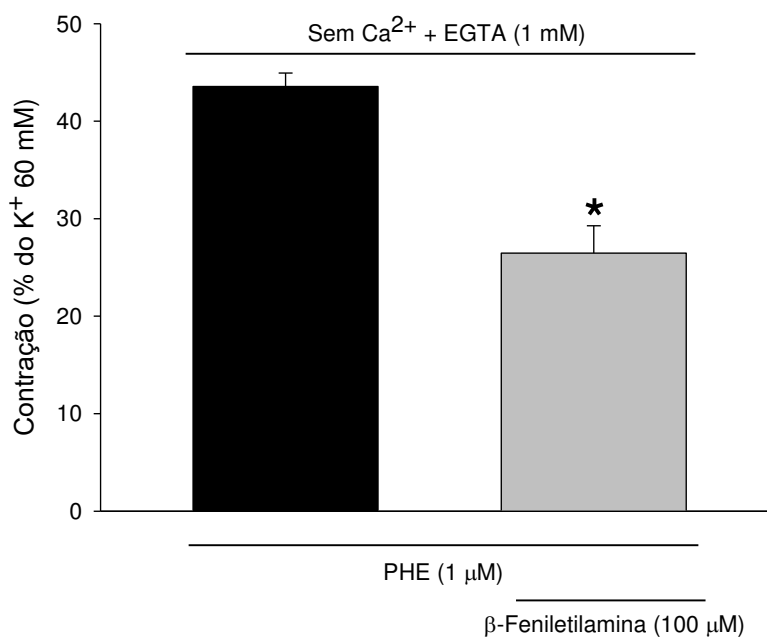


Gráfico representando resposta à fenilefrina 1 μM em meio livre de Ca^{2+} contendo EGTA 1mM na ausência ($n = 6$) e na presença ($n = 9$) de β -FEA 100 μM . A β -FEA (100 μM) inibiu a resposta contrátil à fenilefrina. * $p < 0,05$; ANOVA de uma via com pós-teste de Holm-Sidak.

4.10 Efeito inibitório da β -FEA nas contrações da aorta isolada de rato induzidas pela restauração de Ca^{2+} extracelular após depleção dos estoques intracelulares em meio com tapsigargina, nifedipina e EGTA

Em anéis de aorta mantidos em meio sem Ca^{2+} , contrações fásicas como descritas na seção anterior foram obtidas através de estímulos sucessivos com noradrenalina ($1 \mu\text{M}$) até o desaparecimento da resposta contrátil, o que sugeriu o esgotamento dos estoques intracelulares de Ca^{2+} . Após a remoção da noradrenalina do meio extracelular, o Ca^{2+} extracelular foi restaurado para $2,5 \text{ mM}$, na presença de nifedipina ($1 \mu\text{M}$), tapsigargina ($1 \mu\text{M}$) e EGTA ($0,1 \text{ mM}$), procedimento que causou contração da preparação cuja magnitude foi $26,6 \pm 3,6\%$ ($n = 6$) da contração de referência (K^+ 60 mM) em meio com Ca^{2+} . Na presença de β -FEA ($300 \mu\text{M}$; $n = 8$), esta contração sustentada induzida por Ca^{2+} foi significativamente reduzida para $16,9 \pm 2,6\%$ ($p < 0,05$; teste de Holm-Sidak; Fig. 16).

Figura 15. Efeito da β -FEA sobre a contração induzida pela restauração do Ca^{2+} extracelular após depleção dos estoques intracelulares de Ca^{2+} .

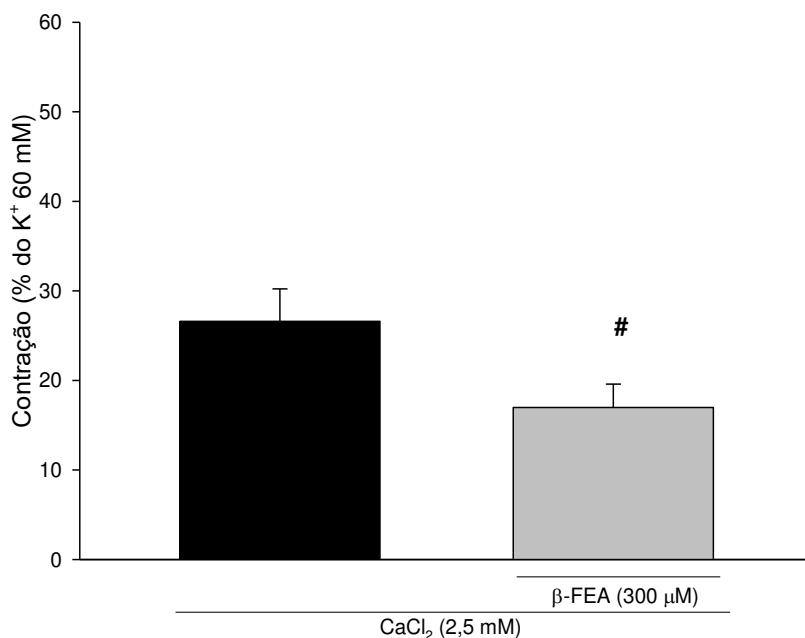


Gráfico mostrando a magnitude da resposta contrátil causada pela restauração de Ca^{2+} no meio extracelular ($2,5 \text{ mM}$) em comparação com a resposta de referência induzida por K^+ 60 mM em meio com cálcio. Após estimulação repetida com noradrenalina até alcançar o esgotamento dos estoques internos, o tecido foi mantido na ausência de qualquer estímulo contrátil na presença de EGTA ($0,1 \text{ mM}$), nifedipina

(1 μM) e taspigargina (1 μM). A adição de 2,5 mM de cálcio produziu contração ($n = 6$) que foi inibida pelo pré-tratamento com β -FEA (300 μM) ($n = 8$). O (n) representa o número de observações experimentais. Os dados são expressos como média \pm E.P.M. # $p < 0,05$; comparado com o efeito contrátil na ausência de β -FEA (teste t).

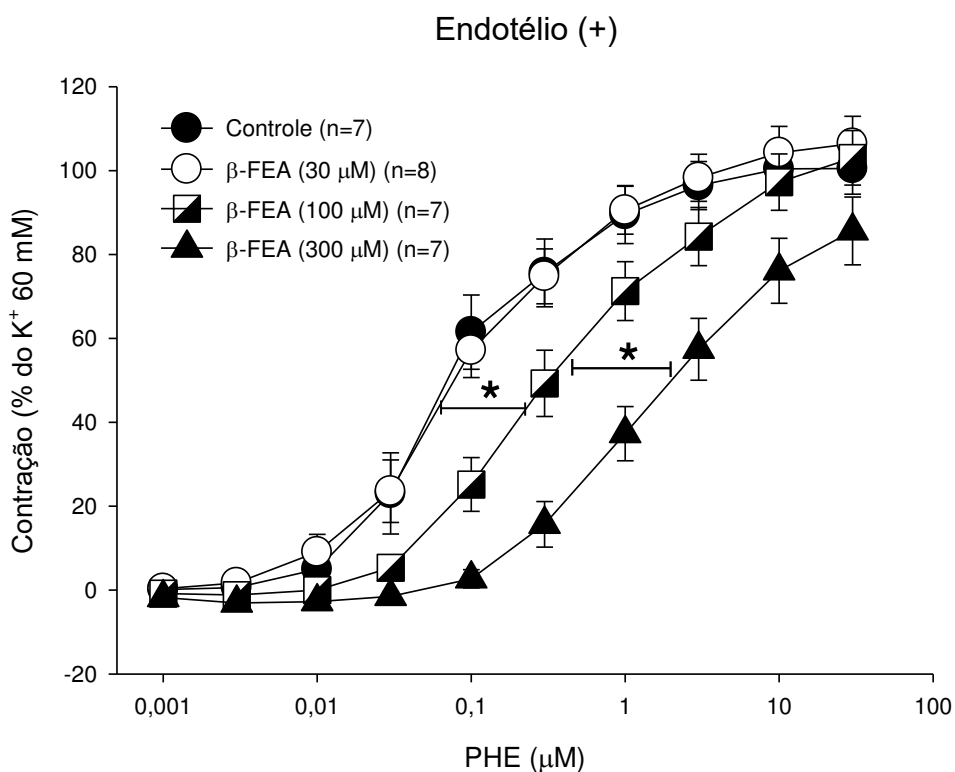
4.11 Influência do endotélio nos efeitos da β -FEA na curva concentração-efeito induzida por fenilefrina em anéis de aorta

Anéis de aorta com endotélio intacto ou com endotélio removido foram estimulados com concentrações crescentes de fenilefrina (PHE; 1 nM a 30 μM) e os respectivos efeitos contráteis estão mostrados nas Figs. 17 (endotélio intacto) e 18 (endotélio removido). Nas preparações com endotélio intacto, a PHE produziu contração com magnitude máxima de $100,49 \pm 6,13\%$ da resposta de referência (K^+ 60 mM) e a CE_{50} foi 0,08 [0,04-0,16] μM ($n = 7$). Na presença de β -FEA (30 μM), a CE_{50} para PHE foi 0,10 [0,05-0,21] μM com E_{max} de $106,40 \pm 6,54\%$, valores sem diferença estatística quando comparados aos respectivos valores na ausência de β -FEA. Em contrapartida, quando na presença de β -FEA (100 μM e 300 μM), a curva concentração-efeito à fenilefrina foi deslocada para a direita, uma vez que a CE_{50} de 0,35 [0,19-0,63] μM e 1,35 [0,85-2,14] μM , respectivamente, foram estatisticamente maiores que aquela obtida na ausência de β -FEA ($p < 0,05$; ANOVA de duas vias com pós-teste de Holm-Sidak; Fig. 17). No entanto, não houve diferença estatística nos valores de E_{max} para a maior concentração usada de PHE (30 μM), os quais foram $103,4 \pm 6,51\%$ na presença de 100 μM β -FEA e $85,62 \pm 8,07\%$ na presença de 300 μM β -FEA ($p > 0,05$ em comparação com E_{max} na ausência de β -FEA [$100,49 \pm 6,13\%$]; Fig. 17).

As preparações com endotélio removido apresentaram maior responsividade à PHE uma vez que os valores de CE_{50} de 10,90 [7,10-16,70] nM e E_{max} de $144,18 \pm 7,58\%$ foram significativamente diferentes daqueles obtidos para PHE em preparações com o endotélio intacto ($p < 0,05$; Mann-Whitney). Na ausência do endotélio, o pré-tratamento com β -FEA 30 μM deslocou para a direita a curva de resposta à PHE, apresentando valor significativamente maior de CE_{50} (40,20 [24,30-66,30] nM; $p < 0,05$; Mann-Whitney) sem alterar o valor de E_{max} ($136,41 \pm 14,29\%$; $p > 0,05$; ANOVA de duas vias). Nas concentrações de 100 μM e 300 μM além de a β -FEA deslocar a curva de resposta à fenilefrina para direita, aumentando os valores de CE_{50} ,

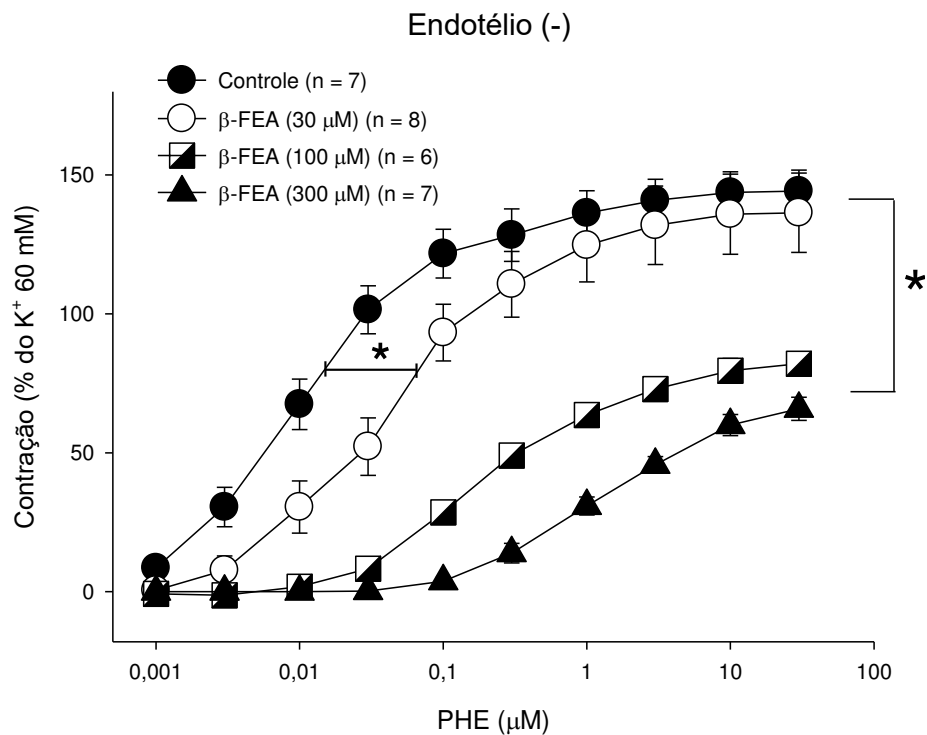
também houve a diminuição do efeito máximo ($p < 0,05$; ANOVA de duas vias). Na concentração de 100 μM , a CE_{50} foi de 193,40 [159,40-234,50] nM e o $\text{E}_{\text{máx}}$ foi de $82,06 \pm 4,25\%$ ($n = 6$). Na concentração de 300 μM , a CE_{50} foi 1.102,30 [650,69-1.867,20] nM e o $\text{E}_{\text{máx}}$ $65,84 \pm 4,16\%$ ($n = 7$; Fig. 18).

Figura 17. Efeitos do pré-tratamento com β – FEA na curva concentração- efeito à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio intacto.



Curvas concentração-efeito à fenilefrina (1,0 nM a 30 μM) foram construídas onde preparações isoladas de aorta de rato, com endotélio intacto, eram previamente tratadas com β -FEA nas concentrações de 30 μM (\circ , $n = 8$), 100 μM (\blacksquare , $n = 7$) e 300 μM (\blacktriangle , $n = 7$) e também na sua ausência, controle (\bullet , $n = 7$). Os dados são média \pm E.P.M e estão expressos como percentual da contração inicial induzida por K^+ (60 mM). O (n) representa o número de observações experimentais. * $p < 0,05$; ANOVA de duas vias.

Figura 18. Efeitos do pré-tratamento com β – FEA na curva concentração- efeito à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio removido.

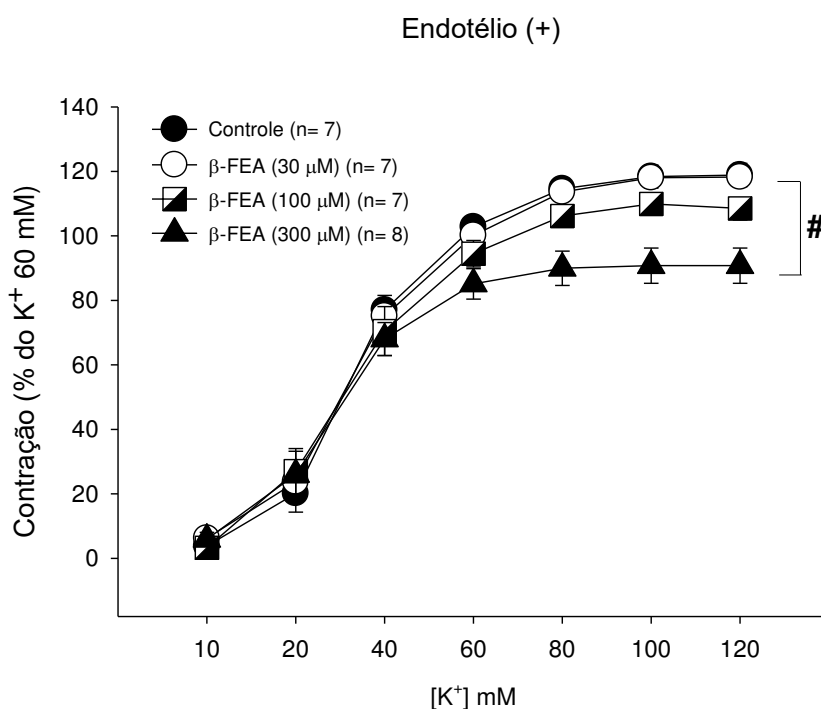


Curvas concentração-efeito à fenilefrina (1,0 nM a 30 µM) foram construídas onde preparações isoladas de aorta de rato, com endotélio removido, eram previamente tratadas com β – FEA nas concentrações de 30 µM (○, n=8), 100 µM (◻, n = 6) e 300 µM (▲, n = 7) e também na sua ausência, controle (●, n = 7). Os dados são média \pm E.P.M e estão expressos como percentual da contração inicial induzida por K⁺ (60 mM). O (n) representa o número de observações experimentais.* p < 0,05; ANOVA de duas vias.

4.12 Efeito da β -FEA sobre a curva concentração-efeito para o K^+

Preparações de anéis de aorta com o endotélio intacto contraíram de maneira dependente de concentração em resposta a concentrações crescentes de K^+ (10-120 mM) com E_{max} de $118,89 \pm 3,58\%$ e CE_{50} de 31,49 [25,17-39,42] mM. Na presença de 30 μ M ou 100 μ M de β -FEA não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de CE_{50} (32,11 [26,69-38,62] e 29,76 [22,11-40,06] mM, respectivamente) ou nos valores de E_{max} ($118,28 \pm 2,97\%$ e $108,53 \pm 3,61\%$, respectivamente) em relação à curva controle ($p > 0,05$; ANOVA de duas vias). Por outro lado, em anéis de aorta pré-tratados com 300 μ M de β -FEA houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$; ANOVA de duas vias) a partir da concentração de 60 mM de K^+ diminuindo o efeito máximo para $90,77 \pm 5,46\%$, mas sem alteração da CE_{50} que corresponde a 26,55 [20,89-33,74] mM (Fig. 19).

Figura 19. Efeito da β -FEA sobre a curva concentração-efeito para o K^+ .



Curvas concentração-efeito ao potássio (10 a 120 mM) foram construídas onde preparações isoladas de aorta de rato, com endotélio intacto, eram previamente tratadas com β - FEA nas concentrações de 30 μ M (\circ , n = 7), 100 μ M (\blacksquare , n = 7) e 300 μ M (\blacktriangle , n = 8) e também na sua ausência, controle (\bullet , n = 7). Os dados são média \pm E.P.M e estão expressos como percentual da contração inicial induzida por K^+ (60 mM). O (n) representa o número de observações experimentais. # $p < 0,05$; ANOVA de duas vias.

4.13 Efeito da β -FEA sobre uma contração sustentada de clonidina 100 μ M

Realizou-se os experimentos em anéis de aorta isolada com endotélio removido, pois na presença do endotélio a clonidina não foi capaz de induzir uma contração expressiva. A β -FEA (1 - 300 μ M) não alterou significativamente ($p > 0,05$; ANOVA de uma via) a contração induzida por clonidina (agonista α_2 -adrenérgico; 100 μ M) ($n = 9$). Na maior concentração de β -FEA (300 μ M), a amplitude de contração da clonidina foi correspondente a $93,45 \pm 4,25\%$ daquela obtida imediatamente antes da adição de β -FEA. Por comparação nas mesmas condições, a contração induzida por PHE (1 μ M) também na ausência de endotélio ($n = 9$), foi reduzida pela β -FEA para $59,40 \pm 5,03\%$ em relação à resposta máxima, valor significativamente diferente do obtido quando a contração foi induzida por clonidina ($p < 0,05$; ANOVA de duas vias) (vide item 4.4 acima).

Figura 16. Efeito da β - FEA sobre uma contração sustentada de clonidina 100 μ M.

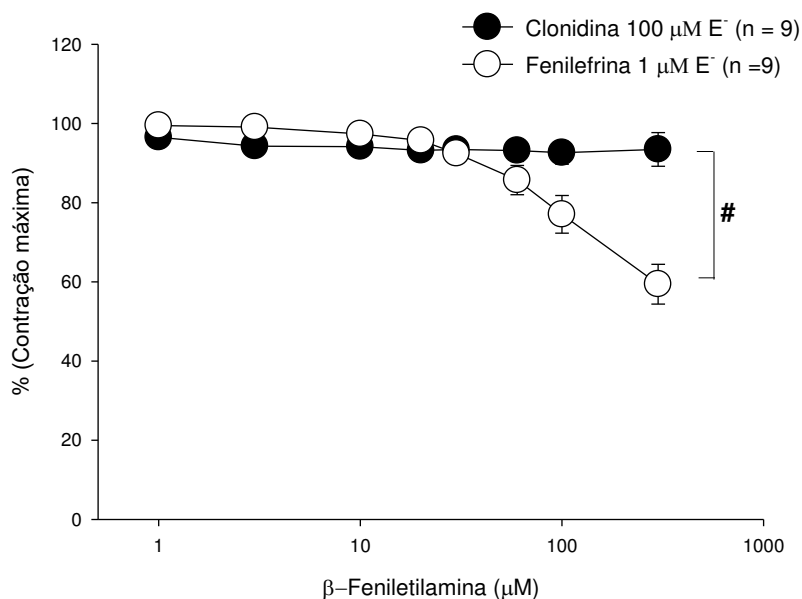


Gráfico mostrando curva concentração-efeito à β -FEA (1 - 300 μ M) sobre pré-contrações induzidas por clonidina 100 μ M (\bullet , $n = 9$) ou fenilefrina 1 μ M (\circ , $n = 9$) em preparações com endotélio removido. A β -FEA (1 - 300 μ M) não relaxou significativamente a contração promovida pela clonidina. Os dados são expressos como média \pm E.P.M. # $p < 0,05$; ANOVA de duas vias.

4.14 Recuperação da resposta contrátil ao potássio após exposição à β -FEA em anéis de aorta isolada de rato

A amplitude da contração de K^+ 60 mM em anéis de aorta isolada após exposição à β -FEA 300 μ M (n = 6) foi de $105,7 \pm 5,0\%$ em relação à contração inicial de K^+ 60 mM em anéis de aorta isolada e não expostos à β -FEA.

Figura 17. Recuperação da resposta contrátil ao potássio após exposição à β -FEA em anéis de aorta isolada de rato.

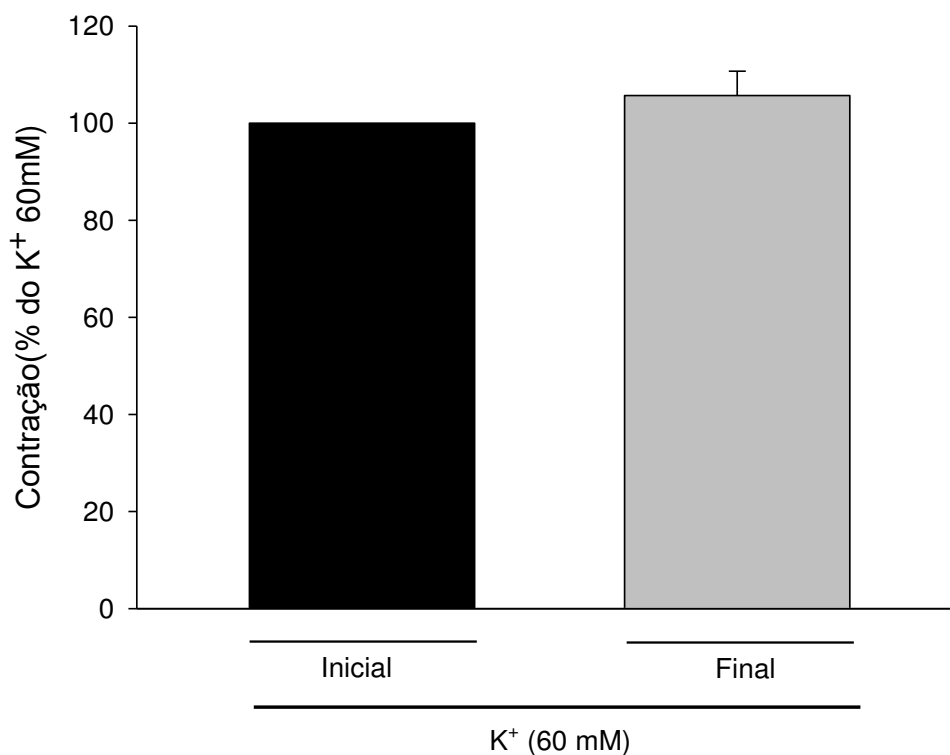


Gráfico demonstrando resposta ao K^+ 60 mM depois da exposição e remoção de uma concentração de 300 μ M de β -FEA (n = 6) – Final. Resposta expressa percentualmente em relação ao mesmo estímulo realizado antes da exposição à β -FEA – Inicial. $p > 0,05$; ANOVA de uma via.

5. DISCUSSÃO

Este estudo foi elaborado com o intuito de investigar o potencial efeito vasorrelaxante da β -FEA, uma amina traço fisiologicamente importante que parece exercer seus efeitos através da modulação da liberação de catecolaminas bem como através da ativação dos receptores associados às aminas traço (TAAR) (ZUCCHI et al., 2006). Essa amina traço apresenta efeitos contráteis e relaxantes a depender da faixa de concentração, por exemplo, Broadley et al., (2009) demonstraram que, em rato e em cobaia, a β -FEA apresentou efeito contrátil em anéis de aorta com endotélio removido na faixa de concentração de 1 a 1000 μ M, em contrapartida, em leito mesentérico de rato ela apresentou efeito vasodilatador quando a pressão foi aumentada através da infusão de fenilefrina (100 μ M). Do mesmo modo, foi avaliado por Fehler et al., (2010) que em aorta isolada de rato a β -FEA apresentou atividade vasoconstritora, entretanto, esta resposta contrátil foi independente da presença do endotélio e de L-NAME (inibidor não específico da enzima óxido nítrico sintase).

Tendo em vista esses dois efeitos observados, neste estudo, demonstramos as curvas concentração-efeito em anéis de aorta isolada de rato com endotélio intacto em resposta à β -FEA usada na faixa de concentração entre 1 e 3000 μ M. Pudemos demonstrar que, em preparações com endotélio intacto, seus efeitos são bifásicos e incluem efeito contrátil nas concentrações acima de 1000 μ M. Além disso, quando β -FEA foi adicionada em anéis de artéria aorta mantidas no *plateau* de contração induzida por fenilefrina, reconhecida por suas ações agonistas α -adrenérgicas (ZHONG; MINNEMAN, 1999), observamos relaxamento significativo ocorrido para concentrações entre 30 e 300 μ M (CE_{50} de aproximadamente 85 μ M).

Estudamos também o efeito da β -FEA sobre outros estímulos contráteis aplicados aos anéis de aorta isolada de rato. O efeito relaxante previamente observado não se reproduziu quando a pré-contração foi induzida com aumento da concentração extracelular de K^+ para 60 mM, o que causa despolarização do sarcolema (SOMLYO; SOMLYO, 1968), ou pela adição de prostaglandina 9,11-dideoxi-11 α ,9 α -epoximetano $F_{2\alpha}$ (U-46619), composto análogo do tromboxano A_2 (WILSON et al., 2005). Estes resultados estão em concordância com os efeitos encontrados por Narang et al., (2014).

Estes autores demonstraram que, em anéis isolados de artéria mesentérica de resistência, a β -FEA relaxou a contração induzida pelos agonistas adrenérgicos noradrenalina, metoxamina e fenilefrina, e foi ineficaz em relaxar as contrações induzidas por prostaglandina $F_{2\alpha}$ (U-46619). O valor da CE_{50} da β -FEA quando a contração foi induzida por fenilefrina foi de $67.74 \pm 16.72 \mu\text{M}$ (NARANG et al., 2014), valor próximo do encontrado no nosso estudo. O fato da β -FEA inibir contrações mediadas por ativação de receptor adrenérgico e pouco influenciar aquelas induzidas por solução despolarizante ou ativação de outro tipo de receptor, leva a pensar em um possível antagonismo adrenérgico, hipótese já levanta por Narang et al., (2014). Ainda assim, foi verificada a participação de receptores β -adrenérgicos nos efeitos inibitórios da β -FEA, mas observamos que a curva concentração-efeito induzida pela β -FEA não foi alterada pela presença de propranolol, desencorajando a hipótese de que os efeitos relaxantes da β -FEA ocorreram via ativação de adrenoreceptores β .

O relaxamento induzido por acetilcolina em segmentos de aorta com endotélio íntegro é um conceito clássico na fisiologia cardiovascular (FURCHGOTT, 1983). Esse relaxamento depende prioritariamente da produção do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF, do inglês *endothelium-derived relaxant factor*), que apesar da natureza não totalmente conhecida ao ser revelado no início dos anos 1980, hoje em dia sabe-se ser majoritariamente o gás óxido nítrico (NO). Esse gás, de meia-vida curta, chega rapidamente do endotélio à célula muscular ativando a enzima guanilato ciclase, levando ao aumento dos níveis de guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Esse aumento leva a uma série de eventos que resulta no relaxamento da musculatura lisa vascular, dentre os quais vale ressaltar a hiperpolarização decorrente da abertura de canais para potássio. Dada a importância dessa via, bem como a analogia estrutural da β -FEA com o nitro-composto com atividade estimuladora sobre a guanilato ciclase solúvel (BRITO et al., 2013), investigamos a participação da via NO/GMPc/canais de K^+ no relaxamento induzido por β -FEA.

Nossos resultados demonstram que a remoção mecânica do endotélio, bem como a adição prévia de um bloqueador da enzima óxido nítrico sintase endotelial (L-NAME), inibiu o relaxamento induzido por β -FEA. Da mesma forma, Anwar et al., (2012), observaram que, em leitos vasculares mesentéricos, a ação vasodilatadora da β -

FEA foi inibida por L-NAME (1 mM), indicando que esse efeito é mediado pela liberação de NO proveniente do endotélio. Entretanto, nos estudos de Narang et al., (2014), o L-NAME (100 μ M) bem como a retirada do endotélio não foi capaz de inibir, em leito mesentérico, o efeito vasodilatador da β -FEA nas contrações induzidas por metoxamina. A razão desses diferentes resultados é desconhecida, mas há a possibilidade da β -FEA causar vasorrelaxamento por mecanismos específicos a depender do tecido onde ela atue e que, não necessariamente, envolva a liberação de NO. Por isso, o L-NAME não interfira no efeito supracitado observado nos estudos de Narang et al., (2014). Além disso, utilizamos o inibidor não específico da ciclooxigenase (COX), indometacina, que também diminuiu a potência farmacológica da resposta vasodilatadora da β -FEA, indicando uma possível liberação de fatores endoteliais como as prostaciclina nos seus efeitos. Assim, com o objetivo de investigar a influência do endotélio no efeito vasorrelaxante da β -FEA, realizamos a curva concentração-efeito à β -FEA em preparações mantidas sem estímulo contrátil na ausência do endotélio. Estes resultados demonstraram que o efeito contrátil da β -FEA foi potencializado com a retirada do endotélio, diminuindo a CE_{50} e aumentando o efeito máximo. Este resultado foi de encontro ao analisado por Fehler et al., (2010), onde a contratilidade ocasionada pela β -FEA, em aorta de rato, não foi afetada pela remoção do endotélio. Contudo, em nosso estudo, demonstramos que provavelmente a presença do endotélio favorece o efeito relaxante da β -FEA enquanto que a ausência do endotélio favorece o efeito contrátil dessa amina traço.

Em seguida, foi demonstrado que a adição de um agente inibidor da guanilato ciclase, o ODQ, foi capaz de diminuir o efeito relaxante da β -FEA, fenômeno não observado com um inibidor da adenilato ciclase, o MDL-12330A. Posteriormente, a participação dos canais para K^+ foi testada com a utilização de inibidores desses canais. Primeiramente, usamos um bloqueador inespecífico, o TEA, que reduziu o relaxamento da β – FEA, e depois dois outros inibidores seletivos: a glibenclamida, bloqueador de canais para potássio ATP-dependentes, que não interferiu no efeito relaxante; e a 4-AP, bloqueador de canais para potássio dependente de voltagem, que reduziu o efeito vasorrelaxante da β -FEA, indicando uma potencial participação dos canais para potássio

sensíveis à voltagem. Assim, esses resultados em conjunto demonstram a importância dessa via NO/GMPc/canais de potássio para o relaxamento induzido por β -FEA.

Narang et al., (2014) levantaram a hipótese de que a β -FEA poderia exercer antagonismo α_1 -adrenérgico, uma vez que seus estudos revelaram que ela reverteu seletivamente contrações induzidas por agonistas do adrenoceptor α_1 . Ademais, eles investigaram e demonstraram a capacidade de ligação da β -FEA aos α -adrenoceptores ao descobrirem que a β -FEA é capaz de deslocar o prazosin dos α_1 -adrenoceptores em homogenatos de cérebro de ratos. Levando-se em consideração essa hipótese, decidimos comparar os efeitos da β -FEA com os do prazosin, um antagonista α_1 -adrenérgico clássico (ALOSACHIE; GODFRAIND, 1986). Como esperado, esse agente causou vasorrelaxamento quando adicionado sobre o *plateau* de uma contração induzida por fenilefrina. Além disso, também foi observado um deslocamento da curva para a direita, com aumento significativo da CE_{50} , quando houve adição prévia do inibidor da guanilato ciclase, ODQ. Portanto, observa-se que a guanilato ciclase influencia a ação relaxante do prazosin assim como a da β -FEA.

Neste estudo, examinou-se também o efeito da β -FEA em protocolos experimentais que avaliam algumas vias de regulação da concentração intracelular de cálcio: (i) contração transitória promovida pela liberação de IP_3 decorrente da estimulação dos receptores α_1 -adrenérgicos em preparações mantidas em condições sem Ca^{2+} extracelular; (ii) contrações induzidas pela depleção dos estoques intracelulares de Ca^{2+} após repetidos estímulos farmacomecânicos e inibição simultânea da cálcio ATPase do retículo sarcoendoplasmático (SERCA) com tapsigargina em meio contendo nifedipina, um bloqueador dos canais para Ca^{2+} do tipo L. Na concentração de 100 μM , a β -FEA inibiu o componente fásico da contração induzida pela PHE, sugerindo que a β -FEA é capaz de inibir indiretamente a contração causada pela liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático pelo receptor de IP_3 , visto que a PHE induz contratilidade pelo mecanismo de acoplamento farmacomecânico que envolve a ativação da fosfolipase C por ativação de receptores acoplados à proteína G, culminando na liberação de IP_3 , o qual possui receptores específicos no retículo sarcoplasmático que, quando ativados, liberam Ca^{2+} para o citoplasma. Além disso, na concentração de 300 μM , a β -FEA, adicionada anteriormente, inibiu a contração sustentada induzida pela restauração de

Ca^{2+} extracelular, inferindo que ela também induz efeitos inibitórios sobre contrações ocasionadas pelo influxo de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} operados por estoques (PUTNEY, 1990). Contudo, não podemos inferir que ela esteja atuando diretamente no retículo sarcoplasmático ou seja um bloqueador SOCC (NOGUERA; D'OCÓN, 1993).

Ainda com o objetivo de comparar os efeitos da β -FEA com os do prazosin, e visto que, Alosachie e Godfraind (1988) relataram suposta ação do prazosin sobre a contração induzida por PHE onde, na presença de endotélio, ele provavelmente age como um antagonista não-competitivo e, na ausência do endotélio, ele age como um antagonista competitivo, decidimos analisar os efeitos da amina traço nas curvas concentração-efeito induzidas por PHE. Assim, na presença do endotélio, a β -FEA deslocou a curva concentração-efeito à PHE para a direita em relação ao controle, no entanto não alterou o efeito máximo, este resultado foi de encontro aos experimentos com o prazosin, onde o efeito máximo foi reduzido na presença do endotélio (ALOSACHIE; GODFRAIND, 1988). Na ausência do endotélio, a β -FEA nas concentrações 30 μM , 100 μM e 300 μM também deslocou a curva concentração-efeito à PHE para a direita em relação ao controle, porém o efeito máximo diminuiu proporcionalmente ao aumento da concentração da β -FEA, indo de encontro ao resultado encontrado nos experimentos demonstrados por Alosachie e Godfraind (1988), onde não houve alteração do efeito máximo na ausência do endotélio.

A remoção do endotélio potencializou a ação contrátil da PHE, diminuindo o CE_{50} e aumentando o efeito máximo da curva controle quando comparado aos valores encontrados na presença do endotélio. O endotélio parece funcionar como um modulador na interação de antagonistas e agonistas α -adrenérgicos em aorta de ratos. Na literatura, foi relatado que em aorta isolada de ratos a modulação do endotélio na contratilidade de agonistas está relacionada com o aumento dos níveis de GMPc ativado por NO, resultando na redução da eficácia do agonista e receptores de reserva (ALOSACHIE; GODFRAIND, 1986). Diante de tantos fatores envolvidos, não podemos inferir que a β -FEA seja uma antagonista α_1 -adrenérgico puro, visto que nos resultados da curva concentração-efeito à PHE, na ausência do endotélio, o efeito inibitório da β -FEA fica prejudicado, dado que a retirada do endotélio altera a linha de base nessas condições experimentais. Contudo, não descartamos a possibilidade de que a β -FEA possa atuar

como um antagonista α -adrenérgico, posto que ela foi capaz de inibir o influxo de cálcio por canais operados por estoques, que segundo Noguera e D'Ocon (1993) seriam sensíveis à ativação dos receptores adrenérgicos. Além disso, seu efeito vasorrelaxante foi observado somente quando a fenilefrina foi utilizada como estímulo contrátil.

Nesse sentido, com o intuito de corroborar nossa hipótese de que o bloqueio α -adrenérgico está envolvido nos efeitos inibitórios da amina-traço, realizamos uma curva concentração efeito para o K^+ na presença da β -FEA. Os resultados demonstraram que não houve diferenças significativas entre as CE_{50} das três curvas em relação ao controle. Enquanto que o efeito máximo foi levemente diminuído nas concentrações de 100 μ M e 300 μ M da amina-traço. Assim, o pré-tratamento com β -FEA inibiu preferencialmente a curva concentração efeito à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio intacto em comparação com seu efeito inibitório sobre a curva concentração efeito para o K^+ . Estes resultados sugerem que uma contração promovida por uma solução despolarizante é menos sensível do que uma contração promovida por um agonista α_1 -adrenérgico aos efeitos inibitórios da β -FEA.

Curiosamente, em anéis de aorta isolada com endotélio removido, β -FEA (1 - 300 μ M) não relaxou significativamente a contração promovida pela clonidina, um agonista α_2 -adrenérgico. Logo aparentemente, a β -FEA só é capaz de produzir relaxamento em preparações contraídas com agonista adrenérgico α_1 .

Por fim, foi avaliada a capacidade de recuperação da resposta contrátil ao potássio após exposição à β -FEA em anéis de aorta isolada de rato. Logo, a recuperação do tecido com estímulo eletromecânico após a verificação do efeito vasorrelaxante da β -FEA indica que seus efeitos são reversíveis.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a β -FEA é uma substância com efeito bifásico, apresentando ação vasorrelaxante significativa somente sobre estímulo contrátil induzido por fenilefrina, em aorta isolada de rato, na faixa de concentração de 30 a 300 μ M, além disso, apresentou efeito contrátil quando adicionada isoladamente nas concentrações acima de 1000 μ M. Seus efeitos vasorrelaxantes parecem ser dependentes da liberação de fatores endoteliais, tais como o óxido nítrico ou prostaciclina, bem como da atividade da enzima guanilato ciclase. Parte dos seus efeitos farmacológicos pode ser explicado pela abertura de canais para K^+ voltagem-dependentes para produzir vasorrelaxamento. Além disso, os canais para K^+ ativados por ATP, a enzima adenilato ciclase ou os receptores β -adrenérgicos parecem não estar envolvidos nos efeitos vasodilatadores da β -FEA. Ademais, a β -FEA reduziu a resposta contrátil mediada pela ativação do receptor de IP_3 , inibiu a contração induzida pela restauração de Ca^{2+} extracelular e inibiu preferencialmente a resposta contrátil mediada por fenilefrina quando comparada ao potássio. Portanto, é possível que um suposto antagonismo α_1 -adrenérgico esteja envolvido nos seus efeitos vasculares, embora uma caracterização mais aprofundada de seu efeito vasodilatador seja necessária e levando-se em consideração a influência do endotélio e do NO nestes efeitos, estudos futuros precisam ser realizados para melhor caracterizá-los, como por exemplo, avaliar a influência do NO e de canais para potássio no efeito contrátil.

REFERÊNCIAS

- AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: Basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone. **Journal of Anesthesia**, v. 21, n. 2, p. 220–231, 2007a.
- AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells. **Journal of anesthesia**, v. 21, n. 2, p. 232–42, 2007b.
- ALOSACHIE, I. ; GODFRAIND, T. The modulatory role of vascular endothelium in the interaction of agonists and antagonists with c-adrenoceptors in the rat aorta. **Br. J. Pharmacol.**, p. 619–629, 1988.
- ALOSACHIE, I.; GODFRAIND, T. Role of cyclic GMP in the modulation by endothelium of the adrenolytic action of prazosin in the rat isolated aorta. **British journal of pharmacology**, v. 89, n. 3, p. 525–32, 1986.
- ANWAR, M. A. et al. Vasoconstrictor and vasodilator responses to tryptamine of rat-isolated perfused mesentery: Comparison with tyramine and ??-phenylethylamine. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 7, p. 2191–2202, 2012.
- BECÚ-VILLALOBOS, D. et al. Octopamine and phenylethylamine inhibit prolactin secretion both in vivo and in vitro. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 199, n. 2, p. 230–5, 1992.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009
- BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of physiology**, v. 586, n. 21, p. 5047–5061, 2008.
- BERRY, M. D. Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, n. 2, p. 257–271, 2004.
- BRANCHEK, T. A.; BLACKBURN, T. P. Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: Legend, myth and fact. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 90–97, 2003.
- BRITO, T. S. et al. The vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane involve stimulation of the soluble guanylate cyclase-cGMP pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 6, p. 780–788, 2013.
- BROADLEY, K. J. et al. Effects of dietary amines on the gut and its vasculature. **The British journal of nutrition**, v. 101, n. 11, p. 1645–52, 2009.
- BUNZOW, J. R. et al. Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic

acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. **Molecular pharmacology**, v. 60, n. 6, p. 1181–8, 2001.

DE SIQUEIRA, R. J. B. et al. 1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of Aniba canelilla, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 638, n. 1-3, p. 90–98, 2010.

FEHLER, M. et al. Identification of trace-amine-associated receptors (TAAR) in the rat aorta and their role in vasoconstriction by β -phenylethylamine. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 382, n. 4, p. 385–98, 2010.

FURCHGOTT, R.F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ Res**. v. 53, p. 557-73, 1983.

GOODMAN, L. S; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGrallHill, 2005. 164 p.

HILGERS, R. H. P.; WEBB, R. C. Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 230, n. 11, p. 829–35, 2005.

IRSFELD, M.; SPADAFORÉ, M.; PRUSS, B. M. Beta-Phenylethylamine, a Small Molecule With a Large Impact. **Webmedcentral**, v. 4, n. 9, p. 1–15, 2013.

KOSA, E. et al. Effects of beta-phenylethylamine on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the male rat. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 67, n. 3, p. 527–35, 2000.

LINDEMANN, L.; HOENER, M. C. A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family. **Trends in pharmacological sciences**, v. 26, n. 5, p. 274–81, 2005.

MOSNAIM, A. D. et al. Platelet monoamine oxidase activity and plasma levels of non-catecholic phenylethylamines in insulin-dependent diabetic subjects. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 126, n. 3, p. 237–42, 1982.

NOGUERA, M. A.; D'OCÓN, M. P. Evidence that depletion of internal calcium stores sensitive to noradrenaline elicits a contractile response dependent on extracellular calcium in rat aorta. **British journal of pharmacology**, v. 110, n. 2, p. 861–7, 1993.

OYEMITAN, I. A. et al. Hypnotic, anticonvulsant and anxiolytic effects of 1-nitro-2-phenylethane isolated from the essential oil of *Dennettia tripetala* in mice. **Phytomedicine**, v. 20, n. 14, p. 1315–1322, 2013.

PATERSON, I. A.; JUORIO, A. V; BOULTON, A. A. 2-Phenylethylamine: a modulator of catecholamine transmission in the mammalian central nervous system? **Journal of neurochemistry**, v. 55, n. 6, p. 1827–37, 1990.

PEI, Y.; ASIF-MALIK, A.; CANALES, J. J. Trace Amines and the Trace Amine-Associated Receptor 1: Pharmacology, Neurochemistry, and Clinical Implications.

Frontiers in neuroscience, v. 10, p. 148, 2016.

PUTNEY, J. W. Capacitative calcium entry revisited. Review article. **Cell Calcium**, v. 11, n. 10, p. 611–624, 1990.

REYNOLDS, G. P.; RAUSCH, W. D.; RIEDERER, P. Effects of tranylcypromine stereoisomers on monamine oxidation in man. **British journal of clinical pharmacology**, v. 9, n. 5, p. 521–3, 1980.

SOMLYO, A. V; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 159, n. 1, p. 129–145, 1968.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231–236, 1994.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325–58, 2003.

VISENTIN, V. et al. Dual action of octopamine on glucose transport into adipocytes: inhibition via beta3-adrenoceptor activation and stimulation via oxidation by amine oxidases. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 299, n. 1, p. 96–104, 2001.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in physiology education**, v. 27, n. 1-4, p. 201–6, 2003.

WILSON, D. P. et al. Thromboxane A₂-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca²⁺ entry and Ca²⁺ sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. **The Biochemical journal**, v. 389, n. Pt 3, p. 763–74, 2005.

XIE, Z.; WESTMORELAND, S. V; MILLER, G. M. Modulation of monoamine transporters by common biogenic amines via trace amine-associated receptor 1 and monoamine autoreceptors in human embryonic kidney 293 cells and brain synaptosomes. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 325, n. 2, p. 629–640, 2008.

ZHONG, H.; MINNEMAN, K. P. Alfa-Adrenoceptor subtypes. **European Journal of Pharmacology**, v. 375, n. 1-3, p. 261–276, 1999.

ZUCCHI, R. et al. Trace amine-associated receptors and their ligands. **British journal of pharmacology**, v. 149, n. 8, p. 967–978, 2006.

ANEXO

ANEXO 1-Declaração da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará.



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 22/2014, sobre o projeto intitulado: “ESTUDO FARMACOLÓGICO DO 1-NITRO-2-FENILETANO E DE SEUS ANÁLOGOS 2- NITRO-1-FENIL-1-PROPANOL E BETA-FENILETILAMINA EM PREPARAÇÕES VASCULARES ISOLADAS DE RATOS”, de responsabilidade do Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 16 de maio de 2014.

Fortaleza, 16 de março de 2014


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Profa. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar
Coordenadora da CEPAD/FFA/MEC/UFCE
MAT. SUAPE 2186303