

**Eunice André**

**Análise dos mecanismos envolvidos no relaxamento induzido pelo sesquiterpeno poligodial em vasos de coelho e cobaia e no corpo cavernoso de coelho *in vitro*.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Farmacologia.

**Orientador:** Prof. Dr. João Batista Calixto

**Florianópolis  
2000**

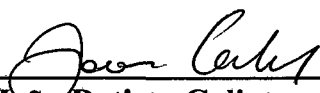
**“ ANÁLISE DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO  
RELAXAMENTO INDUZIDO PELO SESQUITERPENO  
POLIGODIAL EM VASOS DE COELHO E COBAIA E NO  
CORPO CAVERNOSO DE COELHO *IN VITRO*”.**

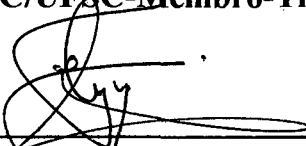
**POR**

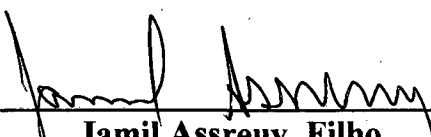
**EUNICE ANDRÉ**

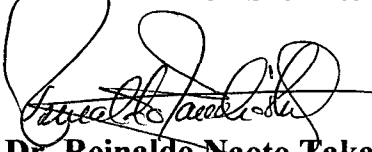
**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final, pelo Orientador e membros  
da Banca Examinadora, composta pelos  
Professores Doutores:**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**João Batista Calixto**  
**(FMC/UFSC-Membro-Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Edson Antunes**  
**(UNICAMP) -Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Jamil Assreuy Filho**  
**(FMC/UFSC-Membro Titular)**

  
**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi**  
**Coordenador do Programa de**  
**Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

**Florianópolis, 10 de Março de 2000.**

ANDRÉ, EUNICE. Análise dos mecanismos envolvidos no relaxamento induzido pelo sesquiterpeno poligodial em vasos de coelho e cobaia e no corpo cavernoso de coelho *in vitro*. Florianópolis, 2000, 90 pp. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Defesa: 10/03/2000

Este estudo investigou os mecanismos de ação envolvidos no relaxamento produzido pelo sesquiterpeno poligodial (0,00427 - 42,74  $\mu\text{M}$ ), isolado da planta *Drymis winteri*, nos vasos de coelho e cobaia e no corpo cavernoso de coelho. Para a realização deste trabalho foram utilizadas artéria pulmonar de coelho e cobaia e o corpo cavernoso de coelho *in vitro*. Nossos resultados mostram que o poligodial produz relaxamento concentração-dependente tanto no corpo cavernoso de coelho como nos vasos estudados. Além disso, o relaxamento observado nos vasos ocorre por mecanismos dependentes e independentes do endotélio. O relaxamento induzido pelo poligodial nos vasos estudados é mediado principalmente pela liberação de NO ou de substância relacionada ao endotélio vascular, pela ativação da guanilato ciclase solúvel e elevação dos níveis de GMPc. Possivelmente essa via esteja também envolvida com o relaxamento produzido pelo poligodial no corpo cavernoso de coelho. Nossos resultados também demonstram que parte dos efeitos relaxantes causados pelo poligodial ocorre aparentemente por ativação de canais de potássio modulados por ATP, sensíveis à glibenclamida. No entanto, a liberação de prostaciclina, substância P, ou ativação da adenilato ciclase parecem não estar envolvidas no vasorelaxamento induzido pelo poligodial.

Palavras chaves: Poligodial, relaxamento, óxido nítrico, artéria pulmonar de coelho

TODOS OS DIAS QUANDO ACORDO, NÃO  
TENHO MAIS O MESMO TEMPO QUE  
PASSOU. MAS TENHO MUITO TEMPO:  
TEMOS TODO O TEMPO DO MUNDO  
(RENATO RUSSO)

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor João Batista Calixto, por ter me concedido a oportunidade de realizar este curso sob sua orientação, pela amizade, confiança e incentivo demonstrado ao longo do desenvolvimento deste projeto,

As professoras: Ana Maria Soares de Arruda, Consuelo de Andrade Marques e Lia Rieck, pelo carinho, amizade e atenção demonstrada durante o decorrer deste curso,

Aos professores do Departamento de Farmacologia,

Aos queridos amigos de turma: Juliano, Fábio, Marco, George, Rodrigo, Marcelo, Ricardo, Márcia, Luciana, Cláudia, Janice, e Sandra por tornarem esses momentos mais alegres,

À segunda "maravilhosa e grande família" por me aturarem durante esses dois anos: Fábio, Juliano, Márcia e Fabiane,

A Daniela, Martha e Alessandra, pelas valiosas sugestões oferecidas durante o desenvolvimento deste projeto,

Aos técnicos e funcionários do Departamento, especialmente à Rosana Ostrosky, por me ensinar pacientemente todas as técnicas necessárias para o desenvolvimento deste trabalho, e pelo imenso carinho demonstrado para comigo,

Aos amigos da iniciação científica, pela amizade, em especial ao Rodrigo por me auxiliar em vários momentos,

Ao Pedro e toda a equipe do biotério, pelo cuidado com os animais,

Ao professor Rosendo A. Yunes, Valdir Cechinel Filho e a Angela Malheiros do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC, pelo fornecimento do composto poligodial,

A todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho,

A CAPES pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

I. LISTA DE FIGURAS	I
II. RESUMO	V
III. ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O papel do endotélio no controle do tônus vascular	5
1.2. Fatores relaxantes derivados do endotélio	5
1.3. Óxido nítrico (NO)	6
1.3.1. Síntese do NO	8
1.3.2. Mecanismo de vasorelaxamento induzido pelo NO	9
1.3.3. Envolvimento do NO no mecanismo de ereção peniana	13
1.4. Participação dos canais de potássio no relaxamento da musculatura lisa vascular	15
1.5. Participação da prostaciclina no relaxamento da musculatura lisa vascular	19
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Animais	22
3.2. Coleta das cascas da <i>Drymis winteri</i>	22
3.3. Isolamento e purificação do sesquiterpeno poligodial	22
3.4. Análise farmacológica	23
3.4.1. Preparações das artérias pulmonares e aortas torácicas	23
3.5. Protocolo experimental para vasos isolados de coelhos e cobaias	24
3.5.11. Isolamento e preparação do corpo cavernoso	30
3.6. Drogas utilizadas	32
3.7. Análise estatística	33
4. RESULTADOS	34

4.1. Influência do endotélio vascular na ação vasorelaxante induzida pelo poligodial nas artérias pulmonares de coelho e cobaia e aorta torácica de coelho.	34
4.2. Efeito do poligodial no relaxamento induzido pelo NPS e pela acetilcolina na artéria pulmonar de coelho com endotélio.	37
4.3. Efeito de inibidores da enzima NOS na ação vasorelaxante mediada pelo poligodial.	39
4.4. Efeito de inibidores da enzima guanilato ciclase solúvel na ação vasorelaxante mediada pelo poligodial.	40
4.5. Efeito do poligodial sobre os níveis de GMPc na aorta torácica de coelho.	41
4.6. Papel dos canais de K <sup>+</sup> na resposta vasorelaxante induzida pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho.	42
4.7. Efeito dos antagonistas dos receptores para substância P, receptores muscarínicos e B <sub>2</sub> para cininas no vasorelaxamento causado pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho.	44
4.8. Efeito do CGRP na ação vasorelaxante induzida pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho.	46
4.9. Efeito dos metabólitos da ciclooxigenase sobre a ação vasorelaxante induzida pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho.	47
4.10. Efeito do inibidor da proteína quinase A na ação vasorelaxante induzida pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio.	48
4.11. Influência do poligodial na contração induzida pelo CaCl <sub>2</sub> na aorta torácica de coelho com e sem endotélio.	49
4.12. Efeito dos inibidores da guanilato ciclase solúvel no relaxamento induzido pelo poligodial no corpo cavernoso de coelho.	53
5. DISCUSSÃO	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68



<b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<b>Tabela 1-</b> Potência e relaxamento máximo para o poligodial em vasos de cobaia e coelho.	36
<b>Tabela 2-</b> Efeito de diferentes classes drogas no relaxamento induzido pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio .	50
<b>Tabela 3-</b> Efeito de diferentes classes de drogas no relaxamento induzido pelo poligodial na artéria pulmonar de cobaia com endotélio .	51
<b>Tabela 4-</b> Efeito de diferentes classes de drogas no relaxamento induzido pelo poligodial na aorta torácica de coelho com endotélio.	52
<b>Figura 1-</b> Fotografia da <i>Drymis winteri</i> .	1
<b>Figura 2-</b> Estrutura molecular do sesquiterpeno poligodial.	4
<b>Figura 3-</b> Esquema proposto para explicar os possíveis mecanismos envolvidos no vasorelaxamento causado por diversas substâncias.	12
<b>Figura 4-</b> Registro típico mostrando o relaxamento causado pelo NPS, acetilcolina e poligodial na artéria pulmonar de coelho pré-contraída com fenilefrina 1 $\mu$ M.	34
<b>Figura 5-</b> Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial em anéis de artéria pulmonar de cobaia e coelho ou na aorta torácica de coelho com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina.	35

- Figura 6-** Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o NPS e para a acetilcolina em anéis de artéria pulmonar de coelho com endotélio, pré-contraídos com fenilefrina . 38
- Figura 7-** Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina obtida na ausência ou na presença dos inibidores da NOS, L-NOARG ou seu isômero inativo D-NOARG ou L-NAME. 39
- Figura 8-** Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina na ausência ou na presença dos inibidores da enzima guanilato ciclase solúvel, ODQ ou LY 83583 . 40
- Figura 9-** Efeito do poligodial e do NPS no conteúdo de GMPc na aorta torácica de coelho com endotélio intacto, pré-contraída com fenilefrina . 41
- Figura 10-** Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina na ausência ou na presença dos bloqueadores de canais de  $K^+$ , TEA e glibenclamida . 42
- Figura 11-** Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina na ausência ou na presença dos bloqueadores de canais de  $K^+$  4-aminopiridina , apamina ou caribdotoxina. 43

- Figura 12-** Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina, na ausência e na presença dos antagonistas seletivos de receptores taquicinérgicos  $NK_1$  (FK 888 ); e  $NK_2$  (SR 48968), antagonista não seletivo de receptores muscarínicos (atropina) e antagonista seletivo de receptores  $B_2$  (HOE 140). 45
- Figura 13-** Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina, na ausência ou na presença do antagonista do receptor de CGRP (CGRP-8,37). 46
- Figura 14-** Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina na ausência ou na presença do inibidor das enzimas ciclooxigenases (indometacina). 47
- Figura 15-** Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina, na ausência ou na presença do inibidor de proteína quinase A (KT 5720 ). 48
- Figura 16-** Curvas concentração-resposta de contração obtidas para o  $CaCl_2$  na aorta torácica de coelho com e sem endotélio na ausência ou na presença do poligodial. 49
- Figura 17-** Registro típico mostrando o relaxamento causado pelo NPS, acetilcolina e poligodial no corpo cavernoso de coelho pré-contraído 53

com fenilefrina 1  $\mu$ M.

**Figura 18-** Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para à 54  
acetilcolina, NPS e poligodial no corpo cavernoso isolado de coelho, na  
ausência ou na presença de inibidores da guanilato ciclase solúvel, LY  
83583 ou ODQ.

## II. Resumo

O poligodial é um sesquiterpeno isolado das cascas da *Drymis winteri* (Winteraceae), uma planta nativa da região sul do Brasil, usada pela população no tratamento de diferentes doenças inflamatórias como a asma, alergia e bronquite. O presente estudo tem como objetivo investigar os mecanismos de ação envolvidos no relaxamento produzido pelo poligodial na aorta torácica de coelho, em artérias pulmonares de cobaia e de coelho e no corpo cavernoso de coelho *in vitro*.

Para a realização deste trabalho foram utilizados coelhos (2.5 – 3.5 Kg) e cobaias (250 - 300 g) de ambos os sexos. Os animais foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical (cobaias) ou anestesiados com pentobarbital sódico (coelhos) e em seguida foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical. Os vasos e o corpo cavernoso foram isolados e limpos dos tecidos conectivos, sendo que os vasos foram em seguida seccionados em anéis. As preparações foram montadas em cubas de vidro contendo 5 ml (para os vasos) ou 10 ml (para o corpo cavernoso) de solução de Krebs-Henseleit, a 37°C e pH 7,2. Nossos resultados demonstram que o poligodial (0,0427- 42,74  $\mu$ M) causou relaxamento concentração-dependente nas artérias pulmonares de cobaia e de coelho e na aorta torácica de coelho com endotélio ( $R_{\text{máx}}$  78  $\pm$  3%, 72  $\pm$  3%, 75  $\pm$  2%, respectivamente), bem como no corpo cavernoso de coelho ( $R_{\text{máx}}$  97  $\pm$  2%). Todas as preparações foram previamente contraídas com fenilefrina (1  $\mu$ M). Além disso, o poligodial aboliu completamente o relaxamento causado pela acetilcolina, mas não pelo nitroprussiato de sódio nos vasos estudados.

**Parte deste trabalho foi publicado:**

ANDRE, E., MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the relaxation caused by the sesquiterpene polygodial in vessels from rabbit and guinea-pig. **Eur. J. Pharmacol.**, 386:47-53, 1999.

**Além deste trabalho, outro foi desenvolvido durante o curso de Mestrado, e está aceito na seguinte revista:**

MAZZUCO, L.T.; ANDRÉ, E.; CALIXTO, J.B. Contribution of nitric oxide, prostanoids and  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  channels to the relaxant response of bradykinin in the guinea pig bronchus "in vitro". **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 361:383-390, 2000.

mM) e a glibenclamida (30  $\mu\text{M}$ ), reduziram parcialmente, mas significativamente, a resposta vasorelaxante causada pelo poligodial somente em artéria pulmonar de coelho. A indometacina (1 e 10  $\mu\text{M}$ ), o CGRP-8,37 (100 nM) ou o KT 5720 (1  $\mu\text{M}$ ) não interferiram com o relaxamento causado pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio intacto. O poligodial (10  $\mu\text{M}$ ) também não interferiu com a contração induzida pelo  $\text{CaCl}_2$  em artéria pulmonar de coelho com ou sem endotélio. Além disso, o antagonista de receptor muscarínico (atropina 1  $\mu\text{M}$ ), antagonistas de receptores das taquicininas  $\text{NK}_1$  e  $\text{NK}_2$  (FK 888 100 nM e SR48968, 100 nM, respectivamente) ou o antagonista de receptores  $\text{B}_2$ , (HOE 140 1  $\mu\text{M}$ ,) não afetaram a resposta vasorelaxante induzido pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho. Em conjunto, nossos resultados indicam que este sesquiterpeno produz vasorelaxamento concentração-dependente por mecanismos dependentes e independentes do endotélio nos vasos estudados.

O relaxamento induzido pelo poligodial nos vasos estudados é mediado principalmente pela liberação de NO ou de substância relacionada ao endotélio vascular, pela ativação da guanilato ciclase solúvel e elevação dos níveis de GMPc. Possivelmente essa via esteja também envolvida com o relaxamento produzido pelo poligodial no corpo cavernoso de coelho. Nossos resultados também demonstram que parte dos efeitos relaxantes do poligodial ocorre aparentemente por ativação de canais de potássio modulados por ATP, sensíveis à glibenclamida. No entanto, a liberação de prostaciclina, substância P, ou ativação da adenilato ciclase parecem não estar envolvidas no vasorelaxamento induzido pelo poligodial.

Em preparações de vasos sem endotélio, o relaxamento máximo do poligodial foi significativamente reduzido nas artérias pulmonares de cobaia e de coelho e na aorta torácica de coelho ( $R_{\text{máx}}$   $26 \pm 2\%$ ,  $31 \pm 1\%$ ,  $17 \pm 2\%$ , respectivamente). O relaxamento induzido pelo poligodial foi inibido na artéria pulmonar de coelho pelos inibidores da enzima NO sintase, L-NAME ( $100 \mu\text{M}$ ), e L-NOARG ( $100 \mu\text{M}$ ) ( $R_{\text{máx}}$   $65 \pm 8\%$ ,  $84 \pm 9\%$  para o veículo e  $27 \pm 9\%$ ,  $44 \pm 0,4\%$ , para L-NAME e L-NOARG, respectivamente). O isômero inativo D-NOARG ( $100 \mu\text{M}$ ) não interferiu de maneira significativa com a ação vasorelaxante do poligodial ( $R_{\text{máx}}$   $84 \pm 9\%$  para o veículo e  $77 \pm 3\%$  para D-NOARG). Resultados muito semelhantes foram obtidos em anéis de artéria pulmonar de cobaia e aorta torácica de coelho. Os inibidores da guanilato ciclase solúvel LY 83583 ( $10 \mu\text{M}$ ) e ODQ ( $1 \mu\text{M}$ ) inibiram marcadamente o relaxamento dependente de endotélio causado pelo poligodial em anéis de artéria pulmonar de coelho pré-contraída com fenilefrina ( $R_{\text{máx}}$   $74 \pm 5\%$ ,  $72 \pm 3\%$  para o veículo e  $20 \pm 4\%$ ,  $7 \pm 0,6\%$  para ODQ e LY 83583, respectivamente). No corpo cavernoso de coelho, o relaxamento induzido pelo poligodial também foi inibido pelo LY 83583 ( $10 \mu\text{M}$ ) ( $R_{\text{máx}}$   $97 \pm 2\%$  para o veículo e  $37 \pm 13\%$  para LY 83583). Nossos resultados também demonstram um aumento dos níveis intracelulares de GMPc na aorta torácica de coelho após a exposição dos anéis ao poligodial ( $42,74 \mu\text{M}$ ) e ao nitroprussiato de sódio ( $10 \mu\text{M}$ ). Ao contrário, os bloqueadores de canais de potássio, como a 4-aminopiridina ( $3 \text{ mM}$ ), apamina ( $1 \mu\text{M}$ ) ou a caribdotoxina ( $100 \text{ nM}$ ), não afetaram o relaxamento induzido pelo poligodial em todos os vasos estudados. Porém, outros bloqueadores de canais de potássio, como o TEA ( $5$



### III. ABSTRACT

Polygodial is the main sesquiterpene isolated from methanolic extract of the plant *Drymis winteri* (Winteraceae), a native Brazilian medicinal plant used in folk medicine for the treatment of different inflammatory diseases, such as asthma, allergy and bronchitis.

The present study was designed to examine the vasorelaxant action of polygodial in intact or in endothelium-rubbed rings of rabbit pulmonary artery and thoracic aorta, guinea-pig pulmonary artery and rabbit corpus cavernosum pre-contracted with phenylephrine. The experiments were carried out on rabbits (2.5 –3.5 kg) and guinea-pigs (250 - 350 g). The animals were killed by a blow to the head (guinea-pig) or anaesthetized with sodium pentobarbital (rabbits), followed by a blow to the head, and were then exsanguinated. All tissues were carefully excised and cleaned from connective tissue and adherent fat. The vessels and corpus cavernosum were suspended in a 5 ml (vessels) or 10 ml (corpus cavernosum) organ bath chambers containing Krebs Henseleit solution at 37 °C, pH 7.2, gassed with 95 % O<sub>2</sub> and 5 % CO<sub>2</sub>. The sesquiterpene polygodial (0.0427- 42.74 M), produced graded relaxation in rings of rabbit pulmonary artery or thoracic aorta and guinea-pig pulmonary artery with endothelium ( $E_{max}$  78 ± 3%, 72 ± 3%, 75 ± 2%, respectively) and in the corpus cavernosum of rabbit ( $E_{max}$  97 ± 2%) pre-contracted by phenylephrine (1 M). In endothelium-rubbed rings, the vasorelaxant action was reduced in pulmonary artery of guinea-pigs or rabbits and thoracic aorta of rabbit ( $E_{max}$  of 26 ± 2%, 32 ± 2% and 17 ± 3%, respectively).

The pre-incubation of rings of rabbit pulmonary artery with L-NAME (100  $\mu$ M) or L-NOARG (100  $\mu$ M) significantly inhibited the endothelium-dependent relaxation caused by polygodial in preparations pre-contracted by phenylephrine ( $E_{max}$  of 65  $\pm$  8%, 84  $\pm$  9% for vehicle and 27  $\pm$  9%; 44  $\pm$  0.4%, for L-NAME and L-NOARG, respectively). The inactive enantiomer D-NOARG (100  $\mu$ M) ( $E_{max}$  of 84  $\pm$  9% for vehicle and 77  $\pm$  3 for D-NOARG) had no significant effect on the vasorelaxant action of polygodial. Very similar results were observed in rings of guinea-pig pulmonary artery and rabbit thoracic aorta. The non-selective and the highly-selective soluble guanylate cyclase inhibitors, LY 83583 (10  $\mu$ M) and ODQ (1  $\mu$ M), respectively, markedly inhibited the endothelium-dependent relaxation caused by polygodial in rings of rabbit pulmonary artery pre-contracted with phenylephrine ( $E_{max}$  of 74  $\pm$  5%, 72  $\pm$  3% for vehicle and 20  $\pm$  4%; 7  $\pm$  0.6% for ODQ and LY 83583, respectively). Similar results were observed in rings of guinea-pig pulmonary artery and thoracic aorta. In the corpus cavernosum, the relaxation induced by polygodial was also inhibited by LY 83583 (10  $\mu$ M;  $E_{max}$  97  $\pm$  2% for vehicle and 37  $\pm$  13% for LY 83583). Our results also show that the cyclic GMP content in rabbit thoracic aorta was significantly increased after exposing the rings to polygodial and sodium nitroprusside. In contrast, indomethacin (1 and 10  $\mu$ M), KT 5720 (1  $\mu$ M), CGRP-8.37 (100 nM), apamin (1  $\mu$ M), charybdotoxin (100 nM) and 4-aminopyridine (3 mM) had no effect on polygodial action in rabbit pulmonary artery or thoracic aorta and guinea-pig pulmonary artery. However, TEA (5 mM) and glibenclamide (30  $\mu$ M) inhibited partially, but significantly, the relaxant responses of rabbit pulmonary artery. In addition, polygodial (10  $\mu$ M) does not affect the contraction induced by  $Ca^{2+}$  in depolarized intact or endothelium-

rubbed rings of rabbit pulmonary artery. Tachykinin NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptor antagonists (FK 888 100 nM or SR 48968 100 nM, respectively) a muscarinic receptor antagonist (atropine 1 μM) and a B<sub>2</sub> receptor antagonist (HOE 140 1 μM) each failed to affect the vasorelaxant action of polygodial. Taken together, the current results show that the sesquiterpene polygodial produced a concentration- and endothelium-dependent and -independent vasorelaxation in rabbit and guinea-pig pulmonary arteries and in rabbit thoracic aorta and corpus cavernosum in vitro, pre-contracted by phenylephrine.

The vasorelaxation induced by polygodial is, in part, dependent on the release of NO or a NO-derived substance from vascular endothelium, as well as activation of guanylate cyclase-dependent mechanism and increase of cGMP. This route also seems to be involved in the relaxation induced by polygodial in corpus cavernosum. However, the opening of potassium channel or the release of prostacyclin, substance P or CGRP, as well as activation of adenylate cyclase, appear to play either minor roles, or have no participation at all in the vasorelaxant action of polygodial in these vessels. Finally, the vasorelaxant effect of polygodial does not seem to involve of [Ca<sup>2+</sup>] in endothelial cells, decrease of [Ca<sup>2+</sup>] in vascular smooth muscle cells, or direct activation of membrane endothelial cell receptors.

## 1. Introdução

O poligodial é um sesquiterpeno isolado das cascas da *Drymis winteri* uma árvore pertencente à família das *Winteraceae*, com altura que varia de 4 a 8 m e com tronco que pode chegar a 40 cm de diâmetro. Suas folhas apresentam um formato alongado com as extremidades arredondadas e uma coloração verde (Figura 1). Esta planta é conhecida popularmente como “casca de anta”, “canela-amarga”, “capororoca-picante”, “carne d’anta”, “melambo”, “paratudo” e “pau-para tudo”. Sua florescência ocorre até duas vezes por ano, porém, com maior intensidade nos meses de junho a agosto, e seus frutos amadurecem entre outubro e novembro.



**Figura 1. Fotografia da árvore *Drymis winteri***

A *D. winteri* é encontrada em alguns países da América do Sul, e principalmente no território brasileiro, sobretudo na região sul do país. Além de possuir qualidades ornamentais, sendo recomendada para o paisagismo, suas folhas e cascas são utilizadas pela população como estimulante, antiespasmódica, aromática, antidiarreica, antipirética, cicatrizante, antiinflamatória, contra hemorragia uterina, em certas afecções do trato respiratório, incluindo o tratamento de asma brônquica e alergia (Morton, 1981; Simões *et al.*, 1986). Esta planta é também utilizada no tratamento do câncer e úlceras (Ricciari, 1981; Houghton e Maby, 1985; Gupta, 1995).

Existem vários estudos fitoquímicos descritos na literatura para esta e outras espécies deste gênero, que demonstram a existência de vários metabólitos secundários de diferentes classes químicas, incluindo aldeídos sesquiterpenos (Appel e Dohr 1958;1959; Brown, 1994; Cortes e Oyarzun, 1981), além de terpenóides, lignanas e flavonóides (Cruz, 1973). Dentre os vários compostos isolados da *D. winteri*, o sesquiterpeno poligodial (Figura 2) é o composto majoritário. O poligodial apresenta atividade antimicrobiana (Himejima e Kubo 1992; McCallion *et al.*, 1982; Samuelsson *et al.*, 1992), antifúngica (Kubo e Taniguchi 1988, Lee *et al.*, 1999) e inseticida (Caprioli *et al.*, 1987). Foi demonstrado também que o poligodial aumenta a concentração de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelular em células SH-SY5Y de neuroblastoma humanas (Forsby *et al.*, 1992; 1994;1996). Além desses efeitos, tem sido proposto que o poligodial atua como agonista de receptores vanilóides (Sterner e Szallasi, 1999).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que, em íleo isolado de cobaia, o sesquiterpeno poligodial causou deslocamento à direita da



curva concentração-resposta à acetilcolina, histamina e bradicinina, associado com inibição das respostas máximas. Já na traquéia de cobaia, o poligodial causou inibição parcial da resposta contrátil causada pela histamina, e inibição da resposta contrátil causada pela bradicinina. Do mesmo modo, o poligodial inibiu de forma significativa e concentração-dependente a resposta contrátil induzida pelo composto 48/80 e pelo análogo estável do tromboxano  $A_2$ , U46619 na traquéia isolada de cobaia. Além disso, o poligodial antagonizou de maneira competitiva a resposta contrátil induzida pela substância P, mas não interferiu com a resposta contrátil ao agonista seletivo do receptor  $NK_1$ , a substância P metil éster, na traquéia de cobaia. Por outro lado, o poligodial inibiu significativamente a curva concentração-resposta para a contração induzida pelo agonista seletivo do receptor  $NK_2$  o  $[\beta\text{-ala}^8]$  neurocinina A (El Sayah *et al.*, 1998).

Na traquéia de cobaias ativamente sensibilizada à ovalbumina, o poligodial causou inibição significativa da resposta contrátil ao antígeno (El Sayah *et al.*, 1998). Quando testado na veia porta isolada de rato, o poligodial causou inibição da curva concentração-resposta contrátil induzida pela bradicinina, U46619, endotelina-1, substância P e senktide (El Sayah *et al.* 1998).

Testes farmacológicos realizados *in vivo* demonstraram, ainda, que o sesquiterpeno poligodial possui propriedades antinociceptivas sistêmica, local, espinal e supraespinal, quando testados em modelos de nocicepção química (teste de formalina e capsaicina), mas não em modelos de dor térmica (placa quente) (Mendes *et al.*, 1998). O mecanismo preciso pelo qual o poligodial produz suas ações antinociceptivas está sendo melhor investigado. Até o momento, foi determinado que as ações antinociceptivas do poligodial parecem

envolver uma interação com o sistema opióide, ou com receptores de serotonina e adrenérgicos  $\alpha_1$ , bem como a interação com mecanismos dependentes da proteína  $G_i/G_o$ , sensíveis à inibição por toxina pertussis (Mendes *et al.*, 1998; 2000). O poligodial apresentou também pronunciado efeito antiedematogênico nos testes de edema de pata de rato induzidos por bradicinina, carragenina, dextrana, fosfolipase  $A_2$ , prostaglandina  $E_2$  e substância P e no edema de orelha induzido por ácido araquidônico, capsaicina e óleo de cróton. Esse composto foi capaz de inibir também a migração celular para a cavidade pleural, quando avaliado no teste de pleurisia realizada em camundongos. Por último, o poligodial apresentou ainda um importante efeito antialérgico tanto em ratos como em camundongos sensibilizados à ovalbumina. A taxa de sobrevivência desses animais submetidos ao choque anafilático induzido pelo antígeno foi significativamente aumentada (Mendes *et al.*, 1998).

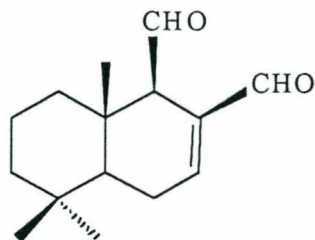


Figura 2- Estrutura molecular do sesquiterpeno poligodial isolado das cascas da *Drymis winteri*.

Considerando os vários efeitos farmacológicos obtidos em nosso laboratório com o composto poligodial tanto, em estudos *in vivo* como *in vitro*, tornou-se interessante investigar as ações vasorelaxantes deste composto. Desta forma, investigamos as ações do poligodial sobre vasos de coelho e cobaia, bem como sobre o corpo cavernoso de coelho *in vitro*.

Para melhor compreensão deste estudo, abordaremos abaixo alguns importantes fatores vasorelaxantes.

### **1.1. O papel do endotélio no controle do tônus vascular**

Durante muito tempo a camada endotelial foi considerada como sendo um simples revestimento, sendo esta sua função principal. Atualmente, sabe-se que a célula endotelial não representa apenas uma barreira passiva de difusão de elementos do sangue, mas é a responsável pela modulação do tônus da musculatura lisa vascular liberando simultaneamente fatores relaxantes e fatores constritores derivados do endotélio. O equilíbrio entre a síntese e a liberação dos agentes vasoconstritores e vasodilatadores mantém o sistema cardiovascular sob um tônus constante, sendo de fundamental importância no controle da pressão arterial e do fluxo sangüíneo (Furchgott e Zawadzki, 1980; Furchgott *et al*, 1989).

O endotélio tem também a função de regular o crescimento do músculo liso vascular, adesão e agregação plaquetária, controlando assim as funções cardiovasculares (Furchgott e Zawadzki, 1980). Portanto, qualquer desequilíbrio na produção e/ou liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio e fatores constritores derivados do endotélio pode contribuir para a gênese de doenças cardiovasculares.

### **1.2. Fatores relaxantes derivados do endotélio**

Após a descoberta da participação do endotélio na resposta dos vasos (Moncada *et al.*, 1976), vários estudos foram realizados visando constatar o envolvimento ou não das células endoteliais sobre o efeito final dessas



substâncias vasoativas. Assim, muitos vasodilatadores como a acetilcolina, substância P, bradicinina, adenosina trifosfato (ATP), trombina, ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  e histamina foram considerados como substâncias que requerem a presença de endotélio para produzir toda ou parte de sua ação. Por outro lado, os nitrovasodilatadores, fator natriurético atrial, inibidores de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e prostaciclina, foram classificadas como substâncias que apresentam sua ação vasorelaxante independente de endotélio (De Mey *et al.*, 1982; Furchgott 1984; Rapoport *et al.*, 1983a; Scivoletto *et al.*, 1984).

Dentre as várias substâncias vasodilatadoras conhecidas atualmente, serão abordadas, com maiores detalhes quatro importantes fatores envolvidos no vasorelaxamento: o óxido nítrico (NO), canais de potássio ( $\text{K}^+$ ), a prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). O papel da prostaciclina e do NO em mediar o relaxamento vascular já está bem estabelecido (Hyslop e De Nucci, 1991) mas a identidade e o mecanismo celular da ação do EDHF ainda não estão bem elucidados (Garland *et al.*, 1995; Waldron *et al.*, 1996).

### 1.3. Óxido nítrico

Em 1980, Furchgott e Zawadzki demonstraram que a acetilcolina produzia relaxamento dos vasos isolados de coelho. Estes autores também descreveram que este fenômeno de vasodilatação era mediado por um fator humoral e de ação lábil, e dependente essencialmente da presença da camada endotelial intacta. Na seqüência das investigações, este fator foi denominando fator de relaxamento derivado do endotélio (FRDE ou EDRF para o termo em inglês *endothelium-derived relaxing factor*) (Cherry *et al.*, 1982). Posteriormente, Palmer *et al* (1987)

demonstraram que o EDRF e NO apresentavam as mesmas características biológicas e químicas, e ambos eram a mesma molécula em estudo. No mesmo ano, esta proposta foi confirmada por outro grupo de pesquisadores, que sugeriram que tanto o EDRF quanto o NO apresentavam as mesmas propriedades químicas e farmacológicas (Ignarro *et al.*, 1987). A partir da descoberta da efetiva atividade do NO sobre o sistema cardiovascular, inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos demonstrando a ação deste mediador em outros sistemas biológicos, mediando importantes processos fisiopatológicos, tais como: transmissão nitrérgica periférica (Rand e Li, 1995) e comunicação intercelular no sistema nervoso central (Southam e Garthwaite, 1993), aterosclerose e patologias associadas, diabetes, neurotoxicidade incluindo alterações neurológicas como derrame cerebral, doença de Parkinson e demência em portadores de HIV (para revisão ver Dawson & Dawson, 1998; Moncada *et al.*, 1991 e Moncada & Higgs, 1993).

O NO pode ainda atuar como um neurotransmissor ou neuromodulador no sistema nervoso; como fator citotóxico no sistema imune, bem como parece estar relacionado com algumas lesões teciduais; como na isquemia de reperfusão e na morte excitatória neuronal (Para revisão ver Katayama, 1995; Wolf, 1997). Além disso, o NO está também envolvido em várias doenças, como artrite reumatóide, aterosclerose, câncer, diabetes, numerosas doenças degenerativas do sistema nervoso e infarto do miocárdio (para revisão ver Moncada *et al.*, 1991; Hobbs *et al.*, 1999).



### 1.3.1. Síntese do NO

A síntese do NO ocorre a partir do nitrogênio do grupo guanidino do aminoácido L-arginina através da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que apresenta grande homologia estrutural com a enzima citocromo P-450 redutase (Bredt *et al.*, 1991). Através da ação da NOS, o aminoácido L-arginina é convertido inicialmente em N<sup>G</sup> hydroxi-L-arginina, originando quantidades equimolares de NO e citrulina. Para que ocorra essa complexa reação essas isoformas de NOS utilizam o aminoácido L-arginina e vários outros cofatores como: flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), fosfato-dinucleotídeo-adenina-nicotinamida reduzida (NADPH) e tetrahydrobiopterina (TBH<sub>4</sub>) ( para revisão ver Crane *et al.*, 1997; Mayer e Hemmens, 1997; Murad, 1999).

Três isoformas de NOS, foram clonadas, sendo todas homólogas e dividindo-se em duas categorias: NOS constitutiva e induzida (para revisão veja Hobbis *et al.*, 1999; Murad, 1999). As duas isoformas de NOS constitutivas são: NOS neuronal (nNOS ou NOS tipo 1) e NOS endotelial (eNOS ou NOS tipo III). Elas foram encontradas originalmente em células neuronais e do endotélio vascular, respectivamente. A NOS induzida (iNOS ou NOS tipo II) geralmente é expressa em diferentes tipos celulares em resposta a estímulos imunológicos ou inflamatórios (Bredt e Snyder, 1990; Gorsky *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1991)

A atividade, tanto a NOS endotelial como a neuronal são dependentes da formação do complexo Ca<sup>2+</sup> /calmodulina, enquanto que a iNOS é independente da formação desse complexo. Esta enzima pode ser induzida em macrófagos, músculo liso e em célula da musculatura lisa vascular por endotoxinas

bacterianas (LPS) e citocinas (interferon  $\gamma$ , interleucina1, fator necrose tumoral e outras citocinas pró-inflamatórias) ( para revisão ver Murad, 1999).

O NO, por ser um gás lipossolúvel, difunde-se livremente e tem seus efeitos determinados pela sua reatividade química. Como um radical livre, reagindo assim rapidamente com espécies contendo elétrons não pareados, como é o caso do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e dos metais (Mayer e Hermmens, 1997). Dentro deste contexto, a interação entre NO e o  $O_2^-$ , gera o ânion peroxinitrito ( $O_2^- + NO = ONOO^-$ ) (Beckman *et al.*, 1990), que também pode produzir vasorelaxamento por estimular a enzima guanilato ciclase solúvel que determina a elevação dos níveis de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (Balazy *et al.*, 1998; Mayer *et al.*, 1995; Tarpey *et al.*, 1995).

### 1.3. 2. Mecanismo de vasorelaxamento induzido pelo NO

O mecanismo pelo qual o NO induz vasodilatação está ainda sujeito a intensos estudos, mas hoje se conhece uma série de eventos que participam da cascata de relaxamento induzida pelo NO. Em linhas gerais, o relaxamento dependente de endotélio induzido por vários vasodilatadores como a acetilcolina, bradicinina, substância P e outros, ocorre por meio de interação com receptores específicos nas membranas de células endoteliais, causando aumento na concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  (Boulanger e Vanhoutte, 1997). A elevação dos níveis de  $Ca^{2+}$  citoplasmático das células endoteliais resulta na formação do complexo  $Ca^{2+}$ /calmodulina, com conseqüente ativação da eNOS, e liberação de NO.



Após a sua formação, o NO difunde-se rapidamente para as células vizinhas, podendo interagir com o grupamento heme da enzima guanilato ciclase solúvel (McCall e Vallance, 1992) promovendo desta forma sua ativação. Essa interação causa uma alteração conformacional da enzima, que por sua vez, converte o nucleotídeo trifosfato de guanosina (GTP) em GMPc (Furchgott, 1984; Ignarro *et al.*, 1982; Rubanyi, 1988; Schmidt, 1992). Na seqüência de eventos intracelulares o GMPc, um segundo mensageiro intracelular, ativa proteínas quinases específicas que fosforilam a cadeia leve de miosina e canais de potássio ( $K^+$ ), promovendo assim sua ação vasorelaxante (Para revisão ver Brayden, 1996 e Moncada *et al.*, 1991) (Figura 3).

O relaxamento da musculatura lisa vascular gerado pelo NO, associado com o aumento do GMPc, já está bem estabelecido. Apesar disso, os mecanismos envolvidos no relaxamento vascular produzido pelo GMPc não estão totalmente elucidados. Alguns estudos sugerem diferentes mecanismos que poderiam explicar como o GMPc produz relaxamento na musculatura lisa vascular, como a inibição da produção de inositol trifosfato ( $IP_3$ ) (Lang e Lewis, 1989; Rapoport, 1986b; Rapoport e Murad, 1986b), a estimulação do seqüestro de  $Ca^{2+}$  intracelular (Garg e Hassid, 1991; Lincoln, 1983; Morgan e Newby, 1989) através da ATPase dependente de  $Ca^{2+}$  (Fiscus, 1988), o aumento da defosforilação da miosina quinase de cadeia leve (Rapoport *et al.*, 1983b), a inibição de canais de  $Ca^{2+}$  operados por receptores (Godfraind, 1986), além da ativação de proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG) que resulta na fosforilação e inativação da miosina quinase de cadeia leve (Fiscus, 1988; Popescu *et al.*, 1985; Rapoport *et al.*, 1983b).

Em 1994, Bolotina *et al.* demonstraram que o NO, além de promover sua ação vasorelaxante via NO/GMPc, pode também agir diretamente sobre os canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup>. Porém, o aumento da atividade desses canais pode estar ocorrendo devido a modificações química nos grupos sulfidrilas de proteínas que participam na regulação do tônus vascular (Figura 3).

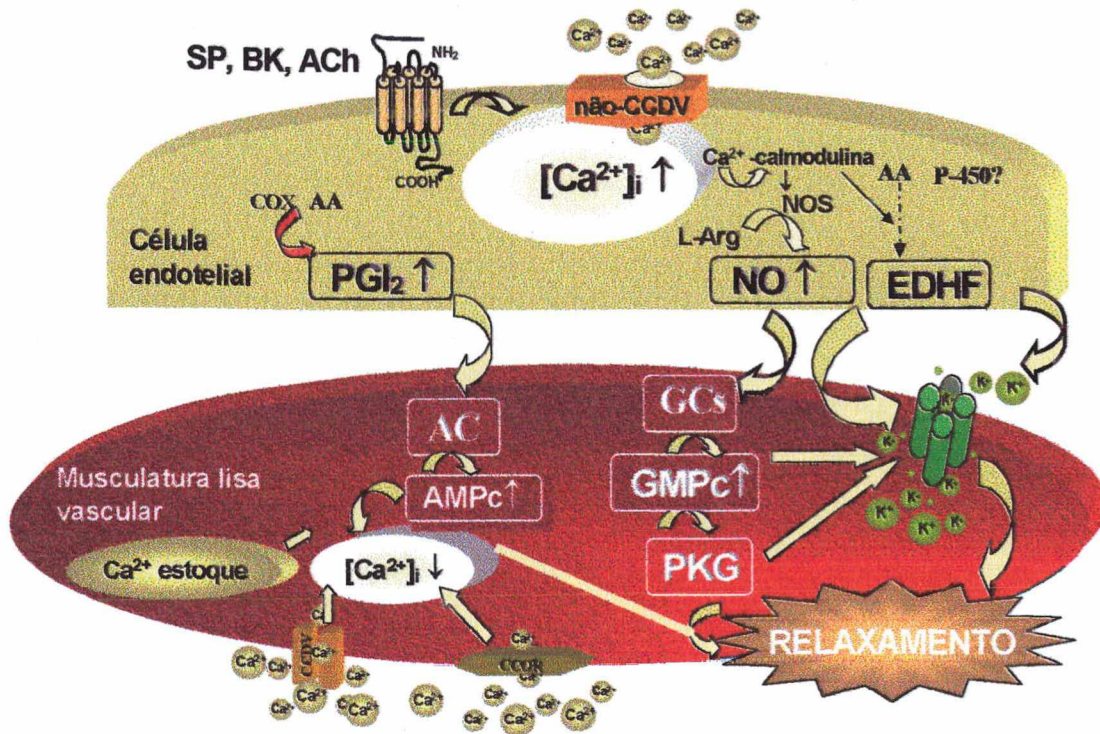


Figura 3. Desenho esquemático abrangendo os possíveis mecanismos envolvidos no vasorelaxamento causado por diversas substâncias. A prostaciclina ( $PGI_2$ ) ativa a adenilato ciclase (AC), elevando os níveis de adenosina monofosfato (AMPc). O Óxido nítrico (NO) ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) aumentando os níveis de GMPC. O fator hiperpolarizante dependente de endotélio (EDHF) causa a abertura dos canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  na musculatura lisa vascular, levando à hiperpolarização. (CCDV) canal de cálcio dependente de voltagem, (CCOR) canal de cálcio operado por receptor. (adaptado de Vanhoutte e Boulanger, 1995).

### 1.3.3. Envolvimento do NO no mecanismo de ereção peniana.

A ereção peniana resulta da interação entre o sistema nervoso central e fatores locais (Para revisão ver Lue e Tanago, 1987; Lue, 1992). Quando o pênis está em estado flácido, há uma influência do tônus simpático e as arteríolas terminais e músculos lisos sinusóides estão contraídos e existe uma quantidade mínima de fluxo sanguíneo nos espaços sinusoidais e nas vênulas subtúnicas.

Porém, durante um estímulo sexual a atividade do sistema parassimpático passa a ser predominante, o que resulta na diminuição da resistência periférica, dilatação das artérias cavernosas e helicinais, com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo para os espaços lacunares do corpo cavernoso. Este processo é considerado como um evento hemodinâmico primário na ereção peniana (Lue *et al.*, 1987; Andersson *et al.*, 1987; Andersson, 1993), sendo que o mecanismo da ereção peniana é dependente da interação entre mecanismos autonômicos adrenérgicos, colinérgicos e não-adrenérgicos/não colinérgicos (NANC) (Saenz de Tejada *et al.*, 1988, 1989, 1991).

Traish *et al.*, (1990) também demonstraram por meio de "binding" de radioligante a presença de receptores muscarínicos do tipo  $M_2$  e  $M_3$  no corpo cavernoso humano. Estes autores também usando esta mesma técnica, encontraram uma alta afinidade para esses receptores muscarínicos em membranas de células endoteliais de corpo cavernoso humano (Traish *et al.*, 1990).

Nos tecidos eréteis ocorre a liberação de uma série de substâncias químicas, destacando-se dentre elas o NO, um mediador muito importante no fenômeno da ereção peniana (Ignarro *et al.*, 1990; Holmquist *et al.*, 1991).



Estudos histoquímicos têm demonstrado uma rede de neurônios contendo NOS no corpo cavernoso e pequenas artérias intracavernosas de ratos, humanos e cães (Burnett *et al.*, 1992, 1993; Hayashida *et al.*, 1996; Vizzard *et al.*, 1994). O relaxamento da musculatura lisa é mediado pelo NO que, durante o estímulo sexual, é sintetizado nos nervos terminais de neurônios NANC no pênis e também por células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos e nos espaços lacunares da corporea cavernosa (Burnett *et al.*, 1992).

O relaxamento produzido pelo NO ou substâncias relacionadas ao NO no corpo cavernoso, ocorre através da estimulação da guanilato ciclase solúvel, levando ao aumento de GMPc no corpo cavernoso. O nível de GMPc na célula lisa muscular é regulado pelo equilíbrio que existe entre a velocidade da sua síntese pela guanilato ciclase solúvel e a velocidade de sua hidrólise pelas fosfodiesterases (PDE) específicas para GMPc (PDE 5 e 6) (Beavo, 1995). Portanto, agentes que inibem a hidrólise do GMPc, fazem com que este segundo mensageiro permaneça elevado, aumentando assim o relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso facilitando a ereção peniana (Chuang *et al.*, 1998; Ballard *et al.*, 1998).

Além disso, o NO pode estimular o acúmulo de GMPc, seguido pela abertura de canais de  $K_{Ca}$  e hiperpolarização, levando ao relaxamento do corpo cavernoso (Seftel *et al.*, 1996; Simonsen *et al.*, 1995). Desta forma, drogas que interferem com estes canais, podem também afetar o relaxamento e a contração neste tecido (Holmquist *et al.*, 1988; Hedlund *et al.*, 1994).

#### 1.4. Participação dos canais de potássio no relaxamento da musculatura lisa vascular

A despolarização e a hiperpolarização celular, através da inibição e ativação de canais de  $K^+$ , respectivamente, são importantes mecanismos na regulação do tônus no músculo liso arterial. Fatores que regulam a atividade dos canais de  $K^+$  têm influência sobre o tônus e o diâmetro dos vasos sanguíneos, e conseqüentemente, sobre a resistência vascular, fluxo e pressão sanguínea (Nelson *et al.*, 1990; Nelson e Quayle, 1995). Nas artérias, os canais de  $K^+$  são modulados por vasodilatadores fisiológicos que aumentam a atividade dos canais de  $K^+$  e por vasoconstritores, que diminuem sua atividade. Quatro tipos de canais de  $K^+$  têm sido descritos no músculo liso vascular (Standen e Quayle, 1998).

1) Canais de  $K^+$  ativados por voltagem ( $K_v$ ) - Esses canais abrem com a despolarização da membrana e são preferencialmente bloqueados por baixas doses de 4-aminopiridina.

2) Canais de  $K^+$  sensíveis ao  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ) - Esses canais abrem com a despolarização da membrana e com o aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular. Os  $K_{Ca}$  são ainda classificados em três subclasses, de acordo com a permeabilidade ao  $Ca^{2+}$  que apresentam. a)  $BK_{Ca}$ , são canais de alta condutância (165 e 220 pS), b)  $MK_{Ca}/IK_{Ca}$  de média condutância (30 e 80 pS), e c) os  $SK_{Ca}$  de baixa condutância (~10 pS). Os  $BK_{Ca}$  são bloqueados por concentrações nanomolares de caribdotoxina, iberotoxina, e são preferencialmente inibidos por baixas doses de tetraetilamônio (TEA). Os  $IK_{Ca}$  são bloqueados por caribdotoxina e TEA, já os  $SK_{Ca}$  por apamina e também pelo TEA.

3) Canais de  $K^+$  retificadores ( $K_{IR}$ ) - Esse tipo de canal é aberto pela hiperpolarização da membrana e pelo aumento extracelular de  $K^+$ , sendo bloqueado por baixas concentrações de cátions divalentes como o bário e o magnésio (Okabe *et al.*, 1987).

4) Canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) - Esse tipo de canal é aberto pela elevação dos níveis de ADP e fechado quando ocorre aumento nos níveis de ATP.  $K_{ATP}$  são bloqueados por sulfoniluréias (glibenclamida) e abertos por pinacidil, cromacalim ou minoxidil (Clapp e Gurney, 1992; Clapp *et al.*, 1993). Porém, existem várias outras substâncias capazes de inibir esses canais, mas devido a sua inespecificidade, são pouco utilizadas atualmente.

Todos esses canais atuam integrando uma variedade de estímulos vasoconstritores e vasodilatadores existentes, tanto sob condições fisiológicas como patológicas, sempre através da regulação do potencial de membrana e do estado de contratilidade celular (para revisão veja Brayden, 1996). Vários mecanismos podem estar envolvidos na modulação desses canais por meio de segundos mensageiros, mas eventos de fosforilação e defosforilação vêm sendo considerados como mais usuais (Catterall *et al.*, 1991).

Tem sido demonstrado que os ativadores da guanilato ciclase solúvel podem hiperpolarizar a musculatura lisa vascular pela ativação de canais de  $K^+$ . Outros estudos sugerem que o NO pode ativar direta ou indiretamente os canais  $BK_{ca}$  contribuindo para o relaxamento na musculatura lisa vascular (Archer *et al.*, 1994; Bolotina *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1988). Além disso, os fatores relaxantes derivados do endotélio como o próprio NO e a prostaciclina, podem ativar um ou mais tipos de canais de  $K^+$  no músculo liso

vascular. Esta visão é baseada no uso de inibidores seletivos destas quinases e/ou pela aplicação direta de quinases purificadas bioquimicamente, sobre membranas contendo canais  $BK_{Ca}$  (Carl *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1993; Schübert *et al.*, 1996,1997; Taguchi *et al.*, 1995). Também existem evidências demonstrando que vários vasodilatadores, como adenosina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), e agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, podem ativar receptores acoplados a proteínas G, causando ativação da adenilato ciclase, elevando os níveis de AMPc e promovendo ativação da proteína quinase A. Muitos canais de  $K^+$  são ativados por essa via na musculatura lisa vascular, em particular os  $K_{ATP}$  (Standen e Quayle, 1998).

Porém, nem todo o relaxamento dependente de endotélio ocorre somente pela liberação de NO ou de prostaciclina. Outras substâncias que hiperpolarizam a membrana das células da musculatura lisa também contribuem para o relaxamento dependente de endotélio.

Em artérias, agonistas muscarínicos, como a acetilcolina, induzem a liberação de um fator conhecido como fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE ou EDHF, do inglês *endothelium-derived hyperpolarizing factor*) que é capaz de hiperpolarizar a membrana produzindo vasorelaxamento na musculatura lisa vascular (Bolton *et al.*, 1984; Edwards e Weston, 1998). Este fator foi descoberto mediante realização de experimentos nos quais foi constatado que, durante o relaxamento vascular dependente de endotélio, havia a produção de um outro fator que era diferente do EDRF. Em 1988, Chen e colaboradores demonstraram que em aorta e artéria pulmonar de rato, a acetilcolina libera dois diferentes fatores derivados das células endoteliais, um

EDRF e outro EDHF. Esta hipótese teve por base experimentos nos quais a hiperpolarização dependente de endotélio, induzida pela acetilcolina, persistiu na presença da hemoglobina e do azul de metileno (Chen *et al.*, 1988).

Nos vasos sanguíneos de várias espécies de animais, a hiperpolarização causada pelo EDHF é resistente a inibidores das enzimas NOS, cicloxigenase, e à glibenclamida (Feletou e Vanhoutte, 1996). O EDHF hiperpolariza a membrana por ativar canais de  $K^+$  sensíveis a caribdotoxina (Hashitani e Suzuki, 1997) e induz vasodilatação por inibir o influxo de  $Ca^{2+}$  (Nelson *et al.*, 1990) ou ainda por promover a produção de  $IP_3$  (Itoh *et al.*, 1992). Apesar de vários estudos estarem sendo realizados, pouco se sabe a respeito do EDHF, mas algumas substâncias vem sendo sugeridas como sendo as responsáveis pelos seus efeitos, tais como: NO, ácidos epoxieicosatrienóicos, endocanabinóides, prostaciclina, espécies reativas de oxigênio e monóxido de carbono (para revisão veja Garland *et al.*, 1995, Mombouli e Vanhoutte, 1997). Edwards e Weston (1998) propõem que o EDHF é o próprio cátion  $K^+$ .

A produção e/ou liberação basal de EDHF é regulada pela concentração citosólica de  $Ca^{2+}$ , liberado dos estoques intracelulares e também pela via extracelular. Além disso, a calmodulina também parece estar envolvida nesta produção e/ou liberação do EDHF (Nagao e Vanhoutte, 1993).

### 1.5. Participação da prostaciclina no relaxamento da musculatura lisa vascular

Os prostanóides (prostaglandina  $D_2$ , prostaglandina  $E_2$ , prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , prostaciclina e tromboxano  $A_2$ ) atuam através da via interação com receptores próprios acoplados a proteínas G, denominados DP, EP, FP, IP e TP, respectivamente (Kennedy *et al.*, 1982; Pierce *et al.*, 1995). Quando os prostanóides ativam os subtipos de receptores  $EP_2$ ,  $EP_4$ , DP ou IP, presentes na musculatura lisa, promovem relaxamento (Negishi *et al.*, 1995).

A ação da prostaciclina é mediada especificamente por meio da ativação de receptores IP localizados na superfície das células. Em condições fisiológicas a prostaciclina é extremamente lábil, apresentando uma meia vida de 3 min. Este prostanóide também é considerado um potente antiagregante plaquetário. Esta atividade antiagregante da prostaciclina é de grande importância na prevenção de doenças, como trombose e infarto do miocárdio (Moncada *et al.*, 1985). Além disso, a prostaciclina é considerada um potente vasodilatador, que relaxa a musculatura lisa vascular por elevar os níveis intracelulares de AMPc (Armstead, 1995; Shaul *et al.*, 1992; Tamaoki *et al.*, 1993) e inibindo a liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares e/ou ativando canais de  $K^+$  (Adeagbo e Malik, 1990; Minami *et al.*, 1993; Parkington *et al.*, 1995; Siegel *et al.*, 1989). Foi demonstrado também que o iloprost, um análogo estável da prostaciclina, induz vasodilatação na artéria carótida de cão, através do aumento da permeabilidade ao  $K^+$  e hiperpolarização (Siegel *et al.*, 1989). Walch *et al.*, (1999) demonstraram que somente o receptor IP é o responsável pelo relaxamento induzido por prostanóides na artéria pulmonar humana.

Tendo em vista que muitas patologias cardiovasculares estão relacionadas a diminuição ou aumento de fatores constritores e relaxantes derivados do endotélio, e que um grande número de compostos vem sendo estudados na tentativa de encontrar novos medicamentos para tratar essas doenças, o presente estudo propõe estudar o mecanismo de ação relaxante do poligodial sobre os vasos de coelho e cobaia bem como sobre o corpo cavernoso de coelho.

## 2. OBJETIVOS

**Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de:**

1- Investigar os efeitos relaxantes causados pelo sesquiterpeno poligodial na artéria pulmonar de coelho e de cobaia, aorta torácica de coelho e no corpo cavernoso de coelho *in vitro*.

2- Analisar os mecanismos envolvidos nas ações relaxantes do sesquiterpeno poligodial nos vasos de coelho e cobaia e no corpo cavernoso de coelho, com a utilização de antagonistas seletivos de receptores e inibidores de enzimas e canais iônicos.

3- Caracterizar, por meio de ensaios bioquímicos, a capacidade do sesquiterpeno poligodial em elevar os níveis de GMPc na musculatura lisa vascular.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados coelhos New Zealand (2,5 a 3,5 Kg) e cobaias Hartley (250 a 300 g) de ambos os sexos, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) criados em ambiente com temperatura controlada, ciclo claro/escuro de 12 h, com água e ração fornecida *ad libitum*.

#### 3.2. Coleta das cascas da *Drymis winteri*

As cascas da *D. winteri* (Winteraceae) foram coletadas no município de Bom Retiro, Santa Catarina e a classificação botânica da espécie foi realizada no Departamento de Botânica da UFSC pela professora Leila da Graça Amaral. Um exemplar da planta está depositado e registrado sob o número 26313 no Herbário FLOR, do Horto Botânico da UFSC, em Florianópolis, Santa Catarina (Figura 1).

#### 3.3. Isolamento e purificação do sesquiterpeno poligodial

O estudo fitoquímico para o isolamento e caracterização química do sesquiterpeno poligodial foi realizado no laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Química da UFSC, pelos professores Drs. Rosendo A. Yunes e Valdir Cechinel Filho. As cascas da *D. winteri* foram secas em estufa a uma temperatura de 45 – 50 °C. O material seco foi cortado em pequenos pedaços e macerado em metanol comercial à temperatura ambiente, durante 10 dias. O extrato metanólico foi exaustivamente fracionado com diclorometano e, após a

remoção do solvente, a fração foi submetida à cromatografia (Merck 60), resultando no isolamento do sesquiterpeno poligodial (Cechinel Filho *et al.*, 1998). O poligodial foi identificado por meio da comparação com amostra autêntica e de dados espectroscópicos (ressonância nuclear magnética de próton e ressonância nuclear magnética carbono-13). Uma porção de material seco das cascas da planta (750 g) permitiu o isolamento de 240 mg de poligodial, correspondendo a um rendimento de 0,032% (Cechinel Filho *et al.*, 1998). A estrutura molecular do sesquiterpeno poligodial está apresentada na Figura 2.

### 3.4. Análise farmacológica

#### 3.4.1. Preparações de artérias pulmonares e aortas torácicas

Os animais utilizados nestes experimentos foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical (cobaias) ou anestesiados com pentobarbital sódico seguido de deslocamento da coluna cervical (coelhos). A caixa torácica foi aberta para remoção da artéria pulmonar (de coelho e cobaia) e aorta torácica de coelho. Após a limpeza das preparações e retirada dos tecidos adjacentes, os anéis de aorta e artéria pulmonar (2 a 3 mm) foram montados em cubas de vidro contendo 5 ml da solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM): NaCl 118,0, KCl 4,4, MgSO<sub>4</sub> 1,1, CaCl<sub>2</sub> 2,5, NaHCO<sub>3</sub> 25,0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 e C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11,0, (pH de 7,2 mantida à 37 °C e aerada com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>). Em alguns experimentos, o endotélio vascular foi intencionalmente removido com o auxílio de uma haste de metal. Após o período de equilíbrio, as preparações foram pré-contraídas com fenilefrina (1 μM) e a integridade do endotélio foi avaliada pela capacidade da acetilcolina em (1 μM) promover relaxamento. As

preparações foram consideradas com endotélio intacto quando a acetilcolina produziu relaxamento superior a 60% e sem endotélio quando a acetilcolina não apresentou qualquer efeito vasorelaxante (Furchgott e Zawadzki, 1980).

As artérias pulmonares foram submetidas a 1 g de tensão e a aorta de coelho a 2 g de tensão, e permaneceram em equilíbrio durante 60 min antes da adição de drogas ao banho, sendo a solução nutritiva renovada a cada 20 min. As alterações na tensão (contração e relaxamento) foram medidas isometricamente por meio de transdutores de força (TRI - 201) e registradas em polígrafo 6006 da Letica Instrumentos Científicos. A resposta contrátil submáxima induzida pela fenilefrina foi considerada como 100% e todas as respostas subsequentes foram calculadas como porcentagens deste valor. Os resultados (n=4 a 6) foram expressos em valores percentuais de contração ou relaxamento em relação aos controles.

### **3.5. Protocolo experimental para vasos isolados de coelhos e cobaias**

#### **3.5.1. Caracterização da ação vasorelaxante induzida pelo poligodial nas artérias pulmonares de cobaia e coelho e aorta torácica e coelho**

Após o período de equilíbrio, as preparações foram contraídas pela adição de fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) e uma vez estabelecido um platô para a resposta contrátil (aproximadamente 5 min), foi obtida uma única curva cumulativa concentração-resposta de relaxamento para o poligodial (0,0427 a 42,74  $\mu\text{M}$ ).

Todas as drogas utilizadas permaneceram em contato com o tecido por 20 min antes da contração com fenilefrina. Para evitar a dessensibilização das

preparações, somente uma única curva cumulativa completa para o poligodial foi obtida em cada preparação. Além disso, curvas controle para o poligodial foram obtidas simultaneamente em banhos adjacentes e somente um antagonista foi testado em cada preparação.

### 3.5.2. Análise histológica das artérias pulmonares de coelho

Para analisar se o poligodial estava causando lesão endotelial, anéis de artéria pulmonar de coelho foram coletados e colocados em formol 10%, antes e após a realização da curva cumulativa concentração-resposta para o poligodial (0,0427 a 42,74  $\mu$ M). Os tecidos foram fixados em líquido de bouin e em seguida passaram por um processo de desidratados com solução alcoólica crescente. Após a desidratação dos anéis, estes foram impregnados em parafina, que depois de solidificados foram colocados no micrótomo para a realização dos cortes seriados. Os cortes foram colocados em água quente (40°-50 °C) afim de obter a distensão dos mesmos e em seguida foram colocados sobre lâminas contendo uma gota de albumina de Mayer. A desparafinização foi feito mediante a colocação das lâminas em xilol. Após esse procedimento, foi feito a hidratação dos anéis colocando-os em uma série de álcoois de graduação decrescente. Em seguida o material foi corado com hematoxilina/eosina ou Mallory. Para a obtenção do preparado permanente os tecidos fixados às lâminas, foram desidratados novamente com soluções alcoólicas crescentes e então cobertos com lamínulas. Após seca a montagem, foi realizada a leitura no microscópio.

### **3.5.3. Influência do poligodial no vasorelaxamento dependente e independente de endotélio causado pela acetilcolina e pelo nitroprussiato de sódio (NPS)**

Estes experimentos foram realizados com o objetivo de analisar se o poligodial poderia interferir com o relaxamento dependente e independente de endotélio produzido pela acetilcolina (0,001 – 30  $\mu\text{M}$ ) ou pelo NPS (0,001 – 30  $\mu\text{M}$ ) respectivamente. Com este propósito, uma curva cumulativa concentração-resposta para a acetilcolina ou para o NPS foi obtida 60 min antes da realização da curva cumulativa concentração-resposta ao poligodial (0,0427 - 42,74  $\mu\text{M}$ ) em artéria pulmonar de coelho, com endotélio intacto. Em seguida, as preparações foram lavadas, e após 60 min, foram pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) e novamente expostas a concentrações crescentes de acetilcolina ou NPS.

### **3.5.4. Análise da participação da via NO/GMPc no vasorelaxamento causado pelo poligodial em vasos de coelho e cobaia com endotélio**

Para avaliar a participação da via do NO no efeito vasorelaxante produzido pelo poligodial, foram utilizadas preparações com endotélio intacto. Uma curva cumulativa concentração-resposta de relaxamento para o poligodial (0,0427 - 42,74  $\mu\text{M}$ ) foi obtida, na ausência e na presença das seguintes drogas: N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 100  $\mu\text{M}$ ), N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG, 100  $\mu\text{M}$ ) inibidores da NOS e N<sup>o</sup>-nitro-D-arginine (D-NOARG, 100  $\mu\text{M}$ ) isômero inativo da L-NOARG. Também foram utilizados 6-anilino-5,8-quinolinediona (LY 83583, 10  $\mu\text{M}$ ) e 1H[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ, 1  $\mu\text{M}$ ) inibidores da enzima guanilato ciclase solúvel.

### 3.5.5. Dosagem do nível de GMPc na aorta torácica de coelho após relaxamento com o poligodial

Para a confirmação do possível envolvimento da via do NO/GMPc na resposta relaxante do poligodial, anéis de aorta isoladas de coelho (pesando entre 0,3 e 0,6 g) foram montados em cubas para órgão isolado sob as mesmas condições descritas anteriormente. Após a confirmação da presença do endotélio, as preparações foram incubadas com isobutilmetilxantina (IBMX, 10  $\mu$ M) e, decorridos 10 min, foram novamente contraídas com fenilefrina (1  $\mu$ M). Após a estabilização da resposta contrátil, alguns anéis foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e ácido etilenoglicol-bis- ( $\beta$ -amino-etil-éster) N,N'-tetraacético (EGTA, 4 mM), sendo utilizados como controle para medida da concentração basal de GMPc. Outro grupo de preparações recebeu SNAP (10  $\mu$ M) ou poligodial (42,74  $\mu$ M) durante 8 min (tempo necessário para a obtenção da resposta máxima de relaxamento), e logo após os anéis (n=14 para cada grupo) foram rapidamente congelados sob as mesmas condições descritas para o controle. Os tecidos foram então homogenizados e centrifugados. O sobrenadante recolhido foi submetido à liofilização e os níveis de GMPc foram medidos por meio de kit de enzimaímunensaio para GMPc da Amersham Pharmacia Biotech. Para tal, as amostras liofilizadas foram ressuspensas em tampão do ensaio (kit). Os resultados foram expressos em fmol/mg de tecido.

### 3.5.6. Papel dos canais de $K^+$ na resposta vasorelaxante induzida pelo poligodial nos vasos de coelho e cobaia com endotélio

Para verificar se o vasorelaxamento causado pelo poligodial era devido a abertura de canais de  $K^+$ , o efeito deste composto foi também avaliado (0,0427 - 42,74  $\mu$ M) na ausência e na presença de bloqueadores de canais de  $K^+$ , como: TEA (1 e 5 mM - bloqueador inespecífico de canais de  $K^+$ ), glibenclamida (3 e 30  $\mu$ M - bloqueador de canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP), apamina (1  $\mu$ M - bloqueador de canais de  $K^+$  de baixa condutância sensíveis ao  $Ca^{2+}$ ), 4-aminopiridina (3 mM - bloqueador de canais de  $K^+$  ativados por voltagem) e caribdotoxina (100 nM - bloqueador de canais de  $K^+$  de alta condutância sensíveis ao  $Ca^{2+}$ ).

### 3.5.7. Análise do envolvimento dos receptores de membrana presentes nas células endoteliais vasculares no efeito vasorelaxante do poligodial

Para analisar se o poligodial estava produzindo vasorelaxamento por atuar em receptores de membrana presentes nas células endoteliais tais como: receptores para substância P, bradininina e acetilcolina, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta de relaxamento para o poligodial em artéria pulmonar de coelho com endotélio intacto, na ausência e na presença do,  $N^2$ -[(4R)-4-hydroxy-1-(1methyl-1H-indol-3-yl)carbonyl-L-prolyl]-N-methyphenylmethyl-3-(2-naphthyl)-L-alaninamide (FK888, 100 nM) e (S)-N-methyl-N [4-(4-acetylamino-4-phenylpiperidino)-2-(3,4-dichlorophenyl)butyl]benzamide (SR 48968, 100 nM) antagonistas seletivos de receptores  $NK_1$  e  $NK_2$ , respectivamente, HOE 140 (1  $\mu$ M) antagonista de receptores  $B_2$  das cininas ou atropina (1  $\mu$ M), antagonista não-seletivo de receptores muscarínicos.

### 3.5.8. Influência do CGRP na ação vasorelaxante induzida pelo poligodial

Para investigar a influência do CGRP no vasorelaxamento induzido pelo poligodial, foram realizadas curvas cumulativa concentração-resposta de relaxamento para o poligodial (0,0427 - 42,74  $\mu\text{M}$ ) na ausência e na presença de CGRP- 8-37 (100 nM) antagonista de receptores para CGRP, na artéria pulmonar de coelho com endotélio intacto.

### 3.5.9. Influência dos metabólitos da cicloxigenase e da proteína quinase A na ação vasorelaxante do poligodial

Para analisar a participação dos metabólitos da cicloxigenase ou ainda, da proteína quinase A, no vasorelaxamento induzido pelo poligodial, foram realizadas curvas cumulativa concentração-resposta de relaxamento para o poligodial em artéria pulmonar de coelho com endotélio intacto, na ausência e na presença de indometacina (1 e 10  $\mu\text{M}$ ) inibidor da cicloxigenase, ou tetrahydro-8,11-epoxy-1H, 8H, 11H-2, 7b, 11a-triazadibenzo[a, g]cycloocta[c, d, e]-trinden-1-one (KT 5720, 1  $\mu\text{M}$ ), inibidor da proteína quinase A.

### 3.5.10. Influência do poligodial na contração induzida pelo $\text{CaCl}_2$

Para verificar a influência do poligodial na resposta contrátil induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , anéis de aorta torácica de coelho com e sem endotélio foram montadas de acordo com o protocolo já descrito acima. Para efetuar a retirada do  $\text{Ca}^{2+}$  as preparações foram lavadas com líquido de Krebs-despolarizante ( $\text{K}^+$  80 mM) preparado pela substituição equimolar de NaCl pelo KCl sem  $\text{Ca}^{2+}$ , contendo EGTA (2 mM) durante 20 min, sendo a solução renovada a cada 10 min. Logo



após, a solução foi substituída por outro líquido despolarizante (80 mM) sem  $\text{Ca}^{2+}$  e sem EGTA por cerca de 20 min. Após esse período, foi realizada uma curva cumulativa concentração-resposta contrátil para o  $\text{CaCl}_2$ , na ausência e na presença do poligodol (10  $\mu\text{M}$ ) incubado durante 20 min.

### 3.5.11. Isolamento e preparação do corpo cavernoso

Coelhos machos (2,5 a 3,5 Kg) foram anestesiados com pentobarbital sódico seguido de deslocamento da coluna cervical. O pênis foi retirado na região de inserção da crura e imediatamente colocado em solução de Krebs-Henseleit. O tecido cavernoso foi dissecado após remoção dos tecidos conectivos e da túnica albugínea. Após a limpeza, o corpo cavernoso foi colocado em cuba de vidro contendo 10 ml da solução de Krebs-Henseleit, pH 7,2 mantida à 37°C e aerada com 95% de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Foi adicionado ao líquido indometacina (5,6  $\mu\text{M}$ ), com o objetivo de inibir a produção endógena de prostaglandinas. De cada animal foi obtido apenas um segmento de corpo cavernoso (2 – 3 cm de comprimento).

As preparações permaneceram em equilíbrio por 120 min sob 2 g de tensão antes da adição de qualquer droga ao banho, sendo a solução nutritiva renovada a cada 20 min. As alterações na tensão (contração e relaxamento) foram medidas isotonicamente por meio de transdutores de força (TRI - 201), e registradas em polígrafo 6006 da Letica Instrumentos Científicos. A resposta contrátil submáxima induzida pela fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) foi considerada como 100% e todas as respostas subseqüentes foram calculadas como porcentagens deste valor. Os resultados foram expressos em valores percentuais de relaxamento.

### 3.5.12. Protocolo experimental utilizado no corpo cavernoso

Após o período de equilíbrio de 120 min, as preparações foram contraídas pela adição de fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) e após estabelecido um platô para a resposta tônica (aproximadamente 5 min), foi realizada uma curva cumulativa concentração-resposta de relaxamento para o poligodial (0,0427 – 42,74  $\mu\text{M}$ ). Foram realizadas também curvas cumulativas concentração-resposta de relaxamento para acetilcolina (0,001 – 30  $\mu\text{M}$ ) e NPS (0,001 – 30  $\mu\text{M}$ ) com o objetivo de comparar o efeito relaxante do poligodial com duas outras substâncias bem conhecidas como relaxantes do corpo cavernoso.

Para investigar a participação da via NO/GMPc no efeito relaxante do corpo cavernoso de coelho, foram utilizadas algumas drogas que atuam nesta via, como inibidores da guanilato ciclase solúvel (LY 83583, 30  $\mu\text{M}$  e ODQ, 3 e 10  $\mu\text{M}$ ). Todas as drogas permaneceram em contato com o tecido por 20 min antes da indução de contração com fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ). Uma vez estabilizada a contração, a acetilcolina, o NPS ou o poligodial foram adicionados cumulativamente ao banho.

Como o poligodial não causou dessensibilização nesta preparação, foi possível obter curvas cumulativas completas de relaxamento para o composto em cada preparação na ausência e na presença dos antagonistas, ou seja, antes da adição de qualquer droga ao banho foram obtidas curvas controle de relaxamento para o poligodial.

### 3.6. Drogas utilizadas

As drogas usadas foram: iodeto de acetilcolina, cloridrato de fenilefrina, NPS, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG), N<sup>ω</sup>-nitro-D-arginina (D-NOARG), NPS, bradicinina, Substância P, indometacina, TEA, apamina, 4-aminopiridina, caribdotoxina, CGRP-8-37, sulfato de atropina, IBMX, EGTA e PBS (solução tampão fosfato), todas da Sigma Chemical Co. St. Louis, U.S.A. glibenclamida e HOE 140 da Hoescht (Frankfurt, Alemanha), 1H[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) da Tocris Cookson (Bailwin, MO, USA), 6-anilino-5,8-quinolinedione (LY 83583) da Research Biochemicals International (Natick, MA, USA), FK 888 da Fujisawa Pharmaceutical Co, Ltda (Osaka, Japão), SR 48968 da Sanofi Recherche (Montpellier, França), (KT 5720) da Calbiochem-Novabiochem corporation La Jolla (Canadá), kit de enzima imunoensaio para GMPc da Amersham Pharmacia Biotech.

O S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP) foi gentilmente cedido pelo professor Jamil Assreuy.

As soluções estoques (1-100 mM) foram mantidas a -20 °C em tubos de plástico siliconizados e diluídas em PBS nas concentrações desejadas min antes de serem utilizadas. As soluções estoques para a maioria das drogas foram dissolvidas em PBS, exceto para a glibenclamida que foi dissolvida em solução de NaOH com 5% de glicose, KT 5720 e IBMX que foram dissolvidas em dimetilsulfoxido (DMSO), poligodial e indometacina que foram dissolvidas em etanol absoluto. A concentração final de etanol ou DMSO não excedeu 0,05% no banho e não apresentaram efeito *per se* no tônus basal das preparações ou na resposta aos agonistas.

### 3.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M), exceto para a  $CE_{50}$  (concentração do agonista ou composto que produziu 50% do efeito máximo de relaxamento) que está apresentada como média geométrica acompanhada de seus limite de confiança a 95% (Fleming *et al.*, 1972). A análise estatística dos resultados foi realizado pelo teste "t" de Student para as amostras não-pareadas. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas ao nível de  $P < 0,05$  ou  $P < 0,01$ .

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. Influência do endotélio vascular na ação vasorelaxante induzida pelo poligodial nas artérias pulmonares de coelho e cobaia e na aorta torácica de coelho.

O poligodial produziu relaxamento concentração-resposta nas artérias pulmonares de coelho e de cobaia e na aorta torácica de coelho com endotélio, pré-contraídas com fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ) (Figura 4 e 5). A potência e o relaxamento máximo causado pelo poligodial não diferiram nos tecidos estudados. Além disso esse relaxamento causado pelo poligodial ( $CE_{50}$   $0,87 \mu\text{M}$  ( $0,4 - 1,8$ ) e  $R_{\text{máx}}$  de  $75,0 \pm 3\%$  foi semelhante ao causado pela acetilcolina e pelo nitroprussiato de sódio (NPS) ( $CE_{50}$  para a acetilcolina  $0,45 \mu\text{M}$  ( $0,03 - 5,8$ ) e NPS  $0,83 \mu\text{M}$  ( $0,02 - 338$ ) na artéria pulmonar de coelho e  $R_{\text{máx}}$   $88,0 \pm 2\%$   $91,4 \pm 1\%$ , respectivamente). Quando o endotélio vascular foi removido intencionalmente, o vasorelaxamento causado pelo poligodial foi reduzido significativamente na artéria pulmonar de cobaia e coelho, bem como na aorta torácica de coelho (Figura 5). Os valores das  $CE_{50s}$  e  $R_{\text{máx}}$  estão demonstrados na Tabela 1.

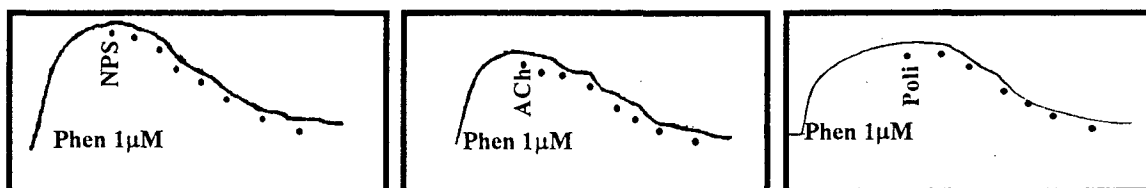


Figura 4- Registro típico mostrando o relaxamento causado pelo NPS ( $0,001-30 \mu\text{M}$ ), acetilcolina (ACh -  $0,001-30 \mu\text{M}$ ) e poligodial ( $0,0427-42,74 \mu\text{M}$ ) na artéria pulmonar de coelho pré-contraída com fenileprina (Phen)  $1 \mu\text{M}$ .

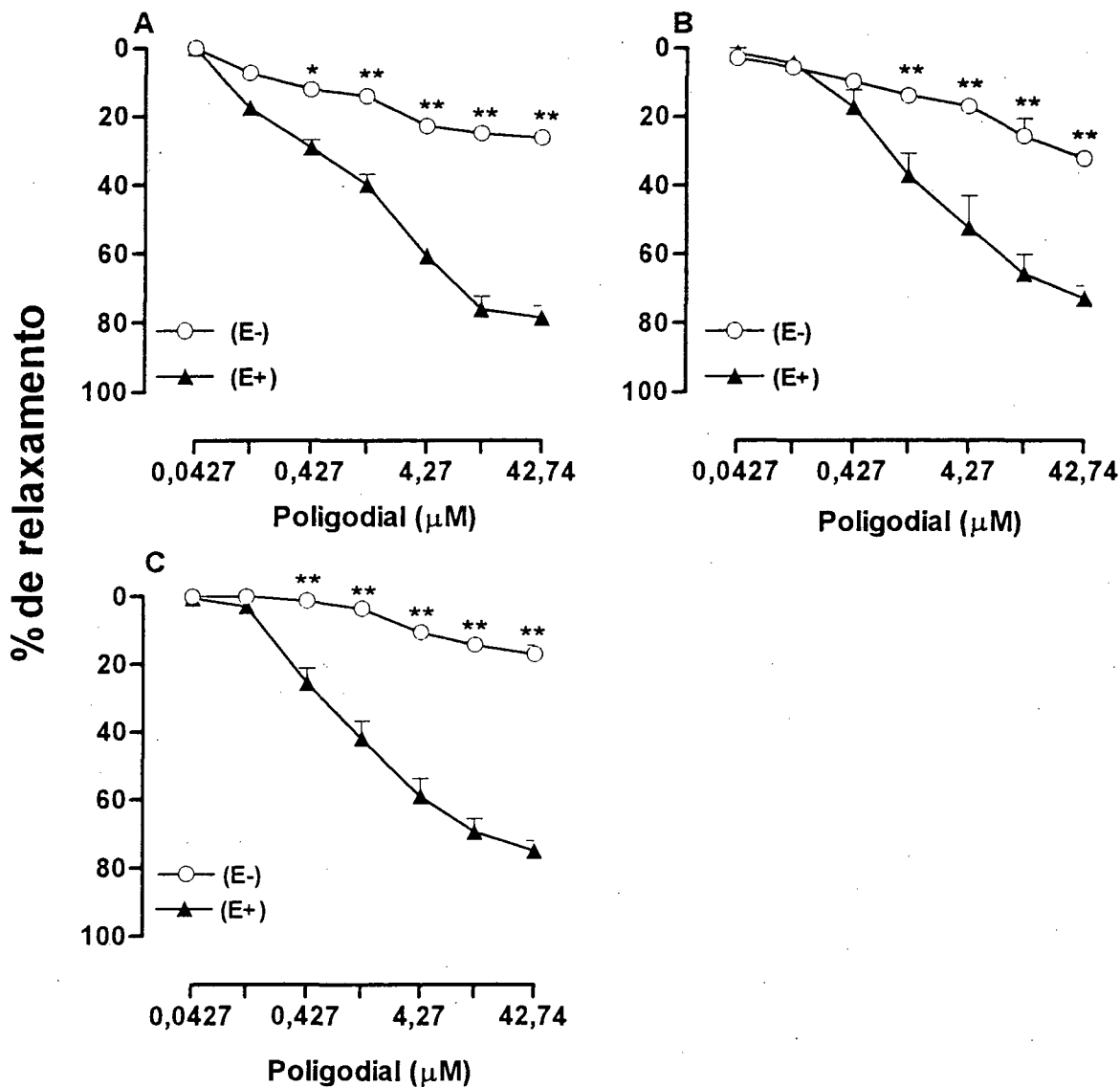


Figura 5- Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial em anéis de artéria pulmonar de cobaia (A) e coelho (B) ou na aorta torácica de coelho (C) com (E+) e sem (E-) endotélio, pré-contraídos com fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ). Cada ponto representa a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do valor controle, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

Tabela 1- Potência e relaxamento máximo para o poligodial em vasos de cobaia e coelho.

Tecidos	Poligodial (E+)		Poligodial (E-)	
	CE <sub>50</sub> (μM)	E <sub>max</sub> (%)	CE <sub>50</sub> (μM)	E <sub>max</sub> (%)
Aorta torácica de coelho	0,87(0,40-1,81)	75,00±2,91	> 42,74	17,37±2,82**
Artéria pulmonar de coelho	0,95 (0,66 -1,38)	72,83±3,80	> 42,74	31,65±1,35**
Artéria pulmonar de cobaia	1,07 (0,32-3,54)	78,66±3,48	> 42,74	26,33±2,02**

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 4 a 6 experimentos.

Difere significativamente dos resultados obtidos nas preparações com endotélio( E+). \*\*

$P < 0,01$ .

#### 4.2. Efeito do poligodai no relaxamento induzido pelo NPS e pela acetilcolina na artéria pulmonar de coelho com endotélio.

Como pode ser observado na Figura 6, o vasorelaxamento causado pela acetilcolina, mas não pelo NPS na artéria pulmonar de coelho, foi completamente abolido após a realização de uma curva cumulativa de relaxamento para o poligodai (0,0427-42,74). Este efeito também foi observado na artéria pulmonar de cobaia e aorta torácica de coelho. Essa dessensibilização causada após a curva cumulativa concentração-resposta de relaxamento induzida poligodai, foi também observada na presença de outros vasodilatadores como a bradicinina, substância P e o próprio poligodai (dados não mostrados). Doses isoladas do poligodai também causam dessensibilização nos vasos estudados (dados não mostrados). No entanto, a resposta contrátil para a fenilefrina não foi alterada.

A incubação de L-arginina (3 mM) por um período de uma hora não foi capaz de reverter este efeito de dessensibilização causado pelo poligodai.

A análise histológica das artérias pulmonares de coelho não revelou qualquer lesão endotelial (dados não mostrados).



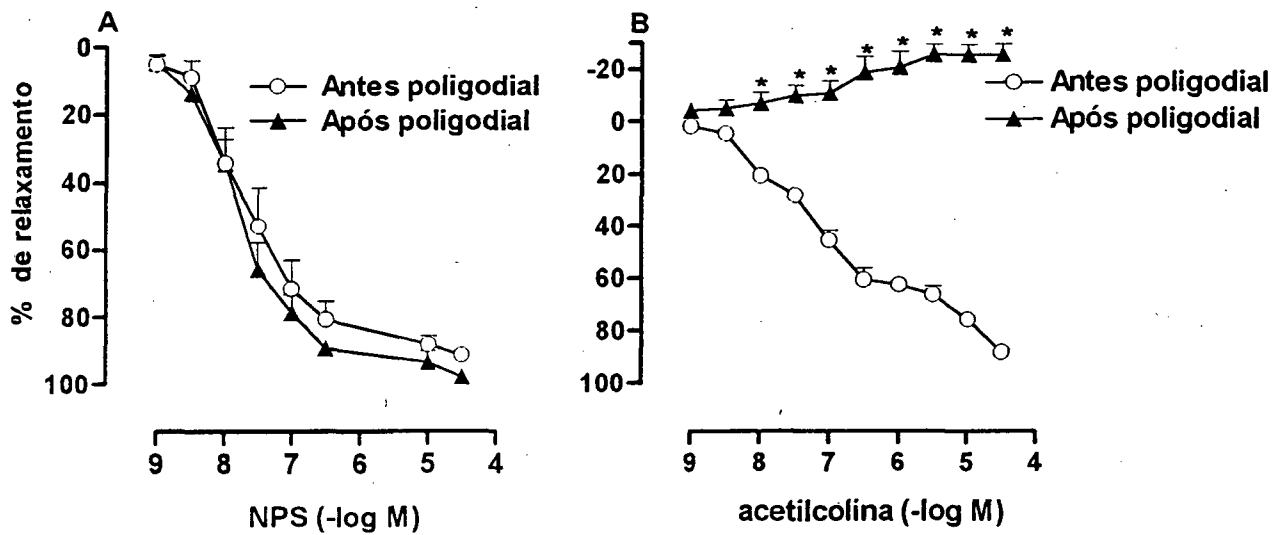


Figura 6- Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o NPS e para a acetilcolina, em anéis de artéria pulmonar de coelho com endotélio, pré-contraídos com fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ). Cada ponto representa a média de 5 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do valor controle \*  $P < 0,01$ .

### 4.3. Efeito de inibidores da enzima NOS na ação vasorelaxante mediada pelo poligodial.

Os resultados apresentados na Figura 7 mostram que a pré-incubação dos anéis de artéria pulmonar de coelho com os inibidores da enzima NOS, L-NAME (100  $\mu$ M) ou L-NOARG (100  $\mu$ M), inibiu significativamente o relaxamento dependente de endotélio causado pelo poligodial nas preparações pré-contraídas com fenilefrina (1  $\mu$ M). A adição do isômero inativo a D-NOARG (100  $\mu$ M) não alterou a ação vasorelaxante induzida pelo poligodial (Figura 7). Resultados semelhantes a esses foram observados nos vasos da artéria pulmonar de cobaia e aorta torácica de coelho (Tabelas 3 e 4).

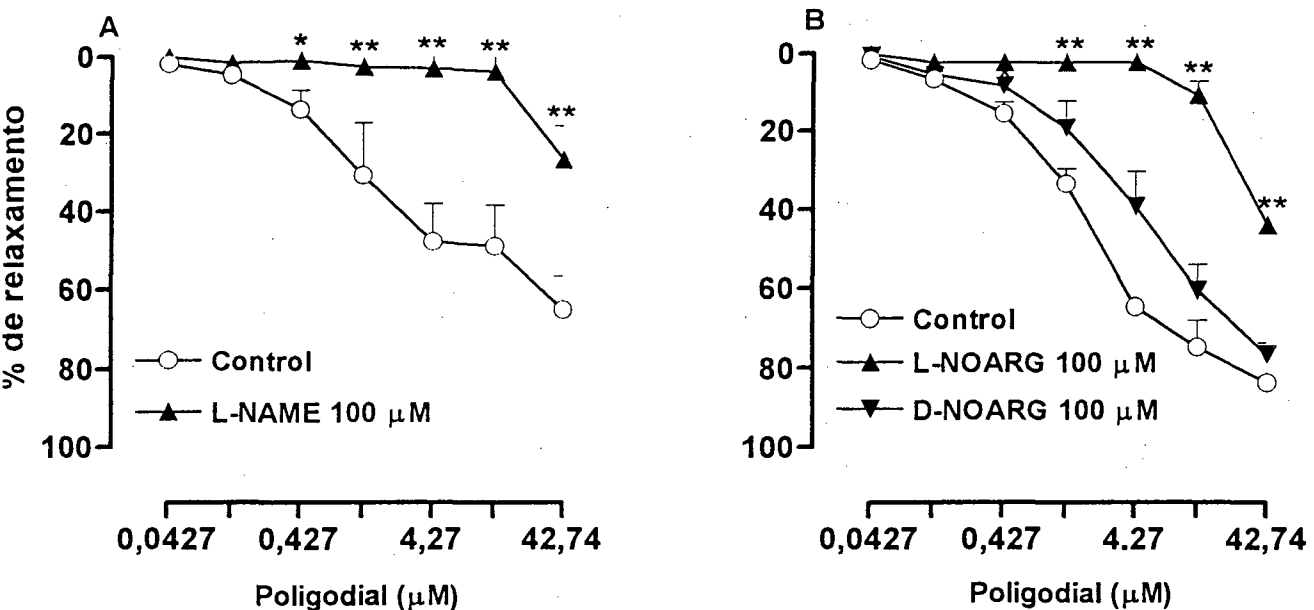


Figura 7- Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina (1  $\mu$ M) obtida na ausência (○) ou na presença dos inibidores da NOS, L-NOARG (▲) ou seu isômero inativo D-NOARG (▼) (B) ou L-NAME (▲) (A). Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle, \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$ .

#### 4.4. Efeito de inibidores da enzima guanilato ciclase solúvel na ação vasorelaxante mediada pelo poligodial.

Ambos os inibidores da guanilato ciclase solúvel, ODQ (1  $\mu\text{M}$ ) ou o LY 83583 (10  $\mu\text{M}$ ), inibiram marcadamente a ação vasorelaxante causada pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho pré-contraída com fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) (Figura 8). Resultados semelhantes a estes foram observados em anéis de artéria pulmonar de cobaia e aorta torácica de coelho (Tabelas 3 e 4).

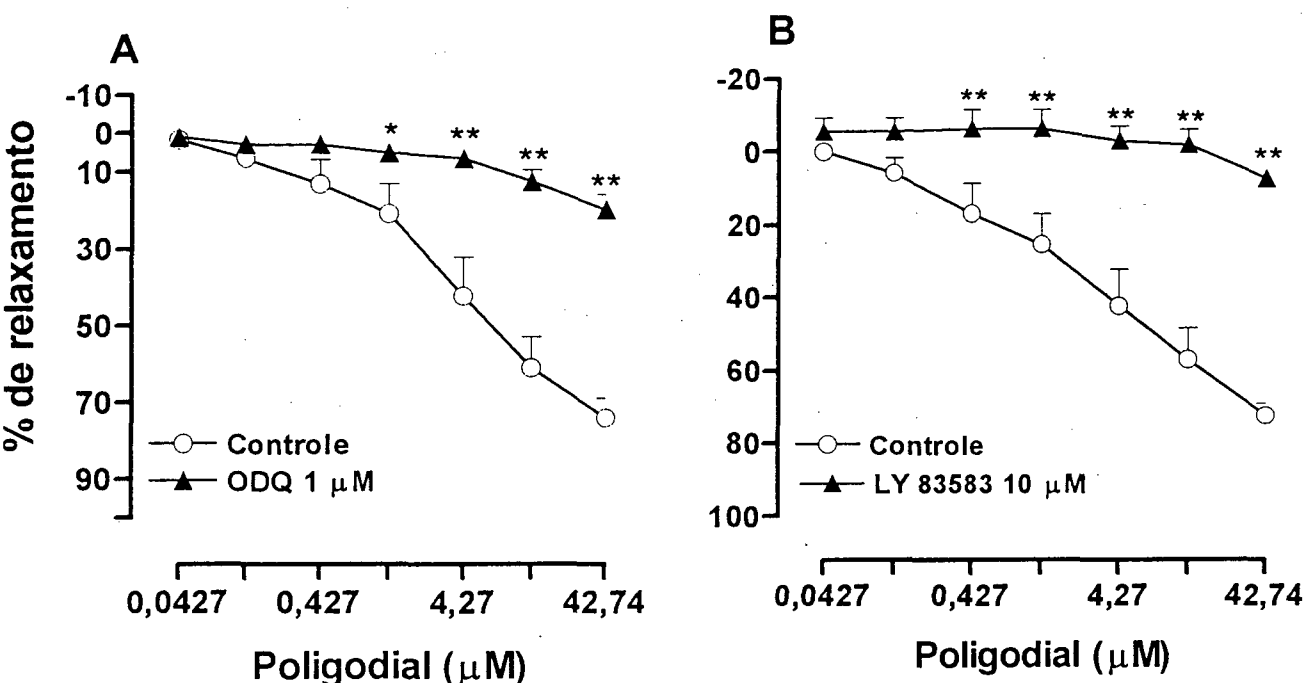


Figura 8- Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina (1 $\mu\text{M}$ ), na ausência (○) ou na presença (▲) dos inibidores da enzima guanilato ciclase solúvel, ODQ e LY 83583. Cada ponto representa a média de 4-5 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle \*  $P < 0,05$  ou \*\*  $P < 0,01$ .

#### 4.5. Efeito do poligodial sobre o nível de GMPc na aorta torácica de coelho.

Os resultados da Figura 9 demonstram claramente que, quando os anéis de aorta torácica de coelho foram submetidos à presença do SNAP (10  $\mu$ M), ocorreu um aumento significativo do nível de GMPc. Resultados semelhantes foram obtidos nas preparações relaxadas pela adição do poligodial (42,74  $\mu$ M), causando aumento significativo do nível de GMPc, quando comparado com o nível basal (Figura 9).

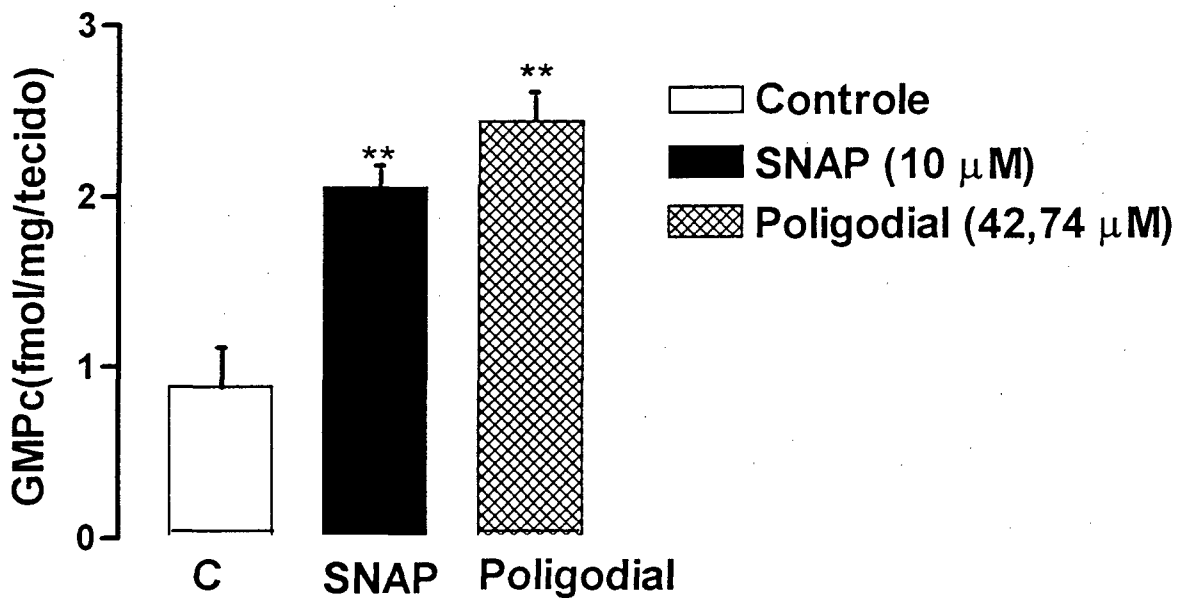


Figura 9- Efeito do poligodial e do SNAP no conteúdo de GMPc na aorta torácica de coelho com endotélio intacto, pré-contraído com fenilefrina (1  $\mu$ M). (\*\*) Nível de GMPc significativamente maior do que nos tecidos controle (valor basal). Cada coluna representa a média de 3 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle \*\*  $P < 0,01$ .

#### 4.6. Papel dos canais de $K^+$ na resposta vasorelaxante induzida pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho.

Os resultados da Figura 10 mostram que a pré-incubação dos anéis de artéria pulmonar de coelho com bloqueadores de canais de  $K^+$  como o TEA (5 mM) ou a glibenclamida (30  $\mu$ M) inibiu de forma parcial mas significativa o efeito vasorelaxante induzido pelo poligodial. Os valores da  $R_{m\acute{a}x}$  estão demonstrados na Tabela 2. Entretanto, a 4-aminopiridina (3 mM), apamina (1  $\mu$ M) ou a caribdotoxina (100 nM) falharam em inibir a ação do poligodial (Figura 11). Resultados semelhantes a estes foram encontrados na artéria pulmonar de cobaia e na aorta de coelho (Tabelas 3 e 4).

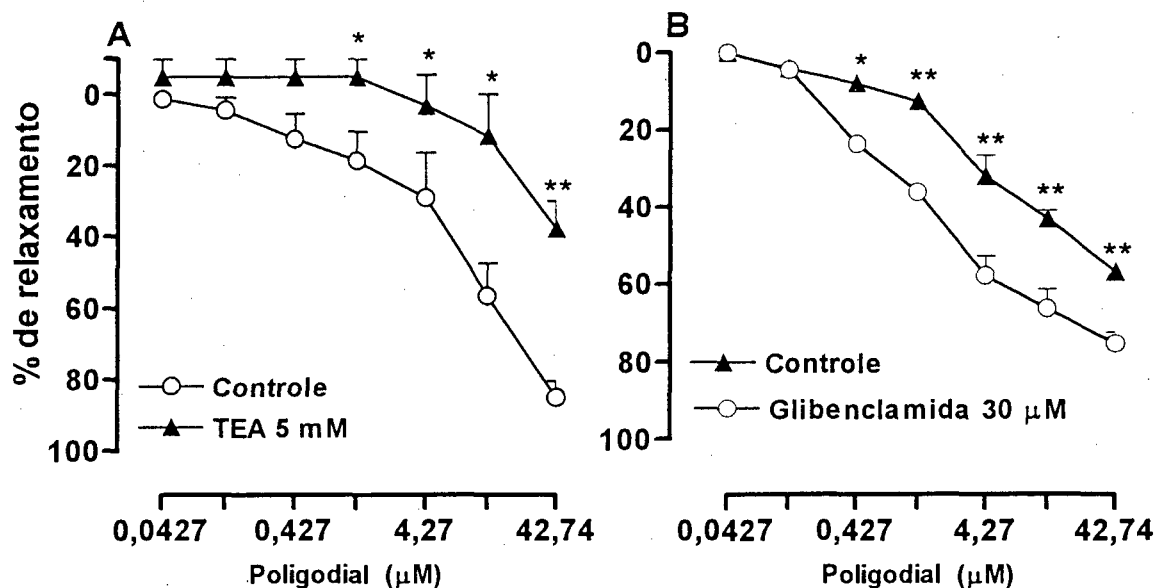


Figura 10- Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina (1  $\mu$ M) na ausência (○) ou na presença (▲) dos bloqueadores de canais de  $K^+$ , TEA (A) e glibenclamida (B). Cada ponto representa a média de 4-6 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do controle \*  $P < 0,05$  ou \*\*  $P < 0,01$ .

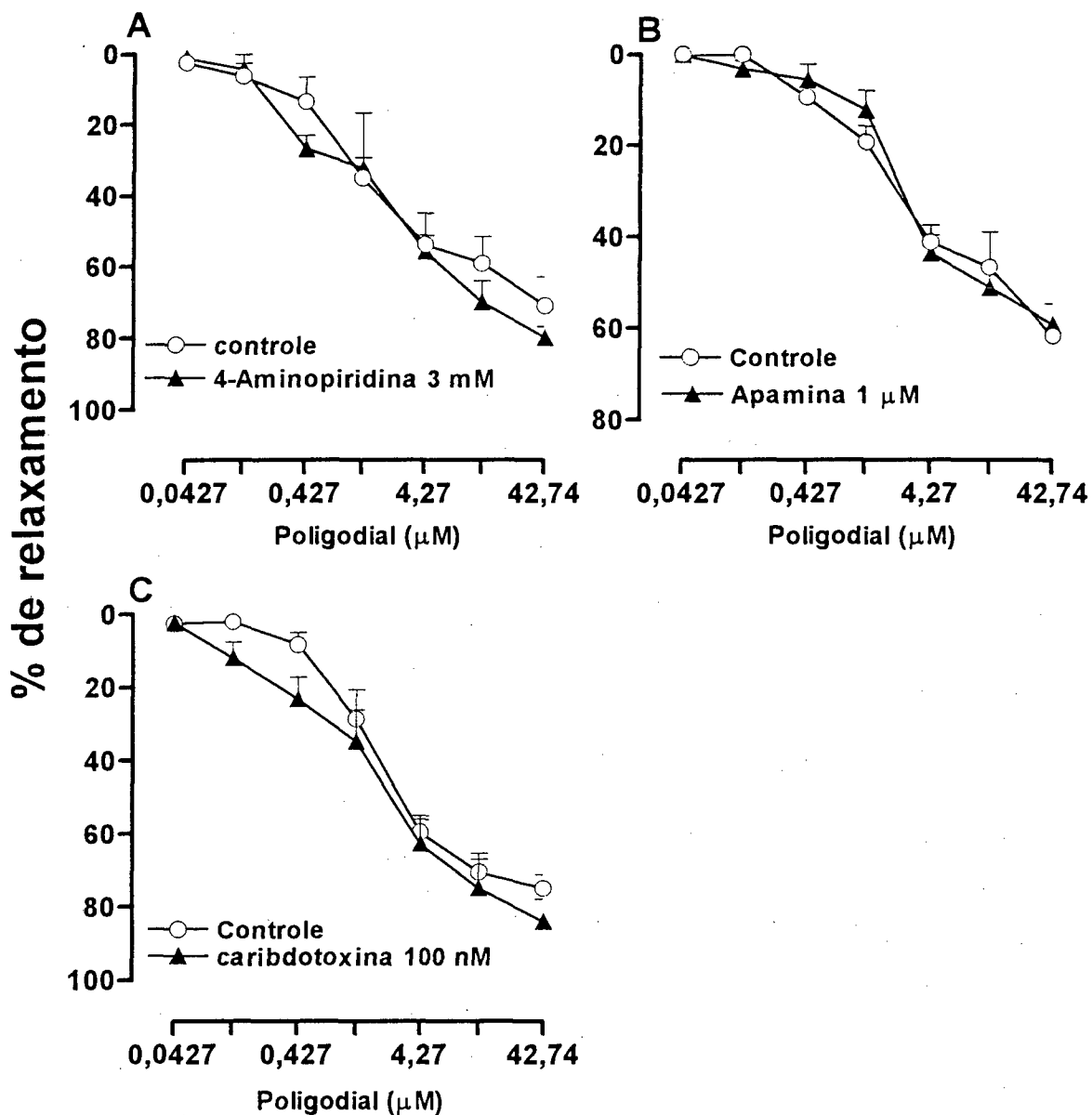


Figura 11- Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina ( $1\mu\text{M}$ ) na ausência (○) ou na presença (▲) dos bloqueadores de canais de  $\text{K}^+$  4-aminopiridina (A), apamina (B) e caribdotoxina (C). Cada ponto representa a média de 4-6 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M.

#### 4.7. Efeito dos antagonistas dos receptores para substância P, receptores muscarínicos e B<sub>2</sub> para cininas no vasorelaxamento causado pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho.

Os resultados apresentados na Figura 12 demonstram que os antagonistas de receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub> (FK 888, 100 nM) e NK<sub>2</sub> (SR 48968, 100 nM), o antagonista de receptores muscarínicos (atropina, 1 μM) ou o antagonista de receptores B<sub>2</sub> para cininas (HOE 140, 1 μM) não modificaram de maneira significativa o vasorelaxamento produzido pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho. Os valores da CE<sub>50</sub> e R<sub>máx</sub> estão demonstrados na Tabela 2.

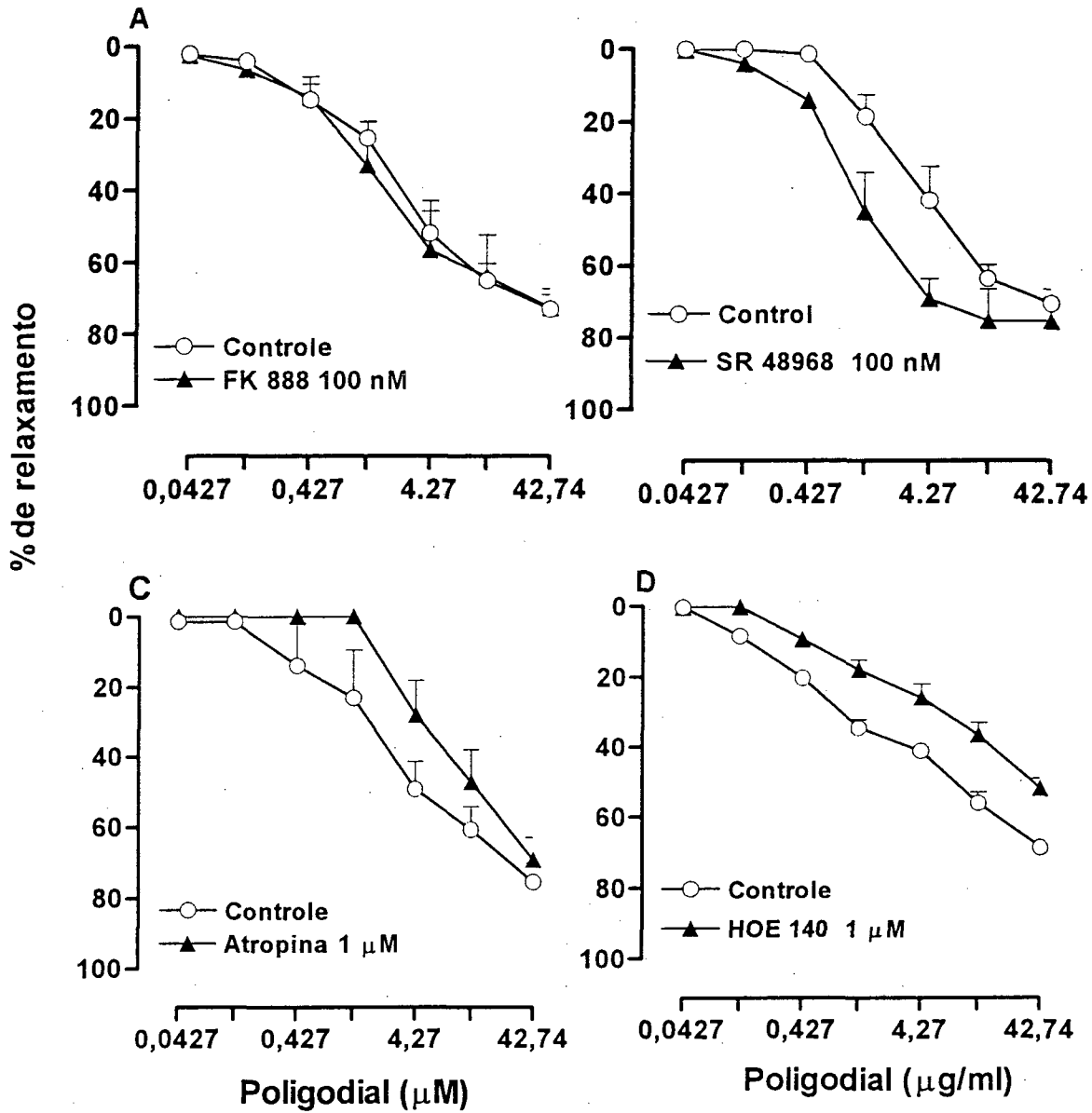


Figura 12- Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina (1 $\mu$ M) na ausência (○) ou na presença (▲) dos antagonistas seletivos de receptores taquicinérgicos NK<sub>1</sub> (FK 888) (A) e NK<sub>2</sub> (SR 48968) (B), antagonista não seletivo de receptores muscarínicos (atropina) (C) e antagonista seletivo de receptores B<sub>2</sub> (HOE 140) (D). Cada ponto representa a média de 4-6 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M.



#### 4.8. Efeito do CGRP na ação vasorelaxante induzida pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho.

Como pode ser observado na Figura 13, a ação vasorelaxante induzida pelo poligodial, também não foi alterada de maneira significativa pelo antagonista de receptores do CGRP (CGRP- 8,37; 100 nM).

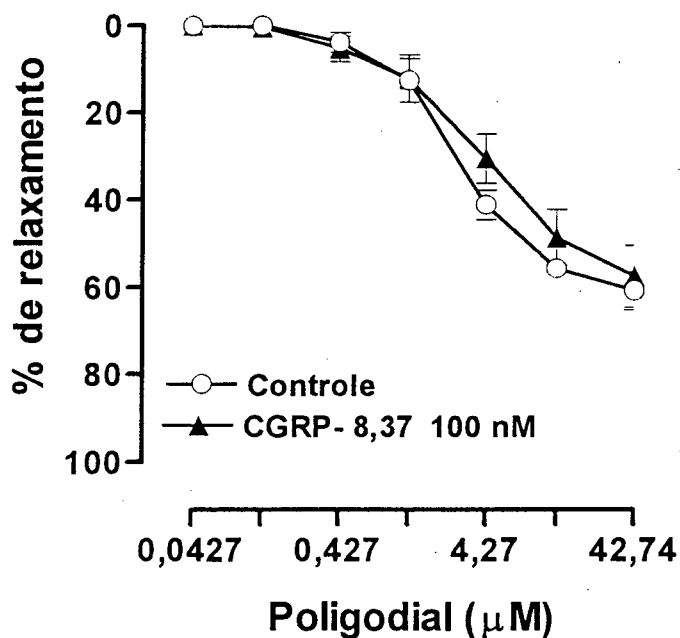


Figura 13- Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina ( $1\mu\text{M}$ ) na ausência ( $\circ$ ) ou na presença ( $\blacktriangle$ ) do antagonista do receptor de CGRP (CGRP-8,37). Cada ponto representa a média de 4-6 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M.

#### 4.9. Efeito dos metabólitos da cicloxigenase sobre a ação vasorelaxante induzida pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho.

O inibidor inespecífico das cicloxigenases (indometacina, 1 e 10  $\mu\text{M}$ ) não alterou de maneira significativa a ação vasorelaxante induzida pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho (Figura 14). Os valores da  $\text{CE}_{50}$  e  $R_{\text{máx}}$  estão demonstrados na Tabela 2.

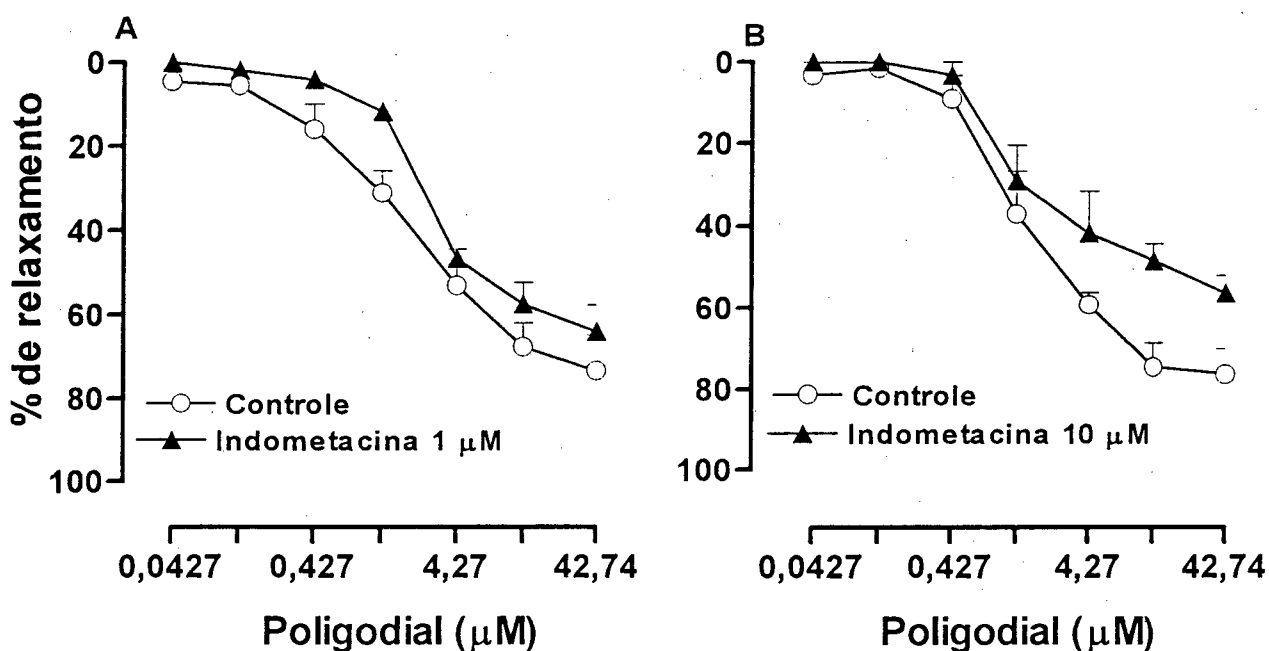


Figura 14- Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para o poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) na ausência (○) ou na presença (▲) do inibidor da enzimas cicloxigenases (indometacina). Cada ponto representa a média de 4-6 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M.

#### 4.10. Efeito do inibidor da proteína quinase A na ação vasorelaxante induzida pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio.

O inibidor específico da proteína quinase A (KT 5720, 1  $\mu$ M) não modificou a resposta vasorelaxante induzida pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho (Figura 15). Os valores da  $CE_{50}$  e  $R_{\max}$  estão demonstrados na Tabela 2.

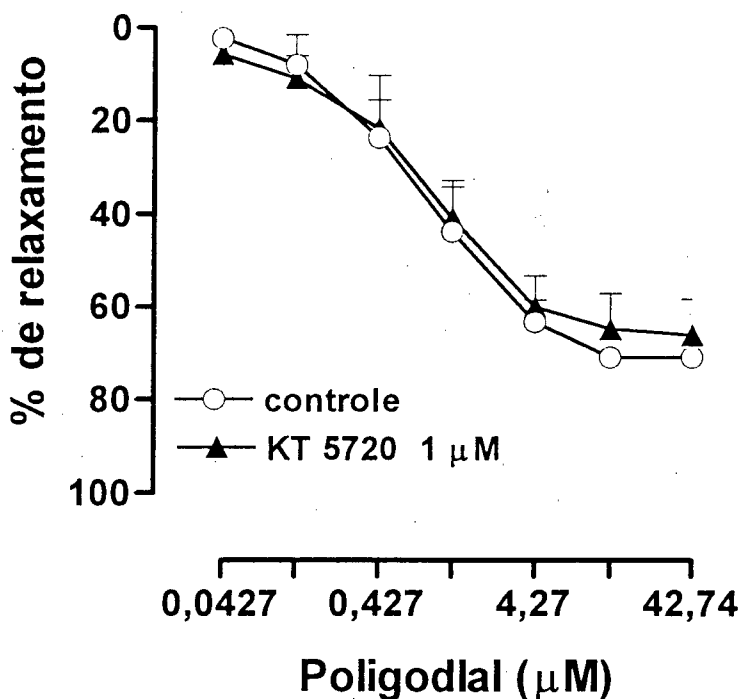


Figura 15- Curvas concentração-resposta de relaxamento obtidas para poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio pré-contraída com fenilefrina (1  $\mu$ M) na ausência (○) ou na presença (▲) do inibidor de proteína quinase A (KT 5720). Cada ponto representa a média de 4-6 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M.

#### 4.11. Influência do poligodial na contração induzida pelo $\text{CaCl}_2$ na aorta torácica de coelho com e sem endotélio.

A resposta contrátil induzida pelo  $\text{CaCl}_2$  nos anéis de aorta torácica de coelho com e sem endotélio não foi alterada na presença do poligodial ( $10 \mu\text{M}$ ) incubado durante 20 min antes da realização da curva cumulativa concentração-resposta ao  $\text{CaCl}_2$  (Figura 16).

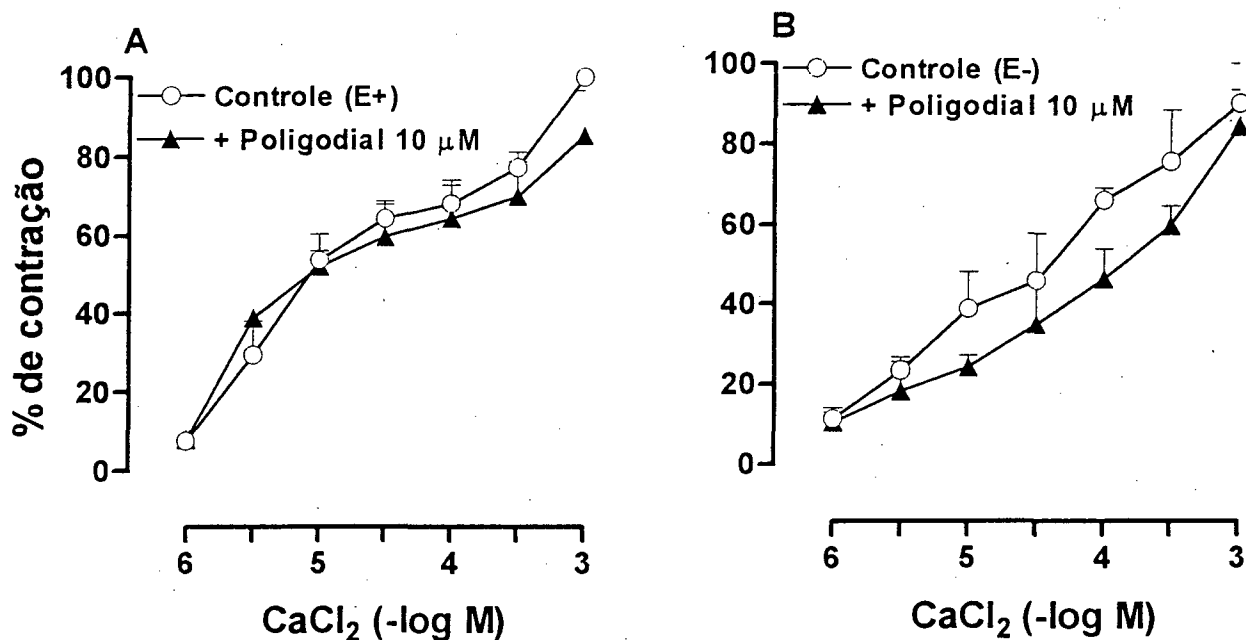


Figura 16- Curvas concentração-resposta de contração obtidas para o  $\text{CaCl}_2$  na aorta torácica de coelho com e sem endotélio na ausência (○) e na presença (▲) do poligodial. Cada ponto representa a média de 4-6 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M.

Tabela 2- Efeito de diferentes classes de drogas no relaxamento induzido pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho com endotélio .

Drogas	Concentração	Ausência		Presença	
		CE <sub>50</sub> (μM)	R <sub>máx</sub> (%)	CE <sub>50</sub> (μM)	R <sub>máx</sub> (%)
L-NOARG	100 μM	1,7(0,005-53,7)	83,8±8,8	> 42,74	44,0±0,4**
L-NAME	100 μM	2,45(0,02-354)	65,0±8,0	> 42,74	26,8±8,7**
D-NOARG	100 μM	1,7(0,005-53,7)	83,8±8,8	3,9(8,711,5)	76,6±3,0
ODQ	1 μM	3,5(1,1-10,9)	74,09±5,1	> 42,74	20,0±4,1**
LY 83583	10 μM	2,7(0,1-70,8)	72,5±3,4	> 42,74	7,1±0,6**
TEA	5 mM	6,1(1,2-30,9)	85,1±4,7	> 42,74	37,7±7,7*
Apamina	1 μM	2,5 (1,0-6,4)	61,7±0,8	2,7 (1,7-4,3)	59,2±4,6
Caribdotoxina	100 nM	2,7 (1,0-7,0)	75,1±3,7	1,9 (1,1-3,2)	84,1±6,1
Glibenclamida	30 μM	1,4 (1,0-2,4)	75,4±2,9	3,9 (1,7-8,7)	56,7±2,0*
4-Aminopiridina	3 mM	1,2 (0,2-9,8)	70,0±9,2	1,8 (0,6-5,3)	79,1±3,1
Indometacina	1 μM	1,8 (0,9-3,7)	73,5±8,6	2,7 (1,6-4,3)	64,1±6,4
Indometacina	10 μM	1,6 (0,3-8,1)	76,3±6,2	2,9 (0,1-14,3)	56,4±4,3
SR48968	100 nM	2,9 (0,3-2,7)	69,8±1,4	3,7 (1,2-11,7)	74,8±9,0
FK 888	100 nM	3,2 (0,8-13,3)	73,0±4,2	2,6 (0,4-18,5)	72,6±5,5
KT 5720	1 μM	0,9 (0,2-3,8)	71,1±2,2	0,9 (0,3-3,3)	66,3±7,9
Atropina	1 μM	3,0(2,4-3,0)	75,5±5,3	6,9(2,8-17,3)	69,2±6,3
HOE 140	1 μM	2,4(0,3-19,0)	68,3±1,6	> 42,74	51,7±2,8

Cada grupo representa a media ± E.P.M. de 4 a 6 experimentos.

Difere significativamente do grupo controle, \*  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ .

Tabela 3- Efeito de diferentes classes de drogas no relaxamento induzido pelo poligodíal na artéria pulmonar de cobaia com endotélio.

Drogas	Concentração	Ausência		Presença	
		CE <sub>50</sub> (μM)	R <sub>máx</sub> (%)	CE <sub>50</sub> (μM)	R <sub>máx</sub> (%)
L-NOARG	100 μM	0,9(0,4-1,8)	79,2±0,7	> 42,74	54,4±3,7**
LY 83583	10 μM	1,4(0,5-3,9)	76,4±4,4	> 42,74	13,8±0,8**
TEA	1 mM	2,7(1,5-5,0)	89,3±5,8	2,1 (1,8-2,4)	86,6±1,3
Glibenclamida	3 μM	2,4 (1,0-5,9)	89,1±5,8	3,2 (0,8-12,5)	74,0±4,1
Apamina	1 μM	1,7(1,0-2,9)	79,7±5,2	1,9 (1,5-25,0)	72,9±2,0

Cada grupo representa a media ± E.P.M. de 4 a 6 experimentos.

Difere significativamente do grupo controle, \*\*  $P < 0,01$ .

Tabela 4- Efeito de diferentes classes de drogas no relaxamento induzido pelo poligodol na aorta torácica de coelho com endotélio.

Drogas	Concentração	Ausência		Presença	
		CE <sub>50</sub> (μM)	R <sub>máx</sub> (%)	CE <sub>50</sub> (μM)	R <sub>máx</sub> (%)
L-NOARG	100 μM	0,7(1,5-0,3)	71,9±4,9	> 42,74	17,4±2,9**
L-NAME	100 μM	3,9(1,4-11,2)	74,7±3,9	> 42,74	20,1±1,6**
ODQ	1 μM	0,5(0,2-1,3)	79,2±1,5	> 42,74	13,8±3,2**
LY 83583	10 μM	3,1(0,9-9,5)	72,9±4,9	> 42,74	22,7±0,5**
TEA	5 mM	0,4 (0,05-3,5)	69,6±5,4	0,9 (0,2-4,3)	62,8±4,4
Apamina	1 μM	1,4 (0,4-5,2)	67,2±5,5	3,1 (0,7-12,0)	65,3±4,9
Glibenclamida	30 μM	2,9 (2,6-3,4)	70,8±3,2	3,7 (1,9-7,4)	64,3±5,7
4-aminopiridina	1 mM	1,3 (0,2-11,2)	67,6±1,4	2,5 (0,1-6,6)	66,9±1,8

Cada grupo representa a media ± E.P.M. de 4 a 6 experimentos,

Difere significativamente do grupo controle, \*\*  $P < 0,01$ .

#### 4.12. Efeito dos inibidores da guanilato ciclase solúvel no relaxamento induzido pelo poligodial no corpo cavernoso de coelho.

Tanto o poligodial ( $CE_{50}$  2,8  $\mu$ M (0,38-11,5) e  $R_{m\acute{a}x}$  97,75  $\pm$  2,22%) como a acetilcolina ( $CE_{50}$  0,38  $\mu$ M (0,1-1,17) e  $R_{m\acute{a}x}$  96,20  $\pm$  1,9%) e o NPS ( $CE_{50}$  0,30 (0,6-1,5) e  $R_{m\acute{a}x}$  100  $\pm$  00%) produziram relaxamento concentrao-dependente do corpo cavernoso de coelho pr-contraido com fenilefrina (1  $\mu$ M) (Figura 17 e 18). A potência e relaxamento máximo apresentado pelo poligodial no corpo cavernoso de coelho não diferiu, de maneira significativa, do relaxamento observado para a acetilcolina e NPS, bem como para o relaxamento observado por esse composto nos vasos de coelho e cobaia. A incubaco prévia do inibidor da guanilato ciclase solvel, o LY 83583 (10  $\mu$ M), inibiu marcadamente a ao relaxante causada pelo poligodial (37,3  $\pm$  13,8%) e pela acetilcolina ( $R_{m\acute{a}x}$  49,9  $\pm$  9,9%) (Figura 18). Além disso, o efeito relaxante apresentado pela acetilcolina e pelo NPS também foi inibido por outro inibidor da guanilato ciclase solvel, o ODQ 3 e 10  $\mu$ M (68,0 $\pm$ 6,3%, 45,0 $\pm$ 0,1% respectivamente).

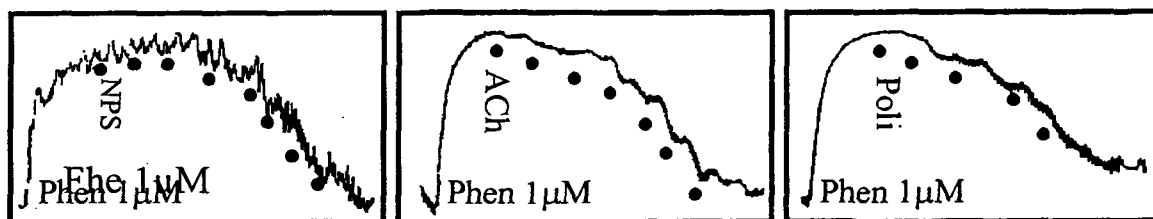


Figura 17- Registro tpico mostrando o relaxamento causado pelo NPS (0,001-30  $\mu$ M) acetilcolina (ACh - 0,001-30  $\mu$ M) e poligodial (0,0427-42,74  $\mu$ M) no corpo cavernoso de coelho pr-contraido com fenilefrina (Phen) 1  $\mu$ M.



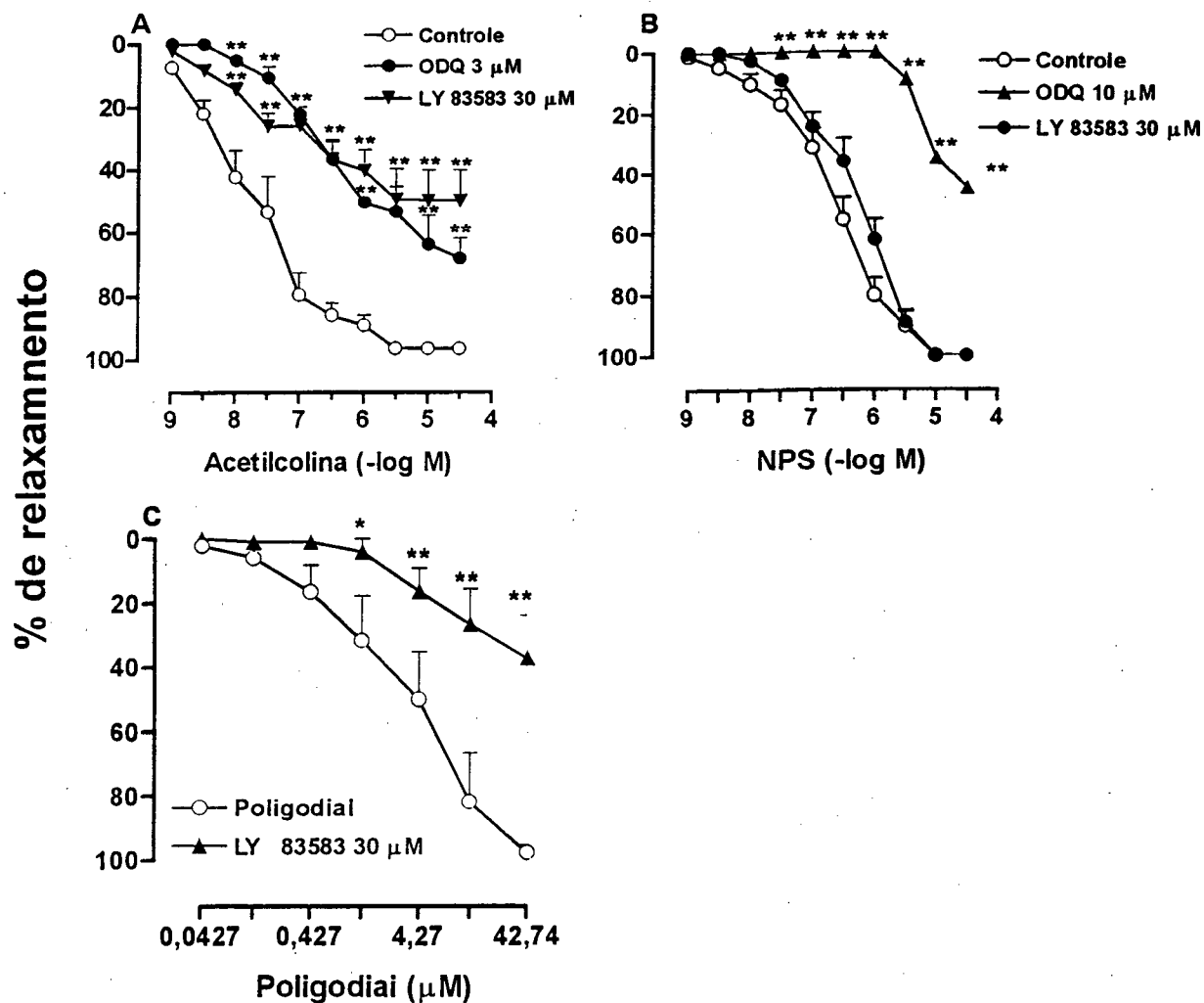


Figura 18 - Curvas concentração-resposta para o relaxamento obtidas para a (A) acetilcolina (B) o NPS e (C) o poligodial no corpo cavernoso isolado de coelho na ausência ou na presença de inibidores da guanilato ciclase solúvel, LY 83583 e ODQ. Cada ponto representa a média de 3 - 4 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do valor controle, \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$ .

## 5. Discussão

Os resultados do presente estudo demonstram que o sesquiterpeno poligodial, composto isolado das cascas da *D. winteri*, uma planta medicinal usada pela população no tratamento de muitas doenças inflamatórias como a asma, a alergia e a bronquite (Morton, 1981) causou um relaxamento concentração-dependente nos vasos de coelho e cobaia com endotélio intacto, bem como no corpo cavernoso de coelho, pré-contraído pela fenilefrina. Contudo, o relaxamento causado pelo poligodial foi marcadamente reduzido nas preparações em que o endotélio vascular foi removido (aproximadamente 80%). Esses dados demonstram que essa ação produzida pelo poligodial parece depender da liberação de substâncias vasorelaxantes liberadas pelo endotélio vascular.

O fato do sesquiterpeno poligodial ter produzido acentuado relaxamento em vasos com endotélio intacto e no corpo cavernoso nos possibilitou direcionar esse trabalho, visando investigar o efeito relaxante causado por este composto.

Em todos os vasos estudados observamos que o poligodial aboliu completamente a ação vasorelaxante induzida pela acetilcolina, mas não para o NPS. Além disso, o poligodial também causou dessensibilização para outros vasodilatadores como a bradicinina e a substância P. Porém, não foi observado qualquer alteração nas respostas contráteis induzidas pela fenilefrina. A incubação da L-arginina no banho, por um período de uma hora, também não foi capaz de reverter este efeito de dessensibilização.

A análise histológica realizada na artéria pulmonar de coelho, não demonstrou qualquer lesão endotelial produzido por esse composto. Dessa maneira, é possível excluir a possibilidade do poligodial estar causando lesão endotelial,

mas não é possível analisar se estas células endoteliais ainda estão funcionalmente viáveis. É possível também que este composto possa estar alterando algum outro mecanismo intracelular importante para o vasorelaxamento dependente de endotélio.

Como descrito anteriormente, o relaxamento na musculatura lisa vascular pode ocorrer pela liberação de vários mediadores derivados do endotélio, tais como: NO, EDHF e prostaciclina. Desta forma, avaliamos o possível envolvimento da via do NO no relaxamento induzido pelo poligodial. Para tanto, utilizamos inibidores da NOS como a NAME e L-NOARG e seu isômero inativo, D-NOARG. Foi observado que o relaxamento causado pelo poligodial, foi significativamente antagonizado pelos inibidores da NOS. Esses mesmos inibidores foram também efetivos em antagonizar o relaxamento causado pela acetilcolina. Porém, o D-NOARG, o isômero inativo da L-NOARG, falhou em interferir com o vasorelaxamento produzido pelo poligodial confirmando que a ação vasorelaxante produzida pelo poligodial, depende da liberação de NO ou de uma substância relacionada ao NO do endotélio vascular (Furchgott *et al.*, 1984).

Foi demonstrado que, na aorta de rato, o NO é o fator relaxante predominante derivado do endotélio (Zygmunt *et al.*, 1994) sendo particularmente sensível ao efeito inibitório da L-NOARG sobre a resposta vasorelaxante (Vargas *et al.*, 1991). Os inibidores da NOS são análogos do substrato L-arginina e por isso competem com o aminoácido pelo sítio ativo desta enzima, promovendo assim um bloqueio da atividade enzimática (Frew *et al.*, 1993; Ishii *et al.*, 1990). A potência de inibição pode variar consideravelmente entre diferentes inibidores da NOS (Frew *et al.*, 1993; Ishii *et al.*, 1990). Na musculatura lisa vascular, os

análogos da L-arginina antagonizam o relaxamento dependente de endotélio e causam contração por bloquear a liberação basal de NO. Estes efeitos podem ser revertidos pela adição da L-arginina, mas não pelo seu enantiômero a D-arginina (Moncada *et al.*, 1991).

Nossos resultados nos permitem ainda sugerir que o poligodial pode estar agindo sobre a eNOS, levando à liberação de NO e Conseqüentemente causando relaxamento da musculatura lisa vascular, tanto nas artéria pulmonares de coelho e de cobaia como na aorta torácica de coelho.

A produção de NO no endotélio vascular ocorre quando existe um aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular. Essa elevação de  $Ca^{2+}$  intracelular ativa a eNOS, uma enzima dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina. Porém, a atividade desta enzima é marcadamente atenuada pela sua interação com uma proteína chamada de caveolina. Os resultados do presente estudo permitem ainda sugerir que o poligodial poderia estar facilitando o rompimento do complexo eNOS/caveolina, facilitando sua interação com o complexo  $Ca^{2+}$ /calmodulina (Feron *et al.*, 1998a, 1998b).

A possível participação da via da guanilato ciclase solúvel na resposta vasorelaxante causada pelo poligodial nos vasos de cobaia e coelho, foi também investigada pelo uso de antagonistas da guanilato ciclase solúvel, o LY 83583 (Luo e Vicent, 1995; Mulsch *et al.*, 1988) e outro mais seletivo o ODQ (Garthwaite *et al.*, 1995). O LY 83583 interage com o grupamento heme, inibindo assim a guanilato ciclase solúvel. Porém, foi demonstrado que o LY 83538 suprime não somente o vasorelaxamento dependente de endotélio (Cherry *et al.*, 1990; McLeod *et al.*, 1987; Müish *et al.*, 1988), como também aquele independente do

endotélio vascular causado por NO exógeno gerado de drogas nitrovasodilatadoras (Barbier e Lefebvre, 1992; Furchgott e Jothianandan, 1991; Kontos e Enoch, 1993; Mülsch *et al.*, 1988). Além disso, foi demonstrado que o LY 83583 pode gerar ânion superóxido inativando assim o NO (Palmer *et al.*, 1987; Kumagai *et al.*, 1998). É também conhecido que o LY 83583 pode inibir diretamente a produção do NO das células endoteliais em concentrações em que a guanilato ciclase solúvel não é afetada, sugerindo dessa forma que essa droga também atua por inibir a NOS (Cherry *et al.*, 1990; Mülsch *et al.*, 1989). Estes vários efeitos apresentados pelo LY 83583 podem no entanto dificultar a interpretação de alguns resultados. Visando eliminar essas dificuldades, foi utilizado o ODQ, que é considerado um potente inibidor da atividade da guanilato ciclase solúvel em concentrações que não interferem com a guanilato ciclase particulada ou a adenilato ciclase (Garthwaite *et al.*, 1995). Foi demonstrado também que este composto liga-se de maneira competitiva com o NO, no sítio da guanilato ciclase solúvel por meio da oxidação do grupamento heme desta enzima (Schrammel *et al.*, 1996).

Nossos resultados demonstram que tanto o LY 83583 quanto o ODQ foram efetivos em inibir a resposta relaxante causada pelo poligodial confirmando portanto, a participação da guanilato ciclase solúvel neste efeito vasorelaxante. Tais resultados ainda reforçam as evidências de que os efeitos relaxantes do poligodial em artéria pulmonar de coelho e de cobaia e na aorta torácica de coelho, pode estar ocorrendo pela liberação de NO com um conseqüente aumento da atividade basal da guanilato ciclase solúvel.

Após o NO ter reagido com a guanilato ciclase solúvel, esta catalisa a conversão de GTP em GMPc, o que por sua vez é o responsável pelo relaxamento observado na musculatura lisa vascular (Murad, 1986). O GMPc ativa proteínas quinases, que por sua vez podem: diminuir a concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular por inibição da fosfolipase C (Hirata *et al.*, 1990; Rapoport, 1986), inibir o receptor de  $IP_3$  o qual está envolvido na liberação de  $Ca^{2+}$  do estoque intracelular (Koga *et al.*, 1994; Komalavilas e Lincoln, 1994), ou inibir o influxo de  $Ca^{2+}$  através de canais iônicos (Blatter e Wier, 1994), bem como pela estimulação do efluxo de  $Ca^{2+}$  do citoplasma pela troca de  $Na^+/Ca^{2+}$  (Furukawa *et al.*, 1991). Além disso, a resposta contrátil de todos os músculos lisos é dependente da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular. Outros mecanismos também participam do vasorelaxamento mediado pela via do GMPc, tais como: diminuição da sensibilidade das proteínas contráteis ao  $Ca^{2+}$  (McDaniel *et al.*, 1992) e ativação de canais de  $K^+$  (Archer *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 1993). No entanto esses canais também podem ser ativados diretamente pelo NO, ou seja, por mecanismos independentes de GMPc. Neste caso o NO promove uma alteração química no grupo sulfidrílica do canal, aumentando a probabilidade de sua abertura (Bolotina *et al.*, 1994). Assim, a diminuição da concentração  $Ca^{2+}$  intracelular e simultânea ativação dos canais de  $K^+$  parecem contribuir para o relaxamento da musculatura lisa.

Para avaliar a participação direta do GMPc no relaxamento vascular causado pelo poligodial na aorta de coelho com endotélio, foi dosado o nível de GMPc na aorta torácica de coelho antes e após o relaxamento com o composto poligodial. Os resultados mostram que tanto o poligodial quanto o NPS, um

doador de NO, aumentaram significativamente os valores de GMPc quando comparado com os níveis basais. Esses resultados confirmam portanto que o efeito relaxante causado pelo poligodial na musculatura lisa vascular possivelmente decorre da liberação de NO, e com conseqüente ativação da guanilato ciclase solúvel, causando assim aumento no nível de GMPc.

Nossos resultados ainda nos permitem sugerir que, na musculatura lisa vascular a elevação do nível de GMPc pode estar promovendo a fosforilação protéica via proteína quinase G, o que resultaria na ação vasorelaxamento produzida pelo poligodial. Outras evidências, também indicam que o relaxamento causado pela liberação de NO, e conseqüente aumento de GMPc em alguns tecidos, pode ocorrer pela ativação direta ou indireta dos canais de  $K^+$  ou pela liberação do EDHF do endotélio vascular (Bolotina *et al.*, 1994; Garland *et al.*, 1995; ; Koh *et al.*, 1995; Robertson *et al.*, 1993).

Para testar a hipótese se a ativação dos canais de  $K^+$  está envolvida no relaxamento causado pelo poligodial, foram realizados experimentos utilizando vasos de coelho e de cobaia com endotélio, na ausência e na presença de diferentes bloqueadores de canais de  $K^+$  como a glibenclamida, bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP (Brayden *et al.*, 1996); TEA, bloqueador não seletivo de canais de  $K^+$  (Huang *et al.*, 1993), 4-aminopiridina, bloqueador de canais de  $K^+$  dependentes de voltagem (Brayden *et al.*, 1996), caribdotoxina, bloqueador de canais de  $K^+$  sensíveis ao cálcio de alta condutância e apamina, bloqueador de canais de  $K^+$  sensíveis ao cálcio de baixa condutância (Brayden *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 1985; Romey *et al.*, 1984). No entanto, estes bloqueadores de canais de  $K^+$  falharam em antagonizar as respostas relaxantes induzidas pelo

poligodial na artéria pulmonar de cobaia e aorta torácica de coelho. Com base nesses resultados, podemos sugerir que o efeito vasorelaxante induzido pelo poligodial nesses vasos, parece não envolver a ativação de canais de  $K_{ATP}$ ,  $K_{Ca}$  ou canais  $K_v$ . No entanto na artéria pulmonar de coelho somente TEA e glibenclamida inibiram parcialmente, mas significativamente a ação do poligodial, sugerindo que uma pequena parte do relaxamento endotélio-dependente causado pelo poligodial parece ser mediada pelos canais  $K_{ATP}$ .

O fato do TEA e a glibenclamida terem inibido o vasorelaxamento apenas em artéria pulmonar de coelho, pode estar relacionado com a espécie do animal utilizado, e também com a quantidade desses canais nesses tecidos, uma vez que a propriedade dos canais  $K_{ATP}$  varia de um tecido para outro (Quayle *et al.*, 1997).

Mediante os resultados obtidos, indicando que o vasorelaxamento induzido pelo poligodial estaria ocorrendo pela ativação da via L-arginina/NO/GMPc, resolvemos investigar a possibilidade do poligodial estar agindo sobre receptores situados na membrana de células endoteliais. O relaxamento endotélio-dependente observado na musculatura lisa vascular pode ocorrer quando agonistas tais como; acetilcolina, ATP, ADP, substância P, serotonina, trombina, bradicinina e outros (Furchgott *et al.*, 1980; Lüscher *et al.*, 1990) ativam receptores próprios situados na membrana das células endoteliais. Essa ativação causa um aumento nos níveis de  $IP_3$  que por sua vez, podem contribuir para o aumentar  $Ca^{2+}$  no citoplasma. seguido pela interação com  $Ca^{2+}$ /calmodulina e ativação da eNOS (Brusse *et al.*, 1993; Vanhoutte *et al.*, 1995). Verificamos que os antagonistas tanto de receptores muscarínicos quanto receptores para



substância P (NK1 e NK2) e de bradicinina ( $B_2$ ) não alteraram significativamente o relaxamento induzido pelo poligodial em artéria pulmonar de coelho, demonstrando assim, que o vasorelaxamento induzido pelo poligodial não está ocorrendo por uma ativação desses receptores específicos na membrana de células endoteliais.

Em outra série de experimentos, foi investigada a suposta participação dos canais de  $Ca^{2+}$  situados na membrana da célula endotelial e também na musculatura lisa vascular. Wang *et al.*, (1999) demonstraram que a rutaecarpina, um alcalóide isolado da *Evodia rutaecarpa*, produz aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular em culturas de células endoteliais, através da ativação do influxo de  $Ca^{2+}$ , possivelmente via canais de  $Ca^{2+}$ . Este alcalóide, também foi capaz de reduzir a concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular através da inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  e liberação de  $Ca^{2+}$  do estoque intracelular na musculatura lisa vascular. No entanto, nossos resultados demonstram que o poligodial não parece interferir com o influxo de  $Ca^{2+}$  na célula endotelial, nem inibindo o influxo de  $Ca^{2+}$  na musculatura lisa vascular, uma vez que a curva cumulativa concentração-resposta para o  $CaCl_2$  na artéria pulmonar de coelho com e sem endotélio não foi alterada na presença do poligodial.

A  $PGI_2$  também causa relaxamento na musculatura lisa vascular por estimular a adenilato ciclase, e aumentar os níveis de AMPc (Parsaee *et al.*, 1992). No entanto, nossos resultados sugerem que a liberação de  $PGI_2$  do endotélio não tem nenhuma participação importante na resposta vasorelaxante induzida pelo poligodial na artéria pulmonar de coelho, uma vez que a indometacina (inibidor de cicloxigenase) falhou em afetar essa resposta.

Considerando uma possível interação entre a guanilato ciclase solúvel e a adenilato ciclase (Lincoln e Cornwell, 1991), nós também avaliamos se o relaxamento causado pelo poligodial poderia estar relacionada com a ativação de AMPc. No entanto, esse parece não ser o caso, uma vez que o inibidor seletivo de proteína quinase A (KT 5720), aparentemente, não teve efeito no relaxamento produzido pelo poligodial.

Procurando ainda, melhor esclarecer o mecanismo de ação envolvido no vasorelaxamento causado pelo poligodial, investigamos também a possível participação de neuropeptídeos neste efeito. Alguns autores têm demonstrado que neuropeptídeos vasoativos como a substância P, CGRP ou o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) estão presentes nos nervos de alguns vasos, produzindo dilatação em vasos contraídos. O efeito periférico do CGRP tem sido estudado usando preparações isoladas do sistema cardiovascular. Esse peptídeo produz vasodilatação em vasos coronarianos de rato, coelho, porco, vaca e homem (Beny *et al.*, 1989; Greenberg *et al.*, 1987; Marshall *et al.*, 1986), bem como em vaso cerebral e artéria mesentérica de rato, cobaia, coelho, gato e homem (Hanko *et al.*, 1985; Marshall *et al.*, 1986, 1988). Tem sido demonstrado também que a vasodilatação neurogênica é seletivamente abolida pela depleção do CGRP, um potente neuropeptídeo vasodilatador. Corboz *et al.* (1998) também demonstraram que os receptores para taquicinina NK<sub>1</sub> estão presentes em artéria pulmonar humana e que a estimulação desses receptores induz vasodilatação. No entanto, o relaxamento induzido pelo poligodial, na artéria pulmonar de coelho, não foi afetado pela presença de CGRP-8,37, um antagonista de receptor para CGRP.

Em outra série de experimentos, foi analisado o efeito relaxante induzido pelo poligodial no corpo cavernoso de coelho, e também sua relação com a via do NO e GMPc. Neste contexto, há trabalhos na literatura descrevendo experimentos com preparações de corpos cavernosos, as quais descrevem a existência de inervação NANC, que é responsável pela maior parte do efeito relaxante causado pelo NO neste tecido (Burnett *et al.*, 1992; Holmquist *et al.*, 1991; Ignarro *et al.*, 1990; Hayashida *et al.*, 1996; Vizzard *et al.*, 1994) pela via NO/GMPc. Por sua vez, o comprometimento fisiológico desta via nitrérgica pode induzir a graves disfunções de ereção peniana. Estas alterações funcionais podem ser revertidas com a utilização de drogas que aumentam o sinal de transdução da via NO/GMPc (Jeremy *et al.*, 1997). É importante ressaltar ainda que o efeito de relaxamento ocasionado pelo NO é decorrente do acúmulo de GMPc, e subsequente ativação de canais de  $K^+$ , os quais induzem a hiperpolarização da membrana celular, produzindo o relaxamento tecidual.

Na busca de novas terapias para o tratamento das disfunções eréteis, alguns produtos naturais vêm apresentando resultados bastante promissores, sendo que muitos apresentam suas ações mediadas pelo aumento dos níveis de NO. Como por exemplo, o alcalóide beriberi, uma benzodiazolizina, causa um efeito relaxante no corpo cavernoso de coelho, por estimular a liberação de NO e a ativação de canais de  $K^+$  (Chiou *et al.*, 1998). Além disso, tem sido demonstrado que outros produtos derivados de plantas e toxinas, como o ginsenoside extraído da *Panax ginseng* (Chen e Lee, 1995) e o veneno do *Tityus serrulatus* (Teixeira *et al.*, 1998) causam relaxamento do corpo cavernoso de coelho por liberar NO. Nossos resultados obtidos demonstram que o poligodial,

no corpo cavernoso de coelho, promove um relaxamento concentração-dependente, com uma potência e relaxamento máximo muito semelhante ao causado pela acetilcolina e pelo NPS.

Este relaxamento evidenciado no corpo cavernoso de coelho, também não diferiu significativamente do relaxamento induzido pelo poligodial nos vasos estudados. Porém o poligodial não causou dessensibilização neste tecido, como evidenciado nos vasos. Esta ausência de dessensibilização observada após a realização da curva cumulativa concentração-resposta de relaxamento para o poligodial no corpo cavernoso de coelho, pode estar ocorrendo porque neste tecido, o NO pode ser liberado tanto do endotélio sinusoidal como de nervos dilatadores autonômicos do tecido cavernoso, que promovem relaxamento do músculo liso trabecular pela elevação dos níveis de GMPc (Andersson, 1993; Holmquist *et al.*, 1991; Rajfer *et al.*, 1992).

O fato de não observarmos dessensibilização induzida pelo poligodial no corpo cavernoso de coelho, abre grandes perspectivas para o aproveitamento do poligodial como uma nova droga no tratamento da impotência sexual.

Nossos resultados também sugerem que o poligodial pode estar produzindo relaxamento no corpo cavernoso de coelho, possivelmente pela via NO/GMPc, uma vez que o LY 83583 inibiu significativamente esse efeito relaxante. Porém, os mecanismos de relaxamento ativados pelo poligodial no corpo cavernoso de coelho ainda está sendo melhor investigado.

Em resumo, nossos resultados indicam que este sesquiterpeno poligodial produziu relaxamento de maneira dependente e independente de endotélio vascular nas artérias pulmonares de coelho e cobaia e na aorta torácica de

coelho. Além disso, o poligodial também causou um relaxamento no corpo cavernoso de coelho muito semelhante ao produzido pelo NPS e pela acetilcolina. O relaxamento induzido pelo poligodial parece ser largamente mediado pela liberação de NO ou substância relacionada com NO do endotélio vascular, por um mecanismo dependente da ativação da guanilato ciclase e do aumento dos níveis de GMPc. Nossos resultados ainda demonstram que o relaxamento induzido pelo poligodial no corpo cavernoso de coelho também pode estar ocorrendo via NO/GMPc. No entanto, a abertura de canais de  $K_{Ca}$ ,  $K_v$ , ou  $K_{ATP}$  parece não estar participando na ação vasorelaxante induzida pelo poligodial em artéria pulmonar de cobaia e aorta torácica de coelho. Porém, na artéria pulmonar de coelho, a abertura de canais  $K_{ATP}$ , parece estar contribuindo, pelo menos em parte, para o relaxamento promovido pelo poligodial. Nossos resultados também demonstram que liberação de  $PGI_2$ , substância P ou CGRP ou a ativação da adenilato ciclase, não estão aparentemente envolvidos na ação vasorelaxante do poligodial nos vasos estudados. Finalmente, o efeito vasorelaxante induzido pelo poligodial não envolve o aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  nas células endoteliais, ou sua diminuição na musculatura lisa vascular ou ainda uma ativação direta de receptores de membranas nas células endoteliais.

Os vários efeitos apresentados pelo poligodial, tanto nos estudos *in vivo* (Mendes *et al.*, 1998, Tratsk *et al.*, 1997) como nos *in vitro* (El Sayah *et al.*, 1998), demonstram claramente que esse composto possui várias atividades de interesse farmacológico que podem ser de grande importância no desenvolvimento de novas drogas oriundas de produtos naturais. Sterner e Azallase (1999) sugeriram

que o poligodial e substâncias naturais relacionadas podem constituir uma atraente alternativa para desenvolver uma nova classe de drogas de interesse clínico, denominados agora de agonistas de receptores vanilóides.

Com base nos nossos resultados aqui apresentados, sugerimos que esse composto, além de apresentar uma variedade de caminhos envolvidos tanto no processo doloroso como em processos inflamatórios, pode agora também ser de grande relevância no desenvolvimento de uma nova substância vasodilatadora.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEAGBO, A.S.O.; MALIK, K.U. Mechanism of vascular action of prostacyclin in the rat isolated perfused mesenteric arteries. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 252: 26-34, 1990.
- ANDERSSON, K-E. The pharmacology of lower urinary tract smooth muscle and penile erectile tissues. **Pharmacol. Rev.**, 45: 253-308, 1993.
- ANDERSSON, K-E.; HEDLUND, H.; FOVAEUS, M. Interactions between classical neurotransmitters and some neuropeptides in human penile erectile tissues. In: Nobin A, Owman, C.; Arneklo-Nobin, B, eds. **Neuronal messengers in vascular function**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 505-524. 1987.
- APPEL, H.; BROOKS, C.J.W.; OVERTON, K.H. The constitution and stereochemistry of drimenol, a novel bicyclic sesquiterpenoid. **J. Chem. Soc.**, 673: 3322-3332, 1959.
- APPEL, H.; DOHR, R. Terpenos del canelo chileno III. **Scientia**, 25: 135-142, 1958.
- ARCHER, S. L.; HUANG, J. M. C.; HAMPL, V.; NELSON, D. P.; SHULTZ, P. J.; WEIR, E. K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by cGMP-kinase-dependent activation of a charybdotoxin-sensitive K channel. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 91: 7583-7587, 1994.
- ARCHER, S. L.; HUANG, J. M.; HAMPL, V.; NESLON, D. P.; SHULTZ, P. J.; WEIR, E. K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 7573-7587, 1994.
- ARMSTEAD, W.M. Role of nitric oxide and cAMP in prostaglandin-induced pial arterial vasodilatation. **Am. J. Physiol.**, 268: H1436- H1440, 1995.

- BALAZY, M.; KAMINSKI, P.M.; MAO, K.; TAN, J.; WOLIN, M.S. S-Nitroglutathione, a product of the reaction between peroxynitrite and glutathione that generates nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, 273: 3209-3215, 1998.
- BALLARD, S.A.; GINGELL, C.J.; TANG, K.; TURNER, L.A.; PRICE, M.E.; NAYLOR, A.M. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. **J. Urol.**, 159: 2164-2171, 1998.
- BARBIER, A.J.; LEFEBVRE, R. A. Effect of LY 83583 on relaxation induced by non-adrenergic non-cholinergic nerve stimulation and exogenous nitric oxide in the rat gastric fundus. **Eur. J. Pharmacol.**, 219: 331-334, 1992,
- BEAVO, J.A.; cGMP inhibition of heart phosphodiesterase: is it clinically relevant? **J. Clin. Invest.**, 95: 445, 1995.
- BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite; implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 87: 1620-1624; 1990.
- BENY, J.L.; BRUNET, P.C.; HUGGEL, H. Effects of substance P, calcitonin gene-related peptide and capsaicin on tension and membrane potential of pig coronary artery in vitro. **Regul. Pept.**, 25: 25-36, 1989
- BLATTER, L. A.; WIER, W. G. Nitric oxide decreases  $[Ca^{2+}]_i$  in vascular smooth muscle by inhibition of calcium current. **Cell. Calcium.**, 15: 122-131, 1994.
- BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 368: 850-853, 1994.



- BOLTON, T.B.; LANG, J.; TAKEWAKI, T. Mechanism of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J. Physiol.*, 351: 549-572, 1984.
- BOULANGER, C.; VANHOUTTE P.M. Ouabain, Na<sup>+</sup>-free and K<sup>+</sup>-free solution and relaxations to nitric oxide and nitrovasodilators. *Gen. Pharmacol.*, 22: 673-683, 1997.
- BRAYDEN, J.E. Potassium Channel in vascular smooth muscle. *Clin Exp. Pharmacol. Physiol.*, 23: 1069-1076, 1996.
- BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 682-685, 1990.
- BREDT, D.S.; WANG, P.M. H; GLATT, C.E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R.R.; SNYDER, S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome p-450 reductase. *Nature*, 351: 714-718, 1991.
- BROWN, G.D. Drimenol, a sesquiterpene from *Drymis winteri*. *Phytochemistry*, 35: 975-977, 1994.
- BURNETT, A.L.; LOWENSTEIN, C.J.; BREDT, D.S.; CHANG, T.C.K.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiological mediator of penile erection. *Science*, 257: 401-403, 1992.
- BURNETT, A.L.; TILLMAN, S.L.; CHANG, T.S.; EPSTEIN, J.I.; LOWENSTEIN, C.J.; BREDT, D.S.; SNYDER, S.H.; WALSH, P.C. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J. Urol.*, 150: 73, 1993.
- BUSSE, R.; MULSC, A.; FLEMINGI, HECKER, M. Mechanisms of nitric oxide release from the vascular endothelium. *Circulation*, 87: V18-V25, 1993.

- CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A. Herbal medicine catuama induces endothelium-dependent and independent vasorelaxant action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. *Phytother. Res.*, 11: 32-38, 1997.
- CAMPOS, A.H.; CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the contractile responses of kinins in rat portal vein rings: mediation by B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 268: 902-909, 1994.
- CAPRIOLI, V.; CIMINO, G.; COLLE, R.; GAVAGNIN, M.; SODANO, G., SPINELLA, A.; .Insect antifeedant activity and hot taste for humans of selected natural and synthetic 1,4-dialdehydes. *J. Nat. Prod.*, 50: 146-151, 1987.
- CARL, A. KENYON, J.L.; UEMURA, N.; FUSETANI, N.; SANDERS, K.M. Regulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by protein kinase A and phosphatase inhibitors. *Am. J. Physiol.*, 261: C387-C392, 1991.
- CATTERALL, W. A.; SNUTCH, T. P.; THOMSEN, W.; ROSSIE, S. Structure and modulation of voltage-gated ion channels. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 625: 174-180, 1991.
- CHEN, G.; SUZUKI, H.; WESTON, A. H. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br. J. Pharmacol.*, 95: 1165-1174, 1988.
- CHEN, XIU.; LEE, T.J-F. Ginsenosides-induced nitric oxide-mediated relaxation of the rabbit corpus cavernosum. *Br. J.Pharmacol.*, 115: 15-18, 1995.
- CHERRY, P.D.; FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V.; JOTHIANANDAN, D.; The role of endothelial cells in the relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 2105-2110, 1982.

- CHERRY, P. D.; OSMAR, H. A.; FARRELL, K. A.; STUART, J. S.; WOLIN, M. S.;  
Superoxide anion inhibits cGMP-associated bovine pulmonary arterial  
relaxation. **Am. J. Physiol.**, 259: H1056-H1062, 1990.
- CHIOU, WEN-FEN.; CHEN, J.; CHEN, C-F. Relaxation of corpus cavernosum and  
raised intracavernous pressure by berberine in rabbit, **Br. J. Pharmacol.**, 125:  
1677-1684, 1998.
- CHUANG, A. T.; STRAUSS, J. D.; STEERS, W. D.; MURPHY, R. A. cGMP mediates  
corpus cavernosum smooth muscle relaxation with altered cross-bridge  
function, **Life Sci.**, 63: 185-194 1998.
- CLAPP, L.; DAVEY, R.; GURNEY, A. M. ATP –sensitive K<sup>+</sup> channels mediate  
vasodilatation produced by lemakalim in rabbit pulmonary artery. **Am. J.  
Physiol.**, 264: H1907-H1915, 1993.
- CLAPP, L.; GURNEY, A. M. ATP –sensitive K<sup>+</sup> channels regulates resting potential  
of pulmonary arterial smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, 262: H916-H920,  
1992.
- COOK, N. S.; HAYLETT, D. G. Effects of apamin, quinidine and neuromuscular  
blockers on calcium-activated potassium channels in guinea-pig hepatocytes.  
**J. Physiol. Lond.**, 358: 373-375, 1985.
- CORBOZ, M. R.; RIVELLI, M. A.; RAMOS, S. I.; RIZZO, C. A. HEY, J. A. Tachykinin  
NK<sub>1</sub> receptor-mediated vasorelaxation in human pulmonary arteries. **Eur. J.  
Pharmacol.**, 350: R1-R3, 1998.
- CORTES, M. M.; OYARZUN, M. L. Tadeonal and isotadeonal from *Drymis winteri*.  
**Fitoterapia**, 52: 33-35, 1981.

- CRANE, B. R.; ARVAI, A. S.; GACHHUI, R.; WU, C.; GHOSH, D. K.; GETZOFF, E. D.; STUEHR, D. J.; TAINER, J. A. The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. **Science**, 278: 425-431, 1997.
- CRUZ, A.; SILVA, M. Further terpenoids and phenolics of *Drymis winteri*. **Phytochemistry**, 12: 2549-2550, 1973.
- DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Nitric oxide in neurodegeneration. **Prog. Brain Res.**, 118: 215-229, 1998.
- DE MEY, J.G.; VANHOUTTE, P.M. Heterogeneous behaviour of the canine arterial and venous wall. **Circ Res.**, 51: 439-447, 1982.
- EDWARDS, G.; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor – a critical appraisal. **Prog. Drug Res.**, 50: 109-133, 1998.
- EL SAYAH, M.E.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A.; PINHEIRO, T.R.; CALIXTO, J.B. Action of polygodial, a sesquiterpene isolated from *Drymis winteri*, in the guinea-pig ileum and trachea *in vitro*. **Eur. J. Pharmacol.**, 344: 215-221, 1998.
- FELETOU, M.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 23: 1082-90, 1996.
- FERON, O.; MICHEL, J.B.; SASE, K.; MICHEL, T.; Dynamic regulation of endothelial nitric oxide synthase: complementary roles of dual acylation and caveolin interactions. **Biochemistry**, 37: 193-200, 1998b.
- FERON, O.; SALDANHA, F.; MICHEL, J.B.; MICHEL, T. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. **J. Biol. Chem.**, 273: 3125-3128, 1998a

- FICUS, R.R. Molecular mechanisms of endothelium-mediated vasodilation. In: Seminars in Thrombosis and Hemostasis - Supplement. New York: Thieme, 1988.
- FLEMING, W.W.; WESTFALL, D.P.; DE LA LANDE, I.S.; JELLETT, L.B. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 181: 339-343, 1972.
- FORSBY, A.; WALUM, E.; STERNER, O. The effect of six sesquiterpenoid unsaturated dialdehydes on cell membrane permeability in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Chem Biol Interact.**, 84: 85-95, 1992
- FORSBY, A.; WALUM, E. Polygodial induces inositol phosphate turnover in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Neurosci Lett.**, 217: 50-41, 1996.
- FORSBY, A.; WITT, R., WALUM, E. Sesquiterpenoid unsaturated dialdehydes increase the concentration of intracellular free Ca<sup>2+</sup> in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Nat. Toxins**, 2: 89-95, 1994.
- FREW, J.D.; PAISLEY, K.; MARTIN, W. Selective inhibition basal but not agonist-stimulated activity of nitric oxide in rat aorta by N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 1003-1008, 1993.
- FURCHGOTT, R.F. The role of endothelium in the response of vascular smooth muscle to drugs. **Ann. Ver. Pharmacol. Toxicol.**, 24:175-197, 1984.
- FURCHGOTT, R.F.; JOTHIANANDAN, D. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. **Blood Vessels**, 28: 52-61, 1991.

- FURCHGOTT, R.F.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB J.**, 3: 2007-2018,1989.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADSKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the arterial smooth muscle to acetylcholine. **Nature**, 88: 373-376,1980.
- FURUKAWA, K.; OHSHIMA, N.; TAWADA-IWATA, Y; SHIGEKAWA, M. Cyclic GMP stimulates  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. **J. Biol. Chem.**, 266: 1237-1241, 1991.
- GARG, U.C.; HASSID. A. Nitric oxide decreases cytosolic free calcium in Balb/c 3T3 fibroblasts by a cyclic GMP-independent mechanism. **J.Biol. Chem.**, 266: 9-12, 1991.
- GARLAND, C.J.; PLANE, F.;KEMP, B.K.; COCKS, T.M. Endothelium-dependent hyperpolarization: A role in the control of vascular tone. **Trends Pharmacol. Sci.**, 16: 23-3, 1995.
- GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C.L.; NIELSEN, E.B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1one. **Mol. Pharmacol.**, 48: 184-188, 1995.
- GODFRAIND, T. EDRF and cyclic GMP control gating of receptor-operated calcium channels in vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, 126: 341-343, 1986.
- GORSKY, L.D.; FORSTERMANN, U.; ISHII, K.; MURAD, F. Production of an EDRF-like activity in the cytosol of N1E-115 neuroblastoma cells. **FASEB J.**, 4: 1494-500, 1990.

- GREENBERG, B.; RHODEN, K.; BARNES, P. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is a potent non-endothelium-dependent inhibitor of coronary vasomotor tone. *Br J Pharmacol.*, 92: 789-794, 1987.
- GUPTA, M. **270 Plantas Mediciniais Iberoamericanas**, Convênio Andres Bello, Ed. Gupta, M., Colombia, p. 574-576, 1995.
- HANKO, J.; HARDEBO, J.E.; KAHRSTROM, J.; OWMAN, C.; SUNDLER, F. Calcitonin gene-related peptide is present in mammalian cerebrovascular nerve fibres and dilates pial and peripheral arteries. *Neurosci. Lett.*, 57: 91-95, 1985.
- HASHITANI, H.; SUZUKI, H.  $K^+$  channels which contribute to the acetylcholine-induced hyperpolarization in smooth muscle of the guinea-pig submucosal arterioles. *J. Physiol.*, 501: 319-329, 1997.
- HAYASHIDA, H.; FUJIMOTO, H.; YOSHIDA, K.; TOMOYOSHI, T.; OKAMURA, T.; TODA, N. Comparison of neurogenic contraction and relaxation in canine corpus cavernosum and penile artery and vein. *Jpn. J. Pharmacol.*, 72: 231-240, 1996.
- HEDLUND, P.; HOLMQUIST, F.; HEDLUND, H.; ANDERSSON, K.E. Effects of nicorandil on human isolated corpus cavernosum and cavernous artery. *J. Urol.*, 151: 1107-1113, 1994.
- HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antimicrobial agents from *Licaria puchuri*-major and their synergistic effect with polygodial. *J Nat Prod.*, 55: 620-625, 1992.
- HIRATA, M.; KOHSE, H. P.; CHANG, C. H.; IKEBE, T.; MURAD, F. Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and

- cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 265: 1268-1273, 1990.
- HOBBS, A.J. HIGGS, A.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39: 191-220, 1999.
- HOLMQUIST F, ANDERSSON KE, FOVAEUS M, HEDLUND H. K(+)-channel openers for relaxation of penile erectile tissue. In **Proceedings of the International Society for Impotence Research**, p. 148, Boston, MA, 1988.
- HOLMQUIST. F.; HEDLUND. H.; ANDERSSON, K.E. L-NG-nitro arginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of human isolated corpus cavernosum. *Acta Physiol. Scand.*, 141: 441-442, 1991.
- HOUGHTON, P. J.; MABY, J. Medicinal plants of the Mapuche. *J. Ethno Pharmacol.*, 13: 89-103, 1985.
- HUANG, J.C.; GARCIA, M.L.; REUBEN, J.P.; KACSOROWSK, G.J. Inhibition of beta-adrenoceptor agonist relaxation of airway smooth muscle by  $Ca^{+2}$ -activated  $K^{+}$  channel blockers. *Eur. J. Pharmacol.*, 235: 37-43, 1993.
- HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. The mechanisms and significance of the coupled release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) and prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) from endothelial cells. *Wien Klin Wochenschr.*, 103: 422-434, 1991.
- IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9265-9269, 1987.
- IGNARRO, L. J.; DEGNAN, J. N.; BARICOS, W. H.; KADOWITZ, P. J.; WOLIN, M. S. Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme.



- Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. **Biochem. Biophys. Acta**, 718: 49-59, 1982.
- IGNARRO, L.J.; BUSH, P.A.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; FUKUTO, J.M.; RAJFTER, J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 170: 843-850, 1990.
- ISHII, K.; CHANG, B.; KERWIN, J.F.; HUANG, Z.-J.; MURAD, F. N<sup>W</sup>-nitro-L-arginine: a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. **Eur. J. Pharmacol.**, 176: 219-223, 1990.
- ITOH, T.; ITO, S.; SHAFIQ, J.; SUZUKI, H.; Effects of a newly synthesized K<sup>+</sup> channel opener, Y-26763, on noradrenaline-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. **Br. J. Pharmacol.**, 111: 165-172, 1992.
- JEREMY, J.Y.; BALLARD, S. A.; NAYLOR, A.M.; MILLER, M. A. ANGELINI, G.D. Effects of sildenafil, a type-5 cGMP phosphodiesterase inhibitor, and papaverine on cyclic GMP and AMP levels in the rabbit corpus cavernosum in vitro. **Br. J. Urol.**, 79: 958-63, 1997.
- KATAYAMA, Y. Nitric Oxide: Mysterious Messenger. **Dojindo Newsletter** No 1, 1995.
- KENNEDY, I.; COLEMAN, R. A.; HUMPHREY, P.P. A.; LEVY, G.P.; LUMLEY, P. Studies on the characterisation of prostanoid receptors: a proposed classification. **Prostaglandins**, 24: 667-689, 1982.

- KOGA, T., YOSHIDA, Y., CAI, J.Q., ISLAM, M.O.; IMAI, S. Purification and characterization of 240-kDa cGMP-dependent protein kinase substrate of vascular smooth muscle: close resemblance to inositol 1,4,5 -triphosphate receptor. **J. Biol. Chem.**, 269: 11640-11647, 1994.
- KOH, S.D.; CAMPBELL, J.D.; CARL, A.; SANDERS, K.M. Nitric oxide activates multiple potassium channels in canine colonic smooth muscle. **J. Physiol.**, 489: 735-743, 1995.
- KOMALAVILAS, P.; LINCOLN, T.M. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem.**, 269: 8701-8707, 1994.
- KONTOS, H. A.; ENOCH, P. Hydroxyl radical-dependent inactivation of guanylate cyclase in cerebral arterioles by methylene blue and by LY 83583. **Stroke**, 24: 427- 434, 1993.
- KUBO, I.; TANIGUCHI, M. Polygodial, na antifungal potentiator. **J. Nat. Prod.**, 51: 22-29, 1988.
- KUMAGAI, Y.; MIDORIKAWA, K.; NAKAI, Y.; YOSHIKAWA, T.; KUSHIDA, K.; HOMMA-TAKEDA, S.; SHIMOJO, N. Inhibition of nitric oxide formation and superoxide generation during reduction of LY 83583 by neuronal nitric oxide synthase. **Eur. J. Pharmacol.**, 360: 213-218, 1998.
- LANG, D.; LEWIS, M.J. Endothelium-derived relaxing factor inhibits the formation of inositol triphosphate by rabbit aorta. **J. Physiol.**, 411: 45-52, 1989.
- LEE, S.H.; LEE, J.R.; LUNDE, C.S.; KUBO, I. In vitro antifungal susceptibilities of *Candida albicans* and other fungal pathogens to polygodial, a sesquiterpene dialdehyde. **Planta Med.**, 65: 204-208, 1999.

- LINCOLN, T. M.; CORNWELL, T.L. Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. **Blood Vessels**, 28: 129-137, 1991.
- LINCOLN, T.M. Effects of nitroprusside and 8-bromo-cyclic GMP on the contractile activity of the rat aorta. **J. Pharmacol. Exper. Ther.**, 224: 100-107, 1983.
- LUE, T.F. Physiology of erection and pathophysiology of impotence. In: WALSH, P.C.; RETIK, A.B.; STAMEY, T.A.; VAUGHAN, E.D. **Campbell's Urology**, 6 ed. W.B. Saunders Co.: Philadelphia, pp. 709-728, 1992.
- LUE, T.F.; TANAGHO, E.A. Physiology of erection and pharmacological management of impotence. **J. Urol.**, 137: 828-836, 1987.
- LUO, D.S.; DAS VINCENT, R.R. Effects of methylene blue and LY83583 on neuronal nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase. **Eur. J. Pharmacol.**, 290: 247-245, 1995.
- LÜSCHER, T.F.; VANHOUTTE, P.M. The endothelium: Modulator of cardiovascular function. **Boca Raton**, CRC Press, 1990.
- MARSHALL, I.; AL-KAZWINI, S.J.; HOLMAN, J.J.; CRAIG, R.K.; Human and rat alpha-CGRP but not calcitonin cause mesenteric vasodilatation In rats. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 26: 691-695, 1988.
- MARSHALL, I.; AL-KAZWINI, S.J.; ROBERTS, P.M.; SHEPPERSON, N.B.; ADAMS, M.; CRAIG, R.K. Cardiovascular effects of human and rat CGRP compared in the rat and other species. **Eur. J. Pharmacol.**, 123: 207-216, 1986.
- MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends Biochem. Sci.**, 477-481, 1997.

- MAYER, B.; KLATT, P.; WERNER, E. R.; SCHMIDT, K. Kinetics and mechanism of tetrahydrobiopterin-induced oxidation of nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, 270: 655-659, 1995.
- MCCALL, T.; VALLANCE, P. Nitric oxide takes centre-stage with newly defined roles. **Trends Pharm. Sci.**, 13: 1-6, 1992.
- MCCALLION, R.F.; COLE, A.L.; WALKER, J.R.; BLUNT, J.W.; MUNRO, M.H. Antibiotic substances from New Zeland plants. II. Polygodial, na anti-Candida agents frpm *Pseudowintera colorata*. **Planta Med.**, 44: 134-138, 1982.
- MCDANIEL, N.L.; CHEN, X.L.; SINGER, H.A.; MURPHY, R.A.; REMBOLD, C.M. Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing  $[Ca^{+2}]_i$  and uncoupling stress from myosin phosphorylation. **Am. J. Physiol.**, 263: C461-C467, 1992.
- MCLEOD, K.M.; NG, D.D.W.; HARRIS, K.H.; DIAMOND, J. Evidence that cGMP is mediator of endothelium-dependent inhibition of contractile responses of rat arteries to  $\alpha$ -adrenoceptor stimulation. **Mol. Pharmacol.**, 32: 59-64, 1987.
- MENDES, G.L.; SANTOS, A.R.; MALHEIROS, A. FILHO, V.C.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 292: 164-172, 2000.
- MENDES, G.L.; SANTOS, A.R.S.; CAMPOS, M.M.; TRATSK, K.S.; YUNES, R.A.; Cechinel-Filho, V., Calixto, J.B. Anti-hyperalgesic properties of the extract and the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of *Drimis winteri* (Winteraceae). **Life Sciences**, 63: 369-381, 1998.

- MINAMI, K.; FUKUZAWA, K.; NAKAYA, Y.; ZENG, X.R.; INOUE, I. Mechanism of the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel by cyclic AMP in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. **Life Sci.**, 53: 1129-1135, 1993.
- MOMBOULI, J.V.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. **Trends Pharmacol. Sci.**, 18: 252-256, 1997.
- MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R.J., BUNTING, S., VANE, J.R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, 263: 663-665, 1976.
- MONCADA, S.; FLOWER, R.J.; VANE, J.R. In: **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Gilman, A.G.; Goodman, L.S.; Rall, T.W.; MURAD, F.; EDS. 7<sup>th</sup> Edn., pp.660-673, Macmillan, New York, 1985.
- MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, 329: 2002-2012, 1993.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43: 109-142, 1991.
- MORGAN, R. O.; NEWBY, A.C. Nitroprusside differentially inhibits ADP-stimulated calcium influx and mobilization in human platelets. **Biochem. J.**, 258: 447-454, 1989.
- MORTON, J.F. Atlas of medicinal plants in middle America-Bahamas to Yucatan. Charles C. Thomas (ed.), 219, **Springfield, USA**, 1981 .
- MÜLSCH, A. LUCKHOFF, A.; POHL, U.; BUSSE, R.; BASSENGE, E. LY 83583 (6-anilino-5,8-quinolinedione) blocks nitrovasodilator-induced cyclic GMP

- increases and inhibition of platelet activation, **Nanyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 340: 119, 1989.
- MÜLSCH, A.; BUSSE, S.; LIEBAU.; FORSTERMANN, U. LY83583 interferes with the release of endothelium-derived relaxing factor and inhibits soluble guanylate cyclase. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 247: 283-288, 1988.
- MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilatation. **J. Clin. Invest.**, 78: 1-5, 1996.
- MURAD, F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. **Angew. Chem. Int.**, 38: 1856-1868, 1999.
- NAGAO, T.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and endothelium-dependent relaxations. **Am.J.Respir. Cell. Moll. Biol.**, 8: 1-6, 1993.
- NEGISHI, M.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A. Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. **Biochem. Biophys. Acta.**, 1259: 109-120, 1995.
- NELSON, M.T.; PATLAK, J.B.; WORLEY, J.F.; STANDEN, N.B. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle cell tone. **Am. J. Physiol.**, 259: C3-C18, 1990.
- NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, 268: C799-C822, 1995.
- OKABE, K.; KITAMURA, K.; KURIYAMA, H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. **Pflugers Arch.**, 409: 561-568, 1987.

- PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526, 1987.
- PARKINGTON, H.C.; TONTA, M.A.; COLEMAN, H.A.; TARE, M. Role of membrane potential in endothelium-dependent relaxation of guinea-pig coronary arterial smooth muscle. *J.Physiol.*, 484: 469-480, 1995.
- PARSAEE, H.; MCEWAN, J.R.; JOSEPH, S.; MACDERMOT. Differential sensitivities of the prostacyclin and nitric oxide biosynthetic pathways to cytosolic calcium in bovine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, 107: 1013-1019, 1992.
- PIERCE, K. L.; GIL, D.W.; WOODWARD, D.F.; REGAN, J.W. Cloning of human prostanoid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 16: 253-256, 1995
- POPESCU, L.M.; PANOIU, C.; HINESCU, M.; NUTU, O. The mechanism of cGMP-induced relaxation in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, 197: 393-394, 1985.
- QUAYLE, J.M.; NELSON, M.T.; STANDEN, N.B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol. Rev.*, 77: 1165-1232, 1997.
- RAJFER, J.; ARONSON, W.J.; BUSH, P.A, DOREY, F.J.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide as a mediator of the corpus cavernosum in response to noradrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N. Engl. J. Med.*, 326: 90-94, 1992.
- RAND, M.J.; LI, C.G.; **Nitric oxide in the autonomic and enteric nervous system.** In: *Nitric Oxide in the Nervous System*, Vincent, S. (ed) pp. 227-279. San Diego, Academic Press. 1995

- RAPOPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B. E.; MURAD, F. Endothelium-dependent vasodilator -and nitrovasodilator-induced relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP- dependent protein phosphorylation. **Trans. Assoc. Am. Phys.**, 96: 19-30, 1983b.
- RAPOPORT, R.M. Cyclic guanosine monophosphate inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidylinositol hydrolysis in rat aorta. **Circ. Res.**, 48: 407-410, 1986.
- RAPOPORT, R.M.; MURAD F. Cyclic AMP may produce vascular relaxation by inhibition of inositol triphosphate generation in rat aorta. **Circ. Res.**, 61: 265-272, 1986.
- RAPOPORT, R.M.; MURAD, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated though cGMP. **Circ. Res.**, 52: 352-357, 1983a.
- RICCIERI, T.M.N. Bibliografia de plantas medicinais. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1: 224, 1981.
- ROBERTSON, B.E.; SCHUBERT, R.; HESCHELER, J.; NELSON, M.T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, 265: C299-C303, 1993.
- ROMEY, G.; HUGHES, M.; SCHIMID-ANTOMARCHI, H.; LAZDUNSKI, M. Apamin: a specific toxin to study a class of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels. **J. Physiol. Lond.**, 79: 259-264, 1984.
- RUBANYI G.M.; VANHOUTTE, P.M. Potassium-free solution prevents the action but not the release of endothelium-derived relaxing factor (s). **Eur.J.Pharmacol.**, 145: 351-355, 1988.



- SAENZ DE TEJADA, I.; BLANCO, R.; GOLDSTEIN, I.; AZADZOI, K.; DE LAS MORENAS, A.; KRANE, R.J.; COHEN, R.A. Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. I. Responses of isolated tissue. **Am. J. Physiol.**, 254: H459-H467, 1988.
- SAENZ DE TEJADA, I.; KIM, N.; LAGA, I.; KRANE, R.J.; GOLDSTEIN, I. Regulation of adrenergic activity in penile corpus cavernosum. **J. Urol.**, 142: 1117-1121, 1989.
- SAENZ DE TEJADA, I.; MOROUKIAN, P.; TESSIER, J.; KIM, J.J.; GOLDSTEIN, I.; FROHRIB, D. The trabecular smooth muscle modulates the capacitor function of the penis. Studies on a rabbit model. **Am. J. Physiol.**, 260: H1590-H1595, 1991.
- SAMUELSSOM, G.; FARAH, M.H.; CLAESON, P.; HAGOS, M.; THULIN, M.; HEDBERG, O.; WARFA, A.M.; HASSAN, A. O.; ELM, A.H.; ABDURAHMAN, A.D. Inventory of plants used in traditional medicine in Somalia III. Plants of the families Lauraceae-Papilionaceae. **J. Ethnopharmacol.**, 37: 93-112, 1992.
- SCHMIDT, H.H.H.W. NO, CO and OH endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors. **FEBS Lett.**, 307: 102-107, 1992.
- SCHMIDT, H.H.H.W.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, M.; GORSKI, L.D.; FÖRSTERMANN, U.; MURAD, F. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating factor synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, 88: 365-369, 1991.
- SCHRAMMEL, A.; BEHREND, S.; SCHMIDT, K.; KOESLING, D.; MAYER, B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-

- site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylate cyclase. **Mol. Pharmacol.**, 50: 1-5, 1996.
- SCHUBERT, R., SEREBRYAKOV, V.N.; ENGEL, H.; HOPP, H.H. Iloprost activates  $K_{Ca}$  of vascular smooth muscle cells: role of cAMP-dependent protein kinase. **Am. J. Physiol.**, 271: C1203-C1211, 1996.
- SCHUBERT, R.; SEREBRYAKOV, V.N.; MEWES, H, HOPP, H.H. Iloprost dilates rat small arteries: Role of  $K_{ATP}$  and  $K_{Ca}$  channels activation by cAMP-dependent protein kinase. **Am. J. Physiol.**, 272: H1147-H1156, 1997.
- SCIVOLETTO, R.; CARVALHO, M.H.C. Cardionatrin causes vasodilation in vitro which is not dependent on the presence of endothelial cells. **Eur. J. Pharmacol.**, 101: 143-145, 1984.
- SEFTEL, A.D.; VIOLA, K.A.; KASNER, S.E.; GANZ, M.B. Nitric oxide relaxes rabbit corpus cavernosum smooth muscle via a potassium-conductive pathway. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 219: 382-387, 1996.
- SHAUL, P.W.; FARRAR, M. A.; MAGNESS, R.R. Prostacyclin synthesis and stimulation of cyclic AMP production in ovine fetal vasculature: heterogeneity in pulmonary and systemic arteries. **Develop. Pharmacol. Ther.**, 18: 89-99, 1992.
- SIEGEL, G.; CARL, A.; ADLER, A.; STOKE, G. Effect of the prostacyclin analogue iloprost on  $K^+$  permeability in the smooth muscle cells of the canine carotid artery. **Eicosanoids**, 2: 213-222, 1989.
- SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. Porto alegre: ed. Da UFRGS, 46-47, 1986.

- SIMONSEN, U.; PRIETO, D.; SANEZ DE TEJADA, I.; GARCIA-SACRISTAN, A.  
Involvement of nitric oxide in the non adrenergic non-cholinergic  
neurotransmission of horse deep penile arteries: role of charybdotoxin-  
sensitive K(+)-channels. **Br. J. Pharmacol.**, 116: 2582-2590, 1995.
- SOUTHAM, E.; GARTHWAITE, J. The nitric oxide-cyclic GMPc signalling  
pathway in rat brain. **Neuropharmacology**, 32: 1267-1277, 1993.
- STANDEN, N.B.; QUALY, J.M. K<sup>+</sup> channel modulation in arterial smooth muscle.  
**Acta Physiol. Scand.**, 164: 549-557, 1998.
- STERNER, OLOV.; SZALLASI, A.; Novel natural vanilloid receptor agonists: new  
therapeutic targets for drugs development. **Trends Pharmacol. Sci.**, 20: 459-  
465, 1999.
- TAGUCHI, H.; HEISTAD, D. D. .; KITAZONO, T.; FARACI, F.M. Dilatation of  
cerebral arterioles in response to activation of adenylate cyclase is dependent  
on activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels. **Circ. Res.**, 76: 1057-1062,  
1995.
- TAMAOKI, J., CHIYOTANI, A., TAKEYAMA, K., YAMAUCHI, F.; TAGAYA, E.;  
KONNO, K. Relaxatin and inhibition of contractile response to electrical field  
stimulation by Beraprost sodium in canine airway smooth muscle.  
**Prostaglandins**, 45: 365-373, 1993.
- TARPEY, M.M.; BECKMAN, J.S.; ISCHIROPOULOS, H.; GORE, J.Z.; BROCK, T.  
A. Peroxynitrite stimulates vascular smooth cell cyclic GMP synthesis. **FEBS  
Lett.**, 364: 314-318, 1995.

- TEIXEIRA, C.E.; BENTO, A.C.; LOPES-MARTINS, R. A.B.; TEIXEIRA, S.A.; EICKESTEDT, V.V.; MUSCARÁ, M.N.; ARANTES, E.C.; GIGLIO, J.R.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the rabbit isolated corpus cavernosum and involvement of NANC nitreergic nerve fibres. **Br. J.Pharmacol.**, 123: 435-442, 1998.
- TRAISH, A.M.; CARSON, M.P.; KIM, N.; GOLDSTEIN, I.; SAENZ DE TEJADA, I. Characterization of muscarinic acetylcholine receptors in the human penile corpus cavernosum: studies on whole tissue and cultured endothelium. **J. Urol.**, 144: 1036-1040, 1990.
- TRATSK, K.S.; CAMPOS, M.M.; VAZ, Z.R.; CECHINEL-FILHO, V.C.; SCHLEMPER, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Anti-airlgic effects and oedema inhibition caused by the extract of *Drymis winteri*. **Inflamm. Res.**, 46: 509-514, 1997.
- VANHOUTTE, P.M.; BOULANGER, C.M. Endothelium-dependent responses in hypertension. **Hypertens Res.**, 18: 87-98, 1995.
- VARGAS, H.M.; CUEVAS, J.M.; IGNARRO, L.J.; CHAUDHURI, G. Comparison of the inhibitory potencies of N<sup>G</sup>-nitro- and N<sup>G</sup>- amino-L-arginine on EDRF function in the rat: evidence for continuous basal EDRF release. **J.Pharmacol. Exper. Ther.**, 257: 1208-1215, 1991.
- VIZZARD, M.A.; ERDMAN, S.L.; FORSTERMANN, U.; DE GROAT, W.C. Differential distribution of nitric oxide synthase in neural pathways to the urogenital organs (urethra, penis, urinary bladder) of the rat. **Brain Res.**, 646: 279-291, 1994.

- WALCH, LAURENCE.; LABAT, C.; GASCARD, J-P.; DE MONTPREVILLE, V.; BRINK, C.; NOREL, X. Prostanoid receptors involved in the relaxation of human pulmonary vessels. **Br. J. Pharmacol.**, 126: 859-866, 1999.
- WALDRON, G.J.; DONG, H.; COLE, W.C.; TRIGGLE, C.R. Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle: role for a non-nitric oxide synthase product. **Acta Pharmacol. Sin.**, 17: 3-7, 1996.
- WANG, G.J.; WU, X.C.; CHEN, C.F.; LIN, L.C.; HUANG, Y.T.; SHNA, J.; PANG, P.K.T. Vasorelaxing action of rutaecarpine: effects of rutaecarpine on calcium channel activities in vascular endothelial and smooth muscle cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 289: 1237-1244, 1999.
- WILLIAMS, D.L.; KATZ, G.M.; ROY-COSTANCIN, L.; RUBIN, J.P. Guanosine 5'-monophosphate modulates gating of high-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels in vascular smooth muscle cells. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 85: 9360-9364, 1988.
- WOLF, G. Nitric Oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization. **Histol. Histopathol.**, 12: 251-261, 1997.
- ZYGMUNT, P.M.; BRUNDEMAR, L.; HÖGESTÄTT, E.D. E.D. Endothelium-dependent relaxation resistant to  $N^W$ -nitro-L-arginine in the rat hepatic artery and aorta. **Acta Physiol. Scand.**, 152: 107-114 1994.