



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos
Órgãos e Sistemas



Participação dos canais “*Transient Receptor Potential* -
TRP” nos efeitos cardiovasculares induzidos por carvacrol
em ratos com Hipertensão essencial

Aluna: Milena Ramos Reis

Orientadora: Darizy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos

Co-orientadora: Josmara Bartolomei Fregoneze

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos
e Sistemas

Participação dos canais “*Transient Receptor Potential* -
TRP” nos efeitos cardiovasculares induzidos por carvacrol
em ratos com Hipertensão essencial

Milena Ramos Reis

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas do ICS/UFBA como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, sob orientação da Prof^a. Dr^a Darízy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos

Resumo

O carvacrol, um monoterpene fenólico encontrado nos óleos essenciais de diversas plantas do gênero *Origanum*, já demonstrou causar hipotensão e vasodilatação em diferentes leitos vasculares de ratos normotensos, porém, seu efeito em ratos hipertensos ainda não foi elucidado. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos cardiovasculares do carvacrol em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e comparar com normotensos Wistar, utilizando ensaios farmacológicos *in vitro* (estudos funcionais e celulares) e *in vivo*. Nos ensaios funcionais *in vitro*, anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais hipertensos e normotensos foram pré-contraídos com FEN (1 μ M) e o efeito de carvacrol (10⁻⁸-10⁻³M) foi observado. Em SHR, este monoterpene induziu vasodilatação dependente de concentração (pD₂=5,13 \pm 0,05; E_{máx}=115,14 \pm 5,46%; N=8) e, após a remoção do endotélio funcional, a potência da droga foi alterada significativamente (pD₂=4,91 \pm 0,05 N=9; p<0,01), sugerindo que a resposta vasodilatadora induzida por carvacrol, provavelmente, envolve uma via dependente e outra independente do endotélio vascular, porém, esta última parece ser a majoritária e, por isso, os ensaios seguintes foram realizados na ausência do endotélio vascular. Interessantemente, quando comparada com animais normotensos, a potência farmacológica de carvacrol foi reduzida significativamente (pD₂=4,91 \pm 0,05; N=9; p<0,05). Em anéis de ratos hipertensos, carvacrol reduziu o influxo de Ca²⁺ por canais Ca_v tipo-L, SOC e ROC, estes resultados foram semelhantes aos obtidos em ratos normotensos. Em ratos hipertensos, mas não em normotensos, a potência farmacológica do carvacrol em anéis pré-contraídos com FEN e na presença de diferentes inibidores de canais TRP (íon Gd³⁺, 10⁻⁵M; 2-APB, 10⁻⁶M ou 10⁻⁵M; BCTC, 2 μ M; 9-fenantrol, 10⁻⁵M; ou HC03003-1, 10⁻⁵M), foi reduzida em relação ao controle na ausência destes bloqueadores, sugerindo que os canais sensíveis à estes bloqueadores (TRPC1-7, TRPM2, M4 e TRPM8, TRPV1 e TRPA1), provavelmente, estão participando dos efeitos vasculares mediados por carvacrol e podem estar envolvidos no processo hipertensivo. Em estudos de *patch-clamp* em células de artéria mesentérica dispersas de ratos hipertensos, carvacrol (300 μ M) reduziu as correntes de entrada de Ba²⁺ por Ca_v tipo-L e este efeito foi semelhante em ratos normotensos. Além disso, em células de ratos hipertensos, o Mg²⁺ (2,5mM), bloqueador do TRPM6 e TRPM7, reduziu as densidades de I_{TRPM} de entrada e saída, assim como carvacrol (100 μ M e 300 μ M), na ausência ou presença do 2-APB (100 μ M), bloqueador de TRPM7. A presença do 2-APB provocou inibição adicional nas densidades de I_{TRPM} pelo carvacrol (100 μ M, mas não 300 μ M). Altas concentrações intracelulares de Mg²⁺ reduziram a magnitude de I_{TRPM7}. Foi evidenciado que a I_{TRPM} no controle é menor em ratos hipertensos que em normotensos. Estes dados obtidos e os relatados na literatura são sugestivos para provável inibição de I_{TRPM7} por carvacrol em células mesentéricas nativas. O efeito anti-hipertensivo do carvacrol foi avaliado por administração via orogástrica (50mg/kg/dia) durante 20 dias foi capaz de reduzir a pressão arterial média dos animais SHR tratados, no 20º dia do tratamento. O tratamento subcrônico com carvacrol não alterou os pesos cardíaco e corpóreo, nem a reatividade vascular. Em conclusão, esses dados sugerem que carvacrol possui atividade anti-hipertensiva em animais SHR, que pode ser devido ao seu efeito vasodilatador em anéis de artéria mesentérica superior isolada, provavelmente, por inibição do influxo de Ca²⁺ por Ca_v tipo-L, ROC, SOC e/ou canais TRPC1, 3 ou 6, além da inibição de correntes tipo-TRPM7 em miócitos mesentéricos.

Palavras-chaves:

Hipertensão / Canais TRP / Produtos Naturais / Monoterpenos / Carvacrol / SHR / Patch-clamp / TRPM7 / Mesentérica

Abstract

The carvacrol, a phenolic monoterpene found in the essential oils of various plants of the genus *Origanum*, has been shown to cause vasodilation and hypotension in different vascular beds of normotensive rats, however, its effect in hypertensive rats has not yet been elucidated. The objective of this study was to investigate the cardiovascular effects of carvacrol in spontaneously hypertensive rats (SHR) and compare with normotensive Wistar, using pharmacological assay *in vitro* (functional and cell) and *in vivo*. In functional assays, mesenteric artery rings isolated from normotensive and hypertensive rats were pre-contracted with FEN (1 μ M) and the effect of carvacrol (10⁻⁸-10⁻³M) was observed. In SHR, the monoterpene induced concentration dependent vasodilation (pD₂=5.13 \pm 0.05, E_{max}=115.14 \pm 5.46%, N=8) and, after removal of the functional endothelium, the pharmacological potency of the drug was significantly changed (pD₂=4.91 \pm 0.05; N=9, p<0.01), suggesting that the vasodilation induced by carvacrol probably involves another vascular endothelium dependent and independent mechanism, however, the latter seems being the majority, and therefore, the following tests were performed with removed endothelium. Interestingly, when compared to normotensive animals, the pharmacological potency carvacrol was reduced significantly (pD₂ =4.91 \pm 0.05; N= 9, p<0.05). In rings of SHR, carvacrol reduced Ca²⁺ influx through L-type Ca_v, ROC and SOC channels, these results were similar to those obtained in normotensive rats. In hypertensive rats, but not in normotensive, the pharmacological potency of carvacrol in pre-contracted rings and in the presence of different inhibitors TRP channels (ion Gd³⁺, 10⁻⁵M, 2-APB, 10⁻⁶M or 10⁻⁵M; BCTC , 2 μ M; 9-fenanol, 10⁻⁵M, or HC03003-1, 10⁻⁵M) was reduced when compared to the control in the absence of these blockers, suggesting that these sensitive channels to blockers (TRPC1-7, TRPM2, M4 and TRPM8 , TRPV1 and TRPA1) probably are participating in the vascular effects mediated by carvacrol and may be involved in hypertension. In patch clamp studies, dispersed cells of mesenteric artery of hypertensive rats, carvacrol (300 μ M) reduced Ba²⁺ currents by Ca_v L-type and this effect was similar in normotensive rats. In addition, in myocytes of hypertensive rats, Mg²⁺ (2.5 mM), TRPM6 and TRPM7 blocker, reduced both inward and outward I_{TRPM} densities, as carvacrol (100 μ M and 300 μ M) in the absence or presence of 2-APB (100 μ M), TRPM7 blocker. The presence of 2-APB caused additional inhibition in densities of I_{TRPM} by carvacrol (100 μ M but not 300 μ M). High concentrations of intracellular Mg²⁺ reduced the magnitude of TRPM7-like current. It was shown that the I_{TRPM} in control is lower in hypertensive rats than in normotensive. These data obtained and reported in the literature are suggestive that carvacrol to inhibit I_{TRPM7} in native mesenteric cells. The antihypertensive effect of carvacrol was evaluated during 20 days by orogastric administration (50mg/kg/day). The monoterpene was able to reduce the media arterial pressure on the 20th day of treatment of SHR treated. The subchronic treatment with carvacrol did not change the heart and body weights, nor vascular reactivity. In conclusion, these data suggest that carvacrol possesses antihypertensive activity SHR, which may be due to its vasodilating effect on rings isolated mesenteric artery probably by inhibition of Ca²⁺ influx by Ca_v type-L, ROC SOC and/or TRPC1, 3 or 6 channels, besides inhibition in I_{TRPM7} myocytes mesenteric.

Key words:

Hypertension / Canais TRP / Natural Products / Monoterpenes / Carvacrol / SHR / Patch-clamp / TRPM7 / Mesenteric

Lista de Abreviaturas

ACh - acetilcolina

BK_{Ca} – canais para potássio sensíveis ao cálcio de grande condutância

Ca_v - canal de cálcio operado por voltagem

CMLV – célula muscular lisa vascular

CE₅₀ – concentração de uma substância que induz 50% do efeito máximo

CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CsCl – cloreto de céσιο

DAG – diacilglicerol

DC – débito cardíaco

DCV – doenças cardiovasculares

DMSO - dimetilsufóxido

E_{max} - efeito máximo induzido pela droga

FC – frequência cardíaca

FEN – fenilefrina

HA – hipertensão arterial

HEK - embrionária do rim humano

I_{Ba} – corrente de bário

I_{TRPM} - corrente tipo TRPM

I_{TRPM6/TRPM7} - corrente tipo TRPM6/TRPM7

I_{TRPM7} – corrente tipo TRPM7

IP₃ – trifosfato de inositol

IP₃R – receptor de trifosfato de inositol

KCl – cloreto de potássio

MSCC - canais de Ca²⁺ mecanosensíveis

MLV – músculo liso vascular

NaCl – cloreto de sódio

NCX - trocador Na⁺/Ca²⁺

NPS – nitroprussiato de sódio
PA - pressão arterial
PAM – pressão arterial média
PKC – proteína cinase C
PLC β - fosfolipase C β
RVPT – resistência vascular periférica total
ROC – canal de cálcio operado por receptor
RyR – receptor de rianodina
SSF - solução salina fisiológica
SHR – *spontaneously hypertensive rats*
SOC - canal de cálcio operado por estoque
STIM1 - molécula de interação estromal 1
TRP – *transient receptor potential*
TRPA1 - potencial receptor transiente anquirina
TRPC – potencial receptor transiente clássico
TRPM - potencial receptor transiente melastatina
TRPML - potencial receptor transiente muculipina
TRPP - potencial receptor transiente policistina
TRPV - potencial receptor transiente vanilóide
VES – volume de ejeção sistólico
WKY – rato wistar kyoto
2-APB – borato de 2-aminoetoxidifenil
[Ca²⁺]_c – concentração de cálcio citoplasmática
[Ca²⁺]_i – concentração de cálcio intracelular
[Mg²⁺]_i - concentração de magnésio intracelular

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

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura proteica dos canais para Ca^{2+} operados por voltagem (VOC ou Ca_v).....	18
Figura 2: Canais para Ca^{2+} nas células musculares lisas vasculares.....	20
Figura 3: Interação entre Orai1/STIM1 na regulação da entrada capacitativa de Ca^{2+}	22
Figura 4: Classificação das subfamílias dos canais TRP.....	23
Figura 5: Estrutura básica dos canais TRPs	24
Figura 6: Possíveis arranjos das subunidades de monômeros de TRPs em canais homo ou heterotetrâmeros funcionais com um poro central.....	25
Figura 7: Estrutura química do monoterpene carvacrol.....	31
Figura 8: Sistema de cubas e aquisição de dados de tensão isométrica para órgão isolado.....	43
Figura 9 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos de concentrações crescentes de carvacrol (10^{-8} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN ($1 \mu\text{M}$).....	44
Figura 10 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos de diferentes concentrações de carvacrol (10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) sobre o influxo de Ca^{2+} em anéis, sem endotélio funcional, de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	45
Figura 11 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos de diferentes concentrações de carvacrol (10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) sobre o influxo de Ca^{2+} por ROC e SOC em anéis, sem endotélio funcional, de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	47
Figura 12 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação dos canais TRP no efeito induzido por Carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertenso e normotenso, na ausência de endotélio funcional e pré-contraídos com FEN ($1 \mu\text{M}$).....	48
Figura 13 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da reatividade vascular dos animais submetidos ao tratamento subcrônico com carvacrol.....	50
Figura 14 - Aparato utilizado para obtenção dos registros eletrofisiológicos....	53
Figura 15 - Esquema representativo mostrando o protocolo experimental para avaliação do efeito de carvacrol ($300 \mu\text{M}$) sobre as correntes de Ba^{2+} , em miócitos da artéria mesentérica superior de rato SHR e Wistar.....	54

Figura 16 - Esquema representativo mostrando o protocolo experimental para avaliação do efeito de carvacrol (100µM e 300 µM) sobre as correntes tipo-TRPM6/TRPM7, em miócitos da artéria mesentérica superior de animal SHR e Wistar. Correntes filtradas em 2,9 kHz e digitalizadas a 10 kHz. De -100 mV a + 100 mV, com 200 ms de duração.....	55
Figura 17 – Efeito vasodilatador induzido por carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	59
Figura 18 - Efeito de carvacrol sobre o influxo de Ca ²⁺ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato hipertenso e normotenso.....	60
Figura 19 - Efeito de carvacrol sobre o influxo de Ca ²⁺ por ROC e SOC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato hipertenso e normotenso.....	61
Figura 20 - Influência do Vermelho de Rutênio (VR), um bloqueador não-seletivo dos canais TRPV1, TRPV5, TRPV6, TRPC3, TRPA1 e TRPM6, nos efeitos vasculares induzidos por carvacrol.....	62
Figura 21 - Influência do íon gadolínio (Gd ³⁺), um bloqueador não seletivo dos canais TRPC1, 3, 6 e 7 nos efeitos vasculares induzidos por carvacrol.....	63
Figura 22 - Influência do 2-Aminoetoxidifenilborato (2-APB), um bloqueador não seletivo dos canais TRPC4-7 e o TRPM7 e 8, nos efeitos vasculares induzidos por carvacrol.....	64
Figura 23 - Influência do 2-Aminoetoxidifenilborato (2-APB), um bloqueador não seletivo dos canais TRPM2, nos efeitos vasculares induzidos por carvacrol.....	65
Figura 24 - Influência do BCTC, um bloqueador não seletivo dos canais TRPV1 e TRPM8, nos efeitos vasculares induzidos por carvacrol.....	66
Figura 25 - Influência do 9-fenantrol, um bloqueador seletivo do canal TRPM4, nos efeitos vasculares induzidos por carvacrol.....	67
Figura 26 - Influência do HC03003-1, um bloqueador seletivo do canal TRPA1, nos efeitos vasculares induzidos por carvacrol.....	68
Figura 27 - Sumário dos resultados dos ensaios funcionais em artéria mesentérica.....	69
Figura 28 - Traçado representativo mostrando o efeito de carvacrol (300µM) sobre correntes de Ba ²⁺ por Ca _v tipo-L.....	71
Figura 29 - Efeito de carvacrol sobre as correntes de Ba ²⁺ em animais hipertensos e normotensos.....	71
Figura 30 - Efeito de carvacrol (na presença ou ausência de 2-APB) e de Mg ²⁺ sobre I _{TRPM6/TRPM7} , durante a rampa de voltagem de -100mV à + 100mV,	

durante 200ms, em miócitos vasculares de animais hipertensos e normotensos.....	73
Figura 31 - Efeito de carvacrol (na presença ou na ausência de 2-APB) e de Mg^{2+} sobre a densidade de corrente tipo-TRPM6/TRPM7, em -80mV ou +80mV, em miócitos vasculares de animais hipertensos e normotensos.....	74
Figura 32 - Efeito de carvacrol (na presença ou na ausência de 2-APB) e de Mg^{2+} sobre $I_{TRPM6/TPM7}$ (alta $[Mg^{2+}]_i$), em miócitos vasculares de animais hipertensos e normotensos.....	78
Figura 33 - Efeito de carvacrol (na presença ou na ausência de 2-APB) e de Mg^{2+} sobre a densidade de corrente por TRPM6/TRPM7 (alta $[Mg^{2+}]_i$), em -80mV e +80mV, em miócitos vasculares de animais hipertensos e normotensos.....	78
Figura 34 – Sumário dos resultados dos ensaios eletrofisiológicos em miócitos isolados de artéria mesentérica.....	81
Figura 35 - Efeito sobre a Pressão Arterial Média (PAM) do tratamento oral com carvacrol (50 mg/kg) em animais SHR por um período de 20 dias.....	81
Figura 36 - Efeito do tratamento oral com carvacrol sobre o peso cardíaco (mg/100g de peso corpóreo) de animais SHR tratados durante 20 dias.....	82
Figura 37 - Efeito do tratamento subcrônico de carvacrol sobre o peso corporal absoluto de animais SHR tratados por 20 dias..	83
Figura 38 - Reatividade vascular à FEN e ao NPS em anéis mesentéricos de animais SHR submetidos ao tratamento subcrônico com veículo ou carvacrol durante 20 dias.....	84

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Origem da nomenclatura das subfamílias dos canais TRP.....	24
Tabela 2 - Expressão (RNA _m e/ou proteína) dos diferentes subtipos de canais TRPs na vasculatura.....	26
Tabela 3 - Composição da solução de Tyrode.....	37
Tabela 4 - Composição da solução de Tyrode nominalmente sem Ca ²⁺	38
Tabela 5 - Composição da solução de Tyrode despolarizante – KCl 60 mM.....	38
Tabela 6 - Composição da solução de Tyrode despolarizante – KCl 60 mM, nominalmente sem Ca ²⁺	38
Tabela 7 - Composição da solução SSF-Normal.....	39
Tabela 8 - Composição da solução SSF-Baixo Ca ²⁺	39
Tabela 9 - Composição da solução interna da pipeta utilizada para medir as correntes de Ba ²⁺	40
Tabela 10 - Composição da solução externa utilizada para medir correntes de Ba ²⁺	40
Tabela 11 - Composição da solução externa utilizada para medir correntes tipo-TRPM6/TRPM7.....	40
Tabela 12 - Composição da solução interna da pipeta utilizada para medir correntes tipo-TRPM6/TRPM7.....	41
Tabela 13 - Composição da solução interna da pipeta utilizada no ensaio de alta [Mg ²⁺] _i	41
Tabela 14 - Relação entre os bloqueadores de TRP utilizados nos ensaios <i>in vitro</i> e, os seus respectivos canais bloqueados.....	49
Tabela 15 - Ensaios realizados para medir correntes tipo-TRPM6/TRPM7.....	56
Tabela 16 - Efeito vasorelaxante de carvacrol em contrações induzidas por fenilefrina (FEN, 1µM).....	69
Tabela 17A - Valores de densidade de I _{TRPM6/TRPM7} com [Mg ²⁺] _i = 0mM, em ratos hipertensos.....	75
Tabela 17B - Valores de densidade de I _{TRPM6/TRPM7} com [Mg ²⁺] _i = 0mM, em ratos normotensos.....	76
Tabela 18 - Valores de densidade de I _{TRPM7} com [Mg ²⁺] _i = 2mM, em ratos hipertensos e normotensos.....	79

Sumário

1 Introdução	13
1.1 Sistema cardiovascular e Hipertensão arterial.....	13
1.2 Contratilidade vascular e canais para Ca^{2+}	16
1.3 Canais TRP.....	22
1.4 Monoterpeno e Carvacrol.....	30
2 Objetivos	34
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Específicos.....	45
3 Material	36
3.1 Animais.....	36
3.2 Substâncias utilizadas.....	36
3.3 Sais utilizados.....	37
3.4 Soluções utilizadas.....	37
3.4.1 Soluções utilizadas nos ensaios funcionais <i>in vitro</i>	37
3.4.2 Soluções utilizadas na preparação das CMLVs.....	39
3.4.3 Soluções utilizadas nos protocolos experimentais eletrofisiológicos.....	40
4 Métodos	41
4.1 Ensaios farmacológicos <i>in vitro</i> funcionais.....	41
4.1.1 Preparação dos tecidos vasculares.....	42
4.1.2 Protocolos experimentais utilizando artéria mesentérica de ratos hipertensos e normotentos.....	43
4.1.3 Avaliação da reatividade vascular de artéria mesentérica de ratos hipertensos após tratamento subcrônico com carvacrol.....	49
4.2 Ensaios <i>in vitro</i> eletrofisiológicos.....	50
4.2.1 Preparação dos miócitos vasculares.....	51
4.2.2 Registros eletrofisiológicos.....	51
4.2.3 Protocolos experimentais utilizando miócitos vasculares de ratos hipertensos e normotentos.....	54
4.3 Ensaios farmacológicos <i>in vivo</i>	57
4.3.1. Investigação do potencial anti-hipertensivo do carvacrol em animais SHR.....	56
4.4 Análise Estatística.....	57
5 Resultados	59
5.1 Efeitos farmacológicos <i>in vitro</i> induzidos por carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos e normotensos.....	59
5.1.1 Efeito vasodilatador induzido por carvacrol em anéis mesentéricos.....	59
5.1.2 Efeito de carvacrol sobre o influxo de Ca^{2+} em anéis mesentéricos, mantidos em meio despolarizante e nominalmente sem Ca^{2+}	60
5.1.3 Efeito de carvacrol sobre o influxo de Ca^{2+} por ROC e SOC em anéis mesentéricos.....	61
5.1.4 Influência do Vermelho de Rutênio (VR) na resposta vasodilatadora induzida por carvacrol em anéis mesentéricos.....	62
5.1.5 Influência do íon gadolínio (Gd^{3+}) na resposta vasodilatadora induzida por carvacrol em anéis mesentéricos.....	63
5.1.6 Influência do 2-Aminoetoxidifenilborato (2-APB) na resposta vasodilatadora induzida por carvacrol em anéis mesentéricos.....	64

5.1.7	Influência do 2-Aminoetoxidifenilborato (2-APB) na resposta vasodilatadora induzida por carvacrol em anéis mesentéricos.....	65
5.1.8	Influência do BCTC na resposta vasodilatadora induzida por carvacrol em anéis mesentéricos.....	66
5.1.9	Influência do 9-fenantról na resposta vasodilatadora induzida por carvacrol em anéis mesentéricos.....	67
5.1.10	Influência do HC03003-1 na resposta vasodilatadora induzida por carvacrol em anéis mesentéricos.....	68
5.2	Efeitos farmacológicos <i>in vitro</i> induzidos por carvacrol em células musculares lisas isoladas de mesentérica superior isolada de ratos hipertensos e normotensos.....	70
5.2.1	Efeito de carvacrol sobre os Ca _v em miócitos mesentéricos.....	70
5.2.2	Efeito de carvacrol sobre correntes tipo TRPM6/TRPM7 em miócitos mesentéricos.....	72
5.3	Efeitos do tratamento subcrônico <i>in vivo</i> com carvacrol em animais SHR.....	81
5.3.1	Efeito do tratamento orogástrico com carvacrol sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos hipertensos.....	81
5.3.2	Efeito do tratamento subcrônico com carvacrol sobre o peso cardíaco de animais SHR.....	82
5.3.3	Efeito do tratamento subcrônico com carvacrol sobre o peso corpóreo de animais SHR.....	83
5.3.4	Efeito do tratamento subcrônico com carvacrol sobre a reatividade vascular de animais SHR.....	84
6	Discussão	86
7	Conclusões	99
	Referências.....	100

Introdução

1 Introdução

1.1 Sistema Cardiovascular e Hipertensão Arterial

A pressão arterial (PA) é regulada pela ação integrada entre os sistemas renal, neural, endócrino e cardiovascular. O sistema cardiovascular exerce uma das funções mais complexas do sistema biológico, que é fornecer e manter o fluxo sanguíneo suficiente aos diversos tecidos do organismo, segundo suas necessidades metabólicas. Este sistema é o principal responsável pela regulação e manutenção da pressão arterial média (PAM) (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; PUSGLEY; TABRIZCHI, 2000; SVENNINGSEN et al., 2014).

A PAM é determinada por variações em parâmetros cardíacos e vasculares, tais como o débito cardíaco (DC) e/ou a resistência vascular periférica total (RVPT), respectivamente. Desta forma, os níveis pressóricos são determinados pela equação: $PAM = DC \times RVPT$, a qual representa a interação entre estas duas variáveis hemodinâmicas (COWLEY, 2006). As ações de drogas ou modulações fisiológicas podem influenciar um ou ambos os parâmetros.

O DC, uma das variáveis que determina a PAM, é determinado pelo produto do volume de ejeção sistólica (VES) pela frequência cardíaca (FC) e é expresso pela equação $DC = VES \times FC$, sendo definido como a quantidade de sangue bombeado pelo coração a cada minuto (COWLEY, 2006). Por outro lado, a RVPT é o somatório do fluxo sanguíneo determinado pelo diâmetro dos vasos, especialmente, os arteriais (OASTES et al., 2003).

O tônus vascular, estado contrátil das artérias de pequeno calibre e arteríolas, é regulado pela interação entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras circulantes, tais como: hormônios circulantes (Ex: angiotensina II), neurotransmissores (Exs: noradrenalina e acetilcolina), fatores derivados do endotélio (Exs: endotelina e tromboxano), sinais elétricos e/ou físicos, como a tensão da parede vascular (JACKSON, 2000; CRIBBS, 2006). Com isso, pode-se dizer que o tônus e a reatividade vasculares à estas diferentes substâncias e sinais podem ser consideradas os maiores

determinantes da RVPT. Portanto, alterações dos sistemas de controle do DC e da RVPT podem provocar mudança nestes parâmetros fisiológicos, e, conseqüentemente, alterações na PA, como as encontradas na hipertensão arterial (HA) (FIRTH et al., 2007).

Segundo as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, a HA pode ser classificada como hipertensão primária ou essencial e hipertensão secundária ou adquirida. A hipertensão essencial é a mais comum e caracteriza-se por elevação da pressão sanguínea, sem causa aparente, e está associada a vários fatores de risco, tais como o consumo elevado de álcool, a predisposição genética, o sedentarismo e a obesidade (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010). Enquanto que, na hipertensão secundária, a causa é identificável e passível ou não de correções, e pode ser expressa como: hipertensão arterial renovascular, hipertensão arterial por excesso de mineralocorticoides (hiperaldosteronismo), por excesso de glicocorticoides (síndrome de Cushing) e por excesso de catecolaminas (feocromocitoma) (CARVALHO, 1996).

No Brasil, as doenças cardiovasculares (DCV) têm sido a principal causa de morte. Em 2007, ocorreram 308.466 óbitos por doenças do aparelho circulatório, e 1.157.509 internações por DCV no Sistema Único de Saúde (SUS), ocasionando custos médicos e socioeconômicos elevados. Segundo o DATASUS, em novembro de 2009 ocorreram 91.970 internações por DCV, resultando em um custo de R\$ 165.461.644,33 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010).

Em 2012, 17,5 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares (DCV) no mundo, representando 31% de todas as mortes globais, sendo que mais de 75% do total destas mortes ocorreram em países em desenvolvimento (OMS, 2015). Nestes países, a HAS se tornou uma preocupação crescente de saúde pública, com uma prevalência estimada de 37,3%, em comparação com 22,9% em nações industrializadas (PICON et al., 2012).

A HA é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de PA, e pelo aumento da resistência vascular periférica, devido às anormalidades no músculo liso e no endotélio vasculares,

e às mudanças na estrutura e na função dos vasos sanguíneos que causam o aumento do tônus vascular, como o aumento da vasoconstrição e a redução da vasodilatação (DOGGREL; BROWN, 1998; TAHVANAIMEN et al., 2006). A HA está associada à interação de fatores genéticos e ambientais, e à várias condições patológicas, tais como: hipertrofia ventricular, disfunção endotelial, síndrome metabólica, estado pró-coagulativo, estresse oxidativo, inflamação, dentre outras (JULIUS, 2007).

Além disso, a HA é considerada um dos fatores de risco mais prevalente para doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, tais como doença cardíaca coronariana, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral, doença renal em estágio terminal e doença vascular periférica (ELLIOTT, 2007; ROGER et al, 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano, são registradas milhões de mortes no mundo por doenças cardiovasculares e uma alta frequência de internações hospitalares devido às complicações clínicas relacionadas a estas patologias.

Dessa forma, como a HA apresenta prognóstico para DCV, ela pode ser considerada um importante problema de saúde pública mundial, o que ressalta a importância de estudos com drogas potencialmente úteis para o tratamento desta patologia tão prevalente no Brasil e no mundo.

Devido a todos estes problemas decorrentes da hipertensão descritos, foram desenvolvidos modelos para o estudo da hipertensão em animais, com o intuito de elucidar mecanismos e facilitar o controle clínico da HA. Atualmente, existem modelos de animais hipertensos que foram desenvolvidos com o objetivo de estudar os fatores responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da hipertensão essencial (PINTÉROVÁ; KUNES; ZICHA, 2011).

A linhagem isogênica de ratos espontaneamente hipertensos (*spontaneously hypertensive rats* - SHR) foi desenvolvida por Okamoto e Aoki (1963), em Kyoto, no Japão, e é o resultado do cruzamento entre irmãos (ratos Wistar-Kyoto), com pressão elevada, sem modificações na dieta ou alterações de estímulos ambientais destes animais, resultando em 100% de progênie com hipertensão espontânea, ou seja, ratos naturalmente portadores de hipertensão, em 100% dos descendentes (OKAMOTO et al., 1966). Desde então, vários especialistas relatam que a linhagem SHR é um excelente

modelo para o estudo da hipertensão essencial (TRIPPODO; FROHLICH, 1981; KUNDU; RAO, 2008).

A HA em animais SHR evolui de maneira gradual, apresentando similaridades com a hipertensão em seres humanos, como o período pré-hipertensivo, seguido pelas fases de desenvolvimento e de hipertensão sustentada (BELL et al., 2004). As mudanças pressóricas na linhagem de ratos SHR iniciam-se com o avanço da idade, e a causa deste aumento da pressão sanguínea ainda é questão de diversos estudos. Foi demonstrado que, no estágio inicial da hipertensão em SHR, há aumento do DC, com manutenção dos níveis normais de RVPT. Com o progresso do estado hipertensivo, o DC retorna a valores normais e, posteriormente, ocorre o aumento sustentado da RVPT (AMENTA; TULLIO; TOMASSONI, 2003).

É importante ressaltar que, este aumento sustentado na RVPT em SHR é uma das características que motiva a escolha destes animais para os ensaios funcionais *in vitro* realizados neste trabalho. Além disso, estudos na literatura mostram que, em SHR, a PA aumenta progressivamente e por volta de 5 a 6 semanas de idade a PAS pode atingir valores entre 180 e 200 mmHg, e caracteriza a fase sustentada da hipertensão. A partir desta fase, os SHR apresentam algumas alterações cardiovasculares, como as hipertrofias cardíaca e vascular, e disfunção endotelial (BING et al., 2002; CONRAD, 1995; KUNDU; RAO, 2008).

1.2 Contratilidade vascular e canais para Ca^{2+}

Uma das causas da HA é o aumento da contratilidade da célula muscular lisa vascular (CMLV), que pode ocorrer, dentre outros fatores, por alterações na estrutura e função dos canais iônicos localizados na membrana celular. Estes canais são proteínas transmembranares que exercem um importante papel no acoplamento excitação-contração dos músculos liso e cardíaco e funcionam como moduladores do potencial de membrana (KEVIN; NELSON, 2005).

Cada uma dessas proteínas de canal tem suas próprias características, tais como: permeabilidade e condutância a diferentes íons, mecanismos de

fechamento e abertura, resposta à agonistas e antagonistas típicos, bem como dependência de voltagem. Os canais iônicos podem ser ativados de maneira direta, por voltagem ou ligação à ligantes, ou indiretamente, por meio de cascata de eventos de sinalização molecular e produção de segundos mensageiros (MINKE; COOK, 2002; MONTELL, 2005).

A regulação da resposta contrátil do músculo liso é dependente, dentre outros fatores, do aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), que ocorre como resultado da liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares, do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular, ou de ambos (ADAMOVA; OZKAN; KHALIL, 2009; SOMLYO; SOMLYO, 1994). O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ facilita a interação do complexo Ca^{2+} -Calmodulina, que sofre alteração conformacional e ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). A MLCK ativada fosforila a cadeia leve da miosina, o que favorece o deslizamento dos filamentos de actina sobre os de miosina, provocando o ciclo das pontes cruzadas e a contração do músculo liso (JOHNSON; SNYDER, 1995; WYNNE; CHIAO; WEBB, 2009).

A literatura relata que, nas células musculares lisas, diversos canais iônicos são de extrema importância para a regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (THORNELOE; NELSON, 2005). Dentre as várias vias que levam ao aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), os principais canais para Ca^{2+} envolvidos neste processo são: os canais localizados na membrana plasmática - os sensíveis à voltagem (Ca_v) e os canais catiônicos não seletivos (tais como: os canais TRP, ROC e SOC); e os encontrados na membrana do retículo sarcoplasmático (RS) – os receptores de rianodina e os receptores de trifosfato de inositol (IP_3), canais que levam a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (LEDOUX et al., 2006).

Nas CMLVs, os canais para Ca^{2+} operados por voltagem (VOC ou Ca_v) são considerados a maior via de influxo de Ca^{2+} e consistem em um grande complexo multimérico. Como pode ser observado na Figura 1, os Ca_v são compostos por uma subunidade proteica α_1 central, formadora do poro do canal, e outras subunidades auxiliares menores (β , $\alpha_2\delta$ e em alguns tecidos γ) (LACINOVA, 2005). A subunidade α_1 apresenta quatro domínios homólogos (I-IV), cada um contendo seis segmentos transmembranares em α -hélice (S1-S6). O segmento S4 de cada domínio contém um sensor de voltagem que

contém resíduos de aminoácidos (lisina e arginina) carregados positivamente, além de conter sítios de regulação para segundos mensageiros e fármacos. Enquanto que, entre os segmentos S5 e S6, contêm quatro resíduos de aminoácidos (glutamato) na parte extracelular do poro, que formam o filtro de seletividade iônica, o que confere a alta seletividade do canal para o íon Ca^{2+} (YU; CATTERALL, 2004; SONKUSARE et al., 2006).

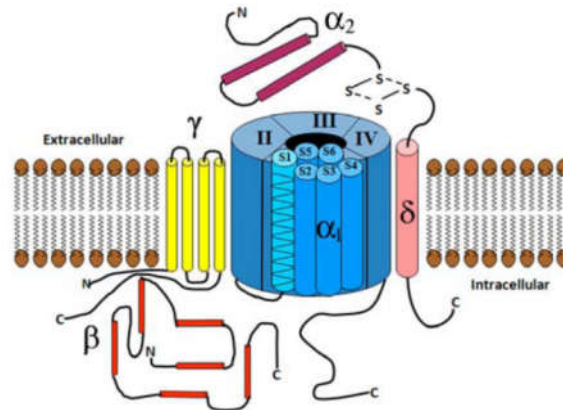


Figura 1: Estrutura proteica dos canais para Ca^{2+} operados por voltagem (VOC ou Ca_v)
 FONTE: GURKOFF et al., 2013

É bem descrito na literatura que dez genes humanos codificam a subunidade α_1 formadora do poro do Ca_v . A diversidade eletrofisiológica e farmacológica dos Ca_v é primariamente originada da existência de múltiplas subunidades α_1 . Os Ca_v se agrupam em três subfamílias distintas: canais Ca_v1 (1.1 – 1.4), que conduzem correntes tipo-L; canais Ca_v2 (2.1 – 2.3), que conduzem correntes tipo-N, P/Q e R; e os canais Ca_v3 (3.1 – 3.3), que conduzem correntes tipo-T (ERTEL et al., 2000; LACINOVÁ, 2005; LIPSCOMBE; HELTOM; XU, 2004; YU; CATTERALL, 2004).

As CLMVs expressam dois tipos de Ca_v : os Ca_v1 (tipo-L) e os Ca_v3 (tipo-T). Os canais para Ca^{2+} tipo-L possuem alta condutância iônica, uma lenta cinética de decaimento da corrente e são ativados em potenciais de membrana acima de -20 mV. Além disso, estes canais são sensíveis a 1,4-diidropiridinas, uma ampla classe de fármacos que inclui tanto os bloqueadores (nifedipina) como os ativadores (Bay K 8644) destes canais para Ca^{2+} tipo-L. Por outro lado, os canais para Ca^{2+} tipo-T são caracterizados por sua baixa condutância e rápida cinética de decaimento, e são ativados por potenciais de membrana

ligeiramente acima do potencial de repouso (aproximadamente -70mV) (DOLPHIN, 2006; JACKSON, 2000; LACINOVÁ, 2005).

Sob condições normais, o influxo de Ca^{2+} em miócitos vasculares é regulado pela baixa probabilidade de abertura dos Ca_v , o que permite a regulação do tônus vascular e, conseqüentemente, da pressão sanguínea. O aumento do influxo de Ca^{2+} desencadeia o desenvolvimento de um tônus vascular anormal e elevação da resistência vascular periférica (SONKUSARE et al., 2006). O maior influxo de Ca^{2+} por canais Ca_v1 (tipo-L) e, conseqüente, indução da hipertensão, pode ocorrer devido a uma diminuição na condutância ao K^+ , levando à despolarização da célula e abertura dos canais Ca_v1 (tipo-L), ou por um aumento no número de subunidades α_1 destes canais nos miócitos vasculares (OHYA et al., 1993; PESIC et al., 2004; STEKIEL et al., 1993). Como os canais Ca_v1 (tipo-L) são de extrema importância no controle do tônus vascular, a descoberta de drogas que atuem como bloqueadoras destes canais é uma alternativa promissora para o tratamento da HA.

Outros canais importantes para o processo hipertensivo são os canais catiônicos não seletivos, que também estão localizados na membrana plasmática e são permeáveis ao íon Ca^{2+} . Dentre estes canais, estão os operados por receptor (ROC), os operados por estoque (SOC) e os TRP (do inglês "*Transient Receptor Potential*").

Conforme mostra a Figura 2, os ROCs são canais catiônicos permeáveis aos íons Na^+ e Ca^{2+} e ativados via estimulação de receptores acoplados à proteína G, de maneira direta (via receptores acoplados à proteína $G_{12/13}$) ou indiretamente (via receptores acoplados à proteína $G_{q/11}$). A via indireta envolve a estimulação da via da fosfolipase $\text{C}\beta$ ($\text{PLC}\beta$), que produz segundos mensageiros, tais como o IP_3 e o diacilglicerol (DAG), e este ativa a proteinocinase C (PKC), a qual pode estimular os ROCs, que também pode ser estimulado diretamente pelo DAG (DIETRICH et al., 2005; SALIDO; JARDÍN; ROSADO, 2011; WYNNE; CHIAO; WEBB, 2009). Portanto, o uso de agonistas que estimulem a via da $\text{PLC}\beta$, como a fenilefrina, pode ser uma boa alternativa como ferramenta farmacológica para estudar os ROCs.

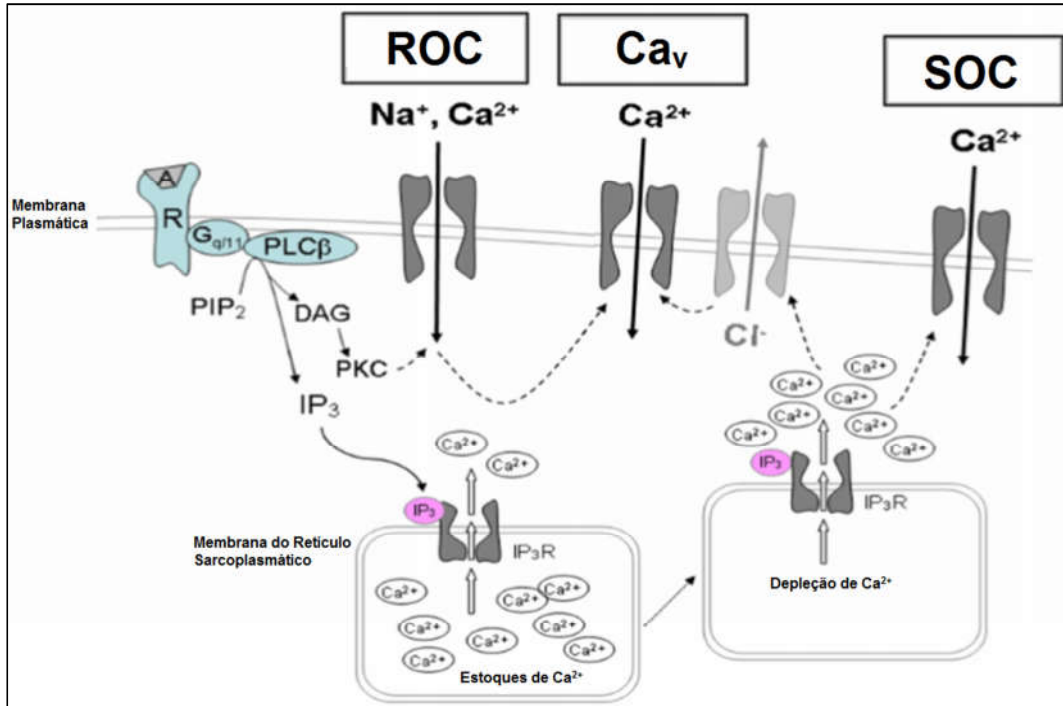


Figura 2: Canais para Ca^{2+} nas células musculares lisas vasculares.
 FONTE: WYNNE; CHIAO; WEBB, 2009 (adaptado).

Os SOCs são canais seletivos para o Ca^{2+} e responsáveis pela entrada capacitativa de Ca^{2+} . Estes canais também podem ser ativados por liberação do segundo mensageiro da via da $\text{PLC}\beta$, o IP_3 , que ativa seu receptor na membrana do retículo sarcoplasmático (IP_3R), provocando a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. Quando estes estoques de Ca^{2+} são depletados no RS, os SOCs são ativados (Figura 2) (WYNNE; CHIAO; WEBB, 2009). Esta ativação ocorre por um mecanismo de acoplamento entre as duas proteínas: a proteína Orai1 e a molécula de interação estromal 1 (STIM1), conforme ilustrado na Figura 3.

Orai1 e STIM1 são proteínas transmembranares localizadas na membrana plasmática e no RS, respectivamente, e que possuem algumas diferenças estruturais. A proteína Orai1 possui quatro regiões transmembranares, com suas porções amino-(N) e carboxi-(C) terminais localizadas no citosol, o que confere maior seletividade ao Ca^{2+} . Enquanto que, STIM1 possui apenas um único domínio transmembranar, com sua porção N-

terminal localizada no interior do RS, onde fica localizado o sensor de Ca^{2+} desta proteína (SALIDO; JARDIN; ROSADO, 2011; TREBAK, 2008).

Em condições basais, ou seja, quando o Ca^{2+} é abundante no RS, Orai1 é predominantemente um dímero, como ilustrado na Figura 3A. Porém, quando há depleção dos estoques intracelulares, seja por ação do IP_3 ou de drogas bloqueadoras da bomba de Ca^{2+} do RS (como o ácido ciclopiazônico e a tapsigargina), há uma menor afinidade do Ca^{2+} ao seu sítio de ligação na região N-terminal de STIM1, causando a dissociação do Ca^{2+} ligado (GIACHINI et al., 2011; WYNNE; CHIAO; WEBB, 2009).

Essa dissociação do Ca^{2+} induz a agregação de moléculas STIM1 (oligomerização) e sua translocação para regiões do RS mais próximas da membrana plasmática (Figura 3B). Com isso, ocorre a interação entre as regiões C-terminais de Orai1 e de STIM1 (com a participação de algumas proteínas auxiliares, tal como a calmodulina), induzindo a dimerização dos dímeros de Orai1, formando tetrâmeros que constituem o poro seletivo ao Ca^{2+} , e é a porção do SOC altamente seletiva ao Ca^{2+} (GIACHINI et al., 2011; FRICHAUF et al., 2008; SALIDO; JARDIN; ROSADO, 2011). Assim, a ativação de SOCs permite a entrada de Ca^{2+} na CMLV e é uma importante via para de regulação do tônus vascular.

Adicionalmente, o aumento de Ca^{2+} intracelular pode ativar os canais para o íon Cl^- , o que promove o efluxo de Cl^- , despolarizando a membrana da célula e ativando os Ca_v , assim como a ativação dos ROC pode aumentar o influxo dos íons Na^+ e Ca^{2+} , provocando a despolarização da membrana e, também, ativação dos Ca_v (MIWA et al., 2005; WYNNE; CHIAO; WEBB, 2009). Estes três canais permeáveis ao Ca^{2+} (Ca_v , ROC e SOC) e seus mecanismos de ativação foram ilustrados na Figura 2.

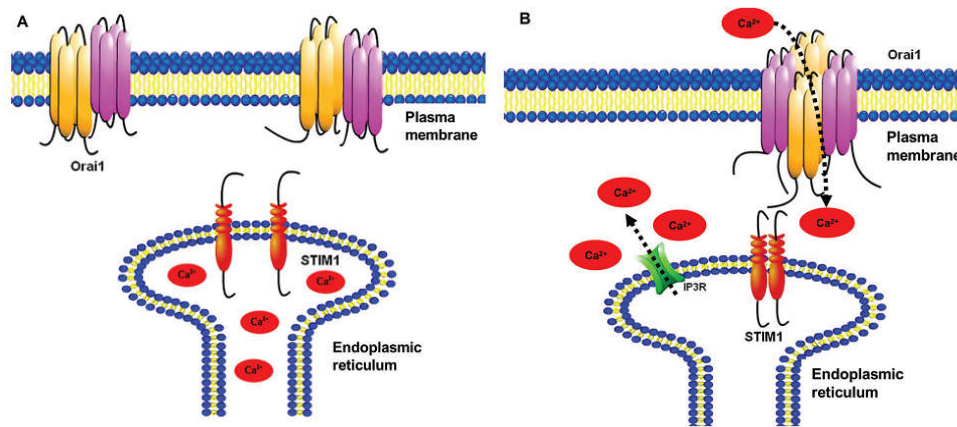


Figura 3: Interação entre Orai1/STIM1 na regulação da entrada capacitativa de Ca²⁺
 FONTE: GIACHINI et al., 2011

1.3 Canais TRP

Os canais TRP são uma nova família de canais permeáveis ao Ca²⁺, que têm atraído uma crescente atenção por serem os únicos canais de entrada de Ca²⁺ ativados por estímulos variados e associados a diversas funções. Estes canais foram encontrados originalmente no sistema visual da mosca de fruta *Drosophila melanogaster* (COSENS; MANNING, 1969), mas também estão presentes em mamíferos (CLAPHAM, 2003; MONTELL, 2005).

Todos os canais TRP constituem-se de canais catiônicos e exibem alta diversidade quanto à seletividade iônica (em sua maioria, são permeáveis ao Ca²⁺), modos de ativação e funções (MONTELL, 2005). Estes canais foram assim denominados porque, quando ativados, permitem o influxo de cargas positivas para a célula, gerando uma despolarização transitória, podendo ou não gerar potencial de ação, por isso o nome “Transiente Receptor Potencial” (TRP) (CLAPHAM, 2003).

Em mamíferos, a grande família de TRPs é classificada em 6 subfamílias de proteínas: Os TRPs clássicos ou canônicos (TRPC), os TRPs receptores de vanilóide (TRPV), os TRPs melastatinas (TRPM), os TRPs muculipinas (TRPML), os TRPs anquirinas (TRPA1) e os TRPs policistinas (TRPP) (CLAPHAM et al., 2005; PHELPS; GAUDET, 2007; NELSON; BECK;

CHENG, 2011), todos estes canais e seus diferentes subtipos estão agrupados e podem ser visualizados na Figura 4. Ao contrário da maioria dos canais iônicos, os diferentes canais TRP são agrupados por sua homologia ao invés de sua função ou seletividade, visto que as suas funções são díspares e muitas vezes desconhecidas (CLAPHAM, 2003).

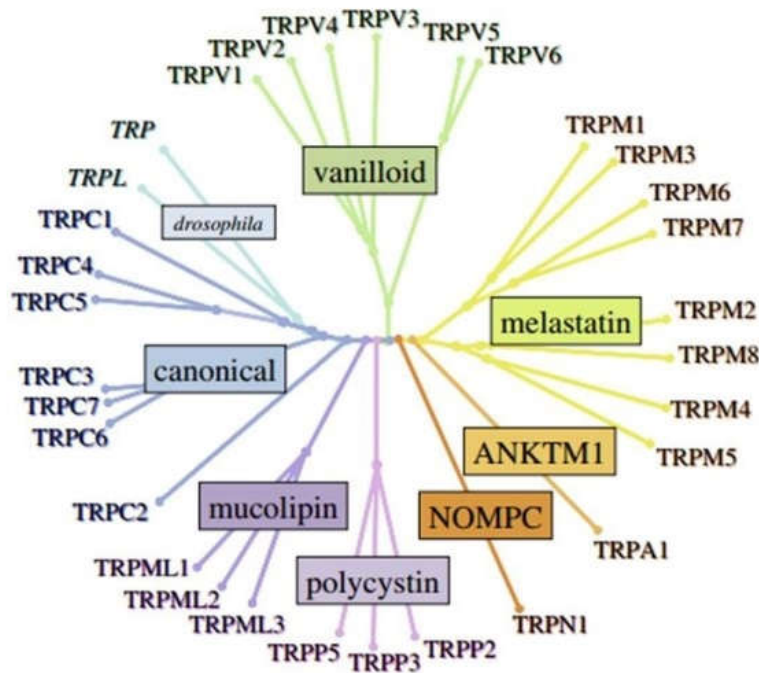


Figura 4: Classificação das subfamílias dos canais TRP
 FONTE: NELSON et al., 2011

A nomenclatura dos canais TRP foi determinada com base em diferentes características individuais: na ordem de sua descoberta, nas substâncias que os ativam, nas suas características estruturais e funcionais, genes e doenças relacionadas. A Tabela 1 resume a origem dos nomes das diferentes subfamílias de TRPs (MONTELL, 2005).

Tabela 1: Origem da nomenclatura das subfamílias dos canais TRP

TRPC (clássico ou canônico)	os primeiros a serem descobertos (semelhante ao canal TRP originalmente encontrado em <i>Drosophila</i>)
TRPV (vanilóide)	ativados por compostos contendo o grupo vanilil
TRPM (melastatina)	a diminuição na expressão dos genes que codificam essas proteínas gera o aparecimento de melanoma
TRML (mucolipina)	envolvidos no transporte de lipídios e proteínas entre lisossomos e endossomos e pelo fato de que mutações nos genes que codificam essas proteínas geram o aparecimento de mucopolidose
TRPA1 (anquirina)	por possuírem anquirinas repetidas na sua estrutura
TRPP (policistina)	mutações nos genes que codificam essas proteínas podem causar o aparecimento de doença renal policística

FONTE: MONTELL, 2005.

Conforme mostra a Figura 5, os canais TRP são monômeros que apresentam em sua estrutura proteica seis domínios transmembranares com um poro entre o quinto e sexto segmentos, além de apresentar os domínios N e C-terminais localizados intracelularmente (CLAPHAM et al., 2005; VANIER et al., 1998), o que permite que estes canais sejam ativados também por estímulos intracelulares, tais como enzimas e segundos mensageiros. As diferentes subfamílias de TRP diferenciam-se por modificações nas sequências de aminoácidos em suas regiões N e C-terminais. Um exemplo é que a porção N-terminal pode conter entre 0-8 repetições de anquirina, uma região em espiral enrolada, e um domínio provável de ligação à caveolina (YIN, KUEBLER, 2010).

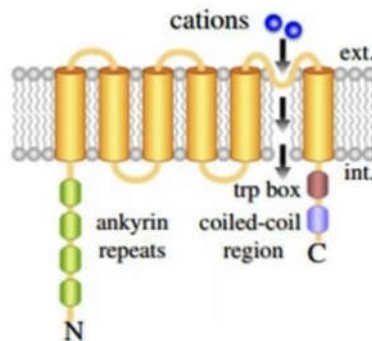


Figura 5: Estrutura básica dos canais TRPs
 FONTE: FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007

Estes monômeros de TRP se agrupam formando homotetrâmeros, dois monômeros iguais, ou heterotetrâmeros, dois ou mais monômeros diferentes (Figura 6). Esta arquitetura assemelha-se à superfamília dos canais catiônicos dependentes de voltagem, no entanto, os resíduos de aminoácidos carregados positivamente, característica dos canais sensíveis à voltagem, não estão preservados na maioria dos membros desta família (INOUE et al., 2006).

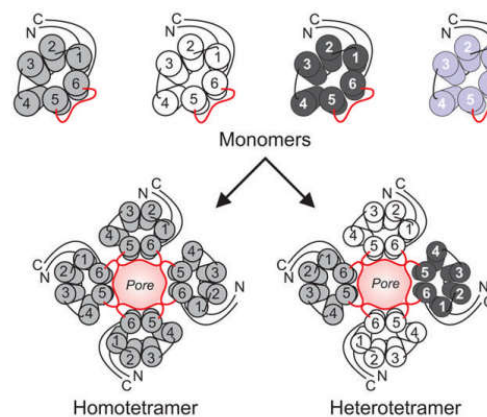


Figura 6: Possíveis arranjos das subunidades de monômeros de TRPs em canais homo ou heterotetrâmeros funcionais com um poro central.
 FONTE: FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007.

Os canais TRP participam na fisiologia sensorial, atuando na visão, paladar, olfato, audição, tato, sensações térmicas e osmosensações. Muitos TRPs também atuam na percepção das mudanças no ambiente local das células (VENKATACHALAM; MONTELL, 2007), agindo como sensores celulares que respondem a estímulos físicos, mecânicos e químicos (CLAPHAM, 2003; NILIUS; VOETS, 2005; PHELPS; GAUDET, 2007).

Diferentes fatores podem ativar os canais TRPs: receptores acoplados à proteína G, agentes quentes (como por exemplo, a capsaicina), lipídeos, ácidos, calor, estresse de cisalhamento e hipoosmolaridade (TRPVs). Outros podem ser ativados por estresse oxidativo, elevação de Ca^{2+} intracelular, exposição à temperaturas baixas ou agentes resfriantes, tais como mentol e icilina (TRPMs) (INOUE et al., 2006; CLAPHAM et al., 2005).

É importante ressaltar que, até o momento, já foram descritos 18 membros de canais TRPs na vasculatura, pois a expressão do RNA_m e/ou da

proteína destes canais já foi detectada nas CMLVs, nos nervos perivasculares e nas células endoteliais vasculares. Estes canais compreendem: os TRPC1-7, os TRPV1-4, os TRPM2-4 e 6-8, e o TRPA1, e a localização destes diferentes subtipos foi resumida na Tabela 2 (EARLEY, 2012 e 2015; EARLEY; GONZALES; GARCIA, 2010; FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007; YUE et al., 2014). Este fato demonstra a importância dos estudos com novas drogas com potencial de atuar sobre estes canais TRPs na vasculatura, bem como o estudo da função destes canais em tecido vascular e em enfermidades relacionadas, tal como a hipertensão arterial, o que reforça a relevância do presente trabalho.

Tabela 2: Expressão (RNA_m e/ou proteína) dos diferentes subtipos de canais TRPs na vasculatura

<i>Tecido vascular</i>	TRPC (1-7)	TRPV (1-6)	TRPM (1-8)	TRPA (1)
Artéria mesentérica	1, 3, 4, 5, 6	1, 2	6,7, 8	----
Outros vasos	1-7	1-4	2, 3, 4, 7, 8	----
Endotélio vascular	1, 3, 4, 5, 6, 7	4	----	1
Nervos perivasculares	----	1	----	1

FONTE: EARLEY, 2012 e 2015; JOHNSON et al., 2009; FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007; YUE et al., 2014.

As funções destes canais TRP no sistema vascular têm sido muito estudadas e envolvem: vasoconstrição, vasodilatação via liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e produção de óxido nítrico na célula endotelial, proliferação de células musculares lisas, respostas miogênicas, dentre outras (INOUE, et al., 2006; MENE; PUNZO; PIROZZI, 2013; YANG et al., 2006).

Além disso, alguns destes canais já foram associados a diferentes enfermidades cardiovasculares, incluindo a hipertensão. Os subtipos de canais

TRP que têm demonstrado envolvimento no processo hipertensivo são: os TRPC1, 3 e 6; os TRPV1 e 4; e os TRPM4, 7 e 8 (ABRIEL et al., 2012; EARLEY, 2015; LIU et al., 2013; YUE et al., 2014; ZHANG et al., 2015). O que ressalta a importância do estudo das possíveis alterações que ocorrem no funcionamento destes canais durante a hipertensão arterial e a descoberta de drogas que atuem modulando estes canais e possam ser usadas no tratamento desta enfermidade.

No músculo liso vascular, os canais TRPCs são canais permeáveis ao Ca^{2+} e possíveis candidatos a SOCs, ROCs e canais de Ca^{2+} mecanossensíveis (MSCC) (INOUE et al., 2006). O TRPC1 é postulado como um SOC e um ROC, e estão envolvidos na reestocagem de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (CHEN et al., 2011; DIETRICH et al., 2005; SALIDO; JARDÍN; ROSADO, 2011). Adicionalmente, TRPC1 pode ser um MSCC (MAROTO et al., 2005) e um canal ativado por estiramento que induz despolarização de membrana para ativar canais Ca_v nas células musculares lisas (THORNELOE et al., 2005), além de ser importante para contração e proliferação da célula muscular lisa vascular (BERGDAHL et al., 2003).

O TRPC6 foi descrito como um ROC ativado por DAG (HOFMANN et al., 1999) e, conforme mencionado anteriormente, os ROCs são abertos em resposta à ativação de receptores membranares acoplados à $\text{PLC}\beta$. Estudos evidenciam o papel importante dos TRPC6 nas células musculares lisas vasculares e pulmonares. Por caracterização biofísica comparativa e supressão de genes, TRPC6 foi sugerido por ser molecularmente correlacionado ao canal catiônico não seletivo ativado por α_1 -adrenoceptores em células musculares lisas vasculares (INOUE et al., 2001) e canais catiônicos ativados por 5-HT e vasopressina em células musculares lisas de aorta da linhagem A7r5 (JUNG et al., 2002).

Adicionalmente, tem sido proposto que o TRPC6 pode estar envolvido na despolarização induzida por pressão intravascular e contração de pequenas artérias e arteríolas, desempenhando um papel essencial na regulação do tônus miogênico (WELSH et al., 2002). Foi observado que a perda de função de TRPC6 levaria a diminuição do tônus vascular e das vias aéreas, concomitantemente reduzindo a contratilidade das vias aéreas e causando

hipotensão (DIETRICH et al., 2003 e 2005), efeitos importantes para o tratamento de enfermidades tais como a hipertensão arterial e pulmonar.

No que se refere à importância da família dos TRPV no sistema cardiovascular, foi observado que existe um complexo de sinalização de Ca^{2+} envolvendo TRPV4, receptores de rianodina e canais para potássio sensíveis ao cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) em músculo liso de artéria cerebral que quando ativado pode levar à vasodilatação (EARLEY et al., 2005). Além disso, os TRPV1 presentes em neurônios perivasculares de artéria mesentérica, quando ativados levam a liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) que induz relaxamento vascular (ZYGMUNT et al., 1999).

Dentre os TRPMs, o TRPM2 é um canal catiônico não seletivo permeável ao Ca^{2+} , Na^+ e K^+ , podendo ser ativados pela ADP-ribose (ADPR), espécies reativas de oxigênio (H_2O_2), NAD^+ e Ca^{2+} (HIROI et al, 2013; MILLER et al, 2013; ZHOLOS, 2010). As funções do TRPM2 no sistema cardiovascular estão envolvidas com proteção no coração (MILLER et al., 2014) e resposta ao estresse oxidativo no endotélio vascular (TAKAHASHI et al., 2011), ademais já foi demonstrada a expressão do RNA_m e proteínas deste canal nas artérias aorta e pulmonar (FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007).

Os canais TRPM4 e TRPM5 são permeáveis a cátions monovalentes e ativados por aumento de Ca^{2+} intracelular, além de exibir uma pronunciada modulação por voltagem (ABRIEL et al., 2012; HOFMANN et al., 2003; LIU; LIMAN, 2003;). O TRPM4 é altamente expresso no coração e também é encontrado em células musculares e no endotélio vascular (MILLS e MILLAN, 2010; NILLIUS, 2007) e tem demonstrado envolvimento no controle da PA, visto que camundongos com deficiência na expressão do canal TRPM4 exibiram aumento de pressão (MATHAR et al., 2010). Também já foi relatado seu importante papel na contração de artéria cerebral de rato em resposta ao aumento da pressão intraluminal (CRNICH et al., 2010; GONZALES et al., 2010).

Os TRPM6 e TRPM7 são duas proteínas denominadas "chanzyme" (canal mais enzima), pois somente elas compreendem canais contendo um poro permeável ao Mg^{2+} fundido com um domínio cinase na região C-terminal (TOUYZ, 2008). Estes canais podem formar tetrâmeros TRPM6/TRPM7,

porém, a interação funcional entre eles e as atividades da cinase ainda permanecem pouco compreendidas (PARAVICINI et al., 2012). Tanto os RNA_m como as proteínas de TRPM6 e de TRPM7 já foram isoladas de brônquios, artéria mesentérica e aorta (CHUBANOV et al., 2004; HE et al., 2005).

O TRPM7 é um canal catiônico divalente mais seletivo para o Mg²⁺, que regula a concentração de Mg²⁺ citosólica (NADLER et al., 2001; RUNNELS et al., 2001). Tanto a expressão quanto a atividade do TRPM7 parecem estar alteradas em modelos experimentais de hipertensão, e podem contribuir para a desregulação de Mg²⁺ e função vascular alterada na hipertensão (YOGI et al., 2010). Estudos demonstram que as células de músculo liso provenientes de artéria mesentérica de SHR apresentam diminuição na expressão do TRPM7 quando comparados com os seus controles normotensos (TOUYZ et al., 2006), demonstrando a importância do estudo dos canais TRPM7 em CMLVs e de moléculas capazes de modular este canal, bem como a investigação do papel destes canais no processo hipertensivo.

É bem descrito na literatura que o íon Mg²⁺ é capaz de influenciar na PA por regular o tônus vascular em diversos modelos experimentais de hipertensão. Já foi demonstrado que a [Mg²⁺]_i é menor tanto em CMLVs como em cardiomiócitos de animais SHR e ratos com hipertensão induzida com acetato de desoxicorticosterona (DOCA), quando comparado aos controles normotensos (ADACHI et al., 1993; TOUYZ, 2008). Em modelos de hipertensão grave, tais como animal SHR propenso a um acidente vascular cerebral (AVC) e SHR tratado com DOCA, a [Mg²⁺]_i está correlacionada negativamente e a [Ca²⁺]_i positivamente com a pressão arterial sistólica, sendo as concentrações intracelulares destes dois íons inversamente associadas (JONES; MARTINS; CLEMENS, 1988), sugerindo que a [Mg²⁺]_i pode estar envolvida na regulação da PA por competição do íon Mg²⁺ com o Ca²⁺. Aliado a isto, os canais TRPM6 e TRPM7, que são mais permeáveis ao Mg²⁺ que ao Ca²⁺, têm sido implicados na homeostase do Mg²⁺ e na regulação da PA, e ambos são regulados por níveis citosólicos de Mg²⁺, tanto Mg²⁺ livre como ligado a nucleotídeos (ATP ou GTP) (DIETRICH et al., 2006; GWANYANYA et al., 2006; SCHMITZ et al., 2003).

O TRPM8 apresenta permeabilidade relativamente alta para íons Ca^{2+} e pequena seletividade entre cátions monovalentes (ZUKER, 2002), sua ativação gera influxo de Na^+ e Ca^{2+} e despolarização da membrana (HUI; GUO; FENG, 2005). Este canal foi recentemente descrito em vários vasos sanguíneos tais como: artérias mesentérica, femoral, caudal e aorta. Neste trabalho, foi evidenciado que em vasos pré-contraídos, agonistas de TRPM8 causaram uma pronunciada vasodilatação por ativarem diretamente estes canais na célula muscular lisa, podendo contribuir, desta forma, para manutenção do tônus vasomotor quando ativado (JOHNSON et al., 2009).

1.4 Monoterpenos e Carvacrol

Os óleos essenciais, também denominados de óleos voláteis, são encontrados em diversas plantas aromáticas e apresentam aroma intenso, volatilidade, imiscibilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos (COSTA, 1975). Estes óleos são misturas complexas, principalmente, de monoterpenos, sesquiterpenos, fenil-propanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular, sendo os monoterpenos os seus componentes majoritários (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; LAVABRE, 1993).

Os monoterpenos são metabólitos secundários formados por hidrocarbonetos a partir do acoplamento de duas unidades de isopreno [$\text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2$], que permitem uma grande variedade estrutural (BAKKALI et al., 2008). Estes compostos são amplamente conhecidos na literatura por suas propriedades farmacológicas, tais como antimicrobianos (ÍSCAN et al., 2002), anestésicos, analgésicos (XU; BLAIR; CLAPHAM, 2005), anti-inflamatórios (SANTOS; RAO, 2001), antipruriginosos (UMEZU; SAKATA; ITO, 2001), dentre outras.

No sistema cardiovascular, há diversos trabalhos que relatam ações de monoterpenos, tais como: rotundifolona (SILVA et al., 2011; GUEDES; SILVA; BARBOSA-FILHO, 2002-2004); α -terpineol (RIBEIRO, 2008); citronelol (BASTOS et al., 2009); timol (PEIXOTO NEVES et al., 2009); e carvacrol (AYDIN et al., 2007; DANTAS et al., 2015; PEIXOTO-NEVES et al., 2009). Além disso, alguns monoterpenos têm demonstrado capacidade de modular os

canais TRP, tais como: mentol, um ativador clássico do TRPM8, o qual também pode ser ativado pelo pulegol, eucaliptol, linalol e geraniol (CALIXTO et al., 2005); a cânfora e o timol, relatados por ativar o TRPV3 e inibir o TRPL (MACPHERSON et al., 2006; PARNAS, et al., 2009; VOGT-EISELE et al., 2007); e o borneol, que também inibe o TRPL (PARNAS, et al., 2009).

O carvacrol, o monoterpene em estudo, é conhecido por ativar TRPV3 e TRPA1 (EARLEY; GONZALES; GARCIA, 2010; VOGT-EISELE et al., 2007) e inibir TRPM7 expressos em células embrionárias do rim humano (HEK) e ectopicamente expresso em uma cultura primária de neurônios do hipocampo do cérebro (PARNAS et al., 2009). O carvacrol é um monoterpene fenólico (Figura 7), quimicamente denominado 5-isopropil-2-metilfenol, encontrado no óleo essencial de diversas plantas aromáticas, como por exemplo, a *Oreganum vulgare* (TIAN; LAI, 2006) e outras espécies do mesmo gênero, como a *O. minutiflorum* (SARER, et al., 1996) e a *O. onites* (VOKOU; KOKKIMI; BESSIERE, 1988), compondo valores acima de 92% do seus óleos essenciais.

A literatura relata diversas atividades farmacológicas do carvacrol, tais como: antimicrobiana (BOTELHO et al., 2007), anti-tumoral (KOPARAL; ZEYTINOGLU, 2003), antimutagênica (AYDIN; BASARAN; BASARAN, 2005), antioxidante (PRIETRO et al., 2007), antiplaquetária (SON et al., 2005), anti-inflamatória (GUIMARÃES et al, 2012), anticonvulsivante (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010), antinociceptiva e antioxidante (GUIMARÃES et al, 2010), dentre outras.

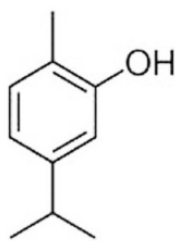


Figura 7: Estrutura química do monoterpene carvacrol
FONTE: HAJIMEHDIPOOR et al., 2010

Há poucos estudos descritos na literatura que abordam os efeitos de carvacrol sobre a musculatura lisa. Boskabady e Jandaghi (2003) foram os primeiros a investigar a atividade relaxante muscular de carvacrol e

demonstraram que o carvacrol atua sobre a traqueia de cobaia, relaxando-a. A atividade vasodilatadora de carvacrol já foi relatada em aorta de rato normotenso, via independente do endotélio vascular e por redução do influxo de Ca^{2+} (PEIXOTO-NEVES et al., 2009), e em artéria cerebral e cerebelar de rato, por ativar TRPV3 na camada endotelial e com isso aumentar as correntes de Ca^{2+} (EARLEY; GONZALES; GARCIA, 2010). Adicionalmente, carvacrol mostrou suprimir correntes de cálcio tipo-L em cardiomiócitos caninos e humanos (MAGYAR et al., 2004).

Aydin e colaboradores (2007) também relataram ações do carvacrol sobre o sistema cardiovascular, demonstrando sua capacidade em reduzir a vasoconstrição induzida por diferentes agonistas e induzir hipotensão e bradicardia em ratos normotensos não anestesiados. Recentemente, estudos desenvolvidos em nosso laboratório revelaram uma ação vasodilatadora de carvacrol em artéria mesentérica de ratos normotensos, que sugere o envolvimento dos Ca_v , ROC, SOC e TRPM7 (DANTAS et al., 2015). No entanto, os efeitos do carvacrol envolvendo canais TRP em um modelo de hipertensão essencial ainda não foram elucidados.

Portanto, a busca por novos fármacos com maior eficácia e seletividade, bem como menos efeitos colaterais, é de extrema relevância para o tratamento da hipertensão, e a correlação funcional entre a expressão dos canais TRPs com as alterações na pressão sanguínea no processo hipertensivo torna estes canais TRPs potenciais alvos terapêuticos para o controle da vasoconstrição. O estudo da ação de produtos naturais sobre estes canais, como o carvacrol, pode gerar futura aplicação clínica para este monoterpeneo.

Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a ação do monoterpene carvacrol sobre a vasculatura de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e de normotensos Wistar, estudando a participação de canais TRP nos efeitos observados, bem como investigar seu possível efeito anti-hipertensivo.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a atividade vasodilatadora do carvacrol e a dependência do endotélio vascular nesta resposta, em artéria mesentérica de ratos hipertensos e normotensos;
- Avaliar se carvacrol reduz o influxo de Ca^{2+} por canais Ca_v tipo-L, ROC e SOC em artéria mesentérica de ratos hipertensos e normotensos;
- Investigar a participação de canais TRP na resposta vasodilatadora de carvacrol em artéria mesentérica de ratos hipertensos e normotensos;
- Avaliar o efeito do carvacrol sobre as correntes iônicas através dos canais Ca_v tipo-L e TRPM7 em células musculares lisas isoladas de artéria mesentérica de ratos hipertensos e normotensos;
- Monitorar os efeitos da administração do carvacrol por gavagem durante 20 dias sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de animais SHR;
- Avaliar a reatividade vascular da artéria mesentérica de animais SHR após tratamento com carvacrol por 20 dias.

Material e Métodos

3 Material

3.1 Animais

Foram utilizados para todos os experimentos ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e ratos normotensos Wistar (*Rattus norvegicus*), com idade entre 12-16 semanas, pesando entre 250-320 gramas, os quais foram provenientes do Biotério do Laboratório de Neurociências, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Estes animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas (6-18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água. Os ensaios foram realizados de acordo com o guia de cuidados e uso de animais de laboratório adotado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFBA (CEUA – UFBA nº 012/2011).

3.2 Substâncias utilizadas

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas: Carvacrol (Sigma), Cremophor EL (Sigma), BCTC (4-(3-Chloro-2-pyridinyl)-N-[4-(1,1-dimethylethyl) phenyl]-1-piperazinecarboxamide) (Sigma), 9-Phenanthrol (Sigma), cloreto de magnésio (VETEC), HC-030031 (Sigma), Xilazina e cetamina (Cristália), sal sódico de heparina (Roche), nitroprussiato de sódio (Sigma), cloridrato de L (-) fenilefrina (Sigma), cloridrato de acetilcolina (Sigma), ácido ciclopiazônico (Sigma), Vermelho de Rutênio (Sigma), 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) (Sigma), nifedipina (Sigma). Para a preparação da solução estoque de Nifedipina, essa substância foi dissolvida em etanol absoluto e diluída em água destilada. O 2-APB e o HC030031 foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), e após diluídos em água destilada. O 9-fenantrol foi dissolvido em DMSO e cremofor, depois diluído em água destilada. E as demais drogas foram dissolvidas em água destilada, de modo a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental.

Para obtenção da solução estoque de carvacrol, o mesmo foi solubilizado em cremofor e diluído em água destilada (experimentos *in vitro*) ou solução salina (experimentos *in vivo*) de modo a serem obtidas as

concentrações ou doses desejadas para cada protocolo experimental. O cremofor foi testado e a possibilidade do efeito ser atribuído ao mesmo foi descartada.

3.3 Sais utilizados

Para a preparação das soluções fisiológicas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e fosfato de sódio mono-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Todos estes sais foram obtidos da VETEC[®].

No preparo das soluções despolarizantes de Tyrode com 60 mM de KCl, a concentração de Na^+ foi isosmoticamente alterada. As Tabelas 3-6 mostram as composições das soluções nutritivas utilizadas para artéria mesentérica superior isolada (TANAKA et al., 1999).

3.4 Soluções utilizadas

3.4.1 Soluções utilizadas nos ensaios funcionais *in vitro*

Tabela 3- Composição da solução de Tyrode

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,05
NaHCO_3	10,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,42
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	5,6

*pH=7,4

FONTE: TANAKA et al., 1999.

Tabela 4- Composição da solução de Tyrode nominalmente sem Ca^{2+}

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,05
NaHCO_3	10,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,42
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	5,6

FONTE: TANAKA et al., 1999 (adaptado).

Tabela 5 - Composição da solução de Tyrode despolarizante – KCl 60 mM

Substância	Concentração (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,05
NaHCO_3	10,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,42
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	5,6

FONTE: TANAKA et al., 1999 (adaptado)

Tabela 6 - Composição da solução de Tyrode despolarizante – KCl 60 mM, nominalmente sem Ca^{2+}

Substância	Concentração (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,05
NaHCO_3	10,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,42
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	5,6

FONTE: TANAKA et al., 1999 (adaptado)

3.4.2 Soluções utilizadas na preparação das CMLVs

Tabela 7 - Composição da solução SSF-Normal

Substância	Concentração (mM)
NaCl	137,0
KCl	5,6
MgCl ₂	1,0
NaHCO ₃	4,17
NaH ₂ PO ₄	0,44
Na ₂ HPO ₄	0,42
CaCl ₂	2,6
C ₆ H ₁₂ O ₆	5,0
HEPES	10,0

FONTE: XU et al., 1999.

Tabela 8 - Composição da solução SSF-Baixo Ca²⁺

Substância	Concentração (mM)
NaCl	137,0
KCl	5,6
MgCl ₂	1,0
NaHCO ₃	4,17
NaH ₂ PO ₄	0,44
Na ₂ HPO ₄	0,42
CaCl ₂	0,05
C ₆ H ₁₂ O ₆	5,0
HEPES	10,0

FONTE: XU et al., 1999 (adaptado).

3.4.3 Soluções utilizadas nos protocolos experimentais eletrofisiológicos

Tabela 9 - Composição da solução interna da pipeta utilizada para medir as correntes de Ba²⁺

Substância	Concentração (mM)
MgCl ₂	4,0
CsCl	130,0
TEA-Cl	10,0
EGTA	10,0
HEPES	10,0

* pH= 7,2 ajustado com CsOH
 FONTE: CRUZ; MATSUDA; 1994.

Tabela 10 - Composição da solução externa utilizada para medir correntes de Ba²⁺

Substância	Concentração (mM)
NaCl	126,0
CsCl	5,4
BaCl ₂	20,0
C ₆ H ₁₂ O ₆	10,0
HEPES	10,0

* pH= 7,4 ajustado com NaOH
 FONTE: CRUZ; MATSUDA; 1994.

Tabela 11 - Composição da solução externa utilizada para medir correntes tipo-TRPM6/TRPM7

Substância	Concentração (mM)
NaCl	135,0
MgCl ₂	1,0
CaCl ₂	1,0
C ₆ H ₁₂ O ₆	10,0
HEPES	10,0

*pH= 7,4 ajustado com NaOH.

Tabela 12 - Composição da solução interna da pipeta utilizada para medir correntes tipo-TRPM6/TRPM7

Substância	Concentração (mM)
NaCl	20,0
Ácido glucônico	100,0
CaCl ₂	1,0
EGTA	11,0
HEPES	10,0

*pH= 7,2 ajustado com NaOH.

Tabela 13 - Composição da solução interna da pipeta utilizada no ensaio de alta [Mg²⁺]_i

Substância	Concentração (mM)
NaCl	20,0
Ácido glucônico	100,0
CaCl ₂	1,0
EGTA	11,0
HEPES	10,0
MgCl ₂	2,0

*pH= 7,2 ajustado com NaOH.

4 Métodos

Foram utilizadas diferentes formas de abordagem para caracterizar a possível ação do monoterpeno carvacrol sobre canais TRP em animais SHR e comparar com os normotensos Wistar: ensaios farmacológicos *in vitro* funcionais e eletrofisiológicos, e ensaios *in vivo*. Todos os animais foram eutanasiados, seguindo as normas de cuidados com animais do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFBA (nº de protocolo 012/2011).

4.1 Ensaios farmacológicos *in vitro* funcionais

Os ensaios farmacológicos foram realizados com o objetivo de investigar o efeito do carvacrol nos tecidos vasculares isolados e a participação dos canais TRP nestas respostas, bem como avaliar as diferenças existentes entre os resultados obtidos em animais espontaneamente hipertensos quando

comparados aos animais normotensos. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Endócrina e Cardiovascular (LAFPEC), no ICS/UFBA.

4.1.1 Preparação dos tecidos vasculares

Os ratos foram eutanasiados com câmara de CO₂ e, por meio de uma incisão no abdome do animal, foi retirada a artéria mesentérica superior de animais SHR e Wistar. Anéis do primeiro segmento da artéria (1 - 2 mm) foram obtidos e isolados de tecido conjuntivo e adiposo. Os anéis foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode (Tabela 3), a 37 °C, e gaseificada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ (carbogênio). Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força, o qual estava acoplado a um sistema de aquisição (FORT-10, WPI, Sarasota, EUA) para o registro das contrações isométricas (Figura 8). Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de 60 min. Durante este tempo, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 min. para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Posteriormente, todos os anéis foram submetidos a uma contração tônica submáxima com a Felinefrina (FEN), 1 µM, para avaliar a viabilidade do tecido. A presença de endotélio funcional foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de 1 µM de acetilcolina (ACh). Para realização dos experimentos com anéis na ausência do endotélio funcional, os anéis foram submetidos ao leve atrito mecânico entre as paredes internas do vaso com uma haste de metal. Foram considerados com endotélio, os anéis com relaxamento superior a 90% sobre a pré-contracção com fenilefrina. Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10%, foram considerados sem endotélio. Anéis com relaxamentos entre 10 e 90% foram desprezados dos protocolos experimentais.

Após a confirmação da presença ou ausência do endotélio funcional, uma segunda resposta com a FEN foi obtida e carvacrol (10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} e 10^{-3} M) foi adicionado cumulativamente à cuba. Os resultados foram expressos levando em

consideração que a contração induzida por FEN corresponde a 100% e que, a tensão de repouso é igual a 0%.



Figura 8: Sistema de cubas e aquisição de dados de tensão isométrica para órgão isolado.

4.1.2 Protocolos experimentais utilizando artéria mesentérica de ratos hipertensos e normotensos

4.1.2.1 Avaliação do efeito vasodilatador de carvacrol em anéis mesentéricos

Neste estudo, foi avaliado o efeito vasodilatador do carvacrol (10^{-8} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de animais SHR e Wistar, a fim de avaliar as ações deste monoterpene isolado de plantas sobre a contratilidade vascular de animais hipertensos e as possíveis diferenças das respostas observadas em normotensos. Para isso, após um período de 60 minutos de estabilização das preparações, concentrações crescentes de carvacrol (10^{-8} - 10^{-3} M), foram adicionadas cumulativamente aos anéis vasculares, pré-contraídos com FEN (1 μ M) tanto para ratos normotensos como para hipertensos (Figura 9).

O efeito vasodilatador do carvacrol foi avaliado em anéis com o endotélio funcional intacto e anéis com o endotélio funcionalmente removido, e em todas as preparações a concentração de FEN (1 μ M) foi ajustada para obtenção de contrações de magnitude semelhante. Após a obtenção das curvas concentração-resposta, foram analisados os valores de pD_2 ($-\log CE_{50}$) e E_{max} (efeito máximo) das curvas individuais na presença e na ausência do endotélio funcional.

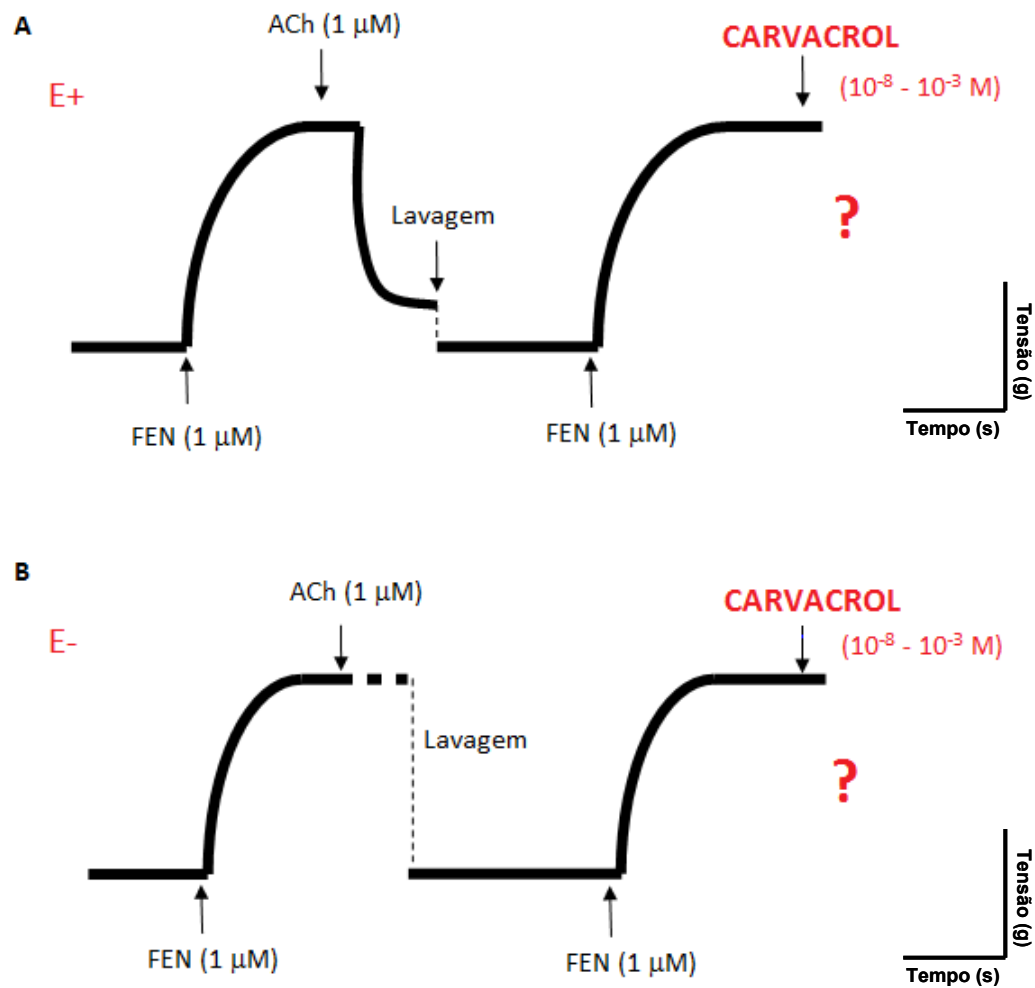


Figura 9 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos de concentrações crescentes de carvedilol (10^{-8} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contraídos com FEN ($1 \mu\text{M}$). A) E+ (anéis com endotélio intacto); B) E- (anéis sem endotélio funcional).

4.1.2.2 Avaliação do efeito do carvacrol sobre o influxo de Ca^{2+} em anéis mesentéricos

Este protocolo foi realizado para avaliar se a diminuição do influxo de cálcio para célula muscular lisa foi um mecanismo utilizado pelo carvacrol para causar efeito vasodilatador, já que o influxo de cálcio pode acontecer por meio de canais distintos no músculo liso vascular, incluindo os canais TRP. Para avaliar esta hipótese, anéis mesentéricos de ratos hipertensos e normotensos foram expostos a uma solução despolarizante de KCl 60 mM (Tabela 5) e em seguida foram lavados com solução de Tyrode nominalmente sem Ca^{2+} (Tabela 4), onde permaneceram nesse meio por 15 minutos. Após esse período, o meio foi trocado por uma solução despolarizante de KCl 60 mM nominalmente sem Ca^{2+} (Tabela 6). Posteriormente, foi obtida uma curva concentração-resposta ao CaCl_2 (10^{-6} – 3×10^{-2} M) (curva controle).

Este processo foi novamente repetido, no entanto, previamente, concentrações isoladas de carvacrol (10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) foram incubadas às preparações juntamente com a solução despolarizante de KCl 60 mM, nominalmente sem Ca^{2+} e uma nova curva concentração resposta ao CaCl_2 (10^{-6} – 3×10^{-2} M) foi obtida. O efeito do carvacrol sobre as contrações induzidas por CaCl_2 foi avaliado comparando-se as curvas de CaCl_2 na ausência (controle) e na presença do monoterpeno em estudo (Figura 10).

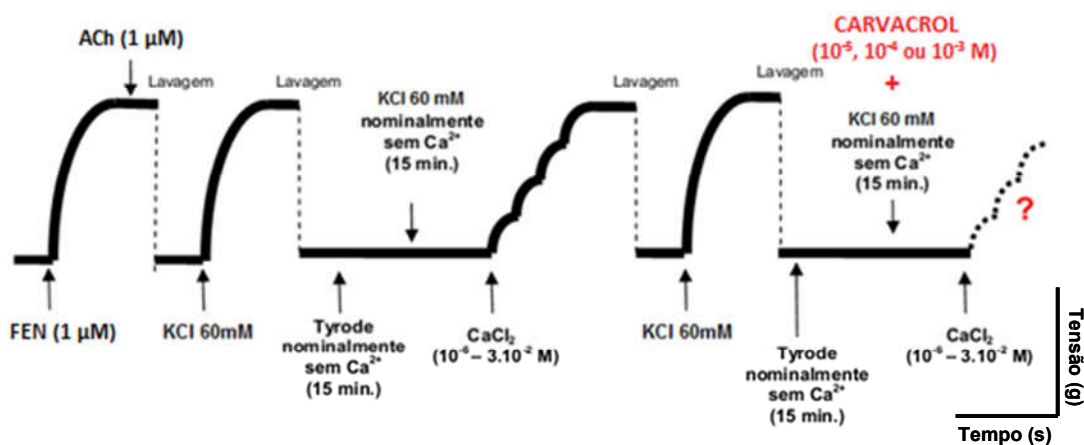


Figura 10 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos de diferentes concentrações de carvacrol (10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) sobre o influxo de Ca^{2+} em anéis, sem endotélio funcional, de artéria mesentérica superior isolada de rato.

4.1.2.3 Avaliação do efeito do carvacrol sobre os canais ROC e SOC em anéis mesentéricos

Como descrito na literatura, a entrada de Ca^{2+} em vários vasos sanguíneos podem envolver canais da família dos TRP, principalmente TRPC1, TRPC3 e TRPC6, sendo estes canais relacionados aos operados por estoques (SOC) e operados por receptor (ROC). Este protocolo foi realizado para avaliar se o carvacrol influencia no influxo de Ca^{2+} por via diferente daquela induzida por canais Ca_v , como por exemplo, pela entrada de Ca^{2+} pelos ROCs e SOCs. Além disso, podemos também avaliar a importância do influxo de Ca^{2+} por vias diferentes daquela mediada por canais Ca_v em animais com hipertensão essencial.

Inicialmente, os anéis mesentéricos dos ratos foram expostos a uma solução de Tyrode livre de Ca^{2+} e contrações repetidas foram induzidas por FEN ($1\mu\text{M}$), com o objetivo de depletar os estoques intracelulares de Ca^{2+} . Logo após, os anéis foram encubados por um período de 30 min com ácido ciclopiazônico (CPA) ($20\mu\text{M}$), um inibidor da ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, responsável por depletar os estoques de cálcio citosólicos e, conseqüentemente, ativar os SOC (LIU et al., 2006). Após este procedimento, ainda em meio sem cálcio, foram adicionadas a FEN ($1\mu\text{M}$) que induz dentre outros mecanismos, a abertura dos ROCs, e a Nifedipina ($1\mu\text{M}$), uma droga inibidora dos Ca_v . Posteriormente, foi obtida uma contração em resposta ao CaCl_2 (10^{-2} M) adicionado na cuba (curva controle), para avaliarmos o efeito da entrada de Ca^{2+} por ROC e SOC, sem a influência dos Ca_v .

Após a obtenção da contração máxima, o meio foi trocado por uma solução de Tyrode a fim de restabelecer o meio fisiológico no órgão, o procedimento anterior foi repetido e após a depleção dos estoques no meio sem cálcio, concentrações isoladas do carvacrol em separado (10^{-5} , 10^{-4} ou 10^{-3} M) foram encubadas às preparações juntamente com Nifedipina ($1\mu\text{M}$), a FEN ($1\mu\text{M}$) e o CPA ($20\mu\text{M}$), e uma nova contração induzida em resposta ao CaCl_2 (10^{-2} M) foi obtida, a qual foi comparada com a curva de CaCl_2 na ausência (controle) do monoterpene (Figura 11).

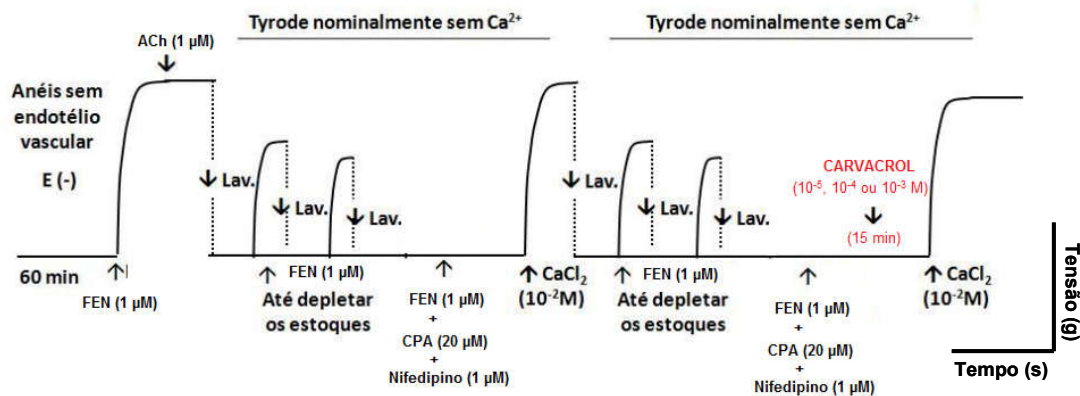


Figura 11 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos de diferentes concentrações de carvacrol (10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) sobre o influxo de Ca^{2+} por ROC e SOC em anéis, sem endotélio funcional, de artéria mesentérica superior isolada de rato.

4.1.2.4 Investigação da participação dos canais TRP nas respostas vasculares induzidas pelo carvacrol em anéis mesentéricos

Para avaliarmos a importância dos canais TRP no efeito vasodilatador induzido pelo carvacrol em ratos hipertensos e comparar com normotensos, foram utilizados anéis vasculares, na ausência do endotélio vascular. Após a verificação da ausência do endotélio funcional, como descrito anteriormente, os anéis mesentéricos, antes da pré-contracção com a FEN (1 μM), foram pré-encubados separadamente, por um período de 30 min, com os diferentes bloqueadores dos canais TRP, e concentrações crescentes de carvacrol (10^{-8} - 10^{-3} M), foram adicionadas cumulativamente à cuba. Os valores de pD_2 e E_{max} foram obtidos e comparados na situação controle e após tratamento com cada bloqueador (Figura 12).

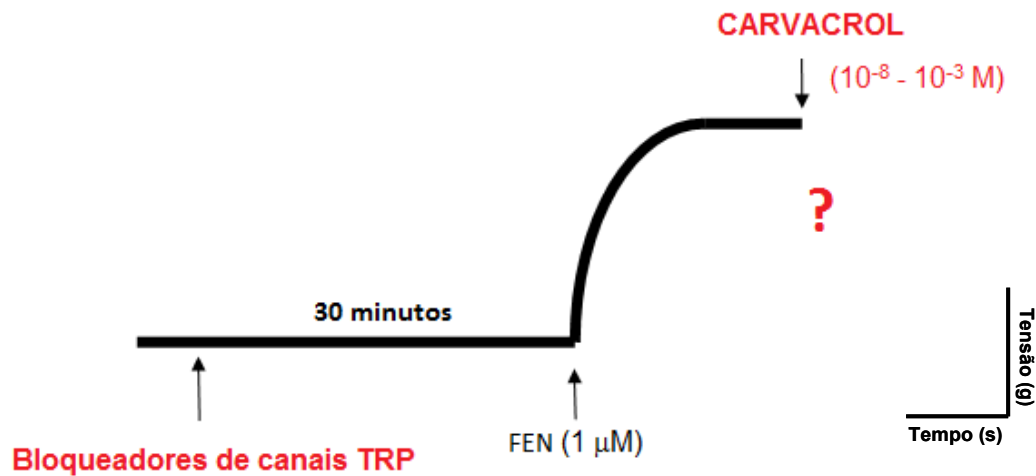


Figura 12 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação dos canais TRP no efeito induzido por Carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertenso e normotenso, na ausência de endotélio funcional e pré-contraídos com FEN (1 μ M).

Conforme pode ser observado na Tabela 14, os bloqueadores não específicos utilizados foram: O Vermelho de Rutênio (10 μ M), o qual bloqueia os canais TRPV1, TRPV5, TRPV6, TRPA1, TRPC3 e TRPM6 (CLAPHAM et al., 2005); o íon gadolínio (10 μ M), o qual bloqueia mais seletivamente os canais TRPC1-7 (LIEVREMONT; BIRD; PUTNEY, 2004; MCELROY; GURNEY; DRUMMOND, 2008); o 2-APB (10 μ M) que bloqueia os canais TRPC4-7 e o TRPM8 (CHE et al., 2014; CHUNG et al., 2014; HU et al., 2004); o 2-APB (1 μ M) que bloqueia os canais TRPM2 (TOGASHI; INADA; TOMINAGA, 2008); o BCTC (2 μ M), o qual bloqueia os canais TRPM8 e TRPV1 (BEHRENDT et al., 2004; CLAPHAM et al., 2005); o 9-fenantrol (10 μ M), o qual bloqueia o canal TRPM4 (GUINAMARD; HOF; DEL-NEGRO, 2014; GRAND et al., 2008); e o HC03003-01, bloqueador do TRPA1 (EARLEY, 2012; MCNAMARA et al., 2007).

Tabela 14: Relação entre os bloqueadores de TRP utilizados nos ensaios *in vitro* e os seus respectivos canais bloqueados.

Bloqueadores	TRPC	TRPV	TRPM	TRPA
Vermelho de Rutênio (10µM)	3	1, 5, 6	6	1
Íon Gadolínio (10µM)	1-7	----	----	----
2-APB (10 µM)	4-7	----	8	----
2-APB (1µM)	----	----	2	----
BCTC (2µM)	----	1	8	----
9-fenantrol (10µM)	----	----	4	----
HC03003-01 (10µM)	----	----	----	1

FONTES: BEHRENDT et al., 2004; CHE et al., 2014; CHUNG et al., 2014; CLAPHAM et al., 2005; EARLEY, 2012; GUINAMARD; HOF; DEL NEGRO, 2014; GRAND et al., 2008; HU et al., 2004; LIEVREMONT; BIRD; PUTNEY, 2004; MCELROY; GURNEY; DRUMMOND, 2008; MCNAMARA et al., 2007; TOGASHI; INADA; TOMINAGA, 2008.

4.1.3 Avaliação da reatividade vascular de artéria mesentérica de ratos hipertensos após tratamento subcrônico com carvacrol

Neste protocolo foi avaliado se o tratamento subcrônico orogástrico com carvacrol (50mg/kg/dia) altera a reatividade vascular de animais SHR. Os animais que passaram pelo tratamento subcrônico com carvacrol foram eutanasiados e o segmento de artéria mesentérica foi isolada como anteriormente descrito. Como mostra a Figura 13, após um período de 60 minutos de estabilização das preparações, concentrações crescentes de fenilefrina (10^{-10} - 10^{-6} M) foram adicionadas ao banho. Uma curva concentração-resposta para o vasoconstritor foi obtida em cada grupo experimental tratado anteriormente (controle negativo, controle positivo e carvacrol). Posteriormente os anéis mesentéricos foram deixados em estabilização em contração tônica durante 40 minutos e foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas do vasodilatador nitroprussiato de sódio (NPS, 10^{-13} - 10^{-5} M), reconhecido doador de óxido nítrico (BATES et al.,1991; TOM et al., 2014).

Após a obtenção das curvas concentração-resposta, foram analisados os valores de CE_{50} e E_{max} das curvas individuais para cada grupo experimental.

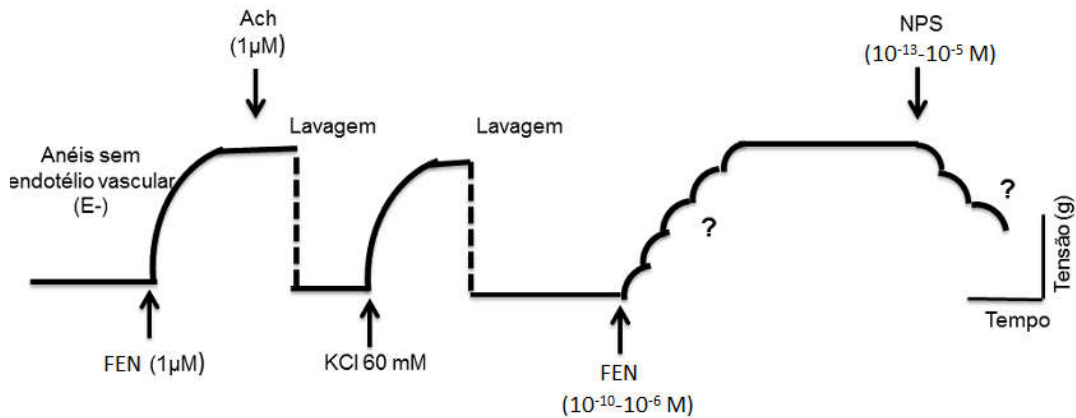


Figura 13 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da reatividade vascular dos animais submetidos ao tratamento subcrônico com carvedilol.

4.2 Ensaios *in vitro* eletrofisiológicos

Por meio dos ensaios eletrofisiológicos foram obtidos os registros de corrente de Ca_v tipo-L e TRPM, em células musculares lisas dissociadas de artéria mesentérica de ratos, bem como as influências do monoterpene carvedilol sobre estas correntes. Adicionalmente, foi avaliada a existência de diferenças entre as densidades de corrente de células musculares lisas dissociadas de animais hipertensos e normotensos.

Estes estudos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular: Eletrofisiologia, do Centro de Biotecnologia, na UFPB, o qual apresenta infraestrutura suficiente para realização dos experimentos eletrofisiológicos, além de apresentar a técnica já estabelecida e padronizada.

4.2.1 Preparação dos miócitos vasculares

As células musculares lisas foram dissociadas da artéria mesentérica de ratos SHR e Wistar. Após o procedimento cirúrgico de isolamento da artéria, a mesma foi dissecada e dividida em segmentos para facilitar a digestão enzimática. Uma vez dissecado, o tecido foi transferido para um tubo falcon, contendo papaína (0,7 mg/mL), albumina (1 mg/mL) e ditioneitol (1 mg/mL), que foram diluídos em solução salina fisiológica (SSF)-normal (Tabela 7), permanecendo por 30 min, à 37°C. Em seguida, as amostras foram transferidas para a solução SSF-baixo Ca^{2+} (Tabela 8) contendo colagenase (1 mg/mL), hialuronidase (0,9 mg/mL) e BSA (1 mg/mL) para a dissociação das células, durante 15 a 30 min, à 37°C. Foi realizado uma lavagem com SSF-baixo Ca^{2+} para a remoção das enzimas. Já dissociadas, as células foram centrifugadas por 1000 rpm durante 1 min. Suspensas em solução SSF- baixo Ca^{2+} e, após isto, as células foram transferidas para lamínulas e deixadas aderir por 20 min. Após adesão, os ensaios eletrofisiológicos foram iniciados.

4.2.2 Registros eletrofisiológicos

Para avaliarmos a influência do carvedilol sobre as correntes iônicas através dos canais Ca_v -tipo L e TRPM em miócitos vasculares de animais hipertensos e normotensos, foram realizados experimentos de fixação de voltagem pela técnica de *patch-clamp*, no modo "*whole-cell*," como descrito previamente (HAMILL et al., 1981). Para tanto, os miócitos foram estudados sob a plataforma de um microscópio invertido (Carl Zeiss, Alemanha), posicionado sobre uma mesa antivibratória com suspensão pneumática (TMC, EUA), onde os registros eletrofisiológicos foram obtidos. Um micromanipulador hidráulico de alta precisão (Narishige, Japão) foi usado para movimentação do eletrodo responsável pelo registro das correntes, e outro micromanipulador foi utilizado para posicionar a pipeta de perfusão, contendo a solução controle ou o composto testado. O uso da gaiola de faraday (TMC, EUA) minimizou as interferências elétricas no sistema preparado.

As correntes foram obtidas por meio de um amplificador (HEKA EPC10, Alemanha), filtradas por filtro passa-baixa a 2,0 kHz, convertidas em sinais

digitais com frequência de 10 kHz. Correntes de vazamento (“leakage”) foram removidas, com auxílio do protocolo P/4 no qual quatro pulsos de amplitude igual a $\frac{1}{4}$ do pulso teste foram aplicados e a resposta de corrente, foi então, somada e subtraída da corrente do pulso teste. As células que apresentaram valores altos para a resistência em série (acima de 5 M Ω) ou que não se mantiveram estáveis, não foram utilizadas na análise. As correntes foram adquiridas e analisadas em um computador PC-compatível usando-se o “software” PatchMaster e Fitmaster (HEKA Elektronik, Alemanha).

As micropipetas de vidro foram fabricadas por meio de um estirador (“puller”) vertical de 2 estágios (Narishige, Japão), as quais foram preenchidas conforme Tabela 9 (protocolos correntes de Ba²⁺) ou Tabela 12 e 13 (protocolos correntes tipo TRPM). Foram utilizadas resistências entre 4 - 5 M Ω para as micropipetas. Um fino fio de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) foi introduzido na micropipeta e o conjunto foi acoplado a um pré-amplificador (“headstage”) que, por sua vez, está conectado à entrada do amplificador. As células foram banhadas por uma solução externa, que pode ser visualizada na Tabela 10 (protocolos correntes de Ba²⁺) ou Tabelas 11 (protocolos correntes tipo TRPM). Todas as soluções foram submetidas a um filtro com porosidade (“mesh”) de 0,22 μm . A osmolaridade das soluções foi ajustada com glicose, para valores de aproximadamente 310 mOsm solução interna e 330 mOsm solução externa.

Os gigasetos (resistência $\geq 1\text{G}\Omega$) foram obtidos por meio de uma suave sucção feita no interior da micropipeta, e em seguida por meio de uma sucção mais vigorosa rompemos o pequeno fragmento de membrana que separava a solução interna, contida na pipeta, do citoplasma da célula em estudo. O aumento brusco do transiente capacitivo indicou a obtenção da configuração de “*whole-cell*”. Todos os registros foram realizados em células submetidas a um sistema de perfusão (Dagan, EUA), que consistiu de uma micropipeta de vidro (com aproximadamente 100 μm de diâmetro interno) conectada à saída de uma válvula solenóide, que estava alimentada por reservatórios de 5 mL, que continham solução externa (controle) sem adição das drogas testes e outros compartimentos com adição das drogas teste. Com auxílio da válvula solenoide foi possível selecionar os compartimentos que estavam ligados à pipeta de

perfusão, estabelecendo assim, um fluxo do seu conteúdo. Os fluxos ($\sim 0,1$ mL/min) foram impulsionados pela força da gravidade.



Figura 14 - Aparato utilizado para obtenção dos registros eletrofisiológicos.

4.2.3 Protocolos experimentais para obtenção dos registros eletrofisiológicos, utilizando miócitos vasculares de ratos hipertensos e normotensos

4.2.3.1 Avaliação do efeito do carvacrol sobre os Ca_v -tipo L em miócitos mesentéricos

Para confirmar a influência do carvacrol sobre o influxo de Ca^{2+} por Ca_v -tipo L de miócitos mesentéricos isolados de ratos hipertensos e normotensos, foram obtidos registros de correntes de Ba^{2+} . Para isto, as pipetas foram preenchidas com a solução interna descrita na Tabela 9. Nesta solução, o CsCl substituiu o íon K^+ e, junto com o TEA, teve a função de bloquear as correntes de K^+ . As células foram banhadas por uma solução externa, conforme descrita na Tabela 10, e, ao invés do Ca^{2+} , o bário (Ba^{2+}) foi usado como carreador, pois os canais para Ca^{2+} do tipo-L apresentam uma maior condutância para o Ba^{2+} em relação ao Ca^{2+} , facilitando assim a identificação destas correntes.

Então, para investigar o efeito do carvacrol sobre as correntes de Ba^{2+} , os miócitos foram mantidos em um potencial de “holding” de -80 mV e, em seguida, foram aplicados pulsos-testes de 100 ms de duração, despolarizando a célula para $+10$ mV, em intervalos de 5s (UCHIDA et al. 2001). As correntes de Ba^{2+} foram medidas na situação controle, com a célula perfundida por solução extracelular e na situação teste, com a célula perfundida com solução extracelular contendo carvacrol ($300 \mu\text{M}$) (Figura 15). Os dados foram expressos em pico de densidade de corrente (pA), normalizados pelos valores de capacitância da célula (pA/pF), em função da concentração do carvacrol.

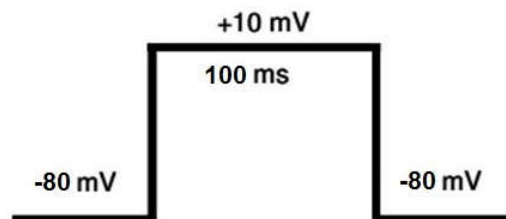


Figura 15 - Esquema representativo mostrando o protocolo experimental para avaliação do efeito de carvacrol ($300 \mu\text{M}$) sobre as correntes de Ba^{2+} , em miócitos da artéria mesentérica superior de rato SHR e Wistar.

4.2.3.2 Avaliação do efeito de carvacrol sobre correntes tipo-TRPM6/TRPM7 em miócitos mesentéricos

Para avaliar a influência do carvacrol sobre correntes tipo-TRPM6/TRPM7 em miócitos mesentéricos isolados de ratos hipertensos e normotensos, foram obtidos registros de correntes catiônicas. Para isto, as pipetas foram preenchidas com a solução interna descrita na Tabela 12, na ausência do Mg^{2+} intracelular, ou na Tabela 13, com a concentração intracelular do Mg^{2+} ($[Mg^{2+}]_i$) aumentada para 2mM, e as células foram banhadas pela solução externa descrita na Tabela 11.

Então, para investigar o efeito do carvacrol sobre as correntes por TRPM6/TRPM7 foi utilizado um protocolo de rampa de voltagem, onde os miócitos foram mantidos em um potencial de “holding” de 0 mV e em seguida, foram aplicados pulsos-testes de 200 ms de duração, despolarizando a célula de -100 mV para +100 mV, em intervalos de 15s (Figura 16). As correntes catiônicas foram medidas na situação controle, com a célula perfundida apenas por solução extracelular, e na situação teste, com a célula perfundida com solução extracelular contendo carvacrol (100 μ M ou 300 μ M) e/ou 2-APB (100 μ M) ou Mg^{2+} (2,5mM), conforme descrito na Tabela 15. Os dados foram expressos em densidade de corrente, onde os valores dos registros de corrente (pA) obtidos foram normalizados pela capacitância (pF) da membrana das células em estudo.

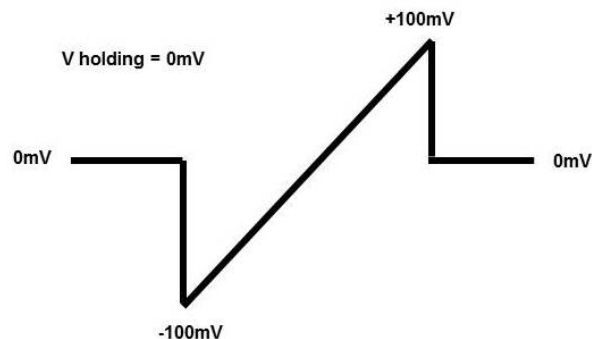


Figura 16 - Esquema representativo mostrando o protocolo experimental para avaliação do efeito de carvacrol (100 μ M e 300 μ M) sobre as correntes tipo-TRPM6/TRPM7, em miócitos da artéria mesentérica superior de animal SHR e Wistar. Correntes filtradas em 2,9 kHz e digitalizadas a 10 kHz. De -100 mV a + 100 mV, com 200 ms de duração.

Tabela 15 – Ensaio realizados para medir correntes tipo-TRPM6/TRPM7

Ensaio 1: ([Mg²⁺]_i = 0 mM)	Ensaio 2: ([Mg²⁺]_i = 2,0 mM)
rampa controle	rampa controle
rampa com Mg ²⁺ (2,5mM)	rampa com Mg ²⁺ (2,5mM)
rampa com carvacrol (100µM)	rampa com carvacrol (100µM)
rampa carvacrol (100µM) + 2-APB (100µM)	rampa carvacrol (100µM) + 2-APB (100µM)
rampa com carvacrol (300µM)	rampa com carvacrol (300µM)
rampa carvacrol (300µM) + 2-APB (100µM)	rampa carvacrol (300µM) + 2-APB (100µM)

4.3 Ensaio farmacológicos *in vivo*

Os ensaios *in vivo* foram realizados no Laboratório de Neurociências, na Universidade Federal da Bahia.

4.3.1. Investigação do potencial anti-hipertensivo do carvacrol em animais SHR

Para avaliar o potencial anti-hipertensivo do carvacrol, os animais SHR foram tratados por via orogástrica com este monoterpene, durante 20 dias, a partir da 9ª semana de idade.

Os animais SHR submetidos ao tratamento com carvacrol por gavagem foram divididos em dois grupos de animais, os quais estão descritos abaixo:

Grupo 1: controle negativo – Veículo (cremofor)

Grupo 2: Carvacrol (50 mg/Kg/Dia)

Todos os animais foram mantidos em caixas individuais, sob condições controladas de temperatura (21±1°C), submetidos a um ciclo claro-escuro e

com livre acesso à ração e água. Os SHR animal foram pesados diariamente antes do carvacrol ou veículo serem administrados por gavagem, o correspondente a 0,1 mL/100g de peso corporal. Durante os 20 dias de tratamento, a pressão sanguínea dos animais foi monitorada a cada cinco dias por plestimografia de cauda.

No último dia do tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, a artéria mesentérica superior, assim como os corações desses animais foram removidos e livres de tecido conjuntivo e adiposo. O coração foi pesado para avaliar de indícios de hipertrofia cardíaca e as artérias foram utilizadas para os experimentos de reatividade vascular *in vitro* (ver detalhes destes ensaios nos tópicos 5.1.3.1 e 5.1.3.2).

4.4 Análise estatística

Os valores foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.). As curvas concentração-resposta foram ajustadas segundo equação logística de quatro parâmetros ou equação de Hill. Para estudar o efeito vasodilatador induzido pelo monoterpene carvacrol, dois parâmetros farmacológicos foram analisados: a eficácia farmacológica (E_{max} , resposta máximo induzida pela substância) e a potência farmacológica (pD_2 , logaritmo negativo da concentração de uma substância que induz 50% do efeito máximo, $-\log CE_{50}$).

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

Os registros eletrofisiológicos foram normalizados em pA/pF, sendo extraída a media \pm desvio padrão da média (d.p.m.), de um número significativo de células. As diferenças estatísticas foram avaliadas usando o teste *t* de student ou ANOVA *one-way*, seguido de teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ indicaram diferença significativa.

Resultados

5 Resultados

5.1 Efeitos farmacológicos *in vitro* induzidos por carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais hipertensos e normotensos

5.1.1 Efeito vasodilatador induzido por carvacrol em anéis mesentéricos

A Figura 17 mostra que a adição cumulativa de carvacrol (10^{-8} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica isolada de animal SHR e Wistar, com endotélio funcional íntegro e pré-contraídos com 1 μ M de FEN, induziu um vasorelaxamento dependente de concentração ($E_{m\acute{a}x} = 115,14 \pm 5,46\%$; $pD_2 = 5,13 \pm 0,05$; $N = 8$; e $E_{m\acute{a}x} = 113,68 \pm 5,49\%$; $pD_2 = 4,38 \pm 0,06$; $N = 8$; respectivamente). Em animal SHR, após a remoção do endotélio vascular, a potência farmacológica de carvacrol foi reduzida de maneira significativa ($pD_2 = 4,91 \pm 0,05$; $N = 9$; $p < 0,01$), porém, este não houve diferença estatística em relação à eficácia da droga ($E_{m\acute{a}x} = 112,80 \pm 5,39\%$; $N = 9$). Enquanto que em animais wistar, a curva concentração-resposta do carvacrol não foi alterada significativamente ($E_{m\acute{a}x} = 115,64 \pm 3,98\%$; $pD_2 = 4,17 \pm 0,04$; $N = 8$) (Tabela 16).

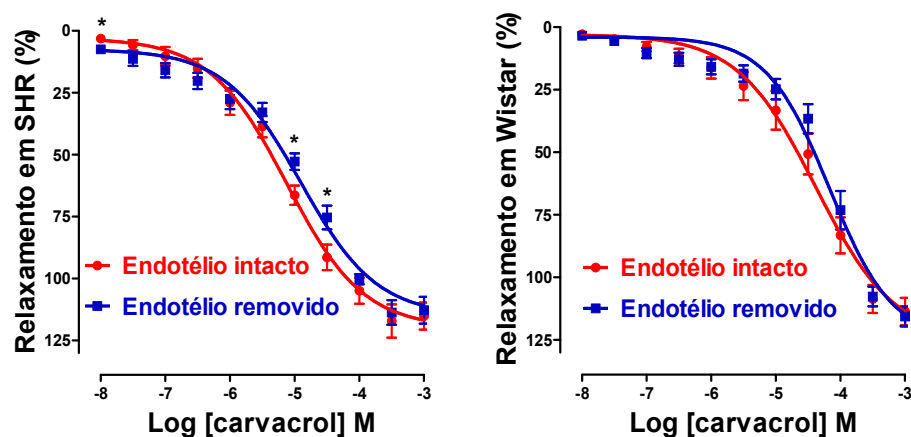


Figura 17 - Efeito vasodilatador induzido por carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato. Curva concentração-resposta para o carvacrol (10^{-8} - 10^{-3} M, cumulativamente) em anéis de animais SHR ou Wistar, com o endotélio intacto (●) ou endotélio funcional removido (■), pré-contraídos com FEN (1 μ M). Os valores estão expressos com média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ versus endotélio intacto.

5.1.2 Efeito de carvacrol sobre o influxo de Ca^{2+} em anéis mesentéricos, mantidos em meio despolarizante e nominalmente sem Ca^{2+}

A Figura 18 mostra que a administração cumulativa de CaCl_2 (10^{-6} – 3×10^{-2} M) promoveu uma contração (Controle: $E_{\text{máx}} = 100.0 \pm 0.0\%$), dependente de concentração, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos e normotensos, na ausência de endotélio funcional, incubados com solução despolarizante (KCl 60 mM) e nominalmente sem Ca^{2+} . Quando os anéis foram encubados previamente com carvacrol (10^{-4} e 10^{-3} M), a curva concentração-resposta para CaCl_2 foi significativamente reduzida ($E_{\text{máx}} = 24,60 \pm 7,66\%$ e $E_{\text{máx}} = 6,10 \pm 1,72\%$, respectivamente; $N = 5$; $***p < 0,0001$ *versus* controle). Enquanto que, na concentração de 10^{-5} M testada de carvacrol, a eficácia do CaCl_2 em induzir contração foi estatisticamente aumentada ($E_{\text{máx}} = 126,33 \pm 4,06\%$; $N = 5$; $***p < 0,0001$; $**p < 0,001$ *versus* controle). Em animal normotenso, a concentração de carvacrol (10^{-5} M) também aumentou a contração induzida por CaCl_2 ($E_{\text{máx}} = 118,83 \pm 3,95\%$; $N = 5$), porém, os ensaios com carvacrol nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-3} M estão sendo finalizados para fins comparativos (Figura 18).

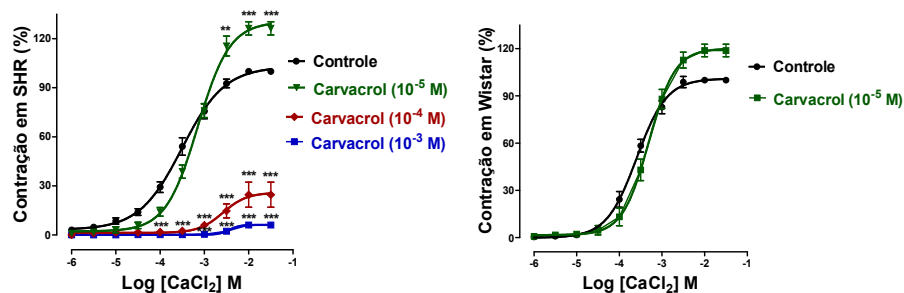


Figura 18 – Efeito de carvacrol sobre o influxo de Ca^{2+} em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato hipertenso e normotenso. Curva concentração-resposta para CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 60 mM) e nominalmente sem Ca^{2+} , em anéis mesentéricos desprovidos de endotélio funcional (Controle) e na presença de concentrações isoladas de carvacrol (10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M), em animal SHR e Wistar, respectivamente. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. $***p < 0,0001$ e $**p < 0,001$ *versus* Controle.

5.1.3 Efeito de carvacrol sobre o influxo de Ca^{2+} por ROC e SOC em anéis mesentéricos

Para avaliar se o efeito de carvacrol em reduzir no influxo de Ca^{2+} por atuar sobre os canais operados por receptor (ROC) e os canais operados por estoque (SOC), foram realizados experimentos em anéis mesentéricos de ratos hipertensos e normotensos, na ausência do endotélio funcional, e mantidos em meio nominalmente sem Ca^{2+} , na presença de FEN (1 μM), ácido ciclopiazônico (CPA, 20 μM) e nifedipina (1 μM). Nestas condições, foi obtida uma contração em resposta ao CaCl_2 (10^{-2}M) na ausência (Controle) ou na presença de carvacrol (10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M). A contração induzida por CaCl_2 ($E_{\text{máx}} = 100,0 \pm 0,0\%$; N = 19) em anéis de animais hipertensos, foi significativamente atenuada por carvacrol nas três diferentes concentrações testadas ($E_{\text{máx}} = 41,21 \pm 11,54\%$; N = 7; $E_{\text{máx}} = 40,62 \pm 4,25\%$, N = 7; $E_{\text{máx}} = 26,39 \pm 11,60$; N = 5; respectivamente; $***p < 0,0001$ versus controle). Resultados semelhantes foram observados em anéis mesentéricos de ratos normotensos, onde a presença de carvacrol (10^{-4} e 3×10^{-4} M) atenuou significativamente a contração induzida por CaCl_2 ($E_{\text{máx}} = 39,4 \pm 5,5\%$ e $11,6 \pm 3,1\%$; $***p < 0,0001$) (Figura 19).

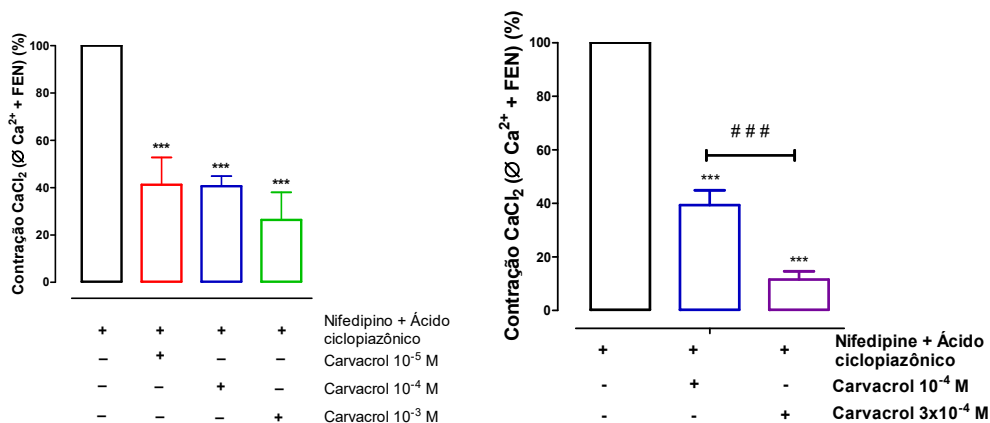


Figura 19 – Efeito de carvacrol sobre o influxo de Ca^{2+} por ROC e SOC em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato hipertenso e normotenso. Curva concentração-resposta para CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 60 mM) e nominalmente sem Ca^{2+} , em anéis mesentéricos desprovidos de endotélio funcional (Controle) e na presença de concentrações isoladas de carvacrol (10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) em animal SHR, e de concentrações isoladas de carvacrol (10^{-4} e 3×10^{-4} M) em Wistar, respectivamente. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. $***p < 0,0001$ e $**p < 0,001$ versus Controle.

5.1.4 Influência do Vermelho de Rutênio (VR) na resposta vasodilatadora induzida por carvacrol em anéis mesentéricos

Para avaliar a participação dos subtipos de canais TRP sensíveis ao Vermelho de Rutênio (VR) no efeito vasorelaxante induzido por carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais SHR e Wistar, experimentos foram realizados na presença de VR (10 μ M) que, nesta concentração, bloqueia não seletivamente os canais TRPV1, TRPV5, TRPV6, TRPC3, TRPA1 e TRPM6 (CLAPHAM et al., 2005). Na presença do VR, a curva concentração-resposta induzida por carvacrol em anéis pré-contraídos com FEN (1 μ M) e na ausência do endotélio funcional, não foi alterada estatisticamente ($E_{m\acute{a}x} = 115,58 \pm 7,28\%$; $pD_2 = 5,07 \pm 0,07$; $N = 6$; $E_{m\acute{a}x} = 121,75 \pm 5,53\%$; $pD_2 = 4,29 \pm 0,05$; $N = 5$; valores referentes aos animais SHR e Wistar, respectivamente) (Figura 20; Tabela 16).

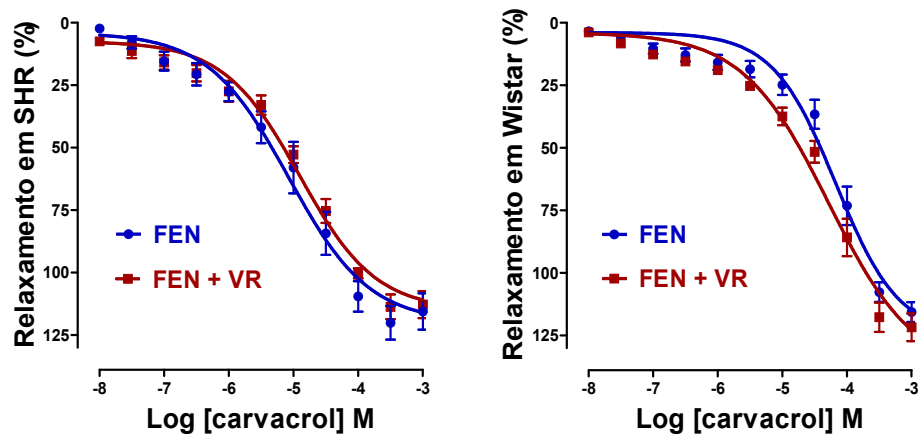


Figura 20 - Influência do Vermelho de Rutênio (VR), um bloqueador não-seletivo dos canais TRPV1, TRPV5, TRPV6, TRPC3, TRPA1 e TRPM6, nos efeitos vasculares induzidos por carvacrol. Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 10^{-3} M, cumulativamente) em anéis mesentéricos de animais SHR e Wistar, com endotélio vascular ausente e pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (●) ou na presença (■) de VR (10 μ M). Os valores são expressos como a média \pm e.p.m.

5.1.5 Influência do íon gadolínio (Gd^{3+}) na resposta vasodilatadora induzida por carvacrol em anéis mesentéricos

Para investigar a participação dos subtipos de canais TRP sensíveis ao íon gadolínio (Gd^{3+}) no efeito vasorelaxante induzido por carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais SHR e Wistar, ensaios foram conduzidos em anéis com endotélio funcional ausente e pré-contraídos com FEN (1 μ M), na presença de Gd^{3+} (10 μ M), o qual, nesta concentração, bloqueia os canais TRPCs (LIEVREMONT; BIRD; PUTNEY, 2004; MCELROY; GURNEY; DRUMMOND, 2008). Em animal SHR, a presença do Gd^{3+} diminuiu significativamente a potência farmacológica de carvacrol ($pD_2 = 4,23 \pm 0,09$; N = 10; $p < 0,0001$), porém, não modificou a eficácia farmacológica do monoterpene ($E_{m\acute{a}x} = 112,34 \pm 3,61\%$; N = 10) quando comparado ao controle na ausência do bloqueador (ver Tabela 16). Por outro lado, em animal Wistar, a potência e a eficácia farmacológicas do carvacrol não foram alteradas estatisticamente ($pD_2 = 3,91 \pm 0,07$; $E_{m\acute{a}x} = 120,18 \pm 3,03\%$, respectivamente; N = 6), quando comparadas ao controle na ausência do Gd^{3+} (Figura 21).

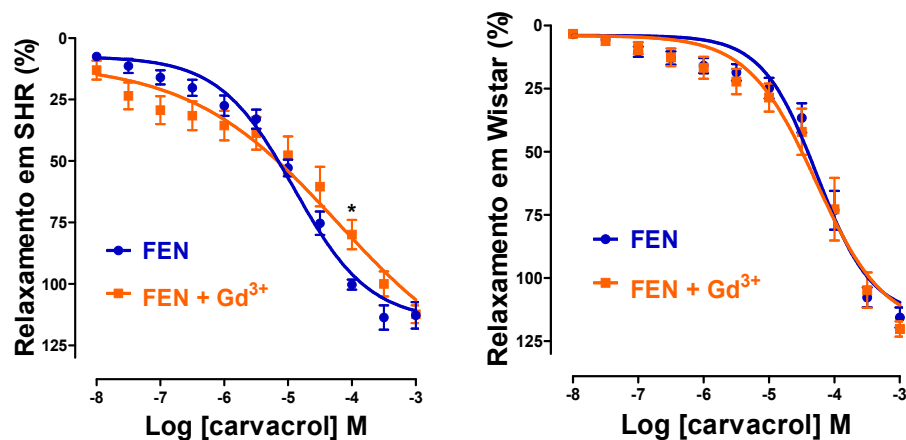


Figura 21 - Influência do íon gadolínio (Gd^{3+}), um bloqueador não seletivo dos canais TRPCs nos efeitos vasculares induzidos por carvacrol. Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 10^{-3} M, cumulativamente) em anéis mesentéricos de animais SHR e Wistar, com endotélio vascular ausente e pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (\bullet) ou na presença (\blacksquare) de Gd^{3+} (10 μ M). Os valores são expressos como a média \pm e.p.m. * $p < 0,01$ versus FEN.

5.1.6 Influência do 2-Aminoetoxidifenilborato (2-APB) na resposta vasodilatadora induzida por carvacrol em anéis mesentéricos

Para investigar a participação dos subtipos de canais TRP sensíveis ao 2-Aminoetoxidifenilborato (2-APB) no efeito vasorelaxante induzido por carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais SHR e Wistar, experimentos foram realizados em anéis com endotélio funcional ausente e pré-contraídos com FEN (1 μ M), na presença de 2-APB (1 μ M), que, nesta concentração, bloqueia o TRPM2 (TOGASHI; INADA; TOMINAGA, 2008). Em animal SHR, a presença do 2-APB diminui significativamente a potência farmacológica de carvacrol ($pD_2 = 4,07 \pm 0,06$; $N = 6$; $p < 0,001$), porém, não modificou a eficácia farmacológica do monoterpene ($E_{m\acute{a}x} = 105,61 \pm 3,03\%$; $N = 6$) quando comparado ao controle na ausência do bloqueador. Por outro lado, em animal Wistar, a potência e a eficácia farmacológicas do carvacrol não foram alteradas estatisticamente ($pD_2 = 4,10 \pm 0,06$; $E_{m\acute{a}x} = 113,66 \pm 5,66\%$, respectivamente; $N = 5$), quando comparadas ao controle na ausência do 2-APB (Figura 22; Tabela 16).

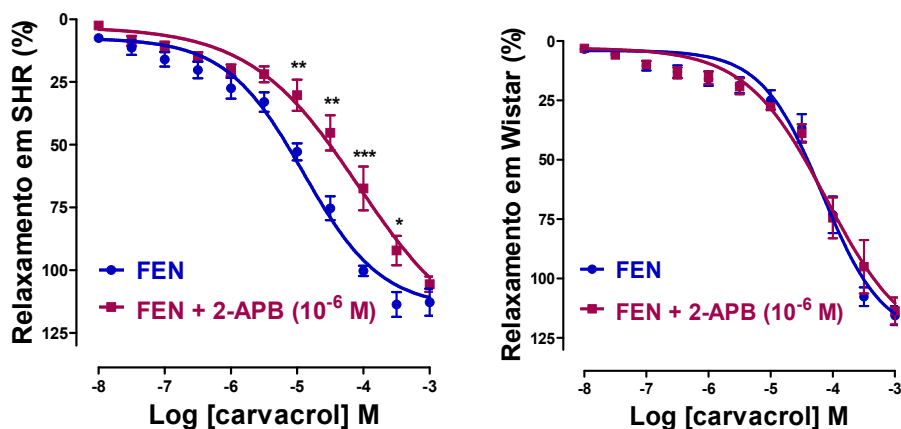


Figura 22- Influência do 2-Aminoetoxidifenilborato (2-APB), um bloqueador não seletivo dos canais TRPM2, nos efeitos vasculares induzidos por carvacrol. Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 10^{-3} M, cumulativamente) em anéis mesentéricos de animais SHR e Wistar, com endotélio vascular ausente e pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (●) ou na presença (■) de 2-APB (1 μ M). Os valores são expressos como a média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus FEN.

5.1.7 Influência do 2-Aminoetoxidifenilborato (2-APB) na resposta vasodilatadora induzida por carvacrol em anéis mesentéricos

Para investigar a participação dos subtipos de canais TRP sensíveis ao 2-Aminoetoxidifenilborato (2-APB) no efeito vasorelaxante induzido por carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais SHR e Wistar, experimentos foram realizados em anéis com endotélio funcional ausente e pré-contraídos com FEN (1 μM), na presença de 2-APB (10 μM), que, nesta concentração, bloqueia os TRPC4-7 e o TRPM8 (CHE et al., 2014; CHUNG et al., 2014; HU et al., 2004). Em animal SHR, a presença do 2-APB reduziu significativamente a potência farmacológica de carvacrol ($pD_2 = 4,46 \pm 0,06$; $N = 6$; $p < 0,001$), porém, não modificou a eficácia farmacológica do monoterpeno ($E_{\text{máx}} = 119,02 \pm 5,53\%$; $N = 6$) quando comparado ao controle na ausência do bloqueador. Por outro lado, em animal Wistar, a potência e a eficácia farmacológicas do carvacrol não foram alteradas estatisticamente ($pD_2 = 4,11 \pm 0,05$; $E_{\text{máx}} = 105,16 \pm 5,51\%$, respectivamente; $N = 5$), quando comparadas ao controle na ausência do 2-APB (Figura 23; Tabela 16).

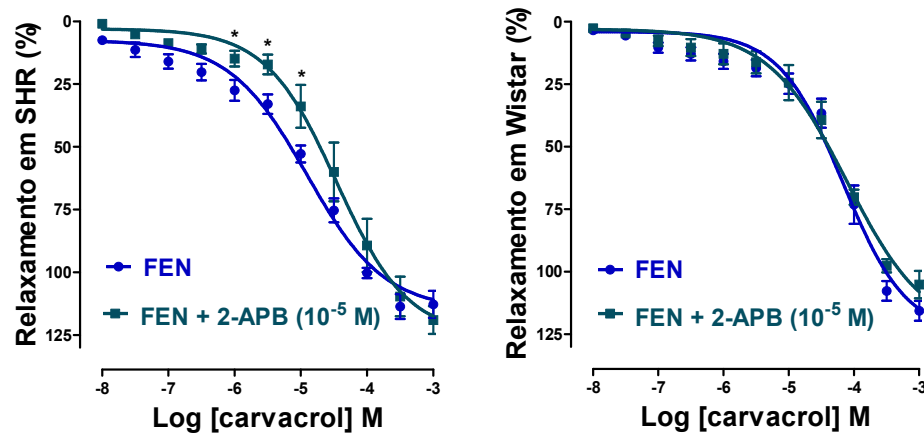


Figura 23 - Influência do 2-Aminoetoxidifenilborato (2-APB), um bloqueador não seletivo dos canais TRPC4-7 e o TRPM8, nos efeitos vasculares induzidos por carvacrol. Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 10^{-3} M, cumulativamente) em anéis mesentéricos de animais SHR e Wistar, com endotélio vascular ausente e pré-contraídos com FEN (1 μM), na ausência (●) ou na presença (■) de 2-APB (10 μM). Os valores são expressos como a média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ versus FEN.

5.1.8 Influência do BCTC na resposta vasodilatadora induzida por carvacrol em anéis mesentéricos

Com o intuito de avaliar a participação dos canais TRPM8 e TRPV1 no efeito vasorelaxante induzido por carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais SHR e Wistar, ensaios foram conduzidos em anéis com endotélio funcional ausente e pré-contraídos com FEN (1 μM), na presença de BCTC (2 μM), que bloqueia os canais TRPV1 e TRPM8 (BEHRENDT et al., 2004; CLAPHAM et al., 2005). Em animal SHR, a presença do deste bloqueador alterou significativamente a potência farmacológica de carvacrol ($pD_2 = 4,44 \pm 0,05$; $N = 6$; $p < 0,001$), porém, não modificou a eficácia farmacológica do monoterpene ($E_{m\acute{a}x} = 110,75 \pm 3,01\%$; $N = 6$) quando comparado ao controle na ausência do bloqueador. Por outro lado, em animal Wistar, a potência e a eficácia farmacológicas do carvacrol não foram alteradas estatisticamente ($pD_2 = 4,37 \pm 0,04$; $E_{m\acute{a}x} = 105,80 \pm 2,79\%$; respectivamente; $N = 5$), quando comparadas ao controle na ausência do BCTC (Figura 24; Tabela 16).

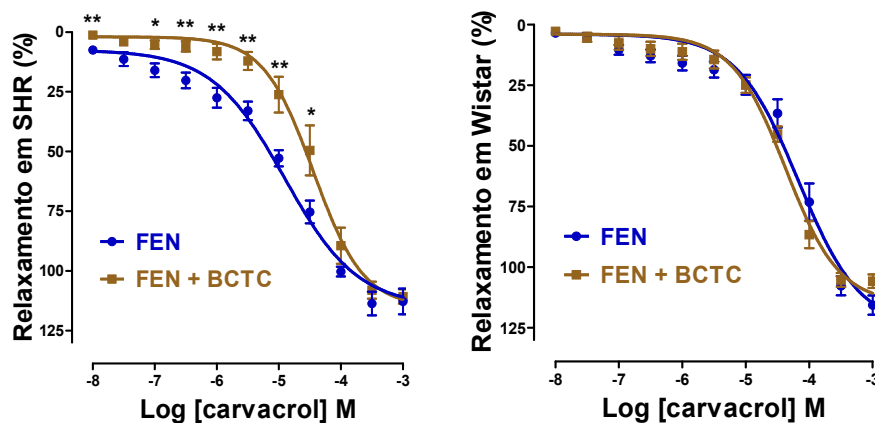


Figura 24 - Influência do BCTC, um bloqueador não seletivo dos canais TRPV1 e TRPM8, nos efeitos vasculares induzidos por carvacrol. Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 10^{-3} M, cumulativamente) em anéis mesentéricos de animais SHR e Wistar, com endotélio vascular ausente e pré-contraídos com FEN (1 μM), na ausência (●) ou na presença (■) de BCTC (2 μM). Os valores são expressos como a média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus FEN.

5.1.9 Influência do 9-fenantrol na resposta vasodilatadora induzida por carvacrol em anéis mesentéricos

Com o intuito de avaliar a participação dos canais TRPM4 no efeito vasorelaxante induzido por carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais SHR e Wistar, ensaios foram conduzidos em anéis com endotélio funcional ausente e pré-contraídos com FEN (1 μ M), na presença de 9-fenantrol (10 μ M), que, nesta concentração, bloqueia mais seletivamente os canais TRPM4 (GUINAMARD; HOF; DEL NEGRO, 2014; GRAND et al., 2008). Na presença do 9-fenantrol, a curva concentração-resposta induzida por carvacrol em anéis pré-contraídos com FEN (1 μ M) e na ausência do endotélio funcional, foi alterada significativamente ($E_{m\acute{a}x} = 113,54 \pm 7,72\%$; $pD_2 = 4,54 \pm 0,06$; $N = 5$; $E_{m\acute{a}x} = 121,67 \pm 5,58\%$; $pD_2 = 4,23 \pm 0,06$; $N = 5$; valores referentes aos animais SHR e Wistar, respectivamente), quando comparadas ao controle na ausência do bloqueador (Figura 25 e Tabela 16).

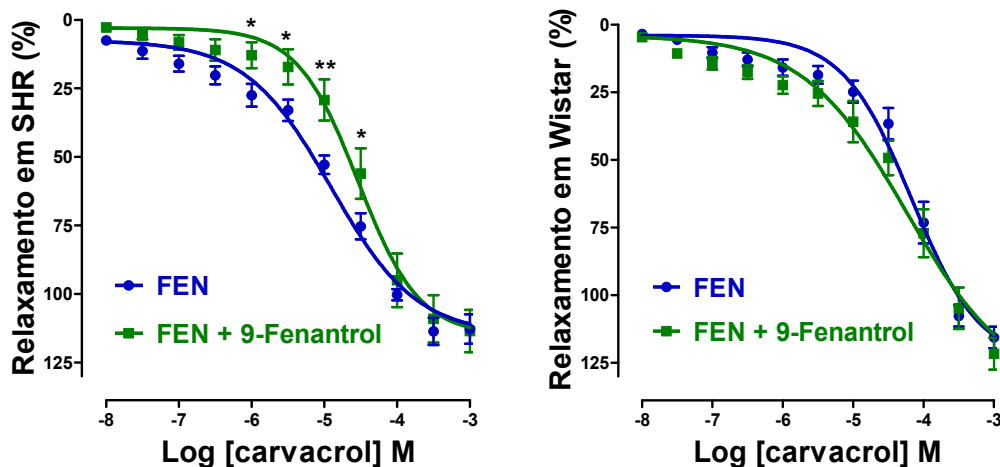


Figura 25 - Influência do 9-fenantrol, um bloqueador seletivo do canal TRPM4, nos efeitos vasculares induzidos por carvacrol. Curva concentração-resposta para carvacrol (10^8 - 10^3 M, cumulativamente) em anéis mesentéricos de animais SHR e Wistar, com endotélio vascular ausente e pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (●) ou na presença (■) de 9-fenantrol (10 μ M). Os valores são expressos como a média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus FEN.

5.1.10 Influência do HC03003-1 na resposta vasodilatadora induzida por carvacrol em anéis mesentéricos

Com o intuito de avaliar a participação do canal TRPA1 no efeito vasorelaxante induzido por carvacrol em anéis de artéria mesentérica superior isolada de animais SHR e Wistar, ensaios foram conduzidos em anéis com endotélio funcional ausente e pré-contraídos com FEN (1 μ M), na presença de HC03003-1 (10 μ M), o qual, nesta concentração, bloqueia seletivamente o canal TRPA1 (EARLEY, 2012; MCNAMARA et al., 2007). Em animal SHR, a presença deste bloqueador alterou significativamente a potência farmacológica de carvacrol ($pD_2 = 4,42 \pm 0,05$; $N = 6$; $p < 0,0001$), porém, não modificou a eficácia farmacológica do monoterpene ($E_{m\acute{a}x} = 103,03 \pm 4,29\%$; $N = 6$) quando comparado ao controle na ausência do bloqueador. Por outro lado, em animal Wistar, a potência e a eficácia farmacológicas do carvacrol não foram alteradas estatisticamente ($pD_2 = 4,02 \pm 0,04$; $E_{m\acute{a}x} = 114,89 \pm 2,35\%$; respectivamente; $N = 5$), quando comparadas ao controle na ausência do HC03003-1 (Figura 26; Tabela 16).

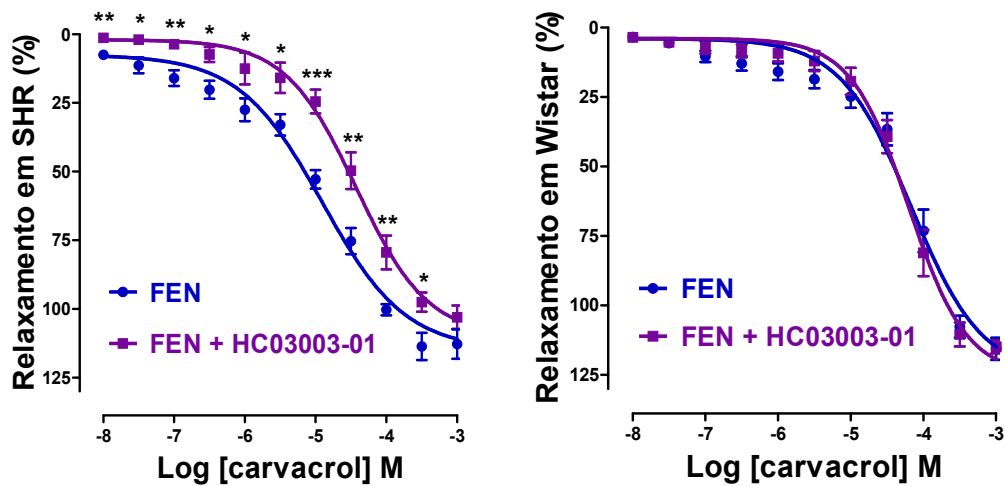


Figura 26 - Influência do HC03003-1, um bloqueador seletivo do canal TRPA1, nos efeitos vasculares induzidos por carvacrol. Curva concentração-resposta para carvacrol (10^{-8} - 10^{-3} M, cumulativamente) em anéis mesentéricos de animais SHR e Wistar, com endotélio vascular ausente e pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (●) ou na presença (■) de HC03003-1 (10 μ M). Os valores são expressos como a média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus FEN.

Tabela 16 - Efeito vasorelaxante de carvacrol em contrações induzidas por fenilefrina (FEN, 1 μ M)

	SHR			Wistar		
	E _{máx} (%)	pD ₂	N	E _{máx} (%)	pD ₂	N
Endotélio intacto	115,14 ± 5,46	5,13 ± 0,05	8	113,68 ± 5,49	4,38 ± 0,06	8
Endotélio removido	112,80 ± 5,39	4,91 ± 0,05 [#]	9	115,64 ± 3,98	4,17 ± 0,04 ^{***@}	8
Vermelho de Rutênio	115,58 ± 7,28	5,07 ± 0,07	6	121,75 ± 5,53	4,29 ± 0,05	5
Íon Lantânio	111,00 ± 5,46	4,78 ± 0,05	8	100,74 ± 4,95*	3,91 ± 0,07*	5
Íon Gadolínio	112,34 ± 3,61	4,23 ± 0,09 ^{***}	10	120,18 ± 3,03	3,91 ± 0,07	6
2-APB (1 μ M)	105,61 ± 3,03	4,07 ± 0,06 ^{***}	6	113,66 ± 5,66	4,10 ± 0,06	5
2-APB (10 μ M)	119,02 ± 5,53	4,46 ± 0,06 ^{**}	6	105,16 ± 5,51	4,11 ± 0,05	5
BCTC	110,75 ± 3,01	4,44 ± 0,05 ^{**}	6	105,80 ± 2,79	4,37 ± 0,04	5
9-Fenantrol	113,54 ± 7,72	4,54 ± 0,06*	5	121,67 ± 5,58	4,23 ± 0,06	5
HC03003-1	103,03 ± 4,29	4,42 ± 0,05 ^{***}	6	114,89 ± 2,35	4,02 ± 0,04	5

Os valores são expressos como média \pm e.p.m. O teste *t de Student* não pareado foi usado para examinar a diferença entre o endotélio removido e endotélio intacto de cada grupo experimental; ANOVA *one-way*, seguida do pós-teste de Bonferroni, foi utilizado para comparar endotélio desnudo com diferentes grupos. [#]p<0,01 *versus* endotélio intacto de SHR; [@]p<0,05 *versus* endotélio intacto de Wistar; ^{**}p<0,001 e ^{***}p<0,0001 *versus* endotélio removido de SHR; ^{*}p<0,05 *versus* endotélio removido de Wistar.

Os resultados obtidos com estes ensaios foram resumidos na Figura 27.

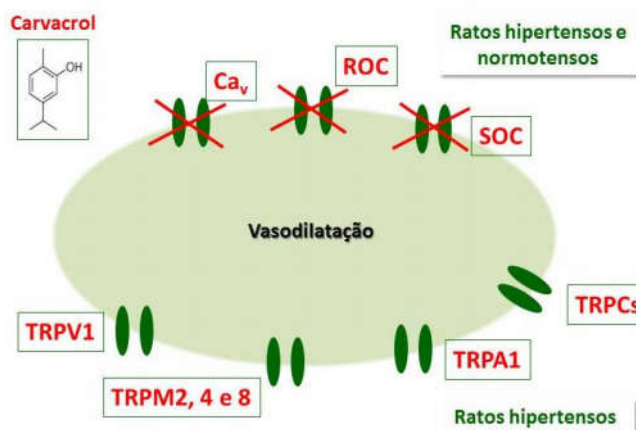


Figura 27. Sumário dos resultados dos ensaios funcionais em artéria mesentérica.

5.2 Efeitos farmacológicos *in vitro* induzidos por carvacrol em células musculares lisas dissociadas de artéria mesentérica de ratos hipertensos e normotensos

5.2.1 Efeito de carvacrol sobre os Ca_v tipo-L em miócitos mesentéricos

Para avaliar o efeito de carvacrol sobre as correntes iônicas de canais Ca_v, foram realizados experimentos de fixação de voltagem usando a técnica de “patch-clamp” em células musculares lisas recém-dispersas de artéria mesentérica. A Figura 28A mostra um registro original representativo obtido na presença e na ausência (controle) de carvacrol (300μM) em uma única célula recém-dispersa de mesentérica de ratos hipertensos, e a Figura 28B mostra em uma célula de ratos normotensos. Em miócitos de hipertensos, carvacrol (300μM) reduziu significativamente (**p<0,001) as correntes de entrada de Ba²⁺ de $-12,59 \pm 0,58$ pA/pF (controle, N = 5) para $-3,78 \pm 0,51$ pA/pF (N = 5), enquanto que, em miócitos de normotensos, esta redução foi de $-8,41 \pm 0,71$ pA/pF (N = 5) para $-2,42 \pm 0,21$ pA/pF (N = 5), como pode ser observado na Figura 29.

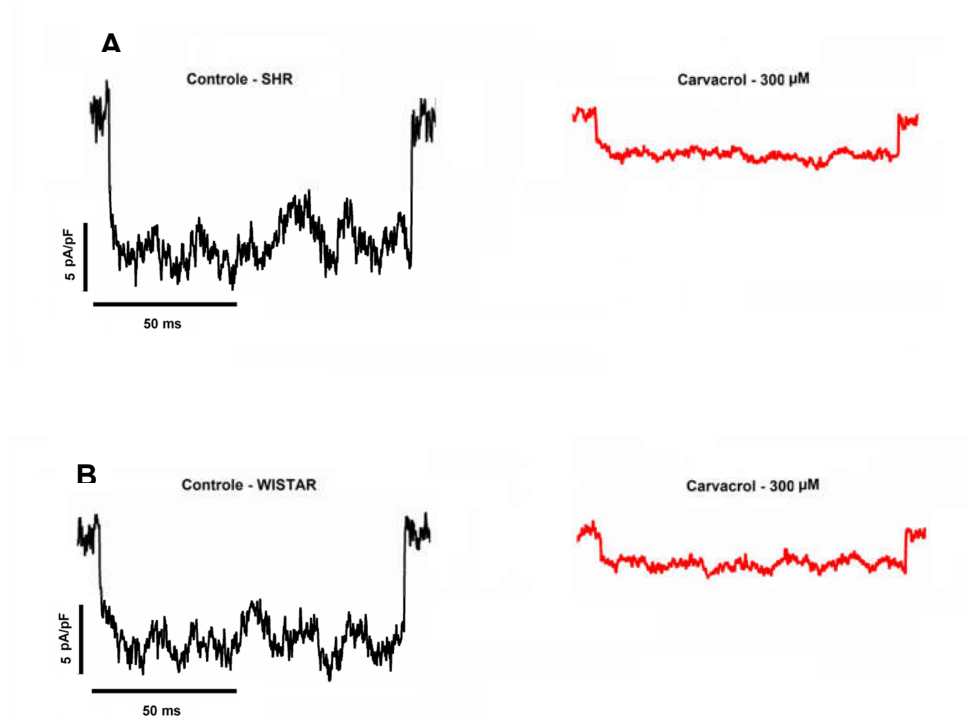


Figura 28 – Traçado representativo mostrando o efeito de carvedilol (300μM) sobre correntes de Ba^{2+} por Ca_v tipo-L. Correntes de entrada de Ba^{2+} obtidas por pulsos despolarizantes a +10 mV, partindo de um potencial de holding de -80 mV, em uma única célula recém-dispersa de artéria mesentérica superior isolada de ratos: A) SHR e B) Wistar.

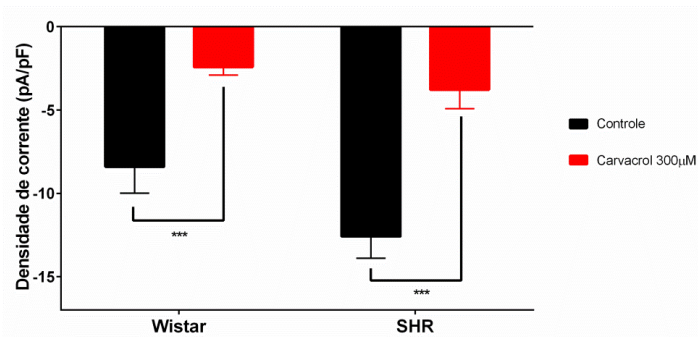


Figura 29 - Efeito de carvedilol sobre as correntes de Ba^{2+} em animais hipertensos e normotensos. Gráfico de barras representando a densidade de corrente (pA/pF) inibida por carvedilol (300μM). Os valores estão expressos como média \pm d.p.m. N=5 células para cada situação experimental. *** $p < 0,001$ versus controle.

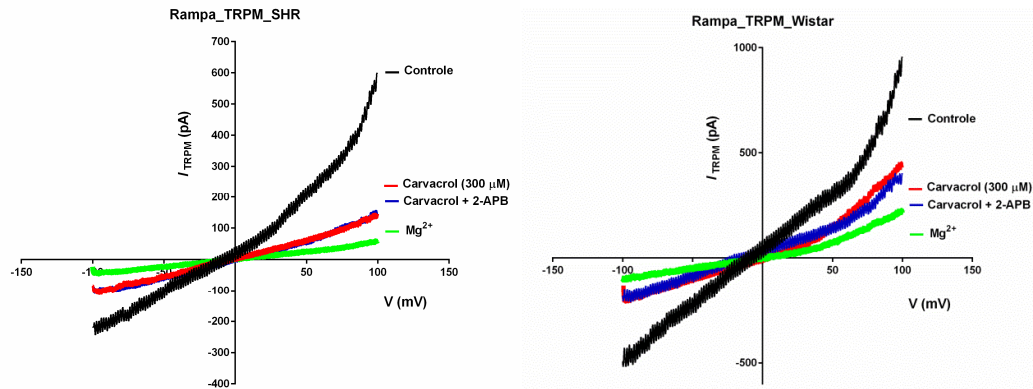
5.2.2 Efeito de carvacrol sobre correntes tipo-TRPM6/TRPM7 em miócitos mesentéricos

Para avaliar o efeito de carvacrol sobre as correntes tipo-TRPM6/TRPM7 ($I_{TRPM6/TRPM7}$), foram realizados experimentos de *voltage clamp* usando a técnica de “patch-clamp” em células musculares lisas recém-dispersas de artéria mesentérica de ratos hipertensos e normotensos, conforme descrito na metodologia. As Figuras 30A-C mostram que carvacrol (100 μ M ou 300 μ M) reduziu a densidade de $I_{TRPM6/TRPM7}$, obtida a partir de uma rampa de voltagem de -100mV a +100mV, num intervalo de 200ms, quando comparado ao controle. A adição de Mg^{2+} (2,5mM – controle positivo) também reduziu as correntes tipo-TRPM6/TRPM7. Além disso, a adição do 2-APB (100 μ M) junto ao carvacrol (100 μ M ou 300 μ M) também reduziu estas correntes.

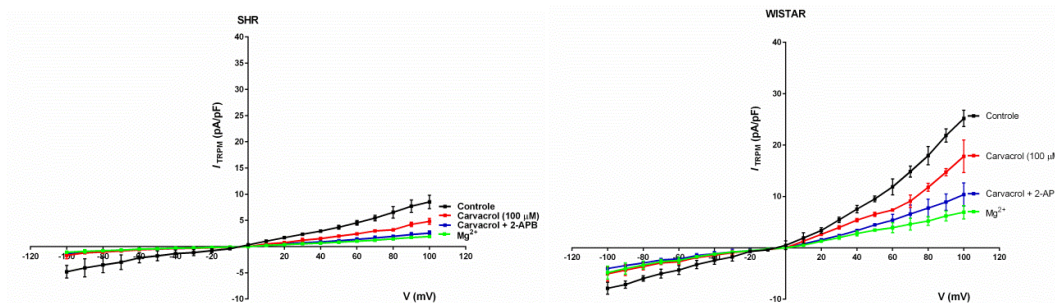
A Figura 30A ilustra o registro original representativo de uma única célula isolada de artéria mesentérica de ratos hipertensos e normotensos, respectivamente. As Figuras 30B e 31C ilustram a relação corrente-voltagem (I/V) de 5 células diferentes de animais hipertensos e normotensos, mostrando que carvacrol (100 μ M e 300 μ M, respectivamente,), tanto na presença quanto na ausência de 2-APB, foi capaz de reduzir as rampas de $I_{TRPM6/TRPM7}$, assim como o Mg^{2+} (controle positivo).

A análise estatística pontual dos efeitos de carvacrol em dois estímulos de voltagem diferentes, em -80mV e em +80mV, pode ser visualizada nas Figuras 31A e 31B. A Figura 31A mostra que, em ratos hipertensos e normotensos, respectivamente, o carvacrol (100 μ M) reduziu estatisticamente as densidades de $I_{TRPM6/TRPM7}$ (pA/pF) de entrada e de saída, cujos valores podem ser visualizados na Tabela 17A. Além disso, A Figura 31B mostra que em hipertensos e normotensos, respectivamente, carvacrol (300 μ M) também reduziu a densidade de $I_{TRPM6/TRPM7}$ (pA/pF), cujos valores e suas respectivas análises estatísticas podem ser visualizados na Tabela 17B.

A)



B)



C)

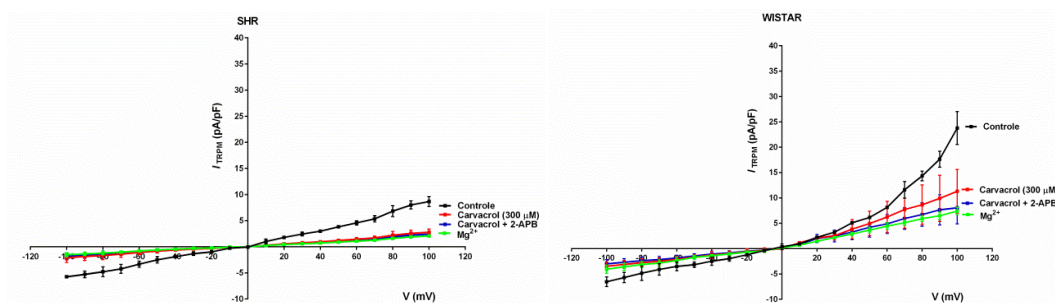
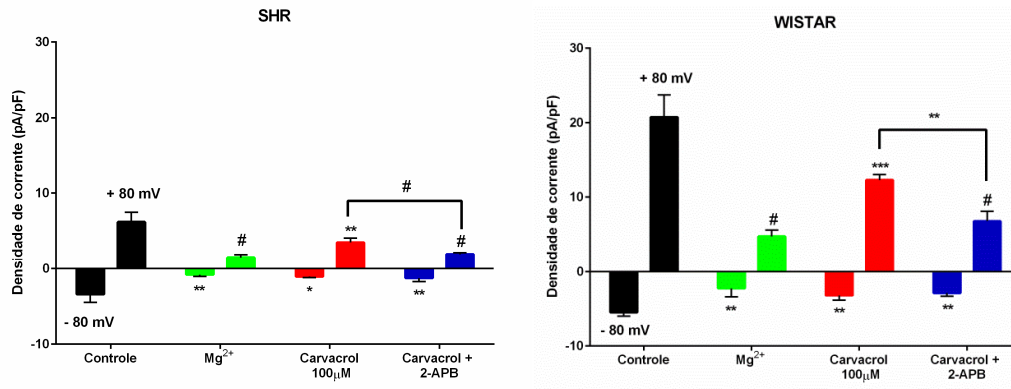


Figura 30 – Efeito de carvacrol (na presença ou ausência de 2-APB) e de Mg^{2+} sobre $I_{TRPM6/TRPM7}$, durante a rampa de voltagem de -100mV à + 100mV, durante 200ms, em miócitos vasculares de animais hipertensos e normotensos. A) Registros representativos de $I_{TRPM6/TRPM7}$ (pA), controle e carvacrol (300 μ M), em animal hipertenso e normotenso; B) Gráfico I/V, efeito de carvacrol (100 μ M) sobre $I_{TRPM6/TRPM7}$ (pA/pF) em animais hipertensos e normotensos, respectivamente; C) Gráfico I/V, efeito de carvacrol (300 μ M) sobre $I_{TRPM6/TRPM7}$ (pA/pF) em animais hipertensos e normotensos, respectivamente. (N=5 células, para cada situação experimental).

A)



B)

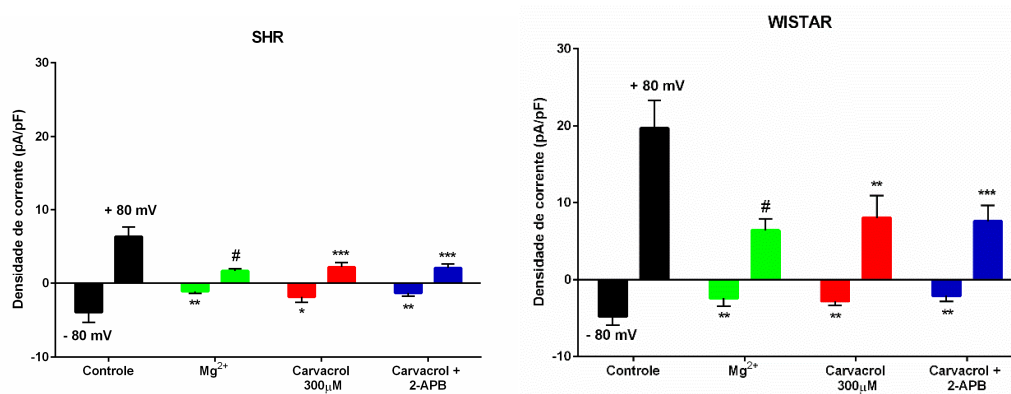


Figura 31 – Efeito de carvacrol (na presença ou na ausência de 2-APB) e de Mg²⁺ sobre a densidade de corrente tipo-TRPM6/TRPM7, em -80mV ou +80mV, em miócitos vasculares de animais hipertensos e normotensos. A) Gráfico de barras mostrando o efeito de carvacrol (100µM) sobre as densidades de I_{TRPM6/TRPM7} (pA/pF) em animais hipertensos e normotensos, respectivamente; B) Gráfico de barras mostrando o efeito de carvacrol (300µM) sobre as densidades de I_{TRPM6/TRPM7} (pA/pF) em animais hipertensos e normotensos, respectivamente. Os valores estão expressos como média ± d.p.m. #p<0,0001, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 versus controle. (N=5 células, para cada situação experimental).

Tabela 17 - Valores de densidade de corrente (pA/pF) com $[Mg^{2+}]_i = 0mM$, em ratos hipertensos e normotensos.

A) Carvacrol (100 μ M)

Estímulo de voltagem	Condição Experimental	SHR	Wistar
-80mV (pA/pF)	Controle	-3,42 \pm 0,47	-5,46 \pm 0,24
	Mg ²⁺ (2,5mM)	-0,83 \pm 0,10 ^{**}	-2,26 \pm 0,51 ^{**}
	Carvacrol	-1,07 \pm 0,07 [*]	-3,20 \pm 0,28 ^{**}
	Carvacrol + 2-APB (100 μ M)	-1,28 \pm 0,20 ^{**}	-2,88 \pm 0,21 ^{**}
+80mV (pA/pF)	Controle	-6,21 \pm 0,57	-20,73 \pm 1,33
	Mg ²⁺ (2,5mM)	-1,55 \pm 0,16 [#]	-4,71 \pm 0,38 [#]
	Carvacrol	-3,53 \pm 0,28 ^{**}	-12,28 \pm 0,33 ^{***}
	Carvacrol + 2-APB (100 μ M)	-1,97 \pm 0,93 [#]	-6,76 \pm 0,60 [#]

Os valores estão expressos como média \pm d.p.m. #p<0,0001, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 versus controle. (n=5 células, para cada situação experimental)

B) Carvacrol (300 μ M)

Estímulo de voltagem	Condição Experimental	SHR	Wistar
-80mV (pA/pF)	Controle	-3,93 \pm 0,62	-4,82 \pm 0,49
	Mg ²⁺ (2,5mM)	-1,23 \pm 0,13 ^{**}	-2,42 \pm 0,48 ^{**}
	Carvacrol	-1,86 \pm 0,34 [*]	-2,81 \pm 0,25 ^{**}
	Carvacrol + 2-APB (100 μ M)	-1,33 \pm 0,21 ^{**}	-2,11 \pm 0,34 ^{**}
+80mV (pA/pF)	Controle	-6,38 \pm 0,59	-15,50 \pm 0,83
	Mg ²⁺ (2,5mM)	-1,78 \pm 0,12 [#]	-6,41 \pm 0,67 [#]
	Carvacrol	-2,29 \pm 0,27 ^{***}	-9,92 \pm 1,40 ^{**}
	Carvacrol + 2-APB (100 μ M)	-2,16 \pm 0,25 ^{***}	-7,57 \pm 0,91 ^{***}

Os valores estão expressos como média \pm d.p.m. #p<0,0001, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 versus controle. (n=5 células, para cada situação experimental)

Para confirmar o efeito de carvacrol sobre TRPM6/TRPM7, foram realizados experimentos de fixação de voltagem usando a técnica de “patch-clamp” em células musculares lisas recém-dispersas de artéria mesentérica, conforme descrito na metodologia, onde a solução interna da pipeta foi preenchida com aumento na concentração de Mg^{2+} (2mM), com o intuito de bloquear TRPM6/TRPM7 (TOUYZ, 2008). A Figura 32 representa a relação corrente-voltagem, mostrando que quando o carvacrol (300 μ M) foi perfundido à solução externa, sozinho ou junto com o 2-APB (100 μ M), assim como o Mg^{2+} (2,5mM) sozinho, as correntes de TRPM7 foram reduzidas, tanto em ratos hipertensos como em normotensos, respectivamente.

A análise estatística destes efeitos de carvacrol (em -80mV e +80mV) pode ser visualizada no Figura 33, que mostra o efeito de carvacrol (300 μ M), na presença ou não de 2-APB, em reduzir estatisticamente as densidades de $I_{TRPM6/TRPM7}$ (pA/pF), em ratos hipertensos e normotensos, respectivamente, quando comparados aos seus controles. Além disso, o Mg^{2+} também foi capaz de reduzir estas correntes quando comparadas aos valores do controle. Entretanto, em animais normotensos, em -80mV, nem carvacrol (na presença ou não de 2-APB) nem Mg^{2+} foram capazes de reduzir as $I_{TRPM6/TRPM7}$. Os valores das densidades de $I_{TRPM6/TRPM7}$ e suas análises estatísticas podem ser visualizados na Tabela 18.

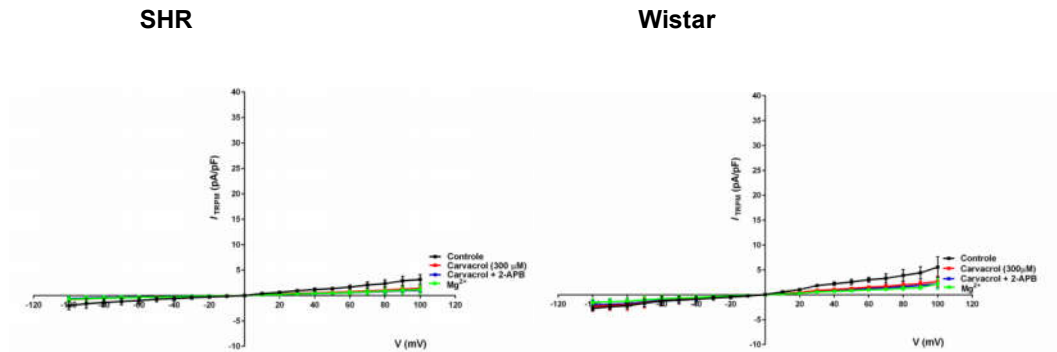


Figura 32 – Efeito de carvacrol (na presença ou na ausência de 2-APB) e de Mg^{2+} sobre $I_{TRPM6/TRPM7}$ (alta $[Mg^{2+}]_i$), em miócitos vasculares de animais hipertensos e normotensos. Gráficos I/V do efeito de carvacrol (300 μ M) sobre $I_{TRPM6/TRPM7}$ de animais hipertensos e normotensos, respectivamente. (n=5 células, para cada situação experimental).

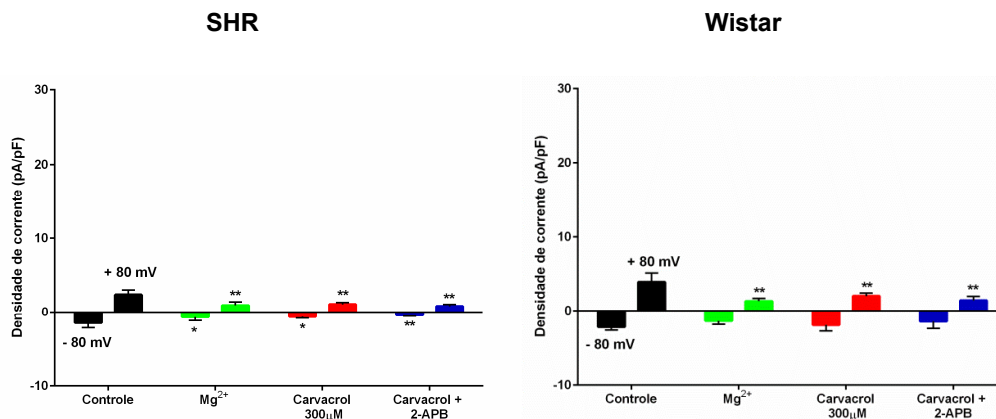


Figura 33 – Efeito de carvacrol (na presença ou na ausência de 2-APB) e de Mg^{2+} sobre a densidade de corrente por TRPM6/TRPM7 (alta $[Mg^{2+}]_i$), em -80mV e +80mV, em miócitos vasculares de animais hipertensos e normotensos. Gráficos de barras mostrando o efeito de carvacrol (300 μ M) sobre as densidades de I_{TRPM7} (pA/pF) em animais hipertensos e normotensos, respectivamente. Os valores estão expressos como média \pm d.p.m.. **p < 0,01, *p < 0,05 versus controle. (n=5 células, para cada situação experimental).

Tabela 18 - Valores de densidade de corrente (pA/pF) com $[Mg^{2+}]_i = 2mM$, em ratos hipertensos e normotensos.

Carvacrol (300 μ M)

Estímulo de voltagem	Condição Experimental	SHR	Wistar
-80mV (pA/pF)	Controle	-1,51 \pm 0,29	-2,15 \pm 0,19
	Mg ²⁺ (2,5mM)	-0,71 \pm 0,21*	-1,32 \pm 0,21
	Carvacrol	-0,66 \pm 0,07*	-1,85 \pm 0,37
	Carvacrol + 2-APB (100 μ M)	-0,44 \pm 0,06**	-1,37 \pm 0,43
+80mV (pA/pF)	Controle	- 2,37 \pm 0,28**	- 3,91 \pm 0,53**
	Mg ²⁺ (2,5mM)	- 0,93 \pm 0,21**	- 1,30 \pm 0,17**
	Carvacrol	- 1,07 \pm 0,11**	- 1,99 \pm 0,19**
	Carvacrol + 2-APB (100 μ M)	- 0,80 \pm 0,11**	- 1,40 \pm 0,25**

Os valores estão expressos como média \pm d.p.m. #p<0,0001, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 versus controle. (n=5 células, para cada situação experimental)

Os resultados obtidos com estes ensaios eletrofisiológicos foram resumidos na Figura 34.

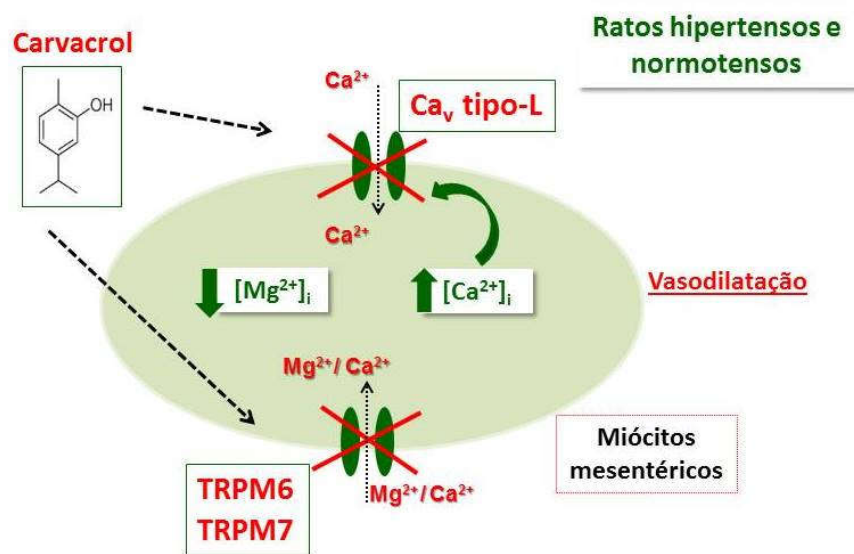


Figura 34. Sumário dos resultados dos ensaios eletrofisiológicos em miócitos isolados de artéria mesentérica.

5.3 Efeitos do tratamento subcrônico *in vivo* com carvedilol em animais SHR

5.3.1 Efeito do tratamento oral com carvedilol sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos hipertensos

Para avaliar se os efeitos vasculares e celulares induzidos por carvedilol podem refletir em uma ação anti-hipertensiva, foram realizados experimentos de medida de pressão arterial indireta durante 20 dias de tratamento subcrônico oral com veículo e carvedilol (50mg/kg). Nos animais tratados com veículo durante 20 dias, o estado hipertensivo foi mantido e, ao final do tratamento, a PAM atingiu valores de $167,5 \pm 10,0$ mmHg, N = 6. A administração diária de carvedilol (50 mg/kg) provocou redução significativa ($*p < 0,05$) na PAM no final do tratamento, atingindo valores de PAM = $138,8 \pm 3,4$ mmHg, N = 6, quando comparados ao controle onde os animais foram tratados apenas com veículo (Figura 35).

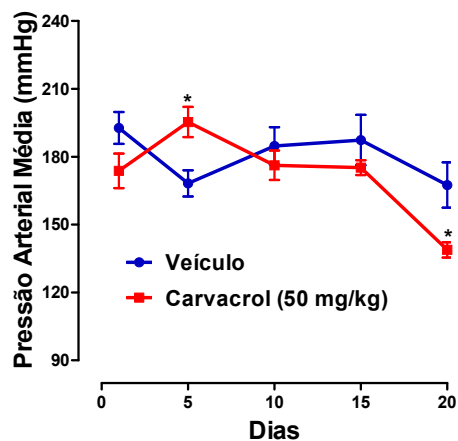


Figura 35 - Efeito sobre a Pressão Arterial Média (PAM) do tratamento oral com carvedilol (50 mg/kg) em animais SHR por um período de 20 dias. Curvas de PAM para veículo (N = 6) e carvedilol (N = 6). Valores expressos com média \pm e.p.m. $*p < 0,05$ versus veículo.

5.3.2 Efeito do tratamento subcrônico com carvedilol sobre o peso cardíaco de animais SHR

Para avaliação de indícios de hipertrofia cardíaca, o peso dos corações dos animais tratados foi medido ao final do tratamento. Para isso, após a eutanásia do animal em câmara de CO₂, os corações foram removidos e submetidos à secagem em estufa à 60°C, durante 24h e 48h. Foi observado que o tratamento oral por 20 dias com o carvedilol não alterou a massa cardíaca (em mg/100g) após secagem de 24h e 48h (228,23 ± 69,43 e 176,33 ± 40,29; respectivamente; N = 5), quando comparados ao controle cujos animais foram tratados apenas com veículo (341,09 ± 53,12 e 155,11 ± 7,92; respectivamente; N = 5) (Figura 36).

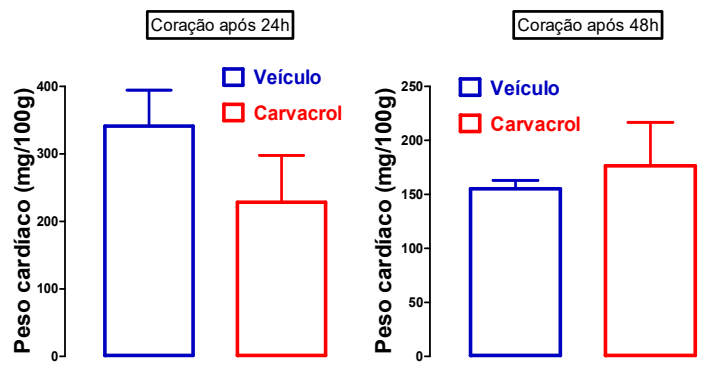


Figura 36 - Efeito do tratamento oral com carvedilol sobre o peso cardíaco (mg/100g de peso corpóreo) de animais SHR tratados durante 20 dias. Peso cardíaco após 24h e 48h de secagem, no final do tratamento com veículo (N = 6) e carvedilol (N = 5). Valores expressos com média ± e.p.m.

5.3.3 Efeito do tratamento subcrônico com carvedilol sobre o peso corpóreo de animais SHR

Para avaliar o efeito de carvedilol sobre o peso corporal, os animais dos dois grupos experimentais foram pesados diariamente durante o tratamento subcrônico. O peso corpóreo dos SHR tratados com carvedilol não foi diferente do peso dos SHR tratados apenas com o veículo (** $p < 0,01$) (Figura 37).

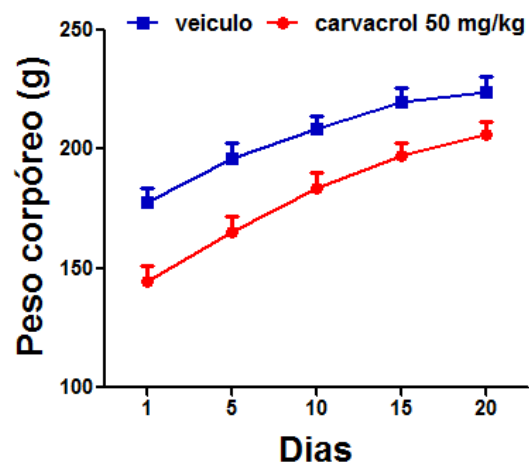


Figura 37 - Efeito do tratamento subcrônico de carvedilol sobre o peso corporal absoluto de animais SHR tratados por 20 dias. Peso corpóreo no final do tratamento com veículo (N = 4) e carvedilol (N = 6). Valores expressos estão expressos com média \pm e.p.m.

5.3.4 Efeito do tratamento subcrônico com carvedilol sobre a reatividade vascular de animais SHR

Após o tratamento subcrônico, foram realizados ensaios para investigar possíveis alterações na reatividade do tecido vascular dos animais SHR tratados com veículo e carvedilol (50mg/kg). Em anéis mesentéricos de animais hipertensos tratados com carvedilol, a eficácia e potência farmacológicas das contrações induzidas por FEN ($E_{m\acute{a}x} = 81,30 \pm 7,071 \%$ e $pD_2 = 6,98 \pm 0,25$; respectivamente, $N = 5$) não foram alteradas significativamente em relação ao veículo ($E_{m\acute{a}x} = 97,67 \pm 5,25 \%$ e $pD_2 = 6,82 \pm 0,23$; respectivamente, $N = 8$). O mesmo ocorreu com o vasorelaxamento induzido pelo NPS, não houve diferença estatística nos parâmetros farmacológicos estudados, nem na eficácia nem na potência do NPS ($E_{m\acute{a}x} = 100,17 \pm 6,39 \%$ e $pD_2 = 11,78 \pm 0,30$; respectivamente, $N = 5$) nos animais tratados com carvedilol, quando comparados ao controle tratados apenas com veículo ($E_{m\acute{a}x} = 116,92 \pm 7,33 \%$ e $pD_2 = 12,22 \pm 0,28$; respectivamente, $N = 8$) (Figura 38).

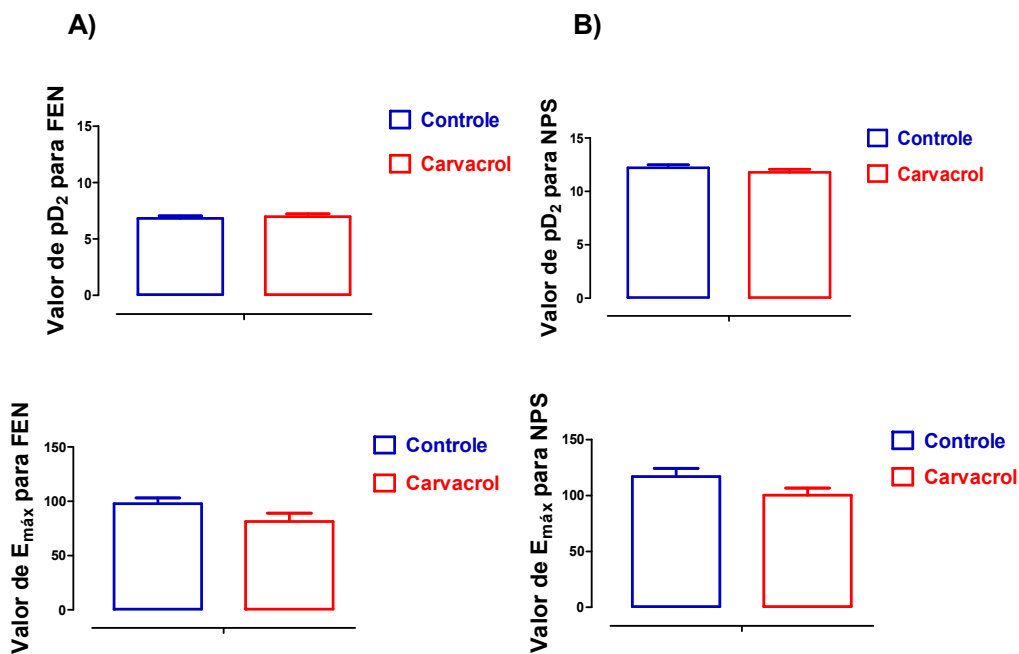


Figura 38 - Reatividade vascular à FEN e ao NPS em anéis mesentéricos de animais SHR submetidos ao tratamento subcrônico com veículo ou carvedilol durante 20 dias. Gráfico em barras mostrando os valores de pD_2 e $E_{m\acute{a}x}$ após o tratamento com veículo ($N = 8$) ou carvedilol ($N = 5$): A) Resposta relaxante para o NPS e B) Resposta contracturante para a FEN. Valores expressos com média \pm e.p.m.

Discussão

6 Discussão

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos do monoterpeno fenólico carvacrol sobre o sistema cardiovascular e elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos, utilizando abordagens: *in vitro* – com anéis e miócitos de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos e normotensos (abordagens a nível funcional e celular, respectivamente), e *in vivo* – medidas indiretas de pressão arterial de ratos hipertensos após tratamento subcrônico orogástrico com carvacrol, tendo como foco os canais TRP.

As principais constatações deste estudo foram que a atividade vasodilatadora de carvacrol em artéria mesentérica superior isolada de animal SHR, provavelmente, envolve a inibição do influxo de Ca^{2+} por Ca_v tipo-L, ROC, SOC e/ou canais TRP, e estes resultados funcionais *in vitro* foram diferentes dos encontrados em animais normotensos. Além disso, foi demonstrado que o carvacrol inibe correntes tipo-TRPM7 em miócitos mesentéricos de ratos hipertensos e normotensos e que possuiu atividade anti-hipertensiva em SHR tratados por gavagem durante 20 dias.

Considerando o importante papel que o tônus vascular desempenha na regulação e manutenção da PA (SONKUSARE et al., 2006), há poucos estudos descritos na literatura que abordam os efeitos do carvacrol sobre o músculo liso vascular (MLV), há apenas quatro estudos realizados em artéria isolada de rato. Um deles foi conduzido por Audyn e colaboradores (2007) e demonstrou que carvacrol reduz a vasoconstrição induzida por FEN, KCl ou $CaCl_2$ em artéria aorta de ratos Sprague-Dawley. Peixoto-Neves e seu grupo de pesquisa (2010) também estudaram os efeitos de carvacrol em aorta de rato, mostrando que carvacrol induz vasodilatação, independente da presença do endotélio vascular, e reduz o influxo de Ca^{2+} nestes leitos vasculares de ratos wistar.

Outro trabalho encontrado na literatura sobre o efeito de carvacrol em MLV relata que este monoterpeno possui ação vasodilatadora em artéria cerebral de ratos Sprague-Dawley, porém, esta atividade é dependente da presença da camada endotelial e ocorre via ativação do canal TRPV3 expresso no endotélio vascular (EARLEY; GONZALES; GARCIA, 2010). A artéria

mesentérica superior é de extrema importância no controle da PA, visto que é uma artéria de pequeno calibre e exerce maior influência sobre a RVPT, mas, apesar disso, o único estudo neste leito vascular descrito na literatura até o momento foi realizado por Dantas e colaboradores (2015), desenvolvido no nosso laboratório de pesquisa, e relata a ação vasodilatadora de carvacrol em anéis mesentéricos de ratos normotensos wistar, provavelmente, por inibição do influxo de Ca^{2+} por Ca_v , ROC, SOC e TRPM7.

Portanto, devido à ausência de estudos sobre o efeito de carvacrol em artéria mesentérica isolada de ratos hipertensos, resolvemos investigar as ações deste monoterpene em anéis mesentéricos isolados de animais SHR, e demonstramos que o carvacrol induz efeito vasodilatador dependente de concentração em anéis pré-contraídos com a FEN, um agonista seletivo α_1 -adrenérgico (Figura 17). Conforme pode ser observado na Tabela 16, esta ação relaxante vascular do carvacrol foi estatisticamente mais potente em animal hipertenso (SHR) quando comparado ao normotenso (wistar), resposta relevante para o tratamento da hipertensão arterial.

Além dos fatores vasodilatadores e vasoconstritores que controlam o tônus arterial e, conseqüentemente, o fluxo sanguíneo local e a PA (LEDOUX et al., 2006), o endotélio funcional também possui um importante papel na regulação da musculatura lisa vascular, por meio da produção e liberação de fatores vasodilatadores, tais como: óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e prostaciclina (PGI_2); e fatores vasoconstritores, tais como: endotelina-1 (ET1), prostaglandina H_2 (PGH_2), tromboxano A_2 (TXA_2) e ânions superóxido (O_2^-) (BATLOUNI, 2001; FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2011).

Então, devido ao fato de uma variedade de substâncias químicas (endógenas e exógenas) exercerem atividade vasodilatadora por meio da participação funcional do endotélio vascular (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; COHEN; VANHOUTTE, 1995; CHAUHAN et al., 2002), nós investigamos o papel dos fatores vasoativos na resposta mediada por carvacrol e, para isso, a camada endotelial foi removida por atrito mecânico. Conforme a Tabela 15, na ausência do endotélio vascular, a potência farmacológica do monoterpene foi estatisticamente reduzida tanto em animal hipertenso quanto em normotenso,

quando comparada à sua resposta na presença do endotélio vascular (Figura 17). Estes dados sugerem que o efeito vasodilatador de carvacrol em artérias de animais hipertensos envolve dois mecanismos de ação distintos, um dependente e outro independente do endotélio vascular. Entretanto, a via independente do endotélio parece ser majoritária no efeito vasodilatador induzido por carvacrol e, por isso, o foco deste trabalho foi na investigação do mecanismo de ação deste monoterpene sobre o MLV. Portanto, os experimentos posteriores foram realizados em anéis mesentéricos ausentes de endotélio funcional.

Visto que estudos anteriores mostraram que carvacrol inibe correntes de Ca^{2+} em cardiomiócitos ventriculares caninos e humanos (MAGYAR et al., 2004) e reduz o influxo de Ca^{2+} em artéria aorta (AUDYN et al., 2007; PEIXOTO-NEVES et al., 2010) e mesentérica (DANTAS et al., 2015) de ratos normotensos, e devido à importância das vias de entradas do Ca^{2+} no MLV de animais hipertensos (principalmente, pelos canais Ca_v) foi avaliada a hipótese que a vasodilatação induzida por carvacrol em animais SHR, também, poderia ser por inibição do influxo de Ca^{2+} . Então, foi investigado o efeito do carvacrol frente às contrações induzidas por CaCl_2 , em meio despolarizante (KCl, 60mM) nominalmente sem Ca^{2+} , isto porque concentrações elevadas de K^+ extracelular provocam despolarização e, conseqüente, abertura dos Ca_v na membrana plasmática. Portanto, contrações induzidas por CaCl_2 são geradas, em grande parte, pelo influxo de Ca^{2+} por Ca_v (RATZ; BERG, 2006). Além disso, a depolarização causada por KCl (60mM) induz a liberação de cálcio dos estoques, podendo causar depleção do retículo sarcoplasmático (KOBAYASHI; KANAIDE; NAKAMURA, 1985 e 1986), levando a uma entrada de Ca^{2+} através SOCs e/ou canais TRP (AY et al., 2004; FELLNER; ARENDSHORST, 2000).

Nestas condições, como mostra a Figura 18, o carvacrol (10^{-4} e 10^{-3}M) antagonizou de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por CaCl_2 em animais hipertensos, sendo que na maior concentração do monoterpene essas contrações foram praticamente abolidas. Por outro lado, na menor concentração testada (10^{-5}M), o carvacrol aumentou as contrações induzidas pelo CaCl_2 em ratos hipertensos e normotensos. Estes dados sugerem que o efeito vasodilatador de carvacrol pode ser, em parte, por reduzir

o influxo de Ca^{2+} em artéria mesentérica, provavelmente, por canais Ca_v , bem como dos SOC e/ou TRPs. Entretanto, este efeito só foi observado em concentrações de carvacrol igual ou superior à sua CE_{50} . Estes resultados corroboraram os achados de Audyn e cols. (2007), Dantas e cols. (2015) e Peixoto-Neves e cols. (2010) em animais normotensos.

Para confirmar se esta resposta de carvacrol em inibir o influxo de Ca^{2+} poderia envolver, também, os SOCs e/ou ROCs, foram realizados experimentos funcionais *in vitro*, onde os anéis foram mantidos num meio nominalmente isento de Ca^{2+} e contrações foram induzidas com FEN ($1\mu\text{M}$), um agonista seletivo α_1 -adrenérgicos. A FEN foi utilizada como ferramenta farmacológica de escolha devido aos relatos da literatura que a ativação de receptores α_1 -adrenérgicos leva ao influxo de Ca^{2+} por canais Ca_v , ROC e SOC na célula muscular lisa (WATANABE et al., 2007; FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007). Adicionalmente, o ácido ciclopiazônico ($20\mu\text{M}$), um bloqueador da ATPase de Ca^{2+} presente no retículo endosarcoplasmático (SERCA), também foi utilizado com o intuito de induzir ativação de SOCs (WYNNE; CHIAO; WEBB, 2009).

Além disso, com o objetivo de ativar os ROCs e os SOCs, porém, descartar a participação dos Ca_v , foi utilizada a Nifedipina, droga conhecida por abolir totalmente as correntes de Ca^{2+} , por bloqueio dos Ca_v em células musculares lisas (CURTIS; SCHOLFIELD, 2001). Então, nestas condições experimentais, onde os anéis de animais hipertensos e normotensos foram mantidos em meio sem Ca^{2+} e na presença da FEN, ácido ciclopiazônico e nifedipina, a contração induzida por CaCl_2 foi reduzida significativamente na presença de carvacrol (10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3}M), quando comparada à contração na ausência do monoterpeneo (Figura 19), sugerindo que os ROCs e os SOCs, provavelmente, estão envolvidos no efeito vasodilatador mediado por carvacrol em ratos hipertensos e normotensos.

Devido ao fato de tanto os SOC como os ROC serem canais que apresentam estrutura relacionada aos canais TRP (BEECH; MURAKI; FLEMMING, 2004; THEBAULT et al., 2005; ZAGRANICHNAYA; WU; VILLERREAL, 2005), principalmente, com os TRPC1 e TRPC6, respectivamente (DIETRICH et al., 2005; HOFMANN et al., 1999), e como o carvacrol já

demonstrou atuar sobre alguns canais TRPs (EARLEY; GONZALES; GARCIA, 2010; PARNAS et al., 2009; XU et al., 2006; VOGT-EISELE et al. 2007), decidimos investigar a contribuição dos diferentes subtipos dos canais TRPs no efeito relaxante vascular do carvacrol e, para isso, foram usados diferentes bloqueadores destes canais, que, apesar de não possuírem efeito farmacológico seletivo, podem ser eficazes no delineamento dos estudos com os canais TRPs.

Primeiramente, foi usado o vermelho de rutênio (VR, 10 μ M), um bloqueador não-seletivo dos canais TRPV1, 2, 3, 4 e 6, TRPA1 e TRPM6 (CLAPHAM et al., 2005). A presença do VR não alterou significativamente a potência nem a eficácia farmacológicas de carvacrol, em nenhum dos animais estudados, quando comparadas ao controle na ausência do VR (Figura 20; Tabela 16), sugerindo que os canais sensíveis ao VR, provavelmente, não estão envolvidos nos efeitos vasculares de carvacrol.

Posteriormente, foi investigada a participação dos canais sensíveis ao íon Gd³⁺ nos efeitos vasculares induzidos por carvacrol, utilizando o Gd³⁺ (10 μ M) que, nesta concentração, bloqueia os canais TRPC1-7 (CLAPHAM et al., 2005; LIEVREMONT; BIRD; PUTNEY, 2004; MCELROY; GURNEY; DRUMMOND, 2008). Em animais hipertensos, a presença do íon Gd³⁺ reduziu estatisticamente a potência farmacológica do carvacrol, mas não em animais normotensos, quando comparados com os seus controles na ausência do bloqueador. Ademais, não houve mudança significativa na eficácia farmacológica do monoterpeneo em nenhum dos animais (Figura 21; Tabela 16). Estes dados sugerem que, em animais hipertensos, mas não em normotensos, os canais sensíveis ao íon Gd³⁺, provavelmente, participam dos efeitos vasculares mediados pelo carvacrol.

Estas diferenças no envolvimento do íon Gd³⁺ na resposta vasodilatadora de carvacrol em ratos hipertensos, quando comparada aos normotensos, podem ser devido às alterações na expressão do canal TRPC3 durante a hipertensão, visto que já foi demonstrado que TRPC3 é mais expresso em miócitos de animal SHR em relação aos seus controles normotensos (LIU et al., 2005), e que, mais especificamente, a expressão da proteína do TRPC3 é maior em artéria mesentérica de animal SHR (ADEBIYI et

al., 2012). Adicionalmente, Noorani, Noel e Marrelli (2011) também relataram que TRPC3 tem sua expressão aumentada em artéria carótida de animal SHR em relação aos normotensos, entretanto, a expressão do TRPC1 está reduzida, corroborando com a sugestão de que a função de alguns canais TRPs estaria modificada durante o estado hipertensivo devido a alterações na expressão destes animais.

É importante ressaltar que os canais TRPC1, 3 e 6 (bloqueados pela concentração Gd^{3+} utilizada) já foram descritos por serem expressos em diversos leitos arteriais, incluindo artéria mesentérica (EARLEY; BRAYDEN, 2015; FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007), e o aumento da expressão de TRPC1 e TRPC3 em arteríolas mesentéricas causa elevação da vasomotricidade em animal SHR (CHEN et al., 2010). Além disso, o fato dos canais TRPC1, 3 e 6 também atuarem como ROC e/ou SOC (AY et al., 2005; HILL et al., 2006; HOFMANN et al., 1999; SALIDO. JARDÍN. ROSADO 2011), esses resultados com o íon Gd^{3+} em animais SHR corroboram com nossos achados iniciais em que carvedilol demonstrou inibir ROC e SOC em anéis mesentéricos.

Dando continuidade às investigações sobre os canais TRPs, fomos avaliar a influência do 2-APB na vasodilatação provocada pelo carvedilol, visto que esta é uma droga vastamente utilizada como ferramenta farmacológica para estudar os canais TRPCs (HARTENECK; GOLLASCH, 2011; SUZUKI et al., 2011; XU et al., 2005) e os TRPMs (CHOKSHI; FRUASAHA; KOZAK, 2012; MACIANSKIENE et al., 2012; NAZIROGLU; ÖZGÜL, 2012). Para isso, utilizamos duas diferentes concentrações de 2-APB (10^{-6} e 10^{-5}) conhecidas por bloquear diferentes canais TRPs. Para bloquear os canais TRPC4-7 e os TRPM8, utilizamos $10^{-5}M$ de 2-APB (CHE et al., 2014; CHUNG et al., 2014; HU et al., 2004), enquanto que para bloquear os canais TRPM2, usamos $10^{-6}M$ de 2-APB (TOGASHI; INADA; TOMINAGA, 2008).

Estes experimentos demonstraram que, em animais hipertensos, a presença das diferentes concentrações de 2-APB reduziu de maneira significativa a potência farmacológica do carvedilol, porém, este efeito não foi observado em animais normotensos. Em relação à eficácia do monoterpeno, nenhuma das duas concentrações de 2-APB testadas foi capaz de modificar

este parâmetro farmacológico, tanto em animal normotenso quanto em hipertenso, como pode ser observado nas Figuras 22 e 23 e na Tabela 16. Com isso, pode-se sugerir que os canais sensíveis ao 2-APB (TRPC4-6; TRPM2 e 8), provavelmente, participam do efeito vasodilatador mediado pelo carvacrol em rato hipertenso, mas não em normotenso. Estas diferenças na resposta do monoterpeno entre estes animais podem estar relacionadas a possíveis alterações na expressão dos canais sensíveis ao 2-APB durante o estado hipertensivo.

Os próximos canais TRPs encontrados no sistema cardiovascular que decidimos estudar foram os canais TRPV1 e TRPM8, utilizando o BCTC (2 μ M) como ferramenta farmacológica para bloquear estes canais (BEHRENDT et al., 2004; CLAPHAM et al., 2005). Os resultados demonstraram que, em animais SHR, a presença do BCTC foi capaz de reduzir significativamente a potência farmacológica do carvacrol, mas não a sua eficácia. Por outro lado, em animais normotensos, não houve mudança em nenhum dos parâmetros farmacológicos analisados (Figura 24; Tabela 16), sugerindo que, provavelmente, os canais sensíveis ao BCTC estão envolvidos na resposta relaxante de carvacrol em artéria mesentérica de animais hipertensos, mas não de normotensos. Lembrando que tanto carvacrol como outros monoterpenos já foram relatados como ativadores do TRPV3, um subtipo de TRP vanilóide (EARLEY; GONZALES; GARCIA, 2010; VOGT-EISELE et al., 2007; XU et al., 2006).

Tendo em vista que o canal TRPM4 já foi descrito pela sua expressão em alguns leitos vasculares (EARLEY; WALDRON; BRAYDEN, 2013; YANG et al., 2006), o próximo passo foi investigar a influência do 9-fenantrol (10 μ M) no efeito relaxante mediado por carvacrol em mesentérica de ratos hipertensos. Nesta concentração, esta droga bloqueia mais seletivamente os canais TRPM4 e pode ser utilizada para estudar este canal (GUINAMARD; HOF; DEL NEGRO, 2014; GRAND et al., 2008). Os resultados demonstraram que em ratos hipertensos, mas não em normotensos, o 9-fenantrol modificou significativamente a potência farmacológica de carvacrol, quando comparada ao controle na ausência do bloqueador (Figura 25 e Tabela 16), o que sugere a participação do TRPM4 no efeito vasodilatador induzido pelo carvacrol em ratos hipertensos, mas não em normotensos.

Além dos diferentes subtipos de canais TRPVs, TRPCs e TRPMs, os TRPA1 também estão expressos no sistema cardiovascular (EARLEY, 2012) e podem estar envolvidos na resposta vascular de carvacrol. Por isso, foi investigada a influência do HC03003-1 (10 μ M), bloqueador seletivo do canal TRPA1 (MCNAMARA et al., 2007). Então, em animais hipertensos, a presença deste bloqueador reduziu significativamente a potência farmacológica de carvacrol, sem alteração significativa na eficácia do composto, quando estes parâmetros foram comparados aos seus controles, entretanto, em animais normotensos, não houve diferença estatística em nenhum destes parâmetros farmacológicos estudados (Figura 26; Tabela 16), sugerindo que, provavelmente, o canal TRPA1 pode estar envolvido no efeito vasodilatador induzido pelo monoterpeno em estudo em ratos hipertensos. Estes dados corroboram os dados da literatura que demonstram que carvacrol é capaz de ativar o canal TRPA1 (XU et al., 2006).

Em resumo, os ensaios funcionais *in vitro* para investigação dos canais TRPs sugerem que o efeito vasodilatador mediado por carvacrol em anéis mesentéricos isolados de animais hipertensos, mas não de normotensos, provavelmente, envolve a participação dos canais TRPC1, 3 e 6, dos TRPM2, 4 e 8, e do TRPA1. Estas respostas diferentes entre estes animais podem ser justificadas pelas possíveis diferenças existentes no estado patológico da hipertensão arterial. Além disso, os ensaios vasculares também sugerem que o efeito vasodilatador de carvacrol envolve, também, a inibição do influxo de Ca^{2+} via canais Ca_v tipo-L, ROCs e SOCs, tanto em animais hipertensos como em normotensos. O sumário destes resultados pode ser observado na Figura 27.

Estes dados corroboram com outros trabalhos que demonstram os efeitos de carvacrol em reduzir o influxo de Ca^{2+} em aorta (AYDIN et al., 2007; PEIXOTO-NEVES et al., 2010) e mesentérica (DANTAS et al., 2015) de ratos normotensos, e inibir tanto correntes de Ca^{2+} em cardiomiócitos ventriculares humanos e caninos (MAGYAR et al., 2004). Além disso, em ratos hipertensos, mas não em normotensos, o efeito de carvacrol foi diferente na presença de diferentes bloqueadores, sugerindo a participação de diversos subtipos de TRP, mas não direcionando o estudo para um canal específico. Com isso, resolvemos investigar o envolvimento do canal TRPM7 na resposta

vasodilatadora mediada por carvacrol, visto que este monoterpene já demonstrou inibir correntes tipo TRPM7 em células HEK super-expressando estes canais (PARNAS et al., 2009).

Com estes dados da literatura e em nossos resultados preliminares, decidimos focar na investigação dos efeitos de carvacrol sobre os canais Ca_v tipo-L e TRPM7 em células de artéria mesentérica recém-dispersas de ratos hipertensos e normotensos, com o intuito de comparar se existe diferença no mecanismo de ação de carvacrol em um modelo de hipertensão essencial. Para isto, foram realizadas medidas de correntes por Ca_v tipo-L e TRPM usando a técnica de “*patch-clamp*” na configuração *whole-cell*.

Ao avaliar o efeito de carvacrol sobre os Ca_v tipo-L em miócitos vasculares de animais hipertensos e normotensos, foi evidenciado que o carvacrol (300 μ M) atenuou significativamente as correntes de Ba^{2+} pelos canais Ca_v (Figura 29), sugerindo que a ação vasodilatadora deste monoterpene envolve o bloqueio destes canais em CMLVs isoladas de animais hipertensos, e que nenhuma diferença nesta via de sinalização do carvacrol foi observada quando comparada às correntes obtidas em miócitos de animais normotensos.

Para investigar o efeito de carvacrol sobre correntes TRPM7 em miócitos vasculares de ratos hipertensos e normotensos, os experimentos foram conduzidos controlando os meios intra e extracelulares utilizando as soluções interna e externa, conforme descrito nas tabelas 11 e 12, que é uma das opções utilizadas para medir correntes tipo-TRPM (I_{TRPM}). Como visualizado nas Figuras 30A-C, as correntes de entrada obtidas neste protocolo são menores que as correntes de saída, tanto em animais hipertensos como em normotensos. Em potenciais despolarizantes, as correntes de saída são proporcionalmente maiores que as correntes de entrada em potenciais mais hiperpolarizantes, conforme visualizado nas Figuras 31A-B. Confirmando que as correntes observadas neste protocolo experimental são tipo-TRP, pois dados da literatura demonstram que as correntes tipo-TRP são retificadas, e que os canais TRP sofrem retificação de saída de corrente (MACIANSKIENE et al., 2012; WATABANE et al., 2015), conforme observado em nossos resultados.

Como pode ser observado nas Figuras 30B e 31A, o carvacrol (100 μ M), na ausência ou presença do 2-APB (100 μ M) que, nesta concentração, é conhecido por bloquear TRPM7, porém, sem ação inibitória sobre TRPM6 (GUILBERT et al., 2009; LI; JIANG; YUE, 2006), inibiu a amplitude de I_{TRPM} , tanto em rato hipertenso como em normotenso. Visto que é descrito na literatura que os canais TRPM6 e 7 estão expressos em artéria mesentérica de ratos hipertensos e normotensos (HE et al., 2005; TOUYZ et al., 2006), foi investigado se este efeito de carvacrol sobre as I_{TRPM} poderia ser um efeito inibitório sobre $I_{TRPM6/TRPM7}$, utilizando o Mg^{2+} (2,5mM), um bloqueador dos canais TRPM6 e 7 (CLAPHAM et al., 2005). O Mg^{2+} foi capaz de bloquear I_{TRPM} de entrada e de saída (Figura 30B), de maneira significativa em relação ao controle (Figura 31A), sugerindo que as I_{TRPM} observadas são $I_{TRPM6/TRPM7}$ tanto em ratos hipertensos como em normotensos.

Em miócitos de ratos hipertensos e normotensos, o efeito do Mg^{2+} em bloquear $I_{TRPM6/TRPM7}$ foi diferente significativamente em relação ao induzido pelo carvacrol (100 μ M), mas foi semelhante ao efeito do monoterpene na presença do 2-APB (Figuras 30B e 31A). Enquanto que, o efeito de carvacrol (300 μ M), na presença ou ausência do 2-APB, não foi diferente do efeito de Mg^{2+} (Figuras 30A, 30C e 31B), sugerindo que carvacrol inibe $I_{TRPM6/TRPM7}$ nestes miócitos. Para demonstrar que as correntes observadas no controle são $I_{TRPM6/TRPM7}$, foi utilizado o Mg^{2+} (2mM) na solução interna da pipeta, com o intuito de aumentar a $[Mg^{2+}]_i$ e bloquear TRPM6 e 7, pois é descrito que o aumento da concentração intracelular deste íon é capaz de bloquear estes canais (D'ANGELO; SINGER; REMBOLD, 1992; NADLER et al., 2001; YOGI et al., 2011). Nestas condições, as I_{TRPM} no controle foram drasticamente reduzidas, conforme visualizado nas Figuras 32 e 33, confirmando que as I_{TRPM} observadas são $I_{TRPM6/TRPM7}$.

Os canais homólogos TRPM6 e TRPM7 são capazes de formar complexos homo- e heteroméricos, e apesar de compartilharem a mesma identidade, possuem propriedades e modulações farmacológicas distintas. Um exemplo disto é que níveis micromolares de 2-APB aumenta a atividade de TRPM6, enquanto que, inibe a atividade de TRPM7 (LI; JIANG; YUE, 2006). Além disso, a expressão (tanto do RNA_m quanto da proteína) e a atividade do

canal TRPM7, mas não do TRPM6, já foi demonstrada estar reduzida em artéria mesentérica de animais SHR quando comparados com seus controles (TOUYZ et al., 2006). Conforme pode ser visualizado nas Figuras 30-33, na condição controle, a amplitude de I_{TRPM} em normotensos foi maior que em hipertensos, corroborando com estudos de Touyz e cols. (2006), demonstrando que o funcionamento do canal TRPM7 pode estar alterado no estado hipertensivo, e sugerindo que o carvedilol provavelmente estaria inibindo I_{TRPM7} nestes miócitos mesentéricos.

Quando os canais TRPM6 e TRPM7 são inibidos, há diminuição da sua permeabilidade e o influxo de Mg^{2+} é reduzido. Visto que este íon pode competir com os sítios de ligação para o Ca^{2+} no interior da célula, a redução da $[Mg^{2+}]_i$ pode provocar o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ livre e, conseqüentemente, inibição dos Ca_v dependentes de Ca^{2+} . Conforme descrito por Lacinová e Hofmann (2005), os canais Ca_v tipo-L apresentam dois tipos de inativação, um processo lento dependente de voltagem e um processo rápido dependente de Ca^{2+} , tanto a voltagem como a entrada de Ca^{2+} servem como sinais de *feedback* negativo, causando transição dos canais para o estado inativado não condutível. Então, pode-se sugerir que a diminuição das correntes de TRPM6 e TRPM7, provavelmente TRPM7, por carvedilol pode induzir a inativação dos Ca_v tipo-L, diminuindo o influxo de Ca^{2+} e levando à vasodilatação (conforme resumido na Figura 34). Este estudo fornece a primeira evidência de correntes tipo-TRPM7 em CMLVs nativas de artéria mesentérica.

Portanto, para investigar se o efeito vasodilatador de carvedilol *in vitro* seria por um potencial efeito anti-hipertensivo deste monoterpeneo, animais SHR foram tratados via gavagem por 20 dias, e a PA foi medida a cada 5 dias durante este período. Foram utilizados animais com nove semanas de idade, onde ainda é observada progressão da PA com o avançar da idade do animal. A dose escolhida foi 50mg/kg, conforme estudos na literatura que relatam o tratamento com carvedilol (BAYRAMOGLU et al., 2014; GUL et al., 2013).

Nestes ensaios *in vivo*, houve redução significativa da pressão arterial média (PAM) dos animais tratados com carvedilol em relação aos animais controle tratados apenas com o veículo (Figura 35), porém, esta diminuição da PAM foi observada apenas no 20º dia de tratamento. Além disso, houve um

aumento da PAM significativa dos animais tratados com carvedilol em relação ao controle no 5º dia de tratamento. Apesar disso, o carvedilol demonstrou ser capaz de atenuar o desenvolvimento da hipertensão arterial em animais com hipertensão essencial.

O efeito de carvedilol sobre a hipertrofia cardíaca de ratos hipertensos foi avaliado, devido ao fato de que, na idade adulta, os animais SHR desenvolvem características das doenças cardiovasculares, como a hipertrofia do coração e dos vasos sanguíneos (CONRAD, 1995). Além disso, já foi descrito que o TRPM7 está correlacionado com desenvolvimento da fibrose cardíaca, por mediar mudanças em Mg^{2+} e Ca^{2+} em fibroblastos cardíacos de ratos (YU et al., 2014; XU et al., 2014), e que ratos deficientes de Mg^{2+} podem apresentar disfunções cardíacas (TASHIRO; INOUE; KONISHI, 2013). Então, ao final do tratamento, os corações foram removidos, submetidos à secagem por 24h ou 48h, e pesados. O índice de massa cardíaca dos animais tratados com carvedilol não foi alterado estatisticamente quando comparado ao controle (Figura 36), demonstrando que carvedilol não altera a massa cardíaca dos animais SHR, na dose utilizada.

Além das alterações cardíacas, modificações na reatividade vascular também estão amplamente descritas durante a hipertensão, tais como: disfunção endotelial e hiperatividade simpática (LUSCHER; VANHOUTTE, 1986; PINTÉROVÁ et al., 2009). O tratamento com carvedilol não alterou a sensibilidade vascular nem ao NPS (agente vasodilatador) e nem à FEN (agente vasoconstritor), quando comparado ao controle (Figura 38), demonstrando que carvedilol não altera a reatividade vascular de animais SHR, na dose testada. Adicionalmente, o peso corpóreo dos dois grupos de animais tratados também foi medido durante todo o experimento, e não demonstrou alteração significativa nos ratos tratados com carvedilol quando comparado ao grupo controle (Figura 37).

Conclusões

7 Conclusões

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que:

- Carvacrol induz vasodilatação em artéria mesentérica isolada de ratos hipertensos e normotensos, majoritariamente, via ação direta no tecido vascular;
- Os efeitos vasculares de carvacrol envolvem provável bloqueio de canais Ca_v tipo-L, ROC e SOC, tanto em ratos hipertensos como em normotensos;
- Em ratos hipertensos, mas não em normotensos a ação vasodilatadora de carvacrol envolve, provavelmente, a participação dos canais TRPC1, 3 e 6, dos TRPM2, 4, 7 e 8, e do TRPA1;
- Carvacrol inibe correntes de Ca^{2+} por Ca_v tipo-L em miócitos vasculares de ratos hipertensos e normotensos;
- Carvacrol bloqueia correntes tipo TRPM6/TRPM7 em miócitos vasculares de animais hipertensos e normotensos;
- Carvacrol possui um potencial efeito anti-hipertensivo em animais SHR.

REFERÊNCIAS

- ABRIEL, H. et al. TRPM4 channels in the cardiovascular system: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Biochem Pharmacol.*, v. 84, n.7, p. 873-81, 2012;
- ADACHI, M; NARA, Y.; MANO, M.; IKEDA, K.; HORIE, R; YAMORI, Y. Intralymphocytic free calcium and magnesium in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and effects of blood pressure and various antihypertensive agents. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* v.20, n.9, p.587-93,1993;
- ADAMOVA Z.; OZKAN S.; KHALIL R.A. Vascular and cellular calcium in normal and hypertensive pregnancy. *Curr Clin Pharmacol.* ;v., 4, n.3, p.172-90, 2009;
- ADEBIYI, A. et al. An Elevation in Physical Coupling of Type 1 Inositol 1,4,5-Trisphosphate (IP3) Receptors to Transient Receptor Potential 3 (TRPC3) Channels Constricts Mesenteric Arteries in Genetic Hypertension. *Hypertension.* v.60, n.5, p.1213-9, 2012;
- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v. 219, n. 6, p. 1698-1705, 1970;
- AMENTA, F.; TULLIO, M. A.; TOMASSONI, D. Arterial hypertension and brain damage--evidence from animal models (review). *Clinical and Experimental Hypertension*, v. 25, n. 6, p. 359-380, 2003;
- AY, B., PRAKASH, Y.S., PABELICK, C.M., SIECK, G.C., Store-operated Ca²⁺ entry in porcine airway smooth muscle. *Lung Molecular cell Biology*, v. 286, p. 909–917, 2004;
- AYDIN, S.; BASARAN, A.A.; BASARAN, N. Modulating effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.1299-305, 2005;
- AUDYN, Y. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta Med.* v. 73, n.13, p.1365-71, 2007;
- BAKKALI, F.; et al. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, n.2, p.446-475, 2008;
- BASTOS J.F.; et al. Hypotensive and Vasorelaxant Effects of Citronellol, a Monoterpene Alcohol, in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, v. 106, n.4, p. 331-7, 2010;
- BATLOUNI, M, Endotélio e hipertensão arterial. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v.8, n.3, p. 328-38, 2001;

- BAYRAMOGLU, G. et al. Carvacrol partially reverses symptoms of diabetes in STZ-induced diabetic rats. *Cytotechnology*, v. 66, p.251–257, 2014;
- BEECH, D. J.; MURAKI, K.; FLEMMING, R. Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP. *J. Physiol.*, London, v. 559, n. 3, p. 685 - 706, 2004;
- BELL, D.; KELSO, E. J.; ARGENT, C. C.; LEE, G. R.; ALLEN, A. R.; MCDERMOTT, B. J. Temporal characteristics of cardiomyocyte hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. *Cardiovascular Pathology*, v. 13, n. 2, p. 71-79, 2004;
- BEHRENDT, H. J. et al. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *British Journal of Pharmacology*, v. 141, p. 737–745, 2004;
- BERGDAHL, A. et al. Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca^{2+} entry dependent on TRPC1. *Circ. Res.*, Baltimore, v. 93, n. 9, p. 839 - 847, 2003;
- BING, O. H.; CONRAD, C. H.; BOLUYT, M. O.; ROBINSON, K. G.; BROOKS, W. W. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart Failure Reviews*, v. 7, n. 1, p. 71-88, 2002;
- BOSKABADY, M.H.; RAMAZANI, M.; TABELI, T. Relaxant effects of different fractions of essential oil from *Carum copticum* on guinea pig tracheal chains. *Phytother Res.* v.17, n.10, p.1145-9, 2003;
- BOTELHO, M.A.; et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, v.40, p.349-356, 2007;
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 8, p. 30-40, 2001;
- CALIXTO, J. B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol. Ther.*, Oxford, v. 106, n. 2, p. 179 -208, 2005;
- CARVALHO, J. G. R. Hipertensão arterial secundária. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 29, p. 220-231, 1996;
- CHAUHAN, S.; RAHMAN, A.; NILSSON, H.; CLAPP, L.; MACALLISTER, R.; AHLUWALIA, A. NO contributes to EDHF-like responses in rat small arteries: a role for NO stores. *Cardiovascular Research*, v. 57, p. 207-216, 2002;

- CHE, H. et al. Functional TRPV and TRPM channels in human Preadipocytes . *Eur J Physiol*, v.466, p.947–959, 2014;
- CHEN, K.T. et al. Contribution of TRPC1 and Orai1 to Ca^{2+} entry activated by store depletion. *Adv Exp Med Biol.*, v.704, 2011;
- CHOKSHI, R.; FRUASAHA, P.; KOZAK, A. 2-Aminoethyl diphenyl borinate (2-APB) inhibits TRPM7 channels through an intracellular acidification mechanism. *Channels*, v. 6, n.5, 362-369, 2012;
- CHUBANOV, V. et al. Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v. 101, n. 9, p. 2894 - 2899, 2004;
- CHUNG, S. et al. Transient Receptor Potential C4/5 Like Channel Is Involved in Stretch-Induced Spontaneous Uterine Contraction of Pregnant Rat. *Korean J Physiol Pharmacol*, v.18, p. 503–508, 2014;
- CLAPHAM, D. E.; RUNNELS, L. W.; STRUBING, C. The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.*, London, v. 2, n. 6, p. 387 -396, 2001;
- CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. *Nature*, London, v. 426, n. 6966, p. 517 - 524, 2003;
- CLAPHAM, D. E. et al. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels. *Pharmacol. Rev.*, Baltimore, v. 57, n. 4, p. 427 - 450, 2005;
- CONRAD, C. H.; BROOKS, W. W.; HAYES, J. A.; SEN, S.; ROBINSON, K. G. O. H. L. *Circulation*, v. 91, p. 161-70, 1995;
- COHEN, R. A.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-Dependent Hyperpolarization: Beyond Nitric Oxide and Cyclic GMP. *Circulation*, v.92, p.3337 – 3349, 1995;
- COSENS, D. J.; MANNING, A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, London, v. 224, n. 5216, p. 285-287;
- COWLEY, A. W. The genetic dissection of essential hypertension. *Nature Reviews Genetics*, v.7, n. 11, p. 829-840, 2006;
- CRAVEIRO, A. A.; DE QUEIROZ, D. C. Óleos Essenciais e Química Fina. *Quim Nova*, v.16, p.224-228, 1993;
- CRNICH, R. et al. Vasoconstriction resulting from dynamic membrane trafficking of TRPM4 in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. v. 299, n. 3, p. C682-94, 2010;
- CRIBBS, L. L. T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. *Cell Calcium*, v.40, n.20, p. 221-230, 2006;

- COSTA, A. F. *Farmacognósia*. 3 ed., Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1: 362, 1975;
- CONRAD, C. H. et al. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*, v. 91, n. 1, p. 161-170, 1995;
- CURTIS, Tim M.; SCHOLFIELD, C. Norman. Nifedipine blocks Ca²⁺ store refilling through a pathway not involving L-type Ca²⁺ channels in rabbit arteriolar smooth muscle. *The Journal of physiology*, v. 532, n. 3, p. 609-623, 2001;
- D'ANGELO, E. K. G.; SINGER, H. A.; REMBOLD, C. M. Magnesium Relaxes Arterial Smooth Muscle by Decreasing Intracellular Ca²⁺ Without Changing Intracellular Mg²⁺. *J. Clin. Invest.* v. 89, p. 1988-1994, 1992;
- DANTAS, B.P.V.; et al. Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvedilol in normotensive rat. *Vascular Pharmacology*, v. 67-69, p. 48-58, 2015;
- DIETRICH, A. et al. Studies on TRPC6-deficient mice reveal its nonredundant role in the regulation of smooth muscle tone. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, Berlin, v. 367, n. 1, p. 238, 2003;
- DIETRICH, A. et al. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6 -/- mice. *Mol. Cell Biol.*, Washington, v. 25, n. 16, p. 6980 - 6989, 2005;
- DIETRICH, A. et al. The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance. *Pflügers Arch., Berlin*, v. 451, n. 1, p. 72 - 80, 2005c;
- DOGGRELL, S. A.; BROWN. L. Rats models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research*, v. 39, p. 89 -105, 1998;
- DOLPHIN, A. C. A short history of voltage-gated calcium channels. *British Journal of Pharmacology*, v. 147, n. 1, p. S56-S62, 2006;
- EARLEY, S. et al. TRPV4 forms a novel Ca²⁺ signaling complex with ryanodine receptors and BK_{Ca} channels. *Circ. Res.*, Baltimore, v. 97, n. 12, p. 1270 - 1279, 2005;
- EARLEY, S.; GONZALES, A.L.; GARCIA, Z. I. A Dietary Agonist of Transient Receptor Potential Cation Channel V3 Elicits Endothelium-Dependent Vasodilation. *Mol Pharmacol.*, v. 77, p. 612-620, 2010;
- EARLEY, S. TRPA1 channels in the vasculature. *British Journal of Pharmacology*, v. 167, p. 13-22, 2012;

- EARLEY, S.; WALDRON, B.J; BRAYDEN, J. E. Critical Role for Transient Receptor Potential Channel TRPM4 in Myogenic Constriction of Cerebral Arteries. *Circ Res.*, v.95, p.922-929, 2004;
- EARLEY, S.; BRAYDEN, J.E. Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiol Rev.*, v. 95, p. 645–690, 2015;
- EDER, P. et al. Na⁺ entry and modulation of Na⁺/Ca²⁺ exchange as a key mechanism of TRPC signaling. *Pflügers Arch.*, Berlin, v. 451, n. 1, p. 99 - 104, 2005;
- ELLIOTT, W. J. Systemic Hypertension. *Curr. Probl. Cardiol.*, Chicago, v.32, p.201-259, 2007;
- ERTEL, E. A.; CAMPBELL, K. P.; HARPOLD, M. M.; HOFMANN, F.; MORI, T.; PEREZ-REYES, E.; SCHWARTZ, A.; SNUTCH, T. P.; TANABE, T.; BIRNBAUMER, L.; TSIEN, R. W.; CATTERALL, W. A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, v. 25, n. 3, p. 533-535, 2000;
- FÉLÉTOU, M; KÖHLER, R; VANHOUTTE, P. M. Nitric oxide: Orchestrator of endothelium-dependent responses. *Ann. Med*, v. 7, 2011;
- FELLNER, S. K.; ARENDSHORST, W. J. Ryanodine receptor and capacitative Ca²⁺ entry in fresh preglomerular vascular smooth muscle cells. *Kidney International*, v. 58, p. 1686–1694. 2000;
- FIRTH, A. L.; REMILARD, C. V.; YAN, J. X. TRP channels in hypertension. *Biochim Biophys Acta*, Amsterdam, v.1772, n. 8, p.895 -906, 2007;
- FRICHAUF, I. et al. The STIM/Orai coupling machinery. *Channels*, v. 2, n. 4, p. 1-8, 2008;
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980;
- GIACHINI, F.R. et al. STIM1/Orai1-mediated store-operated Ca entry: the tip of the iceberg. *Braz J Med Biol Res*, v. 44, n.11, p. 1080-1087, 2011;
- GONZALES, A.L.; AMBERG, G.C.; EARLEY, S. Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum is required for sustained TRPM4 activity in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 299, p. C279–C288, 2010;
- GRAND, T. et al. 9-Phenanthrol inhibits human TRPM4 but not TRPM5 cationic channels. *British Journal of Pharmacology* , v. 153, p. 1697–1705, 2008;

GWANYANYA, A. et al. ATP and PIP₂ dependence of the magnesium-inhibited, TRPM7-like cation channel in cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* v.291, p. C627–C635, 2006;

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS I.A., Muscarinic agonist properties involved in the hypotensive and vasorelaxant responses of rotundifolona in rats. *Plant med*, v.68, p.700-704, 2002;

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS I.A., Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolona. *Braz j Med Biol Res* , v.36, p.549-560, 2004;

GUIMARÃES, A.G.; et al. Bioassayguided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v.107, p.949–957, 2010;

GUIMARÃES, A.G.; et al. Orofacial analgesic-like activity of carvacrol in rodents. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v.385, p.253-263, 2012;

GUINAMARD, R.; HOF, T.; DEL NEGRO, C.A. The TRPM4 channel inhibitor 9-phenanthrol. *British Journal of Pharmacology*. 171, p. 1600–1613, 2014;

GUL, A.S.D., et al. The effects of oral carvacrol treatment against H₂O₂ induced injury on isolated pancreas islet cells of rats. *Islets*. v.5, n.4, p.149-55, 2013;

GURKOFF et al. Voltage-Gated Calcium Channel Antagonists and Traumatic Brain Injury. *Pharmaceuticals*, v. 6, p. 788-812, 2013;

HARTENECK, C.; GOLLASCH, M. Pharmacological Modulation of Diacylglycerol-Sensitive TRPC3/6/7 Channels. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2011, 12, 35-41;

HE, Y. et al. Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angiotensin II. *Circ. Res.*, Baltimore, v. 96, n. 2, p. 207 - 215, 2005;

HILL A.J., HINTON J.M., CHENG H., GAO Z., BATES D.O., HANCOX J.C., LANGTON, P.D., JAMES A.F., A TRPC-like non-selective cation current activated by ladrenoceptors in rat mesenteric artery smooth muscle cells. *Cell Calcium*, 2006;

HIROI, T.; et al. Neutrophil TRPM2 channels are implicated in the exacerbation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, v.97, n.2, p.271-281, 2013;

HOFMANN, T. et al. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca²⁺-activated monovalent selective cation channel. *Curr. Biol.*, London, v. 13, n. 13, p. 1153 - 1158, 2003;

- HOFMANN, T. et al. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, London, v. 397, n. 6716, p. 259 - 263, 1999;
- HUI, K.; GUO, Y.; FENG, Z. P. Biophysical properties of menthol-activated cold receptor TRPM8 channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, New York, v. 333, n. 22, p. 374 - 382, 2005;
- INOUE, R. et al. The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular $\alpha(1)$ -adrenoceptor-activated Ca^{2+} -permeable cation channel. *Circ. Res.*, Baltimore, v. 88, n. 3, p. 325 - 332, 2001;
- INOUE, R. et al. Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. *Circ. Res.*, Baltimore, v. 99, n. 2, p.119 - 131, 2006;
- IRIGOYEN, M. C; CONSOLIN-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v.8, p.55-62, 2001;
- ÍSCAN, G. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J Agric Food Chem.*, v.50, n. 14, p. 3943-6, 2002;
- JACKSON, W. F. Ion channel and vascular tone. *Hypertension*. v.35 (parte 2), p.173 -178, 2000;
- JOHNSON, C.D. et al. Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channel involvement in the regulation of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, Bethesda, v. 296, n. 6, p. H1868-1877, 2009;
- JOHNSON, J. D.; SNYDER, C. H. Calcium regulation of smooth muscle contractile proteins. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*, v. 30, p. 153-174, 1995;
- JONES, MR.; MARTINS, J.E.; CLEMENS, R.A. Mineral balance and blood pressure in the young spontaneously hypertensive rat. *J Nutr.*, v.118, n.1, p.114-20, 1988;
- JULIUS, S. Blood pressure Lowering only or more? Has the jury reached its verdict? *Am. J. Cardiol.*, New York, v. 100, n. 3A, p. 32J – 37J, 2007;
- JUNG, S. et al. TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, Bethesda, v. 282, n. 2, p. C347 - C359, 2002;
- KEVIN, S. T.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can J Pharmacol*, n.83, p.215 - 242, 2005;
- KOBAYASHI, S., KANAIDE, H., NAKAMURA, M. K^{+} -depolarization induces a direct release of Ca^{2+} from intracellular storage sites in cultured vascular

- smooth muscle cells from rat aorta. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 129, p. 877–884, 1985;
- KOBAYASHI, S., KANAIDE, H., NAKAMURA, M. Complete overlap of caffeine and K⁺ depolarization-sensitive intracellular calcium storage site in cultured rat arterial smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 261, p. 15709–15713, 1986;
- KOPARAL, A.T.; ZEYTIÑOGLU, M. Effects of carvedilol on a human nonsmall cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549. *Cytotechnology*, v.43, p.149-54, 2003;
- KUNDU, S.; RAO, J. P. The story of spontaneously hypertensive rat (SHR): A Review. *Al Ameen Journal of Medical Science*, v. 1, n. 1, p. 65-66, 2008;
- LAVABRE, M. *Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais*. 2. ed. Rio de Janeiro, Record, 1993;
- LACINOVÁ, L. Voltage-dependent calcium channels. *General Physiology and Biophysics*, v. 24, suppl. 1, p. 1-78, 2005;
- LACINOVÁ, L.; HOFMANN, F. Ca²⁺-and voltage – dependent inactivation of the expressed L-type Cav1.2 calcium channels. *Arch Biochem Biophys*, v.437, p. 42 – 50, 2005;
- LEDOUX, J.; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology Bethesda, Md*, v. 21, p. 69-78, 2006;
- LI, M.; JIANG, J.; YUE, L. Functional Characterization of Homo- and Heteromeric Channel Kinases TRPM6 and TRPM7. *J Gen Physiol.*, v.127, n. 5, p.525-37, 2006;
- LIÈVREMONT J.P.; BIRD, G.S.; PUTNEY, J.W. Canonical transient receptor potential TRPC7 can function as both a receptor- and store-operated channel in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, v.287, n.6, p.C1709-16, 2004;
- LIPSCOMBE, D.; HELTOM, T. D.; XU, W. L-type calcium channels: the low down. *J. Neurophysiol*, v.92, n.5, p. 2633 - 41, 2004;
- LIU, D.; LIMAN, E. R. Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v. 100, n. 25, p. 15160 - 15165, 2003;
- LIU, C. et al. Depletion of intracellular Ca²⁺ stores enhances flow-induced vascular dilatation in rat small mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.*, London, v.147, n. 5, p.506 - 515, 2006;

- LIU, X.R. et al., Down-Regulation of TRPM8 in Pulmonary Arteries of Pulmonary Hypertensive Rats. *Cell Physiol Biochem.*, v. 31, n.6, p. 892–904, 2013;
- LÜSCHER, T. F.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, v. 8, n. 4, p. 344-348, 1986;
- MCELROY S.P.; GURNEY, A.M.; DRUMMOND, R.M. Pharmacological profile of store-operated Ca^{2+} entry in intrapulmonary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* v.584, n. 1, p.10-20, 2008;
- MAGYAR, J. et al. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *European Journal of Pharmacology*, v.487, p. 29–36, 2004;
- MACIANSKIENE, R. et al. Characterization of Mg^{2+} -regulated TRPM7-like current in human atrial myocytes. *Journal of Biomedical Science*, 19:75, 2012;
- MACPHERSON, L. J. et al. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr. Biol.*, Cambridge, v. 15, n. 10, p. 929 - 934, 2005;
- MAROTO, R. et al. TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat. Cell Biol.*, London, v. 7, n. 2, p. 179 - 185, 2005;
- MCNAMARA, F. N.; RANDALL, A.; GUNTHORPE, M. J. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *Br. J. Pharmacol.*, London, v. 144, n. 6, p. 781 - 90, 2005;
- MCNAMARA, C.R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *PNAS*, v. 104, n. 33, p. 13525–13530, 2007;
- MENÈ, P.; PUNZO, G.; PIROZZI, N. TRP Channels as Therapeutic Targets in Kidney Disease and Hypertension. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 386-397, 2013;
- MILER, B.A.; et al. The second member of transient receptor potential-melastatin channel family protects hearts from ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v.304, p.1010-1022, 2013;
- MILLER, B.A.; et al. TRPM2 Channels Protect against Cardiac. *The Journal of Biological Chemistry*, v.289, p.7615-7629, 2014;
- MILLS, R.W.; MILAN, D.J. Trpm4 - Linked Isolated Cardiac Conduction Defects: Bad Trafficking Causes Electrical Gridlock. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, v.3, p.311-313, 2010.

MINKE, B. TRP channels and Ca²⁺ signaling. *Cell Calcium*, Edinburgh, v.40, n. 3, p.261 - 275, 2006;

MIWA S., et al. Ca²⁺ entry channels in rat thoracic aortic smooth muscle cells activated by endothelin-1. *Jpn J Pharmacol*, v. 80, n.4, p.281–8, 1999;

MONTELL, C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE.*, Washington, v. 272, n. 1, p. re3, 2005;

NADLER, M. J. et al. L TRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature*, London, v. 411, n. 6837, p. 590 - 595, 2001;

NAZIROGLU, M.; OZGUL, C. Effects of Antagonists and Heat on TRPM8 Channel Currents in Dorsal Root Ganglion Neuron Activated by Nociceptive Cold Stress and Menthol. *Neurochem Res*, v.37, p.314–320, 2012;

NELSON, P.L.; BECK, A.; CHENG, H. Transient receptor proteins illuminated: Current views on TRPs and disease. *The Veterinary Journal*, v.187, p. 153–164, 2011;

NILIUS, B.; VOETS, T. TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch.*, Berlin, v. 451, n. 1, p. 1 - 10, 2005;

Noorani, M.Z.; Noel, R.C., Marrelli, S.P. Upregulated TRPC3 and downregulated TRPC1 channel expression during hypertension is associated with increased vascular contractility in rat. *Front Physiol.* v.2, p.42, 2011;

OASTES, J. A.; BROWN, N. J. Anti-hipertensivos e terapia farmacológica da hipertensão. Em: LAURENCE L. BRUNTON; BRUCE A. CHABNER; BJORN C. KNOLLMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*. 10. ed. Rio de Janeiro: Editora McGraw-Hill. Cap. 32, p. 657-678, 2003;

OHYA, Y.; ABE, I.; FUJI, K.; TAKATA, Y.; FUJISHIMA, M. Voltage-dependent Ca²⁺ channels in resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *Circulation Research*, v. 73, p. 1090-1099, 1993;

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal*, v. 27, n. 1, p. 282-293, 1963;

OKAMOTO, K.; Tabei, R.; FUKUSHIMA, M.; NOSAKA, S.; YAMORI, Y.; ICHIJIMA, K.; HAEBARA, H.; MATSUMOTO, M.; MARUYAMA, T.; SUZUKI, Y.; TAMEGAI, M.; Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal*, v. 30, n. 6, p. 703-716, 1966;

PARNAS, M.; et al. Carvacrol is a novel inhibitor of *Drosophila* TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell Calcium*, v.45, n.3, p.300-330, 2009;

PARAVICINI, T.M.; et al. TRPM7: A unique channel involved in magnesium homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.44, p. 1381-1384, 2012;

PATEL, T.; ISHIIJI, Y; YOSIPOVITCH, G. Menthol: a refreshing look at this ancient compound. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis, v.57, n. 5, p. 873 881, 2007;

PEIXOTO-NEVES, D. et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundam Clin Pharmacol.* v.24, n.3, p.341-50, 2010;

PESIC, A.; MADDEN, J. A.; PESIC, M.; RUSCH, N. J. High blood pressure upregulates arterial L-type Ca²⁺ channels: is membrane depolarization the signal? *Circulation Research*, v. 94, p. e97-e104, 2004;

PHELPS, C. B.; GAUDET, R. The Role of the N Terminus and Transmembrane Domain of TRPM8 in Channel Localization and Tetramerization. *J. Biol. Chem.*, n. 50, v. 282, p. 36474 - 36480, 2007;

PICON, R.V., et al. Trends in Prevalence of Hypertension in Brazil: A Systematic Review with Meta-Analysis. *Plos One*, v.7, n.10, 2012;

PINTÉROVÁ, M.; KUNEŠ, J.; ZICHA, J. Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. *Physiological Research*, v. 60, n. 3, p. 381-402, 2011;

PRIETO JM.; et al. In vitro activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. *Food Chemistry*, v.104, p. 889-895, 2007;

PUSGLEY, M. K.; TABRIZCHI, R. The vascular system an overview of structure and function. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 44, n. 2, p. 333-340, 2000;

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; et al. Carvacrol, (-)-borneol and citral reduce convulsant activity in rodents. *African Journal of Biotechnology*, v.9, p.6566–6572, 2010;

RATZ, P. H; BERG, K. M. 2-Aminoethoxydiphenyl borate inhibits KCl-induced vascular smooth muscle contraction. *European Journal of pharmacology*, v. 141, n. 3, p. 177–183, 2006;

ROGER, V.L.; et al. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics–2012 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, vp125, n.1, p.188-197,2012;

ROSKER, C. et al. Ca²⁺ signaling by TRPC3 involves Na⁺ entry and local coupling to the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 279, n. 14, p. 13696 - 13704, 2004;

RUNNELS, L. W.; YUE, L.; CLAPHAM, D. E. TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities. *Science*, New York, v. 291, n. 5506, p. 1043 - 1047, 2001;

SALIDO, G. M.; JARDÍN, I.; ROSADO, J.A. The TRPC Ion Channels: Association with Orai1 and STIM1 Proteins and Participation in Capacitative and Non-capacitative Calcium Entry. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. v. 704, 2011;

SANTOS F.A.; RAO V.S. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother Res.* v. 14, n.4, p.240-4, 2000;

SARER, E.; PANCALI, S.; YILDIZ, S., SHWARZ O., DAVIS P.H.. Chemical composition and antimicrobial composition of essential oil of *Origanum minutiflorum* *J Fac Pharm Ankara* v.25,p. 29-38, 1996;

SCHMITZ, C. et al. Regulation of Vertebrate Cellular Mg²⁺ Homeostasis by TRPM7. *Cell*, v. 114, p. 191–200, 2003;

STEKIEL, W. J.; CONTNEY, S. J.; RUSCH, N. J. Altered α -receptor control of in situ membrane potential in hypertensive rats. *Hypertension*, v. 21, p. 1005-1009, 1993;

SILVA, D. F. et al. Rotundifolone-induced relaxation is mediated by BK(Ca) channel activation and Ca(v) channel inactivation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, Copenhagen, v. 109, n. 6, p. 465-475, 2011;

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Rev. Bras. Hipertens.*, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 8-11, 2010;

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

SON, D.J.; et al. Antiplatelet activity of *Thujopsis dolabrata* var. *hondai*-derived component against platelet aggregation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.15, p. 425-427, 2005;

SONKUSARE, S.; PALADE, P. T.; MARSH, J. D.; TELEMAQUE, S.; PESIC, A.;

- RUSCH, N. J. Vascular calcium channels and high blood pressure: Pathophysiology and therapeutic implications. *Vascular Pharmacology*, v. 44, i. 3, p. 131-142, 2006;
- SVENNINGSSEN, P. et al. T-type Ca^{2+} channels facilitate NO-formation, vasodilatation and NO-mediated modulation of blood pressure. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, v.466, n.12, p.2205-2214, 2014;
- SUZUKI, Y. et al. Involvement of TRP channels in the signal transduction of bradykinin in human osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 410, p. 317–321, 2011;
- TAHVANAINEN, A. et al. Increased wall tension in response to vasoconstrictors in isolated mesenteric arterial rings from patients with high blood pressure. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 99, p. 440-449, 2006;
- TANAKA, Y; MOCHIZUKI, Y; TANAKA, H; SHIGENOBU, K. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympatic neurogenic contraction of rat mesenteric. *British Journal of Pharmacology*, v. 128, p. 1602-1608, 1999;
- TANAKA, K; KATO, K; TAKANO, T; et al. Acute effects of intravenous nicorandil on hemodynamics in patients hospitalized with acute decompensated heart failure. *Journal of Cardiology*, v. 56, p. 291—299, 2010;
- TAKAHASHI, N. et al. Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell Calcium*. v. 50, n. 3, p. 279-87, 2011;
- THEBAULT, S., ZHOLOS, A., ENFISSI, A. SLOMIANNY, C. DEWAILLY, E., ROUDBARAKI, M., PARYS, J., PREVARSKAYA, N. Receptor-operated Ca^{2+} entry mediated by TRPC3/TRPC6 proteins in rat prostate smooth muscle (PS1) cell line. *J. Cell. Physiol*, v. 204, 302-328, 2005;
- THORNELOE, K. S. et al. Urodynamic properties and neurotransmitter dependence of urinary bladder contractility in the BK channel deletion model of overactive bladder. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, Bethesda, v. 289, n. 3, p. F604 - F610, 2005;
- THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 83, n. 3, p. 215-242, 2005;
- TIAN, H.; LAI, D.M. Analysis on the volatile oil in *Origanum vulgare*. *Zhongyaocai*. v.29, n.9, p. 920–921, 2006;
- TOGASHI, K.; INADA, H.; TOMINAGA, M. Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *British Journal of Pharmacology*, v. 153; p. 1324–1330, 2008;

- TOUYZ, M. R. et al. Differential regulation of transient receptor potential melastatin 6 and 7 cation channels by ANG II in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v.290, p. R73–R78, 2006;
- TOUYZ, R. M. Magnesium and hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, Cambridge, v. 15, n. 2, p. 141 - 144, 2006;
- TOUYZ, R. M. Transient receptor potential melastatin 6 and 7 channels, magnesium transport, and vascular biology: implications in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.294, p. H1103–H1118, 2008;
- TREBAK, M. STIM/Orai signalling complexes in vascular smooth muscle. *J Physiol*. v. 590, n.17, p. 4201–4208, 2012;
- TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circulation Research*, v. 48, n. 3, p. 309-319, 1981;
- UMEZU, T.; SAKATA, A.; ITO, H. Ambulation-promoting effect of peppermint oil and identification of its active constituents. *Pharmacol Biochem Behav*, v.69, n.3-4, p.383-90, 2001;
- VANNIER, B., et al. The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *J Biol Chem*, v.273, p.8675 - 8679, 1998;
- VENKATACHALAM, K.; MONTELL, C. TRP Channels. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 76, p. 387 - 417, 2007;
- VOETS, T. et al. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature*, London, v. 430, p. 748 - 754, 2004;
- VOGT-EISELE, A. K. et al. Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br. J. Pharmacol.*, London, v.151, n. 4, p.530 - 540, 2007;
- VOKOU, D.; KOKKIMI, S.; BESSIERE, J.M. *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece: distribution, volatile oil yield and composition. *Econ Bot.* v.42, p. 402-412, 1988.
- WATANABE, H.; et al. TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 118, p.337-351, 2008;
- WATANABE, M. et al. Trpm7 contributes to intercellular junction formation in mouse urothelium. *J Biol Chem.*, 2015;
- WELSH, D. G. et al. Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ. Res.*, Baltimore, v. 90, n. 3, p. 248 - 250, 2002;
- WHO - World Health Organization. Occupational health. Geneva; 2014. Acesso em: 26 outubro 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>;

WYNNE, B.M.; CHIAO, C.W.; WEBB, R.C. Arterial Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *J Am Soc Hypertens.* v. 3, n.2, p. 84–95, 2009;

WU, L.J. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacological Reviews*, v.62, p.381-404, 2010;

XU, H.; BLAIR, N. T.; CLAPHAM, D. E. Camphor Activates and Strongly Desensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 Channel in a Vanilloid-Independent Mechanism. *J. Neurosci.*, v. 25, n. 39, p. 8924 - 8937, 2005;

XU, H.; et al. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nature Neuroscience*, v. 9, p.628 – 635, 2006;

YANG, X. R. et al. Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, Bethesda, v.290, p.L1267 - L1276, 2006;

YIN, J.; KUEBLER, W.N. Mechanotransduction by TRP Channels: General Concepts and Specific Role in the Vasculature. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v.56, p.1-18, 2010;

YOGI, A.; et al. Vascular biology of magnesium and its transporters in hypertension. *Magnesium Research*, v.23, n.4, p.207-215, 2010;

YOGI, A. et al. Transient Receptor Potential Melastatin 7 (TRPM7) Cation Channels, Magnesium and the Vascular System in Hypertension. *Circulation Journal*, v.75, 2011;

YU, F. H; CATTERALL, W. A; The VGL-Chanome: A Protein Superfamily Specialized for Electrical Signaling and Ionic Homeostasis. *Science Signaling: Signal Transduction Knowledge Environment*, v. 15, n.253, 2004;

YUE, Z. et al. Role of TRP channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v..308, n.3, p. H157-82, 2015;

ZAGRANICHNAYA, T.K., WU, X., VILLERREAL, M.L., Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells. *J. Biol. Chem.* 280, 29559–29569, 2005;

ZICHA, J. et al. The Interaction of Calcium Entry and Calcium Sensitization in the Control of Vascular Tone and Blood Pressure of Normotensive and Hypertensive Rats. *Physiol. Res*, v.. 63, p. S19-S27, 2014;

ZHANG, M.J. et al.. The role of TRPV1 in improving VSMC function and attenuating hypertension. *Prog Biophys Mol Biol.* v. 117, n.2-3, p. 212-6, 2015;

ZUKER, C. S. A cool ion channel. *Nature*, London, v. 416, p. 27 - 28, 2002;

ZYGMUNT, P. M. et al. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, London, v. 400, n. 6743, p. 452 - 457, 1999.