

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES DE HISTAMINA E DOS CANAIS IÔNICOS DE CÁLCIO E POTÁSSIO NO EFEITO VASORRELAXANTE DO METIL EUGENOL SOBRE A ARTÉRIA E VEIA UMBILICAL HUMANA.

Gabriela Lucena Calixto¹, Paulo Ricardo Batista¹, Andressa de Alencar Silva¹, Francisco Junio Dias¹, Kamilla Bezerra Cabral¹, Francisca Daliane Severino da Silva¹, Antônio César Vieira da Silva¹, Roseli Barbosa¹

Resumo: Os produtos naturais são relevantes na cura de patologias, à exemplo: hipertensão. Os vasos do cordão umbilical humano estão sujeitos a alterações vasoativas ocasionadas pelas síndromes hipertensivas gestacionais. Nesse sentido, o metil-eugenol (ME) um fenilpropanóide, análogo do eugenol, possui relatos do seu relaxamento em musculatura lisa de animais, mas sem descrições da sua atividade em vasos umbilicais. Assim, esse estudo buscou avaliar o envolvimento dos receptores de histamina e os canais iônicos Ca^{2+} e K^+ sobre o efeito vasorrelaxante do ME em AUH E VUH. Fragmentos de cordão umbilical foram obtidos com o consentimento de doadoras. Os vasos foram isolados, seccionados em anéis de 3 a 4 mm, nutridos por solução de Krebs-Henseleit, montados em banho de órgãos e submetidos a avaliação do efeito do ME (1-1200 μ M em AUH e VUH) na presença de agonistas contráteis: K^+ (KCl 60 mM), HIST (10 μ M), 5-HT (10 μ M), BaCl₂ e CaCl₂ (0,1 – 30 mM), bem como em presença de bloqueadores de canais de K^+ (TEA 1 mM; 4-AP 1 mM; e GLI 10 μ M). Com essa investigação, espera-se contribuir com desenvolvimento de alvos terapêuticos para o tratamento das disfunções hipertensivas gestacionais.

Palavras-chave: Metil-eugenol. Banho de órgãos. Vasos umbilicais humanos.

1. Introdução

As desordens hipertensivas caracterizam-se como um problema de saúde mundial. Estão classificadas em 4 categorias sendo elas: hipertensão crônica, hipertensão gestacional, pré-eclâmpsia-eclâmpsia e hipertensão crônica com pré-eclâmpsia sobreposta (WILKERSON; OGUNBODEDE, 2019). Em 2019, o *American College of Obstetrician and Gynecologists* (Colégio Americano de Obstetria e Ginecologia - ACOG) publicou um boletim destacando que as síndromes hipertensivas gestacionais resultam em significativa morbimortalidade materna, fetal e neonatal. Além disso, o mesmo colégio relatou que a taxa de hipertensão crônica materna aumentou 67% de 2000 a 2009, com maior aumento (87%) entre mulheres afro-americanas, o que corresponderia a cerca de 76.000 mulheres (ACOG, 2019).

1 Universidade Regional do Cariri, email: Gabriela.lucena@urca.br

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



Essas complicações, por sua vez, ocasionam efeitos deletérios que afetam diversos sistemas na gestante, principalmente o vascular, hepático, renal e cerebral (PERAÇOLI et al., 2019; STEEGERS et al., 2010), além de gerar aumento da resistência periférica, a vasoconstrição geral, resistência vascular da circulação umbilical e um fluxo sanguíneo insuficiente para o feto, o que ocasiona restrição do crescimento fetal intrauterino, redução do líquido amniótico e aporte de oxigênio prejudicado. (MOHAUPT, 2007).

Frente aos inúmeros distúrbios que afetam a gestante e o feto decorrentes das síndromes que alteram o mecanismo contrátil vascular, evidencia-se a necessidade de se buscar substâncias que auxiliem no enfrentamento e tratamento dessas doenças. Para tanto, os compostos ativos provenientes de produtos naturais que possuam atividade relaxante em vasos animais constituem uma potencial fonte de moléculas que podem atuar em vasos sanguíneos do cordão umbilical humano (CAROLINA CARDOSOTEIXEIRA et al., 2021). Por dispor de grande disponibilidade e diversidade químicoestrutural, os produtos naturais têm se mostrado promissores para a descoberta de novos fármacos (DANTAS et al., 2022; HUANG et al., 2020; RODRIGUES DA SILVA et al., 2020).

Diante disso, é importante ressaltar que as plantas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários que proporcionam proteção contra patógenos e herbívoros além de servirem como atrativos aromáticos para polinizadores (TAN; NISHIDA, 2012). Dentre eles destaca-se o metil-eugenol (ME), um fenilpropanóide análogo do eugenol (HERRMANN; WEAVER 1999), presente em mais de 450 plantas (TAN; NISHIDA, 2012). Este, por sua vez, é utilizado como agente aromatizante em alimentos, na perfumaria e está presente na composição em óleos utilizados na aromaterapia (TAN; LEE 1982). Tal composto demonstra ter atividades biológicas, como indica Gogoi, R. et al (2020), que observou significativa atividade antioxidante e anti-inflamatória, e moderada atividade antimicrobiana. Ademais, vários estudos descrevem a potente atividade relaxante do ME em músculo liso de traqueia (ARRIETA et al., 2018), íleo de porquinho da índia (LIMA et al., 2000), de cobaias (MAGALHÃES et al., 1998), bem como em algumas preparações vasculares (LAHLOU et al., 2004a; WANG et al., 2021).

Apesar dos relatos acima, não existem estudos sobre o efeito do ME em vasos humanos umbilicais, que constituem um modelo vascular experimental relevante diante dos processos de sinalização que se pode estudar, mas que diferem dos vasos sistêmicos em: morfologia, permanência (são vasos que permanecem apenas no período gravídico), e resposta contrastante, em detrimento a algumas substâncias terapêuticas, tais como os anti- hipertensivos sistêmicos (PERAÇOLI et al., 2019).

Dentro dessa perspectiva o nosso grupo tem desenvolvido estudos com moléculas naturais oriundas de vegetais já descritas em vasos animais (CARDOSO-TEIXEIRA et al., 2018; CAROLINA CARDOSO-TEIXEIRA et al., 2021; DAMIANI; ROSSONI; VASSALLO, 2003) e que possivelmente possam atuar como relaxante da musculatura lisa vascular umbilical, para os quais o

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



carveol (SILVA et al., 2020) e o eugenol (DANTAS et al., 2022) demonstraram efeito vasorrelaxante em AUH. Esses estudos reafirmam os vasos umbilicais como um modelo experimental eficaz para os estudos de mecanismos da contratilidade vascular, bem como destaca a relevância dos produtos naturais como possíveis agentes vasorrelaxantes. Portanto, o presente estudo pretende investigar o efeito do metil eugenol em diferentes padrões de contração de vasos umbilicais humanos.

2. Objetivo

Objetivo geral: Avaliar o envolvimento dos receptores de histamina e dos canais iônicos cálcio e potássio sobre o efeito vasorrelaxante do metil eugenol em vasos do cordão umbilicais humano.

Objetivos específicos:

- Examinar o efeito relaxante do metil-eugenol sobre os receptores de histamina (10 μ M) em AUH e VUH;
- Avaliar o envolvimento dos canais de cálcio operados por voltagem no efeito relaxante exercido pelo metil-eugenol em AUH e VUH;
- Investigar o envolvimento do metil-eugenol com os canais de K⁺ em AUH e VUH.

3. Metodologia

O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa Humana da Universidade Regional do Cariri-URCA (nº 3.832.881) e pelo Comitê de ética do Hospital e Maternidade São Francisco de Assis. Fragmentos de aproximadamente 10 cm de cordão umbilical humano (porções que serão destinadas ao descarte biológico), serão obtidos com consentimento das mães doadoras (por meio de assinatura de consentimento livre esclarecido), saudáveis, normotensas e sem nenhum distúrbio desse cordão, após parto normal ou cesáreo.

As amostras serão coletadas, armazenadas e transportados para o Laboratório de Fisiofarmacologia das Células Excitáveis da URCA, em solução de Krebs Modificado. Os vasos umbilicais humanos: artéria umbilical humana (AUH) e veia umbilical humana (VUH) serão isolados do seu tecido conectivo e seccionadas em anéis de 3 a 4 mm, os quais serão colocados nas cubetas do banho de órgão contendo 10 mL de solução nutritiva de Krebs *Henseleit* utilizada como meio de perfusão e com a seguinte composição (em mM): (118,0) NaCl, (4,8) KCl, (25,0) NaHCO₃, (2,5) CaCl₂ · 2H₂O, (1,2) KH₂PO₄, (1,2) MgSO₄ · 7H₂O, (11,0) glicose; e pH ajustado para 7,4 com HCl/NaOH, temperatura de 37 °C, gaseificado com mistura carbogênica O₂/CO₂ (95/5%), suspensos individualmente em ganchos, que serão inseridos nos seus lúmens e montados, sob uma tensão isométrica de 3g permanecendo em estabilização por 90 minutos

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



Após o período de estabilização, uma contração com uma solução de Krebs Henseleit modificada com KCl (60 mM), de modo hipertônico, será induzida com a finalidade de certificar a viabilidade do tecido. Serão utilizadas também soluções com baixíssimas concentrações de Ca^{2+} (solução 0Ca^{2+}) para pesquisar a participação do Ca^{2+} extracelular no mecanismo de ação do efeito do metil eugenol. Nestas soluções zero cálcio (0Ca^{2+}) serão omitidas as adições de sais de Ca^{2+} e serão adicionados 0,5 mM do Ácido bis (2-aminoetil) etilenoglicol-N, N, N', N'-tetraacético (EGTA) e 0,004 do ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA).

Em seguida, os agonistas indutores de contração HIST (10 μM), KCL (60mM) 5-HT (10 μM) serão adicionados às preparações em experimentos distintos, a depender do protocolo a ser avaliado. Para examinar o efeito relaxante do metil-eugenol sobre os receptores de histamina (10 μM) em AUH e VUH, evoca-se uma contração com Histamina (10 μM) nos vasos, espera-se 5 minutos após a administração do agente contracturante e adiciona-se a menor concentração da sua substância. Após 5 minutos de administração de sua substância, realiza-se a lavagem do tecido e espera-se entre 30 a 40 min até que o tecido volte aos valores da lavagem antes da administração da histamina. Realiza-se esse processo quantas vezes forem necessárias para a verificação do efeito isolado de cada concentração de sua substância.

Para avaliar o envolvimento dos canais de cálcio operados por voltagem no efeito relaxante exercido pelo ME, em AUH e VUH, após a viabilidade, as preparações serão despolarizadas por potássio K^+ (60 mM) em solução livre de Ca^{2+} . Em seguida, a preparação será mantida em solução de Krebs *Henseleit* zero cálcio (0Ca^{2+}) na presença de EDTA e alta concentração de potássio, a fim de reduzir o cálcio extracelular; depois o metil-eugenol será adicionado nas concentrações de 800 e 1000 μM (concentração única; normalmente usa-se os valores de CE_{50} , e/ou as concentrações máximas das vias eletromecânica e farmacomecânica). Posteriormente, adiciona-se o BaCl_2 ou CaCl_2 (0,1-30 mM) de forma cumulativa. Também será incluído na curva a nifedipina (10 μM), um bloqueador de canais de diidropiridina, como controle positivo, sendo adicionada no lugar do veículo e depois de 10 minutos, sendo realizada curva cumulativa concentração-resposta de BaCl_2 ou CaCl_2 .

A fim de investigar o envolvimento do metil-eugenol com os canais de K^+ em AUH e VUH, após a viabilidade, serão utilizados diferentes bloqueadores de canais de K^+ (TEA 1 mM- canais de K^+ de grande condutância ativados por Ca^{2+} ; 4-AP 1 mM- operados por voltagem; e GLI 10 μM - sensíveis ao ATP), pré-incubados nas preparações. Em seguida, será induzida uma contração com 10 μM de 5-HT. Na fase tônica desta contração, o ME (30 – 1200 μM) será adicionado de modo crescente-cumulativo para obter uma curva concentração-resposta.

Apenas os experimentos com contrações reproduzíveis foram considerados viáveis para as séries experimentais avaliadas. Os dados foram

VIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXVI Semana de Iniciação Científica da URCA

04 a 09 de dezembro de 2023

Tema: "INTERIORIZAÇÃO DA CIÊNCIA E REDUÇÃO DE ASSIMETRIAS: O PAPEL DOS PIBIC'S COMO EXPERIÊNCIA DE ARTICULAÇÃO DA PESQUISA NA GRADUAÇÃO E NA PÓS GRADUAÇÃO"



expressos como média \pm S.E.M; o software Sigma Plot 11.0 foi utilizado para análise estatística e produção gráfica.

4. Resultados

- O presente estudo busca compreender os possíveis mecanismos que possam estar envolvidos na atividade vasorrelaxante exercida pelo metileugenol em vasos do cordão umbilical. Os resultados contribuirão, assim, na validação científica e no desenvolvimento de possíveis alvos terapêuticos que possam ser utilizados no tratamento das disfunções que acometem o mecanismo contrátil dos vasos umbilicais, tais como as síndromes hipertensivas gestacionais.
- Produção do manuscrito para posterior publicação;
- Apresentação dos dados parciais em congressos e outros eventos;

5. Conclusão

Os dados que serão obtidos nesse estudo favorecerão uma importante descrição farmacológica para o ME, bem como a continuidade de pesquisas com esse fenilpropanóide utilizando o modelo experimental de vasos umbilicais humanos, os quais estão sujeitos a diversas alterações prejudiciais, tais como as síndromes hipertensivas gestacionais, sendo necessário assim de moléculas que atuem como fármacos mais eficientes para promover um melhor tratamento.

6. Agradecimentos

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

7. Referências

CAROLINA CARDOSO-TEIXEIRA, A.; OLIVEIRA-ABREU, K.; GABRIEL DE FREITAS BRITO, L.; NORONHA COELHO-DE-SOUZA, A.; HENRIQUE LEAL-CARDOSO, J. Effects of Terpenes and Terpenoids of Natural Occurrence in Essential Oils on Vascular Smooth Muscle and on Systemic Blood Pressure: Pharmacological Studies and Perspective of Therapeutic Use. Terpenes and Terpenoids-Recent Advances. [S. l.: s. n.], 2021. DOI 10.5772/intechopen.94194. Available at: <https://www.intechopen.com/books/terpenes-and-terpenoids-recent-advances/effects-of-terpenesand-terpenoids-of-natural-occurrence-in-essential-oils-on-vascular-smooth-muscle>.

CHAPPELL, L. C.; CLUVER, C. A.; KINGDOM, J.; TONG, S. Pré-eclâmpsia. The Lancet, vol. 398, no. 10297, p. 341–354, 2021. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32335-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32335-7).

DANTAS, D. de M.; SILVA, A. de A.; PEREIRA-DE-MORAIS, L.BASTOS, C. M. de S.; CALIXTO, G. L. KERNTOPF, M. R.; MENEZES, I. R. A. de; WEINREICH, D.; BARBOSA, R. Characterization of the vasodilator effect of eugenol in isolated human umbilical cord arteries. Chemico-Biological Interactions, vol. 359, no. March, p. 109890, 2022. DOI 10.1016/j.cbi.2022.109890. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109890>.