

ESTUDO DO EFEITO RELAXANTE DE UM NOVO COMPOSTO DERIVADO PIRAZÓLICO (LQFM 021) EM AORTAS ISOLADAS DE RATOS

1Daniella Ramos MARTINS; 1Matheus Lavorenti ROCHA; 2Francine PAZINI; 2Luciano Morais LIÃO; 3Ricardo MENEGATTI;

1-Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Faculdade de Farmácia; 2-Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Instituto de Química; 3-Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal; Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO, Brasil.

E-mails: daniellamartins22@gmail.com; rochaml@farmacia.ufg.br; francinepazini@gmail.com; luciano@quimica.ufg.br; rm_rj@yahoo.com

Palavras-chave: relaxamento, derivado pirazólico, aorta.

1.0 INTRODUÇÃO

Os compostos pirazolínicos, ou pirazóis, são drogas de origem sintética que possuem em sua estrutura um anel pirazolínico, que é um heterociclo de cinco membros com dois átomos de nitrogênio adjacentes e três de carbono. Seus derivados podem apresentar atividade antiinflamatória, analgésica, antipirética, antiarrítmica e tranquilizante (Borne, 1995; Gursoy et al., 2000). O composto LQFM 021 é um novo derivado pirazólico com potencial ação vasodilatadora.

O maior foco no estudo em biologia vascular tem sido o papel do endotélio na modulação do tônus do músculo liso vascular pela liberação de óxido nítrico (NO), estimulação da guanilato ciclase solúvel (GCs) e o subsequente aumento no GMPc intracelular (Lamping, 2001). Embora a maioria desses estudos sugira que o relaxamento do músculo liso por muitos agentes é mediado pela produção e aumento dos níveis de GMPc e AMPc, vários outros estudos tem sugerido que algumas substâncias dilatadoras podem relaxar a musculatura lisa por vias diferentes da ativação de nucleotídeos cíclicos (Wang et al., 1993; Cardillo et al., 1997). Além disso, a ativação dos canais para K⁺, levando à hiperpolarização da membrana e inibição do influxo de Ca²⁺ é um importante alvo de ação de drogas vasodilatadoras (Miyoshi et al., 1994). Dessa forma, é fundamental a investigação de vias alternativas de relaxamento, dependentes e independentes dos nucleotídeos cíclicos.

O relaxamento do músculo liso vascular é a base para o tratamento da hipertensão (Stokes, 2004). Vários agentes farmacológicos têm sido sintetizados, mas nenhum deles teve uma ação específica, livre de efeitos colaterais. É importante encontrar vasodilatadores novos, com potencial para uso clínico e não associado a efeitos colaterais.

Nesse estudo, foram investigados alguns mecanismos envolvidos no relaxamento induzido por um novo composto derivado pirazólico (LQFM 021), focando principalmente seu efeito sobre os canais de K^+ e o envolvimento do endotélio em aortas isoladas de ratos.

2.0 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos Wistar machos (180-200g) proveniente do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG). Estes protocolos foram submetidos à análise pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFG. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia da UFG, com livre acesso à ração e água, ciclo claro/escuro de 12 h e com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$). Os ratos foram anestesiados e mortos por secção da aorta abdominal. A aorta torácica foi isolada e teve removidos os tecidos conjuntivos e gordurosos. O tecido foi cortado em anéis (3-4 mm), que foram montados entre dois ganchos de metal, sendo um deles conectado a um transdutor de força para registro da tensão isométrica e o outro fixo à cuba para órgão isolado.

Os anéis foram colocados em câmaras para órgãos isolados contendo solução de Krebs modificada com a seguinte composição (em mM): NaCl 118,0; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; CaCl_2 2,5; MgSO_4 1,2; NaHCO_3 15,0; glicose 5,5; em pH 7,4 sob gaseificação com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2), a 37°C . Em algumas preparações o endotélio vascular foi removido mecanicamente e a efetividade da remoção foi demonstrada pela ausência de relaxamento à acetilcolina ($1 \mu\text{M}$) em anéis de aorta pré-contraídas com a EC_{50} da fenilefrina ($0,1 \mu\text{M}$). Para estudos em preparações com endotélio os anéis foram descartados quando o relaxamento à acetilcolina foi inferior a 80% (Hipólito et al, 2009). Anéis de aorta isolados com (E+) e sem (E-) endotélio foram pré contraídos com fenilefrina e expostos ao LQFM 021 ($1 \mu\text{M}$ to $300 \mu\text{M}$) ou solvente (DMSO). Em preparações E+ as vias do NO/GCs e prostanóides foram analisadas pelo uso de drogas como indometacina (inibidor não seletivo de COX, $10 \mu\text{M}$), L-NAME (inibidor da NOS, $100 \mu\text{M}$) and ODQ (inibidor de

GCs, 1 μM) sobre o relaxamento induzido pelo LQFM 021. A influência dos canais de potássio foram verificadas usando alguns bloqueadores de canais de K^+ , como TEA (bloqueador não seletivo de canais de K^+ , 5 mM), 4-AP (bloqueador de canais K_v , 1 mM), glibenclâmida (bloqueador de canais K_{ATP} , 5 μM), BaCl_2 (bloqueador de canais K_{IR} , 30 μM) e clotrimazol (bloqueador de canais K_{Ca} , 10 μM).

A análise estatística utilizada foi a análise de variância variada (ANOVA) one-way, seguido do pós-teste de Newman-Keuls pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.02, 2001). Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significantes.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 1980, Furchgott & Zawadzki descreveram a função das células endoteliais no relaxamento vascular. O endotélio é importante regulador do tônus vascular devido à síntese e liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstrictoras. Além do NO (Palmer et al., 1987), outros fatores relaxantes são liberados de células endoteliais, como as prostaciclina (Moncada & Vane, 1979).

Em nossos experimentos, o relaxamento induzido pelo LQFM021 foi maior em preparações E^+ (E_{max} : $88.1 \pm 2.1\%$, $n=5$) do que em E^- ($55.0 \pm 6.0\%$, $n=5$) (Fig. 1A). Estes resultados sugerem que o endotélio, através dos seus subprodutos participa do relaxamento estimulado pelo LQFM021.

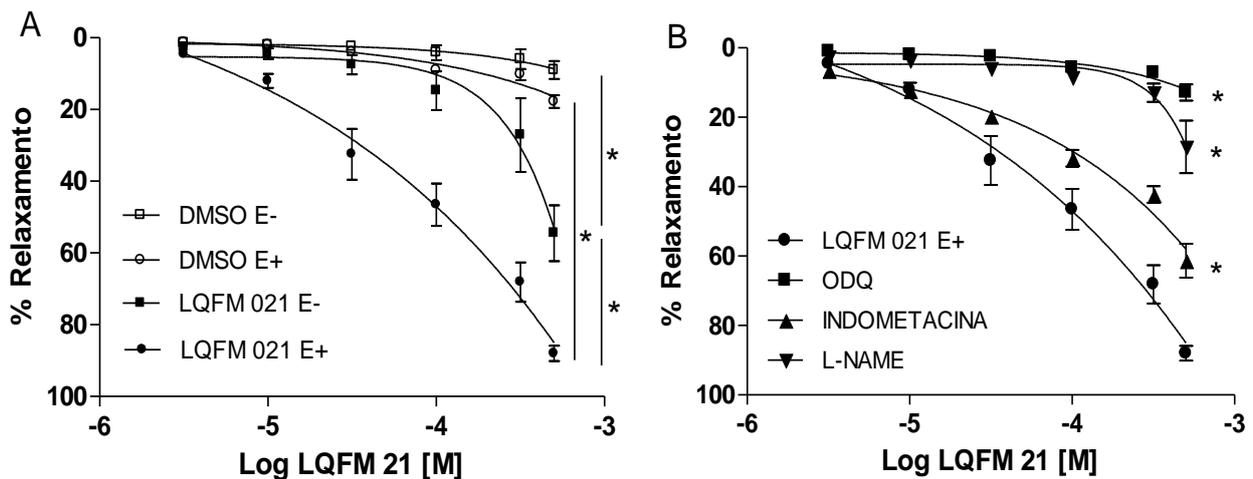


Figura 1: A) Curvas concentração-efeito cumulativas para LQFM 021 ou veículo (DMSO) em aortas com (E^+) ou sem endotélio (E^-). **B)** Curvas concentração-efeito cumulativas para LQFM 021 na ausência ou na presença (20 min) dos inibidores: ODQ, Indometacina e L-NAME. Os pontos representam médias \pm E.P.M. * Diferença significativa ($p < 0,05$)

Além disso, indometacina, L-NAME e ODQ (Fig. 1B) reduziram significativamente ($p < 0,05$) o efeito relaxante do LQFM021 para $61.4 \pm 4.9\%$ ($n=5$), $21.3 \pm 2.9\%$ ($n=4$) e $13.1 \pm 2.9\%$ ($n=5$), respectivamente. Estes resultados mostram que a via do NO/GCs/PKG além dos prostanoídes estão participando do relaxamento induzido pelo composto.

A abertura de canais K^+ na membrana das células do músculo liso vascular aumenta o efluxo de K^+ causando hiperpolarização do potencial de membrana, o que leva à vasodilatação (Nelson & Quayle, 1995). O pré-tratamento com TEA (Figura 2) praticamente aboliu o relaxamento induzido pelo LQFM021 (de $55.0 \pm 6.0\%$ para $5.0 \pm 1.2\%$, $n=6$). A eficácia (E_{max} , figura 3) do LQFM021 também foi prejudicada pelo pré tratamento com 4-AP ($20.4 \pm 5.4\%$, $n=5$), glibenclamida ($18.8 \pm 4.7\%$, $n=4$), $BaCl_2$ ($13.7 \pm 1.8\%$, $n=6$) e clotrimazol ($24.0 \pm 2.2\%$, $n=5$). Estes resultados demonstram a importância dos canais de K^+ para o relaxamento induzido pelo composto.

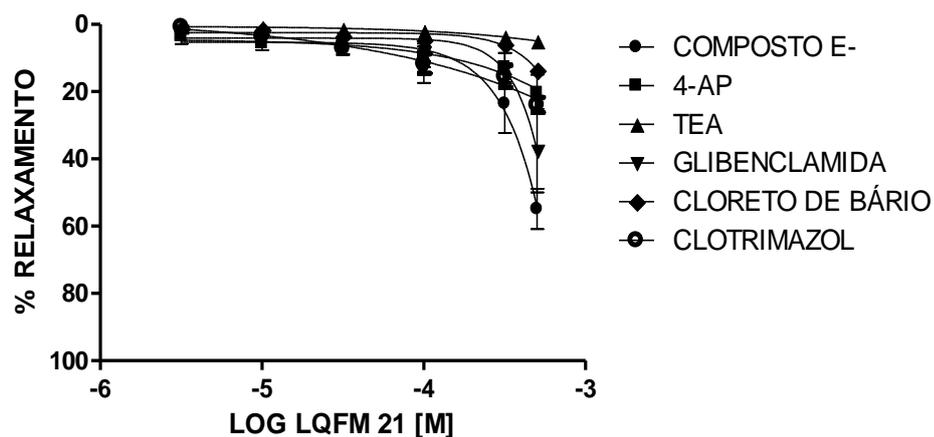


Figura 2: Curvas concentração-efeito cumulativas para o composto LQFM 21 em aortas sem endotélio e na presença dos inibidores 4-AP, TEA, glibenclamida, cloreto de bário ou clotrimazol.

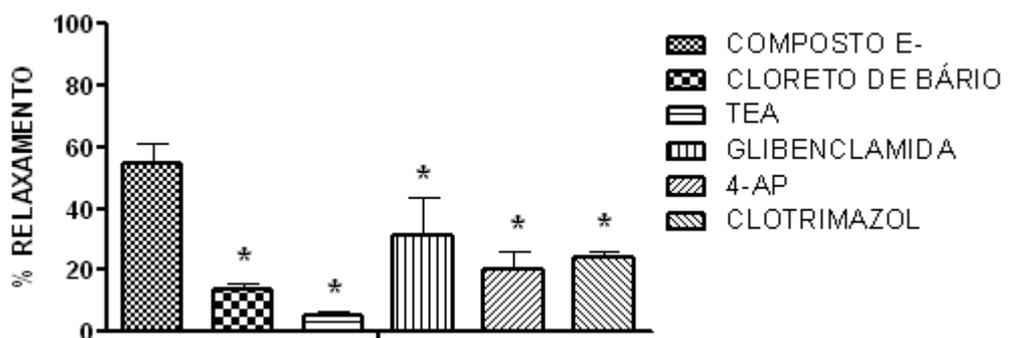


Figura 3: Efeito máximo de relaxamento para LQFM 21 em aortas sem endotélio e na presença (20 min) dos inibidores cloreto de bário, TEA, glibenclamida, 4-AP ou clotrimazol. Barras verticais representam a média \pm E.P.M dos valores obtidos no efeito máximo (E_{max}) nas curvas concentração-efeito para o composto. Diferença estatística * $p < 0,05$.

4.0 CONCLUSÃO

Com esses resultados é possível concluir que o LQFM 021 induz relaxamento em aortas de ratos. O relaxamento é potencializado pela presença do endotélio e envolve a participação da via NO/GCs e estimulação da síntese de prostanóides. Além disso, o relaxamento induzido pelo LQFM 021 parece ser dependente do fluxo de K⁺ através da membrana.

5.0 FONTE DE APOIO À PESQUISA: CAPES/CNPq

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borne, R F. Nonsteroidal anti - inflammatory drugs. In: Foye, W O; Lemke, T L, Williams, D A. (Eds.), **Medicinal Chemistry**. Williams and Wilkins, Baltimore, 535-580, 1995.
- Cardillo, C., Kilcoyne, C.M., et al. Decreased vasodilation response to isoproterenol during nitric oxide inhibition in humans. **Hypertension** 30, 918–921, 1997.
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 288, 373–376. 1980.
- Gürsoy, A., Demirayak, S., et al. Synthesis and Preliminary evaluation of new 5-pyrazolinone derivatives as analgesics agents. **Eur. J. Med. Chem.** 35, 359-364, 2000.
- Lamping, K. Interaction between NO and cAMP in the regulation of vascular tone. Arteriosclerosis, **Thromb. Vasc. Biol.** 21, 729–730, 2001.
- Miyoshi, H., Nakaya, Y., Moritoki, H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates, the ATP-sensitive K⁺ channel of vascular smooth muscle cells. **Febs Letters**. 345 (1), 47-49, 1994.
- Moncada, S., Vane, J.R. Pharmacology and endogenous role of prostaglandins endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. **Pharmacol. Rev.** 30, 293-331, 1979.
- Palmer, R.M.J., Ashton, D.S., et al. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** 327, 524- 526, 1987.
- Stokes, G. S. Systolic hypertension in the elderly: pushing the frontiers of therapy--a suggested new approach. **J. Clin. Hypertens.** 6, 192-198, 2004.
- Wang, Y.X., Poon, K.S., et al. Endothelium-derived nitric oxide partially mediates salbutamol induced vasodilations. **Brit. J. Pharmacol.** 250, 335–340, 1993.