

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DE EXTRATO SECO DE PRÓPOLIS VERMELHA EM FORMA DE LIBERAÇÃO LENTA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS.

BERNARDINO, A.C.^{1*}; HERCULANO, E. A.¹; FERREIRA-RODRIGUES, A. K.B.¹; TENÓRIO, E.P.¹; SILVA, J.C.G.¹; LIMA, R.R.¹; NASCIMENTO, T.G.²; RIBEIRO, E.A.N.¹

¹Laboratório de Farmacologia cardiovascular/ ESENFAR/ UFAL;

²Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos/ ESENFAR/ UFAL.

Resumo:

A própolis vermelha apresenta grande teor de compostos com efeitos benéficos para hipertensão. O objetivo foi avaliar as ações cardiovasculares de um sistema gastrorresistente de própolis vermelha (ESPV) em artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR. Em anéis mesentéricos pré-contraídos, ESPV induziu vasorrelaxamento que foi afetado pela remoção do endotélio. O ESPV (75 e 150 mg/kg) foi administrado oralmente a SHRs e a função vascular das artérias mesentéricas foi investigada. A curva concentração-resposta para NPS permaneceram inalteradas em comparação ao controle. A curva concentração-resposta para acetilcolina apresentou melhora significativa. Para avaliar o relaxamento dependente de NO, investigou-se a reatividade vascular à acetilcolina na presença do inibidor inespecífico de NOS, L-NAME. A resposta relaxante foi abolida. Estes resultados revelaram que o ESPV promove vasorelaxamento, melhorando a função endotelial e aumentando o relaxamento dependente de NO através da NOS.

Autorização legal: Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL (CEP), certidão número 09/2014.

Palavras-chave: hipertensão; própolis vermelha; vasorelaxamento.

Apoio financeiro: FAPEAL

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFAL.

Introdução:

A hipertensão arterial (HA) é considerada um fator de risco para diversas doenças cardiovasculares (LYRA et al, 2006). Este grupo de doenças permanece como principal causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo com uma elevada probabilidade de crescimento de sua incidência (MARK et al, 2007). Desse modo, pode-se afirmar que a HA constitui um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo (SRTRELEC et al, 2003).

Os anti-hipertensivos possuem vantagens e desvantagens terapêuticas, sendo alvo de pesquisas que buscam um aumento de especificidade com fins de reduzir os efeitos colaterais. Do ponto de vista da otimização da farmacoterapia, a liberação do fármaco deveria ser controlada de acordo com a proposta terapêutica e as propriedades farmacológicas da substância ativa (HIRAYAMA e UEKAMA, 1999). Pois nem sempre os níveis terapêuticos do fármaco são mantidos, ou seja, o tratamento não exibe resposta farmacológica, ou apresenta exacerbação dos efeitos adversos (LAURENCIN et al, 1987).

A literatura relata que são em fontes naturais onde se encontra a maior diversidade de substâncias úteis ao tratamento de doenças que atingem o ser humano, 40% dos fármacos empregados atualmente, destes 25% são de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais (CALIXTO, 2003). Nesse sentido, pesquisadores despertaram o interesse em estudar a própolis, que é uma substância natural resinosa, coletada pelas abelhas *Apis mellifera*, de diversas partes da planta. Sua composição química é bastante complexa e variada, estando intimamente relacionada com a flora de cada região (GHISALBERTI, 1979). A própolis vermelha de Alagoas produzida pelas abelhas a partir da planta *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) (TRUSHEVA et al, 2006), foi classificada por Park (2002) como sendo pertencente do 13º grupo de própolis, possui características únicas, pois sua constituição química difere da própolis verde (encontrada no sudeste brasileiro).

Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar as ações do extrato seco de própolis vermelha (ESPV) sobre o sistema cardiovascular de ratos, elucidando os possíveis mecanismos de ação implicados nesses efeitos, através de abordagens *in vitro*.

Metodologia:

- **Extrato:** Os extratos secos foram fornecidos pelo prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento.

- **Animais:** Foram utilizados em todos os experimentos ratos machos SHR e seus respectivos controles (ratos Wistar normotensos), pesando entre 200 e 300 g. Todos provenientes do Biotério Central da UFAL.

- **Preparações com artéria mesentérica superior isolada de ratos SHR:** Os ratos foram sacrificados por exsanguinação, sob anestesia com tiopental sódico, e através de uma incisão no abdômen do animal, retirou-se a artéria mesentérica superior. Anéis foram obtidos livres de tecido conectivo e adiposo, e estes foram mantidos em cubas contendo 5 mL de solução nutritiva de Tyrode a 37° C e gaseificada com uma mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Os anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (GM2, Gould, EUA) acoplado a um sistema de aquisição de dados (Gould, EUA) para o registro das contrações isométricas. Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,5 g por um período de 60 minutos. Durante este tempo, a solução nutritiva era trocada a cada 15 min. para prevenir a interferência de metabólitos. Anéis sem endotélio eram obtidos mecanicamente através do atrito entre as paredes internas do vaso.

A presença ou ausência do endotélio funcional foi verificada pela habilidade, medida em porcentagem (%), da ACh (10⁻⁶ M) em relaxar os anéis pré-contraídos com 10⁻⁴ M de fenilefrina (FEN). Após o período de estabilização de 1 hora e verificação da presença do endotélio funcional, foi induzida uma contração com FEN (10⁻⁴ M) (aproximadamente 40 minutos) e concentrações crescentes do ESPV (1, 10, 50, 100 e 500 µg/mL), foram adicionadas às cubas de maneira cumulativa, dessa forma era obtida uma curva concentração-resposta na presença ou ausência do endotélio vascular.

Após o tratamento de 28 dias com ESPV, foi realizada a avaliação da resposta vascular dos três grupos de ratos SHR Adultos. Para tal procedimento, após o período de estabilização de 60 min e posterior verificação do endotélio funcional, como descrito anteriormente, foi então obtida uma curva

concentração-resposta para ACh. Após o período de estabilização foi induzida uma contração com FEN (100 M) (aproximadamente 30 minutos) e concentrações crescentes de ACh (10⁻¹⁰ – 3.10⁻⁴M) foram adicionadas às cubas de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta na presença do endotélio vascular. A eficácia do efeito vasorelaxante para ACh foram avaliadas através dos valores do Emáx e pD₂.

Após a verificação da integridade endotélio funcional, as preparações de anéis de artéria mesentérica superior isolados de rato foram incubadas com L-NAME (10 mM). Após 30 minutos, uma nova contração tônica com FEN (10 mM) foi obtida e ESPV nas concentrações anteriormente descrita foram então adicionadas. A resposta do ESPV obtida após a adição de L-NAME foi comparada com aquela obtida na ausência do inibidor.

Resultados e Discussão:

Os vasos de pequeno calibre, como a artéria mesentérica, apresentam maior resistência e são mais amplamente implicados na regulação do débito e da pressão capilar, refletem melhor as evoluções da resistência periférica global (MULVANY; AALKJAER, 1990). A pressão arterial média pode ser expressa como produto do débito cardíaco e da resistência vascular periférica total (RVPT), sendo assim qualquer alteração sobre estes parâmetros induz mudanças na pressão arterial (OATES e BROWN, 2003). A pressão arterial pode ser influenciada pela ação de drogas sobre uma ou ambas as variáveis. A redução da pressão de enchimento ventricular pode ser obtida através de drogas que atuam sobre o tônus venoso ou sobre o volume sanguíneo, via efeitos renais. Outras drogas podem ainda reduzir a RVPT atuando diretamente sobre o músculo liso vascular, causando relaxamento dos vasos de resistência, ou ainda interferindo na atividade dos sistemas que promovem constrição dos vasos de resistência, como é o caso do sistema nervoso simpático (OATES, 1996).

Com base nestas premissas, avaliamos se o ESPV reduziria a RVPT. O ESPV (1, 10, 50, 100 e 500 µg/mL) relaxou os anéis com endotélio pré-contraídos com 10⁻⁴ M de FEN, um agonista seletivo para receptores α₁-adrenérgicos, de maneira dependente de concentração.

O endotélio vascular é uma fonte de numerosos mediadores químicos que controlam o tônus vascular, entre estes estão o óxido nítrico, os produtos derivados da ciclo-oxigenase (COX) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE) (STANKEVICIUS

et al., 2003). Com a finalidade de se avaliar a participação do endotélio no efeito vasorelaxante induzido pelo ESPV, utilizamos anéis sem endotélio funcional. Para o ESPV o relaxamento em anéis mesentéricos de ratos pré-contraídos com FEN, na ausência do endotélio funcional foi significativamente atenuado. Com base nestes resultados podemos sugerir que o endotélio é essencial para o vasorelaxamento induzido pelo extrato seco. (Gráfico 1).

$E^*(E_{m\acute{a}x} = // 100 \pm 0,4 \% \text{ e } pD_2 = 1,08 \pm 0,02 \mu\text{g/mL})$;
 $E^*(E_{m\acute{a}x} = 56,7 \pm 2\% \text{ e } pD_2 = 1,37 \pm 0,04 \mu\text{g/mL})$.

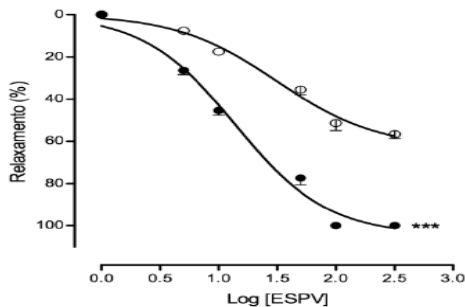


Gráfico 1: Efeito do ESPV em anéis de artéria mesentérica superior isolada de SHR adultos, na presença (●) e ausência (○) do endotélio funcional, pré-contraídos com 100 μ M de FEN (n = 5).

A fim de mimetizar as alterações fisiopatológicas observadas nesses processos de envelhecimento e hipertensão alguns modelos experimentais são utilizados. Nesse contexto, cabe destacar o modelo de rato espontaneamente hipertenso (SHR). Que tem sido um dos modelos mais utilizados na literatura devido a sua semelhança com a hipertensão essencial humana (FAZAN et al., 2006). O envelhecimento e a hipertensão foram identificados como os principais fatores de risco para doenças cardiovasculares, uma vez que estão diretamente associados à disfunção endotelial, reduzidos relaxamentos dependentes de endotélio, desbalanço entre os fatores contracturantes (FCDE) e relaxantes derivados do endotélio (FRDE), diminuição nos níveis de NO, além da diminuição da atividade e expressão da eNOS (PUZSEROVA et al., 2014).

Sabe-se que o endotélio vascular é responsável pelo controle de diversas funções celulares e moleculares, tais como, atividade contrátil e proliferativa da musculatura lisa vascular. Desse modo, as células endoteliais vasculares têm função vital na regulação da homeostase do sistema vascular, exercendo potente efeito regulatório sobre pressão arterial e fluxo sanguíneo local, este processo ocorre devido a liberação de FCDE e FRDE (GARLAND, et al., 1995).

O desenvolvimento da hipertensão no

SHR e no humano leva à diversas desordens funcionais e estruturais nos vasos sanguíneos, onde destaca-se a disfunção endotelial (BARTON et al., 1997; Cernadas et al., 1998). Desta forma, a disfunção endotelial é considerada como a incapacidade de artérias e arteríolas em dilatar totalmente em resposta a um estímulo apropriado, como por exemplo ao neurotransmissor Acetilcolina (ACh) (YOON et al., 2010).

Dados do nosso grupo de pesquisa revelaram que o ESPV apresentou um efeito antihipertensivo em ratos adultos após o tratamento por via oral durante 28 dias, desse modo objetivou-se avaliar se o ESPV promoveria uma melhora na função vascular de SHR adultos, modelo e idade que apresenta relaxamento endotelial comprometido (PUZSEROVA et al., 2014).

Para isto, após o tratamento por 4 semanas com ESPV nas mesmas doses na qual o efeito anti-hipertensivo foi observado, curvas concentração-resposta para ACh foram obtidas. Os resultados revelaram uma melhora significativa no vasorrelaxamento dependente de concentração para ACh em SHR tratados com ESPV nas doses de 150 e 75 mg/kg (Gráfico 2, tabela 1). Estes dados corroboram com o proposto de ESPV promover uma melhora no relaxamento vascular na presença de disfunção vascular (CERNADAS et al., 1998).

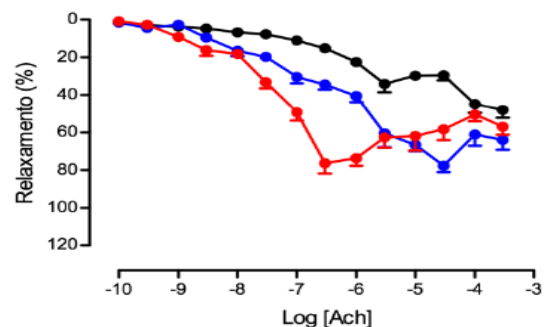


Gráfico 2: Curva concentração-resposta ao ACh (10-10 – 3.10-4 M). Grupo Controle Adulto (●), grupo Adulto 75 (75 mg/kg, v.o., de ESPV) (●) grupo Adulto 150 (150 mg/kg, v.o de ESPV) (●). Valores estão expressos como média \pm e.p.m.

Tabela 1 – Efeitos da curva concentração-resposta à ACh e comparação dos $E_{m\acute{a}x}$ e pD_2 de anéis de artéria mesentérica superior isolada de SHR adultos após tratamento por 28 dias com ESPV em diferentes condições experimentais.

Condição Experimental	Controle Adulto	Adulto 75	Adulto 150
$E_{m\acute{a}x}$ ACh (%)	48,06 \pm 4,2 _{c,d}	77,68 \pm 3,92 _b	76,4 \pm 3,8 _{b,e}
pD_2 ACh (μ g/mL)	- 5,74 \pm 0,14	-6,46 \pm 0,15	-8,72 \pm 3,8 _a
$E_{m\acute{a}x}$ L-NAME (%)	16,07 \pm 0,98	-	18,9 \pm 1,65
pD_2 L-NAME (μ g/mL)	-6,27 \pm 0,19	-	-5,12 \pm 0,33 _a

Objetivando determinar se o efeito relaxante induzido pelo ESPV ocorreria devido

a liberação de NO, foi realizado experimentos com o endotélio vascular intacto e em anéis pré-incubados com LNAME (10 mM), um bloqueador inespecífico e competitivo da enzima NOS (MONCADA & HIGGS, 1993).

Para isto, efetuamos uma curva concentração-resposta para ACh em anéis de SHR adultos pré-incubados com L-NAME. Nestas condições, a presença do L-NAME antagonizou completamente o relaxamento da ACh, o que indica que a melhora observada no relaxamento vascular além de ser dependente do endotélio, provavelmente ocorre via NOS (Gráfico 3, tabela 1). Embora no presente trabalho a atividade da NOSe não tenha sido mensurada, estudos indicam uma redução significativa na atividade em SHR adultos (PUZSEROVA et al., 2014), dados estes indicam que a melhora no vasorrelaxamento em respostas às concentrações de ACh em SHR tratados com ESPV ocorra via NOSe

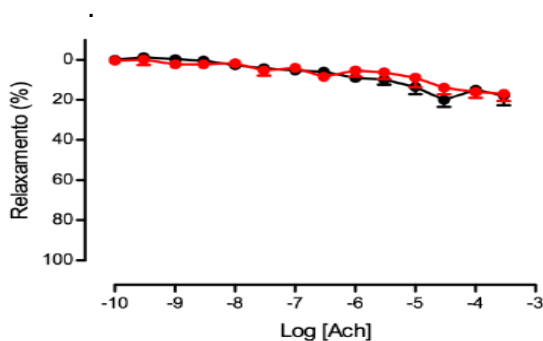


Gráfico 3: Curva concentração-resposta de L-NAME (10-1 M), grupo Controle Adulto (●); com 150 mg/kg, v.o. de ESPV, grupo Adulto 150 (●). Valores estão expressos como média \pm e.p.m.

Conclusões:

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o ESPV promove efeito vasorrelaxante dependente de concentração, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sendo esse efeito dependente de endotélio. Além disso, os resultados aqui apresentados mostram que o tratamento com o ESPV durante 28 dias promoveu uma melhora na reatividade vascular de ratos SHR. Porém, novos estudos são necessários para avaliar os mecanismos intrínsecos aos efeitos farmacológicos aqui descritos.

Referências bibliográficas

LYRA, D.P, J et al. A farmacoterapia no idoso: revisão sobre a abordagem multiprofissional no controle da hipertensão arterial sistêmica. **Rev Latino-am Enfermagem**, v. 14, n. 3, p. 435-441, 2006.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: A review. **Bee World**, v.60, p.59-84, 1979.

PUZSEROVA, A. et al. Age-Related Alterations in Endothelial Function of Femoral Artery in Young SHR and WKY Rats. **BioMed Research International**. Volume 2014.

MARK, D. B et al. Cardiovascular disease on a global scale: defining the path forward for research and practice. **Eur Heart J**, v .28, p. 2678-2684, 2007.

TRUSHEVA, B, et al. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **eCAM**, v.3, n. 2, p.249–254,2006.

CALIXTO, João B.. **Biodiversidade como fonte de medicamentos**. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v.55, n.3, Sept. 2003.

BARTON, M. et al. Anatomic Heterogeneity of Vascular Aging: Role of Nitric Oxide and Endothelin. **Hypertension**, v. 30, n. 4, p. 817-824, October 1, 1997 1997.

FAZAN, V. P. S. et al. Ratos espontaneamente hipertensos e neuropatias periféricas. **Medicina (Ribeirão Preto)** 2006; 39 (1): 39-50.

GARLAND, C.; et al. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16, p. 23-30, 1995.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The L-arginine - nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, 29: 2002–2012, 1993.

MULVANY, M. J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. **Physiol Res**, 70: 921-951, 1990.

OATES, J. A; BROWN, N. J. Anti-hipertensivos e terapia farmacológica da hipertensão. In: **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed.: Editora McGraw-Hill. 2010, cap. 32 2003.

HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. *Cyclodextrin*-based controlled drug release system. v.36, p.125-141,1999.

Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. (2003). Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. **Medicina (Kaunas)** 39: 333–341

LAURENCIN, C.T. Polymeric controlled release systems: new methods for drug delivery. **Clin Lab Med**. v. 7, n. 2, p. 301-323, 1987.