



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

LUIZ HENRIQUE AGRA CAVALCANTE SILVA

**MECANISMOS DE AÇÃO ESPASMOLÍTICA DA CAULERPINA, ALCALOIDE
BISINDÓLICO ISOLADO DE ALGAS MARINHAS DO GÊNERO *CAULERPA*, EM
ÍLEO DE COBAIA**

Maceió - AL

2013

LUIZ HENRIQUE AGRA CAVALCANTE SILVA

**MECANISMOS DE AÇÃO ESPASMOLÍTICA DA CAULERPINA, ALCALOIDE
BISINDÓLICO ISOLADO DE ALGAS MARINHAS DO GÊNERO *CAULERPA*, EM
ÍLEO DE COBAIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Magna Suzana
Alexandre Moreira

Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana de
Andrade Cavalcante

Maceió - AL

2013

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

S586m Silva, Luiz Henrique Agra Cavalcante.

Mecanismos de ação espasmolítica da caulerpina, um alcaloide bisindólico isolado de algas marinhas do gênero *Caulerpa*, em óleo de cabaia / Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva. – 2013.

96 f. : il.

Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.

Co-orientadora: Fabiana de Andrade Cavalcante.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 69-82.

Anexos: f. 83-96.

1. Caulerpina – Efeito espasmolítico. 2. Canais de Ca²⁺. 3. Óleo – Receptores adrenérgicos. 4. Óleo de cabaia. I. Título.

CDU: 616.344:615.322



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – *Câmpus* A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Ata da Defesa da Dissertação de Mestrado do mestrando Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva

Aos 22 dias do mês de fevereiro de 2013, às 9h horas, reuniu-se na sala 204 do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFAL, os membros da Banca examinadora da Defesa da Dissertação do mestrando Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva, regularmente matriculado no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, em nível mestrado, orientado pela Prof.^a Dr.^a Magna Suzana Alexandre Moreira. A Banca examinadora foi composta pelos professores doutores João Xavier de Araújo Junior, Maria Aline Barros Fidelis de Moura e Lídia Moreira Lima. Após a apresentação por 40 (horas/minutos) da dissertação intitulada “Mecanismos de ação espasmolítica da *Caulerpa*, alcaloide bisindólico isolado de algas marinhas do gênero *Caulerpa*, em óleo de cobaia”, o mestrando foi arguido pela banca na seguinte ordem: João Xavier Araújo Júnior, Lídia Moreira Lima e Maria Aline Barros Fidelis de Moura, reunidos em sessão secreta às 12h horas, os examinadores consideraram o mestrando APROVADO. Para constar foi lavrada a presente ata que depois de lida e aprovada foi assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Magna Suzana Alexandre Moreira

Lidia Moreira Lima

João Xavier Araújo Junior

Maria Aline Barros Fidelis de Moura

A minha mãe Maria José (*in memorian*), meu maior exemplo de dedicação, esforço e vitória.

A minha avó Zora (*in memorian*) pelo seu imenso carinho dispensado a minha pessoa.

A minha irmã Luise pelo apoio e incentivo durante essa caminhada.

Meu eterno carinho e agradecimento!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira pelas oportunidades que me concedeu durante todos esses anos, pela paciência, incentivo e ensinamentos, que me fizeram crescer cientificamente e pessoalmente.

A minha coorientadora Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, da Universidade Federal da Paraíba, por ter aceitado fazer parte deste trabalho, contribuindo, assim, de forma veemente para realização do mesmo e também para minha formação acadêmica.

Aos professores Dr. José Maria Barbosa Filho e Dra. Bárbara V. de Oliveira Santos, ambos da Universidade Federal da Paraíba, pelo fornecimento da caulerpina, objeto de estudo dessa dissertação.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva por ter permitido que eu realizasse os experimentos deste trabalho em seu laboratório (Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas/Universidade Federal da Paraíba), pelas contribuições dadas no desenvolvimento desta dissertação e pelos ensinamentos passados durante esse período.

Aos funcionários da Universidade Federal de Alagoas e da Universidade Federal da Paraíba que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado.

As minhas amigas de mestrado Carolina da Matta e Morgana Vital pela amizade e companheirismo durante todos esses anos que nos conhecemos, e, em especial, nesses dois últimos pelos quais passamos por muitos momentos de alegria e de dificuldades, dos quais sempre saímos vitoriosos.

À Yolanda Cupertino, minha querida amiga, que durante esses quatro anos que nos conhecemos sempre me ensinou e me apoiou em todos os momentos. Muito obrigado pela sua amizade.

À Aline Cavalcanti pelo esforço contínuo em nos fazer viver a ciência.

Aos membros do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI): Aline Cavalcanti, Amanda Silva, Arianne Priscila Magalhães, Carolina da Matta, Diego Farias, Gabriela Beiriz, Maria Alice Falcão, Mariana Santos, Max Vianna, Morgana Vital, Nívea Karla, Thays Dias e Yolanda Cupertino pelos bons momentos vividos no LaFi e pela contribuição de forma direta ou indireta na realização de tantos trabalhos.

À Ana Carolina Correia por ter me ajudado de forma inenarrável durante a realização de todo este trabalho. Muito obrigado pelo seu empenho e paciência.

Aos membros do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas: Ana Carolina Correia, Ana Caroline Lima, Aline Brito, Fábio Monteiro, Filipe Oliveira, Ítalo Rossi, Gislaine Oliveira, Giulyane Targino, Hannah Olga, Iara Luna, Joedna Cavalcante, Laylane Cabral, Luiz Henrique César, Maria da Conceição Correia e Sarah Rebeca por me receberem de forma ímpar durante esse período de trabalho e por sempre estarem dispostos a ensinar e ajudar.

Aos meus queridos amigos Débora Fernandes, Nayara Condja, Herickson Nascimento, Lívia Rocha, Carla Alves pelo carinho e por tornarem essa caminhada mais doce.

À Anne Dayse Soares pelas colaborações e amizade durante esses anos.

A toda minha família pelo apoio e carinho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa.

Muito obrigado!
Luiz Henrique Agra

**“Sob a direção de um forte general,
não haverá jamais soldados fracos.”**

Sócrates

RESUMO

A caulerpina (5,12-di-hidro-cicloocta[1,2-b;5,6-b']di-indol-6,13-ácido dicarboxílico dimetil éster), é um alcaloide bisindólico que foi isolado da fase acetato de etila das algas marinhas *Caulerpa mexicana* e *C. sertularioides*. Baseado no fato de que outros alcaloides indólicos apresentaram atividade espasmolítica em músculo liso intestinal, o objetivo deste trabalho foi investigar uma possível atividade espasmolítica da caulerpina em íleo isolado de cobaia. A caulerpina (3×10^{-6} – 3×10^{-4} M) antagonizou de maneira equipotente as contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol ($CI_{50} = 7,0 \pm 1,9 \times 10^{-5}$ M, $E_{max} = 62,0 \pm 7,6\%$), por 10^{-6} M de histamina ($CI_{50} = 1,3 \pm 0,3 \times 10^{-4}$ M, $E_{max} = 71,0 \pm 4,9\%$) ou por 10^{-5} M de serotonina ($CI_{50} = 8,0 \pm 1,4 \times 10^{-5}$ M, $E_{max} = 73,8 \pm 1,4\%$), demonstrando assim um efeito espasmolítico não seletivo em íleo de cobaia. Além disso, a caulerpina inibiu as curvas cumulativas à serotonina, desviando-as para direita, de maneira não paralela e com redução do E_{max} , descartando um antagonismo do tipo competitivo ($slope = 2,44 \pm 0,21$). A participação dos receptores adrenérgicos, importantes em várias funções do trato gastrointestinal, também foi avaliada. Evidenciou-se que os receptores adrenérgicos α_2 não estão envolvidos no efeito espasmolítico de caulerpina, visto que a curva de relaxamento da caulerpina sobre o íleo pré-contraído com 10^{-5} M de carbacol ($CE_{50} = 4,7 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M) não foi deslocada na presença de $1,3 \mu\text{M}$ de ioimbina ($CE_{50} = 5,7 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M), um antagonista desses receptores. O mesmo não foi observado na presença de propranolol, um antagonista de receptores adrenérgicos β , onde a curva de relaxamento da caulerpina foi deslocada 5 vezes na presença de $5 \mu\text{M}$ de propranolol ($CE_{50} = 2,2 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ M), sugerindo a participação dos receptores adrenérgicos β no efeito espasmolítico de caulerpina. A caulerpina também relaxou o íleo pré-contraído com 40 mM de KCl ($CE_{50} = 9,1 \pm 0,9 \times 10^{-5}$ M, $E_{max} = 94,8 \pm 2,6\%$), sugerindo que a caulerpina deve inibir o influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_V). Essa hipótese foi confirmada, uma vez que a caulerpina inibiu as contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca^{2+} . O fato da caulerpina até a concentração de 3×10^{-4} M não ter inibido as contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol na camada circular do íleo de cobaia corrobora com a hipótese que ela inibe o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V . Dessa forma, decidiu-se investigar se o bloqueio dos Ca_V estaria ocorrendo de forma indireta através da ativação dos canais de K^+ . No entanto, o fato da curva de relaxamento da caulerpina ($CE_{50} = 4,7 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M) não ter sido deslocada na presença de 5 mM de CsCl ($CE_{50} = 3,0 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M), um bloqueador inespecífico dos canais de K^+ , indica que os canais de K^+ não participam do efeito espasmolítico da caulerpina. Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a caulerpina apresenta efeito espasmolítico não seletivo e que um dos possíveis mecanismos envolvidos nessa atividade é o bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V e ativação de receptores adrenérgicos β .

Palavras chave: Efeito espasmolítico. Caulerpina. Canais de Ca^{2+} . Receptores adrenérgicos. Íleo de cobaia.

ABSTRACT

Caulerpine (5,12-dihydro-cycloocta[1,2-b;5,6-b']diindole-6,13-dicarboxylic acid dimethyl ester) is a bisindole alkaloid which are isolated from ethyl acetate phase from marine algae *Caulerpa mexicana* and *C. sertularioides*. Since that other indole alkaloids have been shown spasmolytic activity on intestinal smooth muscle, we aimed to investigate a possible spasmolytic activity of caulerpine on guinea pig ileum. Caulerpine (3×10^{-6} – 3×10^{-4} M) antagonized phasic contractions in a significant and equipotent manner induced by 10^{-6} M carbachol ($IC_{50} = 7.0 \pm 1.9 \times 10^{-5}$ M, $E_{max} = 62.0 \pm 7.6\%$), 10^{-6} M histamine ($IC_{50} = 1.3 \pm 0.3 \times 10^{-4}$ M, $E_{max} = 71.0 \pm 4.9\%$) or 10^{-5} M serotonin ($IC_{50} = 8.0 \pm 1.4 \times 10^{-5}$ M, $E_{max} = 73.8 \pm 1.4\%$), proving a non-selective spasmolytic effect on guinea pig ileum. Furthermore, caulerpine inhibited cumulative concentration-response curves to serotonin, and these were shifted to the right, in a non-parallel manner, with E_{max} reduction, discarding thus a competitive type antagonism (slope = 2.44 ± 0.21). The adrenergic receptors involvement, relevant in many functions of gastrointestinal tract, also was carried out. It was observed that α_2 adrenergic receptors are not involved in spasmolytic effect of caulerpine, since caulerpine-induced relaxation curve ($EC_{50} = 4.7 \pm 0.7 \times 10^{-5}$ M) was not shifted in the presence of $1.3 \mu\text{M}$ yohimbine ($EC_{50} = 5.7 \pm 0.7 \times 10^{-5}$ M), an antagonist of these receptors. However, this was not observed in presence of propranolol, an antagonist of β adrenergic receptors, where caulerpine-induced relaxation curve was shifted five folds in the presence of $5 \mu\text{M}$ propranolol ($EC_{50} = 2.2 \pm 0.2 \times 10^{-4}$ M), suggesting the participation of β adrenergic receptors on spasmolytic effect of caulerpine. Caulerpine also relaxed the ileum pre-contracted with 40 mM KCl ($EC_{50} = 9.1 \pm 0.9 \times 10^{-5}$ M, $E_{max} = 94.8 \pm 2.6\%$), indicating that caulerpine could be acting voltage-gated Ca^{2+} channels (Ca_V). This hypothesis was confirmed since caulerpine inhibited CaCl_2 -induced contractions in the depolarizing (70 mM KCl) medium nominally without Ca^{2+} . The fact that caulerpine until 3×10^{-4} M did not inhibit phasic contractions induced by 10^{-6} M carbachol on circular layer from guinea pig ileum corroborates the hypothesis that it inhibits the influx of Ca^{2+} through Ca_V . Thus, it was investigated if this blocked was happened in an indirect manner by K^+ channels opening. However, the findings showed that caulerpine-induced relaxation curve ($EC_{50} = 4.7 \pm 0.7 \times 10^{-5}$ M) was not shifted in the presence of 5 mM CsCl ($EC_{50} = 3.0 \pm 0.7 \times 10^{-5}$ M), a non-selective K^+ channels blocker, indicating that K^+ channels are not involved on spasmolytic effect of caulerpine. Taken together, these results suggest that caulerpine shows a non-selective spasmolytic effect and one of the possible mechanisms involved in this activity is blockade of Ca^{2+} influx through Ca_V blockade and activation of β adrenergic receptors.

Keywords: Spasmolytic effect. Caulerpine. Ca^{2+} channel. Adrenergic receptors. Guinea pig ileum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia das espécies de <i>C. cupressoides</i> (A), <i>C. mexicana</i> (B), <i>C. sertularioides</i> (C) e <i>C. racemosa</i> (D).....	19
Figura 2 - Estrutura química da caulerpina.....	22
Figura 3 - Aparelhos utilizados para o registro das contrações: aparato para registro das contrações isotônicas com cilindro esfumado de um quimógrafo (A), cuba de vidro (B), transdutor de força (C), computador (D) e sistema de banho para órgão isolado (E).....	33
Figura 4 - Registros originais do efeito relaxante da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-5} M de CCh na ausência (A) e na presença de 1,3 μ M de ioimbina (B) e 5 μ M de propranolol (C) em íleo isolado de cobaia.....	44
Figura 5 - Registro original do efeito relaxante da caulerpina sobre a contração tônica induzida por 40 mM de KCl em íleo isolado de cobaia.....	48
Figura 6 - Registros originais do efeito relaxante da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-5} M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl em íleo isolado de cobaia.....	54
Figura 7 - Esquema dos mecanismos de ação espasmolítica da caulerpina em íleo de cobaia.....	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito da caulerpina frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de CCh (A) e de histamina (B) ou por 10^{-5} M 5-HT (C) em íleo isolado de cobaia.....	41
Gráfico 2 - Curvas concentrações-resposta cumulativas à 5-HT na ausência (○) e na presença de caulerpina: 3×10^{-5} (●), 10^{-4} (□), 3×10^{-4} (■) e 10^{-3} M (◇) em íleo isolado de cobaia (A); gráfico do <i>plot</i> de Schild (B).....	42
Gráfico 3 - Efeito de caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-5} M CCh na ausência (■) e na presença de 1,3 μ M de ioimbina (◇) em íleo isolado de cobaia.....	45
Gráfico 4 - Efeito de caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-5} M CCh na ausência (■) e na presença de 5 μ M de propranolol (○) em íleo isolado de cobaia.....	46
Gráfico 5 - Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (□) em íleo isolado de cobaia.....	49
Gráfico 6 - Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (▲) e na presença de caulerpina nas concentrações de 3×10^{-5} (△), 10^{-4} (▼), 3×10^{-4} (▽) e 10^{-3} M (◆), em íleo isolado de cobaia.....	51
Gráfico 7 - Efeito da caulerpina frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na camada circular do íleo isolado de cobaia.....	52

Gráfico 8 - Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-5} M de CCh na ausência (■) e na presença de CsCl (□) em íleo isolado de cobaia..... 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução de Krebs modificado.....	30
Tabela 2 - Composição da solução de Krebs modificado despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca ²⁺	31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de Adenosina
BK_{Ca}	Canais de Potássio Ativados por Cálcio de Grande Condutância
[Ca²⁺]	Concentração de Cálcio
[Ca²⁺]_c	Concentração de Cálcio Citosólico
CaM	Calmodulina
Ca_v	Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem
Ca_v1	Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem Tipo 1
Ca_v2	Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem Tipo 2
Ca_v3	Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem Tipo 3
CCh	Carbacol
CE₅₀	Concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo
CGs	Ciclase de Guanilil Solúvel
CI₅₀	Concentração de uma substância que inibe 50% da resposta máxima de um agonista
CPI-17	Proteína Inibitória Potencializada pela PKC
DAG	Diacilglicerol
EMEA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
e.p.m.	Erro Padrão da Média
E_{max}	Efeito Máximo
FDA	Food and Drug Administration
Gs	Proteína G Estimulatória
G_{q/11}	Proteína G _q ou Proteína G ₁₁
G_{αq}	Subunidade α da Proteína G _q
G_{αq12/13}	Subunidade α da Proteína G ₁₂ ou Proteína G ₁₃
G_{αi1/2}	Subunidade α da Proteína G Inibitória 1 ou 2
GDP	Difosfato de Guanosina
GMPc	Monofosfato Cíclico de Guanosina
GTP	Trifosfato de Guanosina
HIF-1	Fator Induzido por Hipóxia 1

hPTP1B	Proteína Tirosina Fosfatase 1B Humana
IK_{Ca}	Canais de Potássio de Condutância Intermediária
IP₃	1,4,5-trisfosfato de adenosina
IP₃R	Receptor do 1,4,5-trisfosfato de Adenosina
K_{ATP}	Canais de Potássio Sensíveis à ATP
K_{Ca}	Canais de Potássio Ativados pelo Ca ²⁺
K_{ir}	Canais de Potássio Retificadores de Entrada
K_v	Canais de Potássio Dependentes de Voltagem
MLC	Cadeia Leve da Miosina
MLCK	Cinase da Cadeia Leve da Miosina
MLCP	Fosfatase da Cadeia Leve da Miosina
NOS-III	Sintase do Óxido Nítrico III
p	Probabilidade
PACAP	Peptídeo Ativador da Ciclase de Adenilil da Pituitária
pD'₂	Logaritmo negativo na base 10 da concentração molar de um antagonista que reduz 50% do efeito de um agonista
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	Proteína Cinase A
PKC	Proteína Cinase C
PKG	Proteína Cinase G
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PLC_β	Fosfolipase C _β
PLD	Fosfolipase D
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da Membrana Plasmática
r²	Coeficiente de Regressão Linear
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROCK	Proteína Cinase Associada a Rho
RS	Retículo Sarcoplasmático
RyR	Receptor de Rianodina
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do Retículo Sarcoplasmático
SK_{Ca}	Canais de Potássio Ativados pelo Ca ²⁺ de Pequena Condutância
TRP	Receptor de Potencial Transitório
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo
ZIPK	Proteína Cinase de Interação "zipper"

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Produtos naturais marinhos	17
1.2 O gênero <i>Caulerpa</i>	19
1.3 Caulerpina	21
1.4 Contração e relaxamento do músculo liso intestinal	23
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Material	29
3.1.1 Animais.....	29
3.1.2 Substâncias.....	29
3.1.3 Soluções nutritivas.....	30
3.1.4 Isolamento da caulerpina.....	31
3.1.5 Preparação da caulerpina para os ensaios farmacológicos.....	32
3.1.6 Equipamentos.....	32
3.2 Métodos	34
3.2.1 Investigação da atividade espasmolítica de caulerpina em íleo isolado de cobaia.....	34
3.2.1.1 Efeito da caulerpina frente às contrações fásicas induzidas por CCh, por histamina ou por 5-HT.....	34
3.2.2 Avaliação do mecanismo de ação espasmolítica de caulerpina em íleo isolado de cobaia.....	35
3.2.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por 5-HT.....	35
3.2.2.2 Avaliação da participação dos receptores adrenérgicos.....	35
3.2.2.2.1 Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença de antagonistas adrenérgicos.....	35
3.2.2.3 Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por KCl.....	36
3.2.2.4 Avaliação da participação dos canais de cálcio.....	36
3.2.2.4.1 Efeito da caulerpina frente às contrações induzidas por CaCl ₂ em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca ²⁺	36

3.2.2.4.2 Efeito da caulerpina frente às contrações fásicas induzidas por CCh na camada circular.....	37
3.2.2.5 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio.....	37
3.2.2.5.1 Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença de cloreto de céσιο (CsCl).....	37
3.2.3. Análise estatística.....	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Investigação da atividade espasmolítica de caulerpina em íleo isolado de cobaia	39
4.1.1 Efeito da caulerpina frente às contrações fásicas induzidas por CCh, por histamina ou por 5-HT.....	39
4.2 Avaliação do mecanismo de ação espasmolítica de caulerpina em íleo isolado de cobaia	41
4.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por 5-HT.....	41
4.2.2 Avaliação da participação dos receptores adrenérgicos.....	43
4.2.2.1 Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença de antagonistas adrenérgicos.....	43
4.2.3 Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por KCl.....	47
4.2.4 Avaliação da participação dos canais de cálcio.....	50
4.2.4.1 Efeito da caulerpina frente às contrações induzidas por CaCl ₂ em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca ²⁺	50
4.2.4.2 Efeito da caulerpina frente às contrações fásicas induzidas por CCh na camada circular.....	52
4.2.5 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio.....	53
4.2.5.1 Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença de cloreto de céσιο (CsCl).....	53
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXO A - Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFAL.....	83
ANEXO B - Artigo publicado na revista científica Marine Drugs.....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais marinhos

O estudo de organismos marinhos iniciou-se há mais de 60 anos com o isolamento dos nucleosídeos espongouridina e espongotimidina da esponja marinha *Tethya crypta* (BERGMANN; FEENEY, 1951). Posteriormente, estes compostos inspiraram a criação de substâncias utilizadas na terapêutica desde 1974, a saber: citarabina, um agente antineoplásico, e o antiviral vidarabina (MAYER et al., 2010). Nos anos seguintes, uma variedade de substâncias foram descobertas com arranjos estruturais e características peculiares (BLUNT et al., 2012; GLASER; MAYER, 2009).

No entanto, apenas em 2004 um novo fármaco de origem marinha foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de dor crônica, o ziconotideo, um peptídeo sintético análogo da ω -conotoxina MVIIA, isolada do veneno do caracol *Conus magus*. Mais recentemente, em 2007, foi aprovado pela *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA), para o tratamento de sarcomas de tecidos moles, a trabectedina, um alcaloide isolado do tunicado *Ecteinascidia turbinata* (MOLINSKI et al., 2009).

O pequeno número de fármacos derivados de produtos marinhos disponíveis no mercado não representa uma escassez de pesquisa neste âmbito da ciência, ao contrário, desde 1960 mais de 20 mil compostos foram isolados de organismos marinhos (BLUNT et al., 2012). Atualmente, os produtos de origem marinha tem sido fonte de compostos que demonstram, em ensaios pré-clínicos, atividade antibacteriana (HORIE et al., 2008), anti-inflamatória (CHAO et al., 2008), antifúngica (D'AURIA et al., 2007), anticoagulante (JUNG et al., 2007), imunomoduladora (COURTOIS et al., 2008; YAMADA et al., 2007), antiviral (ARTAN et al., 2008) dentre outras. Além disso, vários compostos já estão em fase de teste clínicos.

Vale destacar que a grande maioria dos estudos são mais relevantes no tratamento de neoplasias e é exatamente na terapêutica dessas doenças que se tem o

maior impacto das substâncias de origem marinha (MAYER et al., 2010). Entre os produtos com tais propriedades, encontra-se a briostatina 1, isolado do brizoário *Bugula neritina*, com a qual já foram realizados mais de 80 estudos clínicos, sendo as melhores respostas em associação com outros quimioterápicos (AL-KATIB et al., 1998; DOWLATI et al., 2003; PETTIT et al., 1970; RUAN; ZHU, 2012); o mesilato de eribulina, um macrolídeo derivado da halichondrina B isolada da esponja *Halichondria okadai*, que se encontra em estudos clínicos de fase 3 para o tratamento do câncer de mama (NEWMAN; CRAGG, 2007); e o discodermolido, o mais potente agente estabilizante de microtúbulos já descrito, isolado da esponja *Discoderma dissoluta*, que está em estudos de fase 1 para tratamento de tumores sólidos (SINGH et al., 2008; ter HAAR et al., 1996).

Além das atividades biológicas já descritas, vale ressaltar a utilização de metabólitos marinhos nas indústrias alimentícia, inseticida e cosmética (CARDOZO et al., 2007). Substâncias como a carragenina, isolada principalmente de algas vermelhas dos gêneros *Kappaphycus* e *Betaphycus*, são comumente utilizadas como ingredientes em alimentos como iogurtes e preparados de pudins (GAMAL, 2010); o alginato, substância capaz de quelar íons metálicos e formar soluções altamente viscosas, produzido por algas pardas, é amplamente utilizado na indústria alimentícia (por exemplo, na produção de sorvetes) e farmacêutica (por exemplo, na composição de matrizes de curativos). Além disso, destaca-se também utilização dos carotenoides como pigmentos de alimentos e suplementos nutricionais (CARDOZO et al., 2007).

No contexto dos produtos naturais marinhos, encontram-se as algas marinhas que são organismos contendo pigmentos característicos, compostos por uma única célula ou agrupadas em colônia, ou ainda como organismos pluricelulares (BOLD; WYNNE, 1985). Formam um grupo heterogêneo de organismos, que podem ser divididas em dois grandes grupos: as macroalgas, que ocupam a zona litoral; e as microalgas, que podem ser encontradas tanto na forma bentônicas (fixos a um substrato) habitando o litoral, ou ainda como plânctons (suspensos na água) nos oceanos. De acordo com a classificação botânica, as macroalgas são divididas em três grandes grupos, de acordo com sua estrutura física, pigmentação, função e ciclo de

vida em: Chlorophyta (algas verdes); Phaeophyta (algas pardas) e Rhodophyta (algas vermelhas) (GARSON, 1989).

1.2 O gênero *Caulerpa*

Dentre as algas verdes, encontra-se o gênero *Caulerpa*, pertencente a família Caulerpaceae, que compreendem macroalgas bentônicas, dotadas de um talo rastejante formado por uma porção rizomatosa que se expande ao longo do substrato, fixando-se através de estruturas denominadas rizoides. Além disso, são caracterizadas por terem apenas uma célula contendo vários núcleos (SZE, 1997).

O gênero *Caulerpa* compreende cerca de 80 espécies (ZALESKI; MURRAY, 2006), distribuídas principalmente nos mares tropicais. No litoral brasileiro, as espécies *Caulerpa cupressoides*, *C. mexicana*, *C. racemosa* e *C. sertularioides* são as mais comuns, formando extensas áreas verdes na zona entre marés (Figura 1) (BARATA, 2008; SZE, 1997).

Figura 1 – Fotografia das espécies de *C. cupressoides* (A), *C. mexicana* (B), *C. sertularioides* (C) e *C. racemosa* (D).



A diversidade de espécies de *Caulerpa* vem sendo estudada por vários grupos de pesquisa. Ainouz e Sampaio (1991) demonstraram que extratos de *C. cupressoides* possuem atividade hemaglutinante. Além disso, essa atividade também foi relatada para uma lectina isolada desta mesma espécie (BENEVIDES et al., 2001). Vanderlei et al. (2010) descreveram atividades antinociceptiva e anti-inflamatória predominantemente por mecanismos periféricos para uma lectina isolada de *C. cupressoides*. Essas atividades também já foram descritas para as espécies *C. mexicana*, *C. sertularioides*, *C. kempfii* (BITENCOURT et al., 2011; MATTA et al., 2010; 2011). Santoso, Yoshie-Stark e Suzuki (2004) relataram atividade antioxidante para a espécie *C. sertularioides*. Já a espécie *C. taxifolia* possui atividade hipotensora e diurética em camundongos (BHAKUNI; RAWAT, 2005) e inibidora da 12-lipoxigenase (NINONIYA; ONISHI; KUSUMI, 1998).

A espécie *C. racemosa* (Forsskal) J. Agardh é uma das algas mais amplamente distribuída nos mares tropicais e temperados quentes (NUBER et al., 2007). É considerada uma espécie complexa compreendendo diversas variedades/formas morfológicas, que pode conter de poucos a muitos ramos com formato esférico (MEÑEZ; CALUMPONG, 1982). Em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, essa espécie apresentou atividade antinociceptiva em camundongos (SOUZA et al., 2009a). Outras atividades farmacológicas também já foram descritas para *C. racemosa* como: efeito citotóxico contra uma linhagem de células de melanoma humano (CAVAS et al., 2006; ROCHA et al., 2007), antibacteriana contra bactérias patogênicas gram positivas e negativas (KANDHASAMY; ARUNACHALAM, 2008), antiviral contra o vírus *Herpes simplex* (GHOSH et al., 2004), leishmanicida (SABINA et al., 2005), atividade inibidora de fosfolipase A₂ (PLA₂) (MAYER et al., 1993), antioxidante (CAVAS; YURDAKOC, 2005) e hipolipidêmica (ARA et al., 2002).

Dentre as classes de metabólitos mais distribuídos nos organismos marinhos encontram-se os terpenos (HU et al., 2011). Nas espécies do gênero *Caulerpa*, destacam-se os sesquiterpenos caulerpeninol (COMMEIRAS et al., 2009), caulerpal A e B (MAO; GUO; SHEN, 2006) e caulerpenina (VALLS et al., 1994). Este último pode chegar a concentrações de até 1,3% do peso seco da alga (AMADE; LEMÉE, 1998;

JUNG et al., 2002) e algumas atividades já foram descritas para este terpeno, como atividade antitumoral (FISCHEL et al., 1995; BARBIER et al., 2001), inibidora de PLA₂ e inibidora de lipoxigenase (CENGIZ et al., 2010).

Outra classe de metabólitos que merece destaque, não apenas nas espécies de *Caulerpa*, mas também em outros organismos marinhos, são os alcaloides, considerados como a segunda maior classe de metabólitos presentes nestes seres (HU et al., 2011). Os alcaloides são bases orgânicas nitrogenadas, dotadas de acentuada atividade farmacológica (PELLETIER, 1970). Este grupo de compostos constitui o grupo mais diversificado de metabólitos secundários, sendo os alcaloides indólicos de particular interesse para farmacologia dos produtos marinhos, uma vez que representam ¼ do total de alcaloides marinhos, além de possuírem estruturas únicas e complexas (GUL; HAMANN, 2005; GÜVEN; PERCOT; SEZIK, 2010). A caulersina (SU et al., 1997) e a caulerpina (AGUILAR-SANTOS; DOTY, 1968) são exemplos de alcaloides indólicos encontrados em espécies de *Caulerpa*.

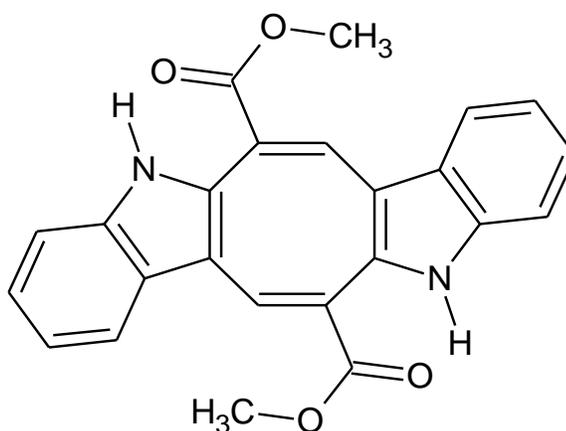
Os alcaloides indólicos são dotados de várias atividades biológicas, a saber: antiviral (RINEHART et al., 1984), citotóxica (KOHMOTO et al., 1988), anti-inflamatória (BOBZIN; FAULKNER, 1991; SOUZA et al., 2009b), antinociceptiva (SOUZA et al., 2009b), relaxante muscular (CHRISTOPHERSEN, 1985), antagonista de calmodulina (KOBAYASHI, 1986), espasmolítica (LIDGREN; BOHLIN, 1986), dentre outras.

1.3 Caulerpina

A caulerpina é um alcaloide bisindólico com massa molar de 398,41 g/mol, que se apresenta na forma de cristais alaranjados. Esta substância foi isolada pela primeira vez por Aguilar-Santos e Doty (1968) de três espécies de *Caulerpa*: *C. racemosa*, *C. sertularioides* e *C. serrulata*. Posteriormente, foi relatada a presença deste alcaloide em outras espécies de *Caulerpa* (CAPON; GHISALBERTI; JEFFERIES, 1983), nas algas verdes *Codium decortcatum* (ANJANEYULU; PRAKASH; MALLAVADHANI, 1991), *Halimeda incrassate* (YAN et al., 1999) e nas algas vermelhas *Hypnea concornis*, *Caloglossa leprieurii* e *Chondria armata* (GOVENKAR; WAHIDULLA, 2000; XU et al., 1998). Sua estrutura molecular foi proposta por Aguilar-Santos (1970) e mais tarde foi

revisada por Maiti, Thomson e Mahendran (1978). No entanto, apenas em 1994 sua estrutura foi determinada por cristalografia de raios-X (LU et al., 1994). A caulerpina (5,12-di-hidro-cicloocta[1,2-b;5,6-b']di-indol-6,13-ácido dicarboxílico dimetil éster) possui dois grupos indóis ligados a um sistema cíclico aromático contendo oito átomos de carbono, com dois substituintes carboxilato de metila (Figura 2) (GÜVEN; PERCOT; SEZIK, 2010).

Figura 2 – Estrutura química da caulerpina.



Fonte: SOUZA et al., 2009.

Algumas atividades farmacológicas já foram descritas para a caulerpina, a saber: inibidor da proteína tirosina fosfatase 1B humana (hPTP1B), enzima considerada como alvo para o tratamento do diabetes tipo II e obesidade, uma vez que pode hidrolisar fosfotirosinas no receptor de insulina, desativando-o (MAO; GUO; SHEN, 2006); inibidor do fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1), um importante alvo molecular para descoberta de fármacos antineoplásicos, visto que a ativação do HIF-1 e as vias de sinalização reguladas por ele promovem adaptação e sobrevivência das células tumorais sobre condições de hipóxia, que são comumente encontradas em tumores sólidos (LIU et al., 2009) e atividade antiviral contra *Herpes simplex* do tipo 1 (MACEDO et al., 2012) e contra vírus da diarreia viral bovina (PINTO et al., 2012). Outros estudos também demonstraram atividade antitumoral da caulerpina (AYYAD; BADRIA, 1984) e atividade

antibacteriana moderada contra oito espécies de bactérias isoladas da superfície de algas (VAIRAPPAN, 2004).

Em um estudo de toxicidade aguda, Vidal et al. (1984) demonstraram que tanto a caulerpina (via oral) como a caulerpina hidrolisada na forma de sal sódico (via intraperitoneal e intravenosa) apresentam uma baixa toxicidade em camundongos machos da linhagem *Swiss*.

1.4 Contração e relaxamento do músculo liso intestinal

O músculo liso é encontrado majoritariamente na parede de órgãos ocos, como vasos sanguíneos, bexiga, vias respiratórias e trato gastrintestinal, tornando-o, assim, um tecido fundamental para homeostasia do organismo (WEB, 2003). Dessa forma, há um grande interesse em se estudar substâncias que modulam o processo de contração/relaxamento desse tipo de músculo. Outrossim, os modelos experimentais com músculo liso são interessantes para investigação de vias de sinalização celular (DANIEL; KWAN; JANSSEN, 2001).

Um passo essencial para a contração do músculo liso é a interação entre actina e miosina, que ocorre após fosforilação do resíduo de Ser¹⁹ na cadeia leve da miosina (MLC) pela cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). Por sua vez, a MLCK é ativada pelo complexo formado por 4 íons Ca²⁺ e a proteína calmodulina [4Ca²⁺-CaM]. Não importando a fonte, o Ca²⁺ quando em quantidades elevadas no citosol liga-se a CaM para formar tal complexo (SOMLYO; SOMLYO, 2003). Assim, o aumento da concentração de cálcio citosólico ([Ca²⁺]_c) é o responsável pela gênese da contração. Este aumento da [Ca²⁺]_c pode ser resultante do influxo de Ca²⁺ ou ainda através da liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares. O influxo de Ca²⁺ é mediado principalmente através dos canais de cálcio dependente de voltagem (Ca_v) (THORNELOE; NELSON, 2005). No entanto, canais iônicos não seletivos, como receptores de potencial transitório (TRP) e receptor purinérgico P2X, também são fontes potenciais de influxo Ca²⁺ extracelular nas células do músculo liso (BENHAM; TSIEN, 1987). Por outro lado, o retículo sarcoplasmático (RS) é a principal organela

responsável pela liberação de Ca^{2+} , sendo os receptores de IP_3 (IP_3R) e o de rianodina (RyR) os principais canais envolvidos nesta liberação (PAN; MA, 2003).

O processo contrátil é resultante de dois estímulos que culminam em dois tipos de acoplamentos: o eletromecânico e o fármaco-mecânico. No acoplamento eletromecânico, a despolarização da membrana plasmática é o principal mecanismo envolvido. Esta despolarização pode ser resultante do aumento da concentração de K^+ extracelular ($[\text{K}^+]_e$) ou pela ligação de agonistas aos seus receptores (por exemplo acetilcolina ao ligar-se ao seu receptor M_3) levando à abertura de Ca_v , com consequente aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ e início da contração (REMBOLD, 1996). Enquanto que, no acoplamento fármaco-mecânico, os mecanismos envolvidos incluem a ligação de um agonista ao seu receptor, desencadeando a ativação de uma via de sinalização intracelular, como, por exemplo, a via $\text{G}_{q/11}$ -fosfolipase C_β (PLC_β) (MAKHLOUF; MURTHY, 1997).

Na via de sinalização $\text{G}_{q/11}$ - PLC_β ocorre a formação de mensageiros secundários derivados do 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP_2), a saber: 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). Ambos agem de forma sinérgica para induzir o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$. O IP_3 se liga ao seu receptor (IP_3R) no RS permitindo a liberação de Ca^{2+} , com consequente aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ e favorecimento do complexo $[\text{4Ca}^{2+}\text{-CaM}]$. A formação desse complexo também é favorecida pela liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} através dos RyR presentes na membrana do RS. Já o DAG ativa uma proteína cinase C (PKC), que fosforila os Ca_v , induzindo sua abertura, com consequente influxo de Ca^{2+} (BOLTON et al., 2002; REMBOLD, 1996; SOMLYO; SOMLYO, 1994).

Já a manutenção da contração tônica depende do influxo sustentado de Ca^{2+} através de canais na membrana plasmática (SOMLYO; SOMLYO, 1994), bem como do balanço entre os processos de fosforilações e desfosforilações observados na via alternativa que contribui para a contração no músculo liso, a via de sensibilização ao Ca^{2+} .

A via de sensibilização ao Ca^{2+} envolve a modulação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP). Essa proteína é composta por três subunidades: uma subunidade catalítica de 37 kDa, PP1c (uma serina/treonina fosfatase); uma regulatória, MYPT, e outra de 20 kDa de função ainda desconhecida (M20) (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A MYPT é expressa em diferentes isoformas, sendo a MYPT1 a principal forma expressa no músculo liso. Os mecanismos que modulam negativamente a MLCP envolvem fosforilações dependentes da proteína inibitória potencializada pela PKC (CPI-17) e da ROCK, uma Rho cinase (SANDERS, 2008; FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001).

A ativação da via de sinalização RhoA/Rho cinase é um passo essencial para manutenção da contração do músculo liso. A RhoA é uma proteína G monomérica encontrada no citosol na forma inativa associada a difosfato de guanosina (GDP), cuja ativação depende das proteínas $G_{\alpha q}/G_{\alpha 12/13}$ e do fator de troca de nucleotídeos de guanina (RhoGEFs), que promovem a troca de GDP por trifosfato de guanosina (GTP). Uma vez ligada ao GTP, a RhoA ativa a fosfolipase D (PLD) e ROCK (EXTON, 2002; SANDERS, 2008). A PLD tem como substrato a fosfatidilcolina, que após hidrólise libera o ácido fosfatídico, cuja desfosforilação gera o DAG. Este mensageiro secundário leva a ativação sustentada da PKC. O alvo desta enzima é o resíduo de Thr³⁸ da CPI-17, uma proteína inibitória endógena, que fosforila a subunidade catalítica PP1c da MLCP, promovendo o seu estado fosforilado e, assim, inibindo a sua atividade (SOMLYO; SOMLYO, 2003). Este estado inativado da MLCP também é mantido por fosforilações nos resíduos Thr⁶⁹⁶ e Thr⁸⁵³ na subunidade de ligação da miosina (MYPT1) pela ROCK, uma serina/treonina cinase (SOMLYO; SOMLYO, 2000). A ROCK pode ainda ativar outra proteína que contribui para o estado fosforilado da MLCP, a proteína cinase de interação “zipper” (ZIPK). A ZIPK pode fosforilar diretamente a MLC, no entanto seu alvo principal é o resíduo de Thr⁶⁹⁶ da MYPT1, o qual é fosforilado inibindo a ação da MLCP (NIIRO; IKEBE, 2001; SAUNDERS, 2008).

Sendo o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ o passo fundamental para iniciar o processo contrátil, o processo inverso, diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, caracteriza o relaxamento do músculo liso. Esse processo pode ocorrer em função da ativação de canais de potássio, resultando em repolarização/hiperpolarização, e conseqüente fechamento dos Ca_v , ou

ainda através de outros mecanismos que levam a diminuição da $[Ca^{2+}]_c$, a saber: (1) aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase, tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA), levando a um aumento do sequestro e da extrusão de Ca^{2+} , respectivamente; (2) bloqueio dos Ca_v ; (3) aumento da atividade do trocador Na^+/Ca^{2+} ; (4) ativação do regulador da sinalização da proteína G (RGS) que inativa a $G_{\alpha_q/11}$, com consequente inibição da atividade da PLC_{β} e diminuição da formação de IP_3 , diminuindo, assim, a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis ao IP_3 (MAKHLOUF; MURTHY, 1997).

Os processos mencionados acima são regulados pelas proteínas cinases dependentes de monofosfato cíclico de adenina (AMPC) e de guanina (GMPc), isto é, PKA e PKG, respectivamente (FRANCIS; CORBIN, 1999). A ativação dessas cinases ocorre em função do aumento da concentração citosólica dos nucleotídeos cíclicos que as regulam. O aumento da concentração de AMPC é resultante da ativação de receptores acoplados a proteína G_s , como por exemplo os receptores adrenérgicos β (TANAKA; HORINOUCI; KOIKE, 2005). Esse nucleotídeo cíclico além de ativar a PKA pode, quando presente em altas concentrações, ativar a PKG. No entanto, o GMPc, formado a partir da ativação o da ciclase de guanilil solúvel (CGs) ativa seletivamente a PKG (MURTHY, 2006).

Além de atuar sobre alvos que desencadeiam a diminuição da $[Ca^{2+}]_c$, a PKA e PKG podem fosforilar o resíduo de Ser^{188} da RhoA, estimulando sua translocação para o citosol, e consequente inibição da via RhoA/Rho cinase (MURTHY et al., 2003). Outro alvo passível de fosforilação é o resíduo de Ser^{695} da MYPT1 da MLCP, que, uma vez fosforilado, impede a fosforilação do resíduo de Thr^{696} pela ROCK (WOOLDRIDGE et al., 2004). Ambos os mecanismos contribuem para o estado inativo da MLC e inibição do processo contrátil.

Uma vez que já foi demonstrado que alcaloides indólicos apresentaram efeito espasmolítico em íleo isolado de cobaia (DINIZ; SILVA; MUKHERJEE, 1994; LIDGREN; BOHLIN, 1986; MEDEIROS; THOMAS; MUKHERJEE, 1991; SILVA et al., 1993) e o músculo liso intestinal é amplamente utilizado como modelo experimental para se

investigar mecanismos de ação de substâncias que possam ser utilizadas em processos fisiopatológicos, como, diarreias e cólicas intestinais (FARTHING, 2000), decidiu-se avaliar se a caulerpina possuiria atividade espamolítica em íleo de cobaia, bem como os possíveis mecanismos envolvidos nesta atividade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito espasmolítico, bem como os possíveis mecanismos de ação, da caulerpina, alcaloide bisindólico isolado da fase acetato de etila das algas marinhas *Caulerpa mexicana* e *C. sertularioides*, sobre íleo isolado de cobaia, contribuindo, assim, para o estudo farmacológico dos produtos naturais de origem marinha, em especial do gênero *Caulerpa*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da caulerpina frente às contrações fásicas induzidas por carbacol, por histamina ou por serotonina;
- Investigar a participação dos receptores adrenérgicos no efeito espasmolítico produzido pela caulerpina;
- Avaliar o efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por acoplamento eletromecânico e fármaco-mecânico;
- Investigar a participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito espasmolítico produzido pela caulerpina;
- Analisar a participação dos canais de potássio no efeito espasmolítico produzido pela caulerpina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Animais

Eram utilizados cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos, com peso médio de $367,4 \pm 6,8$ g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia/UFPB.

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Purina) com livre acesso a água, com ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 06h00 às 18h00. Todos os experimentos eram realizados no período de 08h00 às 20h00.

Todos os animais eram eutanasiados seguindo os princípios de cuidados com animais e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da UFAL N° 039/2012 (Anexo A).

3.1.2 Substâncias

O cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o bicarbonato de sódio (NaHCO_3), o sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) foram obtidos da Vetec (Brasil).

O fosfato de sódio mono-hidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e o ácido clorídrico (HCl P.A.) foram obtidos da Nuclear (Brasil).

O cloreto de sódio (NaCl) e o cloreto de potássio (KCl) foram obtidos da Fmaia (Brasil). O cloridrato de carbamilcolina (carbacol - CCh) foi obtido da Merck (Brasil).

O óleo de castor (Cremophor[®]), o cloreto de céσιο (CsCl), o di-hidrocloridrato de histamina, o hidrocloridrato de serotonina (5-HT), o hidrocloridrato de ioimbina e o hidrocloridrato de propranolol foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA).

3.1.3 Soluções nutritivas

De acordo com os experimentos realizados, foram utilizadas diferentes soluções nutritivas (ajustadas ao pH 7,4), todas aeradas com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantidas a 37 °C, cujas composições estão descritas nas tabelas a seguir.

Tabela 1 – Composição da solução de Krebs modificado.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	117,0
KCl	4,7
MgSO ₄	1,3
NaH ₂ PO ₄	1,2
CaCl ₂	2,5
Glicose	11,0
NaHCO ₃	25,0

Fonte: SUN; BENISHIN, 1994.

Tabela 2 – Composição da solução de Krebs modificado despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca^{2+} .

Substância	Concentração (mM)
NaCl	51,7
KCl	70
MgSO ₄	1,3
NaH ₂ PO ₄	1,2
Glicose	11,0
NaHCO ₃	25,0

3.1.4 Isolamento da caulerpina

Os procedimentos de isolamento da caulerpina foram realizados pelo grupo do Prof. Dr. José Maria Barbosa-Filho e da Profa. Dra. Bárbara V. de O. Santos, ambos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB. Para o presente estudo a caulerpina foi isolada das espécies *C. mexicana* e *C. sertularioides*, que foram coletadas em março de 2009 na praia do Cabo Branco, litoral paraibano, durante marés de sizígia e identificadas pelo Prof. Dr. George Emmanuel C. de Miranda do Departamento de Sistemática e Ecologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As mesmas foram identificadas com o número de tombo JPB13985 e JPB13983, respectivamente. Após a coleta, o material foi lavado com água destilada e separado de epífitas e outras algas, e em seguida seco a temperatura ambiente (~25 °C). Após a secagem, foi submetido à maceração exaustiva com metanol. O extrato metanólico bruto obtido foi submetido a uma partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Na fase acetato de etila, ocorreu a precipitação de um pó vermelho, que após análise espectral de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais foi identificado como a substância caulerpina.

3.1.5 Preparação da caulerpina para os ensaios farmacológicos

A caulerpina foi solubilizada em Cremophor[®] (3%) e diluída em água destilada até a concentração de 10^{-1} M (solução estoque), conservada a 0 °C. A concentração final de Cremophor[®] nas cubas nunca excedeu 0,01% (v/v). Nessa concentração, o Cremophor[®] não apresenta efeito relaxante ou contrátil significativo em íleo de cobaia, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores realizados no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas/UFPB. No momento da realização dos protocolos experimentais, a solução estoque era diluída em água destilada de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. Para avaliar o efeito da caulerpina, eram utilizadas concentrações submáxima e máxima (10^{-4} e 3×10^{-4} M). Se na concentração submáxima o efeito espasmolítico fosse maior que 50%, uma curva cumulativa com o produto era realizada a fim de encontrar as concentrações que produzissem o efeito mínimo (0%) e o efeito máximo (E_{max}). As concentrações da caulerpina eram utilizadas em múltiplos de 3, a fim de se obter uma curva concentrações-resposta cumulativa.

3.1.6 Equipamentos

Para o registro das contrações isotônicas, os órgãos eram suspensos em cubas de 5 mL (Figura 3A) e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição frontal em cilindros esfumados de um quimógrafo (DTF, Brasil) (Figura 3B). As contrações isométricas eram registradas através de transdutores de força isométricos FORT-10 (Figura 3C) conectados a um amplificador modelo TMB4M, ambos da World Precision Instruments (EUA), os quais estavam conectados a uma placa conversora analógico/digital (BioData, Brasil) (Figura 3D) instalada em um computador contendo o programa BioMed[®] versão Rv2 (Figura 3E).

Os valores de pH eram verificados através de um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil). A temperatura das cubas era controlada com bombas termostáticas (BANHO-MARIA AVS-BM, Brasil) ou do modelo POLYSTAT 12002 (Cole-Palmer, EUA).

Todas as substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG200 e os animais em balança semi-analítica modelo BG4001, ambas da GEHAKA (Brasil).

Figura 3 – Aparelhos utilizados para o registro das contrações: aparato para registro das contrações isotônicas com cilindro esfumado de um quimógrafo (A), cuba de vidro (B), transdutor de força (C), sistema de aquisição de dados (D) e sistema de banho para órgão isolado (E).



3.2 Métodos

3.2.1 Investigação da atividade espasmolítica de caulerpina em íleo isolado de cobaia

3.2.1.1 Efeito da caulerpina frente às contrações fásicas induzidas por CCh, por histamina ou por 5-HT

Os cobaias eram mantidos em jejum por 18 horas (dando-lhe somente água nesse período) e eutanasiados por deslocamento cervical seguido por secção dos vasos cervicais. O abdômen era aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento era retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs modificado a 37 °C sob aeração com carbogênio.

Após cuidadosa dissecação, o segmento do íleo era seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, suspensos longitudinalmente e individualmente em cubas de vidro de 5 mL e deixados em repouso por 30 minutos sob tensão de 1 g, tempo necessário para perfeita estabilização da preparação. Durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 15 minutos. Após o período de estabilização, duas contrações fásicas de magnitudes similares, com intervalo de 15 minutos entre ambas, eram obtidas com 10^{-6} M de CCh/histamina ou 10^{-5} M de 5-HT, concentrações submáximas que produzem cerca de 80% da resposta máxima, e registradas através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal em um cilindro esfumaçado de um quimógrafo. A caulerpina era incubada em diferentes concentrações por 15 minutos em preparações diferentes, e na presença desta, era induzida uma terceira contração utilizando um dos agonistas acima citados.

A inibição da resposta contrátil submáxima induzida por CCh, por histamina ou por 5-HT foi avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição do composto à cuba. Os valores de CI_{50} , que é definida com a concentração de uma substância que inibe 50% da resposta máxima de um agonista, foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) dos valores individuais da CI_{50} obtidos em cada um dos experimentos e calculados por regressão não linear.

3.2.2 Avaliação do mecanismo de ação espasmolítica de caulerpina em íleo isolado de cobaia

3.2.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por 5-HT

O íleo era montado como descrito anteriormente. Após o período de estabilização, duas curvas concentrações-resposta cumulativas similares à 5-HT (10^{-9} – 3×10^{-5} M) eram obtidas. Em seguida, na ausência de 5-HT, a caulerpina era incubada por 15 minutos em diferentes concentrações e em experimentos independentes. Após este período, na presença de caulerpina, uma nova curva concentração-resposta cumulativa à 5-HT era obtida. Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença de caulerpina com àquela obtida pela amplitude média das curvas controle (na ausência de caulerpina). O tipo de antagonismo exercido pela caulerpina foi avaliado com base na análise dos valores da inclinação do gráfico de Schild (ARUNLAKSHANA; SCHILD, 1959) e dos valores do efeito máximo (E_{max}) da 5-HT calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência (controle) e na presença da caulerpina. A potência da caulerpina foi determinada pelo valor de pD'_{2} , que é definido como o logaritmo negativo da concentração molar de um antagonista que reduz em 50% o efeito do agonista (VAN-OSSUM, 1963).

3.2.2.2 Avaliação da participação dos receptores adrenérgicos

3.2.2.2.1 Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença de antagonistas adrenérgicos

O íleo era montado como descrito no item 3.2.1.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, era induzida uma contração com 10^{-5} M de CCh (HONDA; TAKANO; KAMIYA, 1996), e sob o componente tônico dessa contração era adicionado a caulerpina de forma cumulativa (curva controle). Em outros experimentos, era adicionada à cuba 1,3 μ M de ioimbina, antagonista dos receptores adrenérgicos α_2 (FAGBEMI; SALAKO, 1982) ou 5 μ M de

propranolol, antagonista dos receptores adrenérgicos β_2 (BAUER, 1982) e após 20 minutos na presença dos antagonistas era induzida uma contração com 10^{-5} M de CCh e sob o componente tônico dessa contração era adicionado a caulerpina de forma cumulativa.

O relaxamento produzido pela caulerpina foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de CE_{50} da caulerpina foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença dos antagonistas.

3.2.2.3 Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por KCl

O íleo era montado como descrito no item 3.2.1.1. Após o período de estabilização, eram obtidas duas contrações com 40 mM de KCl e durante a fase tônica sustentada (8 – 10 min) da segunda contração a caulerpina era adicionada de maneira cumulativa à cuba em preparações diferentes.

O relaxamento produzido pela caulerpina foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pelo agente contrátil. Os valores da concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo (CE_{50}) foram expressos como a média \pm e.p.m. dos valores individuais da CE_{50} , calculados por regressão não linear.

3.2.2.4 Avaliação da participação dos canais de cálcio

3.2.2.4.1 Efeito da caulerpina frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca^{2+}

O íleo era montado como descrito no item 3.2.1.1. Após um período de estabilização do órgão por 30 minutos a solução de Krebs modificado era substituída pela solução despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca^{2+} , por um período de 45 minutos. Eram induzidas duas curvas similares de maneira concentração-resposta cumulativa ao $CaCl_2$, em seguida a caulerpina era incubada na ausência de $CaCl_2$ por 15 minutos e após esse período uma terceira curva cumulativa ao $CaCl_2$ era obtida na

presença da caulerpina. O tipo de antagonismo exercido pela caulerpina foi avaliado com base na análise dos valores de CE_{50} e do E_{max} do $CaCl_2$ calculado a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência (controle) e na presença de caulerpina.

3.2.2.4.2 Efeito da caulerpina frente às contrações fásicas induzidas por CCh na camada circular

O íleo era retirado como descrito no item 3.2.1.1. Para obtenção da camada circular a camada mucosa era removida mecanicamente através do atrito com algodão embebido em solução de Krebs modificado, na parede interna do órgão. Um segmento de cerca de 5 mm era então isolado, suspenso com a ajuda de hastes de aço inoxidável em cubas de banho para órgão isolado contendo solução fisiológica de Krebs modificado, sendo aerados com mistura carbogênica, mantidos a uma temperatura de 37 °C, e sob tensão de repouso de 1 g. A solução do banho era trocada a cada 15 minutos, permanecendo o órgão em repouso por 120 minutos para completa estabilização da preparação (adaptado de CHENG, SHINOKUZA, 1987). Após o período de estabilização, duas contrações fásicas de magnitudes similares, com intervalo de 15 minutos entre ambas, eram obtidas com 10^{-6} M de CCh, concentração submáxima que produz cerca de 80% da resposta máxima, e registradas através de um sistema de aquisição digital. A caulerpina foi incubada em diferentes concentrações, individualmente por 15 minutos em preparações diferentes e na presença desta era induzida uma terceira contração por CCh.

A inibição da resposta submáxima de CCh era avaliada por comparação das respostas antes (100%, controle) e após a adição da caulerpina à cuba.

3.2.2.5 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio

3.2.2.5.1 Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença de cloreto de céσιο (CsCl)

O íleo era montado como descrito no item 3.2.1.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com KCl 40 mM para verificar a

funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 30 minutos, era induzida uma contração com 10^{-5} M de CCh, e sob o componente tônico dessa contração era adicionado a caulerpina de forma cumulativa (curva controle). Em outro experimento era adicionada à cuba 5 mM de CsCl, que nessa concentração é um bloqueador não seletivo dos canais de potássio (CECCHI et al., 1987), e após 20 minutos na presença do bloqueador era induzida uma contração com 10^{-5} M de CCh e sob o componente tônico dessa contração era adicionado a caulerpina de forma cumulativa.

O relaxamento produzido pela caulerpina foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de CE_{50} da caulerpina foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença do bloqueador.

3.2.3 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média \pm e.p.m., e as diferenças entre as médias foram analisadas estatisticamente empregando-se o teste *t* (não-pareado) ou análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido do pós-teste de Bonferroni, onde para valores de $p < 0,05$, as diferenças entre as médias foram consideradas significantes. Os valores de CI_{50} , CE_{50} e R^2 foram calculados por regressão não-linear para todos os experimentos realizados (NEUBIG et al., 2003). Enquanto o *slope* do *plot* de Schild, pD'_2 e o valores de r^2 (coeficiente de regressão linear) foram determinados por regressão linear. O antagonismo foi considerado não-competitivo quando o *slope* do *plot* de Schild diferiu da unidade e quando houve redução do efeito máximo (ARUNLAKSHANA; SCHILD, 1959). Todos os resultados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism[®] versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Investigação da atividade espasmolítica da caulerpina em íleo isolado de cobaia

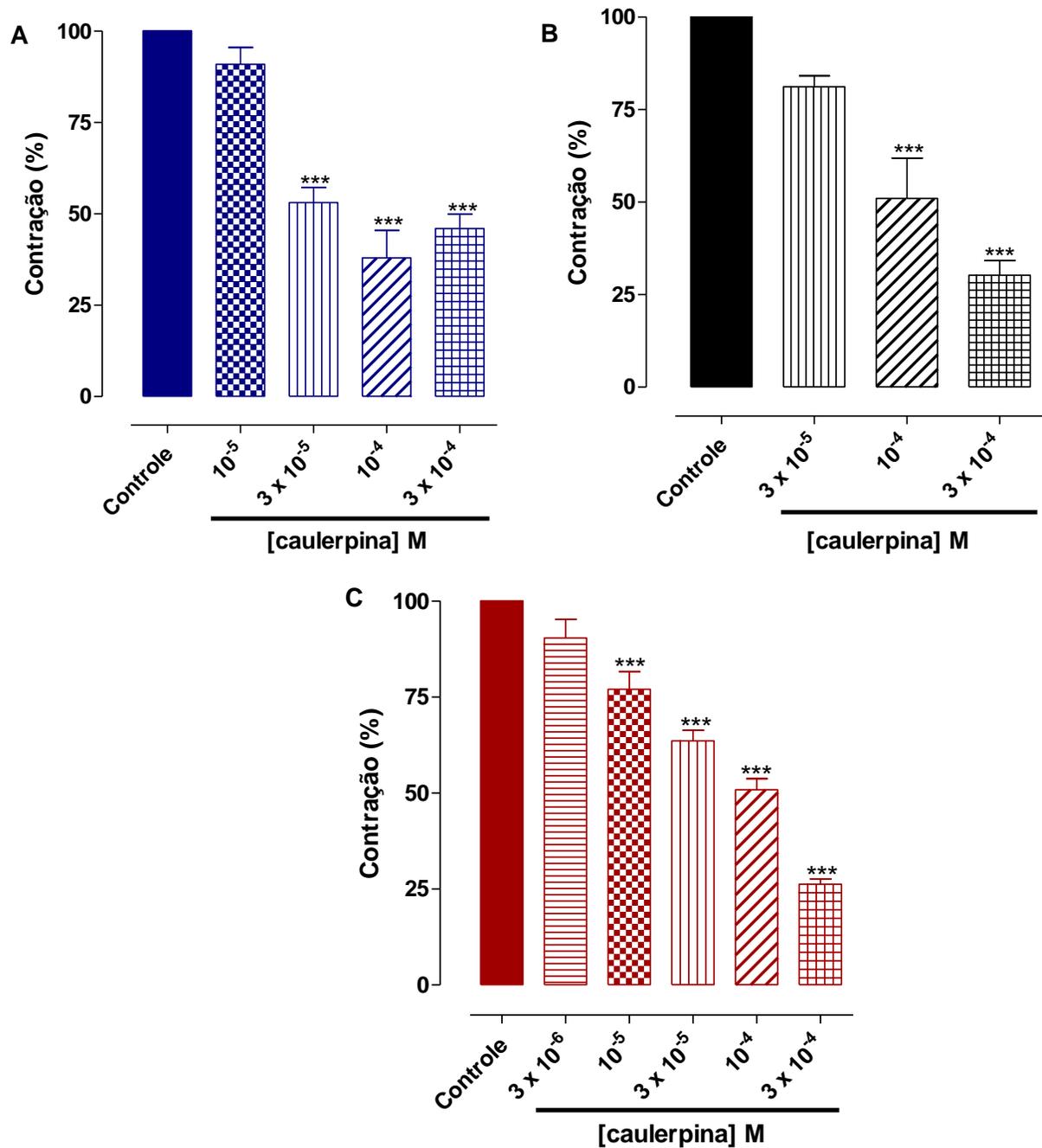
4.1.1 Efeito da caulerpina frente às contrações fásicas induzidas por CCh, por histamina e por 5-HT

A caulerpina antagonizou as contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de CCh, por 10^{-6} M de histamina e por 10^{-5} M de 5-HT em íleo de cobaia (Gráfico 1, $n = 5$) de maneira significativa e dependente de concentração ($R^2 = 0,893 \pm 0,037$; $0,911 \pm 0,045$ e $0,971 \pm 0,06$, respectivamente) O valor de CI_{50} para caulerpina foi de $7,0 \pm 1,9 \times 10^{-5}$ M frente ao CCh, de $1,3 \pm 0,3 \times 10^{-4}$ M frente à histamina e de $8,0 \pm 1,4 \times 10^{-5}$ M frente à 5-HT. Analisando estes valores, pode-se verificar que não há diferença significativa entre os valores de CI_{50} da caulerpina frente às contrações induzidas por CCh, por histamina e por 5-HT.

O E_{max} de $62 \pm 7,6\%$ frente ao CCh foi alcançado na concentração de 10^{-4} M, enquanto que nas contrações induzidas por histamina e por 5-HT os valores de E_{max} de $71,0 \pm 4,9\%$ e de $73,8 \pm 1,4\%$, respectivamente, foram alcançados na concentração de 3×10^{-4} M.

A responsividade do íleo de cobaia aos agentes contráteis foi restabelecida em média $56,7 \pm 19,6$ minutos após a retirada da caulerpina da cuba.

Gráfico 1 – Efeito da caulerpina frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de CCh (A) e de histamina (B) ou por 10^{-5} M de 5-HT (C) em íleo isolado de cobaia.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). ANOVA *one-way* seguido por Bonferroni; *** $p < 0,001$ (controle vs. caulerpina).

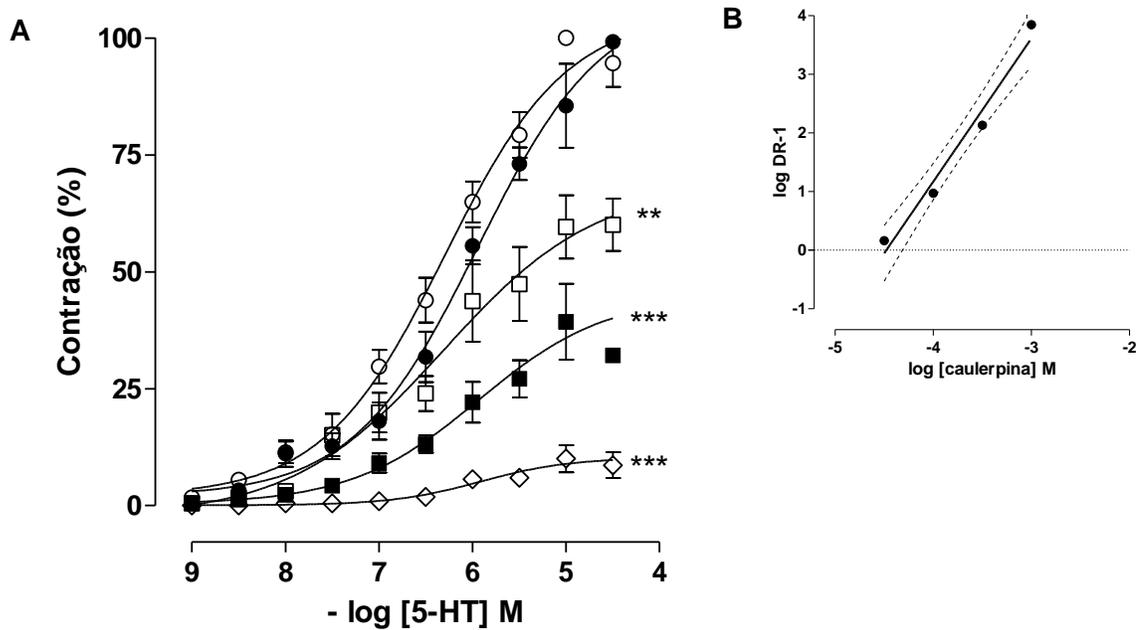
Fonte: Autor, 2013.

4.2 Avaliação do mecanismo de ação espasmolítica da caulerpina em íleo isolado de cobaia

4.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por 5-HT

A caulerpina inibiu de maneira dependente de concentração ($r^2 = 0,95 \pm 0,03$) as contrações cumulativas induzidas por concentrações crescentes de 5-HT (10^{-9} - 3×10^{-5} M, $n = 5$). As curvas cumulativas à 5-HT foram desviadas para a direita de forma não paralela e com redução do E_{max} de 100% (controle) para $99,2 \pm 0,8$; $63,3 \pm 5,4$; $39,3 \pm 8,1$ e $10,5 \pm 2,5\%$, respectivamente (Gráfico 2A). A análise do gráfico do *plot* de Schild (Gráfico 2B) indica um antagonismo do tipo não competitivo, que foi confirmado pelo valor de *slope* igual a $2,44 \pm 0,21$ que diferiu da unidade. A potência da caulerpina foi determinada pelo valor de $pD'_2 = 4,48 \pm 0,08$.

Gráfico 2 – Curvas concentrações-resposta cumulativas à 5-HT na ausência (○) e na presença de caulerpina: 3×10^{-5} (●), 10^{-4} (□), 3×10^{-4} (■) e 10^{-3} M (◇) em íleo isolado de cobaia (A); gráfico do *plot* de Schild (B).



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). ANOVA *one-way* seguido por Bonferroni, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (controle vs. caulerpina).

Fonte: Autor, 2013.

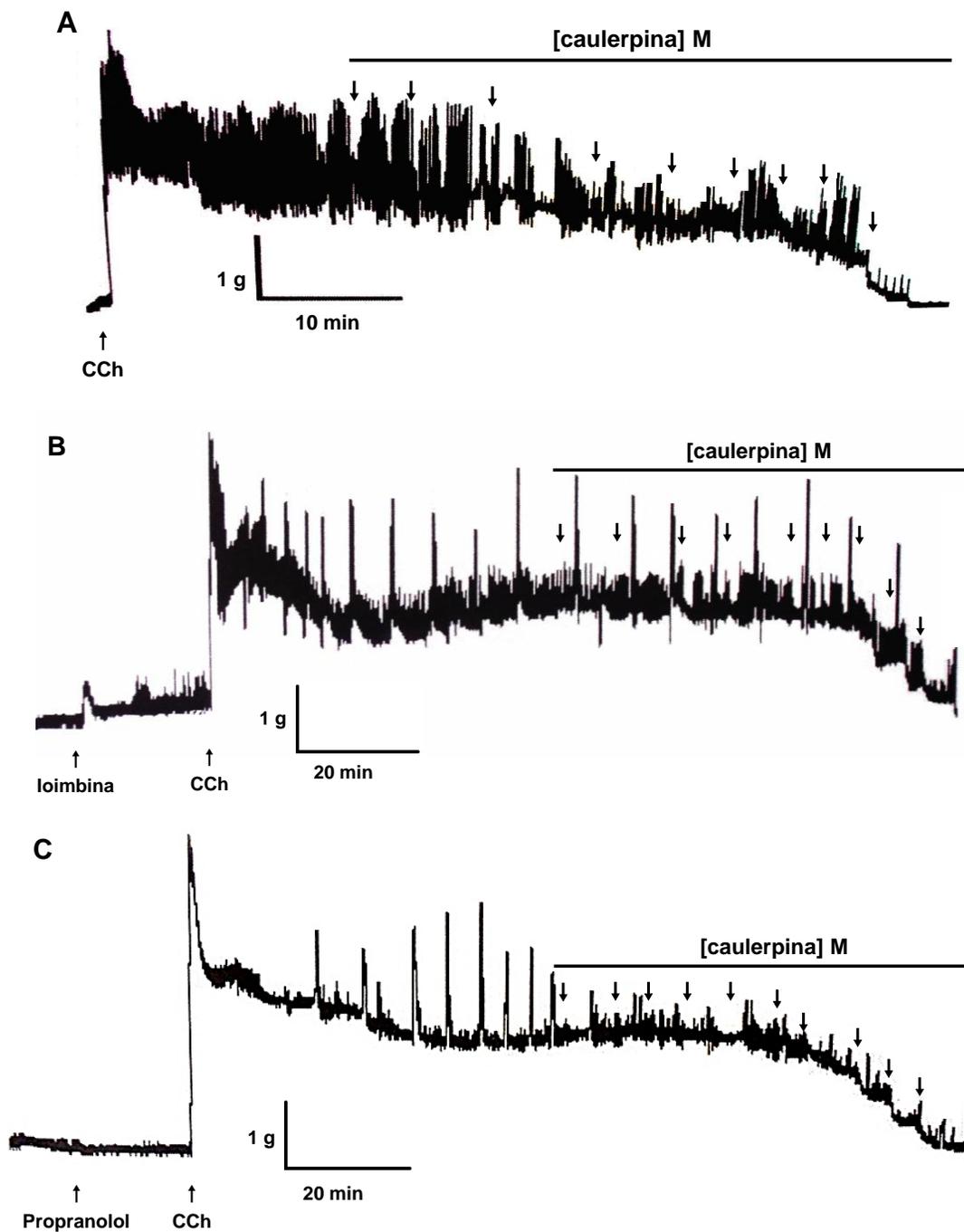
4.2.2 Avaliação da participação dos receptores adrenérgicos

4.2.2.1 Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença de antagonistas adrenérgicos

A caulerpina (10^{-7} – 10^{-3} M) relaxou de maneira significativa e dependente de concentração o íleo de cobaia (Figura 4) pré-contraído com CCh tanto na ausência ($CE_{50} = 4,7 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M, $n = 5$) como na presença de antagonistas adrenérgicos (Gráficos 3 e 4). Entretanto, a curva de relaxamento da caulerpina não foi deslocada na presença de $1,3 \mu\text{M}$ de ioimbina, um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 ($CE_{50} = 5,7 \pm 1,1 \times 10^{-5}$ M, $n = 5$) (Figura 4 e Gráfico 3). Diferentemente, na presença de $5 \mu\text{M}$ de propranolol, um antagonista de receptores adrenérgicos β , a curva de relaxamento da caulerpina foi deslocada cerca de 5 vezes para direita ($CE_{50} = 2,2 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ M, $n = 4$). (Figura 4 e Gráfico 4).

Nas preparações pré-contraídas com CCh na ausência de antagonistas, o E_{max} ($92,7 \pm 5,4\%$) da caulerpina foi atingido no tempo médio de $55,8 \pm 12,5$ minutos. Enquanto que na presença de ioimbina e propranolol, os valores de E_{max} ($94,0 \pm 4,9$ e $99,2 \pm 0,5\%$, respectivamente), foram alcançados no tempo médio de $65,5 \pm 3,2$ e $68,0 \pm 5,0$ minutos, respectivamente (Figura 4).

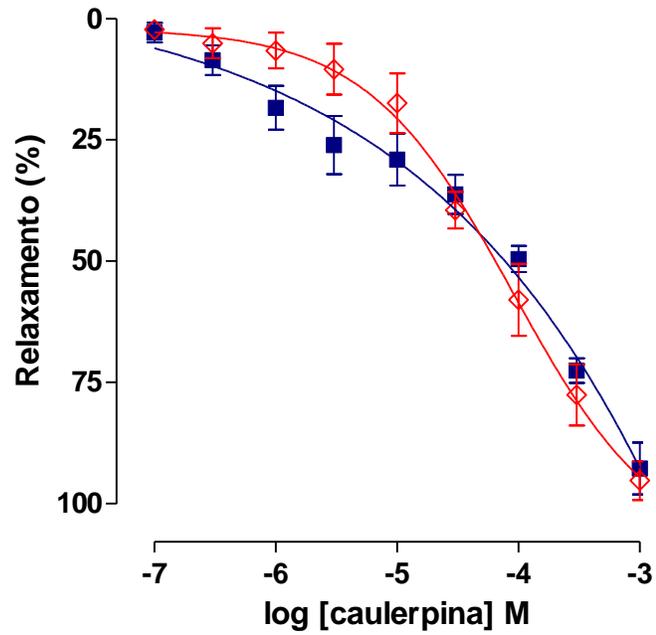
Figura 4 – Registros originais do efeito relaxante da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-5} M de CCh na ausência (A) e na presença de $1,3 \mu\text{M}$ de ioimbina (B) ou de $5 \mu\text{M}$ de propranolol (C) em íleo isolado de cobaia.



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas (10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} ; 3×10^{-5} ; 10^{-4} ; 3×10^{-4} ; 10^{-3} e 3×10^{-3} M, respectivamente) da caulerpina.

Fonte: Autor, 2013.

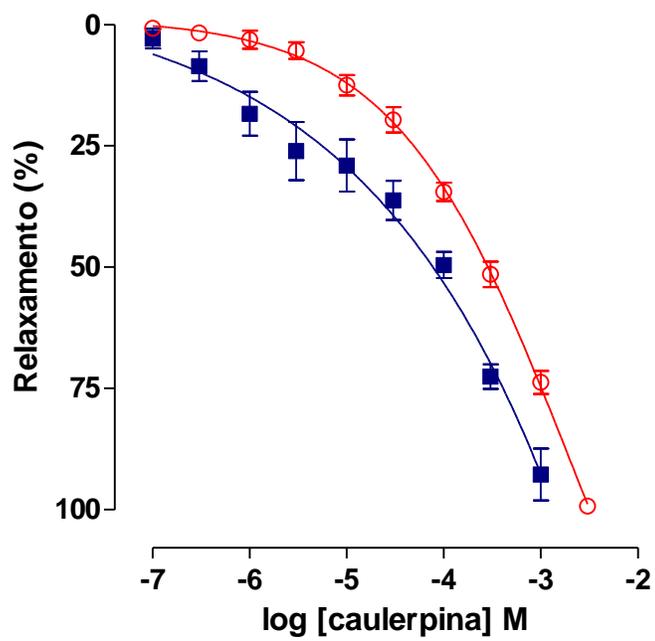
Gráfico 3 – Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-5} M de CCh na ausência (■) e na presença de $1,3 \mu\text{M}$ de ioimbina (◇) em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Autor, 2013.

Gráfico 4 – Efeito de caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-5} M CCh na ausência (■) e na presença de $5 \mu\text{M}$ de propranolol (○) em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 4).

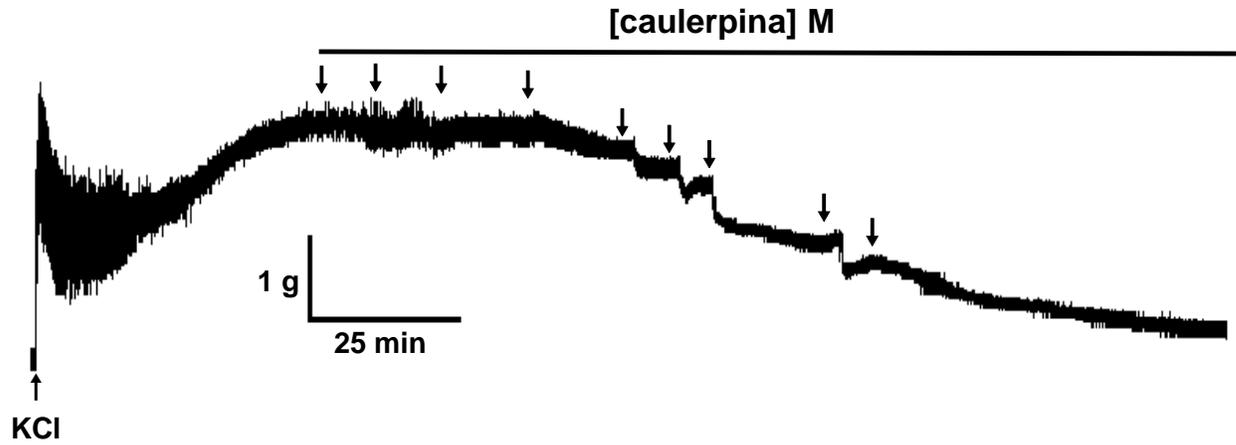
Fonte: Autor, 2013.

4.2.3 Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por KCl

A caulerpina (10^{-7} – 10^{-3} M) relaxou de maneira significativa e dependente de concentração o íleo de cobaia (Figura 5 e Gráfico 5) pré-contraído com 40 mM de KCl ($CE_{50} = 9,2 \pm 0,9 \times 10^{-5}$ M, $n = 5$). O E_{max} de $94,8 \pm 2,6\%$ foi atingido no tempo médio de 135 ± 19 minutos.

A responsividade do íleo de cobaia ao KCl só foi restaurada em $68,31 \pm 6,9\%$ em até 2 h após a retirada da caulerpina da cuba.

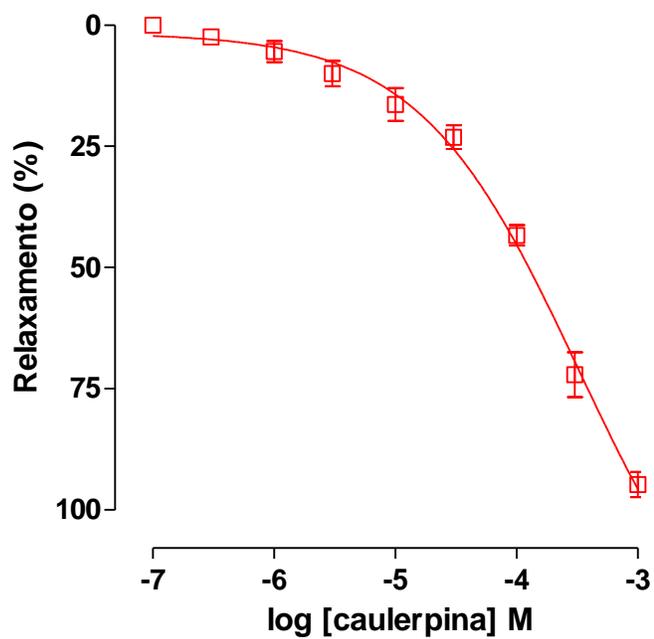
Figura 5 – Registro original do efeito relaxante da caulerpina sobre a contração tônica induzida por 40 mM de KCl em íleo isolado de cobaia.



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas (10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} ; 3×10^{-5} ; 10^{-4} ; 3×10^{-4} e 10^{-3} M, respectivamente) da caulerpina.

Fonte: Autor, 2013.

Gráfico 5 – Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (□) em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

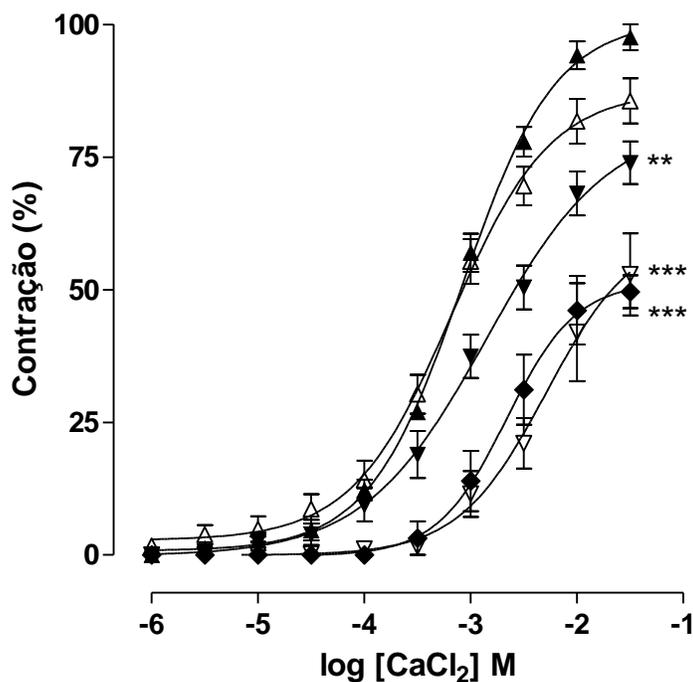
Fonte: Autor, 2013.

4.2.4 Avaliação da participação dos canais de cálcio

4.2.4.1 Efeito da caulerpina frente às contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca^{2+}

A caulerpina (3×10^{-5} ; 10^{-4} ; 3×10^{-4} e 10^{-3} M) inibiu de maneira dependente de concentração as contrações induzidas pelo aumento na concentração extracelular de CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca^{2+} ($n = 5$). As curvas cumulativas ao CaCl_2 foram desviadas para direita de forma não paralela e com redução do E_{max} de 100% (controle) para $85,6 \pm 4,2$; $73,9 \pm 4,0$; $52,9 \pm 7,7$ e $52,7 \pm 4,5$, respectivamente (Gráfico 6). Os valores de CE_{50} do CaCl_2 passaram de $8,2 \pm 0,8 \times 10^{-4}$ M (controle) para $6,6 \pm 1,5 \times 10^{-4}$; $1,1 \pm 0,2 \times 10^{-3}$; $4,3 \pm 0,8 \times 10^{-3}$ e $2,8 \pm 0,7 \times 10^{-3}$ M, respectivamente.

Gráfico 6 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (\blacktriangle) e na presença de caulerpina nas concentrações de 3×10^{-5} (\triangle), 10^{-4} (\blacktriangledown), 3×10^{-4} (∇) e 10^{-3} M (\blacklozenge), em íleo isolado de cobaia.



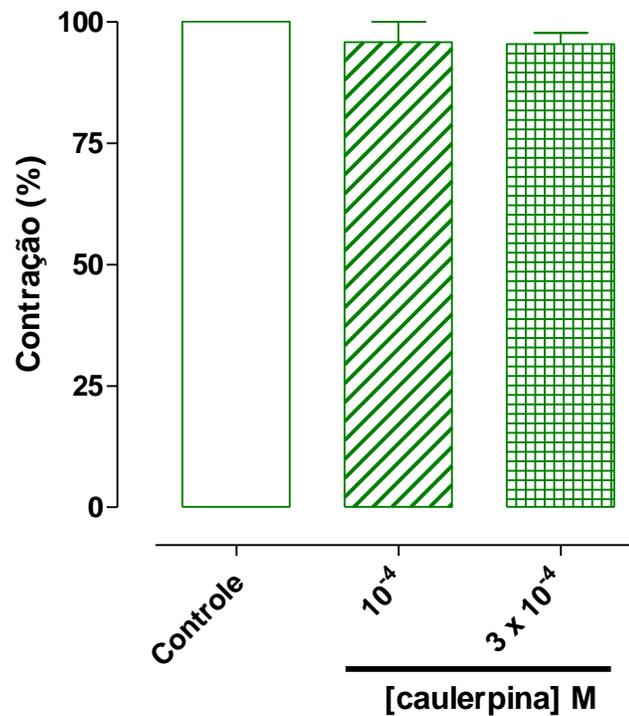
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). ANOVA *one-way* seguido por Bonferroni; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (controle vs. caulerpina).

Fonte: Autor, 2013.

4.2.4.2 Efeito da caulerpina frente às contrações fásicas induzidas por CCh na camada circular

A caulerpina (10^{-4} e 3×10^{-4} M) não antagonizou as contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na camada circular do íleo isolado de cobaia (Gráfico 7, $n = 3$).

Gráfico 7 – Efeito da caulerpina frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de CCh na camada circular do íleo isolado de cobaia.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 3$). ANOVA *one-way* seguido por Bonferroni.

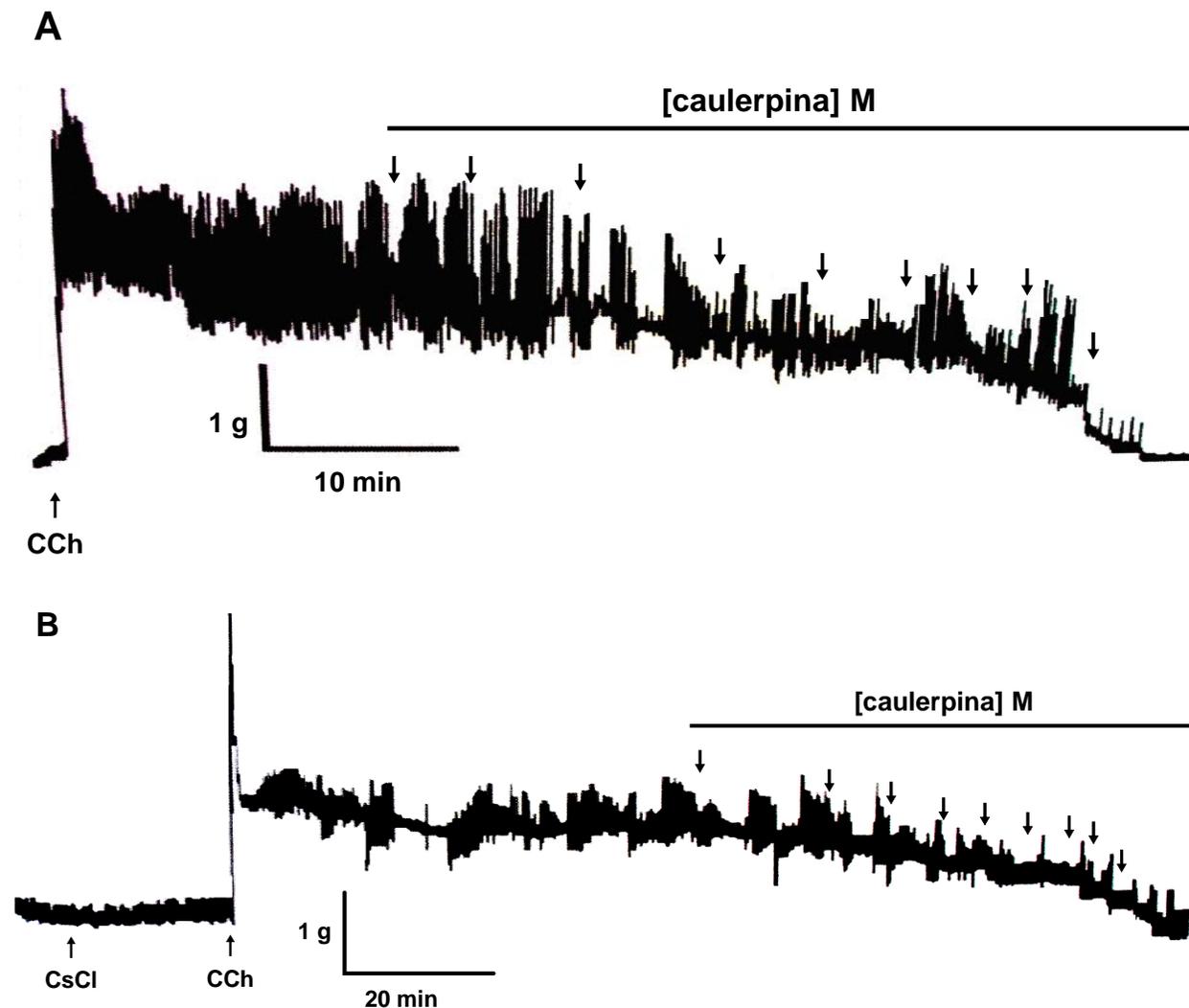
Fonte: Autor, 2013.

4.2.5 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio

4.2.5.1 Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência e na presença de cloreto de céσιο (CsCl)

A curva de relaxamento da caulerpina ($CE_{50} = 4,7 \pm 0,7 \times 10^{-5} \text{ M}$, $n = 5$) não foi deslocada na presença de 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio ($CE_{50} = 3,0 \pm 0,7 \times 10^{-5} \text{ M}$) (Figura 6 e Gráfico 8) O tempo médio para caulerpina atingir o seu E_{max} (100%) foi em média $74,4 \pm 3,8$ minutos na presença de CsCl (Figura 6).

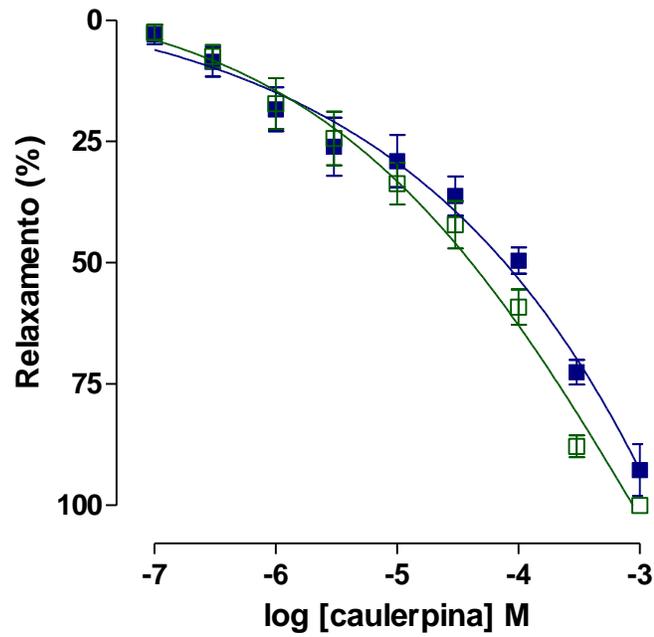
Figura 6 – Registros originais do efeito relaxante da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-5} M de CCh na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl em íleo isolado de cobaia.



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas (10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 10^{-6} ; 3×10^{-6} ; 10^{-5} ; 3×10^{-5} ; 10^{-4} ; 3×10^{-4} e 10^{-3} M, respectivamente) da caulerpina.

Fonte: Autor, 2013.

Gráfico 8 – Efeito da caulerpina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-5} M de CCh na ausência (■) e na presença (□) de 5 mM de CsCl em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Autor, 2013.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi avaliado o efeito espasmolítico da caulerpina, alcaloide bisindólico isolado de algas do gênero *Caulerpa* do litoral paraibano, em íleo isolado de cobaia. Demonstrou-se, pela primeira vez, um efeito espasmolítico não seletivo da caulerpina por mecanismos que envolvem a ativação dos receptores adrenérgicos β e a inibição do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v .

O modelo do músculo liso intestinal é um meio importante para se investigar mecanismos de ação de substâncias que possam ser utilizadas em processos fisiopatológicos, como síndrome do intestino irritável, diarreias e cólicas intestinais, e também para estudar vias de sinalização intracelular.

O principal impacto de doenças gastrintestinais, como a diarreia, é a morbidade (FARTHING, 2000). Esta é um problema médico frequente e ainda é uma das principais ameaças à saúde em populações pobres de países tropicais e subtropicais. A alteração da motilidade é um dos processos fisiológicos que caracterizam a diarreia. Nesse sentido, alguns agentes antidiarreicos são conhecidos por apresentar efeito espasmolítico (HAJHASHEMI et al., 2000), como por exemplo, difenoxilato e loperamida, entretanto podem causar depressão do Sistema Nervoso Central (RYU et al., 2004). Existem ainda os antiespasmódicos ou espasmolíticos clássicos como o extrato fluido de beladona, tintura de ópio, atropina, butiril-escopolamina, papaverina, dicitolmina, dentre outros (BROWN; TAYLOR, 2006; KOROLKOVAS, 2012).

Baseado no fato que os alcaloides indólicos são compostos dotados de atividade espasmolítica evidenciada em íleo de cobaia (DINIZ; SILVA; MUKHERJEE, 1994; LIDGREN; BOHLIN, 1986; MEDEIROS; THOMAS; MUKHERJEE, 1991; SILVA et al., 1993), resolveu-se avaliar se a caulerpina possuiria tal propriedade.

O íleo de cobaia é um órgão que apresenta uma contração bifásica, constituída por uma contração rápida e transiente (componente fásico) com duração aproximada de trinta segundos, seguida por uma contração sustentada (componente tônico) que se

desenvolve mais lentamente e é mantida durante a exposição do órgão ao agente contrátil (ABDEL-LATIF, 1989; BOLTON, 1979).

Inicialmente, foi avaliado o efeito da caulerpina sobre o componente fásico das contrações induzidas por três agonistas diferentes: CCh, histamina e 5-HT. Após análise dos valores de CI_{50} e E_{max} , foi observado que a caulerpina inibiu as contrações induzidas por esses agentes contráteis de maneira equipotente e com eficácia semelhante (Gráfico 1), sugerindo que este alcaloide não estaria atuando seletivamente em nenhum dos receptores dos agonistas contráteis avaliados para exercer seu efeito espasmolítico em íleo de cobaia.

No músculo liso intestinal, a ação do sistema parassimpático ocorre predominantemente através da ativação dos receptores muscarínicos M_3 (EGLEN; HEGDE; WATSON, 1996), que estão localizados tanto na camada circular como na camada longitudinal do músculo, além do plexo mioentérico (PERETTO; PETRILLO; IMBIMBO, 2009). A ativação desses receptores inicia a via de sinalização da $G_{q/11}$ - PLC_{β} para induzir o aumento da $[Ca^{2+}]_c$, com conseqüente início da contração (CANDELL et al., 1990). Também foi descrita a participação dos receptores M_2 (via G_i -ciclase de adenilil) na contração do músculo intestinal (EHLERT; THOMAS, 1995). No entanto, apesar deste subtipo de receptor ser mais expresso que o M_3 no íleo de cobaia (proporção de 4:1) (CANDELL et al., 1990; EGLEN et al., 1994), apenas a sua ativação não é capaz de induzir uma contração (EHLERT, 2003). Contudo, quando ativado concomitantemente com os receptores M_3 , ocorre ativação de correntes catiônicas não seletivas e inibição dos canais de potássio de grande condutância ativados pelo Ca^{2+} (BK_{Ca}), o que contribui para a indução da contração (EHLERT et al., 2001; SAWYER; EHLERT, 1999; THOMAS; EHLERT, 1994).

O efeito contrátil produzido tanto pela histamina como pela 5-HT também envolve ativação da via de sinalização $G_{q/11}$ - PLC_{β} , após a ligação aos receptores H_1 (BOLTON, 1979; HILL et al., 1997) e 5-HT $_{2A}$ (ENGEL et al., 1984), respectivamente. No entanto, o efeito contrátil da 5-HT pode ocorrer indiretamente através dos receptores ionotrópicos 5-HT $_3$ presentes nos neurônios entéricos, que, quando estimulados, induzem a

liberação de acetilcolina, resultando em contração do músculo liso (FOX; MORTON, 1990).

É importante ressaltar a ação de outros alcaloides indólicos sobre a musculatura lisa: Silva et al. (1993) demonstraram que o alcaloide indólico bisnordihidrotoxiferina apresentou efeito espasmolítico, tanto em íleo de cobaia como em útero de rata. Ademais, Medeiros, Thomas e Mukherjee (1991) relataram que o alcaloide bisindólico longicaudatina também apresentou efeito espasmolítico sobre esses órgãos. Vale salientar que a atividade em estudo foi relatada também para outras classes de alcaloides, como no caso do alcaloide piridínico cantleina que apresentou efeito espasmolítico não seletivo em íleo isolado de cobaia (SILVA; SILVA; MUKHERJEE, 1999).

Como mencionado anteriormente, os resultados obtidos no protocolo de contrações fásicas permitem inferir que caulerpina, em nível funcional, provavelmente não atua seletivamente nos receptores avaliados até agora para exercer seu efeito espasmolítico em íleo de cobaia. Para confirmar tal hipótese, decidiu-se avaliar a natureza do antagonismo exercido pela caulerpina frente às curvas concentrações-resposta cumulativas induzidas por 5-HT.

A escolha da 5-HT para realização deste protocolo deu-se em função de ter sido observada uma maior dependência de concentração no efeito inibitório da caulerpina frente às contrações fásicas induzidas por 5-HT em relação aos outros agonistas testados (CCh e histamina). Além disso, assim como a 5-HT e os antagonistas serotoninérgicos, a caulerpina apresenta na sua estrutura o núcleo indol, sendo este, portanto, um possível grupo farmacofórico para atividade espasmolítica deste alcaloide (BIFULCO et al. 1994; BIFULCO et al., 1995; HU et al., 2002).

Nesse protocolo experimental, observou-se um desvio para direita das curvas controles cumulativas à 5-HT, de forma não paralela e com redução do E_{max} (Gráfico 2), descartando, dessa forma, um antagonismo do tipo competitivo, o que foi confirmado pelo valor de *slope* do *plot* de Schild que diferiu da unidade.

O antagonismo do tipo não competitivo pode ocorrer quando há ligação do antagonista ao mesmo sítio de ligação do agonista (antagonismo pseudo-irreversível) ou em um sítio distinto (antagonismo alostérico) (BLUMENTHAL, GARRISON, 2011). O perfil do Gráfico 2 representa um antagonismo pseudo-irreversível, uma vez que não houve saturação do efeito, ou seja, a inibição da resposta contrátil da 5-HT na presença de caulerpina não atingiu um valor limitante, característica observada no antagonismo alostérico.

Resultados semelhantes foram observados por Diniz et al. (1994) que demonstraram efeito espasmolítico do alcaloide indólico trinervina em músculo liso gastrointestinal também através de antagonismo do tipo não competitivo.

O trato gastrointestinal também é extensivamente innervado por fibras do sistema nervoso simpático e as catecolaminas modulam uma série de funções digestivas, como relaxamento do músculo liso, secreção de neurotransmissores e absorção de eletrólitos (DE PONTI et al., 1996). Parte dessas funções são reguladas pelos receptores adrenérgicos α_2 , via G_i -ciclase de adenilil (BÜLBRING; TOMITA, 1987), que estão localizados nas células epiteliais e nas células do músculo liso intestinal. Outrossim, os receptores α_2 são expressos nos neurônios colinérgicos do plexo intestinal que, quando ativados, produzem hiperpolarização e diminuem a liberação de neurotransmissores (BAUER, 1982; DE PONTI et al., 1996).

Em íleo de cobaia, a ação da clonidina, um agonista α_2 , é mediada tanto por ativação da proteína G_i , inibida pela toxina pertussis (LUJÁN et al., 1984), como pela inibição de correntes catiônicas não seletivas por mecanismos que não envolvem ligação ao receptor (CHUNG et al., 2001). Além disso, já foi demonstrado que a inibição do peristaltismo causada pela ativação de receptores α_2 pela clonidina também envolve a ativação de SK_{Ca} e vias opioides endógenas (HERBERT et al., 2002).

Como os receptores adrenérgicos α_2 desempenham um papel importante no trato gastrointestinal, dentre eles a inibição da motilidade (DE PONTI et al., 1996), decidiu-se avaliar se a caulerpina estaria atuando sobre esses receptores para exercer seu efeito espasmolítico. Para tanto, a ioimbina foi utilizada como ferramenta farmacológica para

antagonizar seletivamente os receptores α_2 (FAGBEMI; SALAKO, 1982). Se essa hipótese fosse verdadeira, a curva de relaxamento da caulerpina na presença de ioimbina seria desviada para direita de forma significativa. Entretanto, não houve diferença na potência relaxante da caulerpina na ausência e na presença de ioimbina (Gráfico 3), indicando que não há participação dos receptores adrenérgicos α_2 no efeito espasmolítico de caulerpina.

O relaxamento do músculo liso intestinal induzido por ativação da via adrenérgica não envolve apenas os receptores α_2 , mas também os receptores β . Estes são classificados em três subtipos β_1 , β_2 e β_3 , sendo todos expressos no músculo liso intestinal (BAUER, 1982; DE PONTI et al., 1996).

A ativação dos receptores β inicia a via de sinalização G_s -AC, que desencadeia o relaxamento do músculo liso por mecanismos dependentes e independentes da redução de $[Ca^{2+}]_c$. Além disso, os mecanismos de relaxamento de agonistas β também envolvem mecanismos independentes de AMPc-PKA, visto que o efeito relaxante da isoprenalina, um agonista β não seletivo, não é diminuído na presença de SQ 22536, inibidor da ciclase de adenilil. Entretanto, há uma supressão desse relaxamento na presença de iberiotoxina (inibidor de BK_{Ca}). Ademais, esse efeito é mimetizado pela toxina colérica, um ativador da proteína G_s , o que demonstra que a ativação dos receptores adrenérgicos β induz relaxamento por ativação direta dos BK_{Ca} pela proteína G_s , independente de ativação da PKA (TANAKA; HORINOUCI; KOIKE; 2005).

Sabendo-se da importância desses receptores no relaxamento do músculo liso, decidiu-se investigar se a caulerpina estaria atuando sobre os receptores β para exercer seu efeito espasmolítico. Para tanto, o propranolol foi utilizada como ferramenta farmacológica para antagonizar de forma não seletiva tais receptores (BAUER, 1982). Se essa hipótese fosse verdadeira, a curva de relaxamento da caulerpina na presença de propranolol seria desviada para direita de forma significativa; e foi exatamente o que se observou, a potência relaxante da caulerpina foi reduzida em cerca de cinco vezes na presença de propranolol (Gráfico 4), sugerindo que, em nível funcional, a caulerpina ativa os receptores β para exercer seu efeito espasmolítico. Hou et al. (2012) também

demonstraram que alcaloides indólicos, akuamidina e Z-alstoscolarina, exercem efeito espasmolítico por ativar os receptores adrenérgicos β .

Teoricamente, o uso de agonistas β como agentes espasmolíticos apresentam uma vantagem sobre antagonistas muscarínicos, uma vez que os primeiros relaxam diretamente o músculo liso, enquanto os últimos apenas controlam uma resposta colinérgica excessiva. O efeito espasmolítico de agonistas β pode ser benéfico para pacientes com doenças intestinais, como a síndrome do intestino irritável (DE PONTI et al., 1996).

Para uma substância exercer um efeito espasmolítico, ela deve reduzir, majoritariamente, a $[Ca^{2+}]_c$. Esse íon é um sinal intracelular onipresente responsável pelo controle de uma variedade de processos celulares nos neurônios, músculos e muitas células não-excitáveis e tem como função mais importante a sinalização celular quando do aumento de sua concentração citosólica (BERRIDGE; DUPONT, 1995; BERRIDGE, 1997; BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998, BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000; BOOTMAN; LIPP; BERRIDGE, 2001; SCHUSTER; MARHL; HÖFER, 2002). O Ca^{2+} , um regulador celular universal (CAMPBELL, 1983), é um sinal primário responsável pela ativação da contração do músculo liso (NEERING; MORGAN, 1980; MORGAN; MORGAN, 1982). Além de ser responsável pela contração muscular, o Ca^{2+} está envolvido em outros processos fisiológicos tais como fertilização, proliferação, aprendizagem, memória, apoptose, necrose e secreção (BERRIDGE et al., 2000).

Apesar da resposta inicial a um agonista em muitas células musculares depender da liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares (BERRIDGE; IRVINE; PUTNEY, 1984; BERRIDGE; IRVINE, 1989), geralmente precedida por uma diminuição rápida do conteúdo de PIP_2 na membrana plasmática e por aumento da produção de IP_3 (ABDEL-LATIF; AKTAR; HAWTORNE, 1977; BERRIDGE; IRVINE, 1989), no músculo longitudinal de intestino o mecanismo é diferente. Em estudos realizados com este tecido, que é frequentemente utilizado como modelo de músculo liso visceral, foi demonstrado que a quantidade de IP_3 , gerado em resposta à despolarização e ao CCh, é relativamente pequena quando comparada ao músculo liso vascular (BEST;

BOLTON, 1986; SALMON; BOLTON, 1988) e que a contração induzida por vários agonistas é dependente do influxo de Ca^{2+} (BEST; BROOKS; BOLTON, 1985; GRIDER; MAKHLOUF, 1988).

O influxo de Ca^{2+} está envolvido tanto no componente fásico como tônico da contração do músculo liso do íleo de cobaia. Honda, Takano e Kamiya (1996) demonstraram que a remoção do Ca^{2+} extracelular inibe a resposta contrátil induzida por CCh. Além disso, a remoção deste íon também bloqueia a contração induzida por agentes despolarizantes, indicando que as fontes de Ca^{2+} intracelular não contribuem de forma significativa para o nível de tensão atingido tanto por agonistas como por agentes despolarizantes (NOUAILHETAS et al., 1985). No entanto, a influência do Ca^{2+} extracelular é relativamente maior no componente tônico da contração em comparação com o fásico (TRIGGLE; SWAMY; TRIGGLE, 1979). Além disso, os mecanismos envolvidos na manutenção da contração tônica diferem daqueles responsáveis pela contração fásica (ABDEL-LATIF, 1989, KOBAYASHI et al., 1989).

Dessa forma, decidiu-se avaliar o efeito da caulerpina sobre o componente tônico da contração induzida por KCl (acoplamento eletromecânico) (BOLTON, 1981) em íleo de cobaia e comparar com seu efeito sobre a contração tônica induzida por CCh (acoplamento fármaco-mecânico).

Gutierrez et al. (2005) demonstraram que uma série de derivados *N*^b-benzoil-triptamina apresentou efeito relaxante em íleo de cobaia frente à diferentes agentes contráteis (KCl, acetilcolina e histamina), e que o grupamento farmacofórico responsável por este efeito relaxante é o núcleo indol. De maneira similar, pode-se sugerir que a presença desse grupamento na caulerpina possa, de alguma forma, contribuir para o seu efeito espasmolítico em íleo de cobaia.

Diante do exposto acima, caso a caulerpina relaxasse o íleo pré-contraído com esses agentes contráteis (KCl e CCh), seria um indicativo que ela estaria bloqueando o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v . De fato, a caulerpina relaxou de maneira dependente de concentração o íleo pré-contraído tanto por KCl (Gráfico 5) como por CCh (Gráfico 3) o que reforça a hipótese do bloqueio dos Ca_v , pois independente da contração ter

sido gerada por um mecanismo eletromecânico ou fármaco-mecânico, a manutenção do componente tônico envolve a ativação de Ca_v (BOLTON, 1981; BOLTON, 2002; BOLTON, 2006; REMBOLD, 1996).

Assim, com o objetivo de confirmar essa hipótese, avaliou-se o efeito da caulerpina frente às contrações cumulativas induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} . A despolarização causada pela alta $[K^+]_e$ induz a abertura dos Ca_v e a contração é induzida, quase que exclusivamente, pelo Ca^{2+} oriundo do meio extracelular (REMBOLD, 1996). As curvas cumulativas ao $CaCl_2$ foram desviadas para direita, de forma não-paralela e com redução do E_{max} , confirmando, assim, a hipótese que a caulerpina estaria interferindo no influxo de Ca^{2+} através do Ca_v para exercer seu efeito espasmolítico (Gráfico 6). No entanto, o fato do E_{max} da caulerpina ter sido em torno de 50% em relação ao controle sugere que esse não é o único mecanismo envolvido no seu efeito espasmolítico.

O bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v pode ocorrer de forma indireta através de fosforilações, e conseqüente inativação do canal, ou ainda por hiperpolarização. A estimulação de receptores adrenérgicos β ativa PKA, via aumento de AMPc. Essa cinase, por sua vez, atua sobre vários alvos dentre eles os Ca_v , inibindo-os (MURTHY, 2006). Dessa forma, é possível sugerir que o bloqueio do influxo de Ca^{2+} induzido pela caulerpina, ocorra devido a sua ação sobre receptores adrenérgicos β .

Os Ca_v estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). O influxo de cálcio no músculo liso visceral é controlada pelo potencial de membrana, uma vez que este determina a abertura de Ca_v (SHMIGOL; EISNER; WRAY, 1998; WRAY et al., 2001). Esses canais contribuem majoritariamente para o aumento da $[Ca^{2+}]_c$ (JIM et al., 1981).

Existem em três diferentes famílias de Ca_v : Ca_v1 (tipo L), Ca_v2 (tipo P/N, R e Q) e Ca_v3 (tipo T) (CATTERALL et al., 2005). Os Ca_v1 são ativados por alta voltagem e sensíveis à di-hidropiridinas (REUTER, 1983). Em contraste, os Ca_v2 são insensíveis a essa classe de substâncias, mas sua ativação também requer uma alta despolarização.

Ao passo que os Ca_v3 são ativados por pequenas alterações no potencial de membrana (CATTERALL et al., 2005).

No músculo liso intestinal, há um predomínio da expressão de Ca_v1 , relatados como $Ca_v1.2$ (BOLTON, 1979; CATTERALL et al., 2005). Esses canais são formados por complexos multiméricos constituídos de uma subunidade formadora do poro (a subunidade α_1) e quatro subunidades associadas (α_2 , β , δ e γ) (CATTERALL et al., 2005). A maior parte das funções inerentes aos Ca_v , incluindo a sensibilidade à voltagem, permeabilidade ao Ca^{2+} e sensibilidade aos bloqueadores do canal, é atribuída a subunidade α_1 (JURKAT-ROTT; LEHMANN-HORN, 2004). Esta subunidade é formada por quatro domínios, que são compostos por 6 segmentos transmembranares (S1-S6). Em cada domínio, o segmento S4 é o sensor de voltagem que, em função das alterações do potencial de membrana, altera sua conformação e abre o poro do canal (CATTERALL et al., 2005). Um outro tipo de canal Ca_v envolvido com funções fisiológicas da contração do músculo liso é o $Ca_v3.2$ ou Ca_v-T (SARSERO et al., 1998; CATTERRALL et al., 2005).

O músculo liso intestinal apresenta duas camadas musculares, a longitudinal e a circular, e apesar do aumento da $[Ca^{2+}]_c$ está envolvido no mecanismo contrátil de ambas as camadas, as fontes de Ca^{2+} que levam a esse aumento diferem. A contração da camada longitudinal depende obrigatoriamente do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v , uma vez que essa contração é inibida por bloqueadores de canais de cálcio ou retirada de Ca^{2+} do meio extracelular. No entanto, o bloqueio do influxo Ca^{2+} ou ausência deste íon meio extracelular não afeta a contração da camada circular, o que indica que esta depende da mobilização do Ca^{2+} dos estoques intracelulares para iniciar a contração (GRIDER; MAKHLOUF, 1988; MURTHY; GRIDER; MAKHLOUF, 1991).

A mobilização do Ca^{2+} na camada circular do íleo isolado de cobaia é dependente da formação de IP_3 , uma vez que a inibição da formação deste segundo mensageiro por U-73122 (inibidor da PLC) suprime a mobilização do Ca^{2+} e a contração muscular (MURTHY; KUEMMERLE; MAKHLOUF, 1995). Além disso, vale destacar que a liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} na camada circular é dependente de IP_3 , pois a

liberação de Ca^{2+} em células desse tecido expostas a diferentes concentrações de Ca^{2+} só ocorre na presença de concentrações acima de $1 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} . No entanto, na presença de pequenas concentrações de IP_3 , a liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} ocorre em concentrações fisiológicas de Ca^{2+} (KUEMMERLE; MURTHY; MAKHLOUF, 1994).

Uma vez que a montagem do íleo inteiro favorece a verificação da contração da camada longitudinal do íleo de cobaia, e que esta obrigatoriamente utiliza os Ca_v tanto para as contrações fásicas, como para as tônicas, decidiu-se utilizar um protocolo apenas com a camada circular do íleo de cobaia como uma contraprova para verificar se a caulerpina estaria atuando por bloqueio do influxo de Ca^{2+} , sem interferir na liberação do Ca^{2+} . Caso este alcaloide atuasse apenas modulando negativamente o influxo de Ca^{2+} , não haveria inibição das contrações fásicas da camada circular induzidas por qualquer agente contrátil que utilizasse a via do IP_3 , já que a contração dessa camada é induzida principalmente através da liberação do Ca^{2+} dos estoques, via IP_3 .

Para investigar essa hipótese, avaliou-se se a caulerpina inibiria as contrações fásicas induzidas por CCh na camada circular do íleo. Observou-se que a caulerpina não inibiu essas contrações (Gráfico 7), confirmando, assim, a hipótese que este alcaloide atua por bloqueio de influxo de Ca^{2+} , provavelmente, sem interferir na mobilização do Ca^{2+} dos estoques intracelulares.

O aumento da atividade dos canais de K^+ está associado com relaxamento do músculo liso, uma vez que a abertura dos mesmos causa hiperpolarização/repolarização da membrana e, conseqüentemente, inibição indireta dos Ca_v e do influxo de Ca^{2+} (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). Além disso, a condutância ao K^+ está associada a diferentes processos celulares, incluindo manutenção do potencial de membrana, secreção de hormônios e neurotransmissores, dentre outros (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007).

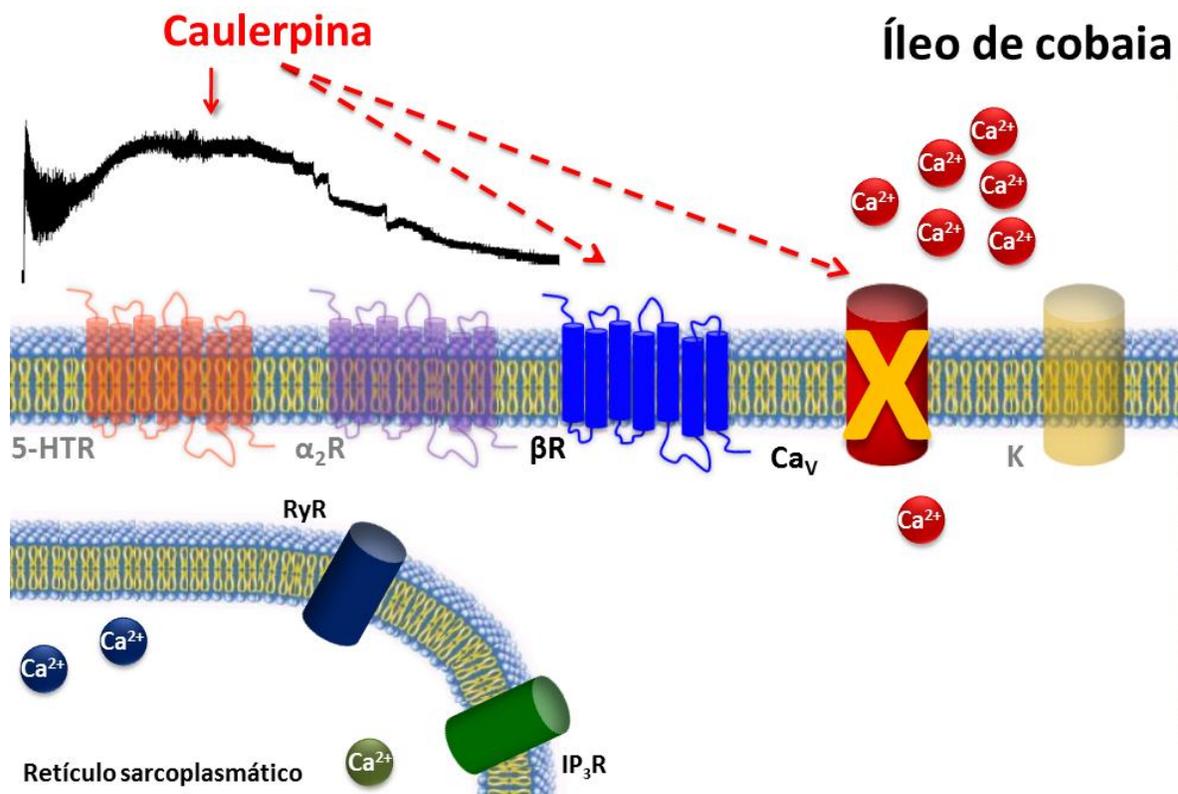
A diversidade de canais de K^+ presente no músculo liso intestinal reflete a grande importância do íon K^+ no regulamento do processo de contração-relaxamento. Dentre

os subtipos de canais expressos em íleo de cobaia encontram-se os canais de K^+ dependentes de voltagem (K_V), canais de K^+ retificadores de entrada (K_{ir}), canais de K^+ sensíveis à ATP (K_{ATP}) e canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} (K_{Ca}). Esta última classe, é dividida em canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} de pequena condutância (SK_{Ca}), canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} de condutância intermediária (IK_{Ca}) e canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} de grande condutância (BK_{Ca}) (VOGALIS, 2000).

Baseado no fato de que os Ca_V podem ser modulados negativamente de forma indireta pela abertura dos canais de K^+ (THORNELOE; NELSON, 2005), decidiu-se investigar se a caulerpina estaria ativando esses canais e, dessa forma, bloqueando indiretamente os Ca_V . Para tanto, o CsCl foi utilizado como ferramenta farmacológica para bloquear os canais de K^+ de forma inespecífica (CECCHI et al., 1987). Se essa hipótese fosse verdadeira, a curva de relaxamento da caulerpina na presença de CsCl seria desviada para direita de forma significativa. No entanto, isso não foi observado. A potência relaxante da caulerpina na presença de CsCl não diferiu quando na ausência deste (Gráfico 8), indicando que a caulerpina não estaria ativando os canais de K^+ para promover o bloqueio indireto dos Ca_V .

Os resultados obtidos neste trabalho, evidenciam, pela primeira vez, que caulerpina possui um efeito espasmolítico não seletivo, e que esse efeito não envolve ativação de canais de K^+ e ativação de receptores α_2 , mas sim ativação dos receptores adrenérgicos β e inibição indireta do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V (Figura 7). Esses resultados trazem uma grande contribuição para o estudo farmacológico de organismos marinhos, em especial, para as algas do litoral nordestino, além de mostrar uma aplicabilidade deste alcaloide como candidato a protótipo para desenvolvimento de moléculas que apresentem uma maior potência espasmolítica e venha a ser utilizadas para tratar doenças gastrintestinais, uma vez que na terapêutica destas ainda não se tem compostos que atuem sobre a via β -adrenérgica para exercer tal efeito terapêutico.

Figura 7 – Esquema dos mecanismos de ação espasmolítica da caulerpina em íleo de cobaia.



Fonte: Autor, 2013.

Nota: 5-HTR: receptor serotoninérgico; α_2R : receptor adrenérgico α_2 ; βR : receptor adrenérgico β ; Ca_v : canais de cálcio dependentes de voltagem; K: canais de potássio; RyR: receptor de rianodina; IP₃: receptor de IP₃.

6 CONCLUSÕES

No estudo da investigação do efeito espasmolítico da caulerpina, alcaloide bisindólico isolado da fase acetato de etila das algas marinhas *Caulerpa mexicana* e *C. sertularioides*, em íleo isolado de cobaia e dos possíveis mecanismos envolvidos neste efeito, pode-se concluir que:

- A caulerpina apresenta efeito espasmolítico não seletivo em íleo de cobaia em relação aos agentes contráteis avaliados;
- O efeito espasmolítico exercido pela caulerpina não envolve antagonismo competitivo dos receptores serotoninérgicos;
- Os receptores adrenérgicos α_2 não estão envolvidos no efeito espasmolítico da caulerpina;
- A caulerpina, em nível funcional, atua sobre os adrenérgicos β para exercer seu efeito espasmolítico;
- A caulerpina inibe o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v para exercer seu efeito espasmolítico;
- Não há envolvimento de canais de potássio na ação espasmolítica da caulerpina.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-LATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphospholinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Science**, v. 45, p. 757-786, 1989.
- ABDEL-LATIF, A. A.; AKTAR, R. A.; HAWTORNE, J. N. Acetylcholine increases the breakdown of triphosphoinositide of rabbit iris muscle prelabeled with [³²P]phosphate. **Biochemical Journal**, v. 162, p. 61-73, 1977.
- AGUILAR-SANTOS, G. Caulerpin, a new red pigment from green algae of the genus *Caulerpa*. **Journal of Chemistry Society**, v. 6, p. 1842-1843, 1970.
- AGUILAR-SANTOS, G.; DOTY, M. S. Chemical studies on three species of the marine algal genus *Caulerpa*. In; FREUDENTHAL, H.D. (Ed.). **Drugs from the Sea**. Washington: Marine Technology Society. 1968. p. 173-176.
- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H. Screening of Brazilian marine-algae for hemagglutinins. **Botanica Marina**, v. 34, p. 211-214, 1991.
- AL-KATIB, A. M. et al. Bryostatin 1 down-regulates mdr1 and potentiates vincristine cytotoxicity in diffuse large cell lymphoma xenografts. **Clinical Cancer Research**, v. 4, p. 1305-1314, 1998.
- ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 2nd edition (2007 Revision). **British Journal of Pharmacology**, v. 150 (Suppl. 1), p. S1-S168, 2007.
- AMADE, P.; LEMÉE, R. Chemical defence of the Mediterranean alga *Caulerpa taxifolia*: variations in caulerpenyne production. **Aquatic Toxicology**, v. 43, p. 287-300, 1998.
- ANJANEYULU, A. S. R.; PRAKASH, C. V. S.; MALLAVADHANI, U. V. Sterols and terpenes of the marine green algal species *Caulerpa racemosa* and *Codium decorticatum*. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 68, p. 480, 1991.
- ARA, J. et al. Hypolipidaemic activity of seaweed from Karachi coast. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 479-483, 2002.
- ARTAN, M. et al.. Anti-HIV-1 activity of phloroglucinol derivative, 6, 6'-bieckol, from *Ecklonia cava*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 7921-7926, 2008.
- ARUNLAKSHANA, O.; SCHILD, H. O. Some quantitative uses of drug antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 14, p. 48-58, 1959.
- AYYAD, S. E. N.; BADRIA, F. A. Caulerpine: An antitumor indole alkaloid from *Caulerpa racemosa*. **Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 217-219, 1984.

- BARATA, D. **Taxonomia e Filogenia do Gênero *Caulerpa* J.V. Lamour. (Bryopsidales, Chlorophyta) no Brasil.** 2008. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) -- Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, SP, 2008.
- BARBIER, P. et al. Caulerpenyne from *Caulerpa taxifolia* has an antiproliferative activity on tumor cell line SK-N-SH and modifies the microtubule network. **Life Sciences**, v. 70, p. 415-429, 2001.
- BAUER, V. Distribution and types of adrenoceptors in the guinea-pig ileum: the action of α - and β -adrenoceptor blocking agents. **British Journal of Pharmacology**, v. 76, p. 569–578, 1982.
- BENEVIDES, N. M. B. et al. Purification and partial characterization of the lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh. **Botania Marina**, v. 44, p. 17-22, 2001.
- BENHAM, C. D.; TSIEN, R. W. A novel receptor-operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle. **Nature**, v. 328, p. 275-278, 1987.
- BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. Xxxii. The nucleosides of sponges. I. **The Journal of Organic Chemistry**, v 16, p. 981-987, 1951.
- BERRIDGE, M. J ; DUPONT, G. Spatial and temporal signalling by calcium. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 6, p. 267-274, 1995.
- BERRIDGE, M. J. Elementary and global aspects of calcium signalling. **Journal of Physiology**, v. 499, p. 291-306, 1997.
- BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP, P. Calcium – a life and death signal. **Nature**, v. 395, p. 645-648, 1998.
- BERRIDGE, M. J.; IRVINE, R. F. Inositol phosphates and cell signalling. **Nature**, v. 341, p. 197-205, 1989.
- BERRIDGE, M. J.; IRVINE, R. F.; PUTNEY, J. W. Jr. The second messenger linking receptor activation to internal Ca^{2+} release in liver. **Nature**, v. 309, p. 63-66, 1984.
- BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signaling. **Nature Reviews**, v. 1, p. 11-21, 2000.
- BEST, L.; BOLTON, T. B. Depolarization of guinea-pig visceral smooth muscle causes hydrolysis of inositol phospholipids. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 53, p. 78-82, 1986.

BEST, L.; BROOKS, K. J.; BOLTON, T. B. Relationship between stimulated inositol lipid hydrolysis and contractility in guinea-pig visceral longitudinal smooth muscle. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, p. 2297-2301, 1985.

BHAKUNI, D. S.; RAWAT, D. S. Bioactivity of marine organisms. In: BHAKUNI, D.S.; RAWAT, D. S. **Bioactive marine natural products**. 1st ed. New York: Springer, 2005. cap. 5.

BIFULCO, G. et al. (T)-Gelliusines A and B, two diastereomeric brominated tris-indole alkaloids from a deep water New Caledonian marine sponge (*Gellius* or *Orina* sp.). **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 1294-1299, 1994.

BIFULCO, G. et al. Further brominated bis- and tris-indole alkaloids from the deep-water New Caledonian marine sponge *Orina* sp. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 1254-1260, 1995.

BITENCOURT, M. A. O. et al. Aqueous and methanolic extracts of *Caulerpa mexicana* suppress cell migration and ear edema induced by inflammatory agents. **Marine Drugs**, v. 9, p. 1332-1345, 2011.

BLUMENTHAL, D. K.; GARRISON, J. C. Pharmacodynamics: molecular mechanisms of drug action. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (Ed.) **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12th ed. San Diego, CA: The McGraw-Hill Companies, Inc. 2011.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 29, p.144-222, 2012.

BOBZIN, S. C. et al. Aromatic alkaloids from the marine sponge *Chelonaplysilla* sp. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 4403-4407, 1991.

BOLD, H. C.; WYNNE, M. J. **Introduction to the algae structure and reproduction**, 2nd ed., Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc., 1985, p 1-33.

BOLTON, T. B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth-muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979.

BOLTON, T. B. Calcium events in smooth muscles and their interstitial cells; physiological roles of sparks. **The Journal of Physiology**, v. 570, p. 5-11, 2006.

BOLTON, T. B. et al. Evidence that histamine and carbachol may open the same ion channels in longitudinal smooth muscle of guinea-pig ileum. **The Journal of Physiology**, v. 320, p. 363-379, 1981.

BOLTON, T. B. et al. Calcium release events in excitation-contraction coupling in smooth muscle. **Novartis Foundation Symposium**, v. 246, p. 154-68, 2002.

BOOTMAN, H.; LIPP, P.; BERRIDGE, M. J. The organization and functions of local Ca^{2+} signals. ***Journal of Cell Science***, v. 114, p. 2213-2222, 2001.

BROWN, J. H.; TAYLOR, P. Muscarinic receptor agonists and antagonists. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Org.). **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11. ed. New York: Mc Graw Hill, 2006. cap. 7, p. 183-200.

BÜLBRING, E.; TOMITA, T. Catecholamine action on smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 39, p. 49-96, 1987.

CAMPBELL A. K. **Intracellular Calcium: Its Universal Role as Regulator**. Chichester, UK: Wiley, 1983.

CANDELL, L. M. et al. Differential coupling of subtypes of the muscarinic receptor to adenylate cyclase and phosphoinositide hydrolysis in the longitudinal muscle of the rat ileum. **Molecular Pharmacology**, v. 38, p. 689-697, 1990.

CAPON, R. J.; GHISALBERTI, E. L.; JEFFERIES, P. R. Metabolites of the green algae, *Caulerpa* species. **Phytochemistry**, v. 22, p. 1465-1467, 1983.

CARDOZO, K. H. M. et al. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 60-78, 2007.

CATTERALL, W. A. et al. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. **Pharmacology Reviews**, v. 57, p. 411-425, 2005.

CAVAS, L. et al. Antiproliferative and newly attributed apoptotic activities from an invasive marine alga: *C. racemosa* var. *cylindracea*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 339, p. 111-119, 2006.

CAVAS, L.; YURDAKOC, K. An investigation on the antioxidant status of the invasive alga *C. racemosa* var. *cylindracea* (Sonder) Verlaque, Huisman, et Boudouresque (Caulerpales, Chlorophyta). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 325, p. 189-200, 2005.

CECCHI, X. et al. Mechanisms of Cs^+ blockade in a Ca^{2+} -activated K^+ channel from smooth muscle. **Biophysical Journal**, v. 52, p. 707-716, 1987.

CENGIZ, S. et al. The sesquiterpene caulerpenyne from *Caulerpa* spp. is a lipoxygenase inhibitor. **Marine Biotechnology**, p. 1-6, 2010.

CHAO, C. H. et al. Cytotoxic and anti-inflammatory cembranoids from the soft coral *Lobophytum crassum*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1819-1824, 2008.

CHENG J. T.; SHINOZUKA, K. Prostaglandin E₂ induced the cyclic AMP-dependent release of acetylcholine in circular muscles of the isolated guinea pig ileum. **Neuroscience letters**, v. 83, p. 293-297, 1987.

CHRISTOPHERSEN, C. Secondary metabolites from marine bryozoans. A review. **Acta Chemica Scandinavica. Series B: Organic Chemistry and Biochemistry**, v. 39, p. 517-529, 1985.

CHUNG, S. et al. Inhibition by clonidine of the carbachol-induced tension development and nonselective cationic current in guinea pig ileal myocytes. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.87, p.125-133, 2001.

COMMEIRAS, L.; THIBONNET, J.; PARRAIN, J. L. First total synthesis of (-)-caulerpenynol. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 425-427, 2009.

CORREIA, A. C. C. **Participação dos canais de potássio na ação espasmolítica de *Solanum agrarium* Sendtner em íleo de cobaia e útero de rata**. 2009. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Farmacologia) -- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

COURTOIS, A. et al. Floridoside extracted from the red alga *Mastocarpus stellatus* is a potent activator of the classical complement pathway. **Marine Drugs**, v. 6, p. 407-417, 2008.

DANIEL, E. E.; KWAN, C.Y.; JANSSEN, L. Pharmacological techniques for the in vitro study of intestinal smooth muscles. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 45, p. 141-158, 2001.

D'AURIA, M. V. et al. Isolation and structural elucidation of callipeltins J-M: antifungal peptides from the marine sponge *Latrunculia* sp. **Tetrahedron**, v. 63, p. 131-140, 2007.

DE PONTI, F. et al. Adrenergic mechanisms in the control of gastrointestinal motility: from basic science to clinical applications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 69, p. 59-78, 1996

DINIZ, M. F. F. M; SILVA, B. A.; MUKHERJEE, R. Spasmolytic actions of the new indole alkaloid trinervine from *Strychnos trinervis* root. **Phytomedicine**, v. 1, p. 205-207, 1994.

DOWLATI, A. et al. Phase I and correlative study of combination bryostatin 1 and vincristine in relapsed B-cell malignancies. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 5929-5935, 2003.

EGLIN, R. M.; HEGDE, S. S.; WATSON, N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. **Pharmacological Reviews**, v. 48, p. 531-565, 1996.

EGLLEN, R. M. et al. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 15, p. 114-119, 1994.

EHLERT, F. J. Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal, airway and urinary bladder smooth muscle. **Life Sciences**, v. 74, p. 355-366, 2003.

EHLERT, F. J. et al. Acetylcholine-induced desensitization of muscarinic contractile response in guinea pig ileum is inhibited by pertussis toxin treatment. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.299, p. 1126-1132, 2001.

EHLERT, F. J.; THOMAS, E. A. Functional role of M2 muscarinic receptors in the guinea pig ileum. **Life Sciences**. 56, 965-971, 1995.

ENGEL, G. et al. Identification of 5HT2-receptors on longitudinal muscle of the guinea pig ileum. **Journal of Receptor Research**, v. 4, p. 113-126, 1984.

EXTON J. H. Phospholipase D-structure, regulation and function. **Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology**, v. 144, p. 1-94, 2002.

FAGBEMI, S. O.; SALAKO, L. A. The effects of prazosin, phentolamine and phenoxybenzamine on inhibitory alpha-adrenoceptors in the guinea-pig isolated ileum. **British Journal of Pharmacology**, v. 76, p. 235-243, 1982.

FARTHING, M. J. Diarrhoea: a significant worldwide problem. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 65-69, 2000.

FISCHEL, J. L. et al. Cell growth inhibitory effects of caulerpenyne, a sesquiterpenoid from the marine algae *Caulerpa taxifolia*. **Anticancer Research**, v. 15, p. 2155-2160, 1995.

FOX, A.; MORTON, I. K. An examination of the 5-HT3 receptor mediating contraction and evoked [3H]-acetylcholine release in the guinea-pig ileum. **British Journal of Pharmacology**, v. 101, p. 553-558, 1990.

FRANCIS, S. H.; CORBIN, J. D. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 36, p. 275-328, 1999.

FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K.. Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 32-39, 2001.

GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, p. 1-25, 2010.

GARSON, J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 6, p. 143-170, 1989.

- GHOSH, P. et al. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemos*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3151-3157, 2004.
- GLASER, K. B.; MAYER, A. M. A renaissance in marine pharmacology: from preclinical curiosity to clinical reality. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 440-448, 2009.
- GRIDER, J. R.; MAKHLOUF, G. M. Contraction mediated by Ca^{++} release in circular and Ca^{++} influx in longitudinal intestinal muscle cells. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 244, p. 432-437, 1988.
- GOVENKAR, M. B.; WAHIDULLA, S. Constituents of *Chondria armata*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 979-981, 2000.
- GUL, W.; HAMANN, M. T. Indole alkaloid marine natural products: an established source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic, neurological and other diseases. **Life Science**, v. 78, p. 442-453, 2005.
- GUTIERREZ, S. J. et al. N^b -benzoyltryptamine derivatives with relaxant activity in guinea-pig ileum. **Il Farmaco**, v. 60, p. 475-477, 2005.
- GÜVEN, K. C.; PERCOT, A.; SEZIK, E. Alkaloids in marine algae. **Marine Drugs**, v. 8, p. 269-284, 2010.
- HAJHASHEMI, V.; SADRAEI, H.; GHANNADI, A. R.; MOHSENI, M. Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 187-192, 2000.
- HERBERT, M. K. et al. Clonidine and dexmedetomidine potently inhibit peristalsis in the guinea pig ileum in vitro. **Anesthesiology**, v. 97, p. 1491-1499, 2002.
- HILL, S. J. et al. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 49, p. 253-278, 1997.
- HONDA, K.; TAKANO, Y.; KAMIYA, H. Involvement of protein kinase C in muscarinic agonist-induced contractions of guinea pig ileal longitudinal muscle. **General Pharmacology**, v. 27, p. 957-961, 1996.
- HORIE, S. et al. Antibacterial quinone metabolite from the brown alga, *Sargassum sagamianum*. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 81, p. 1125-1130, 2008.
- HOU, Y et al. Bioactivity-based liquid chromatography-coupled electrospray ionization tandem ion trap/time of flight mass spectrometry for β_2 AR agonist identification in alkaloidal extract of *Alstonia scholaris*. **Journal of Chromatography A**, v. 1227, p. 203-209, 2012.

- HU, G. P. et al. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. **Marine Drugs**, v. 9, p. 514-525, 2011.
- HU, J. F. et al. New antiinfective and human 5-HT₂ receptor binding natural and semisynthetic compounds from the Jamaican sponge *Smenospongia aurea*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 476-480, 2002.
- JIM, K. et al. Stereoselective and non-selective effects of D600 (Methoxyverapamil) in smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 76, p.67-72, 1981.
- JUNG, V. et al. Comparison of the wound-activated transformation of caulerpenyne by invasive and noninvasive *Caulerpa* species of the Mediterranean. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, p. 2091-2105, 2002.
- JUNG, W. K. et al. A novel anticoagulant protein with high affinity to blood coagulation factor Va from *Tegillarca granosa*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 832-838, 2007.
- JURKAT-ROTT, K.; LEHMANN-HORN, F. The impact of splice isoforms on voltage-gated calcium channel α 1 subunits. **The Journal of Physiology**, v. 554, p. 609-619, 2004.
- KANDHASAMY, M.; ARUNACHALAM, K. D. Evaluation of in vitro antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1958-1961, 2008.
- KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In BÁRÁNY, M. **Biochemistry of Smooth Muscle Contraction**. San Diego, Academic Press, 203 -219, 1996.
- KOBAYASHI, J. et al. Eudistomidin-A, a novel calmodulin antagonist from the Okinawan tunicate *Eudistoma glaucus*. **Tetrahedron Letters**, v. 27, p. 1191-1194, 1986.
- KOBAYASHI, S. et al. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and α -adrenergic Ca^{2+} -release in smooth muscle: physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 17997-18004, 1989.
- KOHMOTO, S. et al. Dragmacidin, a new cytotoxic bis (indole) alkaloid from a deep water marine sponge, *Dragmacidon* sp. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 53, p. 3116-3118, 1988.
- KOROLKOVAS, A.- **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, Edição 19/2012/2013, 2012.

KUEMMERLE, J. F.; MURTHY, K. S.; MAKHLOUF, G. M. Agonist-activated, ryanodine-sensitive, IP₃-insensitive Ca²⁺ release channels in longitudinal muscle of intestine. **The American Journal of Physiology**, v. 266, p. C1421-1431, 1994..

LIDGREN, G.; BOHLIN, L. Studies of swedish marine organisms VII. A novel biologically active indole alkaloid from the sponge *Geodia baretii*. **Tetrahedron Letters**, v. 27, p. 3283-3284, 1986.

LIU, Y. et al. The *Caulerpa* pigment caulerpin inhibits hif-1 activation and mitochondrial respiration. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 2104-2109, 2009.

LU, Y. et al. Crystal structure determination of caulerpin. **Jiegou Huaxue**, v. 13, p. 472-476, 1994.

LUJÁN, M. et al. Pertussis toxin blocks the action of morphine, norepinephrine and clonidine on isolated guinea-pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v.100, p. 377-380, 1984.

MACEDO, N. R. P. V. et al. Caulerpin as a potential antiviral drug against herpes simplex virus type 1. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 861-867, 2012.

MAITI, B. C.; THOMSON, R. H.; MAHENDRAN, M. The structure of caulerpin, a pigment from *Caulerpa* algae. **Journal of Chemistry Research**, v. 4, p. 126-127, 1978.

MAKHLOUF, G. M.; MURTHY, K. S. Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. **Cellular signaling**, v. 9, p. 269-276, 1997.

MAO, S. C.; GUO, Y. W.; SHEN, X. Two novel aromatic valerenane-type sesquiterpenes from the Chinese green alga *Caulerpa taxifolia*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 2947-2950, 2006.

MATTA, C. B. B. et al. Avaliação do perfil antinociceptivo de extratos da espécie de alga bentônica *Caulerpa kempfii* (CAULERPACEAE). REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 5, 2010, Aracajú.

MATTA, C. B. B. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activity from algae of the genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**, v. 9, p. 307-318, 2011.

MAYER, A. M. S. et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 255-265, 2010.

MAYER, A. M. S. et al. Phospholipase A₂ inhibitors from marine algae. **Hydrobiologia**, v. 260, p. 521-529, 1993.

MEDEIROS, C. L. C.; THOMAS, G.; MUKHERJEE, R. The source of Ca^{2+} for the spasmolytic actions of longicaudatine, a bisindole alkaloid isolated from *Strychnos trinervis* (Veil.) Mart. (Loganiaceae). **Phytotherapy Research**, v. 5, p. 24-28, 1991.

MEÑEZ, G.; CALUMPONG, H. P. **The genus *Caulerpa*, from Central Visayas, Philippines**. City of Washington: Smithsonian Institution Press, 1982.

MOLINSKI, T. F. et al. Drug development from marine natural products. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 81, p. 69-85, 2009.

MORGAN, J. P.; MORGAN, K. G. Vascular smooth muscle: the first recorded Ca^{2+} transients. **Pflügers. Arch.**, v. 395, p. 75-77, 1982.

MURTHY, K. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annual Review of Physiology**, v. 68, p. 345-374, 2006.

MURTHY, K. S.; GRIDER, J. R.; MAKHLOUF, G. M. InsP₃-dependent Ca^{2+} mobilization in circular but not longitudinal muscle cells of intestine. **The American Journal of Physiology**, v. 261, p. G937-944, 1991.

MURTHY, K. S.; KUEMMERLE, J. F.; MAKHLOUF, G. M. Agonist-mediated activation of PLA₂ initiates Ca^{2+} mobilization in intestinal longitudinal smooth muscle. **The American Journal of Physiology**, v. 269, p. G93-102, 1995.

MURTHY, K. S. et al. Inhibition of sustained smooth muscle contraction by PKA and PKG preferentially mediated by phosphorylation of RhoA. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 284, p.1006-1016, 2003.

NEERING, I. R.; MORGAN, K. G. Use of aequorin to study excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscle. **Nature**, v. 288, p. 585-587, 1980.

NEUBIG, R. R. et al. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 597-606, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NIIRO, N.; IKEBE, M. Zipper-interacting protein kinase induces Ca^{2+} -free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 29567-29574, 2001.

NINOMIYA, M.; ONISHI, J.; KUSUMI, T. 12-Lipoxygenase inhibitory activity of Japanese seaweeds and isolation of a Caulerpenyne derivative from the green alga *Caulerpa taxifolia* as an inhibitor. **Fish Sciences**, v. 64, p. 346-347, 1998.

NOUAILHETAS, V. L. A. et al. Calcium and sodium dependence of the biphasic response of the guinea-pig ileum agonists. **European Journal of Pharmacology**, v. 116, p. 41-47, 1985.

NUBER, N. et al. Genetic evidence for the identity of *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh (Caulerpales, Chlorophyta) in the adriatic sea. **European Journal of Phycology**, v. 42, p. 113-120, 2007.

PAN, Z.; MA, J. Retrograde activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**, v. 33, p. 375 -384, 2003.

PELLETIER, S. W. **Chemistry of the alkaloids**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1970.

PERETTO, I.; PETRILLO, P.; IMBIMBO, B. P. Medicinal chemistry and therapeutic potential of muscarinic M3 antagonists. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, p. 867-902, 2009.

PETTIT, G. R. et al. Antineoplastic components of marine animals. **Nature**, v. 227, p. 962-963, 1970.

PINTO, A. M. V. et al. Marine natural seaweed products as potential antiviral drugs against Bovine viral diarrhea virus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 813-817, 2012.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; M. **Biochemistry of smooth contraction**. San Diego, Academic Press, p. 227-239, 1996.

REUTER, H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. **Nature**, v. 301, p. 569-574, 1983.

RINEHART, K. L. et al. Eudistomins C, E, K and L, potent antiviral compounds containing a novel oxathiazepine ring from Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, p. 1524-1526, 1984.

ROCHA, F. D. et al. Potential cytotoxic activity of some Brazilian seaweeds on human melanoma cells. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 170-175, 2007.

RUAN, B. F.; ZHU, H. L. The chemistry and biology of the bryostatins: potential PKC inhibitors in clinical development. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2652-2664. 2012.

RYU, S-D. et al. Anti-diarrheal and spasmolytic activities and acute toxicity study of Soonkijangquebo, a herbal anti-diarrheal formula. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 75-80, 2004.

- SABINA, H. et al. Antileishmanial activity in the crude extract of various seaweed from the coast of Karachi, Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, v. 37, p. 163-168, 2005.
- SALMON, D. M. W.; BOLTON, T. B. Early events in inositol phosphate metabolism in longitudinal smooth muscle from guinea-pig intestine stimulated with carbachol. **Biochemical Journal**, v. 254, p. 553-557, 1988.
- SANDERS, K. M. Regulation of smooth muscle excitation and contraction. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 20, p. 39-53, 2008.
- SANTOSO, J.; YOSHIE-STARK, Y.; SUZUKI, T. Anti-oxidant activity of methanol extracts from Indonesian seaweeds in an oil emulsion model. **Fish Sciences**, v. 70, p. 183-188, 2004.
- SARSERO, D. et al. Human vascular to cardiac tissue selectivity of L- and T-type calcium channel antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, p. 109-119, 1998.
- SAWYER, G. W. et al. Muscarinic M3 receptor inactivation reveals a pertussis toxin-sensitive contractile response in the guinea pig colon. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, p. 464-76, 1999.
- SCHUSTER, S.; MARHL, M.; HÖFER, T. Modelling of simple and complex calcium oscillations. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 1333-1355, 2002.
- SHMIGOL, A.; EISNER, D. A.; WRAY, S. Properties of voltage-activated $[Ca^{2+}]$ transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. **Journal of Physiology (London)**, v. 511, p. 803-811, 1998.
- SILVA, B. A. et al. Bisnordihydrotoxiferine and vellosimine from *Strychnos divaricans* root: Spasmolytic properties of bisnordihydrotoxiferine. **Phytotherapy Research**, v. 7, p. 419-424, 1993.
- SILVA T. M. et al. The monoterpene alkaloid cantleyine from *Strychnos trinervis* root and its spasmolytic properties. **Phytomedicine**, v. 6, p.169-76, 1999.
- SINGH, R. et al. Clinical status of anti-cancer agents derived from marine sources. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 8, p. 603-617, 2008.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 1325-1358, 2003.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **Journal of Physiology**, v. 522, p. 177-185, 2000.

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

SOUZA, E. T. et al. Antinociceptive activities of crude methanolic extract and phases, n-butanolic, chloroformic and ethyl acetate from *Caulerpa racemosa* (Caulerpaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 115-120, 2009a.

SOUZA, E. T. et al. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of caulerpin, a bisindole alkaloid, isolated from seaweeds of the genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**, v. 7, p. 689-704, 2009b.

SU, J. Y. et al. A new bisindole from alga *Caulerpa serrulata*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 1043-1044, 1997.

SUN, Y. -D.; BENISHIN, C. G. K⁺ channel openers relax longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 271, p. 453-459, 1994.

SZE, P. **Introduction to algal characteristics and diversity. A Biology of the Algae**. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Science/Engineering, 1997. 288 p.

TANAKA, Y; HORINOUCI, T; KOIKE, K. New insights into β -adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, p. 503-514, 2005.

ter HAAR, E. et al. Discodermolide, a cytotoxic marine agent that stabilizes microtubules more potently than taxol. **Biochemistry**, v. 35, p. 243-250, 1996.

THOMAS, E. A.; EHLERT, F. J. Pertussis toxin blocks M2 muscarinic receptor-mediated effects on contraction and cyclic AMP in the guinea pig ileum, but not M3-mediated contractions and phosphoinositide hydrolysis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 271, 1042-1050, 1994.

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, p. 215-242, 2005.

TRIGGLE, C. R.; SWAMY, V. C.; TRIGGLE, D. J. Calcium antagonists and contractile responses in rat vas deferens and guinea pig ileal smooth muscle. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, p. 804-818, 1979.

VAIRAPPAN, C. S. Antibacterial activity of major secondary metabolites: found in four species of edible green macroalgae genus *Caulerpa*. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences**, v. 6, p. 197-201, 2004.

VALLS, R. et al. Determination of caulerpenyne, a toxin from the green alga *Caulerpa taxifolia* (Caulerpacae). **Journal of chromatography A**, v. 663, p. 114-118, 1994.

VANDERLEI, E. S. O. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 1113-1118, 2010.

VAN-ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. II. Techniques for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 143, p. 299-330, 1963.

VIDAL, J. P. et al. Caulerpin, caulerpicin, *caulerpa scalpelliformis*: comparative acute toxicity study. **Botanica Marina**, v. 27, p. 533-537, 1984.

VOGALIS, F. Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 20, p. 207-219, 2000.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, p. 201-206, 2003.

WRAY, S. et al. The physiological basis of uterine contractility: a short review. **Experimental Physiology**, v. 86, p. 239-246, 2001

WOOLDRIDGE, A. A. et al. Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of serine 695 in response to cyclic nucleotides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 34495–34504, 2004.

XU, X. H. et al. Chemical constituents of the alga *Caloglossa leprieurii*. **Chemical Journal of Chinese Universities**, v. 19, p. 249-251, 1998.

YAMADA, T. et al. Cell-adhesion inhibitors produced by sea hare-derived *Periconia* sp. III. Absolute stereostructures of peribysins J and macrosphelide M. **The Journal of Antibiotics**, v. 60, p. 370-375, 2007.

YAN, S. et al. Studies on chemical constituents of *Halimeda incrassata*. **Tropic Oceanology**, v. 18, p. 91-94, 1999.

ZALESKI, S. F.; MURRAY, S. T. Taxonomic diversity and geographic distributions of aquarium-traded species of *Caulerpa* (Chlorophyta: Caulerpacae) in southern California, USA. **Marine Ecology Progress Series**, v. 314, p. 97-108, 2006.

ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFAL.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Maceió, 12 de dezembro de 2012.

Processo:39/2012

Título: INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA DE CAULERPINA, ALCALÓIDE BISINDÓLICO ISOLADO DE ALGAS MARINHAS

Responsável: Magna Suzana Alexandre Moreira

Instituição/Setor de execução: Universidade Federal de Alagoas /ICBS

Parecer consubstanciado: Considerando que o projeto já obteve aprovação do Comitê de Ética da UFPB e irá reutilizar os animais o projeto foi considerado aprovado.

Situação: Aprovado



**Robinson Sabino da Silva
Coordenador do CEUA-UFAL**

ANEXO B- Artigo publicado na revista científica *Marine Drugs*

Mar. Drugs **2013**, *11*, 1553-1564; doi:10.3390/md11051553

OPEN ACCESS

Marine Drugs

ISSN 1660-3397

www.mdpi.com/journal/marinedrugs

Article

Spasmolytic Effect of Caulerpine Involves Blockade of Ca²⁺ Influx on Guinea Pig Ileum

Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva ¹, Ana Carolina de Carvalho Correia ²,
José Maria Barbosa-Filho ^{2,3}, Bagnólia Araújo da Silva ^{2,3},
Bárbara Viviana de Oliveira Santos ^{2,3}, Daysianne Pereira de Lira ^{2,3},
Jéssica Celestino Ferreira Sousa ^{2,3}, George Emmanuel C. de Miranda ⁴,
Fabiana de Andrade Cavalcante ^{5,*} and Magna Suzana Alexandre-Moreira ^{1,*}

¹ Laboratory of Pharmacology and Immunity, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Maceió 57020-720, AL, Brazil; E-Mail: luiz0710@gmail.com

² Postgraduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; E-Mail: anacarolinacc@yahoo.com.br (A.C.C.C.); jbarbosa@lft.ufpb.br (J.M.B.-F.); bagnolia@lft.ufpb.br (B.A.S.); barbara@lft.ufpb.br (B.V.O.S.); daysianneplira@yahoo.com.br (D.P.L.); jessicacelestino26@hotmail.com (J.C.F.S.)

³ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil

⁴ Laboratory of Marine Algae, Department of Systematics and Ecology, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; E-Mail: mirandag@dse.ufpb.br

⁵ Department of Physiology and Pathology, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil

* Authors to whom correspondence should be addressed;

E-Mails: fa_cavalcante@hotmail.com (F.A.C.); magnasuzana@pq.cnpq.br (M.S.A.-M.);

Tel.: +55-83-3216-7246 (F.A.C.); +55-82-3214-1683 (M.S.A.-M.);

Fax: +55-83-3216-7502 (F.A.C.); +55-82-3214-1683 (M.S.A.-M.).

Received: 25 February 2013; in revised form: 16 April 2013 / Accepted: 26 April 2013 /

Published: 13 May 2013

Abstract: In this work, we investigated the spasmolytic effect of caulerpine, a bisindole

alkaloid isolated from marine algae of the *Caulerpa* genus, on guinea pig ileum. Our findings indicated that caulerpine inhibited phasic contractions induced by carbachol ($IC_{50} = 7.0 \pm 1.9 \times 10^{-5}$ M), histamine ($IC_{50} = 1.3 \pm 0.3 \times 10^{-4}$ M) and serotonin ($IC_{50} = 8.0 \pm 1.4 \times 10^{-5}$ M) in a non-selective manner. Furthermore, caulerpine concentration-dependently inhibited serotonin-induced cumulative contractions ($pD'_2 = 4.48 \pm .08$), shifting the curves to the right with E_{max} reduction and slope of 2.44 ± 0.21 , suggesting a noncompetitive antagonism pseudo-irreversible. The alkaloid also relaxed the ileum pre-contracted by KCl ($EC_{50} = 9.0 \pm 0.9 \times 10^{-5}$ M) and carbachol ($EC_{50} = 4.6 \pm 0.7 \times 10^{-5}$ M) in a concentration-dependent manner. This effect was probably due to inhibition of Ca^{2+} influx through voltage-gated calcium channels (Ca_v), since caulerpine slightly inhibited the $CaCl_2$ -induced contractions in depolarizing medium without Ca^{2+} , shifting the curves to the right and with E_{max} reduction. According to these results, the spasmolytic effect of caulerpine on guinea pig ileum seems to involve inhibition of Ca^{2+} influx through Ca_v . However, other mechanisms are not discarded.

Keywords: caulerpine; guinea pig ileum; spasmolytic effect; Ca^{2+} channel

1. Introduction

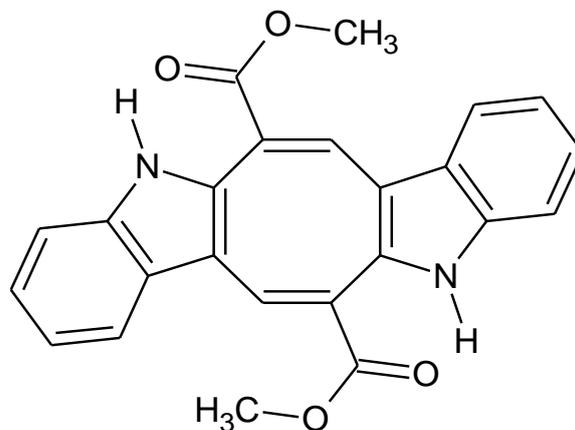
Natural products are a traditional source of drug molecules to treat infectious diseases, pain, and cancer, among others [1,2]. Marine organisms have played a relevant role among the natural products. They make many secondary metabolites with broad chemical diversity and complexity and with great pharmaceutical potential [3–5], such as conotoxins from cone snails [6] and compounds from algae [7] and tunicates [8]. Nowadays, there are four marine natural product-derived drugs approved for marketing: cytarabine and vidarabine, nucleosides with anticancer and antiviral properties, respectively; ziconotide, a peptide with potent analgesic activity; and trabectedin, a tetrahydroisoquinoline alkaloid approved for the treatment of soft tissue sarcoma and ovarian carcinoma [9].

Among the class of secondary metabolites in marine organisms, alkaloids are the second most abundant [10]. Indole alkaloids represent a quarter of all alkaloids [11], which are regarded as promising compounds in new drug discovery since they possess novel and complex frameworks [11,12]. Several activities are related to these compounds, including antiviral [13], cytotoxic [14], anti-inflammatory [15,16], antinociceptive [16], calmodulin antagonist [17], muscle relaxant [18], spasmolytic [19] and others.

5,12-dihydro-cycloocta[1,2-b;5,6-b']diindole-6,13-dicarboxylic acid dimethyl ester, called caulerpine or caulerpin (Figure 1), is a bisindole alkaloid which is isolated mainly from green algae of the genus *Caulerpa* [20,21]. Additionally, its presence was also reported in other green (*i.e.*, *Codium decorticaum* and *Halimeda incrassate*) [22,23] and red (*i.e.*, *Chondria armata*) algae [24]. Since its first isolation in 1968 [20], caulerpine has shown some activities such as antitumor [25], antibacterial [26], inhibitor of human protein tyrosine phosphatase-1B (hPTP1B) [27], inhibitor of hypoxia-inducible factor (HIF) [28], antiviral [29], antinociceptive and anti-inflammatory [16].

Our research group reported some pharmacological activities of marine algae and their secondary metabolites [16,30–32]. Recently, we described the antinociceptive activity of caulerpine [16]. Since, Ca^{2+} is involved in the genesis of the nociceptive process [33] and Ca^{2+} signaling triggers smooth muscle contraction [34], besides the fact that other indole compounds have a spasmolytic effect [35–37], the aim of this work was to investigate the spasmolytic effect of caulerpine on guinea pig ileum.

Figure 1. Structure of caulerpine.

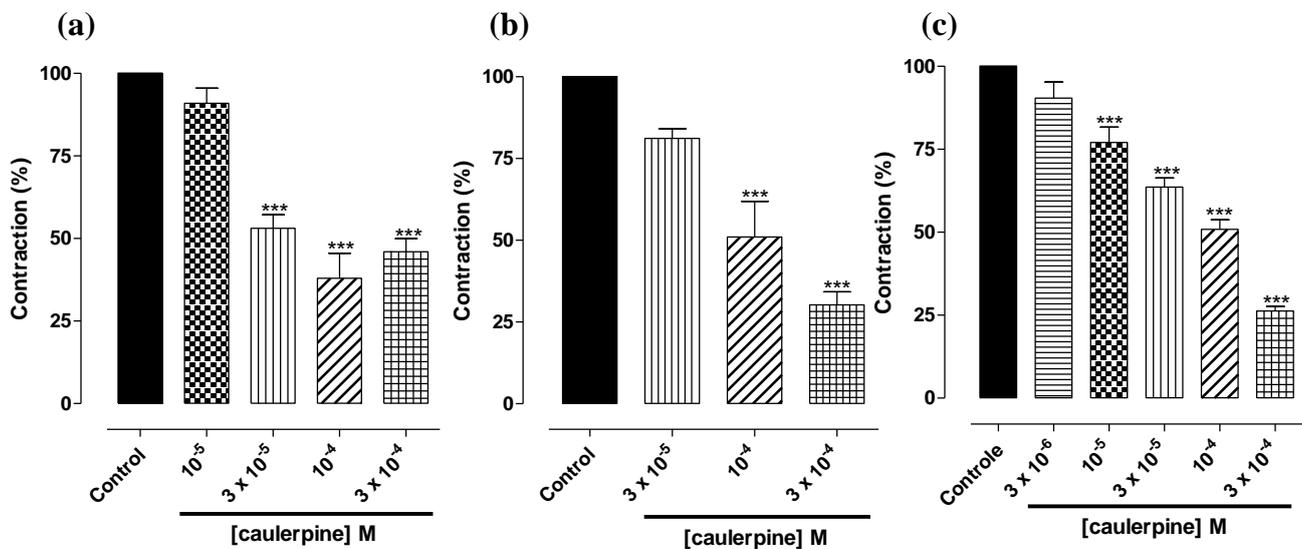


2. Results and Discussion

In this work, the spasmolytic effect of caulerpine was evaluated in ileal smooth muscle of guinea pig. We demonstrated for the first time a non-selective spasmolytic effect of caulerpine, and that this effect is due in part to the inhibition of Ca^{2+} influx through voltage-gated calcium channels (Ca_V).

Initially, the caulerpine effect on phasic contractions induced by three different agonists was evaluated. It was observed that caulerpine antagonized phasic contractions induced by 10^{-6} M carbachol (CCh) ($\text{IC}_{50} = 7.0 \pm 1.9 \times 10^{-5}$ M, $E_{\text{max}} = 62.0 \pm 7.6\%$), 10^{-6} M histamine ($\text{IC}_{50} = 1.3 \pm 0.3 \times 10^{-4}$ M, $E_{\text{max}} = 71.0 \pm 4.9\%$) and 10^{-5} M serotonin ($\text{IC}_{50} = 8.0 \pm 1.4 \times 10^{-5}$ M, $E_{\text{max}} = 73.8 \pm 1.4\%$) (Figure 2). A comparison of IC_{50} values showed that caulerpine had a non-selective effect. Silva *et al.* [35] has also reported a spasmolytic effect of another indole alkaloid, bisnordihydrotoxiferine, on rat uterus and guinea pig ileum.

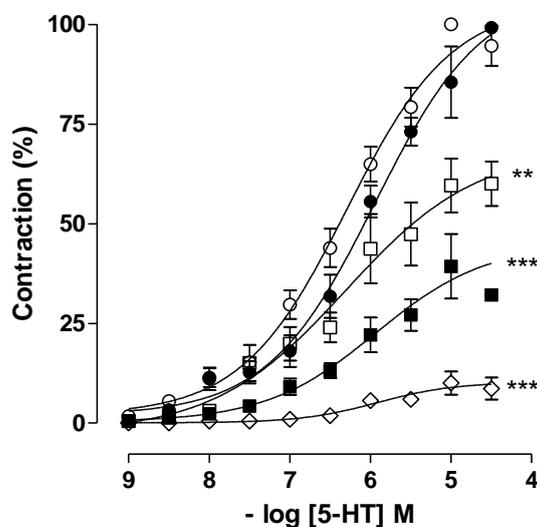
Figure 2. Effect of caulerpine on phasic contractions induced by 10^{-6} M CCh (a), 10^{-6} M histamine; (b) and 10^{-5} M serotonin; (c) on guinea pig ileum ($n = 5$). Columns and vertical bars represent the means \pm S.E.M., respectively. Significant differences are indicated by *** $p < 0.001$.



On guinea pig ileum, the contractile effect of histamine and CCh are mediated by H_1 [38] and M_3 [39] receptors, respectively. Both receptors are coupled to the heterotrimeric $G_{q/11}$ protein, which functions as a transducer to relay information to the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3)/diacylglycerol (DAG) signaling pathway, which in turn triggers an elevation in cytosolic calcium and consequent smooth muscle contraction [38–40]. On the other hand, serotonin-induced contraction is mediated by $5-HT_{2A}$ and $5-HT_3$ receptors [41,42]. The first is a G protein-coupled receptor (GPCR) that shares the same second messenger system with H_1 and M_3 receptors. $5-HT_3$ receptor is a ligand-gated ion channel and it is prone to rapid desensitization. The stimulation of $5-HT_3$ receptors on enteric cholinergic neurons induces acetylcholine release, resulting in smooth muscle contraction [41–43].

Caulerpine antagonized phasic contractions induced by different agonists in an equipotent manner, which could suggest that this alkaloid does not act at the receptor level to inhibit contraction on guinea pig ileum. To confirm this hypothesis, serotonin-induced cumulative contractions were studied. As observed in Figure 3, caulerpine concentration-dependently inhibited serotonin-induced cumulative contractions and shifted the curves to the right with E_{max} reduction and slope of 2.13 ± 0.13 , discarding thus a competitive type antagonism. The relaxation potency expressed as pD'_2 was 4.48 ± 0.04 (Figure 2). Thus, by the antagonism pattern shown in Figure 3, the spasmolytic effect induced by caulerpine is characteristic of noncompetitive antagonism pseudo-irreversible. Furthermore, this result could explain the non-selective effect of caulerpine in relation to the agonists tested. Therefore, it is probable that caulerpine acts in another step of the cascade of events that leads to smooth muscle contraction. In addition, the spasmolytic effect on gastrointestinal smooth muscles through noncompetitive antagonism by the indole alkaloid trinervine was reported by Diniz *et al.* [36].

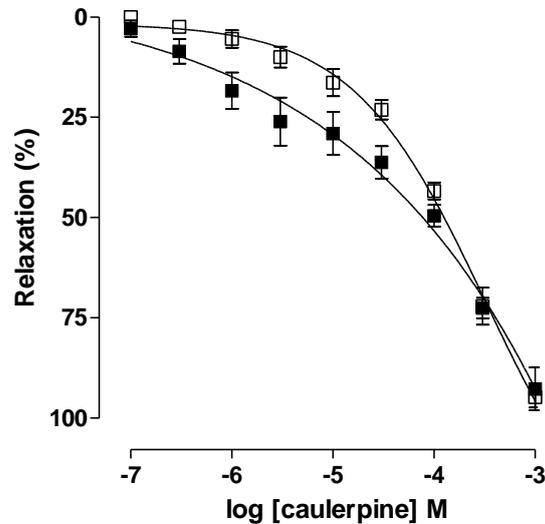
Figure 3. Cumulative concentration-response curves for 5-HT in the absence (\circ) and presence of caulerpine: 3×10^{-5} (\bullet), 10^{-4} (\square), 3×10^{-4} (\blacksquare) and 10^{-3} M (\diamond) ($n = 5$). Symbols and vertical bars represent the means and S.E.M., respectively. One-way ANOVA followed by Bonferroni's test, significant differences are indicated by ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.



Guinea pig ileum shows biphasic contraction, comprising an initial phase in which the muscle exhibits a fast and transient contraction followed by a long-lasting second phase characterized by a maintained tonic contraction [44,45]. Both phasic and tonic contractions are dependent on extracellular calcium since both are inhibited in its absence [46]. The removal of extracellular Ca^{2+} prevents contraction induced by depolarizing agents, such as KCl, or by agonists, such as CCh and serotonin, in few seconds, indicating that intracellular Ca^{2+} does not contribute significantly to the tension level [47]. However, the influence of extracellular Ca^{2+} is relatively greater in tonic contractile response than in the phasic one [48]. Furthermore, the mechanisms involved in the maintenance of tonic contraction components are different from the phasic ones in guinea pig ileum [46]. Thus, the effect of caulerpine on the tonic contraction component induced by KCl (electromechanical coupling) and CCh (pharmacomechanical and electromechanical coupling) was investigated.

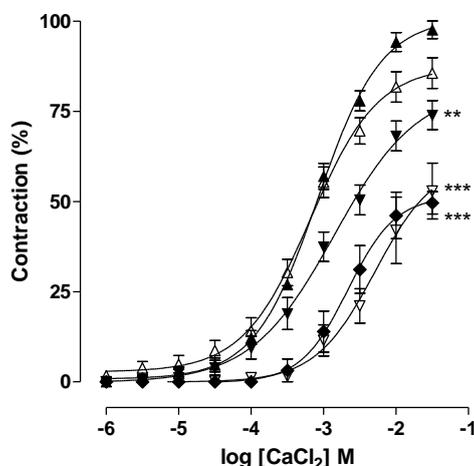
Caulerpine relaxed in a significant and concentration-dependent manner the ileum pre-contracted by 40 mM KCl ($\text{EC}_{50} = 9.2 \pm 0.9 \times 10^{-5}$ M, $\text{E}_{\text{max}} = 94.8 \pm 2.6\%$) and 10^{-5} M CCh ($\text{EC}_{50} = 5.2 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ M, $\text{E}_{\text{max}} = 92.7 \pm 5.4$) (Figure 4). An analysis of EC_{50} values indicated that caulerpine was slightly more potent in relax guinea pig ileum contracted by CCh than KCl, only 1.7-fold. The presence of an indole nucleus may be responsible for the relaxant effect, since a study performed with a series of derivatives analogous to N^b -benzoyltryptamine (*N*-[2-(1*H*-Indol-3-yl)ethyl]benzamide), sharing the indole nucleus, showed non-selective relaxant activity on guinea pig ileum [37].

Figure 4. Effect of caulerpine on the tonic contractions induced by 40 mM KCl (\square) and 10^{-5} M CCh (\blacksquare) on guinea pig ileum ($n = 5$). Symbols and vertical bars represent the means and S.E.M., respectively.



Independently of the contraction being evoked by either pharmacomechanical or electromechanical coupling, the maintenance of the tonic component involves the activation of Ca_v [49]. Therefore, we can postulate that caulerpine blocks these channels to produce non-selective spasmolytic effects. To evaluate this hypothesis, $CaCl_2$ -induced contraction in depolarizing medium nominally without Ca^{2+} was performed. This hypothesis was confirmed since $CaCl_2$ cumulative concentration-response curves were shifted in a nonparallel way to the right and E_{max} was reduced from 100% (control) to $85.6 \pm 4.2\%$ (3×10^{-5} M), $73.9 \pm 4.05\%$ (10^{-4} M), $52.9 \pm 7.7\%$ (3×10^{-4} M) and $52.7 \pm 4.5\%$ (10^{-3} M) in the presence of caulerpine, which indicates a blockade of Ca^{2+} influx through Ca_v (Figure 5). Smooth muscle contractions are initiated when $[Ca^{2+}]_c$ attains a threshold level [40]. Thus, a decrease in $[Ca^{2+}]_c$ is a pivotal factor in smooth muscle relaxation.

Figure 5. Cumulative concentration-response curves to CaCl_2 in depolarizing medium nominally without Ca^{2+} in the absence (\blacktriangle) and presence of caulerpine: 3×10^{-5} (\triangle), 10^{-4} (\blacktriangledown), 3×10^{-4} (∇) and 10^{-3} M (\blacklozenge). Symbols and vertical bars represent the means \pm S.E.M., respectively. One-way ANOVA followed by Bonferroni's test, significant differences are indicated by ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.



Over the last six decades an enormous number of marine natural products have been studied. They are a valuable source of pharmacological tools, since they act on different and specific targets, and are thereby potentially useful leads in the development of new therapies [3,4]. In conclusion, we showed for the first time that caulerpine has a spasmolytic effect on guinea pig ileum through Ca^{2+} influx blockade. This makes such an alkaloid a potential compound for treating gastrointestinal disorders or a prototype to obtain new compounds acting on Ca^{2+} signaling.

3. Experimental Section

3.1. Isolation

Caulerpa sertularioides and *C. mexicana* algae were collected from the coastal region of Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba State, Brazil in March 2009. The specimens were identified by Dr. George Emmanuel Cavalcanti de Miranda. Voucher specimens of *C. sertularioides* (JPB 13983) and *C. mexicana* (13985) have been deposited in the Lauro Pires Xavier Herbarium at the Federal University of Paraíba (Universidade Federal da Paraíba), Brazil. The alga was extracted with MeOH at room temperature and the extract was partitioned between hexane, dichloromethane, ethyl acetate and metanol. In the ethyl acetate phase there was precipitation of a orange red pigment. On the basis of its NMR spectral data and chemical properties, it was assigned the structure of 5,12-dihydro-cycloocta[1,2-b;5,6-b']diindole-6,13-dicarboxylic acid dimethyl ester, named caulerpine or caulerpin.

3.2. Solutions and Drugs

Caulerpine was dissolved in Cremophor[®] and diluted in distilled water. Carbamoylcholine chloride (carbachol), histamine dihydrochloride, serotonin hydrochloride were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and were dissolved and diluted in distilled water. The physiological solution

was a freshly modified Krebs solution (pH 7.4) with the following composition (mM): NaCl (117.0), KCl (4.7), MgSO₄ (1.3), NaH₂PO₄ (1.2), CaCl₂ (2.5), glucose (11.0) and NaHCO₃ (25.0). A high K⁺ isosmotic solution (pH 7.4) with the following composition was also used: NaCl (51.7), KCl (70.0), MgSO₄ (1.3), NaH₂PO₄ (1.2), glucose (11.0) and NaHCO₃ (25.0). These salts were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and Fmaia (Cotia, SP, Brazil).

3.3. *Animals*

Adult guinea pigs (*Cavia porcellus*) of both sexes from the Professor Thomas George Bioterium of CBiotec/UFPB, weighing 368 ± 8 g, were used. The animals had free access to food and water, were kept in rooms at 21 ± 1 °C with a 12-h light–dark cycle and fasted for 18 h before the experiments. Measures to reduce pain, stress and any suffering were taken in accordance with the ethical guidelines for animal use. All experimental procedures were previously approved and performed in accordance with the Research Ethics Committee of the Federal University of Alagoas (UFAL) guidelines (protocol CEUA 039/2012).

3.4. *Measurement of Contraction of Guinea Pig Ileum*

Animals were euthanized by cervical dislocation and exsanguination. The distal ileum was immediately removed, cleaned of adhering fat and connective tissue, immersed in modified Krebs solution at room temperature and continuously gassed with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). Segments of the ileum oriented along the longitudinal axis (2–3 cm in length) were suspended in a 5 mL organ bath, which contained modified Krebs solution, maintained under resting load of 1.0 g at 37 °C. The tissues were allowed to stabilize for 30 min. Isotonic contractions were recorded using isotonic levers coupled to kymographs and smoked drums (DTF, Brazil) (Experiments 3.5.1 and 3.5.2). An isometric transducer (FORT-10) coupled to an amplifier (TMB4M), both from World Precision Instruments (EUA), connected to an analog/digital converter board (Bio Data, Brazil) installed in a computer with BioMed[®] software version RV2 were used to record isometric contractions (Experiments 3.5.3 and 3.5.4).

3.5. *Pharmacological Experiments*

3.5.1. Effect of the Caulerpine on CCh-, Histamine- and Serotonin-Induced Phasic Contractions

After a stabilization period, two phasic contractions were obtained for 10^{-6} M CCh, 10^{-6} M histamine or 10^{-5} M serotonin with intervals of 15 min between them. Caulerpine was then added, and after an incubation period of 15 min, a third concentration-response curve was obtained in the presence of various concentrations of caulerpine in different preparations. The procedure was repeated in the absence and in the presence of various concentrations of this alkaloid. The molar concentration of a substance that inhibits the response to an agonist by 50% (IC₅₀) [50] was obtained by non-linear regression from the individual inhibition values for caulerpine.

3.5.2. Effect of Caulepine on Serotonin-Induced Cumulative Contractions

After a stabilization period, two similar cumulative concentration-response curves for serotonin were induced and caulepine was incubated, in different preparations, in the absence of serotonin for 15 min in different concentrations as independent experiments. Afterwards, a new serotonin cumulative curve was obtained in the presence of caulepine (3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} and 10^{-3} M). The average amplitude of concentration-response curves for serotonin was considered to be 100% (control) and all contractions were assessed referring to it. Each preparation was exposed to only one caulepine concentration. The antagonism exerted by caulepine was evaluated based on the analysis of the Schild plot and their potencies with pD'_2 values, which is defined as the negative logarithm to base 10 of molar concentration values of an antagonist that reduces the response to an agonist to 50% of its maximum effect (E_{max}), assessed through concentration-response curves in both absence (control) and presence of caulepine [51].

3.5.3. Effect of the Caulepine on KCl- or CCh-Induced Tonic Contractions

After a stabilization period, an isometric contraction was elicited by 40 mM KCl or 10^{-5} M CCh. Contractile agents remained in contact with the preparation until a contraction plateau was reached (approximately 10 min), and the tissue was then washed. After 30 min, the process was repeated and caulepine was added cumulatively (10^{-7} up to 10^{-3} M) at the plateau phase. Relaxation was expressed as the reverse percentage of initial contraction elicited by the contractile agents. The molar concentration of a substance that produces 50% of its maximal effect (EC_{50}) was obtained graphically from the concentration-response curves [50].

3.5.4. Effect of Caulepine on $CaCl_2$ -Induced Contractions in Depolarizing Medium Nominally without Ca^{2+}

After the stabilization period, the modified Krebs solution was replaced by a depolarizing (with 70 mM KCl in equimolar exchange for NaCl) and nominally without Ca^{2+} solution for 45 min. Two similar $CaCl_2$ cumulative concentration-response curves were obtained and caulepine was incubated for 15 min in the absence of $CaCl_2$. A third $CaCl_2$ cumulative curve was obtained in the presence of caulepine. The maximal contraction obtained with the first $CaCl_2$ concentration-response curve was considered to be 100% (control), and all contractions were assessed in reference to it. Each preparation was exposed to a single caulepine concentration.

3.6. Statistical Analysis

Data are expressed as means and S.E.M. EC_{50} and IC_{50} values were determined by nonlinear regression [50]. Differences between means were statistically compared using a *t*-test or one-way ANOVA followed by Bonferroni's test when appropriate. The significance level considered in all tests was $p < 0.05$. Schild plots were analyzed by linear regression. Antagonism was considered to be noncompetitive when the slope of the Schild plot was significantly different from unity and depression

of the maximum response was observed. All values were obtained using Graph-Pad Prism[®] 5.01 software (GraphPad Software Inc., SanDiego, CA, USA).

4. Conclusions

In conclusion, we demonstrated that caulerpine has a non-selective spasmolytic effect on guinea pig ileum. At the functional level, this effect is due in part to the inhibition of Ca²⁺ influx through Ca_v. However, other mechanisms cannot be excluded.

Acknowledgments

The authors are grateful to CAPES, CNPq, PRONEX/FAPESQ-PB, FAPEAL, INCT-INOVAR/CNPq (573.564/2008-6), INCTAmbTropic and the Ministry of Environment (License MMA/CGEN 18/2007) for the joint funding of this research project. The authors thank their colleagues working at the Federal University of Alagoas and Federal University of Paraíba for their constructive criticism and assistance in carrying out this project. A. Leyva helped with English editing of the manuscript.

References

1. Harvey, A.L. Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 894–901.
2. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–335.
3. Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Keyzers, R.A.; Munro, M.H.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 144–222.
4. Molinski, T.F.; Dalisay, D.S.; Lievens, S.L.; Saludes, J.P. Drug development from marine natural products. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 69–85.
5. Lira, N.S.; Montes, R.C.; Tavares, J.F.; da Silva, M.S.; da Cunha, E.V.; de Athayde-Filho, P.F.; Rodrigues, L.C.; da Silva Dias, C.; Barbosa-Filho, J.M. Brominated compounds from marine sponges of the genus *Aplysina* and a compilation of their ¹³C NMR spectral data. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 2316–2368.
6. Essack, M.; Bajic, V.B.; Archer, J.A. Conotoxins that confer therapeutic possibilities. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 1244–1265.
7. De Almeida, C.L.; Falcão, H.S.; Lima, G.R.; Montenegro, C.A.; Lira, N.S.; de Athayde-Filho, P.F.; Rodrigues, L.C.; de Souza, M.F.; Barbosa-Filho, J.M.; Batista, L.M. Bioactivities from marine algae of the genus *Gracilaria*. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 4550–4573.
8. Jimenez, P.C.; Wilke, D.V.; Ferreira, E.G.; Takeara, R.; de Moraes, M.O.; da Silveira, E.R.; da Cruz Lotufo, T.M.; Lopes, N.P.; Costa-Lotufo, L.V. Structure elucidation and anticancer activity of 7-oxostauroporine derivatives from the Brazilian endemic tunicate *Eudistoma vannamei*. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 1092–1102.
9. Mayer, A.M.; Glaser, K.B.; Cuevas, C.; Jacobs, R.S.; Kem, W.; Little, R.D.; McIntosh, J.M.; Newman, D.J.; Potts, B.C.; Shuster, D.E. The odyssey of marine pharmaceuticals: A current pipeline perspective. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31*, 255–265.

10. Hu, G.P.; Yuan, J.; Sun, L.; She, Z.G.; Wu, J.H.; Lan, X.J.; Zhu, X.; Lin, Y.C.; Chen, S.P. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 514–525.
11. Gul, W.; Hamann, M.T. Indole alkaloid marine natural products: An established source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic, neurological and other diseases. *Life Sci.* **2005**, *78*, 442–453.
12. Güven, K.C.; Percot, A.; Sezik, E. Alkaloids in marine algae. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 269–284.
13. Rinehart, K.L.; Kobayashi, J.; Harbour, G.C.; Hughes, R.G.; Mizensak, S.A.; Scahill, T.A. Eudistomins C, E, K and L, potent antiviral compounds containing a novel oxathiazepine ring from Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1524–1526.
14. Kohmoto, S.; Kashman, Y.; McConnell, O.J.; Rinehart, K.L.; Wright, A.; Koehn, F. Dragmacidin, a new cytotoxic bis (indole) alkaloid from a deep water marine sponge, *Dragmacidon* sp. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3116–3118.
15. Bobzin, S.C.; Faulkner, D.J. Aromatic alkaloids from the marine sponge *Chelonaplysilla* sp. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4403–4407.
16. Souza, E.T.; Lira, D.P.; Queiroz, A.C.; Silva, D.J.C.; Aquino, A.B.; Mella, E.A.C.; Lorenzo, V.L.; Miranda, G.E.C.; Araújo-Júnior, J.X.; Chaves, M.C.O.; *et al.* The antinociceptive and anti-inflammatory activities of caulerpine, a bisindole alkaloid isolated from seaweeds of the genus *Caulerpa*. *Mar. Drugs* **2009**, *7*, 689–704.
17. Kobayashi, J.; Nakamura, H.; Ohizumi, Y.; Hirata, Y. Eudistomidin-A, a novel calmodulin antagonist from the Okinawan tunicate *Eudistoma glaucus*. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 1191–1194.
18. Christophersen, C. Secondary metabolites from marine bryozoans. A review. *Acta Chem. Scand. B* **1985**, *39*, 517–529.
19. Lidgren, G.; Bohlin, L. Studies of Swedish marine organisms VII. A novel biologically active indole alkaloid from the sponge *Geodia baretii*. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3283–3284.
20. Aguilar-Santos, G.; Doty, M.S. Chemical Studies on Three Species of the Marine Algal Genus *Caulerpa*. In *Drugs from the Sea*; Freudenthal, H.D., Ed.; Marine Technology Society: Washington, DC, USA, 1968; pp. 173–176.
21. Aguilar-Santos, G. Caulerpine, a new red pigment from green algae of the genus *Caulerpa*. *J. Chem. Soc. C* **1970**, *6*, 1842–1843.
22. Anjaneyulu, A.S.R.; Prakash, C.V.S.; Mallavadhani, U.V. Sterols and terpenes of the marine green algal species *Caulerpa racemosa* and *Codium decorticatum*. *J. Indian Chem. Soc.* **1991**, *68*, 480.
23. Yan, S.; Su, J.; Wang, Y.; Zeng, L. Studies on chemical constituents of *Halimeda incrassata*. *Trop. Ocean.* **1999**, *18*, 91–94.
24. Govanar, M.B.; Wahidulla, S. Constituents of *Chondria armata*. *Phytochemistry* **2000**, *54*, 979–981.
25. Ayyad, S.E.N.; Badria, F.A. Caulerpin: An antitumor indole alkaloid from *Caulerpa racemosa*. *Alexandria J. Pharm. Sci.* **1994**, *8*, 217–219.
26. Vairappan, C.S. Antibacterial activity of major secondary metabolites: Found in four species of edible green macroalgae genus *Caulerpa*. *Asian J. Microbiol. Biotech. Environ. Sci.* **2004**, *6*, 197–201.

27. Mao, S.C.; Guo, Y.W.; Shen, X. Two novel aromatic valerenane-type sesquiterpenes from the Chinese green alga *Caulerpa taxifolia*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2947–2950.
28. Liu, Y.; Morgan, J.B.; Coothankandaswamy, V.; Liu, R.; Jekabsons, M.B.; Mahdi, F.; Nagle, D.G.; Zhou, Y.D. The *Caulerpa* pigment caulerpine inhibits HIF-1 activation and mitochondrial respiration. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 2104–2109.
29. Macedo, N.R.P.V.; Ribeiro, M.S.; Villaça, R.C.; Ferreira, W.; Pinto, A.M.; Teixeira, V.L.; Cirne-Santos, C.; Paixão, I.C.N.P.; Giongo, V. Caulerpine as a potential antiviral drug against herpes simplex virus type 1. *Braz. J. Pharmacogn.* **2012**, *22*, 861–867.
30. Cavalcante-Silva, L.H.A.; Barbosa Brito da Matta, C.; de Araújo, M.V.; Barbosa-Filho, J.M.; Pereira de Lira, D.; de Oliveira Santos, B.V.; de Miranda, G.E.C.; Alexandre-Moreira, M.S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of crude methanolic extract of red alga *Bryothamnion triquetrum*. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 1977–1992.
31. Brito da Matta, C.B.; de Souza, É.T.; de Queiroz, A.C.; de Lira, D.P.; de Araújo, M.V.; Cavalcante-Silva, L.H.A.; de Miranda, G.E.C.; de Araújo-Júnior, J.X.; Barbosa-Filho, J.M.; de Oliveira Santos, B.V.; *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activity from algae of the genus *Caulerpa*. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 307–318.
32. Souza, E.T.; Queiroz, A.C.; Miranda, G.E.C.; Lorenzo, V.P.; Silva, E.F.; Freire-Dias, T.L.M.; Cupertino-Silva, Y.K.; Melo, G.M.A.; Chaves, M.C.O.; Barbosa-Filho, J.M.; *et al.* Antinociceptive activities of crude methanolic extract and phases, *n*-butanolic, chloroformic and ethyl acetate from *Caulerpa racemosa* (Caulerpaceae). *Braz. J. Pharmacogn.* **2009**, *19*, 115–120.
33. Sorkin, L.S.; Wallace, M.S. Acute pain mechanisms. *Surg. Clin. North Am.* **1999**, *79*, 213–229.
34. Berridge, M.J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J. Physiol.* **2008**, *586*, 5047–5061.
35. Silva, B.A.; de Araújo, A.P.; Mukherjee, R.; Chiappeta, A.D. Bisnordihydrotoxiferine and vellosimine from *Strychnos divaricans* root: Spasmolytic properties of bisnordihydrotoxiferine. *Phytother. Res.* **1993**, *7*, 419–424.
36. Diniz, M.F.F.M.; Silva, B.A.; Mukherjee, R. Spasmolytic actions of the new indole alkaloid trinervine from *Strychnos trinervis* root. *Phytomedicine* **1994**, *1*, 205–207.
37. Gutierrez, S.J.; Claudino, F.S.; Silva, B.A.; Câmara, C.A.; Almeida, R.N.; Souza, M.F.V.; Silva, M.S.; da-Cunha, E.V.; Barbosa-Filho, J.M. *N*^b-benzoyltryptamine derivatives with relaxant activity in guinea-pig ileum. *Farmaco* **2005**, *60*, 475–477.
38. Ash, A.S.; Schild, H.O. Receptors mediating some actions of histamine. *Br. J. Pharmac. Chemother.* **1966**, *27*, 427–439.
39. Ehlert, F.J.; Sawyer, G.W.; Esqueda, E.E. Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal smooth muscle. *Life Sci.* **1999**, *64*, 387–394.
40. Berridge, M.J.; Bootman, M.D.; Roderick, H.L. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 517–529.
41. Engel, G.; Hoyer, D.; Kalkman, H.O.; Wick, M.B. Identification of 5HT2-receptors on longitudinal muscle of the guinea pig ileum. *J. Recept. Res.* **1984**, *4*, 113–126.
42. Fox, A.; Morton, I.K. An examination of the 5-HT3 receptor mediating contraction and evoked [3H]-acetylcholine release in the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* **1990**, *101*, 553–558.

43. Hoyer, D.; Hannon, J.P.; Martin, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2002**, *71*, 533–554.
44. Bolton, T.B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth-muscle. *Physiol. Rev.* **1979**, *59*, 606–718.
45. Abdel-Latif, A.A. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, generation of second messengers and contraction in the mammalian iris smooth muscle: Historical perspectives and current status. *Life Sci.* **1989**, *45*, 757–786.
46. Honda, K.; Takano, Y.; Kamiya, H. Involvement of protein kinase C in muscarinic agonist-induced contractions of guinea pig ileal longitudinal muscle. *Gen. Pharmacol.* **1996**, *27*, 957–961.
47. Nouailhetas, V.L.; Shimuta, S.I.; Paiva, A.C.; Paiva, T.B. Calcium and sodium dependence of the biphasic response of the guinea-pig ileum to agonists. *Eur. J. Pharmacol.* **1985**, *116*, 41–47.
48. Triggle, C.R.; Swamy, V.C.; Triggle, D.J. Calcium antagonists and contractile responses in rat vas deferens and guinea pig ileal smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1979**, *57*, 804–818.
49. Rembold, C.M. Electromechanical and Pharmacomechanical Coupling. In *Biochemistry of Smooth Contraction*; Bárány, M., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, **1996**, pp. 227–239.
50. Neubig, R.R.; Spedding, M.; Kenakin, T.; Christopoulos, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 597–606.
51. Dunne, A. Comparison of individual and cumulative dose–response curves [proceedings]. *Br. J. Pharmacol.* **1979**, *67*, 491–492.