

ALDEÍDIA PEREIRA DE OLIVEIRA

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DO DITERPENÓ
LABDANO-302 – ESTUDO EM RATOS NORMOTENSOS E
HIPERTENSOS (L-NAME)**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA “PROF. DELBY
FERNANDES DE MEDEIROS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

JOÃO PESSOA – PB 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALDEÍDIA PEREIRA DE OLIVEIRA

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DO DITERPENO
LABDANO-302 – ESTUDO EM RATOS NORMOTENSOS E
HIPERTENSOS (L-NAME)**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de
Ciências da Saúde/Laboratório de Tecnologia
Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, para
obtenção do título de DOUTORA EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS.**

Área de concentração: FARMACOLOGIA.

ORIENTADOR: PROF. DR. ISAC ALMEIDA DE MEDEIROS

**COORIENTADORA: PROFA. DRA. FERNANDA REGINA DE
CASTRO ALMEIDA**

JOÃO PESSOA – PB

2008

Oliveira, Aldeídia Pereira de Oliveira de.
Efeitos cardiovasculares do diterpeno labdano-302- Estudo em ratos hipertensos (L-NAME)
/ Aldeídia Pereira de Oliveira. - João Pessoa, 2008.
125p.:il.-
Orientador: Isac Almeida de Medeiros.
Tese (doutorado) - UFPB / CCS / LTF.

1. Produtos Naturais 2. Farmacologia 3. labdano-302 4. Cardiovascular
5. Hipertensão (L-NAME)

UFPB / BC

ALDEÍDIA PEREIRA DE OLIVEIRA

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DO DITERPENO
LABDANO-302 – ESTUDO EM RATOS NORMOTENSOS E
HIPERTENSOS (L-NAME)**

APROVADA EM 29/02/08

BANCA EXAMINADORA:

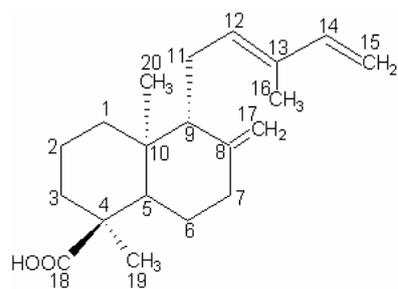
**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
Orientador**

**Profa. Dra. Simone dos Santos Maciel
Examinadora Externa**

**Prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos
Examinador Interno**

**Profa. Dra. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro
Examinadora Externa**

**Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
Examinadora Interna**

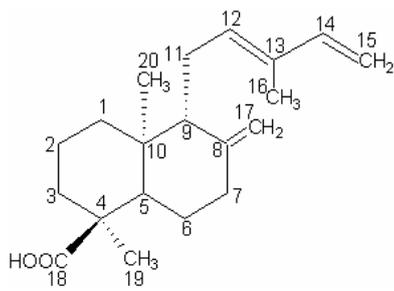


Dedicatórias

Ao meu pai Severo Gomes e minha mãe Maria José, pelo imenso amor, carinho, pelo apoio incondicional e incentivo em todas as minhas decisões e principalmente por me ensinarem a buscar sempre o melhor.

Aos meus irmãos, Clemilson (Dadá) e Hellane, pelo amor e carinho todos os dias de minha vida.

Aos meus sobrinhos, Rayele, Júnior, Elaine e Ana Beatriz pelos momentos indispensáveis de alegria e descontrações que sempre me proporcionam.



Agradecimentos

A Deus, por todas as realizações e conquistas, por me fazer capaz chegar a este dia.

À Natureza pela generosidade em ofertar sua essência em forma de produto natural como o labdano-302, um companheiro fiel e digno do meu mais profundo agradecimento.

Ao Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros, pela orientação, estímulo, amizade, pela oportunidade desta conquista e pela grandeza desse momento e principalmente por me dar condições de conhecer um mundo novo, que aprendi a admirar e a respeitar a FARMACOLOGIA.

À minha Coorientadora Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida pelo incentivo, amizade e confiança e por acreditar na minha capacidade.

À Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses, pelo imenso carinho que sempre dispensou a mim, pelo crédito a meu favor ao decidir tornar possível essa oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Sobral e ao Prof. Dr. Josean Fechine, pelo fornecimento do labdano-302.

Aos amigos, Êurica Nogueira, Raline Mendonça, Fernanda Burle, Tereza Cavalcante, Horacinna Medeiros, Thais Josy, Aurilene Carlos Luciano Ribeiro, Joelmir Lucena e Julianelli Tolentino, pela amizade sincera e pelos esclarecimentos para o bom desenvolvimento deste trabalho.

À Fabíola Furtado (mestranda), pelo exemplo de coragem e força para superar as adversidades, por está sempre disposta a ajudar a todos com competência e dedicação e pela prestimosa amizade.

Ao Abrahão Filho (IC), por me dar a oportunidade de exercitar a arte de ensinar e orientar e a capacidade de aprender que com um sorriso se conquista o mundo.

Ao José Crispim Duarte (Técnico), pela dedicação e por está sempre disposto a ajudar.

Aos amigos pós-graduandos do laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Alessandra Medeiros, Ápio Cláudio, Angélica Sátiro, Darizy Flávia, Francisco Júnior, Karla Veruska, Nayara Magalhães, Robson Veras, Islânia Albuquerque e Thais Porto e a todos os alunos de iniciação científica (Thiago Queiroz, Maria do Carmo, José George, José Couras, Ericelle Carvalho, Camilla Menezes, Karoline Rodrigues) e voluntários pela ajuda e amizade.

Aos Prof. Dr. Jader Cruz e Prof. Dr. Demétrius Araújo pela colaboração nos experimentos com eletrofisiologia.

Aos técnicos Luís Cordeiro e Adriano Cordeiro, pelo trabalho realizado no Biotério do LTF.

À Tânia Alves (Secretaria da Pós-graduação) por seu trabalho desempenhado com dedicação junto à secretaria, e por sua amizade.

À Coordenação, funcionários e a todos os professores pela grande contribuição na minha formação.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, pelo suporte técnico através do Portal Periódicos.

À Universidade Federal da Paraíba, pela capacidade de agregação de conhecimentos aliado a boa estrutura.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - LTF pela imensa capacidade de acolher a todos sem restrições, pela sua importância na formação de recursos humanos.

RESUMO

Os efeitos cardiovasculares de ácido 8(17),12E, 14-labdatrieno-18(oico) (labdano-302), um diterpeno isolado da casca do caule da *Xylopija langsdorffiana* St.Hil & Tul. (Annonaceae), foram estudados usando técnicas combinadas *in vivo* e *in vitro*. O diterpeno labdano-302 promoveu uma hipotensão dose-dependente tanto em ratos normotensos ($-7,4 \pm 2,2$; $-17,2 \pm 1,2$; $-20,3 \pm 4,0$; $-20,5 \pm 2,8$ %) quanto em ratos hipertensos (L-NAME) ($-6,0 \pm 3,0$; $-14,5 \pm 2,5$; $-36,0 \pm 5,0$; $-38,7 \pm 0,5$ %), sendo mais potente em ratos hipertensos (L-NAME). Essa resposta hipotensora foi seguida de taquicardia em ratos normotensos ($45,8 \pm 10$; $68,1 \pm 9,0$; $88,1 \pm 8,0$; $90,1 \pm 7,0$ % bpm) e nos ratos hipertensos (L-NAME) ocorreu alteração significativa da frequência cardíaca apenas nas duas doses maiores ($5,0 \pm 2,1$; $11,3 \pm 0,5$ %). Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com e sem endotélio funcional, labdano-302 (10^{-5} ; 3×10^{-5} ; 10^{-4} e 10^{-3} M) promoveu uma inibição das contrações induzida por fenilefrina (10^{-10} – 10^{-5} M). Em preparações pré-contraídas com fenilefrina labdano-302 promoveu um relaxamento dependente do endotélio vascular tanto em preparações mesentéricas de ratos normotensos ($pD_2=5,16 \pm 0,07$), quanto de hipertensos (L-NAME) ($pD_2=5,68 \pm 0,07$). O efeito relaxante de labdano-302 sobre contrações induzidas por FEN foi atenuado significativamente após a remoção do endotélio vascular, tanto em anéis mesentéricos de ratos normotensos ($pD_2=4,12 \pm 0,03$) quanto de hipertensos (L-NAME) ($pD_2=4,07 \pm 0,03$). Na presença de L-NAME, PTIO, ODQ, KT5823 ou indometacina, ocorreu uma atenuação do vasorelaxamento, o mesmo não foi observado na presença de L-NAME + L-arginina, atropina ou H-89, essa resposta foi observada nos dois modelos estudados. A incubação com KCl 20 mM em preparações com endotélio vascular não alterou a resposta relaxante de labdano-302. No entanto na em preparações com KCl 20 mM ou TEA na ausência do endotélio o relaxamento foi atenuado. Contudo não foi alterada na presença de bloqueadores de canais para potássio como: glibenclâmida (10 μ M), apamina, 4-AP ou BaCl₂. O diterpeno labdano-302 promoveu um relaxamento em preparações pré-contraídas com KCl 80 mM, tanto na presença quanto na ausência do endotélio vascular. O labdano-302 antagonizou contrações induzidas por CaCl₂ sendo mais potente em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME). Em preparações pré-contraídas com BayK 8644, o labdano-302 promoveu relaxamento mais potente em anéis mesentéricos de ratos hipertensos (L-NAME). Em estudos eletrofisiológicos com células GH3 (100 μ M) de labdano-302 promoveu uma inibição das correntes de Ba²⁺ através dos Ca_vL1.2. O labdano-302 inibiu contrações induzidas por fenilefrina em meio livre de cálcio, porém promoveu um discreto aumento das contrações induzidas por cafeína. Em conclusão, estes resultados sugerem que o efeito hipotensor induzido por labdano-302 em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) é provavelmente devido a uma diminuição da resistência periférica total em consequência de uma ativação da via eNOS-NO-GMPc-PKG e da ciclooxygenase endotelial, além da participação dos canais BK_{Ca} na musculatura lisa vascular, bem como do bloqueio dos canais Ca_vL1.2 em células GH3. **Palavras chaves:** labdano-302, *Xylopija langsdorffiana*, artéria mesentérica, Hipertensão (L-NAME).

ABSTRACT

The cardiovascular effects induced by labdane-302, a diterpene isolated from stem bark of *Xylopia langsdorffiana* St. Hill & Tull, were evaluated in this work. In normotensive and (L-NAME) hypertensive non-anaesthetized rats, was observed that labdane-302 induced hypotension (-7.4 ± 2.2 ; -17.2 ± 1.2 ; -20.3 ± 4.0 ; -20.5 ± 2.8 %), (-6.0 ± 3.0 ; -14.5 ± 2.5 ; -36.0 ± 5.0 ; -38.7 ± 0.5 %), respectively and effect and taquicardic response (45.8 ± 10 ; 68.1 ± 9.0 ; 88.1 ± 8.0 ; 90.1 ± 7.0 %), (5.0 ± 2.1 ; 11.3 ± 0.5 %), respectively. In endothelium intact and removal mesenteric rings, application of the Phe (10^{-9} – 10^{-5} M), induced contractions in a concentration-dependent manner. These contractions were reduced in presence of labdane-302 (10^{-5} ; 3×10^{-5} ; 10^{-4} e 10^{-3} M). In contractions elicited by Phe, labdane-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) induced concentration-dependent relaxation of ($pD_2=5.16 \pm 0.07$); ($pD_2=5.68 \pm 0.07$), in mesenteric rings of normotensive and hypertensive (L-NAME) rats, respectively. Which was significantly reduced after removal of the vascular endothelium, ($pD_2=4.12 \pm 0.03$); ($pD_2=4.07 \pm 0.03$), respectively, and the presence of L-NAME, PTIO, ODO, KT5823 or indomethacin. Incubation with the atropine, L-NAME plus L-arginine or H-89 not changed for the labdane-302 vasorelaxante responses. In the presence of high K^+ (20 mM), the relaxation response induced by labdane-302 was not significantly affected in intact rings, but in the absence of endothelium, the high K^+ and TEA, attenuated the labdane-302 response. Nevertheless, it was not affected by glibenclamide, 4-AP, apamin or $BaCl_2$. Labdane-302 antagonized the contractions induced by KCl 80 mM in presence and absence endothelium. The diterpene labdane-302 antagonized the $CaCl_2$ induced-contractions in depolarizing medium nominally without Ca^{+2} . In contractions elicited by Bay K8644 the diterpene labdane-302 concentration-dependent relaxation induced in mesenteric rings of normotensive and hypertensive (L-NAME) rats. Labdane-302 (100 μ M) decreased Ba^{+2} currents in GH3 cells, suggest the block L-type $Ca_vL1.2$ channels. Regarding to transient contractions induced by Phe (10 μ M), the diterpene diminished the maximum response significantly. However, the contractions induced by caffeine (20 mM) were increased in the presence of this compound. In conclusion, these results demonstrate that labdane-302 induce hypotension probably secondary to a peripheral vasodilatation that appears to involve the pathway activation eNOS-NO-GMPc-PKG and COX metabolites. The diterpene labdane-302 activation promote of BK_{Ca} in mesenteric rings and decreased Ba^{+2} currents in GH3 cells.

Keywords: labdane-302, *Xylopia langsdorffiana*, mesenteric artery, hypertension (L-NAME).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Foto <i>Xylopia langsdorffiana</i> St. Hil & Tul.....	5
Figura 2 - Estrutura química do Labdano-302.....	5
Figura 3 - <i>Rattus norvegicus</i>	18
Figura 4 - Representação esquemática do protocolo experimental referente à administração de doses crescentes de labdano-302 (5, 10, 30 e 30 mg/kg, iv.) em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	24
Figura 5 - Aparato utilizado para registros de PA e FC em ratos	24
Figura 6 - Artéria mesentérica superior isolada de rato.....	26
Figura 7 - Cuba para órgão isolado contendo anel de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	26
Figura 8 - Aparato utilizado para registros de tensões isométricas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.....	27
Figura 9 - Representação esquemática dos protocolos experimentais para verificação do efeito de labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos na presença e na ausência do endotélio vascular.....	29
Figura 10 - Representação esquemática dos protocolos experimentais para avaliação do efeito de labdano-302 na presença de ferramentas farmacológicas diversas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio vascular.....	30
Figura 11 - Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para verificação do efeito de labdano-302 sobre contrações induzidas adição cumulativa de CaCl ₂ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular.....	37

Figura 12 - Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para verificação do efeito de labdano-302 sobre contração induzida por BayK 8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular.....	38
Figura 13 - Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para verificação do efeito de labdano-302, sobre as contrações transientes induzidas por fenilefrina ou cafeína em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular.....	41
Figura 14 - Registros originais dos valores de PAS (■) PAM (■) PAD(■) e FC (■) obtidos com a administração aguda doses crescente do labdano-302 (5, 10, 20 e 30 mg/kg ⁻¹) em ratos hipertensos (L-NAME).....	46
Figura 15 - Registros originais do efeito vasorelaxante do labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME) pré-contraídos com FEN, na presença e na ausência do endotélio vascular.....	56
Figura 16 - Registros originais do vasorelaxamento do labdano-302 mesentérica de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) pré-contraídos com Bay K8644	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores basais de PAM e FC em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	44
Tabela 2 - Avaliação de peso corporal e peso dos órgãos dos ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	44
Tabela 3 - Valores de pD_2 e E_{max} das contrações induzida por fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) na presença de concentrações isoladas do labdano-302, em preparações na presença do endotélio vascular.....	51
Tabela 4 - Valores de pD_2 e E_{max} das contrações induzida por fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) na presença de concentrações isoladas de labdano-302, em preparações na ausência do endotélio vascular.....	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito do labdano-302 sobre pressão arterial média e freqüência cardíaca em ratos wistar normotensos ou hipertensos (L-NAME).....	46
Gráfico 2 – Avaliação da reatividade vascular à adição cumulativa de acetilcolina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos ou hipertensos (L-NAME) com e sem endotélio funcional.....	49
Gráfico 3 - Avaliação da reatividade vascular à adição cumulativa de fenilefrina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos ou hipertensos (L-NAME) com ou sem endotélio funcional.....	49
Gráfico 4 - Verificação da resposta vascular para a fenilefrina na presença de labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) com endotélio vascular.....	52
Gráfico 5 - Verificação da resposta vascular para a fenilefrina na presença de labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) sem endotélio vascular.....	53
Gráfico 6 - Efeito de labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME) pré-contraídos com fenilefrina.....	56
Gráfico 7 - Verificação do efeito de L-NAME e L-NAME + L-arginina na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos L-NAME.....	58
Gráfico 8 - Verificação do efeito de PTIO na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	60
Gráfico 9 - Verificação do efeito de ODQ na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	62

Gráfico 10 - Verificação do efeito de KT5823 na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	63
Gráfico 11 - Verificação do efeito de indometacina na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	65
Gráfico 12 - Verificação do efeito de atropina na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	66
Gráfico 13 - Verificação do efeito H-89 na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	68
Gráfico 14 – Efeito do modulador do efluxo de potássio KCl 20 mM na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME) na presença do endotélio.....	69
Gráfico 15 - Efeito do modulador do efluxo de potássio KCl 20 mM na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME) na ausência do endotélio.....	70
Gráfico 16 - Verificação do efeito de 4-aminopiridina na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	72
Gráfico 17 - Verificação do efeito de glibenclamida na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	73
Gráfico 18 - Verificação do efeito de BaCl ₂ na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	75
Gráfico 19 - Verificação do efeito de apamina na resposta vasorelaxante induzida	

por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	76
Gráfico 20 - Verificação do efeito de TEA na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	78
Gráfico 21 - Efeito de um agente despolarizante KCl 80 mM na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME) com endotélio.....	79
Gráfico 22 - Efeito de um agente despolarizante KCl 80 mM na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME) sem endotélio	80
Gráfico 23 - Verificação do efeito de labdano-302 sobre a curva cumulativa para o CaCl ₂ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	82
Gráfico 24 - Efeito de labdano-302 sobre contrações induzidas por S-(-) Bay K8644 um ativador dos canais para cálcio sensíveis à voltagem em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	84
Gráfico 25 - Efeito de labdano-302 sobre canais de cálcio do tipo-L Ca _v L em células GH ₃	86
Gráfico 26 - Efeito de labdano-302 sobre a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares sensíveis a fenilefrina (10 μM).....	88
Gráfico 27 - Efeito de labdano-302 sobre a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares sensíveis à cafeína (20 mM).....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
AVEs	Acidente vascular encefálico
b.p.m.	Batimentos por minuto
BK_{Ca}	Canal para potássio sensível ao cálcio de grande condutância
BAY K8644	S-(-)-1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-3-Ácidopiridinecarboxílico éster metílico
Ca_vL	Canais para cálcio sensível à voltagem tipo L
Ca²⁺	Cálcio
([Ca²⁺]_i)	Concentração de cálcio intracelular
CE₅₀	Concentração que promove 50% do efeito máximo de uma substância
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
DC	Débito cardíaco
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
E_{max}	Efeito máximo
e.p.m.	Erro padrão da média
eNOS	Enzima sintase de NO endotélial
FC	Freqüência cardíaca
FEN	Fenilefrina
GH3	Células de pituitária de ratos
GDP	Difosfato de guanosina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
Gs	Proteína G estimulatória
GMPc	Monofosfato de guanosina ciclíco
GTP	Trifosfato de guanosina
GTPase	Trifosfatase de guanosina
HA	Hipertensão arterial
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol
iNOS	Enzima sintase de NO indutiva
K_v	Canal para potássio sensível à voltagem
K_{ATP}	Canal para potássio sensível à voltagem

K_{IR}	Canal para potássio retificador de entrada
KT5823	<i>indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole aglycone</i>
L-NAME	N ^G -Nitro-L-arginina methyl ester
Labdano-302	Ácido 8, (17) 12 <i>E</i> , 14 labdatrieno 18 (óico)
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina
n	Número de experimentos realizados
nNOS	Enzima sintase de NO neuronal
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
NTS	Núcleo do Trato Solitário
PIP₂	4,5 – difosfato de inositol
PGI₂	Prostaciclina
PAD	Pressão arterial diastólica
PD₂	Logaritmo negativo do valor de CE ₅₀
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PKG	Proteína cinase G
PLC	Fosfolipase C
PTIO	2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido
RS	Retículo sarcoplasmático
ROCC's	Canais de cálcio operados por receptores
RPT	Resistência periférica total
RYR	Receptor de rianodina
SK_{Ca}	Canal para potássio sensível a cálcio de baixa condutância
VE	Volume de ejeção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	2
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Gerais.....	16
2.2 Específicos.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Animais.....	18
3.2 Drogas e reagentes.....	19
3.3 Soluções Nutritivas.....	19
3.4 Preparação do labdano-302.....	20
3.5 Ensaio Farmacológico.....	20
3.6 Indução de hipertensão pela inibição da enzima sintase de NO com L-NAME.....	20
3.7 Procedimento experimental.....	21
3.7.1 Medida Direta da Pressão Arterial (PA) e Frequência Cardíaca (FC) em Ratos não-anestesiados.....	21
3.7.2 Efeito de labdano-302 sobre a PAM e FC em ratos normotensos ou hipertensos (L-NAME) não-anestesiados.....	21
3.7.3 Preparação de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio vascular.....	24
3.8 Protocolos experimentais para estudos <i>in vitro</i>	27
3.8.1 Estudo da reatividade vascular para a acetilcolina em anéis de artéria	

mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	27
3.8.2 Efeito de labdano-302 sobre contrações induzidas por S-(-) Bay K8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	27
3.8.3- Avaliação da resposta contracturante da fenilefrina na presença de concentrações de labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	27
3.8.4 Curva concentração-resposta para labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	27
3.8.5 Verificação da participação da enzima NO-sintase na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos e hipertensos (L-NAME).....	30
3.8.6 Verificação do envolvimento do NO na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	30
3.8.7 Verificação da Ciclase de guanilil na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).induzida por labdano-302.....	30
3.8.8 Verificação da participação da PKG na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	31
3.8.9 Verificação da participação dos metabólitos da via do ácido araquidônico na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	31
3.8.10 Verificação da participação dos receptores muscarínicos no vasorelaxamento arterial induzido por labdano-302 e anéis mesentéricos de ratos hipertensos (L-NAME).....	32

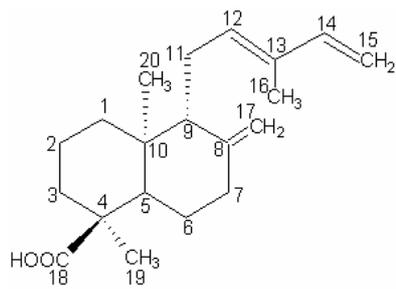
3.8.11 Verificação da participação da PKA na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME).....	32
3.8.12 Verificação da participação dos canais para potássio na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME).....	32
3.8.13 Verificação da participação dos canais para potássio sensível à voltagem-K _V na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos L-(NAME).....	33
3.8.14 Verificação da participação dos canais para potássio sensível a ATP na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos L-NAME.....	33
3.8.15 Verificação da participação dos canais para potássio retificadores de entrada - K _{IR} na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME).....	33
3.8.16 Verificação da participação dos canais para potássio de baixa condutância sensível ao cálcio – SKca na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME).....	34
3.8.17 Verificação da participação dos canais para potássio de grande condutância sensível ao cálcio – BKca na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME).....	34
3.8.18 Efeito de labdano-302 sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME).....	34
3.8.19 Efeito de labdano-302 sobre as contrações induzidas por CaCl ₂ em artéria mesentérica de ratos normotensos e hipertensos L-NAME.....	35
3.8.20 Efeito de labdano-302 sobre contrações induzidas por S(-) Bay K8644 normotensos e hipertensos (L-NAME).....	36

3.8.21 Verificação do efeito de labdano-302 sobre correntes para cálcio através de canais Ca_vL em células GH3.....	37
3.8.21.1 Cultivo das células GH3.....	37
3.8.21.2 Abordagem eletrofisiológica das correntes para cálcio através dos canais – Ca_vL	38
3.8.22 Efeito do labdano-302 sobre as contrações induzidas por fenilefrina ou cafeína em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	39
3.8.23 Análise Estatística.....	41
4 RESULTADOS	43
4.1 Estudos farmacológicos com o diterpeno labdano-302 <i>in vivo</i>	43
4.1.1 Efeito do labdano-302 sobre PAM e FC em ratos normotensos ou hipertensos (L-NAME).....	44
4.2 Estudos farmacológicos com o diterpeno labdano-302 em animais hipertensos (L-NAME) - <i>in vitro</i>	47
4.2.1 Avaliação da reatividade vascular à adição cumulativa de acetilcolina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos ou hipertensos (L-NAME) com e sem endotélio funcional.....	47
4.2.2 Avaliação da reatividade vascular à adição cumulativa de fenilefrina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos ou hipertensos (L-NAME) com ou sem endotélio funcional.....	47
4.2.3 Verificação da resposta vascular para a fenilefrina na presença de labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	50
4.2.4 Efeito do labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de	

ratos hipertensos (L-NAME) pré-contraídos com fenilefrina.....	54
4.2.5 Verificação do efeito de L-NAME + L-arginina na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	57
4.2.6 Verificação do efeito de PTIO na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos ((L-NAME)	59
4.2.7 Verificação do efeito de ODQ na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	61
4.2.8 Verificação do efeito de KT5823 na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	61
4.2.9 Verificação do efeito de indometacina na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	64
4.2.10 Verificação do efeito de atropina na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	64
4.2.11 Verificação do efeito H-89 na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	67
4.2.12 Efeito do modulador do efluxo de potássio KCl 20 mM na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	67
4.2.13 Verificação do efeito de 4-aminopiridina na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	71

4.2.14 Verificação do efeito de glibenclamida na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	71
4.2.15 Verificação do efeito de BaCl ₂ na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	74
4.2.16 Verificação do efeito de apamina na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	74
4.2.17 Verificação do efeito de TEA na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	77
4.2.18 Efeito de um agente despolarizante KCl 80 mM na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).....	77
4.2.19 Verificação do efeito de labdano-302 sobre a curva cumulativa para o CaCl ₂ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	81
4.2.20 Efeito de labdano-302 sobre contrações induzidas por S-(-) Bay K8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).	81
4.2.21 Verificação do efeito de labdano-302 sobre correntes para cálcio através de canais Ca _v L em células GH3.....	85
4.2.22 Efeito do labdano-302 sobre as contrações induzidas por fenilefrina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).....	87
4.2.23 Efeito do labdano-302 sobre as contrações induzidas por cafeína em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos	

(L-NAME).....	87
5 DISCUSSÃO.....	91
6 CONCLUSÕES.....	108
7 PERSPECTIVAS.....	112
REFERÊNCIAS.....	114



Introdução

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças em seres humanos vem crescendo consideravelmente nos últimos anos em todo o mundo (CIRIGLIANO; SUN, 1998). A valorização de plantas medicinais impulsionou a busca de informações comprovada cientificamente sobre a segurança e eficácia terapêutica (SIMÕES et al., 2000).

Muitos remédios à base de ervas medicinais têm sido popularmente usados para o tratamento de patologias e produzindo efeitos satisfatórios sobre doenças do sistema cardiovascular como a hipertensão (VORA; MANSSOR, 2005). Um exemplo disto é a reserpina um alcalóide isolado da espécie *Rauwolfia serpentina* em 1953 que revolucionou o tratamento da hipertensão arterial (SAMY et al., 2008). Porém poucas plantas têm seus efeitos e mecanismos de ação estudados e confirmados. Entretanto produtos derivados de plantas podem produzir interações que levam ao aumento ou diminuição dos efeitos farmacológicos ou toxicológicos de drogas tradicionais usadas no tratamento de doenças relacionadas com o sistema cardiovascular (FUGH-BERMAN, 2000).

A flora brasileira é a mais rica do mundo em matéria prima para a produção de fitofármacos, porém apenas 8 % desta flora foi objeto de estudo. Assim é de suma importância que os pesquisadores brasileiros priorizem seus estudos nestas plantas, buscando uma fonte alternativa de medicamentos e visando no futuro a obtenção de novos fármacos mais eficazes e específicos (SIMÕES et al., 2000).

A família Annonaceae tem distribuição pantropical, apresentando aproximadamente 120 gêneros e cerca de 2000 a 2200 espécies (SANTOS; SALATINO, 2000). O gênero *Xylopia* possui aproximadamente 160 espécies amplamente distribuídas.

Um grande número de plantas da família Annonaceae apresenta fragrância devido à presença de óleos essenciais. Os constituintes desses óleos usualmente são mono e sesquiterpenos ou outros compostos aromáticos (SANTOS; TORRES; LEONART, 1998), ésteres de ácidos alifáticos também podem ser encontrados entre esses compostos (JIROVETZ; BUCHBAUER; NGASSOUM,

1998). Acredita-se que os diterpenos são substâncias características do gênero *Xylopi* (VILEGAS et al., 1991).

Os frutos de *Xylopi* *aethiopia* (Dunal) A. Rich são usados na medicina popular como carminativo e tônico pós-parto. Também são usados para problemas estomacais, no tratamento de bronquite, em problemas biliares e disenteria (IWU, 1994). As sementes de *Xylopi* *frutescens* Aubl. (Annonaceae) são usadas no Brasil na medicina popular como agente antimicrobiano e contra reumatismo. O ácido caurenóico (diterpeno tipo caurano), que é abundante nas sementes de *X. frutescens* apresentou atividade contra o protozoário *Trypanosoma cruzi* que causa a doença de Chagas em estudos *in vitro* e também contra cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquina. Esse diterpeno ainda mostrou atividade antimicrobiana e antiinflamatória, justificando o uso de *X. frutescens* na medicina popular (MELO et al., 2001; JENNETT-SIEMS et al., 1999).

Diterpenos como os ácidos caurenóico, diidro-caurenóico e xylópico isolados de *Xylopi* *aethiopia* e *Alepidea amatymbica* têm demonstrado atividade cardiovascular e diurética em ratos (SOMOVA et al., 2001). Diterpenos do tipo labdano isolados de várias espécies têm demonstrado várias atividades biológicas como, por exemplo: antiinflamatória (DE LAS HERAS et al., 1994); citotóxica, citostática e antineoplásica (DIMAS et al., 1999; TANAKA et al., 2000; DIMAS et al., 2001; KO et al., 2001; ROENGSUMRAN et al., 2001), antiespasmódica uterina (VEDERNIKOV et al., 2000); anti-hipertensiva (TANDON et al., 1992) e vasorelaxante (LINCOLN; FISHER-SIMPSON, 1983; LINDGREN; ANDERSSON, 1991). O ácido ent-15alfa-acetoxicaur-16-en-19-óico (CA-acetoxi), um diterpeno tipo caurano isolado da espécie *Guatteria juruensis* Diels (Annonaceae), apresentou um potente efeito hipotensor e bradicárdico em ratos normotensos não-anestesiados, este efeito parece envolver a participação da via NO-GMPc (RIBEIRO, 2005).

Um dos diterpenos tipo labdano mais estudados até hoje é a forskolina, isolada das raízes de *Coleus forskohlii* Briq. (Labiatae) utilizada no tratamento da asma, cardiomiopatia congestiva (SEN et al., 1993). A forskolina é um potente ativador da AC, induz apoptose em células gliomas malignas e em células granulomas primárias por ativação da via da ciclase de adenilil aumentando as concentrações intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e conseqüente ativação da PKA (KEREN-TAL et al., 1995; CHEN et al., 1998). Sabe-se que esse diterpeno inibe as contrações na musculatura lisa uterina de ratas

grávidas por ativação da via supracitada e conseqüente ativação de canais K_{ATP} (VEDERNIKOV et al., 2000).

A espécie *Xylopiá langsdorffiana* St.-Hil. & Tul. (Annonaceae) é pouco relatada na literatura, tanto do ponto de vista dos estudos fitoquímicos como de suas atividades biológicas. A partir do fracionamento do extrato etanólico bruto, obtido das cascas do caule dessa espécie, foi isolado um diterpeno tipo labdano com peso molecular de 302,451 e com fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_2$ denominado ácido 8 (17),12E,14-labdatrieno-18-oico (figura 2) (ANDRADE et al., 2002). Dessa espécies foram isolados alguns metabólitos secundários sendo um alcalóide (govanina) e três diterpenos (atizano, traquilobano e labdano-302) (ANDRADE et al., 2002; TAVARES, 2006) .

Em estudos anteriores Oliveira 2004, mostrou que o diterpeno labdano-302 promoveu uma diminuição da pressão arterial em ratos normotensos não-anestesiados, e este efeito hipotensor parece ser mediado por uma diminuição da resistencia vascular periférica envolvendo a enzima sintase de NO e ciclooxigenase endotelial bem como da ativação de canais BK_{Ca} .

Recentemente foi demonstrado que o labdano-302 apresentou uma atividade citotóxica em fibroblastos de pulmão de hamster chinês da linhagem V79, no entanto não apresentou toxicidade em estudos realizados com hepatócitos de ratos (TAVARES et al., 2006). O diterpeno labdano-302 apresentou atividades espasmolítica em traquéia isolada de cobaia sem a participação dos fatores relaxantes derivados do epitélio, contudo com possível participação dos canais para potássio. E em aorta isolada de ratos normotensos labdano-302 promoveu efeito relaxante independente do endotélio vascular provavelmente envolvendo a participação dos canais K_V (RIBEIRO et al., 2007a,b).



Figura 1- *Xylopiya langsdorffiana* St. Hil. & Tul.

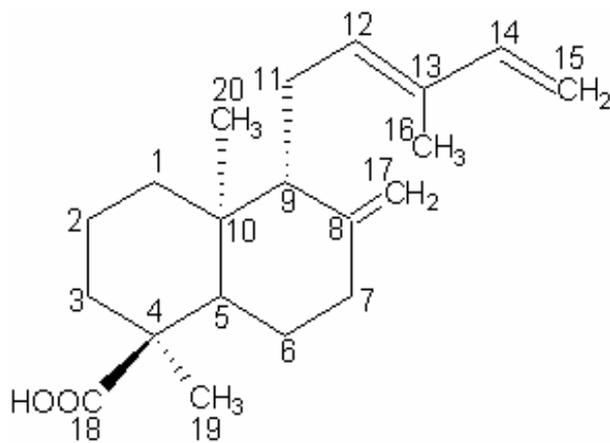


Figura 2. Estrutura química do ácido 8 (17),12*E*,14-labdatrieno-18-óico (labdano-302).

A descoberta de novos produtos naturais oferece maiores oportunidades para encontrar novas moléculas que levem a novos fármacos úteis no tratamento de diversas patologias (GULLO; HUGHES, 2005), incluído o tratamento da hipertensão arterial.

A hipertensão arterial (HA) é considerada como um fator de risco primário para doenças cardíacas e cerebrovasculares, podendo ocorrer em todas as idades e em ambos os sexos (STAMLE et al., 1990, MACHON et al., 1993). Sendo também conhecida como mal silencioso devido à ausência de sinais precoces. A elevação da pressão arterial (PA) pode causar, entre outras coisas, disfunções e lesões do endotélio vascular com migração de elementos aterogênicos, incluindo LDL (lipoproteína de baixa densidade), monócitos e macrófagos (COLLINS et al., 1990; MACHON et al., 1993).

A pressão arterial (PA) pode ser representada, matematicamente, através de um valor de PA não pulsátil, a pressão arterial média (PAM). De maneira simplificada, a PAM pode ser determinada pelo produto de duas variáveis: o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica (RVP), a interação dessas variáveis relacionam-se pela seguinte equação: $PAM = DC \times RVP$, onde o DC é determinado pelo produto entre o volume de ejeção sistólica (VES) e a frequência cardíaca (FC), expresso na equação: $DC = VES \times FC$. Desse modo, a FC participa da homeostase da PAM como um de seus determinantes primários. A PA pode ser influenciada pela ação de drogas sobre um ou ambos as variáveis (OATES et al., 1996).

A regulação da pressão arterial é uma das mais complexas funções fisiológicas, pois é resultante da ação integrada dos sistemas cardiovasculares, renal, neural e endócrino, que trabalhando em conjunto são responsáveis pela redistribuição dos vários fluxos sanguíneos regionais através de alterações na resistência total e no débito cardíaco (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) define como hipertensos todo indivíduo adulto, com valores de pressão arterial sistólica (PS) igual ou superiores a 160 mmHg e ou de pressão arterial diastólica (PD) igual ou superiores a 95 mmHg, em pelo menos duas mediadas realizadas em ocasiões diferentes (KRUMMEL, 2002). São normotensos aqueles com PS inferior a 140 mmHg e PD inferior a 90 mmHg. Conforme a IV Diretrizes Brasileira de Hipertensão Arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia, os níveis de hipertensão compreendem em três estágios: 1 (leve - 140×90 mmHg e 159×99 mmHg), 2

(moderada - 160×100 mmHg e 179×109 mmHg) e 3 (grave - acima de 180×110 mmHg) (IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2002). Os valores intermediários aos acima mencionados são considerados “limítrofes”. No Brasil admite-se como pressão arterial ideal, os valores em que o indivíduo apresenta o menor risco cardiovascular - PAS < 120 mm Hg e PAD < 80 mm Hg (BRASIL, 2002).

A hipertensão arterial é um estado alterado da saúde no qual a pressão do sangue está acima das medidas consideradas normais por um período longo de tempo. Esta alteração decorre do aumento na contratilidade da camada muscular lisa que forma a parede da artéria, algumas substâncias químicas do próprio organismo promovem a contração das artérias. Em situações de desequilíbrio dessas substâncias, ou da alteração dessa camada muscular ocorre o aumento da pressão do sangue dentro dos vasos (KAPLAN, 2001).

Na HA são descritas anormalidades no músculo liso vascular e no endotélio que estão associadas ao comprometimento da função destas estruturas. Dentre estas disfunções, podemos considerar o aumento da vasoconstricção e redução da vasodilatação, tanto dependente como independente do endotélio vascular. A perda do equilíbrio entre o relaxamento e a contração é freqüentemente citada como uma das causas do aumento do tônus vascular na hipertensão (DOGGRELL; BROWN, 1998). A hipertensão pode apresenta-se de duas formas, primária ou essencial e secundária ou adquirida. A hipertensão essencial caracteriza-se por uma elevação da pressão sanguínea sem predisposição genética, enquanto que na secundária ou adquirida geralmente se tem elevação da pressão sanguínea por ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (PAGE et al., 1999). O fator primário da hipertensão é uma resistência vascular periférica total (RVPT) elevada. Portanto, qualquer variação que possa ocorrer no débito cardíaco deve, pois, estar relacionado com uma elevação dessa RVPT e não como causa própria do estado hipertensivo (PAGE, 1987).

O estado hipertensivo está associado com anomalias estruturais no sistema cardiovascular (FOLKOW, 1982). Estas anomalias incluem aumento na relação parede *versus* luz das artérias (SAFAR et al., 1981), aumento na resistência periférica, diminuição da complacência venosa (TAKESHITA; MARK, 1979), aumento da quantidade da massa cardíaca e muscular lisa (FOLKOW, 1982), além de anomalias na função renal (COLEMAM et al., 1994).

Estudos com modelos de hipertensão em ratos, como o modelo por inibição da sintase de NO pela administração de N^G-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME), um potente inibidor da síntese de NO, constitui um modelo amplamente utilizado de hipertensão arterial sistêmica (BAYLIS et al., 1998; ARNAL et al., 1992), visto que, o bloqueio da síntese do NO pelo L-NAME, induz uma hipertensão sustentada em ratos normotensos (RIBEIRO et al., 1992). O L-NAME é solúvel em água e quando administrado oralmente na água de beber do animal, produz um aumento prolongado da pressão arterial em poucas horas (BAYLIS et al., 1992).

Neste modelo ocorre um aumento sustentado da pressão arterial média, mudanças na contratilidade miocárdica, alterações histológicas que consiste em uma grande área de fibrose e necrose miocárdica (ZATZ; BAYLIS, 1998), remodelagem miocárdica (FIALOVÁ et al., 2007), angiogênese e danos mitocondriais além de um aumento na resistência vascular periférica (OKRUHLICOVÁ et al., 2000). Além de disfunção endotelial e hipertensão grave, produz estresse oxidativo, danos inflamatórios e morfológicos, mudanças funcionais: como a proteinúria, hipertensão grave, nefroesclerose, fibrose miocárdica e infarto, além de todas as condições patológicas que são consistentes com o quadro clínico da hipertensão (ONO et al., 1995; GONZALEZ et al., 2000; DE GASPARO et al., 2002).

Dados da literatura indicam que a inibição ou a produção deficiente de NO, no organismo pode ser responsável por uma série de transformações que atuam em sinergia com outros fatores de risco cardiovasculares para a incidência de eventos como acidente vascular encefálico (AVEs), infartos e vasoespasmos (RAMOS et al., 2006). O aumento da resistência vascular sistêmica ou mesmo localizada é capaz de induzir um aumento compensatório da liberação local do NO que se contrapõe à vasoconstrição, revelando um importante mecanismo fisiológico de regulação do tônus vasomotor e, conseqüentemente, da resistência vascular e pressão arterial (RAMOS et al., 2006).

O endotélio vascular é uma monocamada de células que reveste os vasos sanguíneos e que separa a corrente circulatória do músculo liso vascular, não constitui simplesmente uma membrana de diálise, mas possui intensa atividade metabólica. Estando envolvido na síntese e/ou no metabolismo de diversos mediadores endógenos tais como o NO, as prostaglandinas e as endotelinas.

Diversas substâncias derivadas do endotélio parecem estar envolvidas na modulação fisiológica do controle local do tônus e do fluxo vascular: a) substâncias vasodilatadoras – NO e a prostaciclina (PGI_2); b) substâncias vasoconstritoras – endotelina e tromboxano A_2 , por exemplo. Estas substâncias, que são, em alguns casos, produzidas continuamente pelas células endoteliais em pequenas quantidades, podem ser liberadas em quantidades bem maiores por estímulos mecânicos e humorais (BEVAN et al., 1994).

A descoberta de fatores endógenos derivados do endotélio, em especial o NO (FURCHGOTT et al., 1980), iniciou um novo capítulo na compreensão dos mecanismos das doenças cardiovasculares e dos métodos de prevenção e tratamento, foi originalmente identificada como um fator endotelial relaxante do músculo liso vascular e é um importante mediador da sinalização intracelular em vários tecidos (SOUZA et al., 2007).

O óxido nítrico é um mediador generalizado produzido em diversos tecidos biológicos por uma das três isoformas de sintase de NO (GUIX et al. 2005; ŠIMKO, 2007). Três isoformas de NOS foram descritas até hoje, sendo as isoformas endotelial (NOS_1) e neuronal (NOS_3) denominadas constitutivas (cNOS), ao passo que a NOS_2 é conhecida com NOS indutiva (iNOS). As cNOS produzem NO em quantidades pico-nanomolares por curtos períodos, por mecanismo dependente de cálcio; iNOS produz NO em grande quantidade e por longo tempo, uma vez que ocorra ativação celular por estímulos inflamatórios como citocinas e lipopolissacarídeo. A produção de NO via cNOS está relacionada à homeostase, enquanto a produção de NO via ativação da iNOS está ligada a fenômenos fisiopatológicos (ROCHA et al., 2003).

A sintase do NO endotelial ou tipo-III (eNOS ou NOS_{III}) foi originalmente identificada no endotélio vascular, sua ativação regula a resistência vascular, e também é Ca^{2+} /calmodulina dependente. No SNC está predominantemente presente no endotélio dos vasos cerebrais, em algumas populações de neurônios (DINERMAN et al., 1994) e em células da glia (WIENCKEN et al., 1999).

Na tentativa de entender a gênese e manutenção da hipertensão arterial, diversos estudos têm focado a participação de substâncias moduladoras da neurotransmissão dos reflexos cardiovasculares no núcleo do trato solitário (NTS), incluindo o NO. A descoberta de que o NO funciona como uma molécula

sinalizadora no SNC mudou radicalmente o conceito de neurotransmissão (ESPLUGUES et al., 2002). Além do seu papel na neurotransmissão e controle hemodinâmico, o NO participa na regulação da proliferação e crescimento celular (PECHÁŇOVÁ; ŠIMKO, 2007).

Partindo das suas propriedades físicas, o NO não é estocado em vesículas lipídicas e liberado por exocitose, também não é metabolizado por enzimas hidrolíticas. Uma vez sintetizado difunde-se, podendo agir na própria célula em que foi produzido ou em células adjacentes (neurais ou não). Sua inativação ocorre pela reação com um substrato (DIAS et al., 2006). A vida média do NO é muito curta, cerca de seis segundos, reagindo rapidamente com o oxigênio e sendo oxidado a nitrito (NO_2^-), molécula bem mais estável (vida média de horas). No sangue, liga-se rapidamente à hemoglobina (afinidade 3 mil vezes maior que a do oxigênio), sendo convertida em nitrato (NO_3^-), com vida média de seis horas, e é eliminado pela urina (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987).

Foi demonstrado que a redução da síntese crônica de NO com inibidores farmacológicos da sintase de NO como o L-NAME, resultou em alterações metabólicas, hipertensão e hipertrofia miocárdica (BERNÁTOVÁ et al., 1999b, ŠIMKO; ŠIMKO, 2000; KUNESŠ et al., 2004), reduziu o vasorelaxamento (BERNÁTOVÁ et al., 2002; GEROVÁ et al., 2004; TÖRÖK ; KRISTEK, 2002; PAULIS et al. 2006) e espessamentos da parede dos vasos (BERNÁTOVÁ et al., 1999a, GEROVÁ; KRISTEK 2001; ŠIMKO et al., 2007). Além disso, a redução da síntese de NO leva à remodelação de miócito (FIALOVÁ et al., 2007), angiogênese, danos mitocondriais e fibrose miocárdica (OKRUHLICOVÁ et al., 2000; TRIBULOVÁ et al., 2000).

O NO, além de sua potente ação vasodilatadora, promove outros importantes efeitos vasculares, renais e cardíacos, incluindo a ação antiagregante plaquetária, a modulação do ritmo de filtração glomerular e o efeito sobre os remodelamentos vascular e cardíaco (BARTUNEK et al., 2000; HU et al., 2005). Por sua vez, a diminuição endógena da produção do NO está relacionada à redução da vasodilatação endotélio-dependente em pacientes com hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes ou arteriosclerose (MONCADA et al., 1993):

Com relação ao remodelamento cardíaco, o NO parece ser um importante fator endógeno na modulação do crescimento hipertrófico, tanto de modo indireto, por meio de seu efeito hipotensivo, via dilatação arterial periférica,

promovendo diminuição da pós-carga, como pela dilatação do sistema venoso, diminuindo a pré-carga (MATSUOKA et al., 1996; PEREIRA et al., 2001). Adicionalmente, outros estudos demonstraram que o NO também participaria do remodelamento cardíaco por meio mais direto, uma vez que sua diminuição promoveria alterações morfológicas significativas, como focos de necrose, aumento da fibrose, apoptose, diminuição da angiogênese cardíaca e conseqüente hipertrofia patológica (AKUZAWA et al., 1998; KURISU et al., 2003). Entretanto, os efeitos da inibição tanto aguda como crônica da síntese de NO com análogos da L-arginina, como N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) ou L-NAME, que resultam em conseqüente elevação da PA, apresentam dados controversos na literatura no que se refere ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca (DE OLIVEIRA et al., 2000; SIMKO et al., 2005).

É possível que o tempo de inibição da síntese do NO por sete dias não seja suficiente para induzir hipertrofia (SOUZA et al., 2007). No entanto diversos autores demonstraram a existência de hipertrofia cardíaca promovida pelo bloqueio crônico da síntese de NO em estudos com mais de quatro semanas de tratamento, embora com doses diárias de L-NAME menores que 50 mg/kg (HU et al., 2005).

O músculo liso é o principal tipo de músculo que controla e regula o funcionamento da maioria dos órgãos do corpo, representa uma ferramenta útil para a investigação de atividades biológicas de substâncias de qualquer fonte, seja natural ou sintética (WATTERSON et al., 2005). A contração do músculo liso é dependente do aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular através do influxo extracelular e liberação de cálcio dos estoques intracelulares (SOMLYO; SOMLYO, 1994), possui uma papel importante na regulação e manutenção da pressão arterial (SONKUSARE et al., 2006). O tônus miogênico das pequenas artérias e arteríolas podem iniciar a primeira elevação da pressão arterial e ainda elevar a resistência vascular periférica e os níveis de pressão (GEBREMEDHIN et al., 1990; HAYASHI et al., 1992, 1996).

A atividade contrátil de células musculares lisas de artérias e arteríola é o principal determinante da resistência ao fluxo sanguíneo através da circulação. Assim, o tônus vascular desempenha um papel importante na regulação da pressão arterial e da distribuição do fluxo sanguíneo entre e dentro dos tecidos e órgãos do corpo. A regulação da atividade contrátil das células musculares lisas na circulação sistêmica é dependente de uma complexa interação de substâncias vasodilatadoras

e vasoconstrictoras, estímulos de hormônios circulantes, neurotransmissores e de fatores derivados do endotélio que regulam a pressão arterial (JACKSON, 2000).

Todos estes sinais são integrados por células musculares vasculares para determinar a atividade do aparato contrátil, o diâmetro e resistência ao fluxo dos vasos sanguíneos. Os canais iônicos desempenham um papel central neste processo. Como em todas as células musculares, a musculatura lisa vascular utiliza íons Ca^{2+} como um mecanismo de acionamento do processo de contração. O Influxo de cálcio através de canais Ca_v na membrana plasmática e liberação de cálcio dos estoques intracelulares são as principais fontes para a ativação do mecanismo da contração (JACKSON, 2000).

Os estudos iniciais sobre a regulação da contração no músculo liso mostraram que o íon Ca^{2+} , semelhante ao que ocorre no músculo estriado, é o mensageiro secundário do processo de contração. Todavia, verificou-se que as troponinas, entre elas a troponina C, conhecido alvo intracelular para o Ca^{2+} no músculo estriado, não existiam no músculo liso e que os filamentos de actina e miosina não interagem entre si da mesma forma que no músculo estriado (EBASHI 1960; MURPHY, 1976). Com a descoberta da calmodulina (CaM) (CHEUNG, 1970; KAKIUCHI; YAMAZAKY, 1970), uma proteína ligante de Ca^{2+} no músculo liso, demonstrou-se à correlação existente entre a fosforilação da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) e o início da contração. Um aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) induzido por um estímulo qualquer promove a ligação do Ca^{2+} à CaM, formando assim o complexo $(\text{Ca}^{2+})_4/\text{CaM}$. Este sofre uma alteração conformacional e ativa a MLCK, enzima, que através da transferência de um grupo fosfato do trifosfato de adenosina (ATP), fosforila o sítio regulatório (LC20) da cadeia leve da miosina (MLC). A MLC fosforilada desencadeia o mecanismo de ciclização das pontes entre os filamentos de actina e miosina, ocorrendo o deslizamento destes filamentos com conseqüente desenvolvimento de força ou contração do músculo (JOHNSON; SNYDER, 1995). A diminuição dos níveis de Ca^{2+} para os níveis basais desativa a MLCK. O relaxamento do músculo liso ocorre através da ação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), que desfosforila a LC20. Esta reação é relativamente lenta, por isso as contrações do músculo liso são tipicamente mais sustentadas e se dissipam mais lentamente que as do músculo estriado (GARRET ; GRISHAM, 1995).

Um dos mecanismos envolvido no relaxamento muscular é a hiperpolarização de membrana que pode ocorrer em função da liberação do NO, que ativa diretamente a CG; ou no caso dos agonistas que induzem relaxamento, ao ligarem-se aos seus receptores promovendo ativação direta da CG ou AC, resultando na formação do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e monofostato cíclico de adenosina (AMPc), respectivamente. O aumento na [GMPc] ativa a PKG, enquanto que o aumento da [AMPc]_i ativa tanto a PKA como a PKG, que resulta na ativação de canais de K⁺ na membrana plasmática e consequente hiperpolarização. A hiperpolarização reduz o influxo de Ca²⁺ através dos canais Ca_v do tipo L, diminuindo portanto a [Ca²⁺]_i, e a fosforilação da miosina e a contração (REMBOLD, 1996).

Os mecanismos de relaxamento envolvidos no acoplamento fármaco-mecânico incluem: (1) Aumento na atividade da enzima Ca²⁺-ATPase (bomba de Ca²⁺) tanto do retículo sarcoplasmático (RS) como da membrana plasmática através da PKG, levando a um aumento do sequestro e da extrusão de Ca²⁺, respectivamente, diminuindo assim a [Ca²⁺]_i; (2) Diminuição da formação do 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) e conseqüente diminuição da liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares; (3) Redução da [Ca²⁺]_i pelo AMPc por diminuir o influxo de Ca²⁺, indiretamente por hiperpolarização ou por agir diretamente nos Ca_v do tipo L (REMBOLD, 1996).

A etiologia da hipertensão é desconhecida e a doença pode evoluir a partir da interação de fatores genéticos com fatores ambientais. Na verdade, inúmeros fatores endócrinos, reflexos neurais e anormalidades vasculares podem contribuir para hipertensão essencial. No entanto, independentemente dessas origens diversas, uma característica em todas as formas de hipertensão é um tônus vascular anormal que é mediado pelo influxo de Ca²⁺ - através dos canais Ca_v.

Durante a patogênese da hipertensão o aumento no influxo de Ca²⁺ pode fomentar o desenvolvimento de um tônus vascular anormal e elevação da resistência vascular periférica. O conhecimento sobre os canais Ca_v no sistema cardiovascular tem sido revolucionado nas últimas duas décadas pela disponibilidade da biologia molecular. Esse conhecimento lançou as bases para compreensão da relação entre a estrutura e função dos canais-Ca_v na vascularização e na regulação da pressão arterial (SONKUSARE, 2006). Os canais Ca_v são necessários para o acoplamento excitação-contração em vários tipos celulares como no coração, músculo esquelético e músculo liso vascular e não vascular (CURTIS et al., 1984; CATERRAL; PERES-REYES, 2005).

Anormalidades nos canais para Ca^{2+} são consideradas como parte da extensão biológica e adaptações morfológicas que caracterizam a vascularização durante a patogênese da hipertensão, ocorrem quando aumentos agudos da pressão arterial e as pequenas artérias e arteríolas mostram um imediato estiramento dependente da despolarização e constrição denominado por resposta miogênica que dependem da abertura de canais para cálcio sensíveis a voltagem Ca_v na musculatura lisa vascular (NELSON et al., 1990; WANG et al., 1999).

A função dos Ca_v no processo de contração e elevação da pressão ficou evidente pela ausência de tônus miogênico nas artérias de ratos em que o gene para o canal ($\text{Ca}_v1.2$) foi inativado (MOOSMANG et al., 2003). A resposta miogênica dos diferentes leitos vasculares desempenha um papel central na regulação dos níveis de pressão arterial durante a progressão da hipertensão. No entanto, se a pressão arterial não é restaurada para níveis normais por mecanismos compensatórios neurais e renais, as células musculares lisas parece sofrerem uma adaptação ou uma remodelagem elétrica como uma resposta adaptativa para manter os níveis de tensão elevados (COX; RUSCH, 2002).

A contração muscular é controlada pelas concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} , visto que, o cálcio aciona o aparato contrátil. Os canais Ca_v são uma superfamília de canal formado por pelo menos 10 membros, divididos em alta e baixa voltagem, com uma seqüência de aminoácidos homóloga e sensibilidade à ativação pela despolarização da membrana. O grupo ativado pela alta voltagem consiste em canais sensíveis a dihidropiridina – Ca_v1 (tipo- L, $\text{Ca}_v1.1 - 1.4$) e insensível Ca_v2 (P, Q, R, N – tipo-T, $\text{Ca}_v2.1 - 2.3$). Os Ca_v1 e Ca_v2 são canais que exigem uma maior despolarização de membrana para que ocorra a ativação em relação aos canais tipo-T, que necessitam de uma baixa despolarização, que incluem $\text{Ca}_v3.1 - 3.3$ (PEREZ – REYES, 2003).

O retículo sarcoplasmático (RS) é a principal fonte de cálcio intracelular, a liberação de cálcio dessa organela ocorre através dos canais para cálcio sensíveis a rianodina ou a IP_3 (FLYNN et al., 2001). Os receptores de IP_3 são as principais meios de liberação de cálcio dos estoques intracelulares (DELLIS et al., 2006). O IP_3 é um segundo mensageiro formado pela ativação de um receptor de membrana acoplado a proteína G (GPCR), principalmente aqueles acoplados a proteína $G_{q/11}$ que após a ativação de uma enzima denominada fosfolipase C (PLC) que promove a hidrólise de fosfolípidios de membrana (PIP_2) dando origem ao IP_3 e diacilglicerol

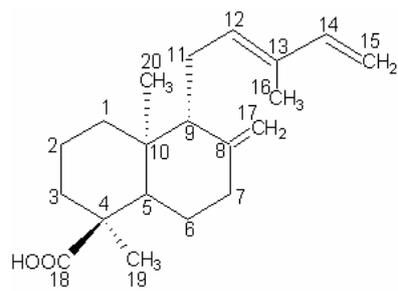
(DAG) (BARRIDGE, 2005). Os receptores rianodínicos são ativados pelo Ca^{2+} liberado através dos receptores sensíveis a IP_3 , processo esse chamado de liberação de cálcio induzida por cálcio (CIRC) (MCHALE et al., 2006).

Os Canais para potássio pertencem a uma grande família das proteínas de membrana que tem um papel importante em vários processos fisiológicos como na liberação de neurotransmissores, excitabilidade celular, secreção de hormônios, frequência cardíaca, reatividade vascular e tônus do músculo liso (LOGSDON et al., 1997). Esses canais são de extrema importância para a regulação do tônus do músculo liso (JACKSON, 2000; JACKSON, 2001), pois são os canais iônicos dominantes na membrana plasmática de células musculares lisas, a corrente através destes canais contribui substancialmente para o potencial de membrana dessas células (JACKSON, 2005).

É importante lembrar que apenas pequenas mudanças no estado de equilíbrio da membrana são necessárias para produzir mudanças significativas no potencial. O potencial de membrana por sua vez, regula a atividade de tensão - fechando canais para Ca^{2+} , controlando o influxo e efluxo de Ca^{2+} . Em células musculares lisas, em virtude do gradiente do K^+ , a abertura de canais para K^+ leva a um efluxo de K^+ na célula e uma hiperpolarização de membrana. Este processo diminui a tensão fechando canais para Ca^{2+} , reduzindo os níveis de cálcio intracelular e levando a uma vasodilatação. Inversamente, o fechamento de canais para K^+ causa despolarização de membrana, abrindo canais para Ca^{2+} levando a uma vasoconstrição (JACKSON, 2005).

Estudos ao longo dos últimos 20 anos têm identificados pelo menos quatro diferentes classes de canais para K^+ expressos nas células arteriolares do músculo liso. Estes incluem: Canais para potássio retificadores de entrada (K_{IR}), canais para potássio sensível ao ATP- (K_{ATP}), canais para potássio ativados pelo cálcio (K_{Ca}) e canais para potássio ativado por voltagem (K_{V}) (JACKSON, 2005).

Baseados nos resultados obtidos com o diterpeno labdano-302 em ratos normotensos, onde foi observada uma ação hipotensora e vasorelaxante, e aliado a busca constante de novas alternativas no tratamento da hipertensão arterial. A proposta deste estudo foi investigar o efeito de labdano-302 sobre a hipertensão arterial induzida em ratos, propondo mecanismo de ação para a ação hipotensora e vasorelaxante deste diterpeno.



Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo diterpeno labdano-302 através de uma abordagem *in vivo* e *in vitro* em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME), além de elucidar os mecanismos de ação implicados nas respostas obtidas.

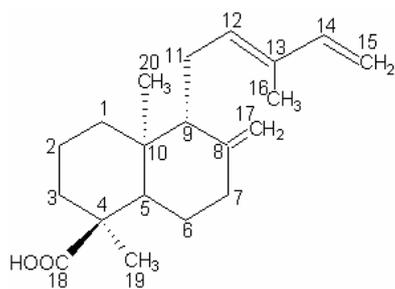
2.2 Específicos

Testes *in vivo*

- Caracterizar o efeito de labdano-302 sobre a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) não anestesiados.

Testes *in vitro*

- Avaliar o efeito de labdano-302 sobre a resposta relaxante em artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME), avaliando:
 - A influência dos fatores relaxantes derivados do endotélio
 - A participação dos íons cálcio na resposta relaxante induzida por labdano-302.
 - A participação dos canais para potássio na resposta vascular induzida por labdano-302.
 - A participação das proteínas cinases (PKA e PKG) no vasorelaxamento induzido por labdano-302.



Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) normotensos, pesando entre (200-300 g), todos provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba – LTF/UFPB.



Figura 3 - *Rattus norvegicus*

Todos os animais eram mantidos sob condições controle de temperatura (21 ± 1 °C), em um ciclo claro e escuro de 12 horas (6h00 às 18h00), e com livre acesso a água e a alimentação. Os experimentos eram realizados no período de 7h00 às 17h00 (*in vivo*) e de 7h00 às 19h00 (*in vitro*).

Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF (CEPA), certidão número 0101/07.

3.2 Drogas e Reagentes

Durante o desenvolvimento dos experimentos foram utilizadas diversas ferramentas farmacológicas tais como: tiopental sódico (Cristália), sal sódico de haptarina (Roche), cloridrato de L (-) fenilefrina, sulfato de atropina, cloridrato de acetilcolina, L-NAME (N^G-nitro-L-arginina-metil éster), nitroprussiato de sódio (NPS), indometacina, ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo-[4,3-a] Quinoxalin -1 – One), cloridrato de L-arginina, cafeína (CAF), glibenclamida (GLIB), tetraetilamônio (TEA), 4-aminopiridina, cloreto de bário (BaCl₂), PTIO, cremofor e dimetil sulfoxido, H-89 (N-[2-((p-bromocinnamyl)amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide 2-HCl), BayK8644 S-(-)-1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-3-ácido piridinecarboxílico ester metílico, KT5823 (Todos Sigma-aldrich St. Louis, MO, EUA).

Para preparação das soluções, a indometacina foi dissolvida em bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 5% em água destilada. O ODQ, H-89, KT5823 e glibenclamida foram dissolvidos em dimetil sulfoxido (DMSO). As demais substâncias utilizadas foram dissolvidas em água destilada. Todas as soluções foram mantidas em temperatura de 0°C e por ocasião da realização dos experimentos, eram diluídas em salina ou água destilada, para os ensaios *in vivo* ou *in vitro*, respectivamente. Vale ressaltar que os veículos utilizados não ultrapassaram 1% na concentração final, nesta concentração eram desprovidos de efeito biológico.

3.3 Soluções Nutritivas

Para a preparação das soluções nutritivas de baseou-se na metodologia desenvolvida por TANAKA et al., 1999. Os sais utilizados em todas as preparações das soluções nutritivas foram: cloreto de sódio (NaCl, 158,3 mM), cloreto de potássio (KCl 4 mM), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl₂ 2 mM), cloreto de magnésio hexa-hidratado (MgCl₂ 1,05 mM), glicose (C₆H₁₂O₆ 5,6 mM) (Merck, darmstadt, Alemanha), bicarbonato de sódio (NaHCO₃ 10 mM), fosfato de sódio mono-hidratado (NaH₂PO₄ 0,42 mM) (todos da Merck (Darmstadt Alemanha)), ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA 1mM), (Sigma-aldrich St. Louis, MO, EUA). No preparo das soluções despolarizantes de Tyrode com cloreto de potássio a 20 mM, 60 mM ou 80 mM, a concentração de Na⁺ foi isosmoticamente alterada. Nas soluções livres de Ca²⁺ foi omitida a adição de CaCl₂ e adicionou-se 1 mM de EDTA.

Porém no preparo de soluções nominalmente sem cálcio apenas omitiu-se o CaCl_2 . Após o preparo das soluções media-se o pH e era feito o ajuste para 7,4, quanto necessário.

3.4 Preparação do labdano-302

O diterpeno labdano-302 foi solubilizado em cremofor (3%) e dissolvida em água destilada na concentração 10^{-1} M (solução estoque), para os experimentos *in vitro*, e em solução salina na dose de 30 mg/kg para os experimentos *in vivo*. A solução estoque era mantida a 0°C, e de acordo com a necessidade de cada experimento eram realizadas as diluições. A concentração final de cremofor na cuba não excedeu 0,01%.

3.5 Ensaio Farmacológicos

Foram utilizadas duas diferentes formas de abordagens, uma com ensaios farmacológicos *in vivo*, utilizando animais íntegros, e outra com ensaios farmacológicos *in vitro*, utilizando anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e ratos hipertensos (L-NAME).

3.6 Indução de hipertensão pela inibição da enzima sintase de NO com L-NAME.

Foram utilizados ratos normotensos *Wistar* pesando entre (200-300g), que foram tratados com L-NAME na dose de 50 mg/kg adicionados na água de beber durante uma semana (7 dias), tempo suficiente para instalação da hipertensão arterial (DANANBERG et al., 1993). Durante a primeira semana deste estudo, foi feito o acompanhamento de rotina dos animais com o objetivo de verificar se o tratamento com L-NAME promoveria alguma alteração no peso corporal. No final de uma semana do tratamento os animais foram submetidos aos diversos protocolos *in vivo* ou *in vitro*.

3.7 Procedimento experimental

3.1.1 Medida Direta da Pressão Arterial (PA) e Freqüência Cardíaca (FC) em Ratos não-anestesiados

Os ratos normotensos ou hipertensos (L-NAME) foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.) para procedimento cirúrgico que consiste na implantação de cateteres de polietileno (PE) na veia cava superior e aorta abdominal. Um segmento de catéter PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente) foi soldado a um segmento de catéter PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente) em seguida fez-se a implantação dos mesmos na aorta abdominal e na veia cava inferior, via artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal (*scapulae*).

A PA e FC foram medidas 24 h após o procedimento cirúrgico pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (Statham P23 ID; Gould, Cleveland, OH, EUA) acoplado a um amplificador (Modelo TBM-4M, WPI, Sarasota, FL, EUA) e conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital (CIO-DAS16/JR, Computer Boards, Inc., Mansfield, MA, EUA) e com o programa CVMS (WPI, Sarasota, FL, EUA) (figura 4). A freqüência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou pressão arterial sistólica, diastólica e média, e o intervalo de pulso (referido como freqüência cardíaca). O cateter venoso foi implantado para a administração das drogas.

3.7.2 Efeito de labdano-302 sobre a PAM e FC em ratos normotensos ou hipertensos (L-NAME) não-anestesiados.

Para obtenção de uma curva dose-resposta controle, os animais foram mantidos em aclimatação por um período de no mínimo 30 min., para estabilização dos parâmetros cardiovasculares, e em seguida administrou-se nitroprussiato de sódio (10 µg/kg, i.v.) para verificar a eficácia da implantação do cateter venoso. Após o retorno dos parâmetros hemodinâmicos dos animais, doses crescentes de

labdano-302 (5, 10, 20 e 30 mg/kg, i.v.) foram administradas randomicamente com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores da linha de base (figura 4). O tempo de retorno dos parâmetros cardiovasculares observado após a administração de labdano-302 era em torno de 20 minutos. Os valores de PAM, FC foram computados antes (valores da linha de base) e imediatamente após a administração da substância, e suas variações foram expressas em porcentagem para cada dose. Para o cálculo dos valores percentuais de PAM e FC, utilizou-se as equações 1 e 2, respectivamente.

$$(1) \text{ Valores de PAM (\%)} = \frac{\text{PAM depois} - \text{PAM antes}}{\text{PAM antes}} \times 100$$

PAM antes

$$(2) \text{ Valores de FC (\%)} = \frac{\text{FC depois} - \text{FC antes}}{\text{FC antes}} \times 100$$

FC antes

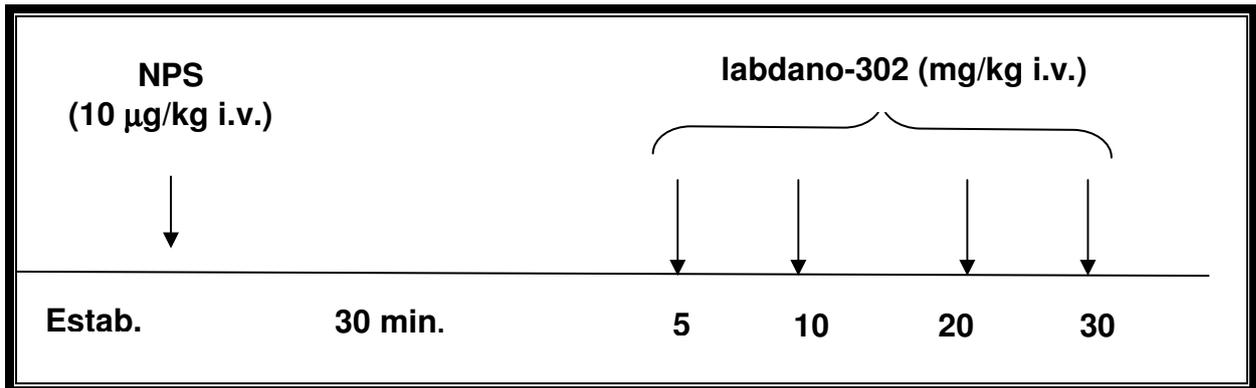


Figura 4 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de labdano-302 sobre PAM e FC em ratos normotensos ou hipertensos (L-NAME) não-anestesiados.

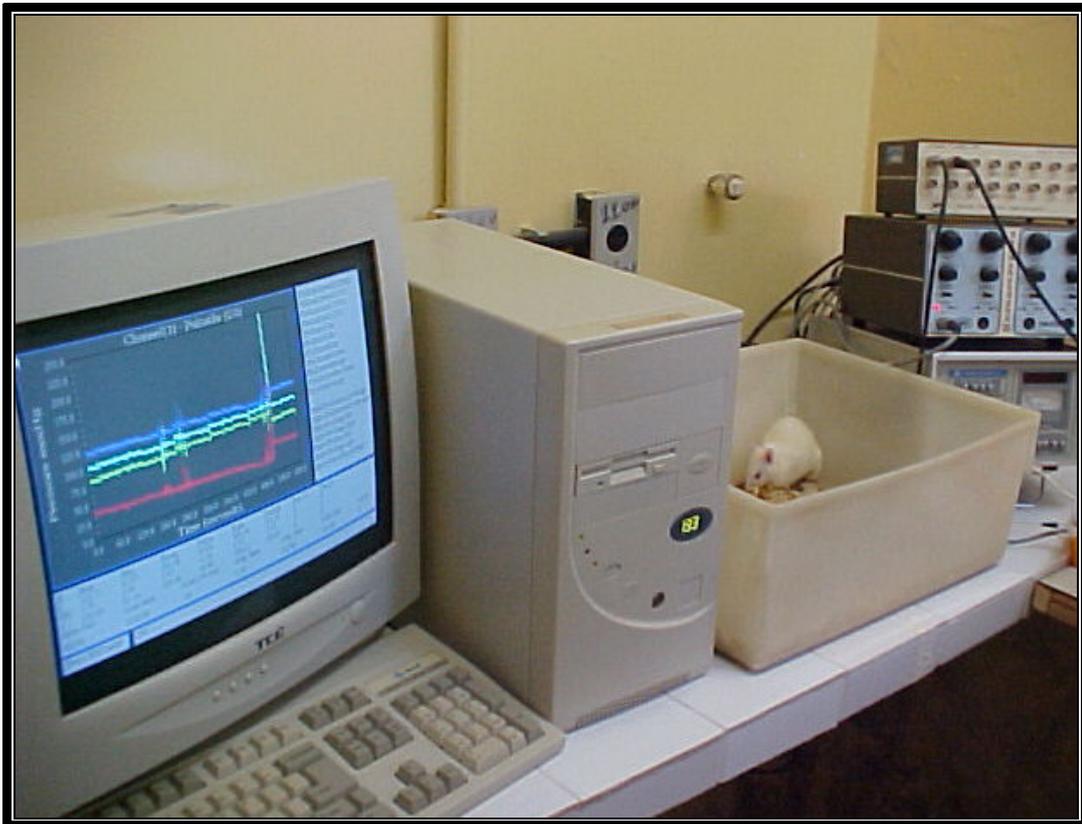


Figura 5 – Aparato utilizado para aquisição dos valores de PAM e FC em ratos

3.7.3 Preparação de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio vascular.

Os ratos foram sacrificados por concussão cerebral seguida por secção dos vasos cervicais. Após uma incisão no abdome do animal, a artéria mesentérica superior foi retirada e livre de tecido conectivo e adiposo (Figura 6), foi seccionada em anéis do primeiro segmento da artéria (1 - 2 mm). Os anéis foram mantidos em cubas contendo 10 mL de solução de Tyrode, a 37° C e gaseificada com uma mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂ (carbogênio) (Figura 7). Esses anéis foram suspensos por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA) para o registro das tensões isométricas (Figura 8). Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de 60 min. Durante este tempo, as soluções nutritivas foram trocadas a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após obtenção de uma curva concentração-resposta com a fenilefrina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME), antes da verificação da presença do endotélio vascular, observou-se que a concentração de (3×10^{-6} M) de fenilefrina induzia uma contração de magnitude semelhantes em 95% das preparações, em comparação com as contrações obtidas com (10 µM) de fenilefrina em anéis mesentéricos de ratos normotensos, a partir dessa observação utilizou-se para todos os procedimentos de verificação do endotélio vascular a concentração de (3×10^{-6} M) de fenilefrina. Esta concentração de (3×10^{-6} M) é frequentemente relatada na literatura em estudo com anéis de artéria mesentérica superior de ratos hipertensos (L-NAME) (HEIJENBROK et al., 2000). Os anéis sem endotélio vascular foram obtidos mecanicamente através do atrito entre as paredes internas do vaso com uma haste de metal. A presença do endotélio vascular foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de (10^{-9} a 10^{-5} M) de acetilcolina, visto que, a acetilcolina não promoveu um relaxamento satisfatório nos anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME), quando administrada em concentração única de (10 µM) que é comumente utilizada para verificação do endotélio vascular em anéis de artéria mesentérica de animais normotensos. A partir desta observação todos os protocolos realizados em anéis

mesentéricos de ratos hipertensos (L-NAME) foram seguidos deste procedimento para verificação do endotélio vascular.

Foram considerados com endotélio, os anéis com relaxamento superior a 80 % para ratos normotensos e de 60% para ratos hipertensos (L-NAME) da contração induzida por fenilefrina (3×10^{-6} M). Os anéis com relaxamentos inferiores a 10 %, foram considerados sem endotélio nos dois modelos estudados (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980, PRIVIERO et al., 2007). Nos anéis mesentéricos de ratos normotensos onde o relaxamento ficou entre 10 e 80 % foram descartados e para anéis mesentéricos de ratos hipertensos (L-NAME), relaxamentos entre 10 e 60% foram também descartados.



Figura 6 - Artéria mesentérica superior isolada de rato.

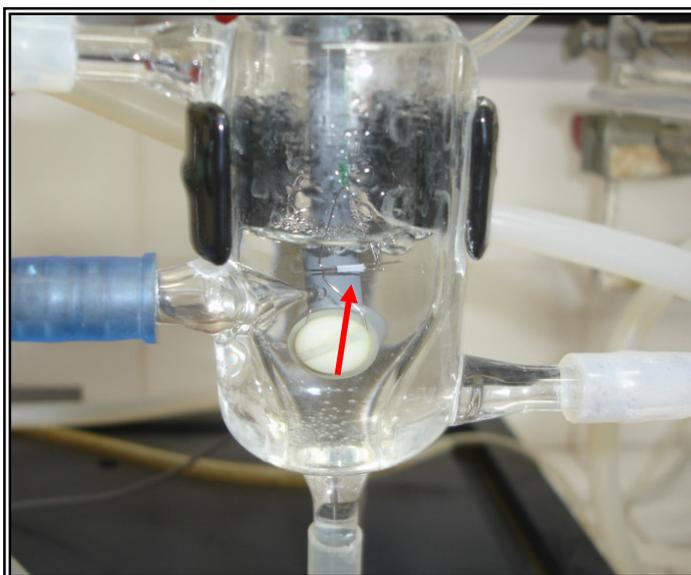


Figura 7 – Cuba para órgão isolado contendo anel de artéria mesentérica superior isolada de rato em solução de Tyrode.



Figura 8 - Aparato utilizado para registros de tensões isométricas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

3.8 Protocolos experimentais para estudos *in vitro*

3.8.1 Estudo da reatividade vascular da acetilcolina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos.

Os anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos foram pré-contraindidos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M), na fase tônica da contração adicionou-se cumulativamente concentrações crescentes de acetilcolina (10^{-9} – 10^{-5} M) para obtenção de uma curva concentração-resposta, obtida através de regressão não-linear dos valores médios.

3.8.2 Estudo da reatividade vascular da fenilefrina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos L-NAME.

Os anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos foram pré-contraindidos a adição cumulativa fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) para obtenção de curva concentração-resposta, após esse processo as preparações foram lavadas e ao retorno do tônus basal, repetiu-se esse procedimento para obtenção de uma nova curva concentração-resposta nos anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos ou hipertensos (L-NAME) na presença ou na ausência do endotélio vascular.

3.8.3 Avaliação da resposta contrátil da fenilefrina na presença de concentrações de labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos L-NAME.

Após a obtenção de uma curva controle com a fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M), as preparações foram lavadas e ao retorno dos valores do tônus basal, incubou-se por 30 minutos, separadamente concentrações de labdano-302. Após esse processo as preparações foram submetidas novamente a adição cumulativa de fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) para obtenção de uma segunda curva concentração-resposta.

3.8.4 Curva concentração-resposta do labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

Após obtenção de uma contração sustentada com fenilefrina ($10^{-9} - 10^{-5}$ M) (aproximadamente 40 minutos), concentrações crescentes de labdano-302 ($10^{-10} - 10^{-3}$ M) eram adicionadas às cubas de maneira cumulativa para obtenção de uma curva concentração-resposta na presença ou na ausência do endotélio vascular (Figura 9 A e B). A potência vasorelaxante de labdano-302 foi avaliada através dos valores de pD_2 e E_{max} na presença ou na ausência do endotélio vascular. Para a determinação do mecanismo de ação envolvido no vasorelaxamento de labdano-302, realizou-se este mesmo procedimento na presença de diversas ferramentas farmacológicas (Figura 10 A e B). Para cada ferramenta farmacológica, foram utilizadas diferentes preparações.

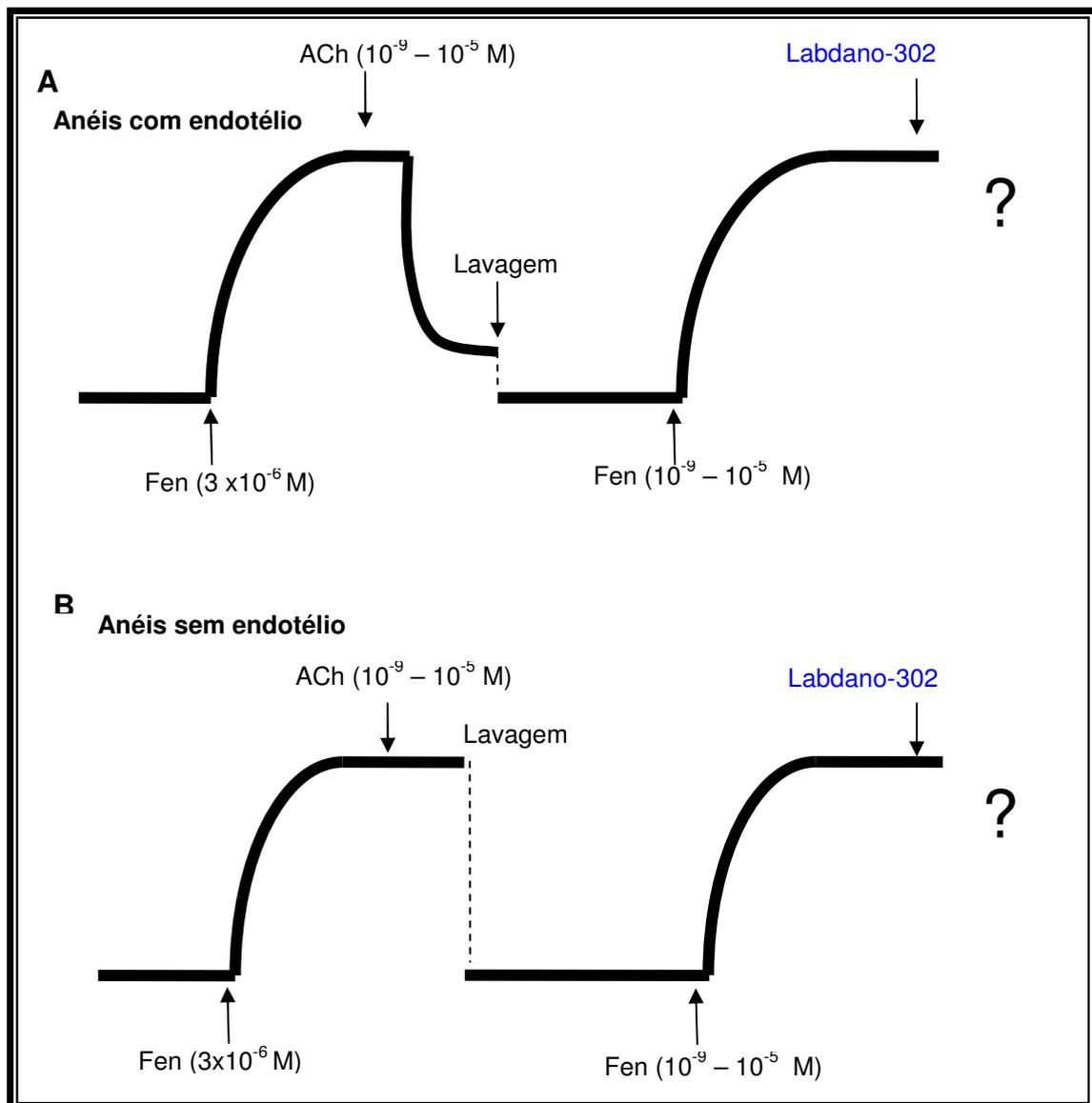


Figura 9 – Representação esquemática dos protocolos experimentais para verificação do efeito de labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos na presença e na ausência do endotélio vascular.

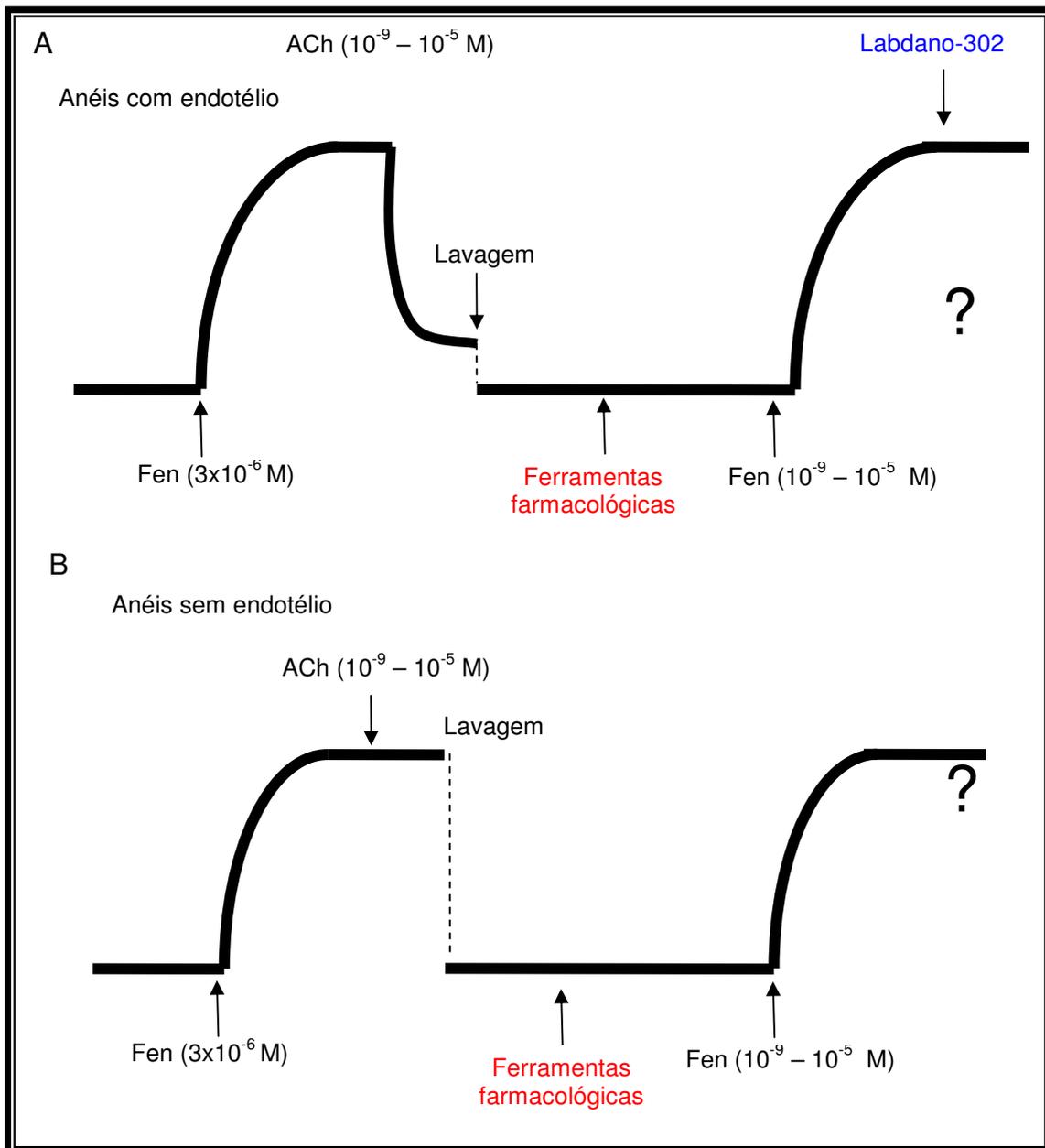


Figura 10 – Representação esquemática dos protocolos experimentais para avaliação do efeito de labdano-302 na presença de ferramentas farmacológicas diversas em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato com ou sem endotélio vascular.

3.8.5 Verificação da participação da enzima sintase de NO na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos L-NAME.

Após a verificação do endotélio vascular, as preparações foram pré-incubadas separadamente com L-NAME (100 μ M), um inibidor competitivo da enzima sintase de NO ou L-arginina (1 mM) substrato para a sintase de NO (MONCADA ; HIGGS, 1993) + L-NAME (100 μ M). Após trinta minutos de incubação induziu-se uma contração cumulativa com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M), na fase tônica e sustentada desta contração adicionou-se cumulativamente labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) para obtenção de uma curva concentração-resposta. As respostas obtidas foram comparadas com a curva controle, ou seja, na ausência de L-NAME ou L-NAME + L-arginina (Figura 10 A). A potência vasorelaxante do labdano-302 foi avaliada através dos valores de pD_2 e E_{max} na presença e na ausência de L-NAME ou L-NAME+L-arginina.

3.8.6 Verificação do envolvimento de NO na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

Após a observação da integridade do endotélio vascular, as preparações foram pré-incubadas com PTIO (300 μ M), um seqüestrador intracelular de óxido nítrico (IKEDA et al., 1997). Após 30 minutos as preparações foram submetidas a uma segunda contração cumulativa com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) em no componente tônico desta contração adicionava-se labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) cumulativamente (Figura 10A). A potência vasorelaxante do labdano-302 foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 e E_{max} na presença ou na ausência PTIO.

3.8.7 Verificação da participação da ciclase de guanilil na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

Após a observação da integridade do endotélio vascular, as preparações foram pré-incubadas com ODQ (10 μ M), um inibidor específico da ciclase de guanilil solúvel (GARTHWAITE et al., 1995). Decorridos 30 minutos as

preparações eram submetidas a uma segunda contração cumulativa com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) e no componente tônico desta contração adicionou-se labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) cumulativamente (Figura 10 A). A potência vasorelaxante do labdano-302 foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 e E_{max} na presença e na ausência de ODQ.

3.8.8 Verificação da participação da PKG na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

Após a observação da integridade do endotélio vascular, as preparações foram pré-incubadas com KT5823 (1 μ M), um inibidor seletivo da proteína cinase dependente de GMPc (SABRANE et al., 2003). Após 30 minutos de incubação as preparações foram submetidas a uma segunda contração cumulativa para a fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) e no componente tônico desta contração adicionava-se labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) cumulativamente (Figura 10A). A potência vasorelaxante do labdano-302 foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 e E_{max} na presença e na ausência de KT 5823.

3.8.9 Verificação da participação dos metabólitos da via do ácido araquidônico na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).

Após a verificação da integridade do endotélio vascular, as preparações foram previamente incubadas com indometacina (10 μ M), um inibidor não seletivo da enzima ciclooxigenase (COX) (CLARK; FUCHS, 1997). Após 30 minutos induziu-se uma contração cumulativa pra fenilefrina (10^{-9} a 10^{-5} M) e na fase tônica desta contração adicionou-se à cuba labdano-302 cumulativamente (Figura 10A). A potência vasorelaxante do labdano-302 foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 e E_{max} na presença e na ausência de indometacina.

3.8.10 Verificação da participação dos receptores muscarínicos no vasorelaxamento arterial induzido por labdano-302 em anéis mesentéricos de ratos hipertensos (L-NAME).

Após a verificação da integridade do endotélio vascular, as preparações foram previamente incubadas com atropina (1 nM), um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos (SAWAYER, 1999). Após 30 minutos induziu-se uma contração cumulativa com fenilefrina (10^{-9} a 10^{-5} M) e na fase tônica desta contração adicionou-se à cuba labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) cumulativamente. A resposta observada foi comparada com o registro controle obtido na ausência da atropina. (Figura 10A). A potência vasorelaxante do labdano-302 foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 e E_{max} na presença e na ausência de atropina.

3.8.11 Verificação da participação da PKA na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME).

Após a verificação da ausência do endotélio vascular, as preparações foram previamente incubadas com H-89 (1 μ M), um inibidor seletivo da proteína cinase dependente de AMPc – PKA (FETSCHER et al., 2001). Após 30 minutos de incubação induziu-se uma contração cumulativa para fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M) e na fase tônica desta contração adicionou-se à cuba labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) de maneira cumulativa (Figura 10B). A potência vasorelaxante do labdano-302 foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 e E_{max} na presença e na ausência de H-89.

3.8.12 Verificação da participação dos canais para potássio na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME).

Após procedimentos realizados para verificação da presença ou da ausência do endotélio vascular a solução de Tyrode da cuba era substituída por uma solução de KCl 20 mM que permanecia durante todo o experimento. Nesta concentração de potássio externo ocorre uma modulação do efluxo deste íon ocasionando assim uma atenuação do relaxamento induzido por ativadores de canais para potássio (CAMPBELL et al, 1996, CLARK; FUCHS, 1997). Após 20 minutos deste procedimento foi induzida uma contração com fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5}

M), em seguida adicionou-se cumulativamente labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) na fase tônica desta contração. A potência vasorelaxante do labdano-302 foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 e E_{max} na presença e na ausência de KCl 20 mM.

3.8.13 Verificação da participação dos canais para potássio sensível à voltagem- K_v na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME).

Os anéis sem endotélio foram pré-incubados por 30 minutos com (4-AP 1 mM), um inibidor dos canais para potássio sensíveis à voltagem- K_v . (BERG, 2002). Após 30 minutos deste procedimento foi induzida uma contração com fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M), na fase sustentada desta contração adicionou-se de maneira cumulativa labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) (Figura 10B). A potência vasorelaxante do labdano-302 foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 e E_{max} na presença e na ausência de 4-AP.

3.8.14 Verificação da participação dos canais para potássio sensível a ATP na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos L-NAME.

Os anéis sem endotélio vascular foram pré-incubados por 30 minutos com GLIB (10 μ M), um inibidor dos canais para potássio sensíveis ao ATP (IIDA, 2001). Após 30 minutos deste procedimento foi induzida uma contração com fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M), na fase sustentada da contração adicionou-se de maneira cumulativa labdano-302 (10^{-10} - 10^{-3} M), a resposta obtida foi então comparada com o controle na ausência da glibenclamida (Figura 10B). A potência vasorelaxante do labdano-302 foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 e E_{max} na presença e na ausência de glibenclamida.

3.8.15 Verificação da participação dos canais para potássio retificadores de entrada - K_{IR} na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME).

Os anéis sem endotélio vascular foram pré-incubados por 30 minutos com (BaCl₂ 30 μ M), um inibidor dos canais para potássio retificadores de entrada - K_{IR} (CHROSSOBOLIS, 2001). Após 30 minutos deste procedimento foi induzida uma

contração com fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M) na fase sustentada da contração adicionou-se de maneira cumulativa labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M), (Figura 10B). A potência vasorelaxante de labdano-302 foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 e E_{max} na presença e na ausência de $BaCl_2$.

3.8.16 Verificação da participação dos canais para potássio de baixa condutância sensível ao cálcio – SK_{Ca} na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME).

Os anéis sem endotélio vascular foram pré-incubados por 30 minutos com apamina (1 μ M), um inibidor dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de baixa condutância (IIDA, 2001). Após 30 minutos deste procedimento foi induzida uma contração com fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M), na fase sustentada da contração adicionou-se de maneira cumulativa labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M), (Figura 10B). A potência vasorelaxante de labdano-302 foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 e E_{max} na presença e na ausência de apamina.

3.8.17 Verificação da participação dos canais para potássio de grande condutância sensível ao cálcio – BK_{Ca} na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME)

Os anéis sem endotélio vascular foram pré-incubados por 30 minutos com TEA (1 mM), um inibidor dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de grande condutância (WHITE, 2002). Após 30 minutos deste procedimento foi induzida uma contração com fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M) na fase sustentada desta contração adicionou-se de maneira cumulativa labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M), a resposta obtida foi comparada com o controle na ausência do TEA (1 mM) (Figura 10B). A potência vasorelaxante do labdano-302 foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 e E_{max} na presença e na ausência de TEA.

3.8.18 Efeito de labdano-302 sobre as contrações induzidas por KCl 80 mM em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME).

Trinta minutos após a verificação da presença ou da ausência do endotélio vascular, o meio nutritivo de cada preparação era trocado por uma solução com elevada concentração de potássio (KCl 80 mM), que promove uma

despolarização da membrana plasmática gerando a ativação dos canais para cálcio sensíveis a voltagem (Ca_v), promovendo o influxo de Ca^{2+} gerando uma contração (REMBOLD, 1996). Este processo era então repetido com o objetivo de se obter duas contrações com magnitude similar para o KCl 80 mM. No componente tônico e sustentado da segunda contração com um tempo médio de 30 minutos para a estabilização era adicionado à cuba concentrações crescentes do diterpeno labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) de maneira cumulativa. A potência vasorelaxante do labdano-302 foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 e E_{max} obtidos para KCl 80 mM e Fenilefrina.

3.8.19 Efeito do labdano-302 sobre as contrações induzidas por $CaCl_2$ em artéria mesentérica de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

Após procedimentos realizados para verificação da ausência do endotélio vascular a solução de Tyrode da cuba foi substituída por uma solução com elevada concentração de potássio (KCl 60 mM), para obtenção de duas contrações com magnitude similar. As preparações eram lavadas por uma solução de Tyrode nominalmente sem cálcio e permaneciam nesta solução por 15 minutos. Após este período, as preparações eram lavadas novamente com uma solução de KCl 60 mM nominalmente sem cálcio por mais 15 minutos em seguida induzia-se uma curva cumulativa para $CaCl_2$ (10^{-6} – 10^{-2} M). Este procedimento era repetido para construção de uma segunda curva para o $CaCl_2$. Após esse processo eram adicionadas as cubas concentrações isoladas de labdano-302 (10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-5} e 10^{-3} M) por um período de incubação de 15 minutos, decorrido este tempo induzia-se novamente uma curva cumulativa de $CaCl_2$. (Figura 11). Os resultados foram avaliados comparando-se a porcentagem da resposta contrátil na presença do labdano-302 com àquela obtida pela amplitude média das curvas controle (na ausência do labdano-302).

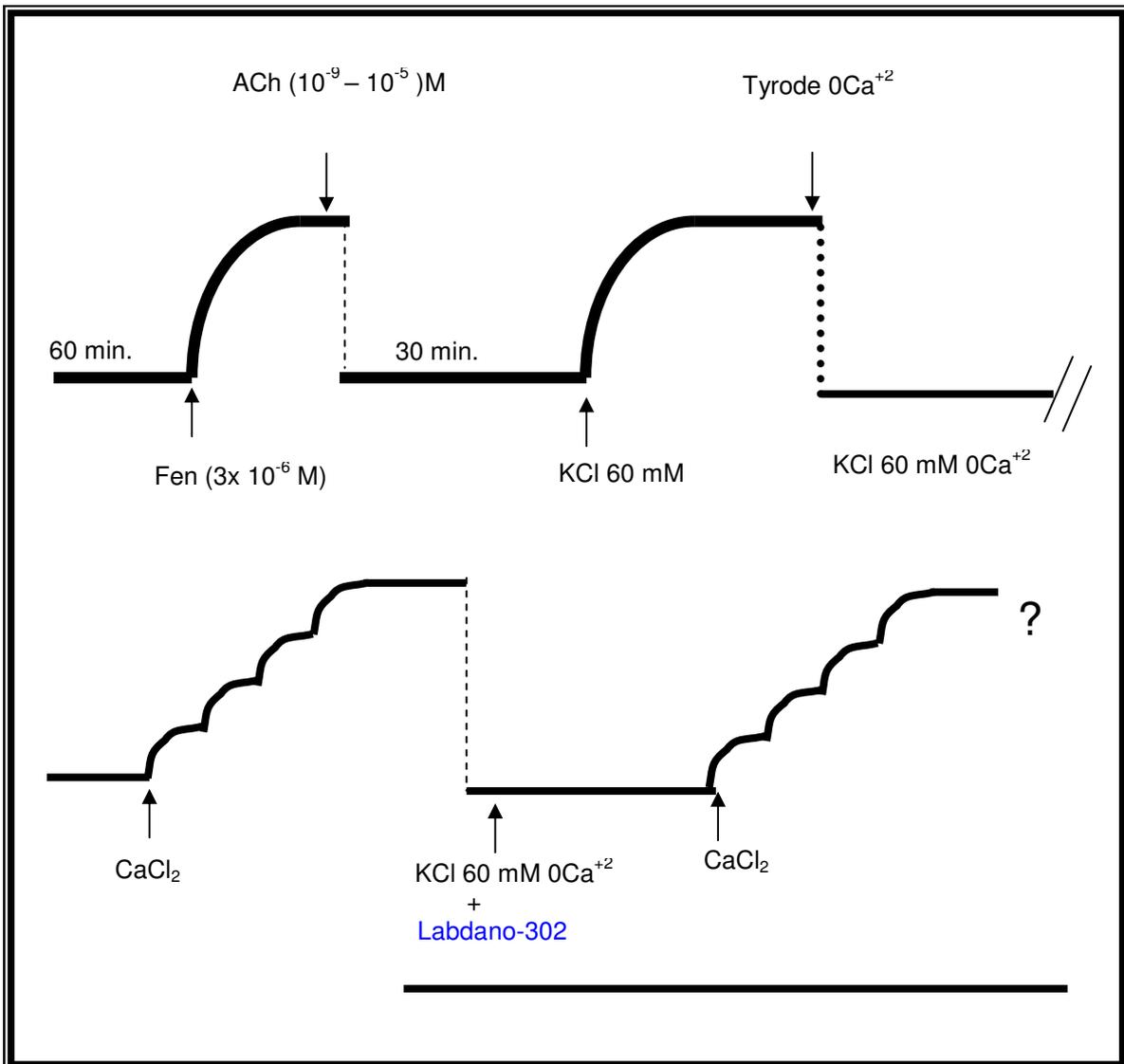


Figura 11 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para verificação do efeito de labdano-302 sobre contrações induzidas adição cumulativa de CaCl₂ em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular.

3.8.20 Efeito do labdano-302 sobre contrações induzidas por S-(-) BayK 8644 em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

Após a verificação da ausência do endotélio vascular. As preparações eram pré-incubadas com uma solução despolarizante de KCl 20 mM por 20 minutos, este procedimento é realizado para que se obtenha uma melhor resposta ao agente contrátil utilizado (BARRÚS et al., 1996), em seguida administrou-se às cubas o Bay

K8644 (10^{-7} μM) uma agonista de Ca_v (BARRUS et al., 1996), para obtenção de uma contração sustentada. Na fase tônica desta contração administrou-se labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) (figura 12). A potência vasorelaxante de labdano-302 foi avaliada através de comparação dos valores de pD_2 e E_{max} obtidos em preparações com anéis mesentéricos de ratos normotensos com os valores obtidos para ratos hipertensos (L-NAME).

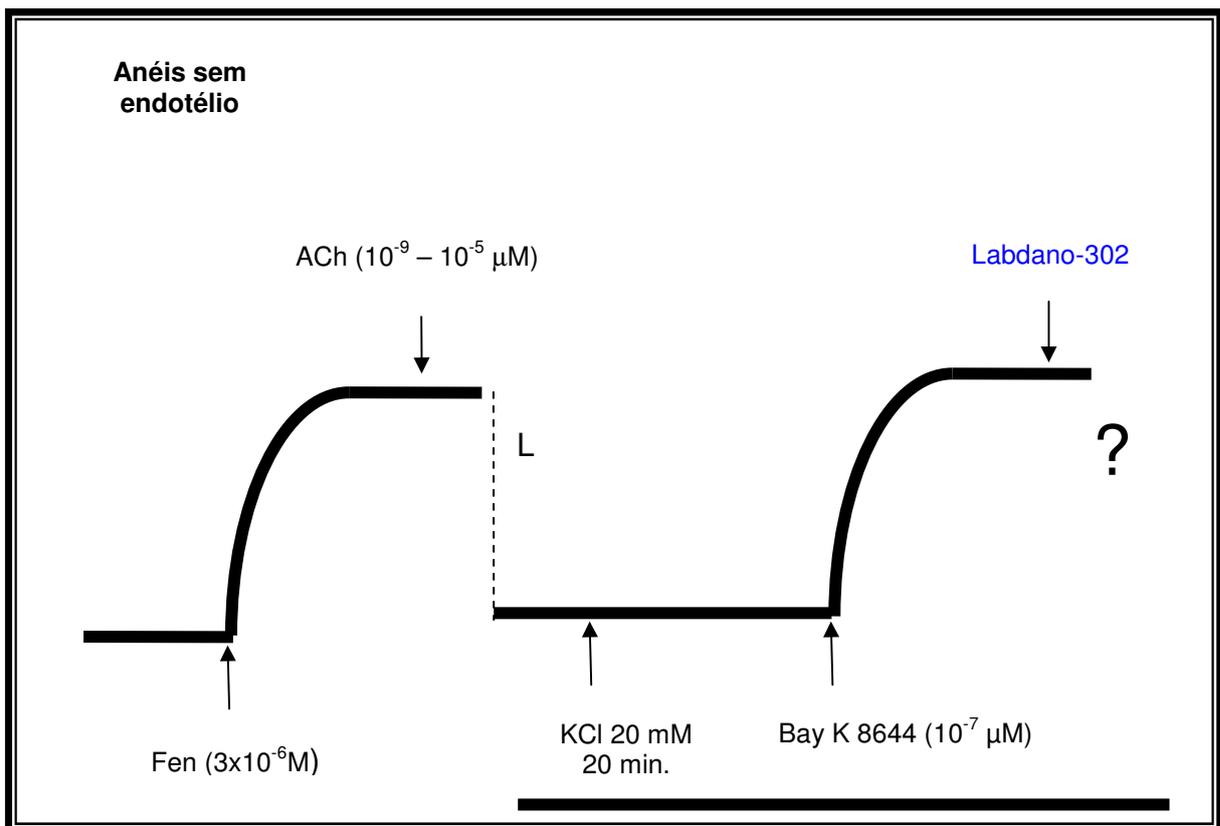


Figura 12 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para verificação do efeito de labdano-302 sobre contração induzida por BayK 8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular.

3.8.21 Verificação efeito do labdano-302 sobre as correntes para Ca^{2+} através dos canais $\text{Ca}_v\text{-L}$ em células GH_3 .

3.8.21.1 Cultivo das células GH_3

A linhagem de células GH_3 , proveniente de tumor de pituitária de rato, foram cultivadas em garrafas de cultura de plástico tratadas para adesão celular (250 mL), a 37°C em estufa umidificada e mantida com atmosfera de 5 % de CO_2 . Usou-se o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

suplementado com bicarbonato de sódio 1, 2 g/L; 10 % de soro fetal bovino (CULTILAB). Foram adicionados os antibióticos penicilina (5000 U/mL) e estreptomicina (5 mg/mL) para uma concentração final de cerca de 1 %. O meio foi trocado três vezes por semana e as células repicadas assim que começavam a confluir. O repique celular consistia de tratar as células com uma solução de tripsina (0,1 %) contendo EDTA (1 mM) em meio DMEM sem soro. Após alguns minutos as células estavam soltas e a metade do volume foi transferida para outra garrafa na qual se completava o enchimento com meio de cultura. O meio foi trocado no dia seguinte. Para a realização dos experimentos as células foram plaqueadas em lamínulas de vidro (22 x 22 mm, Corning, USA) que foram acondicionadas em placas de poliestireno de 35 mm.

3.8.21.2 Abordagem eletrofisiológica das correntes para cálcio através dos canais – Ca_vL

Correntes através de canais para Ca^{2+} sensíveis a voltagem foram registradas utilizando a técnica de “patch-clamp” na configuração “whole cell” (HAMIL et al., 1981). As células foram estudadas através de uma platina de um microscópio invertido (Olympus IMT-2). O conjunto foi montado sobre uma mesa pneumática, acoplada a um micromanipulador elétrico, para a movimentação do eletrodo usado para o registro das correntes da membrana celular, e o outro micromanipulador manual para a perfusão de soluções contendo as ferramentas farmacológicas a serem utilizadas. As pipetas foram feitas a partir de tubos de vidro de parede finas (Perfecta, Brasil). As células utilizadas neste procedimento foram células GH3, que regularmente expressam canais para cálcio sensíveis a dihidropiridina ou canais para cálcio sensíveis a voltagem – Ca_v (ARAÚJO et al., 2003), essas células foram transferidas para a câmara e foram perfundidas com soluções fisiológicas constituída de (em mM): NaCl (140); CsCl (5); $BaCl_2$ (10); $MgCl_2$ (0,5); HEPES (5) e glicose (5). Adicionou-se ao meio tetrodotoxina (100 nM), com o objetivo de bloquear canais para Na^+ dependentes de voltagem. O pH da solução era ajustado para 7,4 com NaOH. Em seguida o labdano-302 (100 μ M) foi adicionado à solução de perfusão. As pipetas foram preenchidas com solução contendo (em mM): CsCl (130); ATP-Mg (4); GTP-Li4 (0,1); HEPES (10) e EGTA (5). Ajustou-se o pH para 7,2. As Pipetas utilizadas tinham resistências de 2,0- Ω antes do preenchimento com

a solução interna e após para 3,0 MΩ. As células foram mantidas em um potencial de “holding” de -80 mV e estimuladas com pulsos teste de 50 ms de duração, que despolarizavam as células para 0 mV a cada 5s. As correntes obtidas foram gravadas com um amplificador EPC-9 (HEKA Electronics, Lambrecht, Alemanha), filtrada em 3.0 kHz, digitalizados em 10 kHz e armazenada em um computador. A compensação da série de resistência foi de (50-75 %) e apenas foram usadas células cuja resistência permaneceu constante durante o todo experimento. O processamento dos dados foram realizados através dos programas Excel (Microsoft Office 2003) e SigmaPlot v.5.0 (Jandel Inc.)

3.8.22 Efeito do labdano-302 sobre as contrações induzidas por fenilefrina ou cafeína em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

O efeito de labdano-302 (10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) sobre os estoques intracelulares de cálcio sensíveis a fenilefrina e a cafeína, foram realizados de acordo com o protocolo sugerido por (SAKATA; KARAKI, 1991). Após a verificação da ausência do endotélio vascular, as preparações eram expostas a solução despolarizante de KCl 60 mM por 3 minutos para obtenção de uma contração tônica. Após este processo as preparações eram lavadas com uma solução de Tyrode livre de cálcio adicionada de EDTA 1 mM, por um período de 2-3 minutos em seguida, adicionava-se à cuba fenilefrina 10 μM ou cafeína 20 mM para obtenção de uma contração transiente. Após este processo as preparações foram lavadas com Tyrode normal e ao retorno do tônus basal, repetiu-se o processo anterior de forma que se obtivessem duas contrações com magnitude similar (controle). O diterpeno labdano-302 em concentrações isoladas foi adicionado às cubas 3 minutos antes da indução de uma terceira contração transiente com 10 μM de fenilefrina ou 20 mM de cafeína. Nos experimentos com cafeína a temperatura do banho era mantida a 21 °C (Figura 13).

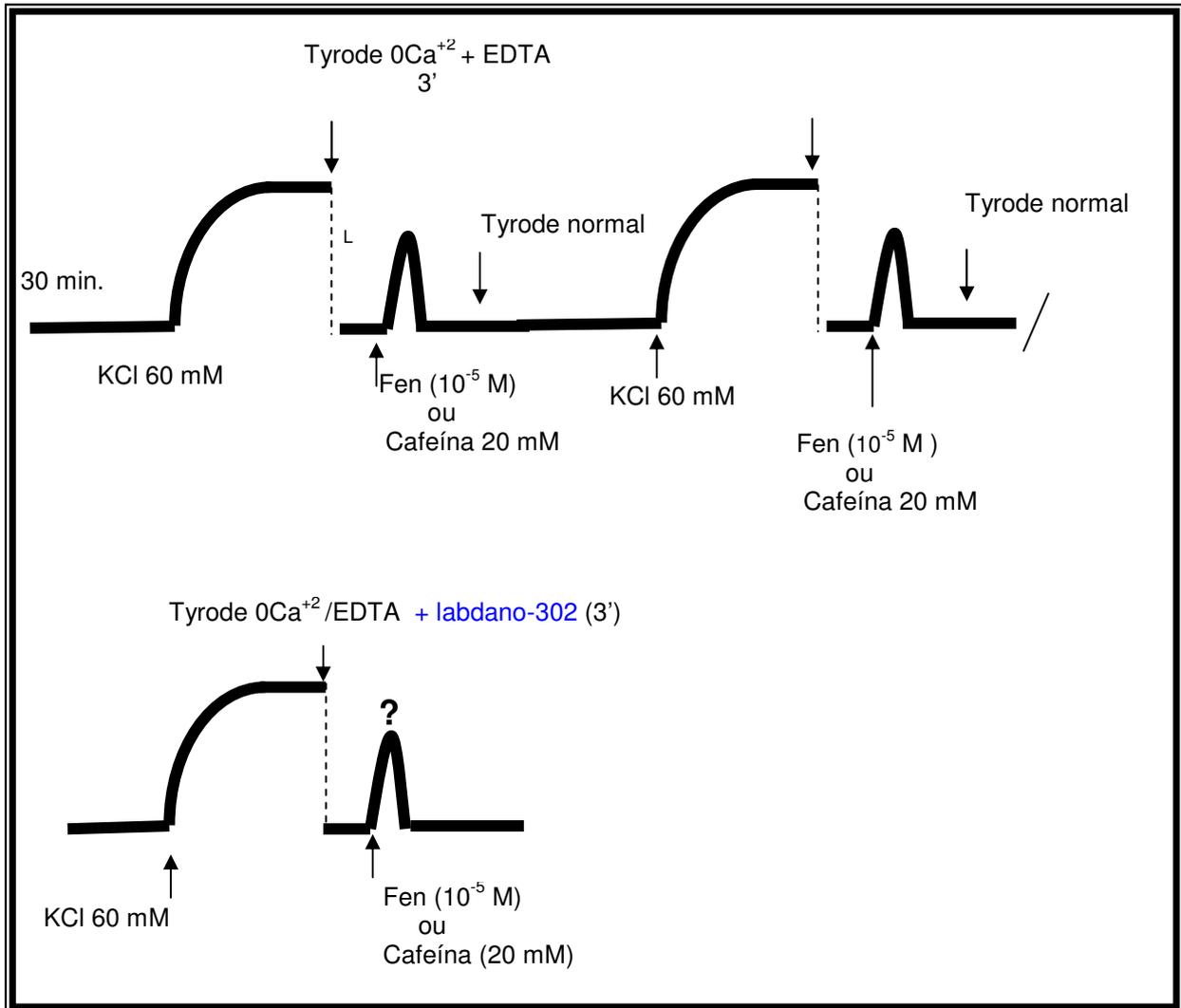


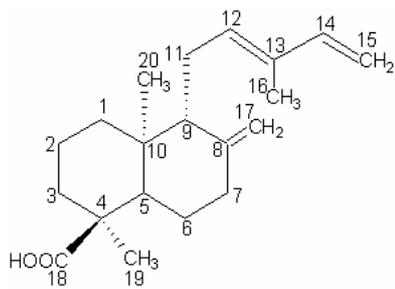
Figura 13 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para verificação do efeito de labdano-302, sobre as contrações transientes induzidas por fenilefrina ou cafeína em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio vascular.

3.8.23 Análise Estatística

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). Foram realizados testes “t” de Student não-pareados, para análise de diferença entre todas as médias e ANOVA (one-way) seguida de Newman Keuls com medida repetida para análise de variância em estudos *in vivo* e *in vitro* quando necessário.

As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando valor obtido para “p” foi menor que 0,05 ($p < 0,05$). As das curvas foram obtidas através de regressão não-linear com variação da inclinação da curva (*slope* variado). Os valores de pD_2 que corresponde ao logaritmo negativo do valor de CE_{50} (Concentração molar de uma substância capaz de induzir 50% de uma resposta máxima) foram obtidos através de regressão não-linear. O valor de $E_{m\acute{a}x}$ corresponde à média percentual de relaxamento do labdano-302 para cada condição estudada.

Toda a análise estatística e plotagem das curvas foram realizadas utilizando o programa estatístico Graph-Pad Prims[®] 4.03.



Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Estudos farmacológicos com o diterpeno labdano-302 *in vivo*

A tabela 1 mostra os valores basais para PAM e FC em animais normotensos e hipertensos L-NAME, mostrando que o tratamento por sete dias com L-NAME (50 mg/kg) induz uma alteração significativa da PAM, e FC. Na tabela 2 estão os valores de peso corporal e órgãos dos ratos hipertensos (L-NAME) e o grupo controle (normotensos), não se observou alteração no índice de massa dos órgãos dos ratos hipertensos (L-NAME).

Tabela 1 – Valores basais de PAM e FC em ratos normotensos e hipertensos L-NAME.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	PAM	FC
CONTROLE	115 ± 2	390 ± 5
L-NAME	160 ± 3*	410 ± 6*

*p<0,05 L-NAME *versus* controle

Tabela 2 - Avaliação de peso corporal e peso dos órgãos dos ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

ÍNDICE DE MASSA (g)	CONTROLE	L-NAME
CORPORAL	240 ± 2	238 ± 6
CORAÇÃO	0,0032 ± 0,01	0,0032 ± 0,005
PULMÃO	0,054 ± 0,1	0,054 ± 0,01
FÍGADO	0,037 ± 0,05	0,040 ± 0,03
RIM (direito)	0,004 ± 0,01	0,004 ± 0,01
RIM (esquerdo)	0,004 ± 0,01	0,004 ± 0,01

4.1.1 Efeito do labdano-302 sobre PAM e FC em ratos normotensos ou hipertensos (L-NAME).

Após um período de estabilização dos parâmetros hemodinâmicos a administração de maneira randômica de doses labdano-302 (5, 10, 20 e 30 mg/kg i.v.), promoveu uma hipotensão seguida de uma taquicardia em ratos normotensos de maneira dependente de dose ($-7,4 \pm 2,2$; $-17,2 \pm 1,2$; $-20,3 \pm 4,0$; $20,5 \pm 2,8$ e $45,8 \pm 10$; $68,1 \pm 9$; $88,1 \pm 8$; $90,1 \pm 7$ %), o mesmo foi observado em animais tratados com L-NAME por sete dias, para o efeito hipotensor, porém a frequência cardíaca apresentou um efeito dual, com uma discreta bradicardia em doses menores e uma leve taquicardia nas maiores doses. ($-6,0 \pm 3,0$; $-14,5 \pm 2,5$; $-36,0 \pm 5,0$; $-38,7 \pm 0,5$ e $-4,1 \pm 1,5$; $-4,7 \pm 1,0$; $5,0 \pm 2,1$; $11,3 \pm 0,5$ % n=6, respectivamente) (Gráfico 01).

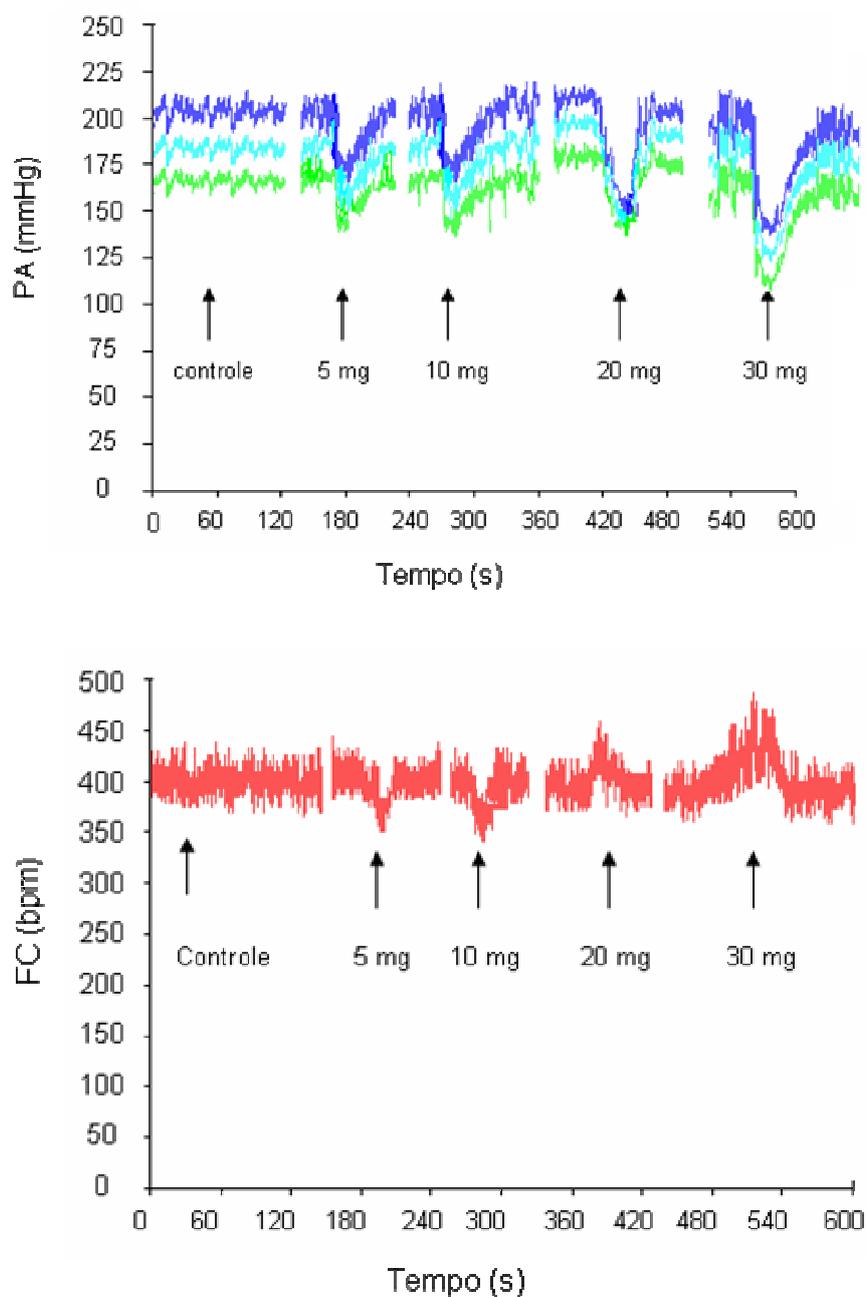


Figura 14 – Registros originais dos valores de PAS (■) PAM (■) PAD (■) e FC (■) obtidos com a administração aguda doses crescente do labdano-302 (5, 10, 20 e 30 mg/kg^{-1}) em ratos hipertensos (L-NAME).

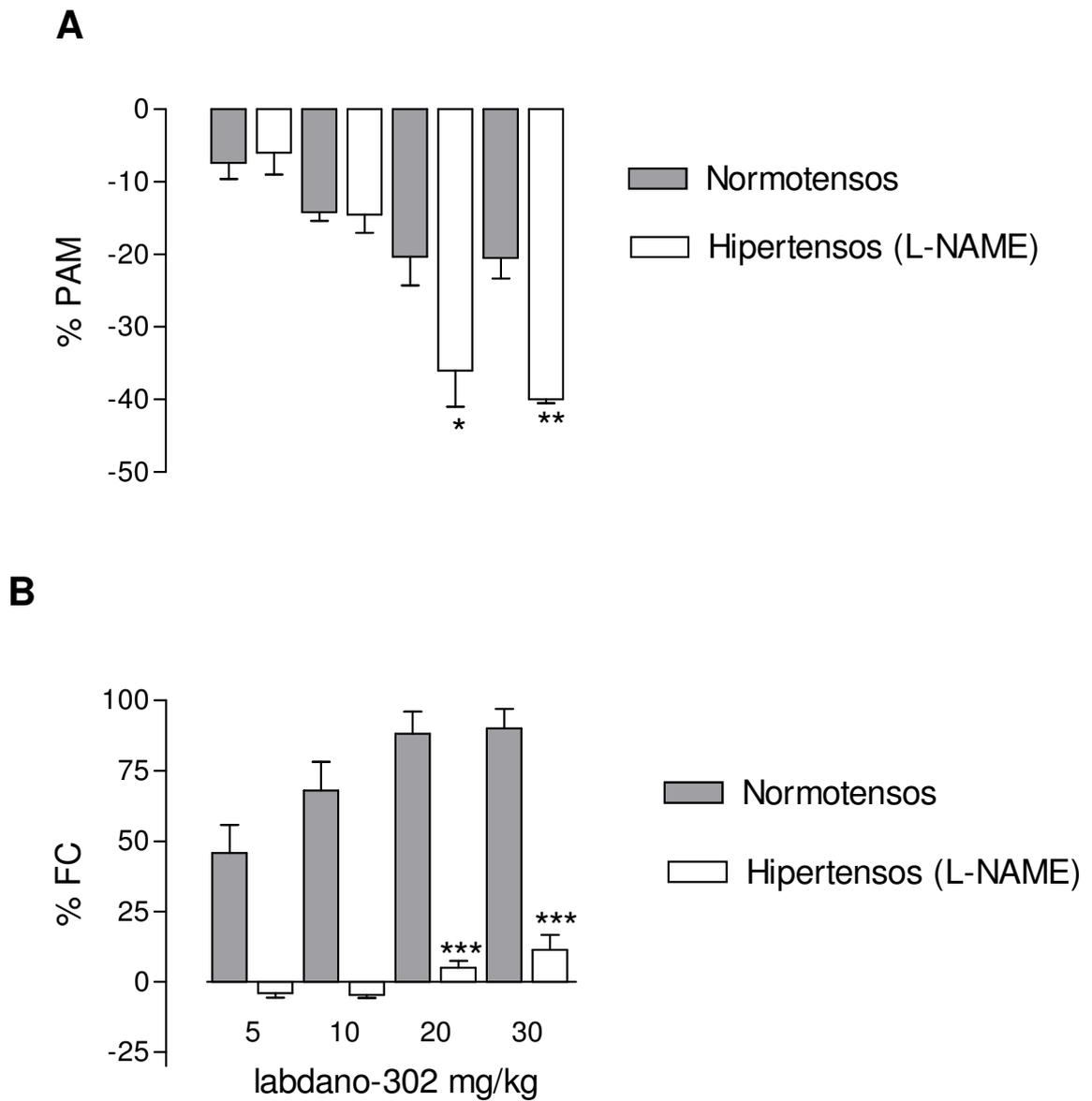


Gráfico 1 - Efeito do labdano-302 sobre a PAM (**A**) e FC (**B**) em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) não-anestesiados. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos *p<0,05; **p<0,005; ***p<0,001 hipertensos (L-NAME) *versus* (normotensos).

4.2 Estudos farmacológicos com o diterpeno labdano-302 em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) - *in vitro*

4.2.1 Avaliação da reatividade vascular à adição cumulativa de acetilcolina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) com e sem endotélio funcional.

O gráfico 2 mostra que a resposta relaxante da acetilcolina foi alterada de maneira significativa em preparações com anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME), em relação ao controle (normotensos) como pode ser observado pelos valores de pD_2 ; (normotensos $pD_2 = 6,71 \pm 0,03$, $n = 6$; hipertensos (L-NAME) $pD_2 = 5,17 \pm 0,06^{***}$ $n = 6$) e nos valores de E_{max} ; (normotensos, $E_{max} = 100,0 \pm 0,0 \%$; hipertensos (L-NAME), $E_{max} = 58,5 \pm 10,7 \%$) (Gráfico 2).

4.2.2 Avaliação da reatividade vascular à adição cumulativa de fenilefrina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) com ou sem endotélio funcional.

Em preparações na presença do endotélio funcional obteve-se contrações crescentes com amplitudes similares (normotensos $pD_2 = 6,52 \pm 0,01$, $n = 6$; hipertensos L-NAME $pD_2 = 6,57 \pm 0,008$, $n = 7$), no entanto em preparações na ausência do endotélio funcional a adição cumulativa de fenilefrina induziu contrações crescentes com mesma magnitude, porém ocorreu um deslocamento da curva para a esquerda, como pode ser observado nos valores de pD_2 ; (normotensos $pD_2 = 6,15 \pm 0,006$, $n = 6$; hipertensos (L-NAME) $pD_2 = 8,16 \pm 0,05^{***}$) (Gráfico 3).

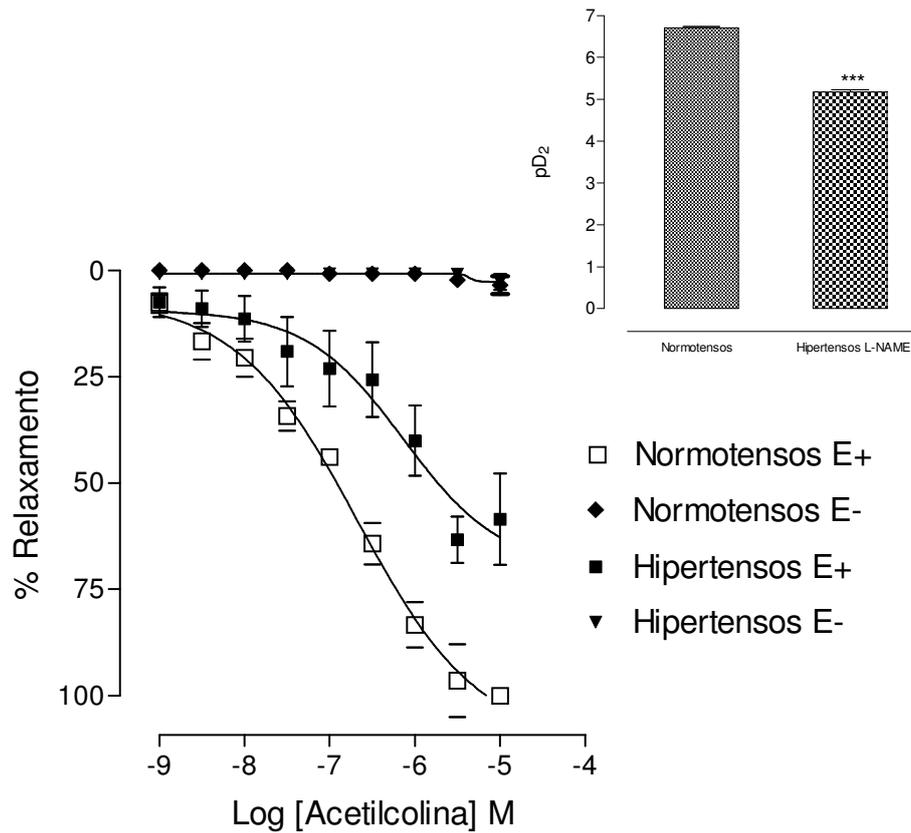


Gráfico 2 – Curvas concentração-resposta da acetilcolina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) na presença ou na ausência de endotélio vascular. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos. *** $p < 0,05$ versus normotensos (com endotélio).

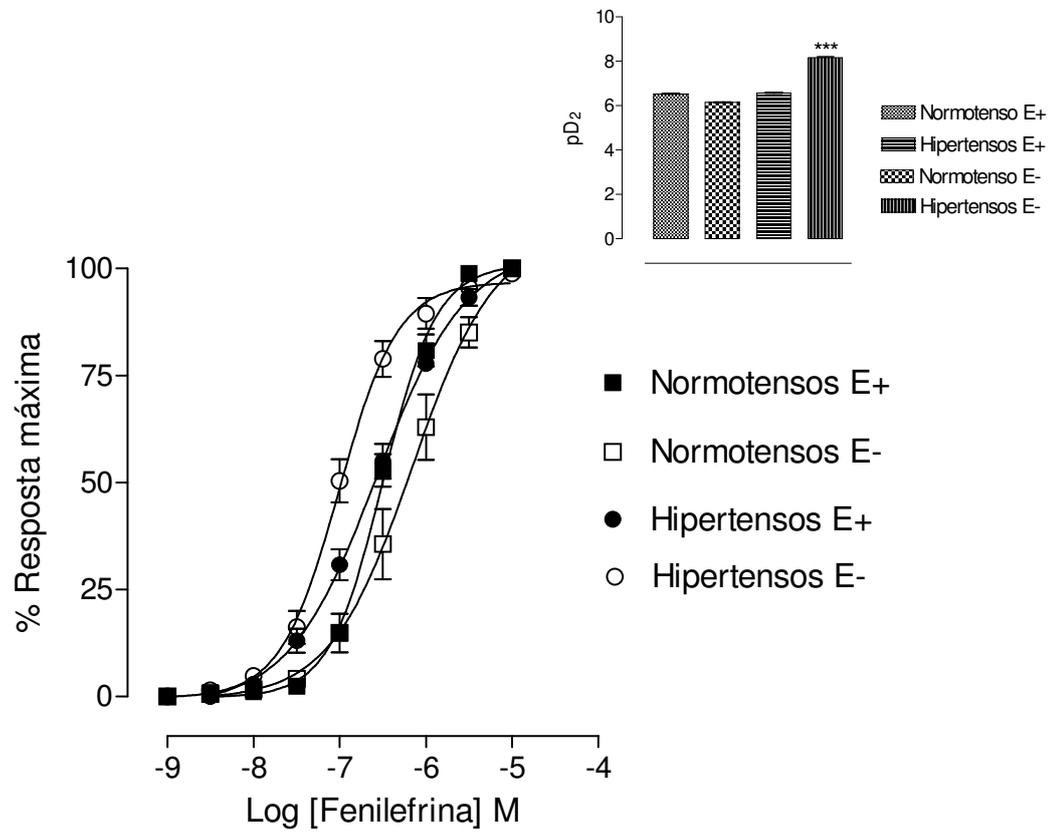


Gráfico 3 – Curvas concentração-resposta da fenilefrina em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME), na presença e na ausência de endotélio vascular. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos. *** $p < 0,05$ versus (normotensos sem endotélio)

4.2.3 Verificação da resposta vascular para a fenilefrina na presença de labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência e na presença do endotélio funcional, a pré-incubação com labdano-302 por 30 minutos foi capaz de inibir de maneira concentração-dependente as contrações induzida por fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M). Havendo ainda um deslocamento da curva para direita com inibição do efeito máximo como podemos observar nas no (Gráfico 4 A e B; Gráfico 5 A e B) (ver tabela 3 e 4).

Tabela 3 Valores de pD_2 e resposta máxima obtida para contrações induzida por fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) na presença de concentrações isoladas do labdano-302, em preparações na presença do endotélio vascular.

Labdano-302 (Molar)	Normotensos		Hipertensos (L-NAME)	
	pD_2	E_{max} (%)	pD_2	E_{max} (%)
Controle	$6,30 \pm 0,003$	$100,0 \pm 0,0$	$6,15 \pm 0,006$	$100,0 \pm 0,0$
10^{-6}	$6,02 \pm 0,02$	$80,6 \pm 7,6^*$	-	-
10^{-5}	$2,09 \pm 0,004^{***}$	$45,6 \pm 2,69^{***}$	$5,04 \pm 0,06^{***}$	$98,9 \pm 4,5$
10^{-4}	-	$14,5 \pm 3,6^{***}$	-	$60,0 \pm 9,3^{***}$
10^{-3}	-	$9,2 \pm 2,6^{***}$	-	$8,7 \pm 2,8^{***}$

Valores expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos por concentração, * $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ significativo *versus* controle.

Tabela 4 Valores de pD_2 e E_{max} das contrações induzida por fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) na presença de concentrações isoladas do labdano-302, em preparações na ausência do endotélio vascular.

Labdano-302 (Molar)	Normotensos		Hipertensos (L-NAME)	
	pD_2	E_{max} (%)	pD_2	E_{max} (%)
Controle	6,57 ± 0,008	100,0 ± 0,0	6,15 ± 0,006	100,0 ± 0,0
10^{-6}	6,02 ± 0,02	80,6 ± 7,6***	-	-
10^{-5}	5,04 ± 0,006***	45,6 ± 2,6	5,84 ± 0,03***	77,8 ± 8,0***
10^{-4}	-	14,5 ± 7,7***	-	24,8 ± 5,6***
10^{-3}	-	9,2 ± 3,8***	-	8,0 ± 2,1***

Valores expressos como média ± e.p.m de 6 experimetos por concentração,
*** $p < 0.001$ significativo *versus* controle.

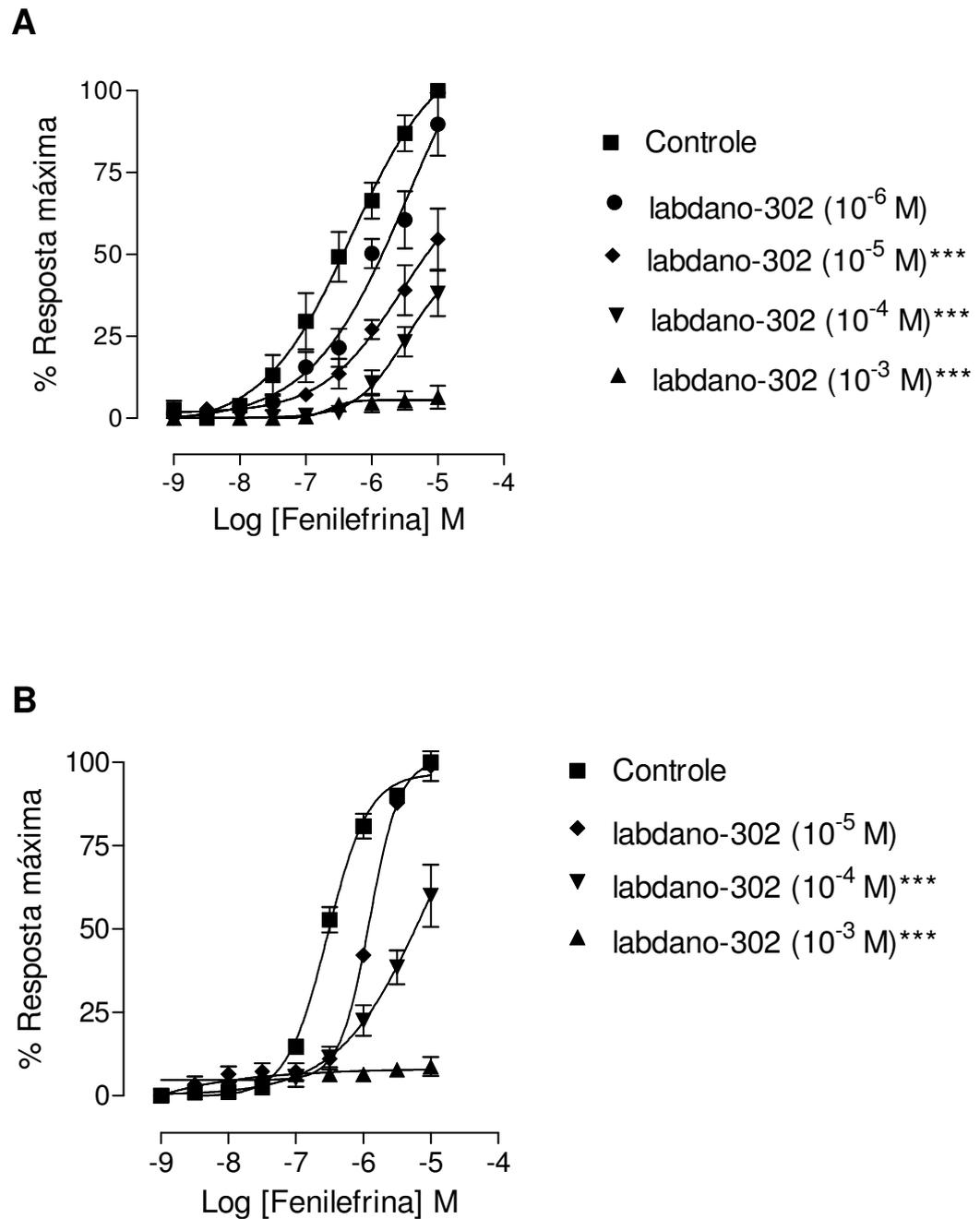


Gráfico 4 - Curvas concentração-resposta para fenilefrina na presença de concentrações isoladas do labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto, (**A**) normotensos e (**B**) hipertensos (L-NAME). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m de 5 experimentos, respectivamente. *** $p < 0,001$ versus controle.

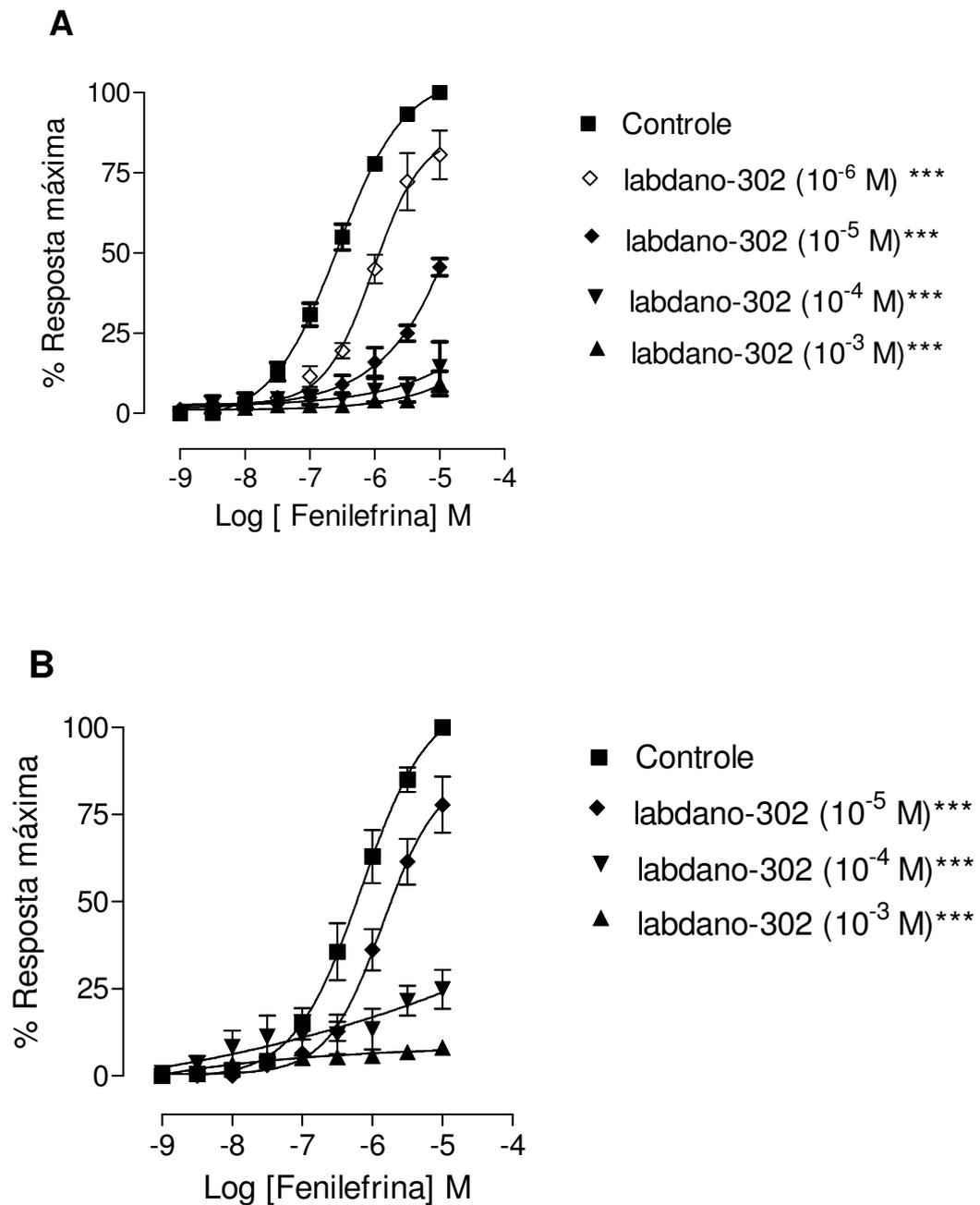


Gráfico 5 - Curvas concentração-resposta para fenilefrina na presença de concentrações isoladas do labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, **(A)** normotensos e **(B)** hipertensos (L-NAME). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m de 5 experimentos, respectivamente. *** $p < 0,001$ versus controle.

4.2.4 Efeito do labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME) pré-contraídos com fenilefrina.

Após a verificação do endotélio vascular, induziu-se uma segunda contração cumulativa com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) para obtenção de um tônus de magnitude similar a primeira contração, na fase tônica desta segunda contração adicionou-se cumulativamente labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M). O diterpeno labdano-302 induziu um vasorelaxamento de maneira concentração dependente em preparações com endotélio funcional ($E_{\max} = 96,5 \pm 2,1$ %) (Figura 8 A), e após a remoção do endotélio a curva concentração-resposta para o labdano-302 foi deslocada para a direita de maneira significativa, porém sem alteração no efeito máximo ($E_{\max} = 94,4 \pm 4,2$ %) (Figura 8 B), (Gráfico 6). O tempo máximo de estabilização do relaxamento entre uma concentração e outra foi de aproximadamente 8 min. com uma duração máxima de relaxamento total em torno de 90 minutos. Após o experimento controle as preparações foram lavadas por 40 minutos e induziu então uma contração com fenilefrina para verificação da reversão do relaxamento induzido por labdano-302, em todas as preparações houve uma reversão de 100 % da resposta (Dados não mostrados).

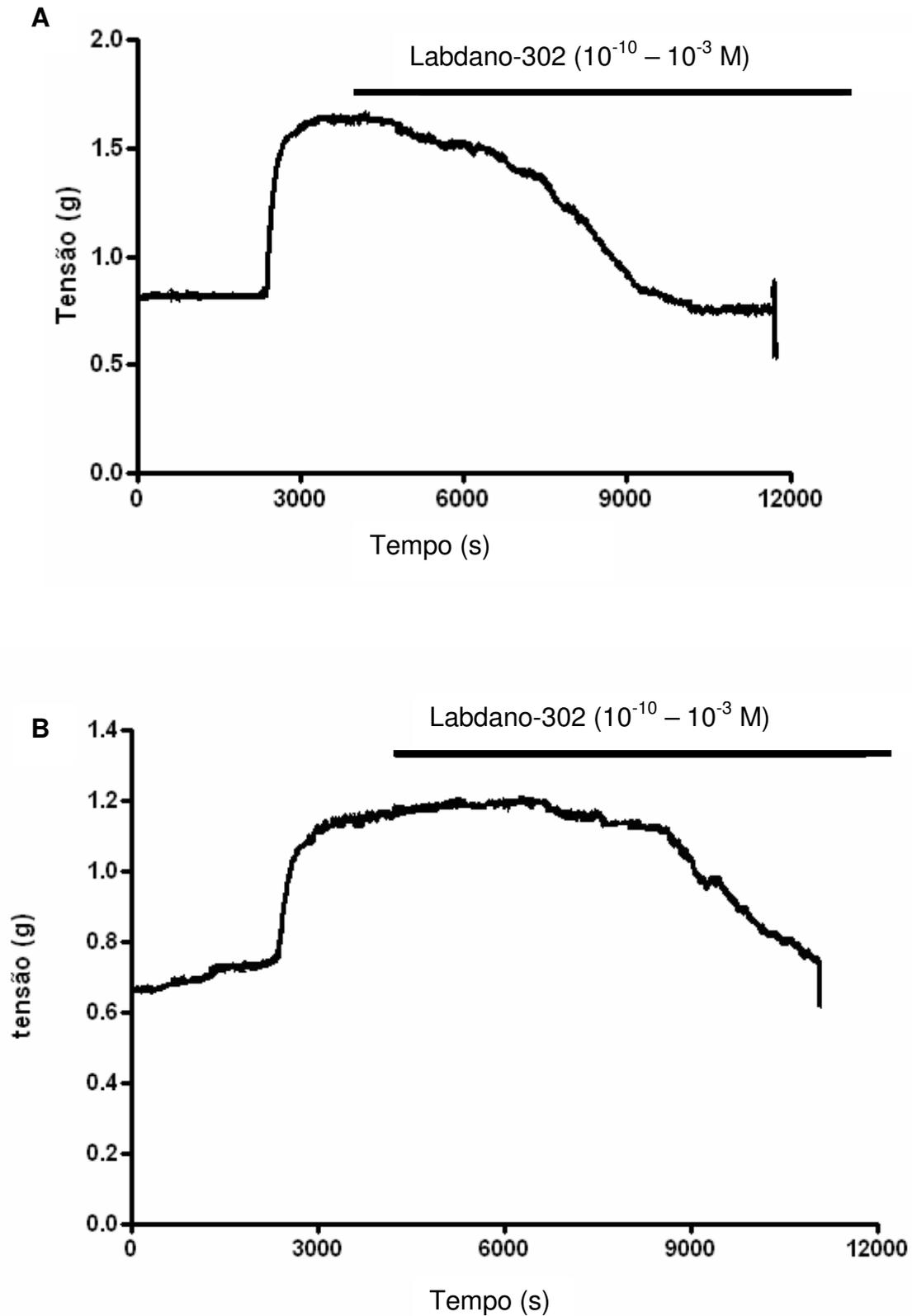


Figura 15 – Registros originais da resposta relaxante do labdano-302 ($10^{-10} - 10^{-3}$ M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME), na presença (**A**) ou na ausência (**B**) do endotélio vascular.

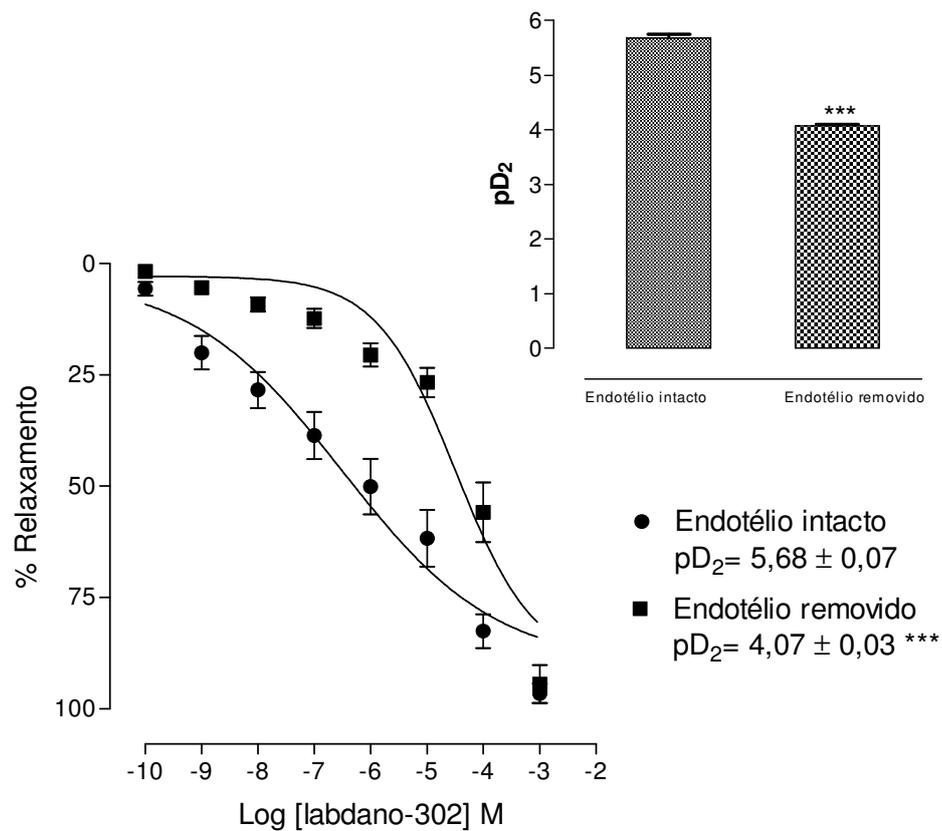


Gráfico 6 – Curvas concentração-resposta do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME), na presença (●) ou na ausência (■) do endotélio vascular. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos, *** $p < 0,05$ versus endotélio intacto.

4.2.5 Verificação do efeito de L-NAME e L-NAME + L-arginina na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

Após a verificação do endotélio vascular, as preparações foram pré-tratadas com um inibidor não seletivos da enzima sintase de NO (L-NAME 100 μ M) por 30 minutos. Após este período induziu-se uma contração com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M), na fase tônica e sustentada desta contração administrou-se cumulativamente labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M). Na presença de L-NAME as curvas concentração-resposta do labdano-302 foram deslocada para a direita de maneira significativa, porém sem alteração no efeito máximo tanto nas preparações com anéis mesentéricos de ratos normotensos ($E_{max} = 95,3 \pm 2,8$ %; L-NAME $E_{max} = 94,5 \pm 2,4$ %) quanto em hipertensos (L-NAME) ($E_{max} = 96,5 \pm 2,1$ %; L-NAME $E_{max} = 100,0 \pm 0,0$ %) (Gráfico 7A e B). A adição concomitante de (1 mM + L-NAME 100 μ M) não foi capaz de reverter a resposta inibitória do L-NAME (100 μ M) nas preparações mesentéricas de ratos normotensos, (Gráfico 7A). No entanto, não houve alteração nos valores de $E_{m\acute{a}x}$ ($E_{max} = 95,3 \pm 2,8$ %; L-NAME+L-arginina, $E_{max} = 100,0 \pm 0,0$ %). Porém, em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME), o pré-tratamento concomitante das preparações com L-arginina (1 mM + L-NAME 100 μ M), reverteu o efeito inibitório do L-NAME ($E_{max} = 96,5 \pm 2,1$ %; L-NAME+L-arginina, $E_{max} = 100,0 \pm 0,0$ %), (gráfico 7 B).

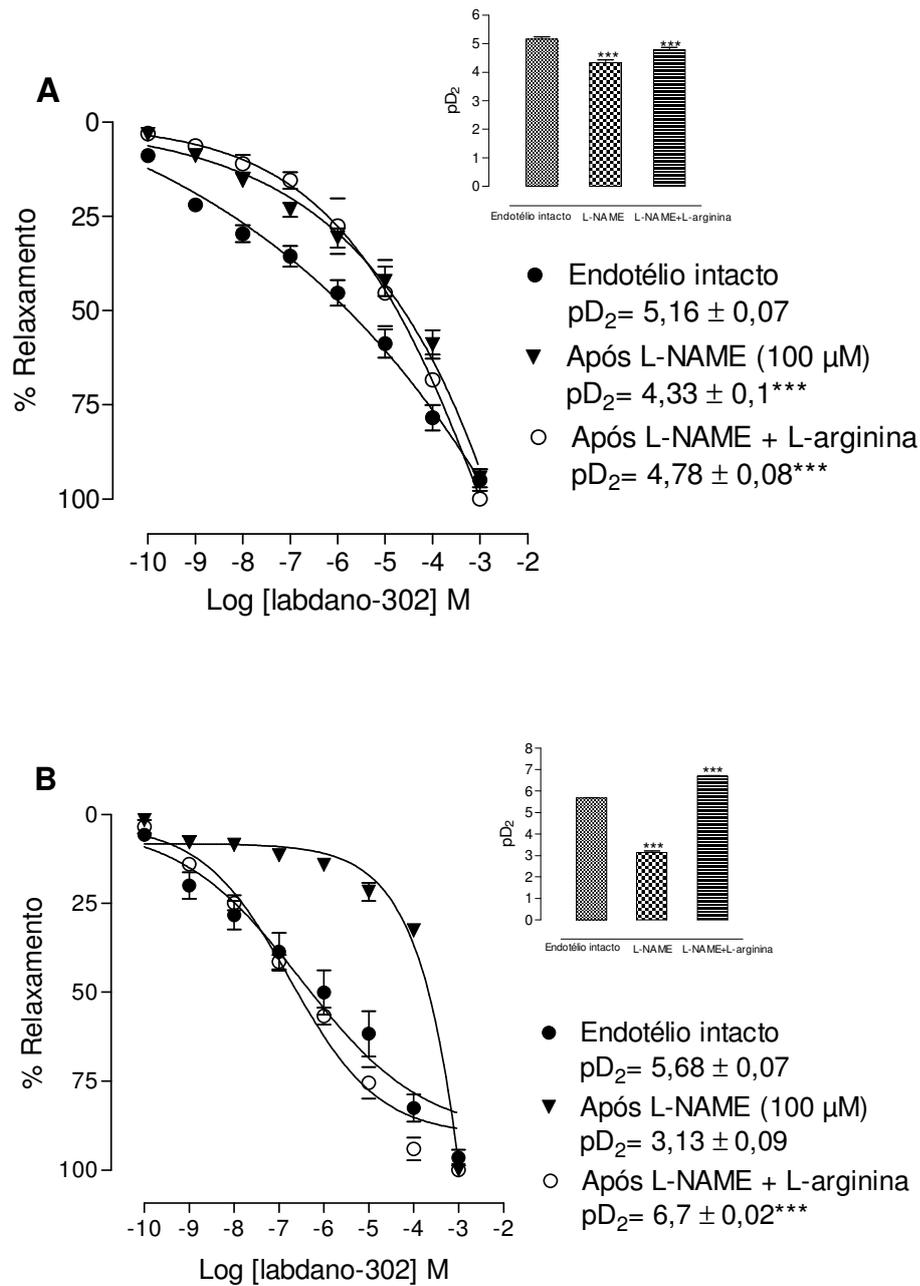


Gráfico 7 - Curvas concentração-resposta do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos (**A**) e hipertensos-L-NAME (**B**), pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M) na ausência (●) e na presença de L-NAME (▼) ou (○) L-NAME+L-arginina. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos. *** $p < 0,001$ versus endotélio intacto.

4.2.6 Verificação do efeito de PTIO na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

Após o procedimento para a verificação da presença do endotélio vascular, os anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos foram pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M). Após 30 minutos do pré-tratamento com PTIO (300 μ M), um seqüestrador permeável de NO (IKEDA et al., 1997). Como pode ser observado o pré-tratamento das preparações com PTIO promoveu uma atenuação da resposta vasorelaxante de labdano-302, sem alteração de maneira significativa no efeito máximo, em preparações com anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos (endotélio intacto, $E_{\max} = 95,3 \pm 2,8$ %; PTIO, $E_{\max} = 89,57 \pm 8,6$ %), porém em preparações com anéis mesentéricos de ratos hipertensos (L-NAME) houve uma diminuição significativa no valor de E_{\max} (endotélio intacto, $E_{\max} = 96,5 \pm 2,1$ %; PTIO, $E_{\max} = 85,0 \pm 2,0$ %** $p < 0,05$) (Gráfico 8 A e B).

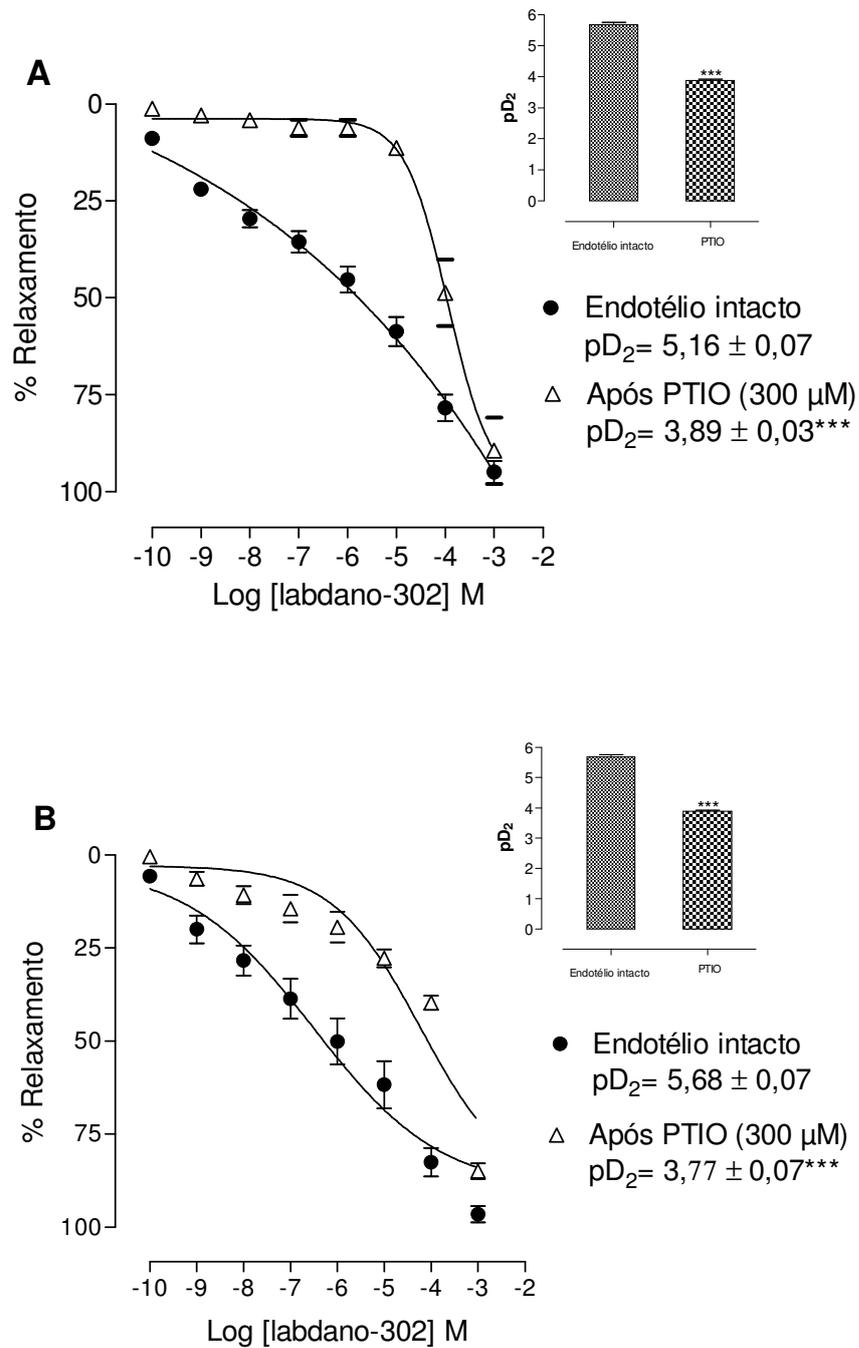


Gráfico 8 - Curvas concentração-resposta do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos (**A**) e hipertensos (L-NAME) (**B**) pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M), na ausência (●) e na presença de PTIO (300 μ M) (Δ). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos. *** $p < 0,001$ versus endotélio intacto.

4.2.7 Verificação do efeito de ODQ sobre a resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídos com fenilefrina ($10^{-9} - 10^{-5}$ M), o pré-tratamento por 30 minutos com ODQ (10 μ M) um inibidor da enzima ciclase de guanilil solúvel (CERONI, 2007), promoveu uma atenuação do vasorelaxamento induzido pela adição cumulativa do diterpeno labdano-302, de maneira significativa. No entanto, não promoveu uma alteração significativa no efeito máximo, tanto em anéis mesentéricos de ratos normotensos (endotélio intacto, $E_{max} = 95,3 \pm 2,8$ %; ODQ, $E_{max} = 94,4 \pm 3,7$ %) como em preparações com anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME) (endotélio intacto, $E_{max} = 96,5 \pm 2,1$ %; ODQ, $E_{max} = 100,0 \pm 0,0$ %) (Gráfico 9 A e B).

4.2.8 Verificação do efeito de KT5823 na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto. O tratamento por 30 minutos com KT5823, promoveu uma atenuação do vasorelaxamento induzido por labdano-302, porém não alterou de maneira significativa os valores de E_{max} , em preparações com anéis mesentéricos de ratos normotensos (endotélio intacto, $E_{max} = 95,3 \pm 2,8$ %; KT5823, $E_{max} = 98,3 \pm 2,4$ % n=4). Nas preparações com anéis mesentericos de ratos hipertensos (L-NAME), houve uma atenuação significativa do efeito máximo (endotélio intacto, $E_{max} = 96,5 \pm 2,1$ %; KT5823, $E_{max} = 82,3 \pm 2,4$ %**); (Gráfico 10 A e B).

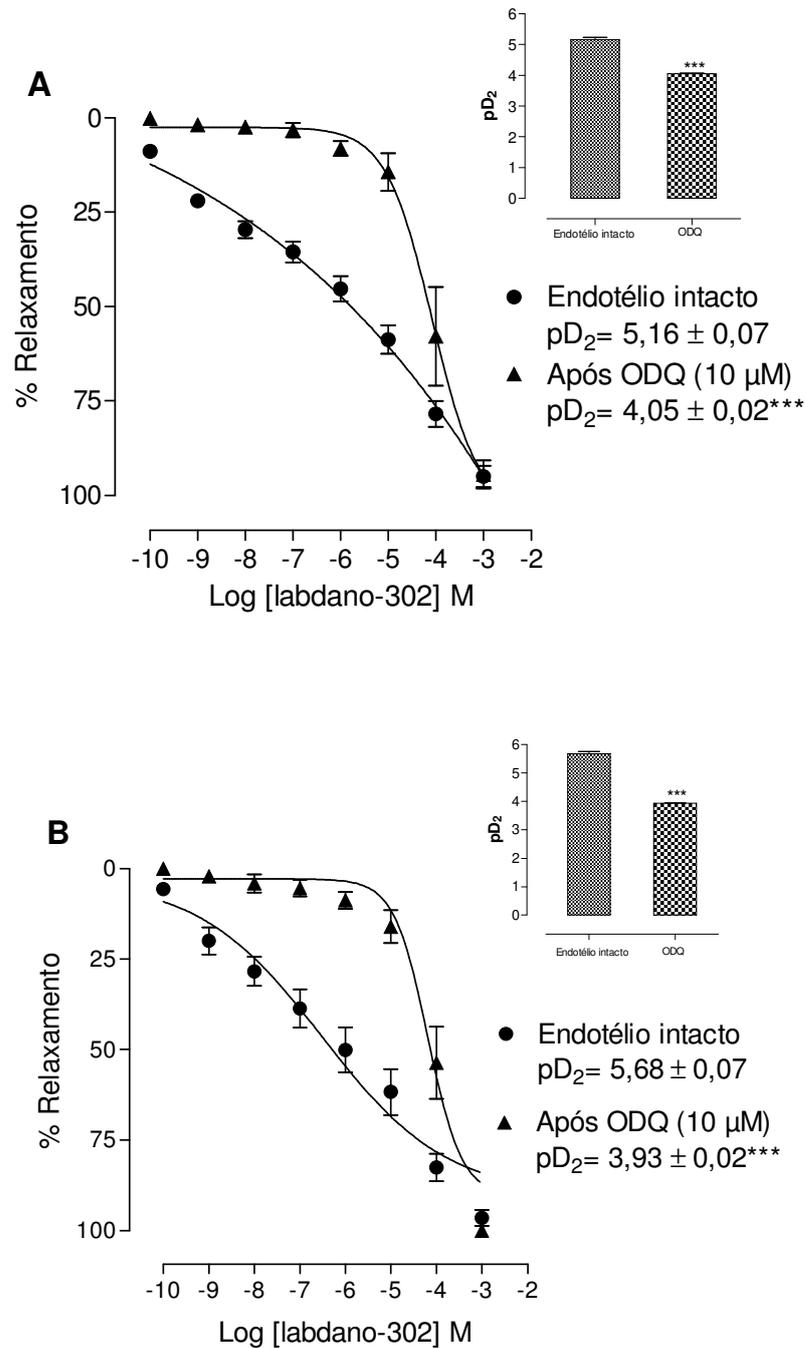


Gráfico 9 - Curvas concentração-resposta do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos (**A**) e hipertensos (L-NAME) (**B**), pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M) na ausência (●) e na presença de ODQ (▲). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos. $^{***}p < 0,001$ versus endotélio intacto.

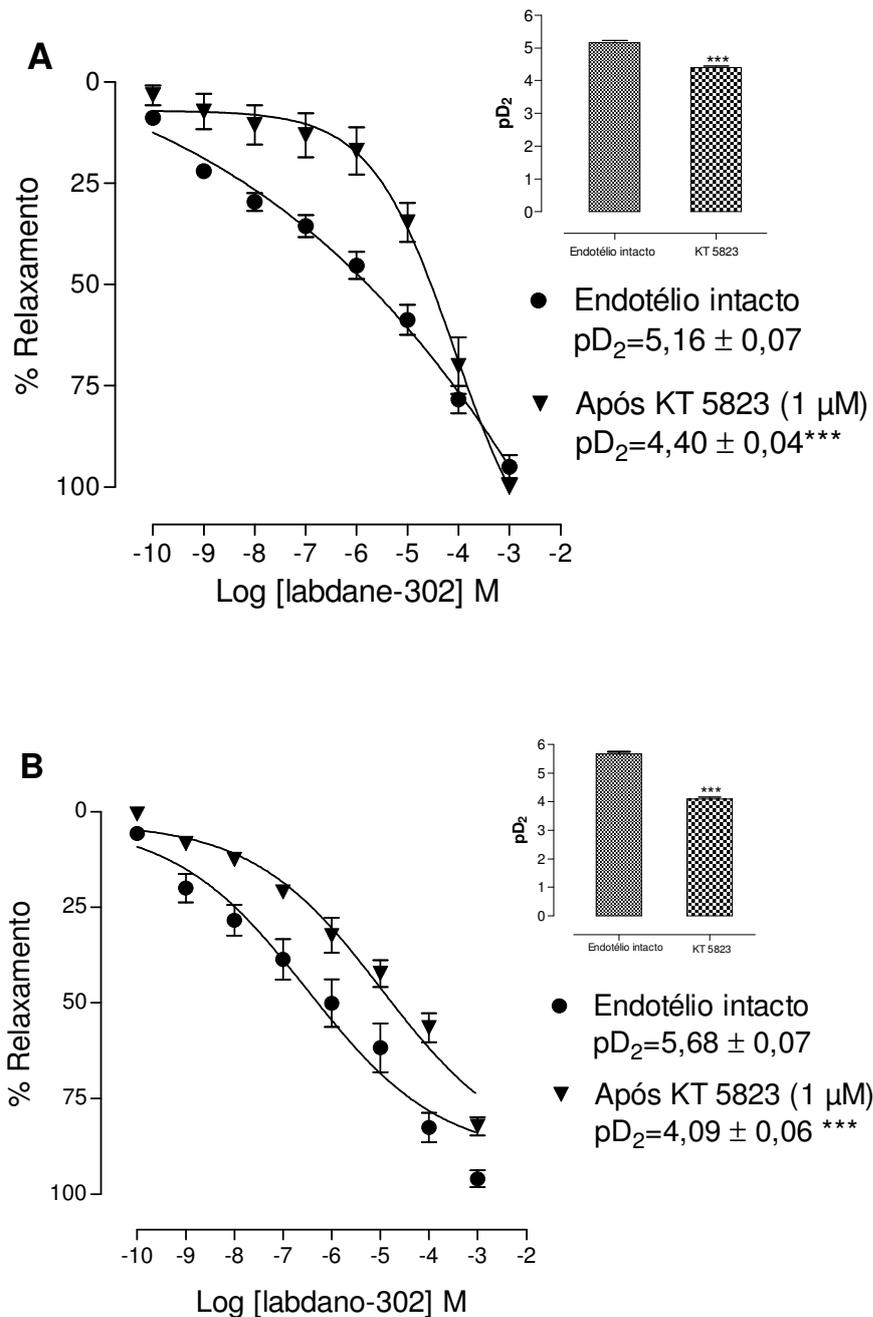


Gráfico 10 - Curvas concentração-resposta do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-4} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos (**A**) e hipertensos (L-NAME) (**B**), pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M) na ausência (●) e na presença de KT5823 (▼). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 4 experimentos. *** $p < 0,001$ versus endotélio intacto.

4.2.9 Verificação do efeito de indometacina na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME) com endotélio intacto pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M), o pré-tratamento com indometacina (10 μ M) por 30 minutos, promoveu um deslocamento da curva concentração-resposta para direita caracterizando assim uma atenuação do relaxamento induzido por labdano-302, porém sem alteração nos valores de E_{max} (endotélio intacto, $E_{max}= 96,5 \pm 2,1$ %; indometacina, $E_{max}= 97,2 \pm 1,8$ %) (Gráfico 11).

4.2.10 Verificação do efeito de atropina na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos com endotélio intacto, pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M), o pré-tratamento por 30 minutos com atropina (1 nM) não promoveu alteração significativa da curva concentração-resposta para o labdano-302, bem como não houve alteração no efeito máximo (endotélio intacto, $E_{max}= 96,5 \pm 2,1$ %; atropina, $E_{max}= 100,0 \pm 0,0$ %), (Gráfico 12).

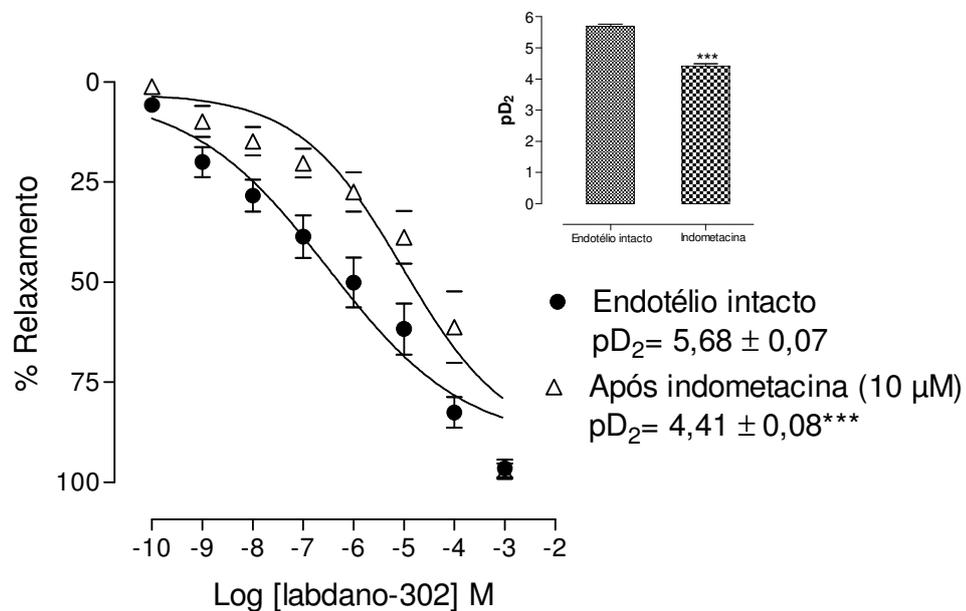


Gráfico 11 - Curvas concentração-resposta do labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME), pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M), na ausência (●) ou na presença de indometacina (Δ). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos. *** $p < 0,001$ versus endotélio intacto.

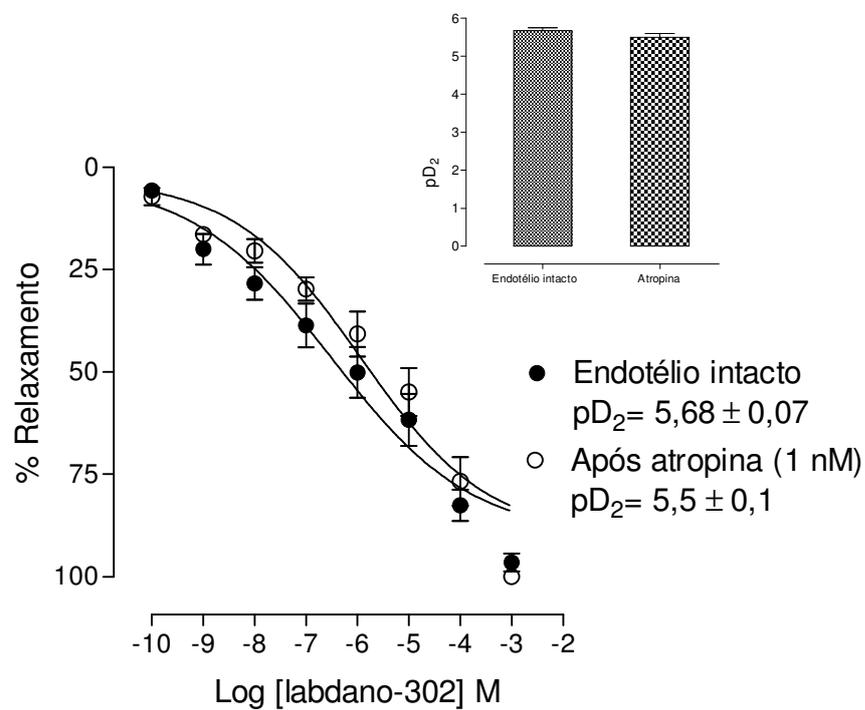


Gráfico 12 - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME) pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) na ausência (●) ou na presença de atropina (1 nM) (○). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos.

4.2.11 Verificação do efeito H-89 na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

Após a verificação da ausência do endotélio vascular, os anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME), foram incubados por 30 minutos com H-89 (1 μ M). Após o período de incubação os anéis mesentericos foram pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M). Na fase tônica desta contração o labdano-302 foi adicionado cumulativamente. O H-89 não promoveu alteração significativa da curva concentração-resposta para o labdano-302, em preparações com anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos (endotélio removido, $E_{max} = 94,4 \pm 4,2$ %; H-89, $E_{max} = 88,7 \pm 3,5$ % $n=5$). Porém, em preparações com anéis mesentéricos de ratos hipertensos (L-NAME), houve alteração no valor do efeito máximo (endotélio removido, $E_{max} = 95,3 \pm 2,8$ %; H-89, $E_{max} = 81,4 \pm 2,3$ %) (Gráfico 13 A e B).

4.2.12 Efeito do modulador do efluxo de potássio KCl 20 mM na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-incubados com KCl 20 mM, e pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) o efeito vasorelaxante de labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M), não foi alterado de maneira significativa em preparações com endotélio, também não houve alteração nos valores de E_{max} (endotélio intacto, $E_{max} = 96,5 \pm 2,1$ %; KCl 20 mM, $E_{max} = 100,0 \pm 0,0$ %). Porém na ausência do endotélio vascular houve uma atenuação da resposta relaxante de labdano-302, sem alteração no efeito máximo (Sem endotélio, $E_{max} = 94,4 \pm 4,2$ %; KCl 20 mM, $E_{max} = 100,0 \pm 0,0$ %) e (Gráficos 14 e 15).

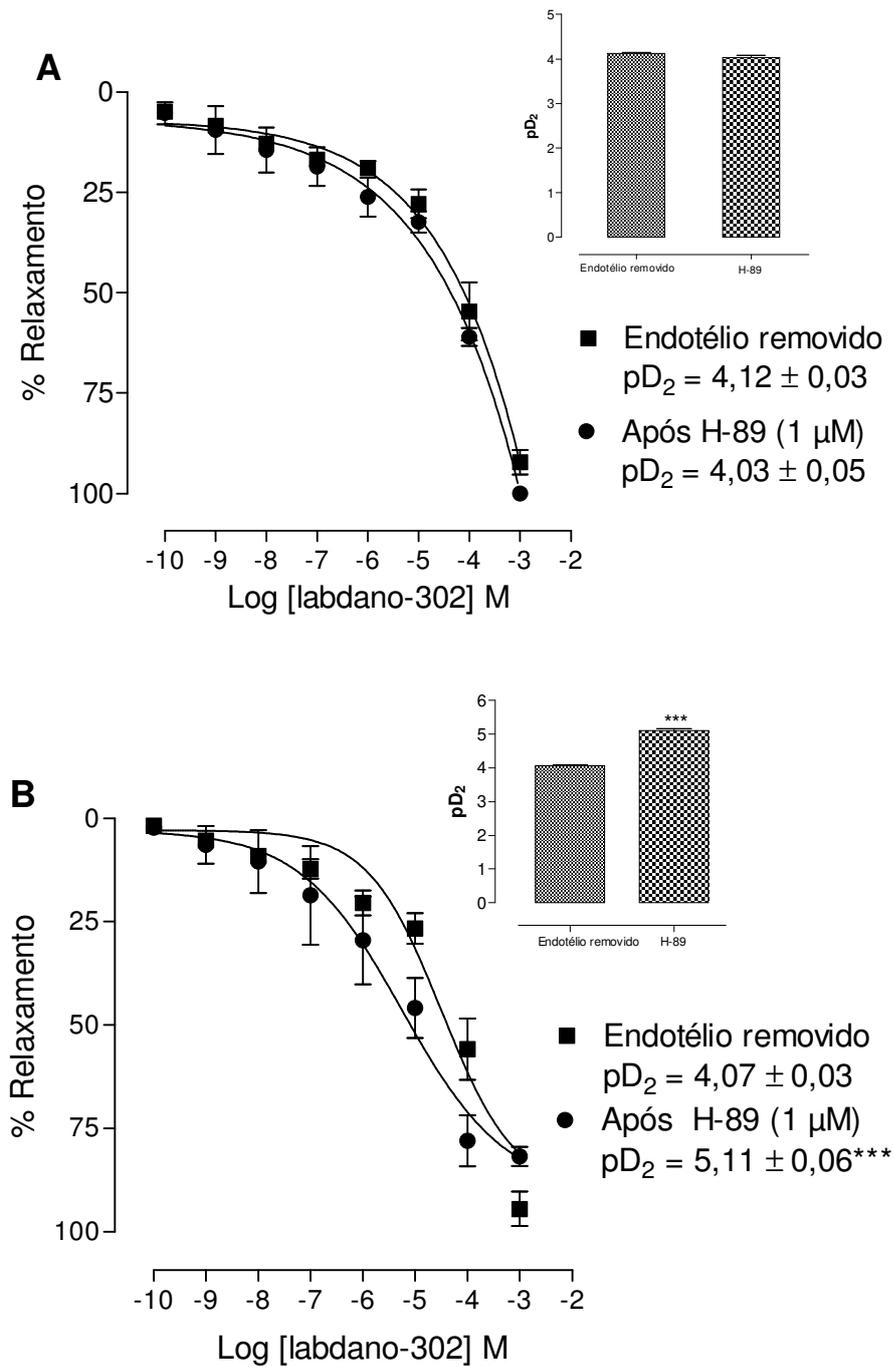


Gráfico 13 - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos (**A**) e hipertensos (L-NAME) (**B**) pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) na ausência (■) ou na presença de H-89 (●). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos. *** $p < 0,001$ versus endotélio removido.

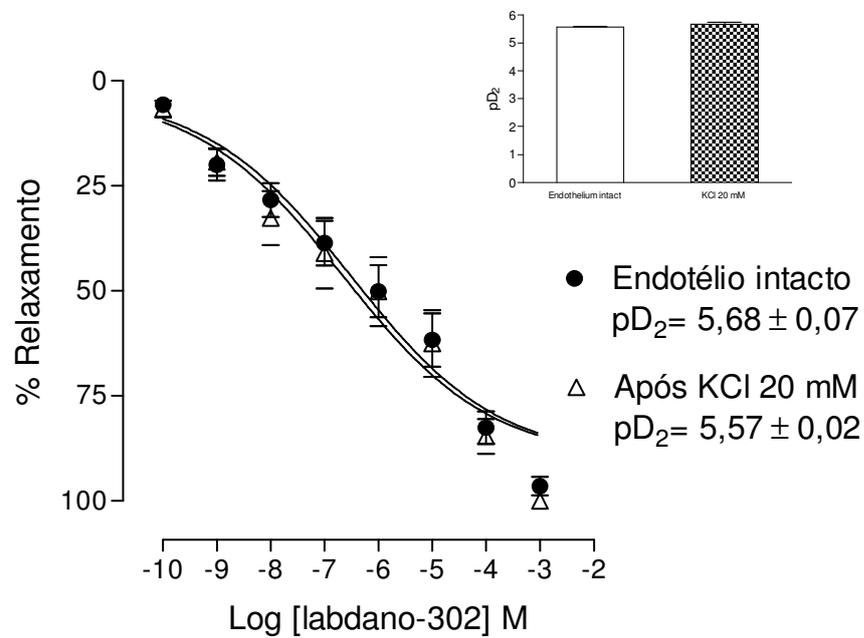


Gráfico 14 - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME), pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) na ausência (●) ou na presença de KCl 20mM (△). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos.

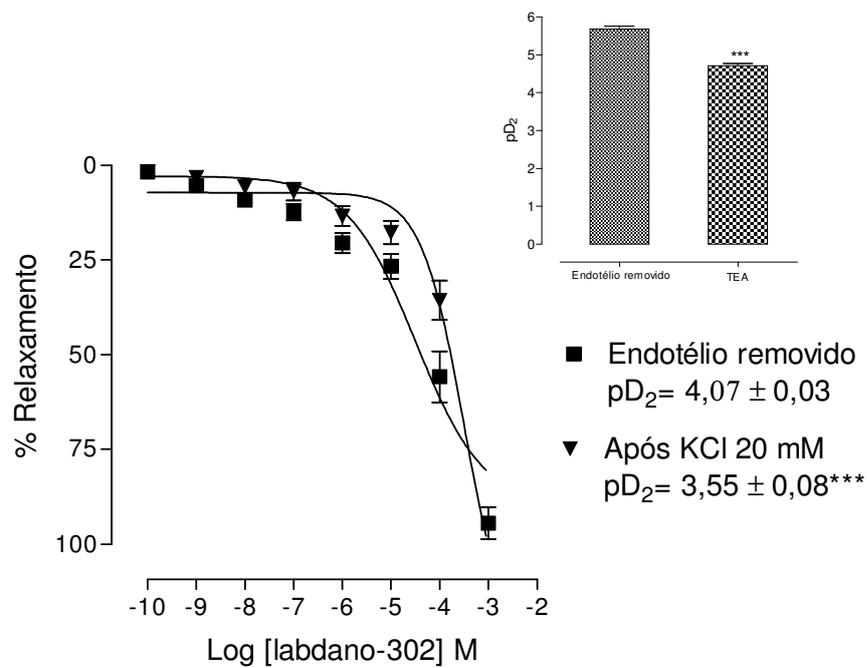


Gráfico 15 - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME), pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M), na ausência (■) ou na presença KCl 20 mM (▼). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos. $^{***}p < 0,05$ versus endotélio removido.

4.2.13 Verificação do efeito de 4-aminopiridina na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME) sem endotélio funcional e pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) o pré-tratamento com 4-AP (1 mM) um bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis à voltagem, não alterou a curva concentração-resposta para o labdano-302, nem promoveu alteração significativa no efeito máximo (endotélio removido, $E_{\max} = 94,4 \pm 4,2$ %; 4-AP, $E_{\max} = 100,0 \pm 0,0$ %) (Gráfico 16).

4.2.14 Verificação do efeito de glibenclamida na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME), sem endotélio funcional e pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M), o pré-tratamento por 30 minutos com glibenclamida (10 μ M) um inibidor seletivo dos canais para potássio sensíveis a ATP, não alterou a curva concentração-resposta para o labdano-302 e nem alterou a resposta máxima do relaxamento induzido por labdano-302 (endotélio removido, $E_{\max} = 94,4 \pm 4,2$ %; glibenclamida, $E_{\max} = 96,2 \pm 3,7$ %), (Gráfico 17).

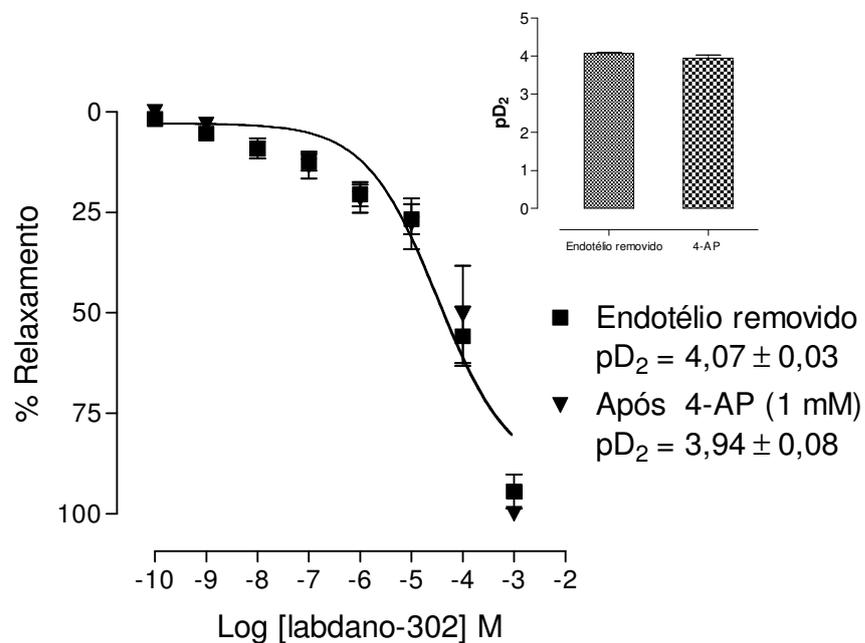


Gráfico 16 - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME), pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) na ausência (■) ou na presença 4-AP (1 mM) (▼). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos.

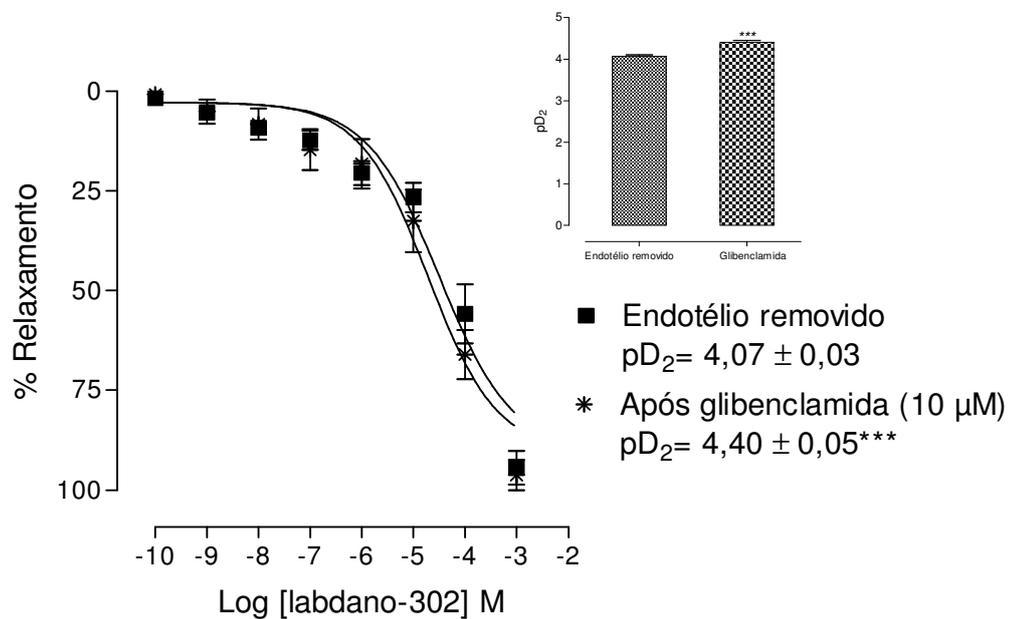


Gráfico 17 - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos L-NAME pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) na ausência (■) ou na presença glibenclamida (10 μ M) (*). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos *** $p < 0,001$ versus endotélio removido.

4.2.15 Verificação do efeito de BaCl₂ sobre a resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M), o pré-tratamento por 30 minutos com BaCl₂ (30 μ M), não promoveu uma atenuação do relaxamento induzido por labdano-302 e nem alterou os valores de E_{max} nas preparações com anéis mesentericos de ratos normotensos (endotélio removido, $E_{max}= 94,4 \pm 4,2$ %; BaCl₂, $E_{max}= 99,2 \pm 0,8$ %), nem em preparações mesentéricas de ratos hipertensos (L-NAME) (endotélio removido, $E_{max}= 92,2 \pm 3,1$ %; BaCl₂, $E_{max}= 99,4 \pm 0,5$ %). Nas duas condições estudadas houve um aumento no relaxamento induzido por labdano-302 (Gráfico 18 A B).

4.2.16 Verificação do efeito de apamina sobre a resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio funcional e pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M), o pré-tratamento por 30 minutos com apamina (1 μ M), não alterou de maneira significativa a curva concentração-resposta do labdano-302, e nem modificou os valores de E_{max} (endotélio removido, $E_{max}= 92,2 \pm 3,1$ %; Apamina, $E_{max}= 95,7 \pm 3,7$ %), (Gráfico 19).

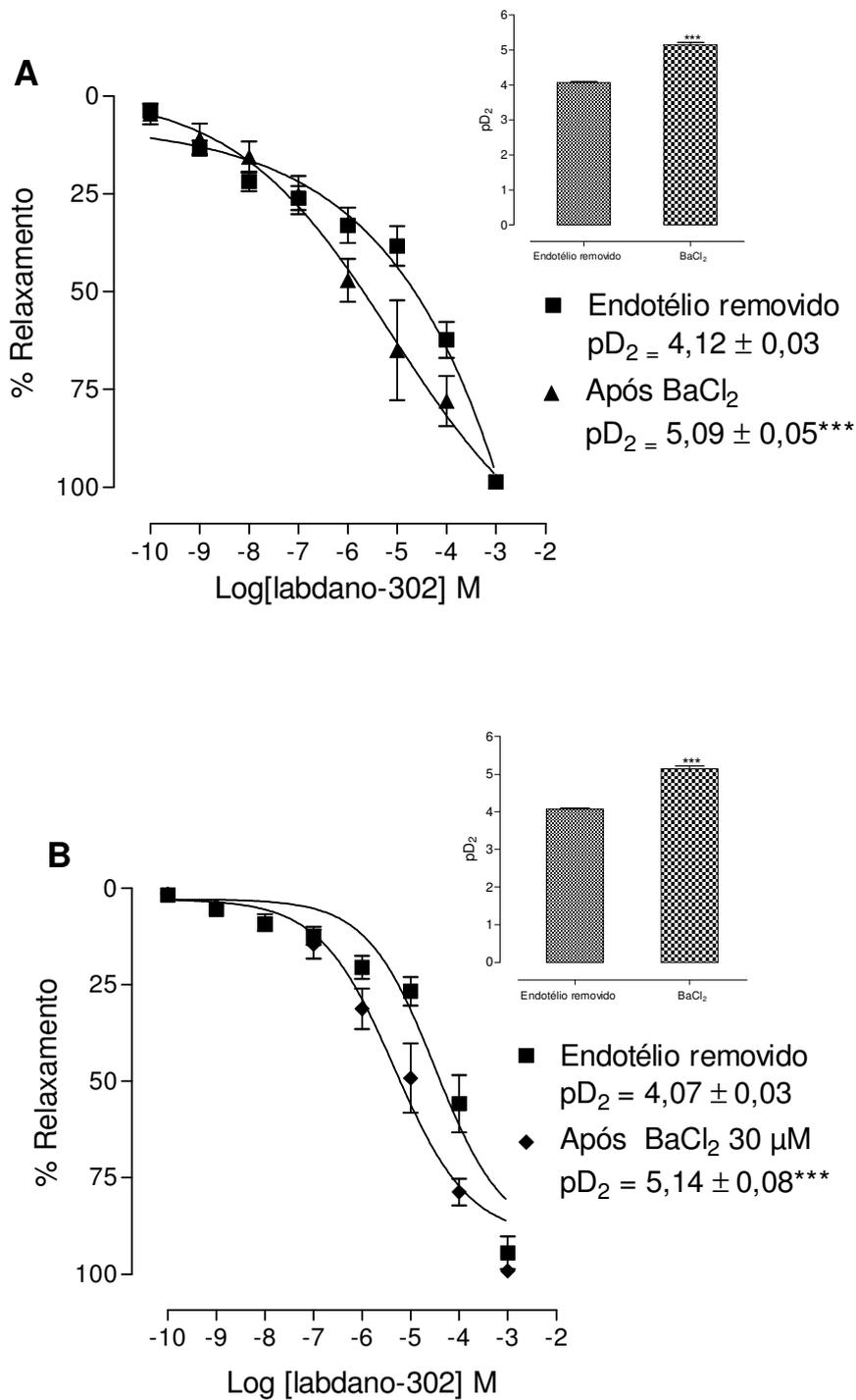


Gráfico 18 - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos (**A**) e hipertensos (L-NAME) (**B**), pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) na ausência (■) ou na presença $BaCl_2$ (30 μM) (◆). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos. $^{***}p < 0,001$ versus endotélio removido.

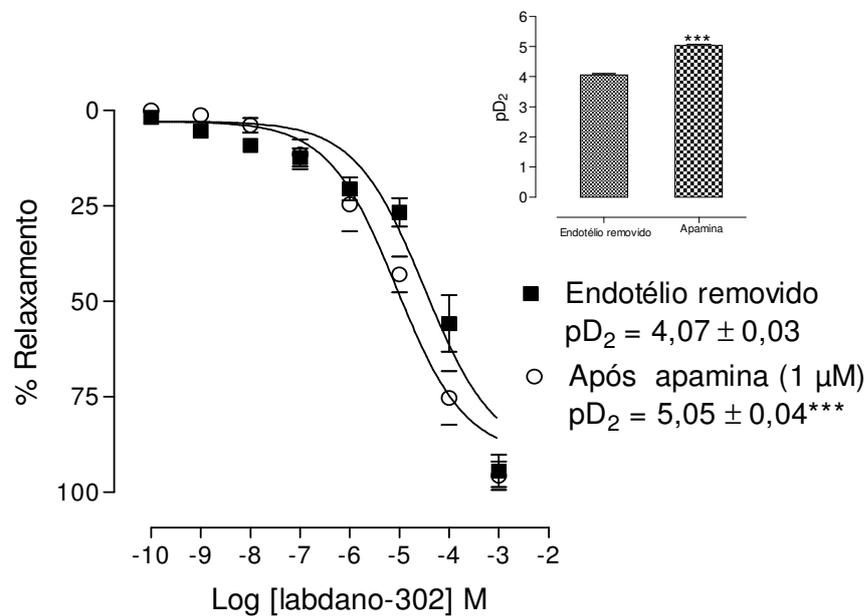


Gráfico 19 - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME), pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) na ausência (■) ou na presença apamina (1 μ M) (○). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 5 experimentos. *** $p < 0,001$ versus endotélio removido.

4.2.17 Verificação do efeito de TEA na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).

Em preparações mesentéricas de ratos hipertensos (L-NAME), sem endotélio funcional e pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M), a incubação por 30 minutos com TEA (1 mM), promoveu um deslocamento para a direita da curva concentração-reposta do labdano-302, porém não houve alteração significativa nos valores da resposta máxima (endotélio removido, $E_{max} = 94,4 \pm 4,2$ %; TEA, $E_{max} = 92,3 \pm 1,7$ %), (Gráfico 20).

4.2.18 Efeito de um agente despolarizante KCl 80 mM na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME).

Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato hipertensos (L-NAME) com e sem endotélio vascular, pré-contraídos com um agente despolarizante KCl 80 mM. A adição cumulativa do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M) promoveu um potente efeito vasorelaxante dependente de concentração, com relaxamento máximo semelhante ao obtido com contrações induzidas por fenilefrina: endotélio intacto (FEN, $E_{max} = 96,5 \pm 2,1$ %); (KCl 80 mM, $E_{max} = 94,4 \pm 2,3$ %); endotélio removido (FEN, $E_{max} = 93,2 \pm 4,2$ %); (KCl 80 mM, $E_{max} = 89,6 \pm 4,6$ %) (Gráficos 21 e 22).

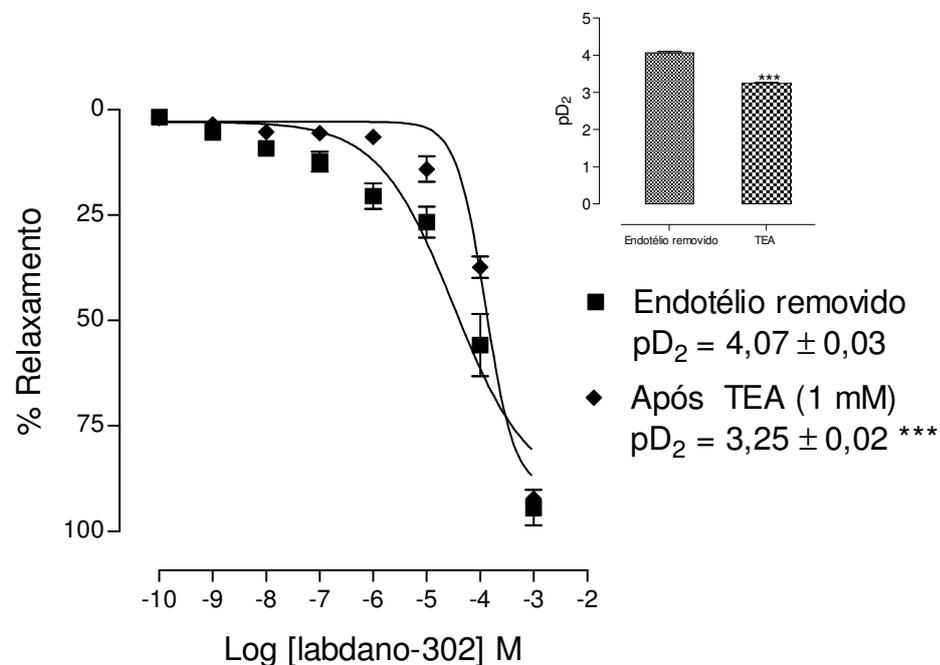


Gráfico 20 - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos hipertensos (L-NAME) sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M), na ausência (■) ou na presença TEA (1 mM) (◆). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos. *** $p < 0,001$ versus endotélio removido.

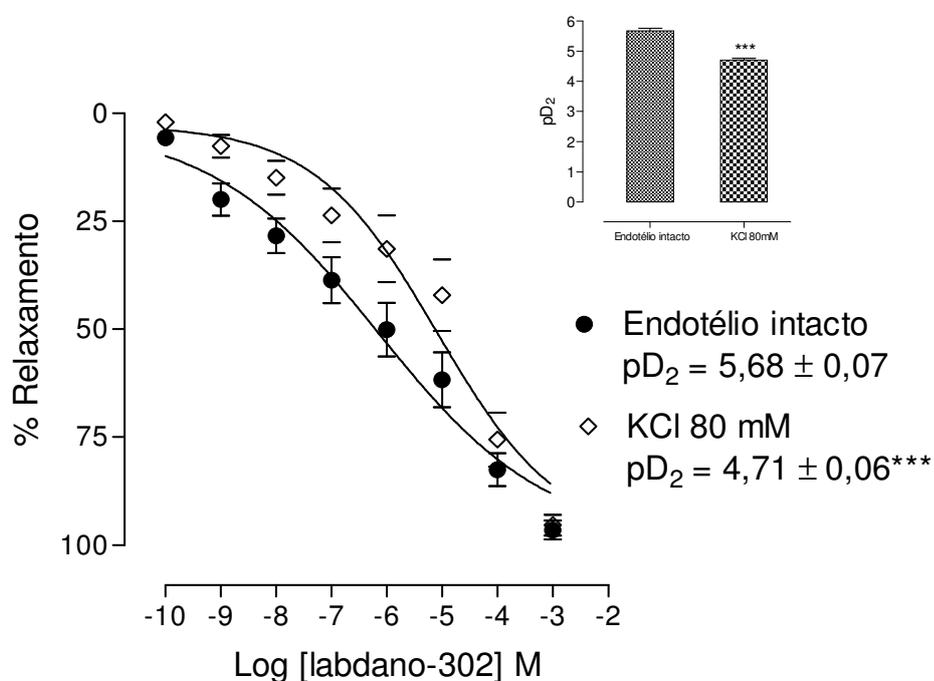


Gráfico 21 - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do labdano-302 (10^{-10} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato hipertensos (L-NAME) pré-contraídos com fenilefrina (10^{-9} – 10^{-5} M) (■) ou KCl 80 mM (◇). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos. $^{***}p < 0,001$ versus fenilefrina (endotélio intacto).

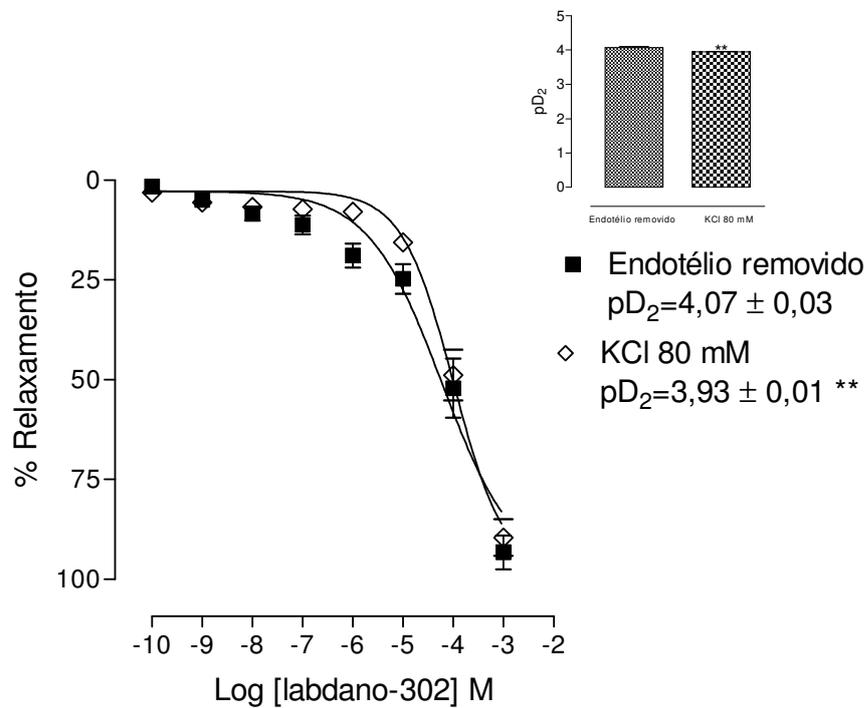


Gráfico 22 - Curvas concentração-resposta do efeito vasorelaxante do labdano-302, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato hipertensos (L-NAME) com endotélio removido pré-contraídos com fenilefrina ($10^{-9} - 10^{-5}$ M) (■) ou KCl 80 mM (◇). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos. $**p < 0,02$ versus fenilefrina (endotélio removido).

4.2.19 Verificação do efeito de labdano-302 sobre as contrações induzidas por CaCl_2 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

O gráfico 22 A e B mostra que as curvas concentração-resposta para o CaCl_2 foram deslocada para direita com redução do efeito máximo na presença de diferentes concentrações de labdano-302 (10^{-5} , 10^{-4} ou 10^{-3}), para experimentos com anéis mesentéricos de ratos normotensos e (10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} ou 10^{-3} M) para anéis mesentéricos de ratos hipertensos (L-NAME). Os níveis percentuais máximo de contração induzida por CaCl_2 na presença das concentrações utilizadas de labdano-302 em ratos normotensos foram as seguintes: ($E_{\text{max}} = 98,1 \pm 0,6$ %; $E_{\text{max}} = 58,9 \pm 5,9$ %; $E_{\text{max}} = 8,4 \pm 3,6$ %, respectivamente), enquanto que em ratos hipertensos (L-NAME), foram ($E_{\text{max}} = 87,5 \pm 5,1$ %; $E_{\text{max}} = 66,8 \pm 4,6$ %; $E_{\text{max}} = 15,4 \pm 4,5$ %, $E_{\text{max}} = 9,0 \pm 0,8$ %, respectivamente). A inibição das contrações de CaCl_2 pelas concentrações de labdano-302 foi de maneira dependente de concentração.

4.2.20 Efeito de labdano-302 sobre contrações induzidas por S(-) Bay K8644 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

O gráfico 23 e Figura 12 mostram a resposta relaxante de labdano-302 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME), sem endotélio funcional e pré-contraídos com Bay K8644 ($0,1 \mu\text{M}$), adicionado à cuba, 20 minutos após o meio nutritivo de Tyrode ser trocado por uma solução despolarizante de (KCl 20 mM). Como pode ser observado, labdano-302 promoveu um efeito vasorelaxante dependente de concentração nas duas condições estudadas, sendo mais potente nos anéis mesentéricos de ratos hipertensos (L-NAME). No entanto, não houve alteração significativa nos valores de E_{max} ; (Normotensos $E_{\text{max}} = 100,0 \pm 0,0$; Hipertensos (L-NAME) $E_{\text{max}} = 100,0 \pm 0,0$).

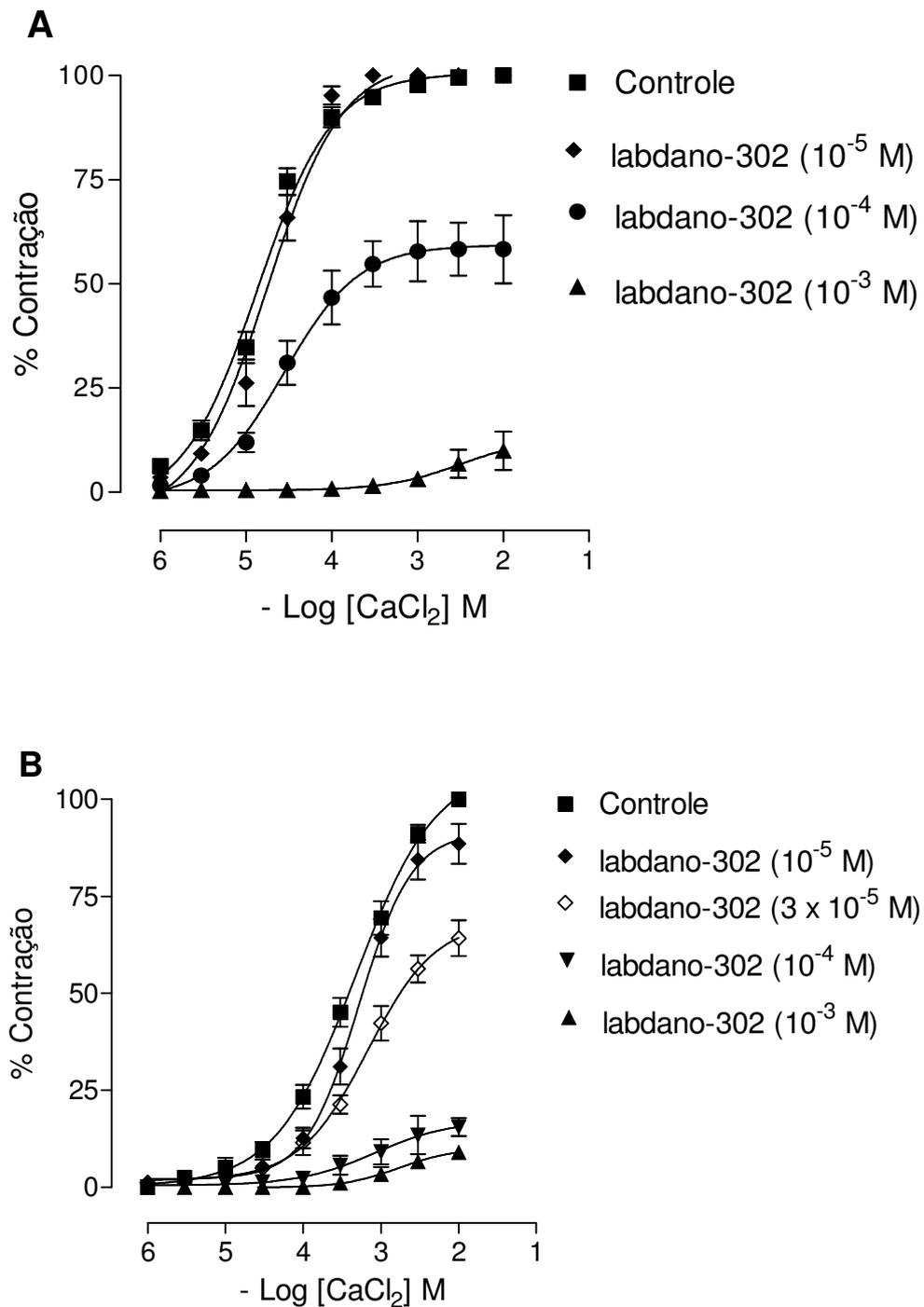


Gráfico 23 – Curvas cumulativa para CaCl_2 na presença de concentrações isoladas de labdano-302, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos (A) e hipertensos (L-NAME) (B). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos por concentração.

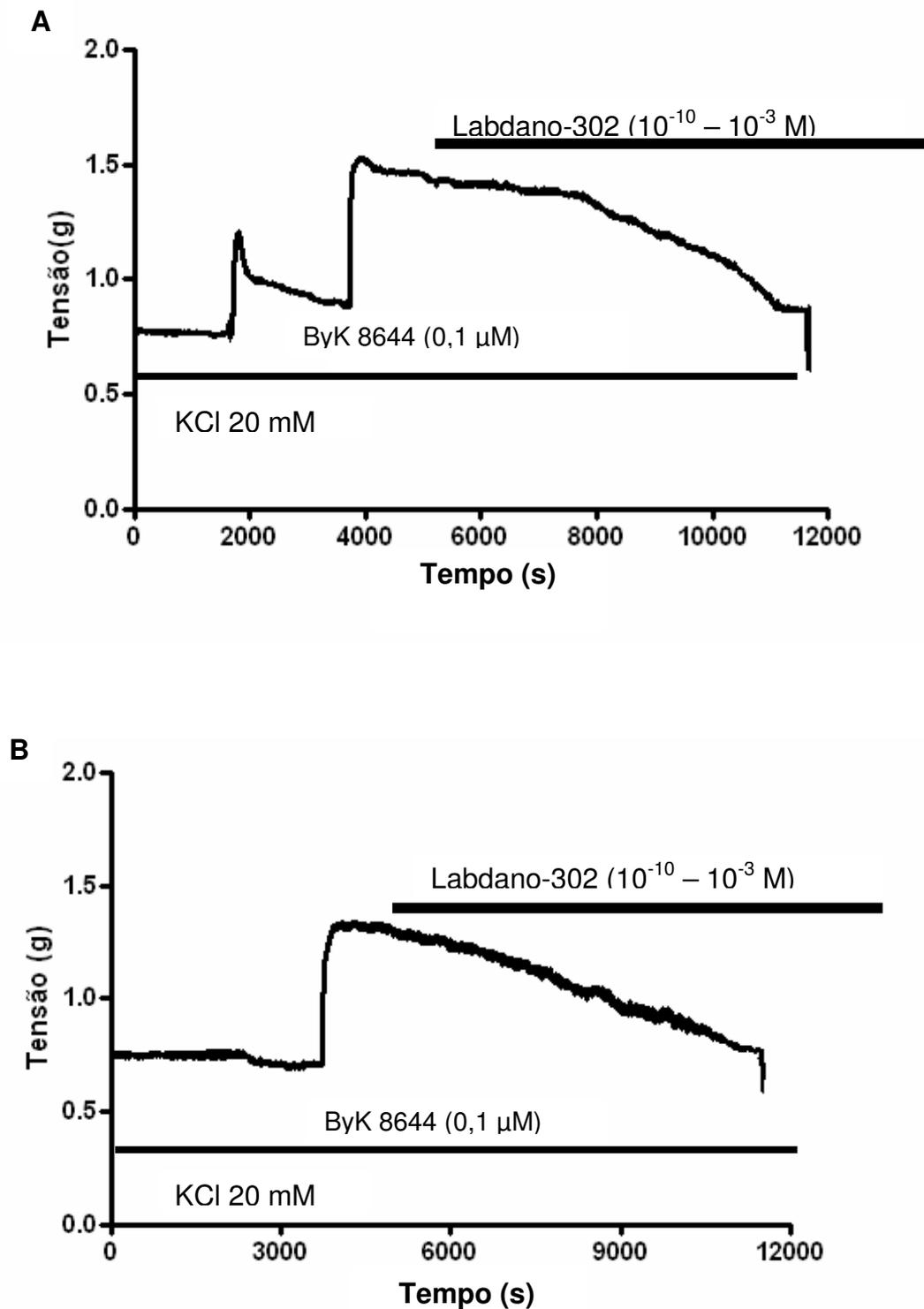


Figura 16 – Registros originais do efeito vasorelaxante do labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos (**A**) e hipertensos em (**B**) na ausência do endotélio vascular pré-contraídos com Bay K8644.

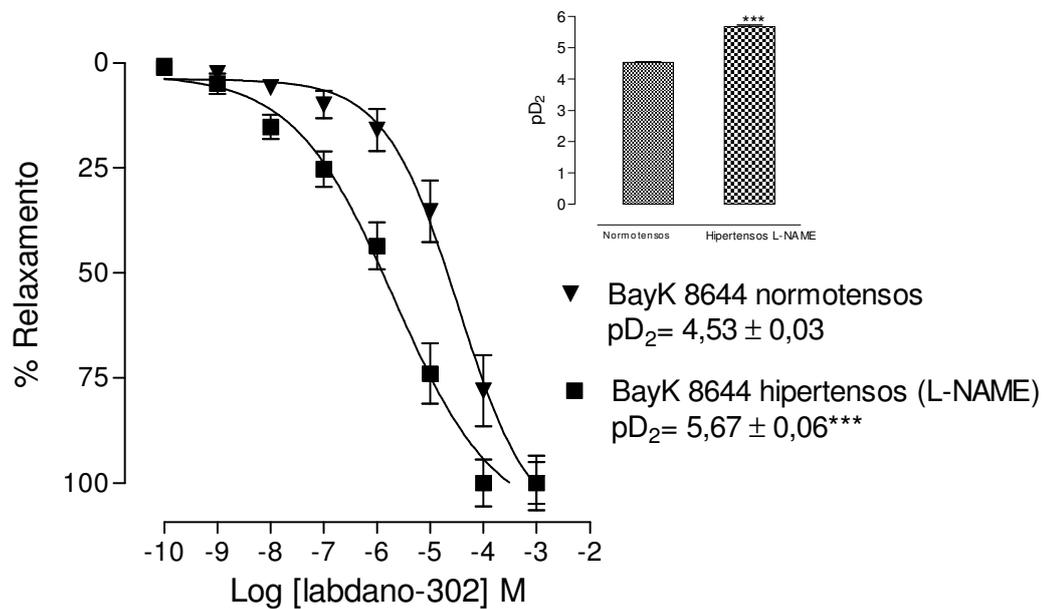


Gráfico 24 – Curvas concentração-resposta do labdano-302 sobre contrações induzidas por Bay K8644 (0,1 μ M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos (▼) e hipertensos L-NAME (■) sem endotélio vascular. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos, *** $p < 0,001$ versus normotensos.

4.2.21 Efeito do labdano-302 sobre canais Ca_vL em células GH_3 .

O gráfico 24 mostra a medida de correntes de íons cálcio obtida através da técnica de “patch-clamp” na configuração “whole-cell” em células GH_3 . As medidas de correntes foram registradas utilizando o Ba^{2+} como transportador de carga. Foi utilizado ainda a tetrodotoxina (300 nM) para bloquear as correntes de sódio, céσιο e TEA para bloquear as correntes de potássio. O diterpeno labdano-302 (100 μM) inibiu as correntes macroscópicas de canais tipo-L originada por um pulso despolarizante de 0 mV (potencial de holding = -80 mV). As correntes foram determinadas em intervalos de 0,1 ms durante 100 ms. O diagrama (A) mostra o esquema representativo do curso-temporal da inibição da corrente de Ba^{2+} induzida por labdano-302 (100 μM). Em (B) temos a densidade de tensão em relação à IBa^{2+} em células GH_3 . A curva IV foi diminuída na presença de labdano-302 com ligeira mudança na dependência de tensão. A média valor de pico era de -10 mV no controle de $-11,0 \pm 3,3$ pA / pF e $-5,3 \pm 2,4$ pA / pF na presença de labdano-302. O diagrama (C) mostra a representação de correntes indicando que labdano-302 não alterou a dependência de tempo da IBa^{2+} . O diagrama (D) resume os efeitos do labdano-302 (100 μM) sobre a amplitude da densidade média. (n = 4 células, *p <0,05).

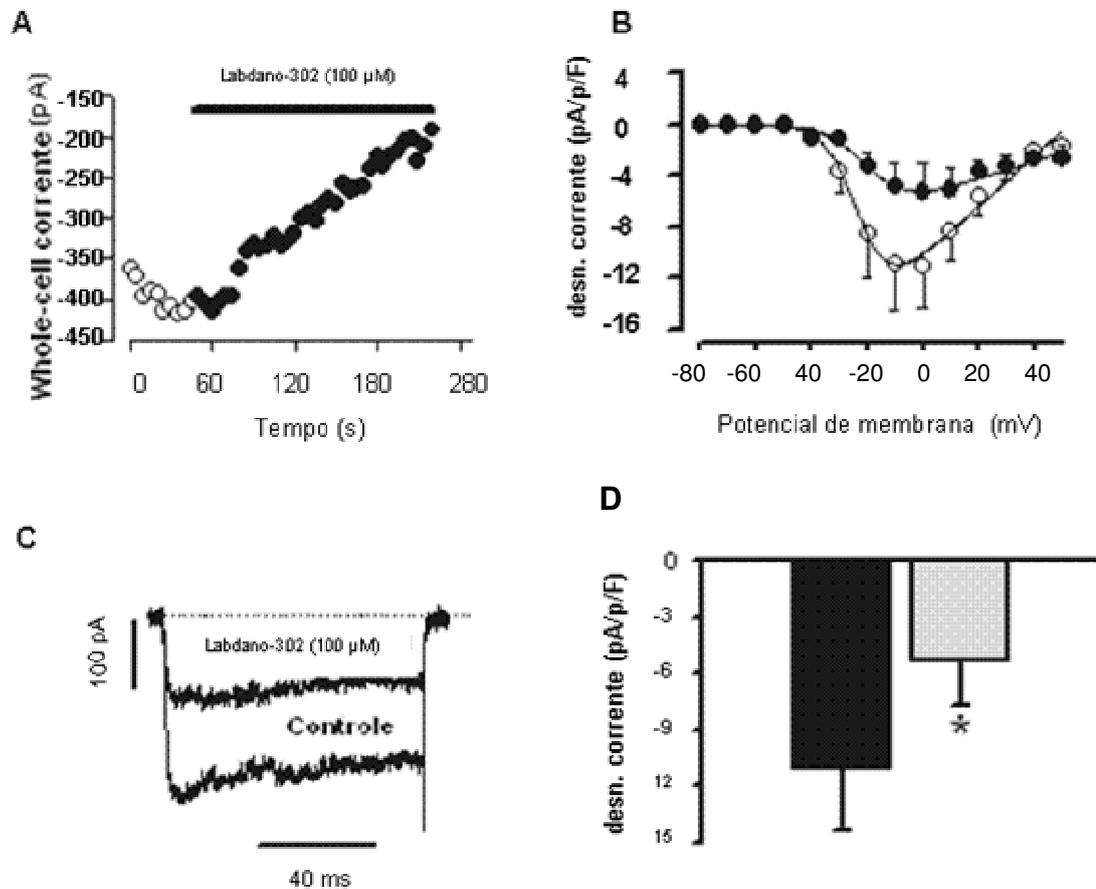


Gráfico 25 – Efeito do labdano-302 (100 µM) sobre a curva corrente-voltagem dos canais Ca_vL em células GH_3 . (potencial de holdin = -80 mV). Os diagramas **(A)** mostra o esquema representativo do curso-temporal da inibição da corrente de Ba^{2+} . **(B)** Densidade de tensão em relação à IBa^{2+} **(C)** Representação original de correntes indicando que labdano-302 não alterou a dependência de tempo da IBa^{2+} . O diagrama **(D)** resume os efeitos do labdano-302 (100 µM) sobre a amplitude da densidade de corrente. (n = 4 células). * $p < 0,05$ versus controle.

4.2.22 Efeito de labdano-302 sobre as contrações induzida por fenilefrina (10 μ M).

A avaliação do efeito do labdano-302 sobre as contrações transientes induzida por fenilefrina (10 μ M) foi estudada em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) sem endotélio intacto. O diterpeno labdano-302 (10^{-5} , 10^{-4} ou 10^{-3} M), induziu uma discreta inibição das contrações transientes induzida por fenilefrina. Os níveis máximos de contrações obtidas após a incubação das respectivas concentrações de labdano-302 foram: Controle ($E_{max} = 100 \pm 0,0 \%$) ($E_{max} = 91,1 \pm 1,2 \%$; $E_{max} = 86,8 \pm 1,3 \%$; $E_{max} = 81,7 \pm 2,0\%$, respectivamente) em anéis mesentéricos de ratos normotensos e ($E_{max} = 99,7 \pm 0,2 \%$; $E_{max} = 63,7 \pm 11,9 \%$; $E_{max} = 70,2 \pm 9,5 \%$, respectivamente) em artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME), (Gráfico 25 A e B).

4.2.23 Efeito de labdano-302 sobre as contrações induzida por cafeína (20 mM).

A avaliação do efeito do labdano-302 sobre as contrações induzida por cafeína foi estudada em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) sem endotélio. As concentrações de labdano-302 utilizadas nesse procedimento (10^{-5} , 10^{-4} ou 10^{-3} M), promoveram um aumento moderado da das contrações transientes induzida por cafeína 20 mM. Os valores de contrações máximas obtida na presença das diferentes concentrações de labdano-302 foram: Controle ($E_{max} = 100 \pm 0,0 \%$) ($E_{max} = 101,0 \pm 4,4\%$; $E_{max} = 103,3 \pm 0,6\%$; $E_{max} = 114,2 \pm 4,1\%$; $E_{max} = 101,4 \pm 3,6\%$; $E_{max} = 103,0 \pm 1,4\%$; $E_{max} = 110,5 \pm 1,9\%$, respectivamente) como mostrado nos (Gráfico 26 A e B).

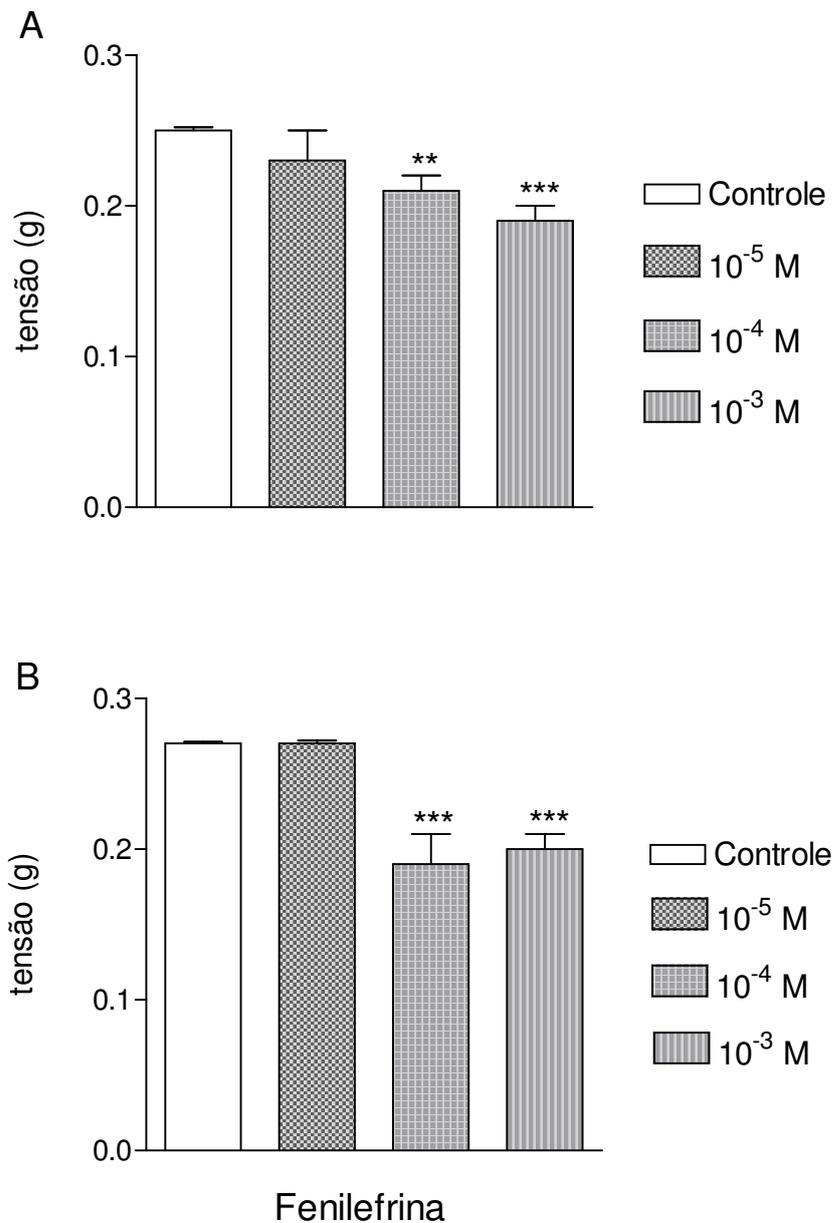


Gráfico 26 – Efeito do labdano-302 sobre contrações induzidas por fenilefrina (10 µM) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos (A) e hipertensos L-NAME (B) em meio livre de cálcio. Os valores foram expressos como média ± e.p.m de 6 experimentos por concentração. *** p<0,0001 *versus* controle.

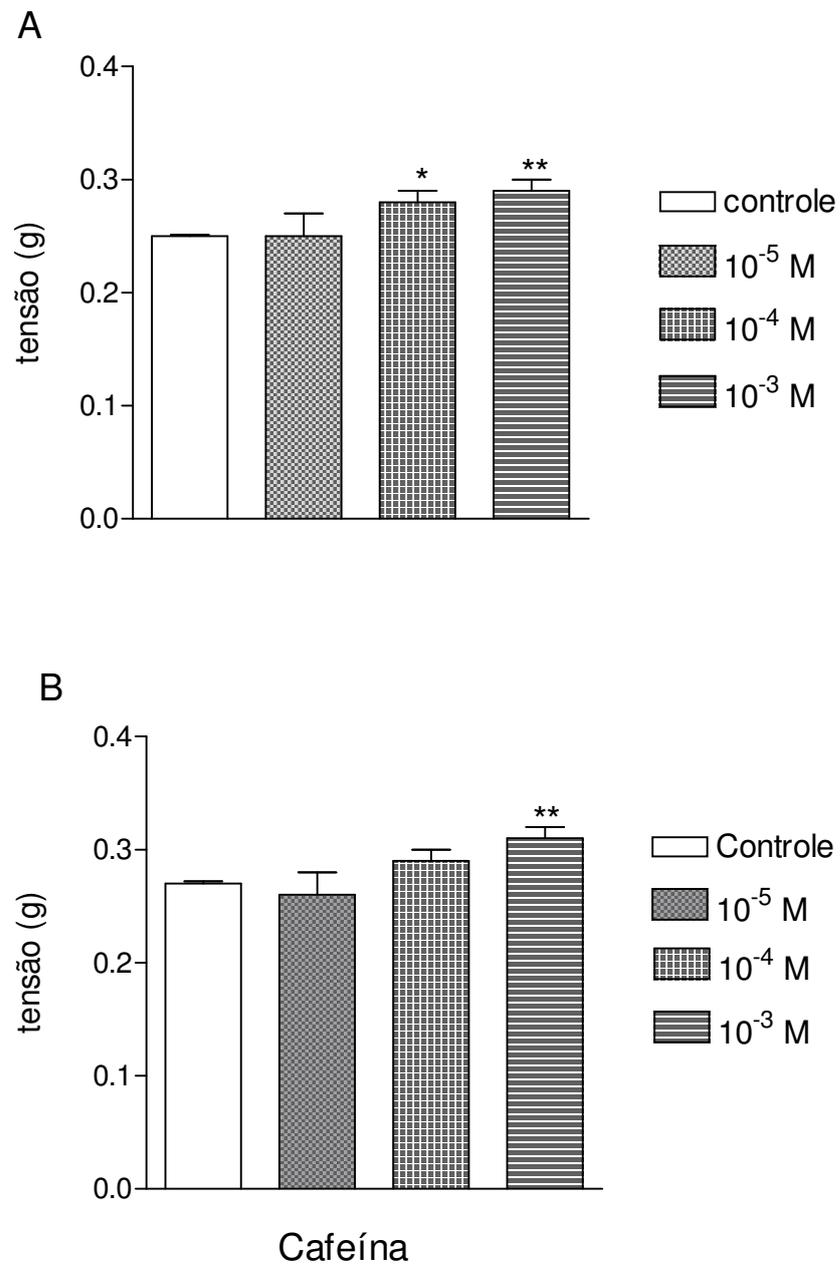
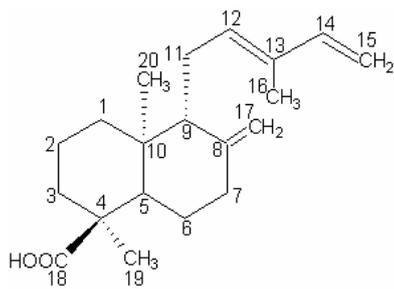


Gráfico 27 – Efeito do labdano-302 sobre contrações induzidas por cafeína (20 mM) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos (**A**) e hipertensos L-NAME (**B**) em meio livre de cálcio. Os valores foram expressos como média \pm e.p.m de 6 experimentos por concentração. * $p < 0,05$; ** $p < 0,004$; *** $p < 0,0001$ versus controle.



Discussão

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foram utilizadas duas abordagens metodológicas: *in vivo* para avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) não anestesiados e *in vitro* com anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

A principal constatação deste estudo realizado em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) foi que o diterpeno 8,17 12E,14-labdatrieno 18-óico (labdano-302) promoveu uma acentuada atividade hipotensora, sendo mais potente em ratos hipertensos (L-NAME). A hipotensão promovida por labdano-302 ocorre, provavelmente através de uma diminuição da resistência vascular periférica total.

Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório (Laboratório de Farmacologia Cardiovascular/LTF), labdano-302 apresentou um potente efeito hipotensor seguido de uma acentuada tarquicardia em ratos normotensos não-anestesiados. Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos, labdano-302 induziu um vasorelaxamento dependente e independente do endotélio vascular. No efeito dependente do endotélio vascular, a resposta relaxante do labdano-302 envolveu a participação da enzima sintase de NO, além dos metabólitos da via da ciclooxigenase, enquanto que no efeito independente do endotélio a resposta relaxante deste diterpeno parece envolver a participação dos canais para potássio de grande condutância sensível ao cálcio – BKCa (OLIVEIRA, 2004).

O tempo de administração de L-NAME em ratos é variável desde uma até oito ou mais semanas, e as doses administradas também são variáveis, desde baixas (5 mg/kg/dia) a altas (100 mg/kg/dia), além de doses intermediárias (50 mg/kg/dia) (RIBEIRO, 1992; BANK et al., 1994; HU et al., 1994). A correlação entre tempo de administração e valores de hipertensão ou níveis de disfunções endoteliais ainda não está esclarecida (LOPEZ et al., 2004). Neste estudo a administração de (L-NAME 50 mg/kg/dia) adicionado na água de beber dos ratos, aumentou os níveis basais de PAM e FC. Esses resultados são importantes visto que, de acordo com a literatura a administração de L-NAME durante sete dias promove uma elevação da PAM e FC (LIU et al. 1998) (ver tabela 1). Avaliou-se ainda, as alterações no índice massa corporal e dos órgãos dos ratos tratados com L-NAME, e como demonstrado na tabela 2, não ocorreu alteração no índice de massa dos órgãos dos ratos

tratados, em relação aos ratos normotensos (controle), de acordo com a literatura a administração prolongada de L-NAME induz lesões no fígado (ZATZ, et al., 1992). Um outro estudo mostrou que a administração por 4 semanas de L-NAME (40 mg/kg) por dia adicionado a água de beber, aumentou a síntese protéica e a proliferação celular em ratos (BERNATOVA et al., 1999). No entanto até o momento não está determinado se a administração de L-NAME por 7 dias causa algum tipo de alteração a nível de proliferação e síntese protéica em ratos.

A anestesia modifica os níveis de PA e FC além do funcionamento dos principais sistemas envolvidos na regulação da PA, tais como o sistema renina-angiotensina, o sistema nervoso simpático e o barorreflexo (FLUCKIGER et al., 1985. DORWARD et al, 1985), produz depressão de algumas sinapses do sistema nervoso central, alterando as respostas autonômicas (KORNER et al., 1968; WHITE ; MCRITCHIE, 1973; ZIMPFER et al., 1982), além de outros efeitos prejudiciais sobre os sistemas básicos de controle fisiológico da PA (FLUCKIGER et al., 1985, SMITH; HUTCHINS, 1980). Sendo assim, neste estudo foram utilizados animais não-anestesiados em todos os procedimentos *in vivo* e *in vitro*.

Em ratos tratados com um inibidor da síntese de NO (L-NAME), o diterpeno labdano-302 induziu um potente efeito hipotensor, sendo este efeito mais evidente nas duas últimas doses administradas (20 e 30 mg/kg). Quanto ao efeito sobre a FC a administração de labdano-302 não promoveu alteração, sendo observado apenas nas duas últimas doses uma discreta resposta taquicárdica, enquanto que nas duas primeiras doses a resposta bradicárdica observada não foi diferente estatisticamente dos valores basais. Entretanto, nos animais normotensos (controle), labdano-302 promoveu uma potente resposta taquicárdica dependente de dose e esta taquicardia pode ser atribuída provavelmente por uma ativação reflexa (Gráfico 1). Neste modelo de hipertensão (L-NAME) ocorre um aumento da atividade simpática e uma diminuição da atividade barorreflexa (SIMKO et al., 2003; SOUZA; BALLEJO; SALGADO; SILVA, 2001). Com isso, a diminuição da taquicardia observada em ratos hipertensos (L-NAME), após a administração do labdano-302, pode ser atribuída à diminuição da atividade barorreflexa observada nos animais tratados com L-NAME. No entanto, é necessária a realização de experimentais adicionais que comprovem a origem reflexa da taquicardia induzida por esse diterpeno.

Com o objetivo verificar se a diminuição da pressão arterial obtida com labdano-302 seria por uma diminuição da resistência vascular periférica. Realizou-se estudos com anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME). A artéria mesentérica por se apresentar como um vaso de resistência está mais amplamente implicado na regulação do débito sanguíneo e da pressão capilar e refletem melhor as evoluções da resistência periférica global (AALKJAER et al., 1990).

A hipertensão (L-NAME) ocorre devido a vários fatores como: inibição da produção de óxido nítrico (RIBEIRO et al., 1992), aumento do tônus simpático (SANDER et al., 1997), aumento da atividade do sistema renina - angiotensina (RIBEIRO et al., 1992; JOVER et al., 1993) e aumento da resistência vascular (RUIZ - MARCOS et al., 2001).

O mecanismo de relaxamento da musculatura lisa vascular pela acetilcolina (ACh) e outros agentes muscarínicos tem sido estudado extensivamente (COCKS et al., 1983) e demonstraram ser dependente da presença do endotélio vascular (FURCHGOTT et al., 1980). A acetilcolina estimula os receptores muscarínicos, que aumenta a concentração de cálcio intracelular nas células endoteliais levando a síntese e liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio-FRDE, principalmente NO (AJAY et al., 2006). O NO se difunde nas áreas adjacentes as células musculares lisas e ativa a produção de GMPc, levando a um relaxamento das células musculares lisas vasculares (FURCHGOTT et al., 1980).

Em várias artérias de ratos hipertensos (L-NAME) a resposta vasodilatadora para a acetilcolina é diminuída (GEWALTIG; KOJDA, 2002; AJAY et al., 2006) e abolida após a remoção do endotélio vascular (FURCHGOTT et al., 1980, RESS et al., 1990). Em experimentos realizados com anéis de artéria mesentérica de ratos tratados com (L-NAME), a resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina sofreu alteração de maneira significativa quando comparada ao controle (normotensos) (Gráfico 2).

A inibição crônica da sintase de NO induz um aumento na pressão arterial que é dependente da elevação da RPT (DANANBERG et al., 1993). Estudos anteriores sugerem que a vasoconstrição exige que o sistema nervoso simpático esteja intacto (TODA et al., 1993) e é mediada pelo aumento do tônus vascular adrenérgico (QIU et al., 1994), que pode ser causado pelo aumento ou liberação de catecolaminas ou pelo aumento da sensibilidade do músculo liso vascular às

catecolaminas. A aorta torácica não é inervada, enquanto que a artéria mesentérica superior é bem inervada pelas fibras simpáticas, mas as duas artérias apresentaram alterações semelhantes na sensibilidade aos estímulos adrenérgicos. No entanto, a similaridade na evolução das duas artérias sugere que a inervação simpática não é responsável por essa modulação, porém ocorre um aumento do número de receptores α_1 -adrenérgicos vascular que poderia contribuir para a elevação da resistência vascular periférica neste modelo de hipertensão (KANAGY, 1997).

Em estudos realizados para a verificação da reatividade vascular da fenilefrina, um agonista α_1 -adrenérgico (QIU et al., 1994). Observou-se que a resposta contracturante deste agonista foi diferente em preparações com anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME) na ausência do endotélio, em comparação com a resposta obtida em anéis mesentéricos de ratos normotensos na ausência do endotélio. Nas preparações na presença do endotélio a ação contracturante da fenilefrina não sofreu alteração significativa nem nos anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos, nem nos anéis mesentéricos de ratos hipertensos (L-NAME), (Gráfico 3). Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que preconizam que a reatividade vascular a agentes vasoconstritores é aumentada e a capacidade de resposta a vasodilatadores dependente do endotélio é reduzida neste modelo de hipertensão (CUNHA et al., 2000).

De acordo com os resultados acima (Gráfico 3), ocorre uma maior sensibilidade do aparato contráctil no modelo de hipertensão (L-NAME) a agentes contracturantes como a fenilefrina na ausência do endotélio vascular.

A fenilefrina promove o aumento do tônus vascular pela estimulação do receptor e pela elevação do influxo de cálcio (KARAKI; WEISS, 1988). Em experimentos para verificação da influência do labdano-302 sobre as contrações induzidas por fenilefrina, observou-se que o labdano-302 foi capaz de inibir de maneira concentração dependente as contrações induzida por fenilefrina, tanto em preparações de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos, quanto em ratos hipertensos (L-NAME), na presença ou na ausência do endotélio vascular, (Gráficos 4 A e B e 5 A e B). Estes resultados sugerem que o labdano-302 de algum modo influencia na resposta contráctil induzida pela fenilefrina. Dados da literatura mostram que o efeito vasoconstritor de agonista α_1 -adrenérgico pode ser modulado pelos fatores relaxantes derivados do endotélio vascular, principalmente NO e

prostaciclina (PGI_2) (GODFRAIND et al., 1985). Sendo assim, uma substância capaz de induzir a liberação desses fatores, aliado a capacidade de inibir o influxo de cálcio poderia interferir no processo de contração induzido pela fenilefrina.

O gráfico 6 mostra o efeito vasorelaxante induzido por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME), pré-contraídos com FEN. Nestas condições o diterpeno labdano-302 induziu um vasorelaxamento dependente de concentração e esta resposta foi atenuada de maneira significativa após a remoção do endotélio vascular, sugerindo o envolvimento de fatores relaxantes derivados do endotélio-FRDE. Ressaltamos ainda, que a resposta relaxante do labdano-302 em anéis mesentéricos de ratos hipertensos (L-NAME) na presença do endotélio vascular foi mais potente quando comparada com anéis mesentéricos de ratos normotensos (OLIVEIRA, 2004).

O tônus vascular tem um papel importante na regulação da pressão sanguínea. O desenvolvimento e manutenção da hipertensão estão associados à diminuição da influência de substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio no tecido vascular (KANG et al., 2005). O endotélio tem uma função importante na manutenção da homeostasia vascular pela síntese e liberação de vários fatores vasodilatadores incluindo: óxido nítrico, prostaciclina e FHDE além de fatores contracturantes como endotelina (MATOBA et al., 2002; KOZA et al., 2007).

Com o objetivo de identificar qual fator derivado do endotélio vascular estaria sendo responsável pela ação vasodilatadora do labdano-302, realizou-se experimentos utilizando diversas ferramentas farmacológicas inibidoras endoteliais.

Na presença de L-NAME um inibidor não seletivo da enzima sintase de NO (ARNAL; AMRANI; CHATELLIER; MENARD; MICHEL, 1993), a resposta relaxante de labdano-302 foi atenuada de maneira significativa, sugerindo o envolvimento da enzima sintase de NO nesta resposta. Este resultado surpreende visto que, os anéis mesentéricos utilizados neste experimento eram de ratos onde ocorreu uma inibição da sintase de NO com a administração prolongada de L-NAME. No entanto, estudos anteriores mostram que em comparação com ratos normotensos a atividade catalítica da sintase de NO em ratos hipertensos (L-NAME) é diminuída apenas em 30-60% (PECHÁŇOVÁ et al., 1997; BERNÁTOVÁ et al., 1999). Esta redução do percentual de atividade da sintase de NO, provavelmente não impede completamente a participação deste sistema vasoativo na regulação da pressão arterial (ZICHA et al., 2003). Além disso, nos animais hipertensos (L-NAME)

pode haver uma regulação crescente do mecanismo de reserva vasodilatador como fator hiperpolarizante derivado do endotélio (VARGAS et al. 1996; RUIZ-MARCOS et al., 2001) ou uma maior atividade da iNOS (LUVARA et al. 1998; PECHÁŇOVÁ et al., 2004). A iNOS uma isoforma da sintase de NO indutiva é ativada após um processo inflamatório (MONCADA et al., 1991; VANHOUTTE; EBER, 1995), sabe-se também que a inibição crônica da sintase de NO com a administração de L-NAME causa inflamação em modelo de hipertensão animal (KANG et al., 2005). Estes efeitos da administração prolongada de L-NAME, explicariam em parte a atenuação da resposta relaxante do labdano-302 em preparações tratadas agudamente com L-NAME.

A L-arginina o substrato endógeno para a enzima sintase do NO (MONCADA; HIGGS, 1993) e de acordo com dados literários a reversão do efeito inibitório do L-NAME na presença desse substrato é um forte indício da participação desta enzima em uma resposta relaxante. Em experimentos realizados na presença simultânea de L-NAME mais L-arginina ocorreu uma reversão total do efeito inibitório do L-NAME em preparações com anéis mesentéricos de ratos hipertensos (L-NAME). Enquanto que em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos não foi observado uma reversão total. Estes resultados sugerem o envolvimento da enzima sintase do NO na resposta relaxante induzida por labdano-302 (Gráfico 7 A e B).

O NO um gás lipossolúvel produzido pelas células endoteliais por ação da enzima sintase de NO e do complexo cálcio/calmodulina, é o principal fator relaxante derivado do endotélio vascular (BREDT et al., 1990; BUSSE et al., 1990; MONCADA et al., 1991). Para avaliar a participação do NO na resposta relaxante do labdano-302, utilizou-se o PTIO (300 μ M), uma ferramenta farmacológica que é capaz de seqüestrar óxido nítrico na célula (IKEDA et al., 1997). Nestas condições, a resposta relaxante de labdano-302 foi atenuada nas duas condições estudadas. Sugerindo o envolvimento do NO na resposta relaxante deste diterpeno (Gráfico 8 A e B). Este resultado pode fundamentar-se no fato de que, a inibição crônica com L-NAME aumenta a atividade da enzima sintase de NO (BERNÁTOVÁ et al., 2007). E que em artérias femorais de ratos tratados cronicamente com L-NAME ocorreu um aumento do vasorelaxamento dependente do endotélio, além de uma diminuição da vasoconstrição o que é indicativo de elevação da disponibilidade de óxido nítrico, nestas artérias (DABIRE et al., 1990). O aumento da produção de NO pode resultar

do “feedback” negativo da regulação entre o NO e sua própria produção (BERNÁTOVÁ et al., 2007). Estudos recentes mostraram que em células endoteliais de aorta de bovinos ocorreu um aumento na transcrição de RNAm da eNOS na presença de L-NAME, o que levaria a um maior aumento na atividade da sintase de NO (GRUMBACH, 2005). Estes relatos corroboram os resultados deste estudo, visto que houve uma atenuação da resposta relaxante de labdano-302 na presença de inibidor do L-NAME em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME).

A produção de NO pela célula endotelial ativa a CG, que irá catalizar a conversão de GTP em GMPc no músculo liso, este GMPc formado proverá a ativação de uma proteína cinase dependente de GMPc-PKG, que através de fosforilações intracelulares leva a uma diminuição dos níveis de Ca^{2+} no interior da célula muscular lisa e conseqüente processo de vasodilatação da musculatura lisa vascular (SABRANE et al., 2003; MULLERSHAUSEN et al., 2003).

Para avaliar a participação da via de sinalização que envolve a ativação da ciclase de guanilil solúvel, foi realizado experimentos na presença de ODQ (10 μ M), um inibidor seletivo desta enzima (GARTHWAITE et al., 1995). Nestas condições o vasorelaxamento de labdano-302 foi atenuado de maneira significativa e equipotentes nas duas condições estudadas, sugerindo o envolvimento da enzima ciclase de guanilil na resposta relaxante induzida por labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) (Gráfico 9 A e B). Como observado tanto na presença do PTIO como do ODQ ocorreu uma inibição da resposta relaxante do labdano-302 maior do que o efeito relaxante obtido após a remoção do endotélio vascular, este acentuada inibição na presença dessas ferramentas sugere que provavelmente alguma fonte de reserva de NO esteja sendo recrutada para o relaxamento do labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) na presença do endotélio vascular, no entanto experimentos adicionais são necessários para a melhor caracterização dessa resposta.

Com o objetivo de avaliar se o diterpeno labdano-302 estaria agindo sobre a PKG e com isso promoveria seu efeito vasodilatador dependente do endotélio vascular, realizou-se experimentos na presença de KT 5823 (1 μ M), um inibidor seletivo da PKG (KWAN et al., 2000). Como pode ser observado no gráfico (10 A e B) a resposta vasodilatadora induzida pelo labdano-302 foi atenuada de maneira significativa, tanto em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

normotensos como em anéis mesentéricos de ratos hipertensos (L-NAME), reforçando as evidências experimentais do envolvimento da via NO/GMPc/PKG na resposta vasorelaxante do labdano-302.

Uma outra via muito importante para o vasorelaxamento e conseqüente regulação do tônus vascular é a que envolve a produção e liberação de metabólitos da via da enzima ciclooxigenase. A ciclooxigenase - COX é uma enzima que catalisa a reação de metabolismo do ácido araquidônico em metabólitos, dentre eles a prostaciclina que é um potente vasodilatador derivado do endotélio vascular importante para a regulação do tônus muscular (MONCADA; VANE, 1979; SHULZ; TRIGGLE, 1994). A prostaciclina formada no endotélio vascular se difunde até o as células musculares onde promove a ativação de receptores IP que estão acoplados a proteína G_s (COLEMAN et al., 1994), este acoplamento induz a ativação da enzima AC levando a um aumento dos níveis de AMPc no citosol. O aumento do AMPc gera a ativação de uma proteína cinase dependente de AMPc-PKA. Esta proteína quando ativada promove fosforilações da bomba do retículo sarcoplasmático, aumentando a recaptação de cálcio do citosol para os estoques, promovendo a abertura de canais para potássio, o fechamento de canais para cálcio na membrana e a inibição da cinase da cadeia leve de miosina (MLCK). Estas seqüências de fosforilações levam a uma diminuição das concentrações de cálcio na célula muscular acarretando em uma diminuição do tônus (SIEGEL, et al, 1989; FROLICH, 1990).

Para avaliar a influência da COX na resposta relaxante induzida por labdano-302, realizou-se experimentos na presença de indometacina, um inibidor não seletivo desta enzima (CLARK; FUCHS, 1997). E nestas condições, a resposta vasorelaxante de labdano-302 foi atenuada de maneira significativa, sugerindo o envolvimento dos metabólitos da via do ácido araquidônico nesta resposta (Gráfico 11). Estes resultados obtidos com anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME) corroboram os resultados obtidos com ratos normotensos (OLIVEIRA et al., 2006).

Um evento importante para a produção de fatores relaxantes derivados do endotélio é o aumento das concentrações de Ca^{2+} na célula endotelial, que pode ocorrer por ativação dos receptores muscarínicos subtipo M_3 . Os receptores muscarínicos são proteínas integrais de membrana acoplados a proteína-G que quando estimulados por um agonista induz o aumento de Ca^{2+} na célula endotelial e

conseqüente liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio – FRDEs (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). O envolvimento desses receptores neste estudo foi avaliado através de experimentos realizados na presença de um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos, a atropina (1 nM) (SAWAYER, 1999). Nestas condições, a resposta vasorelaxante de labdano-302 não sofreu alteração significativa, sugerindo que os receptores muscarínicos provavelmente não participam da resposta relaxante do diterpeno labdano-302 (Gráfico 12). Esses resultados corroboram os obtidos em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos (OLIVEIRA et al., 2006).

As interações das proteínas G com canais iônicos causam uma mudança imediata no estado de comportamento celular. Estas interações com enzimas-alvo têm conseqüências mais complexas, levando à produção de outras moléculas e íons que são sinalizadores intracelulares. Esses sinalizadores, por sua vez, freqüentemente chamadas de segundo mensageiro, passam adiante o sinal, alterando o comportamento de proteínas celulares específicas. Os mediadores intracelulares mais estudados são o 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e o Ca^{2+} (SCHUBERT, 2001). O AMPc promove a ativação da AC. Esta enzima é normalmente mantida inativa em um complexo com outra proteína; a ligação ao AMPc induz uma mudança conformacional que libera a enzima ativa promovendo a ativação da PKA, resultando na fosforilação de várias proteínas alvo no interior da célula e membrana, incluído os canais para potássio, levando ao relaxamento muscular (WHITE, 2001).

Com o objetivo de avaliar a influência da PKA na resposta vasorelaxante induzida por labdano-302, realizou-se experimentos com anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) na ausência do endotélio vascular, pré-incubados por 30 minutos com H-89 (1 μ M) um inibidor seletivo desta enzima (WHITE, 2001). Nestas condições, a resposta relaxante do diterpeno labdano-302 não foi modificada, sugerindo que provavelmente a PKA não participa do mecanismo de ação vasorelaxante de labdano-302 em preparações na ausência do endotélio vascular, tanto em anéis mesentéricos de ratos normotensos quanto em hipertensos (L-NAME) (Gráfico 13 A e B). Observou-se também que houve uma potencialização da resposta relaxante do labdano-302 nas duas condições estudadas. No entanto faz-se necessário, a realização de estudos adicionais para melhores esclarecimentos dessa resposta.

Os canais para potássio pertencem a uma grande família de proteínas integrais de membrana que têm um papel importante em processos fisiológicos, desde a liberação de neurotransmissores a regulação do tônus vascular (GHATTA et al., 2006). A ativação desses canais para potássio altera a atividade e mobilização de Ca^{2+} na célula muscular, que posteriormente poderá resultar em vasodilatação (STANDEN et al., 1998).

Para avaliar a influência dos canais para potássio na resposta relaxante de labdano-302, realizou-se experimentos aumentando a concentração externa de potássio de 4 para 20 mM (CAMPBELL et al., 1996). Esta concentração impede parcialmente o efluxo desses íons levando a uma atenuação da resposta relaxante induzida por substâncias que promovem a abertura de canais para potássio (CLARK ; FUCHS, 1997).

Nestas condições experimentais, o efeito vasorelaxante de labdano-302 não foi alterado em preparações na presença do endotélio vascular, sugerindo o não envolvimento desses canais na resposta relaxante dependente do endotélio (Gráfico 14). Porém, após a remoção da camada endotelial ocorreu uma atenuação da resposta vasodilatadora do labdano-302 evidenciando, portanto, o envolvimento dos canais para potássio no vasorelaxamento induzido por labdano-302 na ausência do endotélio vascular (Gráfico 15).

A ativação de canais para potássio na membrana do músculo liso vascular, gera o aumento do efluxo de íons potássio causando uma hiperpolarização de membrana, levando ao fechamento dos Ca_v , diminuindo a entrada de Ca^{2+} na célula causando uma vasodilatação (SOBEY et al., 2001). Estudos ao longo dos últimos 20 anos têm identificado pelo menos quatro diferentes classes de canais para K^+ expressos pelas células arteriolares do músculo liso. Estes incluem: Canais para potássio retificadores de entrada (K_{IR}), canais para potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}), canais para potássio ativado por voltagem (K_V) e canais para potássio ativados pelo cálcio (K_{Ca}) (JACKSON, 2005).

Com o objetivo de identificar o canal para potássio envolvido no efeito vasodilatador de labdano-302 em preparações na ausência do endotélio vascular, passou-se a realização de experimentos utilizando diferentes inibidores seletivo de canais para potássio.

Um grupo de canal muito importante para a regulação do tônus vascular são os canais K_V . Esses canais são ativados por despolarização de

membrana e provavelmente participam do “feedback” negativo da regulação do potencial de membrana juntamente com BK_{Ca} (JACKSON, 2005). A influência desses canais na resposta vasorelaxante do labdano-302 foi avaliada através da utilização de 1 mM de 4-aminopiridina, um bloqueador seletivo desses canais (BERG, 2002). Nestas condições, o efeito vasorelaxante de labdano-302 não sofreu alteração significativa, sugerindo que os K_V provavelmente não participam do efeito vasodilatador do diterpeno labdano-302 em anéis de artéria mesentérica de ratos hipertensos (L-NAME) na ausência do endotélio vascular (Gráfico 16).

Os canais para potássio sensíveis a ATP - K_{ATP} são fechados pelo aumento dos níveis de ATP intracelular e também são modulados por vários outros sinais intracelulares como: ADP, H^+ e Ca^{2+} , podendo ainda ser ativado pelo óxido nítrico (QUAYLE et al., 1997). Com o objetivo de verificarmos a influência do diterpeno labdano-302 sobre os K_{ATP} , utilizou-se um inibidor seletivo para esses canais (glibenclamida 10 μM) (IIDA, 2001) em preparações com anéis mesentéricos de ratos hipertensos, na ausência do endotélio funcional. Nestas condições a resposta vasorelaxante de labdano-302 não sofreu alterações significantes, sugerindo a não participação desses canais na resposta vasorelaxante endotélio independente de labdano-302 (Gráfico 17).

Os K_{IR} são canais para potássio que quando ativados promovem o equilíbrio do potencial negativo da membrana, pois conduzem íons potássio para dentro da célula, quando o potencial está mais positivo, considerando que com o potencial mais positivo a entrada de potássio é limitada (QUAYLE, 1997). Esse mecanismo os torna importantes para manutenção da homeostasia do tônus vascular. Esses canais K_{IR} são bloqueados por Ba^{2+} em concentrações micromolar e são ativados por aumento de potássio extracelular (QUAYLE et al., 1997). Com o objetivo de avaliar a participação dos canais para potássio retificadores de entrada (K_{IR}) na resposta relaxante induzida por labdano-302, utilizou-se $BaCl_2$ (30 μM), um inibidor seletivo desse canais (CHRISOBOLIS, 2000). Na presença de $BaCl_2$ a resposta vasorelaxante de labdano-302 não sofreu atenuação e sim uma potencialização da ação relaxante do labdano-302 (Gráfico 18). Esta resposta potencializada poderia ser uma somatória da ação do labdano-302 do e $BaCl_2$ sobre a inibição das correntes para Ca^{2+} através dos Ca_V . Visto que o Ba^{2+} compete com o Ca^{2+} pelo canal Ca_V . No entanto é necessária a realização de estudos adicionais para melhores esclarecimentos desse efeito.

Os canais para potássio ativados pelo cálcio – K_{Ca} foram os primeiros membros na família a serem identificados (MARTY, 1981). Eles são ativados tanto pela elevação dos níveis citosólicos de Ca^{2+} quanto pela despolarização de membrana, surpreendentemente, estes canais podem abrir mesmo na ausência de cálcio (PALLOTTA, 1985). São três até o momento os tipos de canais para potássio sensíveis a cálcio, eles variam de denominação de acordo com a sua sensibilidade; Canais para potássio sensíveis ao cálcio de grande condutância (BK_{Ca}), canais para potássio sensíveis ao cálcio de condutância intermediária (IK_{Ca}) e canais para potássio de baixa condutância sensíveis ao cálcio (SK_{Ca}) (JACKSON, 2005).

De acordo com a literatura drogas que promovem a abertura ou expressão de canais SK_{Ca} podem representar um novo e importante alvo terapêutico na estratégia de tratamento da hipertensão (LEDOUX et al., 2006). Para avaliarmos a influência desses canais na resposta vasorelaxante de labdano-302, realizou-se experimentos na presença de apamina (1 μ M), um inibidor seletivo desses canais, e como mostrado no gráfico 19 a apamina não foi capaz de alterar o vasorelaxamento induzido por labdano-302, sugerindo que estes canais provavelmente não participam dessa resposta. Esses resultados obtidos na presença de glibenclamida e apamina corroboram os resultados obtidos em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos, onde ocorreu uma potencialização do relaxamento do diterpeno labdano-302 (OLIVEIRA, 2004). Esta resposta relaxante aumentada na presença desses inibidores, necessita de estudos adicionais para maiores esclarecimentos, no entanto, evidências experimentais sugerem que pode ocorrer uma diminuição da expressão ou da atividade desses canais (SK_{Ca} , K_{ATP}) na patologia da hipertensão arterial (SOBEY, 2001).

Os BK_{Ca} foram os primeiros canais a serem estudados em células musculares lisas, onde são os principais canais atuantes na regulação do tônus vascular (JACKSON, 2005). Ativadores de BK_{Ca} estabilizam as células por aumentarem o efluxo de íons potássio, conduzindo uma hiperpolarização de membrana e assim, diminuem a excitabilidade das células e/ou podem causar relaxamento do músculo liso. Substâncias que podem agir como ativadores destes canais têm potencial terapêutico por causa do envolvimento desses canais na patologia da hipertensão (JACKSON, 2005). Uma série de recentes descobertas mostram a importância dos canais BK_{Ca} na regulação do tônus do músculo liso

vascular e da pressão arterial, dada a identificação do gene da subunidade- β_1 do canal que é específica para a regulação do tônus gerado na hipertensão (LEDOUX et al., 2006).

Neste estudo a participação desses canais na resposta vasodilatadora induzida por labdano-302 foi avaliada em procedimento experimental no qual se utilizou um inibidor seletivo de BK_{Ca} (TEA 1 mM) (LANGTON et al., 1991; GARCIA; KAC-ZOROWSKI, 1992; WHITE, 2002). Como pode ser observado no gráfico 20, a resposta relaxante de labdano-302 foi atenuada de maneira significativa, sugerindo o envolvimento dos BK_{Ca} no efeito vasorelaxante de labdano-302, em preparações mesentérica de ratos hipertensos L-NAME na ausência do endotélio vascular.

Como em todas as células musculares, a musculatura lisa vascular utiliza Ca^{2+} , como um mecanismo de acionamento no processo de contração. O influxo de Ca^{2+} através de Ca_v da membrana plasmática e liberação de cálcio dos estoques intracelulares são as principais fontes para a ativação do mecanismo da contração (JACKSON, 2000). O aumento das concentrações extracelulares de potássio gera uma despolarização de membrana promovendo a ativação dos canais Ca_v ocasionando o influxo de cálcio gerando uma contração (REMBOLD, 1996). No músculo liso, independente da via de sinalização envolvida no processo de contração, uma redução dos níveis de Ca^{2+} intracelular leva ao relaxamento (NELSON et al., 2005).

O aumento de potássio externo promove uma despolarização de membrana, promovendo a abertura de Ca_v , levando a um aumento do influxo de Ca^{2+} na célula gerando uma contração. Este fenômeno pode ser observado quando se eleva a concentração externa de potássio com uma solução despolarizante com elevado potássio (KCl 80 mM). Em experimentos realizados nestas condições, o labdano-302 promoveu um vasorelaxamento dependente de concentração nos anéis de artéria mesentérica superior de ratos hipertensos (L-NAME) tanto na presença quanto na ausência do endotélio vascular, sugerindo que o labdano-302 promove relaxamento de contrações induzida tanto por um agonista adrenérgico como por uma agente despolarizante caracterizando uma ação inespecífica, estes resultados ainda sugerem que o labdano-302 pode estar atuando sobre o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v na membrana plasmática diminuindo a entrada de Ca^{2+} .

Independente das origens diversas, uma característica em todas as formas de hipertensão é um tônus vascular anormal que é mediado pelo influxo de Ca^{2+} , através dos Ca_V . Notavelmente, o conhecimento sobre os canais Ca_V no sistema cardiovascular tem revolucionado nas últimas duas décadas pela disponibilidade da biologia molecular. Esse conhecimento lançou as bases para compreensão da relação entre a estrutura e função dos canais- Ca_V na vascularização e na regulação da pressão arterial (SWAPNIL, 2006).

Para reafirmar a participação do labdano-302 sobre o bloqueio dos canais para cálcio na membrana plasmática, realizou-se experimentos, através da adição cumulativa de CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem cálcio antes e após a incubação com concentrações isoladas de labdano-302. Nestas condições observou-se que, na presença de labdano-302 as curvas concentração-resposta do CaCl_2 foram deslocadas para a direita e com redução do efeito máximo, sugerindo uma ação de labdano-302 sobre o influxo de Ca^{2+} na membrana plasmática (Gráfico 23 A e B).

Após caracterizar o envolvimento de labdano-302 sobre o influxo de Ca^{2+} através na membrana plasmática, passou-se a avaliar a inibição desse influxo de cálcio estaria ocorrendo por uma ação direta de labdano-302 sobre os canais Ca_VL . Para isso, realizou-se experimentos na presença de uma ferramenta farmacológica, agonista desses canais, o Bay K8644 (0,1 μM), que causa pequenas contrações concentração-dependente e que sofrem um aumento considerável após despolarização moderada da membrana com potássio (7,5 - 20 mM) (BARRÚS et al., 1996). Como pode ser observado no gráfico 24, labdano-302 promoveu um relaxamento concentração-dependente das contrações induzidas pelo Bay K8644 de maneira concentração-dependente. Observou-se ainda que o relaxamento induzido por labdano-302 foi mais potente nas preparações com anéis mesentéricos de ratos hipertensos (L-NAME). Estes resultados são de extrema importância, visto que, confirmam a hipótese levantada de que labdano-302 promove o bloqueio dos canais Ca_VL na membrana plasmática.

As células musculares lisas vascular (VSMCs) utilizam cálcio como um sinal molecular para múltiplas funções. São dois os tipos de canais responsáveis pela entrada de cálcio na célula musculares lisas vasculares (VSMCs), o canal Ca_VL e baixa voltagem tipo-T (Ca_VT). Os Ca_VL têm como função principal regular a entrada de Ca^{2+} para contração, enquanto que o tipo-T não contribui

significativamente para vasoconstrição arterial, exceto na microvasculatura renal (CRIBBS, 2006). O principal canal para cálcio sensível a voltagem encontrado na musculatura lisa é o $Ca_v1.2$, que é membro da família dos Ca_vL presentes em vários músculos lisos inclusive na musculatura lisa vascular (CATTERALL et al., 2005).

A técnica de “Whole cell patch-clamp” é usada para investigar as propriedades farmacológicas de correntes para cálcio em células clonadas de pituitária de ratos (GH3) (SIMASKO et al., 1988). Os Ca_vL são conhecidos por proporcionarem um maior influxo de cálcio em células excitáveis de pituitária (CORRETTE et al., 1995). A função fisiológica desses canais é bem extensivamente investigada em linhagem de células GH3 onde a maioria dos canais presentes na membrana destas células é de canais para cálcio sensíveis a voltagem do tipo-L- (Ca_vL) (KALMAN et al., 1988; SIMASKO et al., 1988; LIÉVANO et al., 1994; PIROS et al., 1995). As células utilizadas neste estudo foram GH3, escolhidas porque apresentam características eletrofisiológicas (MEZA et al., 1994; LIÉVANO et al., 1994) e de transdução de sinal semelhantes às células musculares lisas vasculares (PIROS et al., 1995; CATALDI et al., 1996; KEEF et al., 2001), também regularmente expressam canais Ca_vL (ARAÚJO et al., 2003).

Uma evidência experimental de que o labdano-302 poderia realmente bloquear os canais Ca_vL na membrana plasmática foi obtida através de experimentos eletrofisiológicos. A figura 25 mostra que em estudo eletrofisiológico para medida de corrente para cálcio na configuração “whole cell”, labdano-302 na concentração de 100 μ M promoveu uma diminuição significativa das correntes para cálcio. O início do bloqueio do efeito foi bastante lento e irreversível nas condições experimentais levantando, à hipótese de um efeito indireto do labdano-302 sobre o bloqueio de Ca_vL (Gráfico 25A). Estes resultados confirmam a ação deste diterpeno sobre o bloqueio do canal Ca_vL (OLIVEIRA et al., 2006). A este efeito de labdano-302 envolvendo a inibição do influxo de Ca^{2+} através dos $Ca_vL1.2$ pode-se atribuir a sua atividade vasodilatadora e hipotensora, já que os $Ca_vL1.2$ são alvos comuns de fármacos antihipertensivos que bloqueiam a entrada de cálcio e promovem vasodilatação (MARTIN et al., 2000; BRUEGGEMANN et al., 2005).

A liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares tem um papel importante na atividade celular incluindo, o acoplamento excitação-contração no músculo liso. Esta liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático ocorre via ativação de receptores sensíveis a IP_3 - IP_3R e de receptores sensíveis a rianodina- R_{yR} , no

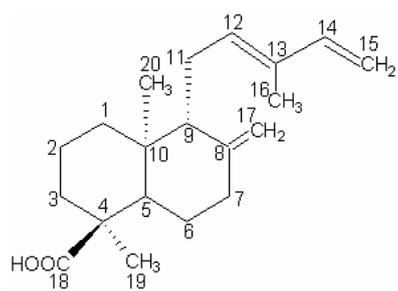
entanto a inter-relação entre esses receptores ainda não é totalmente conhecida (FLYNN et al., 2001).

O fosfoinositol trisfosfato - IP_3 é um segundo mensageiro liberado através da ativação de um receptor de membrana ligado a proteína-G. Uma vez formado, o IP_3 se difunde pelo citoplasma e ativa o receptor específico no retículo sarcoplasmático – RS, promovendo então a liberação de cálcio dos estoques intracelulares gerando uma contração transiente (LAPORTE et al., 2004). Sendo assim, substâncias que possam atuar sobre esses receptores tornam-se importantes alvos para estudos que envolvam o processo de contração ou relaxamento do músculo liso.

O gráfico 26 A e B, mostra que o diterpeno labdano-302 promoveu uma discreta inibição da contração transiente induzida por fenilefrina ($10 \mu M$), tanto em anéis mesentéricos de ratos normotensos, quanto em anéis mesentéricos de ratos hipertensos (L-NAME), sugerindo que o labdano-302 provavelmente influencia na mobilização de cálcio dos estoques intracelulares sensíveis a IP_3 .

Os receptores rianodínicos são canais para cálcio presentes na membrana do retículo sarcoplasmático, são ativados pelo cálcio citoplasmático em aproximadamente ($1 \mu M/L$) e são desativados pelo aumento das concentrações de cálcio (BEZPROZVANNY et al., 1991). A liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares sensíveis a rianodina é chamada de “sparks- Ca^{2+} ” (KNOT et al., 2005), esse aumento focal de cálcio promove a ativação dos canais BK_{Ca} (JACKSON, 2000). A cafeína é utilizada como ferramenta farmacológica para a ativação e conseqüente liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (SMITH et al., 1989).

O gráfico 27 A e B, mostra que na presença do labdano-302 ocorreu um aumento discreto das contrações induzida por cafeína, sugerindo um envolvimento deste diterpeno na liberação de cálcio dos estoques intracelulares sensíveis a rianodina. Porém é necessária a realização de experimentos a nível molecular para melhor esclarecer esta hipótese.



Conclusões

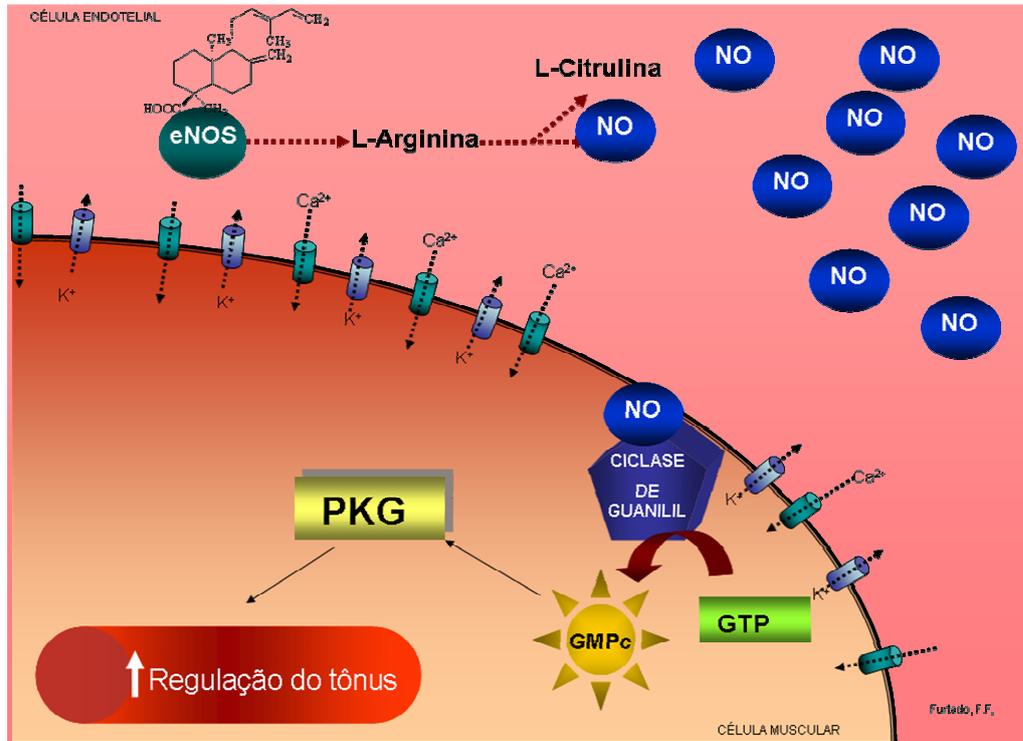
6 CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados obtidos através de uma abordagem *in vivo e in vitro* em ratos normotensos e hipertensos (L-NAME) demonstram que:

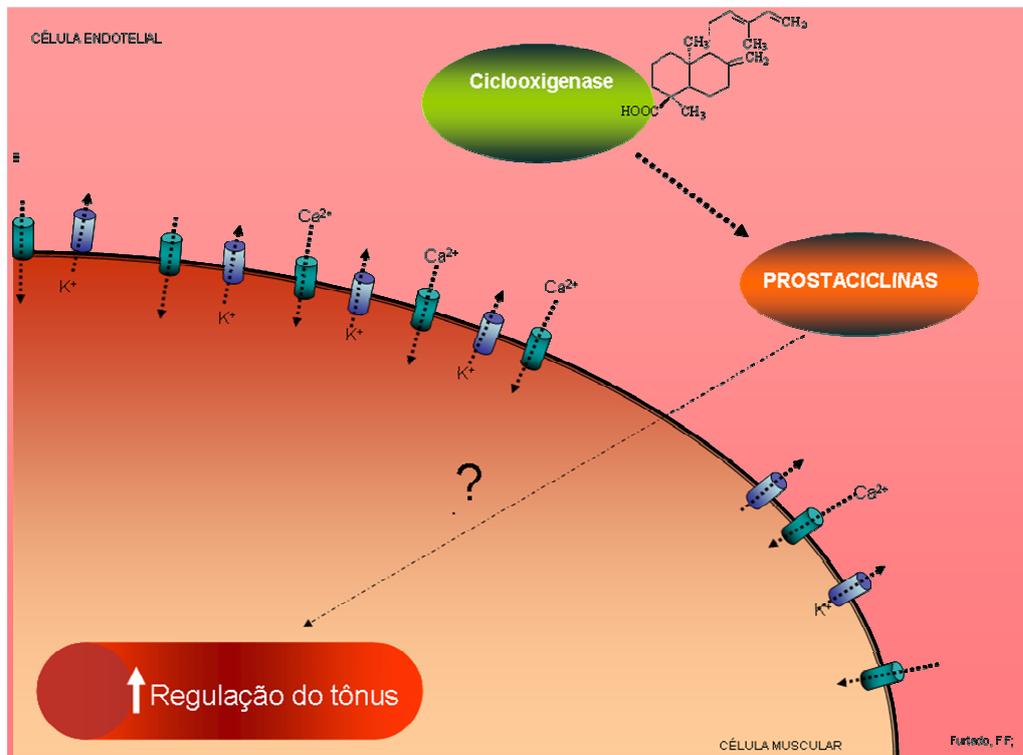
- ✓ O diterpeno labdano-302 induz uma diminuição da pressão arterial em ratos hipertensos (L-NAME) mais pronunciada do que em ratos normotensos.
- ✓ Em ratos normotensos labdano-302 promoveu uma acentuada taquicardia provavelmente de origem reflexa.
- ✓ O labdano-302 promoveu uma diminuição significativa da FC, com uma leve bradicardia em doses mais baixa não diferente dos valores basais e uma discreta taquicardia em doses mais elevadas em ratos hipertensos (L-NAME).
- ✓ O diterpeno labdano-302 promoveu um potente efeito vasorelaxante dependente e independente do endotélio vascular, o efeito dependente do endotélio parece envolver a via NO-sintase/NO/GMPc/PKG, além dos metabólitos derivados da ciclooxigenase.
- ✓ O efeito vasorelaxante do labdano-302 dependente do endotélio parece não envolver a ativação dos receptores muscarínicos.
- ✓ Em preparações na ausência do endotélio vascular, o efeito vasorelaxante de labdano-302 provavelmente não envolve a participação da proteína cinase dependente de AMPc - PKA.
- ✓ Os canais para potássio sensível ao cálcio de grande condutância - BK_{Ca} provavelmente participam do vasorelaxamento independente do endotélio induzido pelo labdano-302.
- ✓ O diterpeno labdano-302 mostrou-se capaz de inibir o influxo de cálcio através dos Ca_vL1.2 na membrana plasmática bem como inibiu as correntes de Ba²⁺ em células GH3.
- ✓ O diterpeno labdano-302 promoveu uma discreta inibição da mobilização dos íons cálcio dos estoques intracelulares induzida por fenilefrina, e promoveu uma moderada liberação de cálcio dos estoques sensíveis à rianodina.

Mecanismos de ação dependentes do endotélio vascular propostos para o labdano-302:

Mecanismo 1 – Envolvendo a participação da via eNOS/NO/CG/PKG.

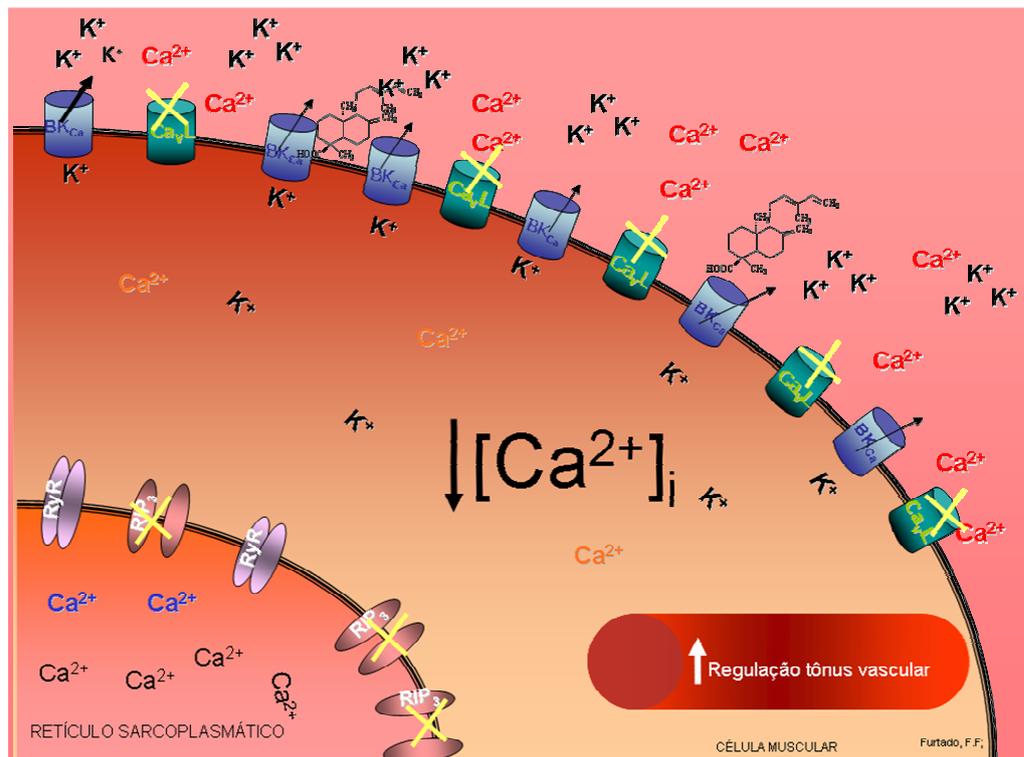


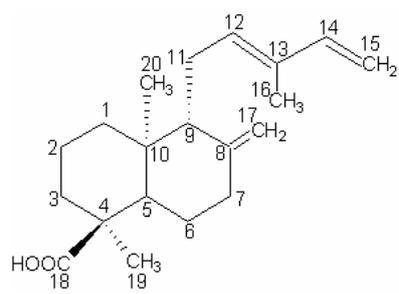
Mecanismo 2 – Envolvendo a participação da enzima ciclooxigenase



Mecanismo de ação independente do endotélio vascular proposto para o labdano-302:

- 1- Envolvendo a ativação de BK_{Ca}
- 2- Diminuição do influxo de Ca^{2+} através dos $Ca_v1.2$
- 3- Inibição da liberação dos estoques intracelulares sensíveis a fenilefrina.





Perspectivas

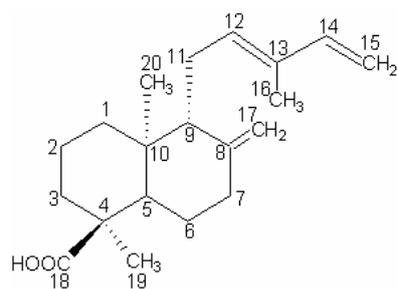
7 PERSPECTIVAS

Em estudos *in vivo*;

Avaliação da ação anti-hipertensiva de labdano-302 em ratos hipertensos L-NAME, através da realização do tratamento crônico dos animais com doses variadas de labdano-302 em períodos de realização diferentes.

Em estudos *in vitro*;

- Realização de dosagem dos níveis de GMPc e NOx em células de artéria mesentérica de ratos hipertensos e normotensos tratados cronicamente com labdano-302.
- Avaliação da atividade da enzima NOS em células endoteliais de artéria mesentérica de ratos hipertensos L-NAME tratados com labdano-302.
- Realização de medidas dos níveis de cálcio em células musculares lisas de artéria mesentérica de ratos hipertensos L-NAME tratado com labdano-302.



Referências

REFERÊNCIAS

AJAY, M.; ACHIKE, F. I.; MUSTAFA, A.M.; MUSTAFA, M. R. Direct effects of quercetin on impaired reactivity of spontaneously hypertensive rat aortae. Comparative study with ascorbic acid. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 33; 345–350. 2006.

AKUZAWA, N.; NAKAMURA, T.; KURASHINA, T.; SAITO, Y.; HOSHINO, J. Antihypertensive agents prevent nephrosclerosis and left ventricular hypertrophy induced in rats by prolonged inhibition of nitric oxide synthesis. **American Journal Hypertension**, 11 (6 Pt 1): 697-707, 1998.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, 219: 1698-1705. 1970.

ANDRADE, N. C.; FRANÇA, V.C.; FECHINE, I. M.; TAVARES, I. F.; MAIOR, J. F. A. S.; RIBEIRO, L. A. A.; SILVA, M. S. Diterpenes kaurano e labdano do gênero *xylopi*. In: **25ª Reunial anual da Sociedade Brasileira de Química**. Poços de Caldas, livro de resumo p. PN-168. 2002.

ARAÚJO, D. A. M.; MAFRA, R. A.; RODRIGUES, A. L. P.; MIGUEL-SILVA, V.; BEIRÃO, P. S. L.; ALMEIDA, R.N.; QUINTANS J R.; SOUZA, M. F. V.; CRUZ, J. S. N-Salicyloyltryptamine, a new anticonvulsant drug, acts on voltage-dependent Na⁺, Ca²⁺, and K⁺ Ion Channels. **British Journal of Pharmacology**, 140, 1331–1339. 2003.

ARNAL, J. F.; AMRANI, A. I.; CHATELLIER, G.; MENARD, J.; MICHEL, J. B. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. **Hypertension**. 22, 380–387. 1993.

BARRÚS, M. T.; REVIRIEGO, J.; MARÍN, J. Effect of the Ca(2⁺)-channel agonist Bay K 8644 on the contractile responses in human placental veins. **Journal Auton Pharmacology**, 16(3):161-7. 1996.

BARTUNEK, J.; WEINBERG, E.O.; TAJIMA, M.; ROHRBACH, S.; KATZ, S.E.; DOUGLAS, P. S. Chronic NG-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. **Circulation**, 101: 423-9, 2000.

BARRIERE, E.; TAZI, K. A.; RONA, J.P.; PESSIONE, F.; HELLER, J.; LEBREC, D.; MOREAU, R. Evidence for an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in the Superior Mesenteric Artery From Rats With Cirrhosis. **Hepatology** v. 32, No. 5, 2000.

BAYLIS, C.; MITRUKA, B.; DENG, A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **Journal Clinical Investigation**, 90; 278–281. 1992.

BAYLIS, C.; ZATZ, R. M. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. **Hypertension**, 32; 958–964. 1998.

BANK, N.; AYNEDJIAN, H. S.; KHAN, G. A. Mechanism of Vasoconstriction Induced by Chronic Inhibition of Nitric Oxide in Rats. **Hypertension**, 24; 322–328. 1994.

BERG, T. Analysis of the pressor response to the K⁺ channel inhibitor 4-aminopyridine. **European Journal of Pharmacology**, 452:325-337, 2002.

BERRIDGE, M. J. Unlocking the secrets of cell signaling. **Annual Reviews fo Physiology**, v.67, p.1-21, 2005.

BERNÁTOVÁ, I.; PECHÁŇOVÁ, O.; KRISTEK, F. Mechanism of structural remodelling of the rat aorta during long-term NG-nitro-L-arginine methyl ester treatment. **Japan Journal Pharmacology**, 81: 99-106, 1999.

BERNATOVA, I.; PECHANOVA, O.; SIMKO, F. Effect of captopril in L-NAME-induced hypertension on the rat myocardium, aorta, brain and kidney. **Experimental Physiology**, 84; 1095-1105, 1999

BERNÁTOVÁ, I.; PECHÁŇOVÁ, O.; BABÁL, P.; KYSELÁ, S.; ŠTVRTINA, S.; ANDRIAN T. R. Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension. **American Journal of Physiology**, 282: H942-H948, 2002.

BERNATOVA, I.; KOPINCOVA, J.; PÚZSEROVÁ, A.; JANEGA, P.; BABÁL, P. Low-dose L-NAME Treatment increases Nitric Oxide Production and Vasorelation in Normotensive Rats. **Physiological Research Pre-Press Article**, 2007.

BEVAN, J. A; HENRION, D. Pharmacological implications of the flow-dependence of vascular smooth muscle tone. **Annual Review Pharmacology Toxicology**. 34:173-90. 1994.

BEZPROZVANNY, I.; WATRAS, J.; EHRLICH, B.E. Bell-Shaped Calcium-Response Curves of Ins(1,4,5)P₃- and Calcium-Gated Channels from Endoplasmic Reticulum of Cerebellum. **Nature**, 351: 751–754. 1991.

BISSONNETTE, J. M. The role of calcium-activated potassium channels in respiratory control. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v.131, n.1-2, p.145-153. 2002.

BRAGANÇA, L. A. R. 1996. Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar. **Universidade Federal Fluminense**, Niterói. 300 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Projetos em saúde. Secretaria de políticas de saúde. Plano de Reorganização da Atenção à Hipertensão Arterial e ao Diabetes Mellitus. Departamento de ações programáticas estratégicas. – Brasília: ministério da saúde, 2002.

BREDDT, D. S; SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc Natl Acad Sci USA**, 87: 682-685, 1990.

BRUEGGEMANN, L. I.; MARTIN, B. L.; BARAKAT, J.;BYRON, K. L.; CRIBBS, L. L. Low voltage-activated calcium channels in vascular smooth muscle: T-type channels and AVP-stimulated calcium spiking. **American Journal Physiology Heart**

Circulation Physiology 288: H923-H935, 2005.

BUSSE, R.; MÜLSCH, A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. **FEBS Lett**; 265: 133–6, 1990.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovascular e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, 8: 30-40, 2001.

CAMPBELL, W. B.; HARDER, D. R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circulation Research**, 78: 415-423, 1996.

CATALDI, M.; TAGLIALATELA, M.; GUERREIRO, S.; AMOROSO, S.; LOMBARDI, G.; DI RENZO, G.; AUNNUNZIATO, L. Protein-tyrosine kinases activate while protein-tyrosine phosphatases inhibit L-type calcium channel activity in pituitary GH3 cells. **Journal Biological Chemistry**, 19: 271(16):9441-6. 1996.

CATERRALL, W. A.; PERES-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. **Pharmacological Reviews**, v.57, n.4. 411-425, 2005.

CERONI, L.; ELLIS, A.; WIEHLER, W.B.; JIANG, YAN-FEN, DING. H.; TRIGGLE C.R. Calcium-activated potassium channel and connexin expression in small mesenteric arteries from eNOS-deficient (eNOS^{-/-}) and eNOS-expressing (eNOS^{+/+}) mice. **European Journal of Pharmacology** .2007.

CHEN, T. C.; HINTON, D. R.; ZIDOVETZKI, R., HOFMAN, F. M. Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas. **Laboratory Investigatio**, v. 78, n.2, p. 165-174. 1998.

CHEUNG, W. Y. Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase: demonstration of an activator. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 56, n. 3, p. 533-538, 1970.

CHRISOBOLIS, S.; ZIOGAS, J.; CHU, Y.; FARACI, F. M; SOBEY, C.G. Role of inwardly rectifying K1 channels in K1-induced cerebral vasodilatation in vivo. **American Journal of Physiology**, 279: H2704–H2712. 2000.

CIRIGLIANO, M; SUN, A. Advising patients about herbal therapies. **JAMA**. 11;280(18):1565-6. 1998.

CLARK, S. G.; FUCHS, L. C. Role of nitric oxide and Ca⁺⁺-dependent K⁺ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **J. Pharmacol Exper Ther**, 282(3):1473-1479, 1997.

COCKS, T. M.; ANGUS, J. A. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. **Nature**, 305: 627-30. 1983.

COLEMAN, T. G.; MANNING, R. D. Jr.; NORMAN, R. A. Jr.; DECHEE, J. The role of the kidney in spontaneous hypertension. **American Heart Journal**, 89: 94-98, 1994.

CORRIU, C.; FELETOU, M.; CANET, E.; VANHOUTE, P. M. Inhibitors of the cytochrome P450-mono-oxygenase and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig isolated carotid artery. **British Journal of Pharmacology**, 117; 607-610, 1996.

CORRETTE, B. J.; BAUER, C. K.; SCHWARZ, J. K. Electrophysiology of anterior pituitary cells. In *The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells*, ed. Scherübl, H. & Hescheler, J., pp. 101-143. **CRC Press, Boca Raton**. 1995.

COLLINS, R; MACMAHON, S. Blood pressure stroke and coronary heart disease. **Lancet**;335:827-38. 1990.

CORNWELL, T. L. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependente protein kinase in vascular smooth muscle cells. **Molecular Pharmacology** 40: 923-931, 1991.

COX, R. H; RUSCH, N. J. New expression profiles of voltage-gated ion channels in arteries exposed to high blood pressure. **Microcirculation**, 9: 243–257. 2002.

CRIBBS, L. L. T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: Multiple functions **Cell Biologic** Volume 40, Issue 2 pp. 81-260 ; 221-230, 2006.

CUNHA, V.; ROSSONI, L.V.; OLIVEIRA, P.A.; POTON, S.; PRETTI, S.C.; VASSALLO, D.V.; STEFANON, I. Cyclooxygenase inhibition reduces blood pressure elevation and vascular reactivity dysfunction caused by inhibition of nitric oxide synthase in rats. **Clinical Experimental of Hypertension** 22 (2), 203–215. 2000.

CURTIS, M. J.; MACLEOD, B. A.; WALKER, M. J. Antiarrhythmic actions of verapamil against ischaemic arrhythmias in the rat. **British Journal of Pharmacology**. 83(2): 373-85. 1984.

DABIRE, H; CHERQUI, C; SAFAR, M; SCHMITT, H. Haemodynamic aspects and serotonin. **Clinical Physiology Biochemical & Supplement**, 3: 56-63, 1990.

DANANBERG, J.; SIDER, R.S.; GREKIN, R.J. Sustained hypertension induced by orally administered nitro-L-arginine. **Hypertension**. 21:359-363. 1993.

DE GASPARO, M.; HESS, P.; CLOZEL, M.; PERSOHN, E.; ROMAN, D.; GERMANN, P. G. Combination of low-dose valsartan and enalapril improves endothelial dysfunction and coronary reserve in Noreganitro-L-arginine methyl ester-treated spontaneously hypertensive rats. **Journal Cardiovascular of Pharmacology**; 40:789-800. 2002.

DE LAS HERAS, B.; VILLAR, A.; VIVAS, J. M.; HOULT, J. R. Novel anti-inflammatory plant labdanes: comparison or *in vitro* properties with aspirin and indomethacin. **Agents and Actions**, v. 41, n. 1-2, p. 114-117, 1994.

DELLIS, D. D.; DEDOS, S. G.; TOVEY, S.C.; TOUFIQ UR, R.; DUBEL, S.J.; TAYLOR, C. W. Ca^{2+} entry through plasma membrane IP_3 receptors. **Science**, v.313, n.584,p.229-233, 2006.

DE OLIVEIRA, C.F.; CINTRA, K.A.; TEIXEIRA, S.A.; DE LUCA, I.M.S.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Development of cardiomyocyte hypotrophy in rats under prolonged treatment with a low dose of a nitric oxide synthesis inhibitor. **European Journal of Pharmacology**, 391: 121-6, 2000.

DIAS A. C. R; SILVA, L. G; COLOMBARI, E. O óxido nítrico (NO) no controle neural da pressão arterial: modulação da transmissão glutamatérgica no NTS. **Medicina (Ribeirão Preto)**; 39 (1): 51-64. 2006.

DIMAS, K.; KOKKINOPOULOS, D.; DEMETZOS, C.; VAOS, B.; MARSELOS, M.; MALAMAS, M.; TZAVARAS, T. The effect of sclareol on growth and cell cycle progression of human leukemic cell lines. **Leukemia Research**, v. 23, n. 3, p. 217-234, 1999.

DIMAS, K.; DEMETZOS, C.; VAOS, V.; IOANNIDIS, P.; TRANGAS, T. Labdane type diterpenes down-regulate the expression of *c-Myc* protein, but not *Bcl*, in human leukemia T-cells undergoing apoptosis. **Leukemia Research**, v. 25, n. 6, p. 449-454, 2001.

DORWARD, P. K.; RIEDEL, W.; BURKE, S. L.; GIPPS, J.; KORNER, P. J. The renal sympathetic baroreflex in the rabbit. Arterial and cardiac baroreceptor influences, resetting, and effects of anesthesia. **Circulation Research**, 57: 618-633, 1985.

EBASHI, S. Calcium binding and relaxation in actomyosin system. **Journal of Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 150-151, 1960.

ESPLUGUES, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. **Bristh Journal of Pharmacology**; 135: 1079-95. 2002.

FÉLÉTEU, M.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Bristh Journal of Pharmacology**, 93: 515-524, 1988.

FETSCHER, C.; CHEN, H.; SCHAÈ FERS, R.F.; WAMBACH, G.; HEUSCH, G.; MICHEL, M.C. Modulation of noradrenaline-induced microvascular constriction by protein kinase inhibitors. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacology**, 363; 57 ± 65. 2001.

FIALOVÁ, M; DLUGOŠOVÁ, K; OKRUHLICOVÁ, L.; KRISTEK, F.; MANOACH, M.; TRIBULOVÁ, N: Adaptation of the heart to hypertension is associated with maladaptive gap junction connexin-43 remodelling. **Physiology Research**, 56: 2007, in press

FILHO, Y. C.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, n.21(1), p.99-105. 1998.

FLYNN, E. R. M.; BRADLEY, K. N.; MUIR, T. C.; McCARRON, J. G. Functionally-separate intracellular Ca²⁺ stores in smooth muscle. **The Journal of Biological Chemistry**. 2001.

FLUCKIGER, J. P.; SONNAY, M.; BOILLAT, N.; ATKINSON, J. Attenuation of baroreceptor reflex by general anesthetic agent in the normotensive rat. **European Journal of Pharmacology**, 109: 105-109, 1985.

FOLKOW, B.; Structure and function of the arteries in hypertension. **Am. Heart J.**, 114; 938-948, 1987.

FOLKOW, B.; Physiological aspects of primary hypertension. **Physiologic Reviews** 62: 347-504, 1982.

FOLKOW, B. Relationship between vessel design and hemodynamics along the precapillary resistance compartment in mono-and hypertension. **Blood Vessels**, 16: 277-280, 1979.

FREISE, D. How diuretics lower blood pressure. **American Heart Journal**, 106: 185-187, 1983.

FROLICH, J. D. Prostacyclin in hypertension. *J Hypertension Suppl.*, 8: S73-S78, 1990.

FUGH-BERMAN, A. Herbs and dietary supplements in the prevention and treatment of cardiovascular disease. **Prev Cardiol.** 3(1):24-32. 2000.

FURCHGOTT, R. F. Role of the endothelium in responses of vascular smooth muscles. **Circulation Research**, 53: 557-573, 1983.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 373 - 376, 1980.

GARCIA, M.L., KACZOROWSKI, G.J. High conductance calcium-activated potassium channels: molecular pharmacology, purification and regulation. In: Weston, A.H., Hamilton, T.C., Eds. *Potassium Channel Modulators*. **Blackwell, Oxford**, pp. 76–109. . 1992.

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; SBOULTON, C.L.; NIELSEN, E.B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and Selective Inhibition of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase by 1h-[1m2,3]Oxadiazolo[4,3-A]Quinoxalin-1-One. **Molecular Pharmacology**, 48, 184-188, 1995.

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Muscle contraction. In: **Molecular aspects of cell biology**. Philadelphia: Saunders, p. 1156-1179. 1995.

GEROVÁ, M.; KRISTEK, F. Efficiency of NO donors in substituting impaired endogenous NO production: a functional and morphological study. **Physiology Research**.;50(2):165-73. 2001.

GEROVÁ, M.; TÖRÖK J, PECHÁŇOVÁ, O; MATÚŠKOVÁ, J. Rilmenidine prevents blood pressure increase in rats with compromised nitric oxide production. **Acta Pharmacol Sin** 25: 1640-1646, 2004.

GEBREMEDHIN, D.; FENOY, F. J.; HARDER, D. R.; ROMAN, R. J. Enhanced Vascular Tone In The Renal Vasculature Of Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension** ;16(6):648-54. 1990.

GEWALTIG, M.T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovascular Research** , 250–260. 2002.

GHATTA, S.; NIMMAGDDA, D.; XU, X.; O'FOURKE, S.T. Large-Conductance, Calcium-Activated Postassium Channels: Strutral and Functional Implications. **Pharmacology & Therapeuties** 110, 103-116. 2006.

GODFRAIND, T.; EGLEME, C.; OSACHIE, A.I. Role of endothelium in the contractile response of rat aorta to alpha-adrenoceptor agonists. **Clinical Science** 68, 65s–71s. 1985.

GONZALEZ, W.; FONTINE, V.; PUEYO, M. E.; LAQUAY, M.; MESSIKA-ZEITOUN, D.; PHILIPPE, M. Molecular plasticity of vascular wall during N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: modulation of proinflammatory signals. **Hypertension**; 36:103-09. 2000.

GRISSMER, S.; NGUYEN, A. N; AIYAR, J.; HANSO, D. C.; MATHER, R. J. GOTMAN, G. A. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv 1.1, 1.2, 1.5 and 3.1, stably expressed in mamalian cell lines. **Molecular of Pharmacology**, 45: 1227-34, 1994.

GRUMBACH, I. M; CHEN, W.; MERTENS, S. A.; HARRISON, D. G. A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor kappa-B modulates endothelial nitric oxide synthase transcription. **Journal of Molecular and Cell Cardiology**, 39: 595-603, 2005.

GRYGLEWSKI, R. J.; MACDONALD, O. S.; DUSTING, G. J. Cyclic nucleotide interactions involved in endothelium-dependent dilation in rat aortic rings. **European Journal of Pharmacology** 48:17-24, 1988.

GUIX, F. X; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUNOZ, F. J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Programe Neurobiologic**, 76: 126-152, 2005.

GULLO, V. P.; HUGHES, D. E . Exploiting new approaches for anatural product drug discovery in the biotechnology industry. Drug discovery Today: **Techologies**, v.2, n3, p. 281-286. 2005.

HAEUSELER, G. contraction, membrane potential and calcium fluxes in rabbit pulmonary arterial muscle. Fed. Proc. 42, 263-268, 1983.

HAEUSELER, G. Relationship between noradrenaline induced depolarization and contraction in vascular smooth muscle. **Blood Vessels** 15, 46-54, 1978.

HAMIL, O. P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B.; SGWORTH, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflugers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 391, n.2, p. 85-100, 1981.

HAYASHI, K.; EPSTEIN, M.; LOUTZENHISER, R. Enhanced myogenic responsiveness of renal interlobular arteries in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension** 19, 153–160. 1992.

HAYASHI, K.; EPSTEIN, M.; SARUTA, T. Altered myogenic responsiveness of the renal microvasculature in experimental hypertension. *J. Hypertens.* 14, 1387–1401. 1996

HEIJENBROK, F. J. P.; MARIE-JEANNE, M. M.; VAN ZWIETEN, P. A. The influence of chronic inhibition of nitric oxide synthesis on contractile and relaxant properties of rat carotid and mesenteric arteries. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 362 :504–511 .2000.

HU, L.; MANNING R.; BRANDS M. W. Long-term cardiovascular role of nitric oxide in conscious rats. **Hypertension** 23 185–194. 1994.

HU, C.T.; CHANG, H.R.; HSU, Y. H.; LIU, C. J.; CHEN, H. I. Ventricular hypertrophy and arterial hemodynamics following deprivation of nitric oxide in rats. **Life Sci.** 78: 164-73, 2005.

IIDA, S.; TAGUCHI, H.; WATANABE, N.; KUSHIRO, T.; KANMATSUSE, K. Insulin-induced relaxation of rat mesenteric artery is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels. **European Journal of Pharmacology** 411_2001.155–160. 2001.

IKEDA, M.; MORITA, C.; MIZUNO, M.; SADA, T.; KOIKE, H.I.; KUROKAWA, K. PDGF-BB decreases systolic blood pressure through an increase in macrovascular compliance in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 273:1719-1726, 1997.

IWU, M. M. African medicinal plants in the search for new drugs based on ethnobotanical leads. **Ciba found Symp.** 185: 116-26; discussion 126-9. 1994.

JOHNSON, J. D.; SNYDER, C. H. Calcium regulation of smooth muscle contractile proteins. In: Lippincott-Raven Publ. **Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research.** Philadelphia, 30: 153-174, 1995.

JACKSON, W. F. Potassium channels and regulation of microcirculation. **Microcirculation**, 5, 85-90, 1998.

JACKSON, W. F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**, 35, 173-178, 2000.

JACKSON W. F. Potassium channels in the circulation of skeletal muscle. In: **Potassium Channels in the Cardiovascular Biology (SL Archer, NJ Rusch, Eds).** New York: Kluwer Academic/Plenum, 505–522. 2001.

JACKSON W. F. Potassium Channels in the Peripheral Microcirculation. *Microcirculation.* ; 12(1): 113–127. 2005.

JENETT-SIEMS, K.; MOCKENHAUPT, F. P.; BIENZLE, U.; GUPTA, M. P.; EICH, E. *In vitro* antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. **Tropical medicine & International Health**, v. 4, n. 9, 611-615, 1999.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; NGASSOUM, M. Essential oil compounds of the *Annona muricata* fresh fruit pulp from Cameroon. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 3719-3720, 1998.

JOVER, B.; HERIZI, A.; VENTRE, F.; DUPONT, M.; MIMRAN, A. Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade. **Hypertension** 21, 944–948. 1993.

KANG, D. G.; LEE, J. K.; CHOI, D. H.; SOHN, E. J.; MOON, M. K.; LEE, H. S. Vascular Relaxation y The Methanol Extract of Sorbus Cortex Via NO-cGMP Pathway. **Biological Of Pharmacology Bull.** 28(5), 860-864. 2005.

KANAGY, N. L. Increased vascular responsiveness to α_2 -adrenergic stimulation during NOS inhibition-induced hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 273:2756-2764, 1997.

KAKIUCHI, S.; YAMAZAKY, R. Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5' – nucleotide phosphodiesterase. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 41, n. 5, p. 1104-1110, 1970.

KALMAN, D.; O'LAGUE, P. H.; ERXLEBEN, C.; ARMSTRONG, D. L. Calcium-dependent inactivation of the dihydropyridine-sensitive calcium channels in GH₃ cells. **Journal of General Physiology** 92, 531-548, 1988.

KAPLAN, N. M. Systemic Hypertension: Mechanisms and Diagnosis IN Braunwald, Zipes, Libby – **Heart Disease, a textbook of Cardiovascular Medicini – Cap 28**, p-958-60: Saunders, 2001.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.-I.; HARADA, K.-I.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K.-J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacology. Revoews**, v. 49, n. 2, p. 157-230, 1997.

KARAKI, H.; WEISS, G. B. Calcium release in smooth muscle. **Life Sciences**, 42: 111-122, 1988.

KERENTAL, I; SSUSH, B. S.; DANTES, A. LINDNER, S.; OREN, M.; AMSTERDAM, A. Involvement of p53 expression in AMPc- mediated apoptosis in immortalized granulosa cells. **Experimental Cell Research**, v. 218, n.1, p.283-295, 1995.

KEEF, K. D.; HUME, J. R., Regulation of cardiac and smooth muscle Ca(2+) channels (Ca(V)1.2a,b) by protein kinases. **American Journal of Physiology Cell Physiology**. 281 (6); 1743-56.2001.

KNOT, H. J.; LAHER, I.; SOBIE, E. A.; GUATIMOSIM, S.; GOMEZ-VIQUEZ, L.; HARTMANN, H.; SONG, L.; LEDERER, W.J.; GRAIER, W. F.; MALLI, R.; FRIEDEN, M.; PETERSEN, O. H. Twenty Years of Calcium Imaging: **Cell Physiology To Dye For**; 5-112-127. 2005.

KO, W. G.; KANG, T. H.; LEE, S. J.; KIM, Y.C., LEE, B. H. Rotundifuran, a labdane type diterpene from *Vitex rotundifolia*, induces apoptosis in human myeloid leukaemia cells. **Phytoterapy Research**, v. 15, n. 6, p. 535-537, 2001.

KORNER, P. I.; LANGSFORD, G.; STARR, D.; UTHER, J. B.; WARD, W.; WHITE, S. W. The effects of chloralose-urethane and sodium pentobarbitone anesthesia on the local and autonomic components of the circulatory response to arterial hypoxia. **J. Physiology. (Land)**, 199; 283-302, 1968.

KOZA, OWSKA H; BARANOWSKA, M; GROMOTOWICZ, A; MALINOWSKA, B; ZAKA, FIZJOLOGII DOA; WIADGCZALNEJ A.M, BIAA; YSTOK. Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF): Potential involvement in the physiology and pathology of blood vessels. **Postepy Hig Med Dosw** . 12;61:555-64. 2007.

KRUMMEL, D. Nutrition in hypertension. In: **Mahan LK, Escott-Stump S, eds. Krause's food nutrition diet therapy**. Pennsylvania: Saunders. p.596-10. 2002

KUNEŠ, J; HOJNÁ, S; KADLECOVÁ, M; DOBEŠOVÁ, Z.; RAUCHOVÁ, H.; VOKURKOVÁ, M.; LOUKOTOVÁ, J.; PECHÁŇOVÁ, O.; ZICHA, J. Altered balance of vasoactive systems in experimental hypertension: the role of relative NO deficiency. **Physiology Research** 53 Suppl 1: S23-S34, 2004.

KURISU, S.; OZONO, R.; OSHIMA, T.; KAMBE M.; ISHIDA, T.; SUGINO, H. Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis. **Hypertension**. 41 (1): 99-107, 2003.

KWAN, H.; HUANG, Y.; YAO, X. Store-operated Calcium Entry in Vascular Endothelial Cells Is Inhibited by cGMP via a Protein Kinase G-dependent Mechanism. **The Journal of Biological Chemistry** Vol. 275, No. 10, pp. 6758–6763, 2000.

LAGAUD, G. J. L.; SKARSGARD, L.; LAHER I. And CORNELIS VAN BREEMEN. Hetrogeneity of Endothelium-Dependent Vasodilatation in Pressurezed Cerebral and Samall Mesenteric Resistance Arteries of The Rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics**. 290: 832-839, 1999.

LANGTON, P.D.; NELSON, M.T.; HUANG, Y.; STANDEN, N.B. Block of calcium-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions. **Ameriacan Journal of Physiology**. 260, H927–H934. 1991.

LAPORTE, R.;HUI, A.; LAHER, I. Pharmacological Modulation of Sarcoplasmic Reticulum Function in Smooth Muscle. **Pharmacological Reviews**, 56:439–513, 2004.

LAWSON, K. Potassium channel openers as potential therapeutic weapons in ion channel disease. **Kidney Int**. 57, 838-845, 2000.

LEDOUX J.; WERNER, M.E.; BRAYDEN, J .E.; NELSON, M.T. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. **Physiology** 21:69-78, 2006.

LIÉVANO, A.; BOLDEN, A.; HORN, R. Calcium channels in excitable cells: divergent genotypic and phenotypic expression of α_1 -subunits. *American Journal of Physiology* 267, C411-424. 1994.

LIU, Y.; TSUCHIHASHI, T.; KAGIYAMA, S.; MATSUMURA, K.; ABE, I.; FUJISHIMA, M. Central and peripheral mechanisms involved in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Journal of Hypertension*, 16:1165–1173, 1998.

LONGSDON, N.J., KANG, J., TOGO, J. A., CHRISTIAN, E. P., AIYAR, J. A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *Journal Biological Chemical*, 272; 32723-32726. 1997.

LÓPEZ, R. M.; CINDY S. ORTIZ, A. R.; JUAN, M; VELEZ, C. C.; CASTILLO, E, F. Impairment of smooth muscle functions of rat thoracic aorta in an endothelium-independent manner by long-term administration of NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Fundamental & Clinical Pharmacology*; 18 669–677. 2004.

LUVARA, G.; PUEYO, M. E.; PHILIPPE, M.; MANDET, C.; SAVOIE, F.; HENRION, D.; MICHEL, J. B. Chronic blockade of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall: prevention by angiotensin II antagonism. *Arterioscler Thrombs Vascular Biologic*, 18: 1408-1416, 1998.

McHALE, N.; HOLLYWOOD, M.; SERGEANT, G.; THORNBURY, K. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. *Journal of Physiology*, 570; n.Pt., p.23-28, 2006.

MACMAHON S, PETO R, LUTLER J. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease: Part 1. Prolonged differences in blood pressure. Prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet*.;335:765-74. 1990.

MACMAHON, S.; RODGERS, A. The effects of blood pressure reduction in older patients: an overview of five randomized controlled trials in elderly hypertensives. *Clinical Experimental Hypertension*. 15:967-78. 1993.

MARTY, A. Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* 291, 497–500. 1981.

MARTIN R. L.; LEE, J. H.; CRIBBS, L. L.; PEREZ-REYES; HANCK D.A. Ibefradil block of T-type Ca channels. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutic* 295: 302–308, 2000.

MATOKA, T.; SHIMOKAWA, H.; KUBOTA, H.; MORIKAWA, K.; FUJIKI, T.; KUNIHITO, I.; MUKAI, Y.; HIRAKAWA, Y.; TAKESHITA, A. hydrogen Peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing foactor in human mesenteric arteries. *Biochemical. Biophys Research. Commun*. 25:290(3):909-13, 2002.

MATSUOKA, H.; NAKATA, M.; KOHNO, K.; KOGA, Y.; NOMURA, G.; TOSHIMA, H. Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 27: 14-8, 1996.

MELO, A. C.; COTA, B.B.; OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F. C. HPLC quantification of kaurene diterpenes in *Xylopi*a species. **Fitoterapia**, 72 ; p.40-45, 2001.

MEZA, U.; AVILA, G.; FELIX, R.; GOMORA, J.C.; COTA, G., Long-term regulation of calcium channels in clonal pituitary cells by epidermal growth factor, insulin, and glucocorticoids. **Journal of Genetic and Physiology**. 104, 1019–1038. 1994.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide; Physiology, patothophysiology and pharmacology. **Pharmacology Reviews**, 43; 109-142, 1991.

MONCADA, S., PALMER, R.M. J., HIGGS, E. A.: - Nitric oxide pathway. **N. Engl. J. med.** 29: 2002-2012. 1993.

MONCADA, S.; VANE, J. R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandins endoperoxydes, thomboxone A2 and prostacyclin. **Pharmacol. Rev.** 30:293-331, 1978.

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

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

MULLERSHAUSEN, F.; FRIEBE, A.; FEIL, R.; THOMPSON, W.J.; HOFMANN, F.; KOESLING, D., Direct Activation of PDE5 by Cgmp: Long-Term Effects Within NO/cGMP Signaling. **Journal. Cell Biological**. 160, 719-727. 2003.

MURPHY, R. A. Structural proteins in the myofilaments on regulation of thecontraction in vertebrate smooth muscle. **Federation Proceedings**, v. 35, n. 6, p. 1302-1306, 1976.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial muscle. **American Journal of Physiology**. 268:C799-C822, 1995.

OLIVEIRA, A. P.; FURTADO F. F.; TAVARES, J. F.; MAFRA, R. A.; SILVA, M. S.; ARAÚJO, D. A. M.; CRUZ, J. S.; MEDEIROS, I. A. Calcium Channel Blockade as a Target for the Hypotensive and Spasmolytic Effects Induced by the 8 (17), 12E, 14-Labdatrien-18-Oic Acid (Labdane-302). **Vascular Pharmacology**. 44:338-344. 2006.

OKRUHLICOVÁ, L.; TRIBULOVÁ, N.; BERNÁTOVÁ, I.; PECHÁŇOVÁ, O: Induction of angiogenesis in NO-deficient rat heart. **Physiology Research** 49: 71-76, 2000.

OATES, J. A. Antihypertensive agents and the drug therapy of hypertension. In:HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. G.; LIMBRIND, L. E. GOODMAN & GILMAN'S. The pharmacological basis of therapeutics. 9ed. **USA: McGraw-Hill**, 33:781,1996.

OLIVEIRA, A.P. Estudo dos efeitos cardiovasculares do ácido 8 (17), 12E, 14-labdatrieno-18 (oico), um diterpeno isolado da *Xylopi*a *langsдорffiana* St. Hil & Tul. (Annonaceae) em ratos. **Dissertação de mestrado**. LTF/CCS/UFPB. 2004.

ONO, H.; ONO, Y.; FROHLICH, E. D. Nitric oxide synthase inhibition in spontaneously hypertensive rats. Systemic, renal, and glomerular hemodynamics. **Hypertension**; 26:249-55. 1995.

PAGE, C.P.; CYRTIS, M.J.C.; SUTTIER, M.C.; WALKER, M.J.A. & HOFFMANN, B.B. As drogas e o sistema cardiovascular. Farmacologia Integrada. 1ª ed. editora **Manole**, São Paulo-SP, 153-193, 1999.

PAGE, I.H. Hypertensive mechanisms. **Grune Stratton**, Orlando, 1987.

PALMER, R. M. J; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**; 327:524-30. 1987.

PAULIS, L.; ZICHA, J.; KUNES, J.; HOJNA, S.; KOJSOVA, S.; PECHANOVA, O.; SIMKO, F: Regression of L-NAME-induced hypertension: The role of NO-pathway and endothelium-derived constricting factor. **Journal Hypertension** 24(Suppl, 4): S7, 2006.

PECHÁŇOVÁ, O.; ŠIMKO, F: The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance. **Physiology Research** 56(Suppl 2): S00-S00. 2007.

PECHÁŇOVÁ, O.; BERNÁTOVÁ, I.; PELOUCH, V.; ŠIMKO, F. Protein remodelling of the heart in NO-deficient hypertension: the effect of captopril. **Journal Molecular Cell Cardiology** 29: 3365-3374, 1997.

PECHÁŇOVÁ, O.; DOBEŠOVÁ, Z.; ČEJKA, J.; KUNEŠ, J.; ZICHA, J. Vasoactive systems in L-NAME hypertension: the role of inducible nitric oxide synthase. **Journal Hypertension** 22: 167-173, 2004.

PEREIRA, L. M.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereology of cardiac hypertrophy induced by NO blockade in rats treated with enalapril and verapamil. **Anal Quantitative Cytology Histology**, 23: 330-8, 2001.

PEREZ-REYES, E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. **Physiology Reviews**. 83(1):117-61. 2003.

PIROS, E.; PRATHER, P. L.; LOH, H. H.; LAW, P. Y.; EVANS, C. J.; HALES, T. G. Ca²⁺ channel and adenylyl cyclase modulation by cloned μ -opioid receptors in GH₃ cells. **Molecular Pharmacology** 47, 1041-1049, 1995.

PRIVIERO, F. B. M.; TEIXEIRA, C. E.; CLAUDINO, M. A.; DE NUCCI, G.; ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Vascular effects of long-term propranolol administration after chronic nitric oxide blockade. **European Journal of Pharmacology** 571, 189–196. 2007.

QUAYLE, J.M; NELSON, M.T.; STANDEN, N.B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. **Physiology Reviews**, 77:1165–1232. 1997.

QIU, C.; ENGELS, E.; BAYLIS, C. Angiotensin II and α_1 -adrenergic tone in chronic nitric oxide blockade-induced hypertension. **American Journal Physiology**, 266 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 35): R1470–R1476, 1994.

RAIJ, L. Nitric oxide in hypertension: relationship with renal injury and left ventricular hypertrophy. **Hypertension**. 31; (1 Pt 2): 189-93,1998.

RAMOS, L.; LABAT, R.; AIMBIRE, S. F.; CARVALHO, A. B. M.; LOPES, R. Á. B. Efeito da administração oral de arginina sobre a pressão arterial e parâmetros cardíacos em ratos submetidos ao bloqueio crônico da síntese de óxido nítrico, **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, 12, Nº 4, 2006.

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

RESS, D. D.; PALMER, R. J. M.; MONCADA, S. Role of endothelium derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86: 3375-3378, 1989.

RIBEIRO, M.O.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LOVISOLO, S.M.; ZATZ, R. Chronic Inhibition Of Nitric Oxide Synthesis. A New Model of Arterial Hypertension. **Hypertension**; 20 298–303. 1992.

RIBEIRO, E. A. N. Estudos das ações cardiovasculares de dois compostos (ácido ent-15 α -acetoxicaur-16-em-19-óico – CA-acetoxi e 4-Nitro-N-fenilmaleimida – 4-NO₂) em ratos. **Tese de doutorado**. LTF/CCS/UFPB. 2005.

RIBEIRO, L. A. A. Ação relaxante do ácido 8 (17),12E,14-labdatrieno-18-óico diterpeno isolado de *Xylopiá langsdorfiana* A. St. Hill e Tul. (Annonaceae), envolve canais de potássio – **dissertação de Mestrado – UFPB/CCS – 2003**.

RIBEIRO, L. A. A.; TAVARES, J. F.; ANDRADE, N. C.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. The 8 (17), 12E, 14-Labdatrien-18-Oic Acid (Labdane-302), diterpene type labdane isolated of *Xylopiá langsdorfiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxant effect in trachea isolated of guinea-pig. *Revista Brasileira de farmacognosia (article in press)*^a. 2007.

RIBEIRO, L. A. A.; TAVARES, J. F.; ANDRADE, N. C.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. Vasorelaxant Effect of 8(17), 12E, 14-Labdatrien-18-oic Acid (Labdane-302) in Rat Aorta Involves K⁺ Channels. **Z. Naturforsch. C (article impress)**^b. 2007.

ROCHA, F. A. C., ROCHA, J. C. S., PEIXOTO, M. E. B., JANCAR, S., CUNHA F. Q, RIBEIRO, R. A. Effect of nitric oxide synthase in articular inflammatory pain and cellular influx of zymosan-induced arthritis in rats. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 4, p. 206-17. 2003.

ROENGSUMRAN, S.; PETSON, A.; KUPTIYANUWAT, N.; VILAVAN, T.; NGAMROJNAVAWICH, N.; CHAICHANTIPYTH, C.; PHUTHONGS. Citotoxic labdane diterpenes from *Cronton oblongifolius*. **Phytochemistry**, 56; n.1, p. 103-107, 2001.

RUIZ-MARCOS, F.M.; ORTIZ, M.C.; FORTEPIANI, L.A.; NADAL, F.J.A.; ATUCHA, N.M., GARCIA-ESTAN, J. Mechanisms of the increased pressor response to

vasopressors in the mesenteric bed of nitric oxide-deficient hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology** 412 (3), 273–279. 2001.

SABRANE, K.; GAMBARYAN, S.; BRANDES, R. P.; HOLTWICK, R.; VOSS, M.; KUHN, M. Increased Sensitivity to Endothelial Nitric Oxide (NO) Contributes to Arterial Normotension in Mice with Vascular Smooth Muscleselective Deletion of the Atrial Natriuretic Peptide (ANP) Receptor. **The Journal of Biological Chemistry** Vol. 278, No. 20, 16, pp. 17963–17968, 2003.

SAKATA, K.; KARAKI, H., Effects of a novel smooth muscle relaxant, KT-362, on contraction on cytosolic Ca^{2+} level in the rat aorta. **British Journal of Pharmacology**, 102:147-178, 1991.

SAMY, R.P.; THWIN, M. M.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; IGNACIMUTHU, S. Ethnobotanical survey of folk plants for the treatment of snakebites in Southern part of Tamilnadu, India. **Journal of Ethnopharmacology**. 17;115(2):302-12. 2008.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALANTINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil; taxonomic significance. **Phytochemistry**, v.55, n.567-573. 2000.

SANTOS, C. A.; TORRES, K. R.; LEONART, R; **Plantas Medicinai**s. São Paulo: Ícone, 1998.

SANDER, M.; HANSEN, J.; VICTOR, R.G. The sympathetic nervous system is involved in the maintenance but not initiation of the hypertension induced by N(omega)-Nitro-L-Arginine Methyl Ester. **Hypertension** 31 (1 Pt 1), 64–70. 1997.

SAWAYER, D. B.; BYMASTER, P. F.; CALLIGARO, O. D.;FALCONE, J.; MITCH, H. C.; WARD, S. J.; WHITESITT, C.; SHANNON, E. H. Direct pharmacological comparison of the muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in the rabbit thoracic aorta. **Gen Pharmacology**, 32: 445-452, 1999.

SAFAR, M. E.; PERONNEAU, P.P.; LEVENSON, J.A.; TOTO-MOUKOUO, J. A. & SEAMON, K. B.; PADEGETT, W.; DALY, J. W. Forskolin: unique diterpene activator of adenilate ciclase in membranes and intact cells. **Product Natural Academic Science**, 78(6): 3363 – 3367, 1981.

SCHUBERT, R.; NELSON, M. T. Protein Kinases: tuners of the BK_{Ca} channel in smooth muscle. **Trends in Pharmacological Sciences**. Vol.22-10, 2001.

SCHULZ, R.; TRIGGLE, C. R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. **Trends Pharmacology Science**, 15: 255-259.1994.

SCHVARTSMAN, S. Plantas Venenosas. São Paulo. Ed. **Sarvier**. 176 p. 1979.

SEN, J.; SHARMA, A. K.; SAHU, N. P.; MAHOTO, S. B. Forskolin production in untransformed root culture of *Coleus forskohlii*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1309-1312, 1993.

SMHITH, T. L.; HUTCHINS, P. M. Anaesthetic effects on hemodynamics of spontaneously hypertensive and wistar-Kyoto rats. **American Journal Physiology** 238; H539-H544, 1989.

SIMASKO, S. M.; WEILAND, G. A.; OSWALD, R. E. Pharmacological characterization of two calcium currents in GH₃ cells. **American Journal of Physiology**, 254, E328-336. 1988.

ŠIMKO, F.; POTÁČOVÁ, A.; PELOUCH, V.; PAULIS, L.; MATÚŠKOVÁ, J.; KRAJČÍROVIČOVÁ, K.; PECHÁŇOVÁ, O.; ADAMCOVÁ, M. Spontaneous, L-arginine-induced and spironolactone induced regression of protein remodeling of the left ventricle in L-NAME-induced hypertension. **Physiology Research** 56(Suppl 2): S00-S00, 2007.

ŠIMKO, F.; ŠIMKO, J.: The potential role of nitric oxide in the hypertrophic growth of the left ventricle. **Physiology Research** 49: 37-46, 2000.

ŠIMKO, F.; MATÚŠKOVÁ, J.; LUPTÁK, I.; KRAJČÍROVIČOVÁ, K.; ŠTVRTINA, S.; POMŠÁR, J.; PELOUCH, V.; PAULIS, L.; PECHÁŇOVÁ, O. Spironolactone differently influences remodeling of the left ventricle and aorta in L-NAME-induced hypertension. **Physiology Research**, 56(Suppl 2):S00-S00 2007, in press.

SIMKO, F.; LUPTAK, I.; MATUSKOVA, J.; KRAJCIROVICOVA, K.; SUMBALOVA, Z.; KUCHARSKA, J. L-arginine fails to protect against myocardial remodeling in L-NAME-induced hypertension. **European Journal Clinic Investigation**. 35: 362-8, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELOO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. In: **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade/ UFRGS, 2000.

SOBEY, C.G. Potassium Channel Function in Vascular Disease. **Arterioscler. Thrombs. Vascular Biological**. 21;28-38.2001.

SOMOVA, L. I.; SHODE, F. O; MOODLEY, K.; GOVENDER, Y. Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopiya aethiopica* and *Alepidea amatymbica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n.2. 2-3, p. 165-174, 2001.

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

SONKUSARE, S.; PALADE, P. T.; MARSH, J. D.; TELEMAQUE, S.; PESIC, A.; RUSCH, N. J. Vascular calcium channels and high blood pressure: **Pathophysiology and therapeutic implications a Vascular Pharmacology** 44; 131 – 142. 2006.

SOUZA, H. C. D.; PENTEADO, D. M. D.; PINGE, M. C. NETO, M.; BARBOSA, O.; TEIXEIRA, V. P. A.; BLANCO, J. H. D.; SILVA, V. J. D. O bloqueio da síntese do óxido nítrico promove aumento da hipertrofia e da fibrose cardíaca em ratos submetidos a treinamento aeróbio. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, vol.89; n.2, 2007.

SOUZA, H. C. D.; BALLEJO, G.; SALGADO, M. C. O.; SILVA, V. J. D.; SALGADO, H. C. Cardiac sympathetic overactivity and decreased baroreflex sensitivity in L-

NAME hypertensive rats . **American Physiology Heart Circulation Physiology**, 280: H844–H850, 2001.

STAMLE, J.; NEATON, J.; WENTWORTH, D. Blood pressure and risk of fatal coronary heart disease. **Hypertension**. 13:2-12. 1990.

STANDEN, N. B.; QUAYLE, J. M. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**; 164(4): 549–57. 1998.

SVENDSEN, A. B.; SCHEFFER, J. J. C. Natural products in therapy: prospects, goals and means in modern research. **Pharmaceutish Weeklad**, 4: 96 - 103, 1992.

SONKUSARE, S. A.; PHILIP, T.; PALADE, A.; JAMES, D.; MARSH, B. S.; TELEMAQUE, B.; ALEKSANDRA, P. A.; NANCY, J. R.. Vascular calcium channels and high blood pressure: Pathophysiology and therapeutic implications a **Vascular Pharmacology** 44 131 – 142. 2006.

TAKESHITA, A.; MARK, A. L. Decreased venous distensibility in borderline hypertension. **Hypertension**. 1; 202-206, 1979.

TANAKA, R.; OHTSU, H.; IWAMOTO, M.; MINAMI, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; MATSUNAGA, S.; YOSHITAKE, A. Cancer chemopreventive agents, labdane diterpenoids from the stem bark of *Thuja standishii* (Gord.) Carr. **Cancer Letters**, v. 161, n. 2, p. 165-170, 2000.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; SHIGENOBU, K. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric. **British Journal of Pharmacology**, 128; 1602-1608, 1999.

TANDON, J. S.; ROY, R.; BALACHANDRAN, S.; VISHWAKARMA, R. A. Epi-deoxycoleonol, a new antihypertensive labdane diterpenoid from *Coleus forskohlii*. **Bioorganic & Medical Chemistry Letters**, v. 2, n. 3, p. 249-254, 1992.

TAVARES, J.F.; SILVA, M. V. B.; QUEIROGA, K. F.; DINIZ, M. F. F. N.; FILHO, J. M. B.; HAUN, M.; MELO, P.S.; SILVA, M.S. Xylodiol, a new Atisane Diterpenoid from *Xylopi Langsdorffiana* St.-Hil & Tul. (Annonaceae). **Zeitschrift für Naturforschung**. 62b:1-3. 2006.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ions channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.83, n. 3, p. 215-242, 2005.

TODA, N.; KITAMURA, Y.; OKAMURA, T. Neural mechanism of hypertension by nitric oxide synthase inhibitor in dogs. **Hypertension** 21: 3–8, 1993.

TÖRÖK, J.; KRISTEK, F. Beneficial effect of pentaerythryl tetranitrate on functional and morphological changes in the rat thoracic aorta evoked by long-term nitric oxide synthase inhibition. **Vascular Pharmacology** 38: 177-182, 2002.

TRIBULOVÁ, N.; OKRUHLICOVÁ, L.; BERNÁTOVÁ, I.; PECHÁŇOVÁ, O. Chronic disturbances in NO production results in histochemical and subcellular alterations of the rat heart. **Physiology Research** 49: 77-88, 2000.

UMAS, J. G.; LEVI, R. The nitric oxide system in circulatory homeostasis and its possible role in hypertensive disorders. In: **Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management, Second edition. Raven Press, NY, 1995.**

VARGAS, F.; OSUNA, A.; FERNANDEZ-RIVAS, A. Vascular reactivity and flow-pressure curve in isolated kidneys from rats with N-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. **Journal of Hypertension**, 14: 373-379, 1996.

VANHOUTTE, P. M.; BOULANGER, C. M. Function of the endothelium in arterial hypertension. **La Revue Du Praticien**, v.45, Issue 20, p-2513-2518, 1995.

VEDERNIKOV, Y. P.; SYAL, A. S.; OKAWA, T.; SAADE, G. R.; GARFIELD, R. E. Adenylate cyclase and potassium channels are involved in forskolin and 1,9-dideoxyforskolin induced inhibition of pregnant rat uterus contractility. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 182, n 3, p. 620-624, 2000.

VILEGAS, W.; FELICIO, J. D.; ROQUE, N. F.; GOTTLIEB, H. E. Diterpenic adducts from *Xylopi* species. **Phytochemistry**, v. 30, n.6. p. 1869-1872, 1991.

VORA, C.K.; MANSOOR, G. A. Herbs and alternative therapies: relevance to hypertension and cardiovascular diseases. **Curr Hypertens Rep.**;7(4):275-80. 2005.

WANG, H. X.; DAVIS, M. J.; RAJANAYAGAM, M. A.; POTOCHNIK, S. J.; HILL, M. A.; Myogenic reactivity of rat epineurial arterioles: potential role in local vasoregulatory events. **Am. Journal of Physiology** 277, H144– H151. 1999.

WESTON, A. H.; EDWARDS, G. Recent progress in potassium channel opener pharmacology. **Biochemical Pharmacology**, v.43, n.1, p.47-54, 1992.

WHITE, S. W.; McRITCHIE, R. J. Nasopharyngeal reflexes: Integrative analysis of evoked respiratory and cardiovascular effects. **Ast. J. Exp. Biol. Med. Sci.** 51: 17-31, 1973.

WHITE, R. E.; HANA, G.; MAUNZ, M.; DIMITROPOULOU, C.; EL-MOWAFY, M. A.; BARLOW, R. S.; CATRAVAS, J. D.; SNEAD, C.; CARRIER, G.O.; ZHU, S.; YU, X. Endothelium-independent effect of estrogen on Ca²⁺-activated K channels in human coronary artery smooth muscle cells. **Cardiovascular Research** 53; 650–661. 2002.

WHITE, R.; BOTTRILL, F.E.; SIAU, D.; HILEY, C. Protein Kinase A-Dependent and -Independent Effects of Isoproterenol in Rat Isolated Mesenteric Artery: Interactions with Levocromakalim. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, Vol. 298, No. 3; 2001.

WIENCKEN, A. E.; CASAGRANDE, V. A. Endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) in astrocytes: another source of nitric oxide in neocortex. **Glia**; 26: 280-90. 1999.

ZATZ, R.; BAYLIS, C. Chronic Nitric Oxide Inhibition Model Six Years On. **Hypertension**; 32:958-964,1998.

ZICHA, J. O.; PECHÁŇOVÁ, D. Z.; KUNEŠ, J. Hypertensive response to chronic N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) treatment is similar in immature and adult Wistar rats. **Clin Sci** **105**: 483-489, 2003.

ZIMPFER, M.; MANDERS, W. T.; BARGER, A. C. e VATNER, S. F. Pentobarbital alters compensatory neyribak humoral mechamism in response to hemorrhage. **American Journal of Physiology**. 243: H713-H721, 1982

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)