UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JANAINA APARECIDA SIMPLICIO

**Avaliação do efeito cardiovascular do labdano ácido
ent-3-acetóxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico**

Ribeirão Preto

2013

JANAINA APARECIDA SIMPLICIO

**Avaliação do efeito cardiovascular do labdano ácido
ent-3-acetóxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Ribeirão Preto

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Simplicio, Janaina Aparecida

Avaliação do efeito cardiovascular do labdano ácido *ent*-3-acetóxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico. Ribeirão Preto, 2013.

88 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Tirapelli, Carlos Renato.

1. Diterpeno. 2. Labdano. 3. Reatividade Vascular. 4. Óxido Nítrico

Nome: Janaina Aparecida Simplicio

Título: Avaliação do efeito cardiovascular do labdano ácido *ent*-3-acetóxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Ao grande responsável por cada caminho seguido, por cada degrau alcançado, por cada sonho realizado. Aquele que me ensinou a ter humildade, fê e perseverança. Aquele que me proporcionou a vida. Aquele que eu chamo de Meu Porto Seguro, Meu Salvador,

Meu Amado e Querido Deus!

Sem Ti eu jamais teria chegado até aqui! Sem Ti eu nada seria!

À Deus não só dedico este trabalho, como também dedico a minha vida, o meu conhecimento, o que sou e possuo, e que tudo isso possa ser usado para fins nobres e verdadeiros.

Agradecimentos

À Deus por tudo! Não tenho palavras que descrevam meus sinceros agradecimentos ao Meu Porto Seguro!

Aos meus pais, Lucy e Moacyr, pela educação, pelo exemplo de honestidade e luta, por terem acreditado em mim sempre. Obrigada por terem me ajudado a enfrentar a vida e a crescer como pessoa, com muita perseverança e principalmente humildade. Amo vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli, pelo exemplo de profissionalismo, pela oportunidade de aprendizado, pela orientação e principalmente pela confiança depositada em minha pessoa, que foram essenciais para o desenvolvimento deste projeto. Meus sinceros agradecimentos.

Ao professor Sérgio Ricardo Ambrósio (UNIFRAN) por ter isolado, purificado e fornecido o composto labda-15-óico.

À Prof^a. Dr^a. Evelin Cappelari Carnio da Escola Enfermagem de Ribeirão Preto - USP pela disponibilidade em fornecer seu laboratório para as dosagens de nitrato e experimentos de pressão arterial.

Ao meu grande amigo Marcelo Eduardo Batalhão (Bata), pela paciência, por me ouvir nos momentos de desespero, por me ensinar técnicas que eu considerava tão difíceis. Além de ser um grande profissional, se tornou um eterno amigo.

Ao meu querido amigo Ulisses (Lissão), pela paciência interminável, pelo exemplo de profissionalismo e de humildade. Você é uma pessoa iluminada.

À Juliana, por todos os ensinamentos, pelo incentivo em prestar a prova do mestrado e por toda ajuda proporcionada e que foram fundamentais no desenvolvimento deste projeto. Hoje você é uma amiga muito especial.

Às minhas queridas amigas Patrícia (Paty) e Letícia (Lets) por toda ajuda, paciência e dedicação com minha pessoa. Obrigada por me ouvirem nos momentos tristes e por darem gargalhadas nos momentos de alegrias. Obrigada por fazerem parte da minha vida e tornarem o meu mundo mais doce.

Aos meus grandes amigos Paulinho e Gabriel por toda a amizade, pelos almoços e momentos de risada. Obrigada por vocês terem entrado em minha vida de uma forma tão especial.

Às amigas de laboratório, Marjory, Joice, Larissa e Kátia, pelos momentos de descontração, pela amizade e companheirismo.

Às queridas Ana Paula (Linda) e Natália (Naty) pelas conversas, conselhos, risadas, conversas engraçadas, ensinamentos e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Oliveira pela disponibilidade em fornecer seu laboratório para o preparo das lâminas e das amostras para os experimentos de citometria.

À técnica Fabiana (Citometria) por todo o apoio técnico.

À Larissa Pernomian, pela ajuda nos experimentos de citometria e por todas dúvidas esclarecidas no desenvolver dos protocolos.

À Soninha, por todo o suporte com os documentos da pós-graduação e por toda paciência e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia José Waldick Ramon e Fátima Helena Petean, por todo apoio prestado.

Aos membros da banca examinadora, professora Lusiane e professor Matheus pela disponibilidade, contribuições e sugestões para a melhoria deste projeto.

À professora Claudia Padovan (Claudinha) pelo fornecimento do biotério, pelo apoio prestado nas análises estatísticas e pela amizade.

Ao meu professor de iniciação científica, Rubens, pelo incentivo nos caminhos da ciência durante a graduação e por sempre ter acreditado em mim.

Às minhas eternas amigas da graduação, Elis, Lidiane, Élidi e Graziela, pelas risadas, pela compreensão e por todo carinho.

Ao meu companheiro e amigo Silvano, por toda dedicação, por ser cúmplice dos meus sonhos, decepções, lutas e vitórias.

Ao meu irmão, Luciano, *in memoriam*, pelo incentivo em iniciar a pós-graduação e por me achar sempre muito capaz.

Aos meus lindos sobrinhos, Luciano e Davi, pela simples virtude de terem nascido e fazerem o meu mundo mais feliz.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) - USP pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2010/01009-3) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

RESUMO

SIMPLICIO, JA. **Avaliação do efeito cardiovascular do labdano ácido *ent*-3-acetóxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A pesquisa e o uso de produtos naturais como agentes terapêuticos tem crescido muito nos últimos anos. Os diterpenos são os principais constituintes de extratos de plantas que são usadas na medicina popular no tratamento da hipertensão arterial. Diterpenos da classe dos labdanos exercem atividade inibitória sobre a contração vascular e induzem relaxamento desses tecidos. Nesse sentido, o presente estudo foi delineado de forma a investigar os mecanismos envolvidos no efeito cardiovascular do labdano ácido *ent*-3-acetóxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico (labda-15-óico) em ratos. Os resultados mostraram que o labdano exerce seu efeito inibitório máximo sobre a contração vascular induzida pelo KCl após 30 min de incubação. O efeito inibitório do labda-15-óico sobre a contração induzida por KCl foi totalmente revertido 60 e 120 minutos após a remoção do diterpeno das preparações em anéis sem endotélio (E^-) e com endotélio (E^+), respectivamente. Os valores de E_{max} para as curvas de fenilefrina e serotonina foram reduzidos na presença do labda-15-óico em anéis de aorta de rato E^+ e E^- . O labda-15-óico reduziu a contração induzida pelo $CaCl_2$ em anéis E^- nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$. O labda-15-óico não alterou a mobilização do Ca^{2+} intracelular induzida por fenilefrina ou cafeína. O labdano induziu relaxamento em artérias aorta E^+ ou E^- pré-contraídas com fenilefrina ou KCl. Em anéis de aorta E^+ pré-contraídos com fenilefrina, os valores de E_{max} para o relaxamento foram reduzidos na presença de L-NAME, ODQ, hemoglobina, 7-nitroindazol, Rp-8-Br-Pet, tapsigargina e tetraetilamônio. Por outro lado, indometacina, wortmanin, LY294002, H-89, SQ22,536, atropina e propranolol não afetaram o relaxamento induzido pelo labdano. O labdano aumentou os níveis de nitrato e GMPc em anéis E^+ , mas não alterou os níveis de AMPc. O composto em estudo elevou ainda, a intensidade de fluorescência emitida por amostras de células endoteliais marcadas com DAF-2DA, indicando um aumento dos níveis de NO citosólico. Além disso, o labda-15-óico (3 mg/Kg) induziu hipotensão em ratos não anestesiados. O L-NAME reduziu a resposta hipotensora induzida pelo labdano. Concluímos que o labdano exerce um efeito vasorelaxante *in vitro* e hipotensor *in vivo*. O labda-15-óico age no músculo liso vascular, onde bloqueia canais para Ca^{2+} sensíveis a voltagem e operados por receptores, levando à redução do influxo de Ca^{2+} extracelular. A resposta de relaxamento é parcialmente dependente do endotélio onde o labda-15-óico ativa a via de sinalização do NO-GMPc e promove abertura de canais para K^+ no músculo liso vascular. Os estudos *in vivo* confirmam a participação do NO na resposta cardiovascular induzida pelo labda-15-óico.

Palavras chaves: Diterpeno, Labdano, Reatividade Vascular, Óxido Nítrico.

ABSTRACT

SIMPLICIO, JA. **Assessment of the cardiovascular effects induced by the labdane *ent*-3-acetoxy-labda-8(17),13-dien-15-oic acid**. Thesis (Master) - School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The research, development and use of natural compounds as therapeutic agents have been increasing in recent years. Diterpenoids are the main constituents of plant extracts that are used in folk medicine for the treatment of hypertension. Labdane-type diterpenes are described to exert antispasmodic and relaxant action in vascular tissues. The present investigation aimed to evaluate the mechanisms (*in vitro* and *in vivo*) underlying the cardiovascular effects displayed by the labdane *ent*-3-acetoxy-labda-8(17),13-dien-15-oic acid (labda-15-oic) in rats. Our findings show that labda-15-oic achieved its maximal inhibitory action on KCl-induced contraction at 30 min. The inhibitory effect on the contraction induced KCl elicited by labda-15-oic was totally abolished 60 and 120 min after the removal of the labdane from the medium bath in endothelium-denuded (E^-) rings and endothelium-intact (E^+) rings. The E_{max} values for phenylephrine and serotonin in E^+ and E^- rings were reduced in the presence of labda-15-oic. The labda-15-oic inhibited the contraction induced $CaCl_2$ in E^- rings at 10, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$. The labdane did not alter the intracellular Ca^{2+} mobilization induced by phenylephrine or caffeine. The labdane induced relaxation in E^+ and E^- rings pre-contracted with phenylephrine or KCl. In E^+ rings pre-contracted with phenylephrine, labda-15-oic-induced relaxation was reduced in the presence of L-NAME, ODQ, haemoglobin and RP-8-Br-Pet. On the other hand, indomethacin, wortmannin, LY294002, H-89, SQ22,536, atropine, propranolol did not have a significant effect on the relaxation induced by the labdane. The labdane increased the levels of cGMP and nitrate but not cAMP in E^+ rings. The compound studied also increased the intensity of fluorescence emitted by samples of endothelial cells labeled with DAF-2DA indicating an increase in the cytosolic levels of NO. Furthermore, labda-15-oic (3 mg/Kg) induced hypotension in unanesthetized rats and this effect was attenuated by L-NAME. Taken together, our results demonstrate that the labdane exerts a vasorelaxant effect *in vitro* and hypotensive effect *in vivo*. The labda-15-oic acts on vascular smooth muscle where it blocks Ca^{2+} influx through interference with both voltage and receptor-operated channels. The relaxant action of the labdane is also partly mediated by the activation of endothelial NO-cGMP pathway and the opening of K^+ channels present in vascular smooth muscle. The studies *in vivo* confirm the role of NO in the cardiovascular response induced labda-15-oic acid.

Keywords: Diterpene, Labdane, Vascular Reactivity, Nitric Oxide

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
[NO] _c	Concentração de NO citosólico
Δ	Delta
°C	Unidade de temperatura Celsius
μL	Unidade de medida Microlitro
μmol	Unidade de concentração Micromolar
7-Ni	7-nitroindazol
AA	Ácido Araquidônico
AC	Adenilil ciclase
AMP _c	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BK _{Ca}	Canais para potássio ativados pelo cálcio de alta condutância
Ca ²⁺	Cálcio
CaCl ₂ .	Cloreto de cálcio
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
DAF-2DA	Diacetato de 4,5-Diaminofluoresceína
DAG	Diacylglicerol
DMSO	Dimetil sulfóxido
EC ₅₀	Concentração de droga que produz 50% do efeito máximo
EGTA	Ácido Etileno glicol tetraacético
E _{max}	Efeito máximo produzido pelo agonista
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
Fmol	Unidade de concentração Femtomolar
FSC	Forward-scattered light
G	Unidade de medida Grama
GCs	Guanilil Ciclase solúvel

GMPc	Guanosina 3, 5- monofosfato cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IF	Intensidade de fluorescência
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
IP ₃	Trifosfato de inositol
K ⁺	Potássio
K _{ATP}	Canais para potássio dependentes de ATP
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Unidade de medida kilogramas
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
Kv	Canais para potássio operados por voltagem
L	Unidade de medida Litro
Labda-15-óico	Ácido <i>ent</i> -3-acetóxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico
L-NAME	N ω -nitro-L-arginina metil éster
Mg	Unidade de medida Miligrama
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
Min	Minutos
mL	Unidade de medida Mililitro
MLC	Cadeia leve da miosina
MLCK	Quinase da cadeia leve de miosina
MLCP	Fosfatase da cadeia leve da miosina
Mm	Unidade de medida Milímetro
mmol/L	Unidade de concentração Milimolar
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
nmol/L	Unidade de concentração Nanomolar
nNOS	Enzima óxido nítrico sintase neuronal

NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
NOS-1	Enzima óxido nítrico sintase neuronal
NOS-2	Enzima óxido nítrico sintase induzível
NOS-3	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
O ₂	Gás oxigênio
O ₃	Ozônio
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one
OH ⁻	Radical hidroxila
p < 0,05	Valor mínimo de probabilidade menor que 0,05 estatisticamente significativo
PAM	Pressão arterial média
pD ₂	Logaritmo negativo da EC ₅₀
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinase
PKA	Proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
SERCA	Enzima cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático
SK _{Ca}	Canais para potássio ativados pelo cálcio de baixa condutância
SSC	Side-scattered light
T	Tempo
TEA	Tetraetilamônio
UF	Unidade de fluorescência
VaCl ₃	Cloreto de Vanádio
Zero-Ca ²⁺	Meio zero Cálcio

SUMÁRIO

1. Introdução	17
2. Objetivos.....	23
3. Materiais e Métodos	25
3.1 Isolamento do labda-15-óico	26
3.2 Animais	26
3.3 Estudos <i>in vitro</i>	26
3.3.1 Estudo funcional da reatividade em artérias isoladas	26
3.3.1.1 Determinação do período de incubação do labda-15-óico	27
3.3.1.2 Estudo do tempo de reversibilidade do labda-15-óico	28
3.3.1.3 Estudo do efeito do labda-15-óico sobre a resposta de contração da artéria aorta induzida pela fenilefrina e serotonina	28
3.3.1.4 Estudo do efeito do labda-15-óico sobre a mobilização do Ca^{2+} extracelular	29
3.3.1.5 Estudo do efeito do labda-15-óico sobre a mobilização do Ca^{2+} intracelular	29
3.3.1.6 Estudo do efeito do labda-15-óico em artérias pré-contraídas com fenilefrina ou KCl	30
3.3.2 Estudos dos mecanismos pelo qual o labda-15-óico exerce seu efeito vasorelaxante em aorta de ratos	31
3.3.2.1 Estudo da participação da via AMPc-PKA na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico	31
3.3.2.1.1 Efeito dos inibidores SQ22,536 e H-89 sobre o efeito vasorelaxante induzido pelo labda-15-óico	31
3.3.2.1.2 Avaliação dos níveis de AMPc em aorta de rato por ELISA	31
3.3.2.2 Estudo da participação da via do NO-GMPc na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico	32
3.3.2.2.1 Efeito do inibidor L-NAME sobre o efeito vasorelaxante induzido pelo labda-15-óico	32
3.3.2.2.2 Efeito da hemoglobina, 7-Ni, ODQ, Rp-8-Br-Pet e taspargina sobre o efeito vasorelaxante induzido pelo labda-15-óico	33
3.3.2.2.3 Determinação dos níveis de nitrato em aorta de rato por quimioluminescência	34
3.3.2.2.4 Estudo da concentração citosólica de NO ($[\text{NO}]_c$) em células endoteliais de aorta de ratos por citometria de fluxo	34
3.3.2.2.4.1 Isolamento das células endoteliais	34
3.3.2.2.4.2 Determinação da concentração citosólica de NO ($[\text{NO}]_c$) nas células endoteliais	35

3.3.2.2.5 Determinação dos níveis de GMPc em aorta de rato através do método de ELISA.....	36
3.3.2.3 Estudo da participação dos canais para K ⁺ na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico	37
3.3.2.3.1 Efeito do inibidor tetraetilamônio sobre o efeito vasorelaxante induzido pelo labda-15-óico	37
3.3.2.3.2 Efeito dos inibidores 4-aminopiridina, caribdotoxina, apamina e glibenclamida na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico	37
3.3.2.4 Estudo da participação da ciclooxigenase sobre o efeito vasorelaxante induzido pelo labda-15-óico	38
3.3.2.5 Estudo da participação da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico.....	38
3.3.2.6 Estudo da participação dos receptores β-adrenérgicos e muscarínicos na resposta vasorelaxante induzida pelo labda-15-óico	38
3.4 Experimentos <i>in vivo</i>	39
3.4.1 Avaliação do efeito do labda-15-óico sobre a pressão arterial média em animais normotensos acordados.....	39
3.5 Análise estatística	40
4. Resultados.....	41
4.1 Estudos <i>in vitro</i>	42
4.1.1 Avaliação do período de incubação do labda-15-óico em anéis de aorta	42
4.1.2 Avaliação do tempo de reversibilidade do labda-15-óico.....	42
4.1.3 Avaliação do efeito do labda-15-óico o sobre a resposta de contração da artéria aorta induzida pela fenilefrina ou serotonina.....	43
4.1.4 Avaliação do efeito do labda-15-óico sobre a mobilização do Ca ²⁺ extracelular ..	45
4.1.5 Avaliação do efeito do labda-15-óico sobre a mobilização do Ca ²⁺ intracelular ..	47
4.1.6 Efeito de relaxamento do labda-15-óico em artérias pré-contraídas com fenilefrina ou KCl.....	47
4.1.7 Estudo dos mecanismos envolvidos na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico	49
4.1.7.1 Estudo da via AMPc-PKA.....	49
4.1.7.1.1 Avaliação da participação da enzima adenilil ciclase e da PKA na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico.....	49
4.1.7.1.2 Avaliação do efeito do labda-15-óico sobre os níveis de AMPc em aorta de rato.....	50
4.1.7.2 Estudo da via NO-GMPc	51
4.1.7.2.1 Participação da enzima NOS na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico.....	51
4.1.7.2.2 Participação do NO na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico	52

4.1.7.2.3 Avaliação do efeito do labda-15-óico sobre os níveis de nitrato em aorta de rato.....	53
4.1.7.2.4 Avaliação da concentração citosólica de NO ([NO] _c) em células endoteliais	54
4.1.7.2.5 Participação da enzima guanilil cíclica, da PKG e da enzima Ca ²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático sobre a resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico.....	55
4.1.7.2.6 Avaliação do efeito do labda-15-óico sobre os níveis de GMPc em aorta de rato.....	57
4.1.7.3 Avaliação da participação dos canais para K ⁺ na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio.....	58
4.1.7.4 Avaliação da participação dos subtipos de canal para K ⁺ na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio.....	59
4.1.7.5 Avaliação da participação da ciclooxygenase na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico	61
4.1.7.6 Avaliação da participação da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico	62
4.1.7.7 Avaliação da participação dos receptores β-adrenérgicos e dos receptores muscarínicos na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico.	63
4.2 Estudos <i>in vivo</i>	64
4.2.1 Efeito do labda-15-óico sobre a PAM de ratos normotensos.....	64
4.2.2 Efeito da forskolina sobre a PAM de ratos normotensos	66
5. Discussão	67
Referências	77
Anexo.....	87
Anexo A.....	88

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento, a pesquisa e o uso de produtos naturais como agentes terapêuticos, especialmente os derivados de plantas, tem crescido muito nos últimos anos (Rates, 2001), uma vez que o reino vegetal representa uma grande reserva de novas moléculas (Hostettmann e Wolfender, 1997). Por esse motivo, muitas companhias farmacêuticas tem investido na procura por produtos naturais com novas atividades biológicas (Turner, 1996; Rates, 2001).

Os diterpenos compreendem um grande grupo de compostos não voláteis formados por cadeias que contêm 20 carbonos. Apesar de serem produzidos principalmente por plantas e fungos, alguns organismos marinhos e também insetos são capazes de produzir esses compostos (Robbers et al., 1996). Alguns diterpenóides acíclicos foram descritos, entretanto a grande maioria desses compostos é formada por cinco anéis carbônicos (Robbers et al., 1996). Os diterpenos tem sido encontrados em diferentes estados de oxidação, desde hidrocarbonetos até compostos altamente oxigenados que apresentam uma grande variedade de atividades biológicas. Por exemplo, o paclitaxel, é um diterpeno que tem sido utilizado no tratamento do câncer de ovário (Robbers et al., 1996).

No passado, os estudos envolvendo produtos naturais tinham como principais objetivos elucidar e estabelecer as estruturas e propriedades químicas dos compostos extraídos das plantas. Entretanto, mais recentemente um grande número de estudos está se concentrando nas atividades biológicas desempenhadas por esses compostos. A consequência dessa mudança de estratégia é a de que muitos diterpenos estão sendo “redescobertos” e suas atividades biológicas estão sendo investigadas empregando-se uma grande variedade de ensaios biológicos (Tirapelli et al., 2008a).

A importância do estudo das ações cardiovasculares dos diterpenos tem como base o fato de que muitas plantas medicinais, utilizadas na medicina popular para tratamento de patologias relacionadas ao sistema cardiovascular, contem diterpenos, que são os principais compostos responsáveis pela ação farmacológica dessas plantas. Calixto e Santana (1990) estudaram os efeitos relaxantes do diterpeno jatrofona, isolado dos rizomas de *Jatropha elliptica*, em preparações de músculo liso isolado do útero de ratas. Duarte et al. (1992) avaliaram a ação vasorelaxante da jatrofona em aorta de ratos, a qual era mediada pelo bloqueio dos canais para cálcio operados por receptores e dependentes de voltagem, e por ativação dos canais para K^+ sensíveis ao ATP. A *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees (Acanthaceae) tem sido empregada na Malásia no tratamento da hipertensão (Ahmad e Asmawi, 1993) e seu extrato aquoso reduz a pressão arterial (Zhang e Tan, 1996) sendo esse efeito atribuído ao diterpeno 14-deoxiandrografolide (Zhang et al., 1998). O meio ambiente

marinho também produz muitos compostos diterpênicos com uma potente atividade no sistema cardiovascular (Norton, 1991). Aceret et al. (1996) isolaram três diterpenos de *Sinularia Flexibilis*, uma espécie de coral, e observaram a produção de uma resposta vasorelaxante em aorta de ratos. Ohashi et al. (2000) isolaram, das folhas da *Orthosiphon aristatus*, quatro diterpenos da classe dos pimaranos que apresentavam atividade de relaxamento em aorta de ratos, um achado que está relacionado ao uso dessa planta no tratamento da hipertensão na medicina tradicional Javanesa. Somova et al. (2001) isolaram da *Alepidea amatymbica* e *Xylopi aethiopica* diterpenos, como os ácidos caurenóico, diidro-caurenóico e xilópico, e observaram efeitos diuréticos e hipotensores em ratos. Baccelli et al. (2005) isolaram dois diterpenos do extrato diclorometano da *Croton zambesicus*, uma planta que é empregada amplamente na medicina popular africana no tratamento da hipertensão. Ambos os diterpenos induziram relaxamento vascular via bloqueio do influxo de Ca^{2+} extracelular, sendo essa ação de grande importância no efeito anti-hipertensivo exercido pela *Croton zambesicus*. Silva et al. (2005) demonstraram os efeitos hipotensores em ratos e efeitos vasorelaxantes na aorta destes animais, tal efeito atribuído ao diterpeno trans-dehidrocrotonin isolado da casca de *Croton cajucara*, uma planta encontrada na Amazônia.

O fato dos diterpenos serem os principais constituintes de extratos de plantas que apresentam atividade hipotensora e anti-hipertensiva aumentou o interesse pelo estudo das ações cardiovasculares desses compostos bem como pelos mecanismos responsáveis por esses efeitos. Assim, ensaios farmacológicos com diterpenos isolados indicam um forte potencial terapêutico em várias doenças cardiovasculares, como na hipertensão arterial. Dentre os diterpenos que foram estudados por causa de sua ação cardiovascular, destaca-se o esteviosídeo, que é um glicosídeo extraído da *Stevia rebaudiana* Bertoni (Hanson e De oliveira, 1993). A infusão ou administração intraperitoneal do esteviosídeo reduz a pressão arterial em ratos e os mecanismos propostos para essa ação envolvem a redução da resistência vascular periférica associada ao bloqueio de canais para Ca^{2+} , liberação de um prostanóide vasodilatador e indução de diurese e natriurese que resultaria em redução do volume sanguíneo (Melis; Sainati, 1991; Chan et al., 1998; Lee et al., 2001). O efeito cardiovascular do esteviosídeo também foi testado em humanos e constatou-se que a administração oral desse composto por 12 ou 24 meses induziu redução da pressão arterial sistólica, diastólica e média (Chan et al., 2000; Hsieh et al., 2003).

Os resultados apresentados mostram que diferentes classes de diterpenos apresentam atividade cardiovascular. Os labdanos constituem uma das classes de diterpenos e esses compostos são substâncias naturais isoladas principalmente de espécies vegetais,

apresentando um sistema bicíclico e formadas a partir de unidades de isopreno. Diversos efeitos biológicos foram associados a essa classe de compostos, dentre elas destacam-se a ação de inibição de agregação plaquetária e ativação da enzima adenilil ciclase (De Souza et al., 1983). Além disso, os labdanos também atuam no sistema cardiovascular. Lindner et al. (1978) descreveram que o labdano forscolina (7 beta-acetoxi-8 alfa, 13-epoxi-1, 6-beta, 9 alfa-tri-hidroxi-labda-14-eno-11-ona) (Figura 1) induz hipotensão em cães e gatos e apresenta atividade anti-hipertensiva em ratos. Posteriormente, mostrou-se que a forscolina é um potente ativador seletivo da adenilil ciclase, enzima que aumenta a concentração intracelular do segundo mensageiro AMPc (Seamon et al., 1981). Desde então, esse composto tornou-se uma importante ferramenta farmacológica no estudo do papel do AMPc em diferentes tecidos. A administração oral de labdanos, que foram derivados estruturalmente da forscolina, levou à redução da pressão arterial em ratos hipertensos (Bhat et al., 1983) mostrando que os diterpenos da classe dos labdanos apresentam ação anti-hipertensiva

A atividade hipotensora e anti-hipertensiva apresentada pelos labdanos está relacionada, em parte, a sua ação de relaxamento do músculo liso vascular. A forscolina induz relaxamento vascular via aumento intracelular de AMPc (Muller e Baer, 1983) com consequente ativação da proteína quinase A (PKA) (Lincoln e Fisher-Simpson, 1984). A PKA fosforila resíduos protéicos reduzindo a concentração citoplasmática de Ca^{2+} . Entre esses resíduos, tem-se a fosforilação dos canais para Ca^{2+} aumentando a extrusão de Ca^{2+} pela membrana citoplasmática (Den Hertog et al., 1984). Além da forscolina, outros diterpenos da classe dos labdanos também apresentam ações cardiovasculares. No entanto, é importante ressaltar que a estrutura química dos labdanos tem influência sobre os mecanismos responsáveis pela ação cardiovascular desses compostos. Nesse sentido, El Bardai et al. (2003a) mostraram que o labdano marrubenol induz relaxamento da artéria aorta pré-contráida com KCl. Posteriormente, esse grupo de pesquisadores descreveu que a ação vasorelaxante do marrubenol deve-se ao bloqueio de canais para Ca^{2+} do tipo L (El Bardai et al., 2003b). Utilizando uma abordagem combinada de estudos *in vitro* e *in vivo*, De Oliveira et al. (2006) mostraram que a administração intravenosa do labdano ácido 8 (17), 12*E*, 14-labdatrien-18-óico em ratos normotensos induziu hipotensão que foi inibida significativamente pelo L-NAME, um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Esse resultado sugere que a hipotensão induzida pelo labdano é parcialmente mediada pelo NO. Experimentos em leito mesentérico isolado de ratos mostraram o envolvimento do NO e de um prostanóide vasodilatador na resposta de relaxamento vascular mediado por esse labdano. Além disso, os estudos *in vitro* mostraram que o ácido 8 (17), 12*E*, 14-labdatrien-18-

óico inibiu o influxo de Ca^{2+} extracelular por canais do tipo L (De Oliveira et al., 2006). Lahlou et al. (2007) mostraram que o labdano ácido labd-8(17)-en-15-óico é outro diterpeno que possui efeitos cardiovasculares. A injeção intravenosa desse labdano em ratos normotensos induz redução da pressão arterial. Estudos *in vitro*, mostram que esse diterpeno induz relaxamento vascular em aorta de ratos por um mecanismo independente do endotélio (Lahlou et al., 2007).

É interessante notar que, apesar de pertencerem à mesma classe de diterpenos, os labdanos apresentam diferentes mecanismos de ação vascular. Tal fato está relacionado a diferenças na estrutura química dos labdanos, que influenciam significativamente o mecanismo de ação farmacológico e a ação cardiovascular desses compostos (Khandelwal et al., 1988).

O labdano ácido *ent*-3-acetóxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico (labda-15-óico) foi obtido a partir do óleo resina de *Copaifera langsdorffii* Desf. e a sua estrutura química apresenta vários pontos comuns à da forskolina, que é a principal representante dos diterpenos da classe dos labdanos (**Figura 1**).

Figura 1: Estrutura química da Forscolina e do ácido *ent*-3-acetóxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico (labda-15-óico).

Analisando a abordagem biossintética e a estrutura química da forskolina e do labda-15-óico, observa-se que estes compostos são constituintes de metabólitos secundários de plantas, e são classificados como diterpenos da classe dos labdanos. Estes diterpenóides são biossintetizados a partir do ácido mevalônico e são caracterizados pela presença de dois anéis condensados em seu esqueleto químico (anéis A e B). Observamos a presença de um grande número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (grupo hidrofílico), destacando os

grupos hidroxilas (OH⁻) em C-1, C-6 e C-9 no esqueleto de forscolina, e somente dois grupos hidrofílicos em C-3 e C-16 na estrutura química do labda-15-óico.

A *Copaifera langsdorffii* Desf comumente chamada de “copaiba”, é uma árvore amplamente distribuída nas regiões norte e nordeste do Brasil, em especial nos estados do Pará, Ceará e Amazonas (Paiva et. al, 2004). Quanto a classificação botânica, o gênero *Copaifera* pertence a família Leguminosae Juss. e subfamília Caesalpinoideae Kunth (Santos et al., 2008). Espécies pertencentes ao gênero *Copaifera*, secretam um óleo resina que é disponível comercialmente e muito usado na medicina popular (Cavalcanti et al., 2006). Somente na espécie *C. langsdorffii* o óleo de copaiba, ou óleo resina, apresenta-se vermelho recebendo a denominação popular de copaiba vermelha (Valdir et al., 2002). Estudos fitoquímicos evidenciaram uma diversidade de substâncias neste óleo resina, destacando-se a presença de óleos essenciais e uma mistura de diterpenos e sesquiterpenos (Paiva et. al, 2002). Estudos farmacológicos demonstraram um efeito antiinflamatório, gastroprotetor e cicatrizantes associados aos óleos essenciais (Paiva et. al, 1998, 2002) e um efeito antimicrobiano, antinocepcivo, citotóxico e efeito relaxante sobre o músculo liso associado aos compostos diterpênicos (Velikova et al., 2000; Costa-Lotufo et al., 2002; De Alencar Cunha et al., 2003).

A descoberta de produtos naturais bioativos constitui não apenas uma necessidade de identificação própria, mas também para o conhecimento de entidades químicas que possam servir de modelos (protótipos) para o desenvolvimento de novos fármacos (Montanari e Bolzani, 2001). Portanto, torna-se pertinente o estudo da ação biológica de compostos com diferentes estruturas químicas uma vez que compostos com maior atividade biológica podem ser descobertos.

O conjunto de dados apresentados mostra que diterpenos da classe dos labdanos possuem ação cardiovascular que é mediada por diferentes mecanismos de ação celulares. Portanto, a hipótese do presente estudo é a de que o labda-15-óico isolado da *Copaifera langsdorffii* Desf. promova relaxamento vascular e redução da pressão arterial em ratos. Apesar de alguns estudos descreverem a ação dos labdanos como agentes que alteram a função cardiovascular, não há relatos sobre o efeito do labda-15-óico no sistema cardiovascular. Portanto, o presente estudo foi delineado de forma a investigar detalhadamente os mecanismos envolvidos no efeito cardiovascular (*in vitro* e *in vivo*) do labda-15-óico em ratos.

Investigar os mecanismos envolvidos no efeito cardiovascular (*in vitro* e *in vivo*) do labda-15-óico em ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolamento do labda-15-óico

Amostra autêntica do óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* Desf. foi identificada e fornecida pela empresa de fitoterápicos Apis Flora, localizada na cidade de Ribeirão Preto. O isolamento do metabólito *ent*-3-acetóxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico (labda-15-óico) foi realizado utilizando-se diversas técnicas cromatográficas, tais como cromatografia líquida à vácuo, cromatografia clássica e cromatografia em camada delgada comparativa. Todos os procedimentos de isolamento e purificação foram desenvolvidos pelo prof. Dr. Sergio Ricardo Ambrosio da Universidade de Franca – UNIFRAN.

3.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos, com idade média entre 40 e 50 dias (200-250 g), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Os protocolos experimentais descritos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto da USP (Protocolo CEUA nº: 09.1.1007.53.0).

3.3. Estudos *in vitro*

3.3.1. Estudo funcional da reatividade em artérias isoladas

Os animais foram anestesiados e posteriormente sacrificados por exsanguinação seguida de rompimento do diafragma. A artéria aorta torácica foi isolada e os nervos adjacentes e tecido conjuntivo removido. Em seguida, o tecido foi cortado em quatro segmentos de aproximadamente 5 mm cada. Após a retirada e isolamento das artérias, dois ganchos de metal foram inseridos no lúmen das mesmas para produzir tensão. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro a um transdutor isométrico de força, visando detectar modificações do tônus muscular. As modificações de tônus vascular

foram registradas através de sistema de aquisição de sinais TRI201 (Panlab, Espanha) e processadas pelo software Chart Pro 5.0 (ADInstruments, Austrália). O sistema foi montado em câmara para órgão isolado contendo 5 mL de solução de Krebs cuja composição é (em mmol/L): NaCl 118; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 15; Glicose 5,5; CaCl₂ 2,5; pH 7,4. Os anéis foram mantidos a uma temperatura constante de 37°C e gaseificados com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). As preparações de aorta (1,5 g de tensão) permaneceram em repouso durante 60 minutos para estabilização. Em seguida, as artérias foram estimuladas repetidamente com fenilefrina (0,1 µmol/L) até a reprodução da amplitude da resposta contrátil. O endotélio vascular foi preservado ou removido mecanicamente de acordo com o protocolo experimental. A integridade do endotélio foi testada pelo relaxamento produzido pela acetilcolina (1 µmol/L) sobre contração mantida estimulada com fenilefrina. A partir das curvas concentração-resposta obtidas nos experimentos de reatividade vascular, foram determinados os valores de potência (pD₂) que consiste no logaritmo negativo da concentração molar do composto vasoativo que promove 50% do efeito máximo (EC₅₀), bem como os respectivos efeitos máximos (E_{max}). As EC₅₀ foram calculadas por regressão não-linear, utilizando-se o programa GraphPad Prism[®] (versão 3.0 Prism, GraphPad, USA).

3.3.1.1. Determinação do período de incubação do labda-15-óico

Para a realização de todos os experimentos em artéria isolada, o labda-15-óico foi diluído em DMSO sendo que a concentração desse solvente não ultrapassou a concentração de 0,5% na cuba. Testes empregando somente o solvente nessa concentração já foram realizados em nosso laboratório e observou-se que o mesmo não altera a reatividade vascular a agentes vasoconstritores ou vasorelaxantes (Hipólito et al., 2009; Tirapelli et al., 2008b).

Para a determinação do período de incubação no qual o labda-15-óico exerce seu efeito inibitório máximo, os anéis de aorta foram estimulados com KCl (30 mmol/L) antes (controle) e após incubação com o labdano (10, 50, 100 µmol/L) por 30 ou 60 minutos. As respostas obtidas antes e após incubação com o labda-15-óico foram comparadas para a determinação do período no qual se observa o efeito inibitório máximo. O período determinado neste experimento foi usado nos demais protocolos experimentais.

Objetivo: Determinar o período de incubação em que o labda-15-óico exerce seu efeito inibitório máximo (período de equilíbrio).

3.3.1.2. Estudo do tempo de reversibilidade do labda-15-óico

Para a determinação do período de reversibilidade do efeito inibitório do labda-15-óico sobre a contratilidade da artéria aorta, anéis com e sem endotélio foram estimulados com KCl (30 mmol/L) antes (controle) e após incubação com o labdano (100 μ mol/L) por 30 minutos. Em seguida, as preparações foram lavadas a cada 10 minutos por um período de 30 minutos. Ao término desse período, os anéis de aorta foram estimulados novamente com KCl (30 mmol/L) e este procedimento foi repetido por 120 minutos. As respostas obtidas antes, após incubação com o labda-15-óico e após a lavagem, foram comparadas para a determinação do período no qual não se observou mais o efeito inibitório do labdano nas preparações de aorta.

Objetivo: Determinar o período no qual houve reversão do efeito inibitório induzido pelo labda-15-óico nas preparações isoladas de aorta.

3.3.1.3. Estudo do efeito do labda-15-óico sobre a resposta de contração da artéria aorta induzida pela fenilefrina e serotonina

A reatividade vascular foi estudada a partir da obtenção de curvas concentração-resposta cumulativas para fenilefrina (0,1 nmol/L -10 μ mol/L) e serotonina (1 nmol/L -100 μ mol/L) em anéis de aorta com ou sem endotélio vascular. As respostas contráteis foram expressas em gramas de contração. As curvas concentração-resposta para fenilefrina e serotonina obtidas na ausência do labda-15-óico foram consideradas como controle. Em outro grupo experimental, as curvas foram realizadas nos anéis de aorta após incubação dos tecidos por 30 min com diferentes concentrações de labda-15-óico (10, 50, 100 μ mol/L). Uma mesma preparação foi submetida a apenas uma concentração do labdano.

Objetivo: Verificar se o labda-15-óico altera a resposta de contração induzida pela fenilefrina e serotonina e qual a participação do endotélio nessa resposta.

3.3.1.4. Estudo do efeito do labda-15-óico sobre a mobilização do Ca^{2+} extracelular

Para estudar o influxo de Ca^{2+} extracelular, a solução fisiológica de Krebs foi substituída por uma solução de mesma constituição onde não estava presente o Ca^{2+} (solução zero- Ca^{2+} + EGTA 1 $\mu\text{mol/L}$). Em seguida, anéis de aorta sem endotélio receberam sucessivas estimulações com fenilefrina (10 $\mu\text{mol/L}$) com o intuito de depletar os estoques intracelulares de Ca^{2+} . Após depleção total do Ca^{2+} intracelular (aproximadamente 90 minutos), as preparações foram expostas a uma solução zero- Ca^{2+} que não continha EGTA. Foram adicionados a essa solução a fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$) ou KCl (30 mmol/L) que serviram de estímulo para o influxo de Ca^{2+} . Em seguida, foram obtidas curvas concentração-resposta para o cloreto de Ca^{2+} (CaCl_2 0,05 - 2 mmol/L) (Tirapelli et al., 2004; Hipólito et al., 2009). Em outro grupo de experimentos, as curvas para o CaCl_2 foram obtidas após incubação por 30 min com labda-15-óico (10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$).

Objetivo: Verificar se o labda-15-óico afeta o influxo de Ca^{2+} extracelular.

3.3.1.5. Estudo do efeito do labda-15-óico sobre a mobilização do Ca^{2+} intracelular

Para estudar a mobilização do Ca^{2+} intracelular, a solução fisiológica de Krebs foi substituída por uma solução de mesma constituição onde não estava presente o Ca^{2+} (solução zero- Ca^{2+}). Após 1 minuto em solução Krebs zero- Ca^{2+} (David et al., 2002), anéis de aorta sem endotélio foram estimulados com fenilefrina 1 $\mu\text{mol/L}$ ou cafeína 30 mmol/L na ausência (controle) ou após incubação por 30 min com o labda-15-óico (10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$). A resposta contrátil induzida pela fenilefrina ou cafeína foi medida e expressa em gramas de contração (Tirapelli et al., 2004; Hipólito et al., 2009).

Objetivo: Verificar se o labda-15-óico altera a mobilização de Ca^{2+} intracelular dos estoques sensíveis ao trifosfato de inositol (IP_3) ou rianodina no músculo liso da artéria aorta.

3.3.1.6. Estudo do efeito do labda-15-óico em artérias pré-contraídas com fenilefrina ou KCl

Curvas concentração-resposta para o labda-15-óico (0,1 – 300 $\mu\text{mol/L}$) foram obtidas em anéis de aorta, com ou sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina ou KCl. Com a finalidade de se obter a mesma amplitude de pré-contracção, a concentração de fenilefrina utilizada foi de 0,1 e 0,03 $\mu\text{mol/L}$ para os anéis com e sem endotélio, respectivamente. No caso do KCl, a concentração utilizada para induzir a pré-contracção foi de 30 mmol/L uma vez que não houve diferença na magnitude de contracção para esse agente contrátil entre anéis com e sem endotélio. A resposta de relaxamento foi expressa como a porcentagem de relaxamento relativa à pré-contracção com fenilefrina ou KCl. Doses crescentes do veículo (DMSO) também foram adicionadas na cuba, no mesmo volume que a usada na diluição do composto em estudo. Este controle foi realizado para avaliar se o veículo não altera a resposta vasorelaxante induzida pelo labda-15-óico.

Para comparação, curvas concentração-resposta para a forskolina (0,1 nmol/L - 1 $\mu\text{mol/L}$) foram obtidas em anéis de aorta, com ou sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina ou KCl.

Objetivo: Avaliar o perfil de relaxamento do labda-15-óico em anéis de artéria com e sem endotélio e comparar com a forskolina.

3.3.2. Estudos dos mecanismos pelo qual o labda-15-óico exerce seu efeito vasorelaxante em aorta de ratos

3.3.2.1. Estudo da participação da via AMPc-PKA na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico

3.3.2.1.1. Efeito dos inibidores SQ22,536 e H-89 sobre o efeito vasorelaxante induzido pelo labda-15-óico

Curvas concentração-resposta para o labda-15-óico (0,1 – 300 $\mu\text{mol/L}$) foram obtidas em anéis de aorta com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina (0,1 e 0,03 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente). Os anéis de aorta foram incubados por 30 min com SQ22,536 (inibidor da enzima adenilil ciclase, 100 $\mu\text{mol/L}$) ou H-89 (inibidor da PKA, 1 $\mu\text{mol/L}$).

***Objetivo:** Avaliar a participação da enzima adenilil ciclase e da PKA na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico em anéis de aorta.*

3.3.2.1.2. Avaliação dos níveis de AMPc em aorta de rato por ELISA

Os níveis de AMPc foram avaliados em aorta com endotélio na ausência (basal) e na presença de fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$) e após a adição de DMSO (0,3%), forskolina (1 $\mu\text{mol/L}$) e labda-15-óico (300 $\mu\text{mol/L}$). O DMSO foi usado como veículo para diluição do labda-15-óico, logo adicionamos na cuba a mesma quantidade usada para a diluição (15 μL), com o objetivo de avaliar se há efeito do solvente. A forskolina foi usada como controle positivo. Usamos somente a fenilefrina, para ter certeza que o seu estímulo contrátil não alteraria os níveis de AMPc. Foi adicionado as preparações um inibidor não seletivo da fosfodiesterase, o 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, 100 $\mu\text{mol/L}$). Em seguida, os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido, homogeneizados em solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L e centrifugados. O sobrenadante foi usado para determinação dos níveis de AMPc de acordo com as instruções

do kit comercial CA200, Sigma. Os resultados foram expressos como picomoles de AMPc por mg de proteína. A concentração de proteína foi determinada utilizando-se o método de dosagem de Lowry (Bio-Rad, EUA).

Objetivo: *Avaliar se ocorre um aumento nos níveis de AMPc em anéis de aorta com endotélio após estímulo com labda-15-óico.*

3.3.2.2. Estudo da participação da via do NO-GMPc na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico

3.3.2.2.1. Efeito do inibidor L-NAME sobre o efeito vasorelaxante induzido pelo labda-15-óico

Nesses estudos, curvas concentração-resposta para o labda-15-óico (0,1 – 300 $\mu\text{mol/L}$) foram obtidas em anéis de aorta com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina. Os anéis de aorta foram incubados por 30 min com L-NAME (inibidor não seletivo da NOS, 100 $\mu\text{mol/L}$). A pré-contracção dos anéis incubados com L-NAME foi induzida com fenilefrina 0,03 $\mu\text{mol/L}$ para obtenção da mesma amplitude de contracção na ausência desse inibidor.

Objetivo: *Avaliar a participação da enzima óxido nítrico sintase na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico em anéis de aorta com e sem endotélio.*

3.3.2.2.2. Efeito da hemoglobina, 7-nitroindazol, ODQ, Rp-8-Br-Pet e taspargina sobre o efeito vasorelaxante induzido pelo labda-15-óico

Nesses estudos, curvas concentração-resposta para o labda-15-óico (0,1 – 300 $\mu\text{mol/L}$) foram obtidas em anéis de aorta com endotélio, pré-contraídos com fenilefrina. Os anéis de aorta foram incubados por 30 min com os seguintes inibidores: hemoglobina (sequestrador de

NO extracelular, 10 $\mu\text{mol/L}$), 7-nitroindazol (inibidor seletivo da nNOS, 100 $\mu\text{mol/L}$), ODQ (inibidor seletivo da enzima guanilil ciclase, 1 $\mu\text{mol/L}$), Rp-8-Br-Pet (inibidor da proteína quinase G, PKG, 3 $\mu\text{mol/L}$) ou taspigargina (inibidor da enzima Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático, SERCA, 1 $\mu\text{mol/L}$). A pré-contracção dos anéis foi induzida com fenilefrina 0,1 $\mu\text{mol/L}$. Nos grupos onde o ODQ esteve presente, a pré-contracção induzida pela fenilefrina foi feita com a concentração de 0,03 $\mu\text{mol/L}$ para obtenção da mesma amplitude de contracção na ausência desse inibidor.

Objetivo: Avaliar o envolvimento do NO, da enzima guanilil ciclase, da proteína quinase dependente de GMPc (PKG) e da enzima Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) sobre a resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio.

3.3.2.2.3. Determinação dos níveis de nitrato em aorta de rato por quimioluminescência

Os níveis de nitrato, um metabólito estável do NO, foram avaliados em anéis de aorta com endotélio. Os anéis de aorta foram estimulados com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$) e após a obtenção da resposta contrátil foi adicionado na cuba DMSO (0,3%) ou labda-15-óico (300 $\mu\text{mol/L}$). Em outro grupo, anéis de aorta não sofreram nenhum tipo de estímulo (basal) ou foram incubados por 30 minutos com L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$) seguido da adição de fenilefrina para a obtenção da resposta contrátil e posterior adição do labda-15-óico (300 $\mu\text{mol/L}$). O DMSO foi usado como veículo para diluição do labda-15-óico, logo adicionamos na cuba a mesma quantidade usada para a diluição (15 μL), com o objetivo de avaliar se há efeito do solvente. O L-NAME foi usado como um controle para avaliar a participação do NO a partir da NOS. Em seguida, os tecidos foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido. O tecido foi homogeneizado em 250 μL de salina. Aliquotas de 100 μL de amostras de tecido aórtico foram desproteinizadas por precipitação utilizando 200 μL de etanol absoluto mantido á 4°C, seguido de agitação e permaneceram por 30 minutos em freezer (-20°C), e em seguida, foram submetidas à centrifugação (4.000 g, 10 min, 25°C) para posterior dosagem.

Para as dosagens de nitrato tecidual, foi utilizada a técnica de quimioluminescência NO/ozônio utilizando-se o analisador Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280 (GE Analytical Instruments, Boulder, CO. USA). Um volume de 5,0 μL de amostra foi injetado na câmara de

reação do analisador contendo o agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio, VaCl_3 , em 1N de HCl à 95°C) o qual reduz o nitrato em NO . O NO gerado é carregado a uma câmara de geração de ozônio. A reação entre o NO e o ozônio emite luz. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico, que é captado, amplificado e processado por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico, em que a área sob a curva gerada corresponde à concentração de nitrato na amostra. A curva de calibração em níveis múltiplos foi realizada com a injeção de padrões externos, e a concentração de nitrato foi quantificada a partir destes padrões. O conteúdo protéico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA). Os resultados foram expressos como μmol de nitrato por mg de proteína.

Objetivo: Avaliar se ocorre um aumento nos níveis de nitrato, um metabólito estável do NO , em anéis de aorta com endotélio após estímulo com labda-15-óico .

3.3.2.2.4. Estudo da concentração citosólica de NO ($[\text{NO}]_c$) em células endoteliais de aorta de ratos por citometria de fluxo

3.3.2.2.4.1. Isolamento das células endoteliais

O isolamento das células endoteliais da aorta de rato foi realizado 30 minutos antes dos experimentos. Os animais foram anestesiados e posteriormente sacrificados por exsanguinação seguida de rompimento do diafragma. A artéria aorta torácica foi isolada e os nervos adjacentes e tecido conjuntivo removido. Depois de isoladas, as artérias foram cortadas longitudinalmente. As células endoteliais foram mecanicamente removidas dos vasos por fricção suave com haste plástica em solução de Hanks (composição em mmol/L : CaCl_2 1,6; MgSO_4 1,0; NaCl 145,0; KCl 5,0; NaH_2PO_4 0,5; dextrose 10,0; HEPES 10,0; pH 7,4) (Rodrigues et al., 2008).

A suspensão de células foi centrifugada a 200 g em temperatura ambiente por 5 min e o pellet foi ressuspenso em 500 μL de solução de Hanks contida em tubos de poliestireno para citometria de fluxo. Após esta etapa, as células permaneceram acondicionadas em estufa de

CO₂ (37° C) até o momento do experimento (Bonaventura et al., 2008). A análise foi realizada em Citômetro de Fluxo (FACS Canto, BD).

3.3.2.2.4.2. Determinação da concentração citosólica de NO ([NO]_c) nas células endoteliais

Para a realização da medida de [NO]_c por citometria de fluxo, a suspensão de células endoteliais sem qualquer estímulo ou com a presença do labda-15-óico foi submetida à leitura para verificar a emissão da fluorescência basal (branco). Em seguida a suspensão de células foi incubada por 20 minutos com a sonda fluorescente diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA, 10 µmol/L) e uma nova leitura das amostras foi realizada para a obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo DAF-2DA. Um grupo de células foi estimulado com labda-15-óico (300 µmol/L) após incubação com a sonda e uma nova leitura das amostras foi realizada para a obtenção dos valores de fluorescência emitidos pelo DAF-2DA após o respectivo estímulo. Em outro grupo, a suspensão de células foi incubada com L-NAME (100 µmol/L)+DAF-2DA seguido ou não do estímulo com labda-15-óico (300 µmol/L).

Nesses estudos, foram analisados os traçados citofluorográficos (histogramas) gerados pelo programa DIVA (Software DIVA) após leitura pelo citômetro. Os histogramas obtidos a partir da análise citofluorográfica descrevem fenômenos de dispersão do laser que incide sobre as células, de absorção da luz e de emissão de fluorescência. Os histogramas biparamétricos correlacionam a luz dispersa lateralmente (*Side-scattered light*, SSC), proporcional à complexidade ou granulosidade interna da célula, em função da luz dispersa para frente (*Forward-scattered light*, FSC), proporcional à área da superfície celular. A correlação das medidas de SSC e FSC permitem diferenciar os tipos celulares em populações celulares heterogêneas, agrupadas em *gates* (fronteiras gráficas que definem as características de uma população celular). Logo, os histogramas biparamétricos gerados pela análise citofluorográfica foram utilizados para analisar a homogeneidade da população celular empregada na leitura. Já histogramas monoparamétricos relacionam o número de eventos celulares adquiridos por leitura em função da intensidade de fluorescência emitida pela sonda fluorescente DAF-2DA e, portanto utilizados para analisar a biodisponibilidade de NO nas amostras empregadas durante a leitura. Os resultados foram expressos em valores medianos

da intensidade de fluorescência (IF) emitida por cada amostra, expressos em unidades de fluorescência (U).

Objetivo: Avaliar se ocorre um aumento da concentração citosólica de NO em células endoteliais após estímulo com labda-15-óico.

3.3.2.2.5. Determinação dos níveis de GMPc em aorta de rato através do método de ELISA

Os níveis de GMPc foram avaliados em aorta de rato com endotélio na ausência (basal) ou na presença de fenilefrina ($0,1\mu\text{mol/L}$) e após a adição de DMSO (0,3%), nitroprussiato de sódio ($0,03\mu\text{mol/L}$) e labda-15-óico ($300\mu\text{mol/L}$). O DMSO foi usado como veículo para diluição do labda-15-óico, logo adicionamos na cuba a mesma quantidade usada para a diluição ($15\mu\text{L}$), com o objetivo de avaliar se há efeito do solvente. O nitroprussiato de sódio foi usado como controle positivo. Usamos somente a fenilefrina, para ter certeza que o estímulo contrátil não alteraria os níveis de GMPc. Em seguida, foi adicionado as preparações um inibidor não seletivo da fosfodiesterase, o 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, $100\mu\text{mol/L}$). Logo após, os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, homogeneizados em solução de ácido tricloroacético 6% e centrifugados. O sobrenadante foi lavado cinco vezes com 5 volumes de dietil éter e o extrato aquoso remanescente foi liofilizado. O extrato seco obtido foi dissolvido em solução tampão disponível no Kit e em seguida foi usado para determinação dos níveis de GMPc de acordo com as instruções do kit comercial RPN226, GE Healthcare. Os resultados foram expressos como femtomoles de GMPc por mg de proteína. A concentração de proteína foi determinada utilizando-se o método de dosagem de Lowry (Bio-Rad, EUA).

Objetivo: Avaliar se ocorre aumento nos níveis de GMPc em anéis de aorta com endotélio após estímulo com labda-15-óico.

3.3.2.3. Estudo da participação dos canais para K^+ na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico

3.3.2.3.1. Efeito do inibidor tetraetilamônio sobre o efeito vasorelaxante induzido pelo labda-15-óico.

Nesses estudos, curvas concentração-resposta para o labda-15-óico (0,1 – 300 $\mu\text{mol/L}$) foram obtidas em anéis de aorta com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina (0,1 e 0,03 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente). Os anéis de aorta foram incubados por 30 minutos com tetraetilamônio (inibidor não seletivo dos canais para K^+ , TEA, 1 mmol/L).

***Objetivo:** Avaliar a participação dos canais para K^+ na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico em anéis de aorta com e sem endotélio.*

3.3.2.3.2. Efeito dos inibidores 4-aminopiridina, caribdotoxina, apamina e glibenclamida na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico

Nesses estudos, curvas concentração-resposta para o labda-15-óico (0,1 – 300 $\mu\text{mol/L}$) foram obtidas em anéis de aorta com endotélio, pré-contraídos com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta foram incubados por 30 minutos com os seguintes inibidores seletivos de canal para K^+ : 4-aminopiridina (inibidor dos canais para K^+ sensíveis a voltagem, K_v , 1 mmol/L), caribdotoxina (inibidor dos canais para K^+ de alta condutância ativados pelo Ca^{2+} , BK_{ca} , 0,1 $\mu\text{mol/L}$), apamina (inibidor dos canais para K^+ de baixa condutância ativados pelo Ca^{2+} , SK_{ca} , 1 $\mu\text{mol/L}$) ou glibenclamida (inibidor dos canais para K^+ sensíveis ao ATP, K_{ATP} , 3 $\mu\text{mol/L}$) (Nelson e Quayle, 1995).

***Objetivo:** Avaliar a participação dos subtipos de canal para K^+ na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio.*

3.3.2.4. Estudo da participação da ciclooxigenase sobre o efeito vasorelaxante induzido pelo labda-15-óico.

Nesses estudos, curvas concentração-resposta para o labda-15-óico (0,1 – 300 $\mu\text{mol/L}$) foram obtidas em anéis de aorta com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina (0,1 e 0,03 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente). Os anéis de aorta foram incubados por 30 min com indometacina (inibidor não seletivo da ciclooxigenase, 10 $\mu\text{mol/L}$).

***Objetivo:** Avaliar a participação da ciclooxigenase na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico em anéis de aorta com e sem endotélio.*

3.3.2.5. Estudo da participação da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico

Nesses estudos, curvas concentração-resposta para o labda-15-óico (0,1 – 300 $\mu\text{mol/L}$) foram obtidas em anéis de aorta com endotélio, pré-contraídos com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta foram incubados por 30 min com os inibidores seletivos da PI3K: wortmanin (1 $\mu\text{mol/L}$) ou LY294002 (1 $\mu\text{mol/L}$)

***Objetivo:** Avaliar a participação da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio.*

3.3.2.6. Estudo da participação dos receptores β -adrenérgicos e muscarínicos na resposta vasorelaxante induzida pelo labda-15-óico

Curvas concentração-resposta para o labda-15-óico (0,1 – 300 $\mu\text{mol/L}$) foram obtidas em anéis de aorta com endotélio, pré-contraídos com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$). Os anéis de aorta foram incubados por 30 minutos com atropina (antagonista não seletivo de receptores

muscarínicos, 1 $\mu\text{mol/L}$) ou propranolol (antagonista não seletivo dos receptores β -adrenérgicos, 3 $\mu\text{mol/L}$).

Objetivo: *Avaliar a participação dos receptores β -adrenérgicos e dos receptores muscarínicos na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio.*

3.4. Experimentos *in vivo*

3.4.1. Avaliação do efeito do labda-15-óico sobre a pressão arterial média em animais normotensos acordados

Um dia antes dos experimentos, os ratos foram anestesiados e uma cânula (um segmento de 4 cm de PE-10 ligado a um segmento de 13 cm de PE-50, Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) foi inserida na aorta abdominal pela artéria femoral para o monitoramento da pressão arterial e da frequência cardíaca. Uma segunda cânula foi implantada na veia jugular para a administração de drogas. As duas cânulas foram exteriorizadas no dorso do animal. As pressões sistólica, diastólica e média foram registradas antes (basal) e após a injeção (bolus) do labda-15-óico (0,3 - 3 mg/kg) usando um amplificador HP-7754A (Hewlett Packard, EUA) conectado a um computador e processados pelo software Windaq di 190 (Dataq, EUA). Os resultados foram expressos como o delta (Δ) da redução da pressão arterial média (PAM) induzido pelo labda-15-óico em relação ao tempo zero ($t=0$ minutos), que corresponde ao momento imediatamente anterior à injeção do labda-15-óico. O labda-15-óico foi diluído em DMSO 10%. Injeção intravenosa empregando somente o solvente foi realizada para avaliar se teria alguma interferência do respectivo veículo sobre a resposta hipotensora do labdano. Em outro grupo de experimentos foi administrado ainda o L-NAME (10 mg/kg) e 15 minutos depois, após ser observado um aumento nos valores de pressão arterial média, foi administrado labda-15-óico na concentração de 3 mg/kg (dose máxima administrada da droga). A forskolina (0,1-1 mg/kg) também foi administrada para comparação da resposta hipotensora com o labda-15-óico.

Entre uma dose e outra de labda-15-óico ou forskolina esperava-se 20 minutos, que era o tempo necessário para que a PAM retornasse aos valores basais.

Objetivo: *Verificar se o labda-15-óico reduz a PAM e altera a frequência cardíaca em animais normotensos e se este mecanismo está ligado à via do NO. Comparar a resposta hipotensora do labda-15-óico com a da forskolina.*

3.5. Análise estatística

A análise estatística utilizada para comparação entre os grupos foi a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls ou teste “t” de Student não pareado, utilizando o programa GraphPad Prism[®] (versão 3.0 Prism, GraphPad, USA). Para análise do estudo de reversibilidade a análise estatística utilizada foi ANOVA de medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Bonferroni, utilizando o programa SPSS (versão 15.0). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Estudos *in vitro*

4.1.1. Avaliação do período de incubação do labda-15-óico em anéis de aorta

O labda-15-óico inibiu a contração de anéis de aorta torácica induzida por KCl 30 mmol/L de maneira dependente da concentração após incubação por 30 ou 60 minutos (Tabela 1). O tempo de equilíbrio foi observado após 30 minutos de incubação já que não houve diferença estatisticamente significativa da resposta inibitória entre os períodos de incubação de 30 e 60 minutos para as três concentrações do labda-15-óico. Levando em consideração estes resultados, os demais experimentos foram realizados utilizando o tempo de incubação de 30 minutos.

Tabela 1: Porcentagem de inibição promovida pelo labda-15-óico sobre a contração induzida por KCl (30 mmol/L) em anéis de aorta com endotélio.

Tempo (minutos)	Labda-15-óico		
	10 μ mol/L	50 μ mol/L	100 μ mol/L
30	11,6 $\pm$ 1,4 ^a (8)	34,3 $\pm$ 5,5 ^{a,b} (7)	78,5 $\pm$ 3,8 ^{a,b,c} (10)
60	12,8 $\pm$ 2,3 ^a (8)	39,8 $\pm$ 3,2 ^{a,b} (9)	81,9 $\pm$ 4,2 ^{a,b,c} (9)

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações utilizadas. Os anéis de aorta foram inicialmente estimulados com KCl 30 mmol/L (grupo controle, 100% de contração) e uma segunda estimulação com esse agente foi realizada após incubação com três diferentes concentrações de labda-15-óico por 30 e 60 minutos. ^a Diferença significativa em relação ao grupo controle (0% de inibição); ^b Diferença significativa em relação à concentração de 10 μ mol/L no respectivo tempo de incubação; ^c Diferença significativa em relação de 50 μ mol/L no respectivo tempo de incubação (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.1.2. Avaliação do tempo de reversibilidade do labda-15-óico

O período no qual ocorre reversão total do efeito inibitório induzido pelo labda-15-óico em anéis de aorta com e sem endotélio foi avaliado. O efeito inibitório do labda-15-óico

sobre a contração induzida por KCl foi revertido 60 minutos após a remoção do diterpeno das preparações em anéis com e sem endotélio (Figura 2).

Figura 2: Avaliação da reversibilidade do efeito inibitório do labda-15-óico (100 $\mu\text{mol/L}$) sobre a contração de anéis de aorta com (E^+) e sem endotélio (E^-) estimulados com KCl (30 mmol/L). Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM de 7 preparações independentes. *Diferença significativa em relação ao grupo controle, KCl (100% contração)(ANOVA de medidas repetidas seguida de pós-teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

4.1.3. Avaliação do efeito do labda-15-óico o sobre a resposta de contração da artéria aorta induzida pela fenilefrina ou serotonina

Os valores de E_{max} para fenilefrina em artérias com endotélio foram menores na presença do labda-15-óico na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$, quando comparados ao controle (Figura 3; Tabela 2). Em artérias sem endotélio, houve redução dos valores de E_{max} para a fenilefrina na presença do labda-15-óico nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$. O labda-15-óico não alterou os valores de pD_2 para fenilefrina em artérias com e sem endotélio nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ (Tabela 2).

Figura 3: Efeito do labda-15-óico sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em anéis de aorta com (E^+) e sem endotélio (E^-). Foram realizadas curvas concentração-resposta para fenilefrina em anéis de aorta de rato na ausência (controle) ou após incubação por 30 minutos com labda-15-óico nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$. Os pontos representam a média $\pm$ EPM da contração em resposta a uma dada concentração de fenilefrina.

Tabela 2: Efeito do labda-15-óico sobre os valores de E_{max} (g) e pD_2 da fenilefrina em anéis de aorta com ou sem endotélio.

Labda-15-óico	Com Endotélio		Sem Endotélio	
	E_{max}	pD_2	E_{max}	pD_2
Ausente	$1,65 \pm 0,06$ (7)	$7,4 \pm 0,04$	$1,74 \pm 0,08$ (6)	$7,3 \pm 0,19$
10 $\mu\text{mol/L}$	$1,41 \pm 0,08$ (7)	$7,5 \pm 0,11$	$1,44 \pm 0,14$ (9)	$7,9 \pm 0,16$
50 $\mu\text{mol/L}$	$1,41 \pm 0,10$ (6)	$7,5 \pm 0,04$	$1,21 \pm 0,09^a$ (6)	$7,4 \pm 0,13$
100 $\mu\text{mol/L}$	$1,16 \pm 0,04^a$ (7)	$7,5 \pm 0,06$	$0,90 \pm 0,15^{a,b}$ (7)	$7,4 \pm 0,23$

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações. ^a Diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle; ^b Diferença significativa em relação ao labda-15-óico 10 $\mu\text{mol/L}$ (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Os efeitos do labda-15-óico sobre a contração induzida pela serotonina em aorta torácica de ratos estão representados na Figura 4. Os valores de E_{max} para serotonina em artérias com e sem endotélio foram menores na presença do labda-15-óico nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$, quando comparados ao controle (Tabela 3). O labda-15-óico não alterou os valores de pD_2 para serotonina em artérias com e sem endotélio (Tabela 3).

Figura 4: Efeito do labda-15-óico sobre a resposta contrátil induzida pela serotonina em anéis de aorta com (E⁺) e sem endotélio (E⁻). Foram realizadas curvas concentração-resposta para a serotonina em anéis de aorta na ausência (controle) ou após incubação por 30 minutos com labda-15-óico nas concentrações 10, 50 e 100 µmol/L. Os pontos representam a média $\pm$ EPM da contração em resposta a uma dada concentração de serotonina.

Tabela 3: Efeito do labda-15-óico sobre os valores de E_{max} (g) e pD₂ da serotonina em anéis de aorta com ou sem endotélio.

Labda-15-óico	Com Endotélio		Sem Endotélio	
	E _{max}	pD ₂	E _{max}	pD ₂
Ausente	1,33 $\pm$ 0,06 (8)	5,5 $\pm$ 0,10	1,39 $\pm$ 0,14 (6)	5,6 $\pm$ 0,06
10 µmol/L	1,05 $\pm$ 0,09 ^a (7)	5,2 $\pm$ 0,09	0,99 $\pm$ 0,09 ^a (8)	5,8 $\pm$ 0,20
50 µmol/L	1,06 $\pm$ 0,05 ^a (9)	5,3 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,07 ^a (8)	5,6 $\pm$ 0,13
100 µmol/L	0,85 $\pm$ 0,09 ^a (7)	5,3 $\pm$ 0,09	0,80 $\pm$ 0,09 ^a (7)	5,6 $\pm$ 0,15

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações. ^a Diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.1.4. Avaliação do efeito do labda-15-óico sobre a mobilização do Ca²⁺ extracelular

A pré-incubação com o labda-15-óico atenuou a contração induzida por CaCl₂ em aorta sem endotélio exposta ao meio zero-Ca²⁺ contendo fenilefrina (0,1 µmol/L) ou KCl (30 mmol/L) como estimulantes (Figura 5). Os valores de E_{max} e pD₂ para o CaCl₂ na presença do labda-15-óico estão descritos na Tabela 4.

Figura 5: Efeito do labda-15-óico sobre a resposta contrátil induzida por CaCl₂ em anéis de aorta sem endotélio. As curvas foram determinadas na ausência (controle) ou após incubação por 30 minutos com labda-15-óico nas concentrações de 10, 50 e 100 μmol/L. Os pontos representam a média ± EPM da contração em resposta a uma dada concentração de CaCl₂. Foram utilizados como estímulo para a mobilização do Ca²⁺ a fenilefrina (0,1 μmol/L) e o KCl (30 mmol/L).

Tabela 4: Efeito do labda-15-óico sobre os valores de E_{max} (g) e pD₂ do CaCl₂ em anéis de aorta sem endotélio.

Labda-15-óico	Estímulo: Fenilefrina		Estímulo: KCl	
	E _{max}	pD ₂	E _{max}	pD ₂
Ausente	1,28 ± 0,10 (6)	0,59 ± 0,10	1,42 ± 0,06 (8)	0,90 ± 0,13
10 μmol/L	0,73 ± 0,07 ^a (6)	0,53 ± 0,10	0,91 ± 0,13 ^a (5)	0,88 ± 0,18
50 μmol/L	0,78 ± 0,12 ^a (5)	0,68 ± 0,17	0,78 ± 0,14 ^a (7)	0,67 ± 0,18
100 μmol/L	0,41 ± 0,06 ^{a,b,c} (6)	0,34 ± 0,14	0,67 ± 0,06 ^a (6)	0,35 ± 0,12

Os valores são expressos como a média ± EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações.

^aDiferença significativa em relação ao respectivo grupo controle; ^b Diferença significativa ao labda-15-óico 10 μmol/L; ^c Diferença significativa ao labda-15-óico 50 μmol/L (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, p<0,05).

4.1.5. Avaliação do efeito do labda-15-óico sobre a mobilização do Ca^{2+} intracelular

O labda-15-óico não alterou a mobilização do Ca^{2+} intracelular induzida pela fenilefrina ou cafeína (Figura 6).

Figura 6: Efeito do labda-15-óico sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina (1 µmol/L) ou cafeína (30 mmol/L) em anéis de aorta sem endotélio em meio zero Ca^{2+} . As respostas contráteis induzidas pela fenilefrina ou cafeína foram determinadas na ausência (controle) ou após incubação por 30 minutos com labda-15-óico 10, 50 e 100 µmol/L. Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM de 5-7 preparações independentes.

4.1.6. Efeito de relaxamento do labda-15-óico em artérias pré-contraídas com fenilefrina ou KCl

O labda-15-óico e a forskolina induziram relaxamento em artérias, com ou sem endotélio, pré-contraídas com fenilefrina ou KCl (Figura 7). Os valores de E_{max} do labda-15-óico e da forskolina em anéis com e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina ou KCl, não foram significativamente diferentes. Os valores de pD_2 do labda-15-óico ou forskolina foram significativamente diferentes quando comparados anéis com e sem endotélio em artérias pré-contraídas com fenilefrina. Os valores de pD_2 da forskolina foram significativamente maiores quando comparados com os valores de pD_2 do labda-15-óico em anéis com e sem endotélio pré-contraídos com KCl ou fenilefrina (Tabela 5). Doses crescentes do veículo DMSO foram adicionadas na cuba e nenhuma alteração foi observada.

Figura 7: Relaxamento induzido pelo labda-15-óico ou forskolina em anéis de aorta com (E^+) e sem endotélio (E^-). Realizou-se pré-contracção com fenilefrina (A) ou KCl (B) e concentrações crescentes do labda-15-óico ou de forskolina foram adicionadas ao banho de órgão. Os pontos representam a média $\pm$ EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração do composto.

Tabela 5: Valores de $E_{\max}$ (% relaxamento) e pD_2 para o labda-15-óico e forskolina em anéis de aorta com e sem endotélio.

Composto	Agente pré-contrátil	Com Endotélio		Sem Endotélio	
		$E_{\max}$	pD_2	$E_{\max}$	pD_2
Labda-15-óico	Fenilefrina	101,4 $\pm$ 7,07 (11)	4,8 $\pm$ 0,18	94,6 $\pm$ 9,4 (9)	4,1 $\pm$ 0,02 ^a
	KCl	111,8 $\pm$ 7,03 (9)	4,4 $\pm$ 0,07	113,9 $\pm$ 2,0 (7)	4,3 $\pm$ 0,11
Forskolina	Fenilefrina	101,2 $\pm$ 1,05 (8)	7,4 $\pm$ 0,1 ^b	102,0 $\pm$ 2,2 (8)	6,5 $\pm$ 0,05 ^{a,b}
	KCl	102,5 $\pm$ 4,04 (6)	7,3 $\pm$ 0,13 ^c	90,9 $\pm$ 3,7 (6)	7,0 $\pm$ 0,11 ^c

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações. ^aDiferença significativa em relação ao respectivo grupo com endotélio pré-contráído com fenilefrina. ^bDiferença significativa em relação ao grupo labda-15-óico pré-contráído com fenilefrina. ^cDiferença significativa em relação ao grupo labda-15-óico pré-contráído com KCl (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.1.7. Estudo dos mecanismos envolvidos na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico

4.1.7.1. Estudo da via AMPc-PKA

4.1.7.1.1. Avaliação da participação da enzima adenilil ciclase e da PKA na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico.

Os resultados mostram que os inibidores SQ22,536 (inibidor da enzima adenilil ciclase) ou H-89 (inibidor da PKA) não alteraram o perfil do relaxamento induzido pelo labda-15-óico (Figura 8; Tabela 6).

Figura 8: Relaxamento induzido pelo labda-15-óico em anéis de aorta com (E⁺) e sem endotélio (E⁻) na presença de SQ22,536 ou H-89. Realizou-se uma pré-contracção com fenilefrina e concentrações crescentes do labda-15-óico foram adicionadas ao banho de órgão. Os pontos representam a média $\pm$ EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração do composto. Os tecidos foram incubados com SQ22,536 (100 μ mol/L) ou H-89 (1 μ mol/L) por 30 minutos.

Tabela 6: Efeito do SQ22,536 (100 $\mu\text{mol/L}$) ou H-89 (1 $\mu\text{mol/L}$) nos valores de E_{max} (% relaxamento) e pD_2 para o labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio pré-contraídos com fenilefrina.

Grupo	Com Endotélio		Sem Endotélio	
	E_{max}	pD_2	E_{max}	pD_2
Controle	$101,4 \pm 7,0$ (11)	$4,8 \pm 0,18$	$94,6 \pm 9,4$ (9)	$4,1 \pm 0,02$
SQ22,536	$89,6 \pm 5,4$ (10)	$4,8 \pm 0,18$	$84,8 \pm 5,6$ (6)	$4,3 \pm 0,16$
H-89	$104,13 \pm 3,1$ (8)	$4,7 \pm 0,17$	$91,3 \pm 4,8$ (8)	$4,3 \pm 0,06$

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações.

4.1.7.1.2. Avaliação do efeito do labda-15-óico sobre os níveis de AMPc em aorta de rato

O efeito do labda-15-óico (300 $\mu\text{mol/L}$) sobre a formação de AMPc foi avaliado em artérias aorta com endotélio, pré-contraídas com fenilefrina. Os resultados mostram que em anéis de aorta estimulados com o labda-15-óico não houve alteração dos níveis de AMPc quando comparados ao grupo controle (basal) (Figura 9). A fenilefrina foi usada para mostrar que o estímulo contrátil não altera os níveis de AMPc. O DMSO foi usado como veículo para diluição do labda-15-óico, e mostrou não alterar os níveis de AMPc. A forskolina foi usada como controle positivo, já que é conhecido seu efeito na formação de AMPc, causando um aumento dos níveis deste segundo mensageiro (Figura 9).

Figura 9: Efeito do labda-15-óico sobre os níveis de AMPc em anéis de aorta com endotélio. Os níveis de AMPc foram avaliados na ausência (basal) ou na presença de Fenilefrina (0,1 μmol/L) e após a adição de DMSO (0,3%), Forscolina (1 μmol/L) ou labda-15-óico (300 μmol/L). Os valores são expressos como a média ± EPM de 6-8 preparações independentes. * Diferença significativa em relação aos grupos basal, fenil, DMSO e labda-15-óico (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.1.7.2. Estudo da via NO-GMPc

4.1.7.2.1. Participação da enzima NOS na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico

Em anéis com endotélio, houve redução do relaxamento induzido pelo labda-15-óico e deslocamento da curva do labda-15-óico para a direita na presença de L-NAME (inibidor não seletivo da NOS). Em anéis sem endotélio, o inibidor utilizado não alterou a resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico (Figura 10; Tabela 7).

Figura 10: Relaxamento induzido pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) na presença de L-NAME. Realizou-se uma pré-contracção com fenilefrina e concentrações crescentes do labda-15-óico foram adicionadas ao banho de órgão. Os pontos representam a média $\pm$ EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração do labda-15-óico. Os tecidos foram incubados com L-NAME (100 μ mol/L) por 30 minutos.

Tabela 7: Efeito do L-NAME (100 μ mol/L) e pD₂ para o labda-15-óico em anéis de aorta com ou sem endotélio pré-contráídos com fenilefrina

Grupo	Com Endotélio		Sem Endotélio	
	E _{max}	pD ₂	E _{max}	pD ₂
Controle	101,4 $\pm$ 7,0 (11)	4,8 $\pm$ 0,18	94,6 $\pm$ 9,4 (9)	4,1 $\pm$ 0,02
L-NAME	50,8 $\pm$ 2,4 (10) ^a	4,2 $\pm$ 0,06 ^a	75,5 $\pm$ 4,5 (8)	4,2 $\pm$ 0,06

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações.

^aDiferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.1.7.2.2. Participação do NO na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico

Houve redução do relaxamento induzido pelo labda-15-óico na presença de hemoglobina (sequestrador de NO extracelular) (Figura 11). Observou-se deslocamento da curva do labda-15-óico para a direita na presença da hemoglobina e 7-nitroindazol (inibidor seletivo da nNOS) (Tabela 8).

Figura 11: Relaxamento induzido pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio na presença de hemoglobina e 7-nitroindazol. Realizou-se uma pré-contracção com fenilefrina e concentrações crescentes do labda-15-óico foram adicionadas ao banho de órgão. Os pontos representam a média $\pm$ EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração do composto. Os tecidos foram incubados com hemoglobina (10 μ mol/L) e 7-nitroindazol (100 μ mol/L) por 30 minutos.

Tabela 8: Efeito da hemoglobina (10 μ mol/L) e 7-nitroindazol (100 μ mol/L) sobre os valores de $E_{\max}$ (% relaxamento) e pD_2 para o labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio pré-contráídos com fenilefrina.

Grupo	Labda-15-óico	
	$E_{\max}$	pD_2
Controle	$101,4 \pm 7,0$ (11)	$4,8 \pm 0,18$
Hemoglobina	$73,2 \pm 4,0^a$ (10)	$4,2 \pm 0,05^a$
7-nitroindazol	$93,8 \pm 5,9$ (8)	$4,0 \pm 0,08^a$

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações.
^aDiferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.1.7.2.3. Avaliação do efeito do labda-15-óico sobre os níveis de nitrato em aorta de rato

Os resultados mostram que em anéis de aorta estimulados com o labda-15-óico há um aumento dos níveis de nitrato quando comparados aos valores basais. O DMSO foi usado como veículo, e mostrou não alterar os níveis de nitrato. O L-NAME inibiu o aumento dos níveis de nitrato induzido pelo labda-15-óico (Figura 12).

Figura 12: Efeito do labda-15-óico sobre os níveis de nitrato em anéis de aorta com endotélio. Os níveis de nitrato foram avaliados em anéis de aorta na ausência (Basal) ou após pré-contracção com fenilefrina (0,1 µmol/L) seguido da adição de DMSO (0,3%) ou labda-15-óico (300 µmol/L). Em outro grupo, os anéis de aorta foram incubados com L-NAME (100 µmol/L) e estimulados com Labda-15-óico (300 µmol/L). Os valores são expressos como a média ± EPM de 6 preparações independentes. *Diferença significativa em relação aos grupos basal, DMSO e L-NAME + Labda-15-óico (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.1.7.2.4. Avaliação da concentração citosólica de NO ($[NO]_c$) em células endoteliais

O efeito do labda-15-óico (300 µmol/L) sobre a formação citosólica de NO foi avaliado em células endoteliais de aorta de rato. Amostras brancas (não-carregadas com DAF-2DA) de células endoteliais de artérias aorta com a presença ou não de labda-15-óico emitiram uma fluorescência basal de baixa intensidade. A adição da sonda fluorescente em amostras de células endoteliais de todos os grupos aumentou a intensidade de fluorescência emitida em relação às amostras brancas. Os resultados mostram que nas células endoteliais estimuladas com o labda-15-óico há um aumento dos níveis de $[NO]_c$ quando comparados a fluorescência emitida por amostras marcadas com DAF-2DA de células endoteliais não estimuladas (basal). O DMSO foi usado como veículo, e mostrou não alterar a fluorescência quando comparado ao basal. O L-NAME reduziu o aumento da fluorescência com e sem o estímulo com labda-15-óico (Figura 13).

Figura 13: Efeito do labda-15-óico (300 µmol/L) sobre a fluorescência emitida por amostras de células endoteliais de artérias aorta marcadas com DAF-2DA. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M ($n = 5$) da intensidade de fluorescência mediana emitida por amostras de células endoteliais marcadas com DAF-2DA na ausência (basal) e após a adição de DMSO (0,3%), labda-15-óico (300 µmol/L), L-NAME (100 µmol/L) ou L-NAME+labda-15-óico. *Diferença significativa em relação aos demais grupos; # diferença significativa em relação aos grupos basal, DMSO e labda-15-óico (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.1.7.2.5. Participação da enzima guanilil cilcase, da PKG e da enzima Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático sobre a resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico

O efeito vasodilatador do labda-15-óico foi avaliado em artérias aorta com endotélio, pré-contraídas com fenilefrina, após incubação por 30 minutos com ODQ (inibidor seletivo da guanilil ciclase), Rp-8-Br-Pet (inibidor da PKG) ou tapsigargina (inibidor da SERCA) (Figura 14). Houve redução do relaxamento induzido pelo labda-15-óico na presença de ODQ e Rp-8-Br-Pet (Tabela 9). Observou-se deslocamento da curva do labda-15-óico para a direita na presença de ODQ, Rp-8-Br-Pet e tapsigargina (Tabela 9).

Figura 14: Relaxamento induzido pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio na presença de ODQ, Rp-8-Br-Pet e taspigargina. Realizou-se uma pré-contracção com fenilefrina e concentrações crescentes do labda-15-óico foram adicionadas ao banho de órgão. Os pontos representam a média $\pm$ EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração do composto. Os tecidos foram incubados com ODQ (1 μ mol/L), Rp-8-Br-Pet (3 μ mol/L) ou taspigargina (1 μ mol/L) por 30 minutos.

Tabela 9: Efeito da do ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$), Rp-8-Br-Pet (3 $\mu\text{mol/L}$) e tapsigargina (1 $\mu\text{mol/L}$) sobre os valores de E_{max} (% relaxamento) e pD_2 para o labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio pré-contraídos com fenilefrina.

Grupo	Labda-15-óico	
	E_{max}	pD_2
Controle	$101,4 \pm 7,0$ (11)	$4,8 \pm 0,18$
ODQ	$73,7 \pm 6,1^a$ (9)	$4,0 \pm 0,08^a$
Rp-8-Br-Pet	$74,0 \pm 4,5^a$ (6)	$4,1 \pm 0,09^a$
Tapsigargina	$107,9 \pm 2,5$ (8)	$3,9 \pm 0,14^a$

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações. ^aDiferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.1.7.2.6. Avaliação do efeito do labda-15-óico sobre os níveis de GMPc em aorta de rato

O efeito do labda-15-óico (300 $\mu\text{mol/L}$) sobre a formação de GMPc foi avaliado em artérias aorta com endotélio, pré-contraídas com fenilefrina. Os resultados mostram que em anéis de aorta estimulados com o labda-15-óico houve aumento dos níveis de GMPc quando comparados ao grupo controle (basal) (Figura 15). A fenilefrina foi usada para mostrar que seu estímulo contrátil não altera os níveis de GMPc. O DMSO foi usado como veículo para diluição do labda-15-óico, e mostrou não alterar os níveis de GMPc. O nitroprussiato de sódio foi usado como controle positivo, já que é conhecido seu efeito na formação de GMPc, causando um aumento dos níveis deste segundo mensageiro (Figura 15).

Figura 15: Efeito do labda-15-óico sobre os níveis de GMPc em anéis de aorta com endotélio. Os níveis de GMPc foram avaliados na ausência (Basal) ou na presença de Fenilefrina (0,1 µmol/L) e após a adição de DMSO (0,3%), nitroprussiato de sódio (0,03 µmol/L) e labda-15-óico (300 µmol/L). Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM de 5-7 preparações independentes. * Diferença significativa em relação aos grupos basal, fenil e DMSO. #Diferença significativa em relação ao grupo Nitroprussiato de sódio (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.1.7.3. Avaliação da participação dos canais para K^+ na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio.

O efeito vasodilatador do labda-15-óico foi avaliado em artérias aorta, com ou sem endotélio, pré-contraídas com fenilefrina, após incubação por 30 minutos com tetraetilamônio (TEA, inibidor não seletivo dos canais para K^+) (Figura 16; Tabela 10). Em anéis com endotélio, houve deslocamento da curva do labda-15-óico para a direita na presença do inibidor. Em anéis sem endotélio, não houve alteração na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico (Figura 16; Tabela 10).

Figura 16: Relaxamento induzido pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) na presença do TEA. Realizou-se uma pré-contracção com fenilefrina e concentrações crescentes do labda-15-óico foram adicionadas ao banho de órgão. Os pontos representam a média $\pm$ EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração do labda-15-óico. Os tecidos foram incubados TEA (1 mmol/L) por 30 minutos.

Tabela 10: Efeito do TEA (1 mmol/L) nos valores de $E_{\max}$ (% relaxamento) e pD_2 para o labda-15-óico em anéis de aorta com ou sem endotélio pré-contraindidos com fenilefrina.

Grupo	Com Endotélio		Sem Endotélio	
	$E_{\max}$	pD_2	$E_{\max}$	pD_2
Controle	$101,4 \pm 7,0$ (11)	$4,8 \pm 0,18$	$94,6 \pm 9,4$ (9)	$4,1 \pm 0,02$
TEA	$93,59 \pm 5,7$ (9)	$4,3 \pm 0,06^a$	$100,5 \pm 7,7$ (6)	$4,3 \pm 0,07$

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações.

^aDiferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.1.7.4. Avaliação da participação dos subtipos de canal para K^+ na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio.

Houve redução do relaxamento induzido pelo labda-15-óico na presença de 4-aminopiridina (inibidor dos canais para K^+ sensíveis a voltagem), apamina (inibidor dos canais para K^+ de baixa condutância ativados pelo Ca^{2+}) e caribdotoxina (inibidor dos canais para K^+ de alta condutância ativados pelo Ca^{2+}) (Figura 17; Tabela 11). Observou-se deslocamento da curva do labda-15-óico para a direita na presença de todos os inibidores (Tabela 11).

Figura 17: Relaxamento induzido pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio na presença de 4-aminopiridina (1 mmol/L), caribdotoxina (0,1 μ mol/L), apamina (1 μ mol/L) ou glibenclamida (3 μ mol/L). Realizou-se uma pré-contracção com fenilefrina e concentrações crescentes do labda-15-óico foram adicionadas ao banho de órgão. Os pontos representam a média $\pm$ EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração do composto. Os tecidos foram incubados com os inibidores por 30 minutos.

Tabela 11: Efeito da 4-aminopiridina (1 mmol/L), caribdotoxina (0,1 μ mol/L), apamina (1 μ mol/L) ou glibenclamida (3 μ mol/L) nos valores de $E_{\max}$ (% relaxamento) e pD_2 para o labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio pré-contráídos com fenilefrina.

Grupo	Labda-15-óico	
	$E_{\max}$	pD_2
Controle	101,4 $\pm$ 7,0 (11)	4,8 $\pm$ 0,18
4-aminopiridina	62,8 $\pm$ 6,7 ^a (8)	4,3 $\pm$ 0,11 ^a
Caribdotoxina	89,2 $\pm$ 9,0 (8)	4,3 $\pm$ 0,08 ^a
Apamina	76,8 $\pm$ 3,0 ^a (7)	4,3 $\pm$ 0,07 ^a
Glibenclamida	77,7 $\pm$ 5,6 ^a (8)	4,3 $\pm$ 0,11 ^a

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações.
^aDiferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.1.7.5. Avaliação da participação da ciclooxygenase na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico

O efeito vasodilatador do labda-15-óico foi avaliado em artérias aorta, com ou sem endotélio, pré-contraídas com fenilefrina, após incubação por 30 minutos com indometacina (inibidor não seletivo das ciclooxygenases) (Figura 18; Tabela 12). O inibidor utilizado não alterou a resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico (Figura 18; Tabela 12).

Figura 18: Relaxamento induzido pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) na presença de indometacina. Realizou-se uma pré-contracção com fenilefrina e concentrações crescentes do labda-15-óico foram adicionadas ao banho de órgão. Os pontos representam a média $\pm$ EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração do labdano. Os tecidos foram incubados com indometacina (10 μ mol/L) por 30 minutos.

Tabela 12: Efeito da indometacina (10 μ mol/L) nos valores de $E_{\max}$ (% relaxamento) e pD_2 para o labda-15-óico em anéis de aorta com ou sem endotélio pré-contraídos com fenilefrina.

Grupo	Com Endotélio		Sem Endotélio	
	$E_{\max}$	pD_2	$E_{\max}$	pD_2
Controle	101,4 $\pm$ 7,0 (11)	4,8 $\pm$ 0,18	94,6 $\pm$ 9,4 (9)	4,1 $\pm$ 0,02
Indometacina	91,8 $\pm$ 4,4 (10)	4,6 $\pm$ 0,14	100,4 $\pm$ 9,4 (7)	4,3 $\pm$ 0,08

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações.

4.1.7.6. Avaliação da participação da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico.

O efeito vasodilatador do labda-15-óico foi avaliado em artérias aorta com endotélio, pré-contraídas com fenilefrina, após incubação por 30 minutos com os inibidores da PI3K, wortmanin ou LY294002. Os resultados mostram que esses inibidores não alteraram o perfil do relaxamento induzido pelo labda-15-óico (Figura 19; Tabela 13).

Figura 19: Relaxamento induzido pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio na presença de wortmanin ou LY294002. Realizou-se uma pré-contracção com fenilefrina e concentrações crescentes do labda-15-óico foram adicionadas ao banho de órgão. Os pontos representam a média $\pm$ EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração do composto. Os tecidos foram incubados com wortmanin (1 μ mol/L) ou LY294002 (1 μ mol/L) por 30 minutos.

Tabela 13: Efeito do wortmanin (1 μ mol/L) ou LY294002 (1 μ mol/L) nos valores de $E_{\max}$ (% relaxamento) e pD_2 para o labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio pré-contraídos com fenilefrina.

Grupo	Labda-15-óico	
	$E_{\max}$	pD_2
Controle	101,4 $\pm$ 7,0 (11)	4,8 $\pm$ 0,18
Wortmanin	111,0 $\pm$ 5,3 (6)	4,7 $\pm$ 0,17
LY294002	98,0 $\pm$ 5,3 (7)	4,9 $\pm$ 0,18

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações.

4.1.7.7. Avaliação da participação dos receptores β -adrenérgicos e dos receptores muscarínicos na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico

O efeito vasodilatador do labda-15-óico foi avaliado em artérias aorta com endotélio, pré-contraídas com fenilefrina, após incubação por 30 minutos com atropina (antagonista não seletivo de receptores muscarínicos) ou propranolol (antagonista não seletivo dos receptores β -adrenérgicos). Os resultados mostram que esses antagonistas não alteraram o perfil do relaxamento induzido pelo labda-15-óico (Figura 20; Tabela 14).

Figura 20: Relaxamento induzido pelo labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio na presença de atropina ou propranolol. Realizou-se uma pré-contracção com fenilefrina e concentrações crescentes do labda-15-óico foram adicionadas ao banho de órgão. Os pontos representam a média $\pm$ EPM do relaxamento em resposta a uma dada concentração do composto. Os tecidos foram incubados com atropina (1 μ mol/L) ou propranolol (3 μ mol/L) por 30 minutos.

Tabela 14: Efeito da atropina (1 μ mol/L) ou propranolol (3 μ mol/L) nos valores de $E_{\max}$ (% relaxamento) e pD_2 para o labda-15-óico em anéis de aorta com endotélio pré-contraídos com fenilefrina.

Grupo	Labda-15-óico	
	$E_{\max}$	pD_2
Controle	101,4 $\pm$ 7,0 (11)	4,8 $\pm$ 0,18
Atropina	90,7 $\pm$ 5,1 (9)	4,6 $\pm$ 0,18
Propranolol	95,3 $\pm$ 6,7 (9)	4,8 $\pm$ 0,18

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações.

4.2. Estudos *in vivo*

4.2.1. Efeito do labda-15-óico sobre a PAM de ratos normotensos

O veículo (DMSO 10% + salina) não alterou os valores de PAM. O labda-15-óico na concentração de 3 mg/kg reduziu os valores de PAM (Figura 21) levando a uma variação significativa em seus valores de Δ PAM máxima ($-45,2 \pm 9,0$ mmHg) (Tabela 15). As demais doses do labda-15-óico (0,3 e 1 mg/Kg) não apresentaram diferença significativa em relação aos valores basais, antes da administração da droga. Os valores de frequência cardíaca não foram alterados (dados não mostrados).

Figura 21: Traçado representativo do efeito do labda-15-óico (0,3-3 mg/kg) sobre a variação da PAM de ratos não anestesiados. A PAM foi registrada antes e após a administração de veículo (DMSO 10% + salina) e do labda-15-óico (0,3-3 mg/kg) em um grupo de 5 animais.

A administração do L-NAME (10 mg/kg) aumentou significativamente os valores de PAM ($91,4 \pm 3,3$ / $126,1 \pm 4,5$ mmHg) e foi capaz de reduzir o efeito hipotensor do labda-15-óico (3mg/kg) (Figura 22; Tabela 15). Os valores de frequência cardíaca não foram alterados (dados não mostrados).

Figura 22: Efeito do labda-15-óico (3 mg/kg) após a administração de L-NAME (10 mg/kg) sobre a variação da PAM máxima de ratos não anestesiados. A PAM foi registrada antes e após a administração de labda-15-óico (3 mg/kg) ou após a administração de L-NAME seguida do labda-15-óico (3 mg/kg). Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM de 5 animais. *Diferença significativa em relação ao grupo tratado previamente com Labda-15-óico 3mg/kg (Teste “t” de Student, $p < 0,05$).

Tabela15: Valores de PAM máxima atingidos antes e após administração de veículo (DMSO10% + salina), labda-15-óico (0,3 - 3 mg/Kg) ou L-NAME (10 mg/Kg) seguido da administração de labda-15-óico (3 mg/kg) e Δ PAM.

Composto	PAM (mmHg)		
	Antes	Após	Δ PAM
Veículo (DMSO + Salina)	92,9 $\pm$ 2,0 (5)	89,6 $\pm$ 3,1	-3,3 $\pm$ 1,4
Labda-15-óico 0,3 mg/Kg	91,1 $\pm$ 3,2 (5)	90,0 $\pm$ 3,7	-1,1 $\pm$ 1,6
Labda-15-óico 1 mg/Kg	96,3 $\pm$ 2,7 (5)	80,8 $\pm$ 12,0	-15,5 $\pm$ 11,0
Labda-15-óico 3 mg/Kg	91,7 $\pm$ 2,1 (5)	46,5 $\pm$ 8,5 ^a	-45,2 $\pm$ 9,0 ^b
L-NAME+Labda-15-óico 3 mg/Kg	126,1 $\pm$ 4,5 (5)	111,3 $\pm$ 5,9	-14,8 $\pm$ 6,8

Os valores são expressos como a média $\pm$ EPM da variação máxima da PAM e Δ PAM. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações. ^aDiferença significativa em relação aos valores basais de PAM antes da administração do composto (Teste “t” de Student, $p < 0,05$). ^bDiferença significativa em relação aos demais grupos (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

4.2.2. Efeito da forskolina sobre a PAM de ratos normotensos

O veículo (DMSO 10% + salina) não alterou os valores de pressão arterial média. A forskolina nas três doses administradas reduziu os valores de pressão arterial média (Figura 23) apresentando uma variação significativa quando comparado aos valores basais, antes da administração da droga (Tabela 16).

Figura 23: Traçado representativo do efeito da forskolina (0,1 – 1,0 mg/Kg) sobre a variação da pressão arterial média de ratos não anestesiados. A PAM foi registrada antes e após a administração de veículo (DMSO 10% + salina) ou forskolina (0,1 - 1 mg/Kg) para um grupo de 5 animais.

Tabela 16: Valores de PAM máximo atingido antes e após administração de Veículo (DMSO10% + Salina) ou Forscolina (0.1, 0.3 e 1 mg/Kg) e ΔPAM.

Composto	PAM (mmHg)		
	Antes	Após	ΔPAM
Veículo (DMSO + Salina)	93,0 ± 2,3 (5)	91,0 ± 3,8	-2,0 ± 2,8
Forscolina 0,1 mg/Kg	93,9 ± 1,0 (5)	70,0 ± 4,1 ^a	-23,9 ± 4,0 ^c
Forscolina 0,3 mg/Kg	91,6 ± 1,6 (5)	75,2 ± 5,7 ^a	-16,4 ± 4,1 ^c
Forscolina 1 mg/Kg	90,3 ± 2,1 (5)	46,4 ± 7,0 ^a	-43,9 ± 6,9 ^b

Os valores são expressos como a média ± EPM da variação máxima da PAM e ΔPAM.. Algarismos entre parênteses indicam o número de preparações. ^aDiferença significativa em relação aos valores basais de PAM antes da administração do composto (Teste “t” de Student, $p < 0,05$). ^bDiferença significativa em relação aos demais grupos, ^cdiferença significativa em relação ao veículo (ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

5. *DISCUSSÃO*

Em nosso trabalho, foi avaliado o efeito cardiovascular do diterpeno da classe dos labdanos, o ácido *ent*-3-acetóxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico, obtido a partir do óleo resina de *Copaifera langsdorffii*.

Foram realizadas duas abordagens metodológicas: *in vitro* para avaliar o efeito relaxante do labda-15-óico em anéis de aorta e por quais mecanismos o composto induz relaxamento e *in vivo*, para avaliar qual seu efeito sobre a pressão arterial média em ratos normotensos acordados.

Nos experimentos para determinação do tempo de incubação das artérias aorta com o labda-15-óico, observamos que esse composto exerceu efeito inibitório sobre a contração induzida pelo KCl (30 mmol/L) de maneira dependente da concentração. Não houve diferença significativa entre a inibição da contração observada no tempo de 30 e 60 minutos. Portanto, o período necessário para que o composto atinja o seu efeito inibitório máximo é de 30 minutos. Assim, os protocolos de reatividade vascular utilizados para o estudo do efeito do labda-15-óico sobre a contração vascular foram realizados após um período de incubação de 30 minutos com o labdano.

Ao avaliar o efeito inibitório do labda-15-óico sobre a contratilidade da aorta, observamos que a resposta inibitória da contração induzida pelo KCl foi revertida após 60 minutos em preparações de aorta com e sem endotélio. Este resultado mostrou que o efeito de inibição da contração mediado pelo labda-15-óico é reversível. É importante ressaltar que essa resposta de reversão sugere que a ação inibitória do diterpeno sobre a contração vascular não é resultado de uma ação tóxica do composto sobre os anéis de aorta. Tal efeito de reversibilidade também foi observado por Tirapelli et al.(2002) em seu estudo com o ácido caurenóico, um diterpeno da classe dos cauranos.

Com o intuito de avaliar se o labda-15-óico altera a reatividade vascular a agentes vasoconstritores, avaliamos as respostas contráteis para fenilefrina e serotonina na presença do labda-15-óico. A contração vascular induzida pela serotonina ocorre por meio da ativação dos receptores 5-HT_{2A}. Estes receptores estão acoplados a proteína G_{q/11} e estão ligados a ativação da fosfolipase C, formação de IP₃ e DAG (diacilglicerol), e aumento do influxo de Ca²⁺ (Hannon e Hoyer, 2008). A contração induzida por fenilefrina ocorre por ativação dos receptores α_1 adrenérgicos, ocasionando aumento do influxo de Ca²⁺ por canais operados por receptores (Hirata et al., 1998) e por canais sensíveis a voltagem (Wesselman et al.,1996; Lee et al., 2001a). O labda-15-óico reduziu a contração induzida pela fenilefrina e serotonina em anéis de artéria aorta torácica com e sem endotélio, sugerindo que o processo de inibição da contração é independente do endotélio.

Os resultados obtidos com o labda-15-óico corroboram estudos prévios, onde foi observado que diterpenos da classe dos cauranos (Tirapelli et al., 2004a; Hipólito et al., 2011), pimaranos (Tirapelli et al., 2004b; Hipólito et al., 2009) e labdanos (de Oliveira et al., 2006) inibiram a contração vascular induzida por agentes vasoativos e induziram vasorelaxamento de uma forma independente do endotélio.

Dois tipos de estimulantes são amplamente utilizados para causar a contração no músculo liso vascular por aumentar os níveis de Ca^{2+} citosólico: altas concentrações de K^+ que levam a despolarização da membrana e a ativação de receptores por agonistas contráteis como a fenilefrina (Karaki et al., 1997). Um aumento das concentrações de Ca^{2+} citosólico é o principal desencadeante da contração da musculatura lisa vascular devido a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina (Araujo e Bendhack, 2003). Este complexo sofre uma alteração conformacional e ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK), responsável pela fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC). Esta última quando fosforilada interage com os filamentos de actina com consequente contração do músculo (Walsh, 1994). A redução dos níveis de Ca^{2+} ativa uma segunda enzima, a fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP), que desfosforila a MLC, e ao retornar ao seu estado inativo faz o músculo liso vascular relaxar (Adelstein et al., 1982).

Vários diterpenos são descritos por induzir hipotensão através de um mecanismo vasorelaxante que envolve a mobilização de Ca^{2+} (Tirapelli et al., 2010), com redução dos níveis de Ca^{2+} citosólico. Diante disso, com o objetivo de avaliar se o composto inibe o influxo de cálcio extracelular, nós realizamos curvas de CaCl_2 utilizando o KCl e a fenilefrina como estímulos para a obtenção de tais curvas. Na presença do labda-15-óico houve redução da contração induzida pelo CaCl_2 , indicando que o labdano inibe a mobilização do Ca^{2+} do meio extracelular induzida por fenilefrina e KCl.

Como observamos que labda-15-óico interfere com a mobilização de Ca^{2+} extracelular para promover seus efeitos vasculares, avaliamos o efeito desse labdano sobre a mobilização de Ca^{2+} intracelular no músculo liso vascular. A fenilefrina induz a produção de IP_3 , o qual ativa receptores IP_3 (Eckert et al., 2000), por outro lado, a cafeína estimula receptores de rianodina (Leitjen e van Breemen, 1984). Ambos receptores medeiam a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para a contração do músculo liso vascular. No entanto, em nosso estudo, o labda-15-óico não alterou a mobilização de Ca^{2+} intracelular quando a contração foi induzida por fenilefrina ou por cafeína, sugerindo que este labdano não afeta a mobilização de Ca^{2+} intracelular mediada por receptores de rianodina ou IP_3 .

Como mencionado anteriormente, a contração induzida por fenilefrina ocorre principalmente devido ao aumento do influxo de Ca^{2+} através de canais operados por receptores (Hirata et al., 1998) e sensíveis a voltagem (Wesselman et al., 1996; Lee et al 2001a), já a contração induzida por K^+ no músculo liso é mediada por despolarização da membrana celular e aumento do influxo de Ca^{2+} através de canais sensíveis a voltagem (Godfraind e Kaba, 1969; Somlyo e Somlyo, 1994). Considerando que o KCl e a fenilefrina foram usados como estímulos para a obtenção das curvas de CaCl_2 , podemos sugerir que o labda-15-óico inibe o influxo de Ca^{2+} extracelular através de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem e operados por receptor. Tais resultados corroboram os obtidos com outros diterpenos que causavam relaxamento em aorta de ratos devido ao bloqueio de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem e operados por receptor (Tirapelli et al., 2004a; Tirapelli et al., 2004b; Guerrero et al., 2004; Hipólito et al., 2009; Hipólito et al., 2011).

Considerando, ainda, que o influxo de cálcio por canais do subtipo L é importante para a contração induzida por receptores α_1 adrenérgicos (Muller et al., 2003), e o composto inibiu a contração induzida pela fenilefrina, podemos sugerir que o labda-15-óico cause bloqueio dos canais para Ca^{2+} do subtipo L. Estes subtipos de canais são os principais canais para Ca^{2+} presentes nas células da musculatura lisa vascular (Orlov et al., 1996).

O labda-15-óico induziu relaxamento em artérias aorta com e sem endotélio pré-contraídas com fenilefrina ou KCl, sugerindo que o efeito vasodilatador desse composto sobre anéis de aorta é independente do endotélio. O efeito relaxante produzido pelo labda-15-óico corroboram com os experimentos de contração com CaCl_2 , uma vez que o composto relaxa anéis pré-contraídos com fenilefrina ou KCl, cuja contração é mediada principalmente pelo influxo de Ca^{2+} . Em anéis com endotélio pré-contraídos com fenilefrina, o labda-15-óico promoveu relaxamento vascular em concentrações menores do que as utilizadas nos anéis sem endotélio. A partir desta observação, podemos concluir que endotélio vascular potencializa a ação vasodilatadora do labda-15-óico. Estudos mostram que fatores relaxantes derivados do endotélio vascular, como o NO, podem modular o efeito vasoconstritor de agonistas α_1 -adrenérgico (Godfraind et al., 1985). Isso poderia explicar o deslocamento da curva para a esquerda observada em anéis com endotélio pré-contraídos com fenilefrina. Tal observação não foi vista nos anéis pré-contraídos com KCl, uma vez que seu mecanismo de ação ocorre por despolarização da membrana e aumento do influxo de Ca^{2+} nas células do músculo liso vascular.

A estrutura química do labda-15-óico apresenta vários pontos comuns à da forskolina, como a presença de dois anéis condensados em seu esqueleto químico, além da presença de grupos hidroxila. Diante disso, nós avaliamos e comparamos as curvas concentração efeito do

labda-15-óico e da forskolina. Observamos que o perfil de relaxamento dos compostos é semelhante, uma vez que ambos promoveram relaxamento em concentrações menores nos anéis com endotélio, quando pré-contraídas com fenilefrina. Fatores endoteliais podem potencializar o relaxamento induzido pelo labdano forskolina (Neto et al., 2011) e de acordo com os dados obtidos isso também ocorre com o labda-15-óico, já que foi observado um deslocamento da curva para a esquerda em anéis de aorta com endotélio. Além disso, ambas as drogas são capazes de causar 100% de relaxamento nos anéis pré-contraídos com fenilefrina ou KCl, quando comparamos seus valores de $E_{\max}$. No entanto, os valores de pD_2 para a forskolina são maiores nos anéis com e sem endotélio quando comparados aos do labda-15-óico, indicando que a forskolina é mais potente que o labda-15-óico.

A forskolina é o principal composto ativo isolado da planta de origem indiana *Coleus forskohlii*. Neto et al. (2011) mostraram que a forskolina pode ativar a produção de NO nas células endoteliais, levando a formação de GMPc e relaxamento vascular. No entanto, o principal mecanismo de ação da forskolina é promover aumento de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) através da ativação direta da enzima adenilil ciclase (Metzger e Lindner, 1981). Assim, na vasculatura, a forskolina ativa a adenilil ciclase, produzindo um aumento de AMPc, que por sua vez irá ativar a PKA e produzir relaxamento (Lincoln e Fisher-Simpson, 1984). Além disso, o relaxamento induzido pela forskolina também envolve hiperpolarização do músculo liso e extrusão de Ca^{2+} através da membrana plasmática (Den Hertog et al., 1984). Por esta razão, a forskolina é normalmente usada para elevar os níveis de AMPc em estudos experimentais de fisiologia e farmacologia (Insel e Ostrom, 2003).

Com base no principal mecanismo de ação da forskolina e na sua semelhança estrutural com o labda-15-óico, nós avaliamos a participação da enzima adenilil ciclase e da PKA na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico através do uso de dois inibidores farmacológicos, o SQ22,536, inibidor da adenilil ciclase, e o H89, inibidor da PKA. Nossos resultados mostram que a adenilil ciclase e a PKA não participam da resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico. Além disso, o labda-15-óico não alterou os níveis de AMPc em tecido aórtico. Tal observação mostra que o labda-15-óico exerce seus efeitos vasculares de uma maneira diferente do labdano forskolina. Estudos prévios mostram que pequenas alterações na estrutura química dos diterpenos modificam suas respostas cardiovasculares (Tirapelli et al., 2005), o que seria uma possível explicação para a diferença entre a ação do labda-15-óico e o da forskolina.

Considerando que o labda-15-óico não atua através da formação de AMPc e consequente ativação da PKA, nosso próximo passo foi avaliar qual era o mecanismo de ação

pelo qual o labda-15-óico causava seu efeito vasodilatador. O NO de origem endotelial, sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, é um vasodilatador que desempenha importante função no controle do tônus vascular (Furchgott e Zawadzki, 1980; Moncada et al., 1989). Schini e Vanhoutte (1991) mostraram que a L-arginina provoca relaxamento de maneira dependente e independente do endotélio em aorta de ratos, demonstrando que o músculo liso vascular também possui mecanismos bioquímicos para converter a L-arginina em NO. Por esse motivo e considerando que diversos estudos mostram que as ações cardiovasculares de alguns diterpenos é mediada pela via do NO (De Oliveira et al., 2006; Silva et al. 2005), nós avaliamos a participação do NO endotelial e do músculo liso vascular no relaxamento induzido pelo labda-15-óico. O L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, provocou um deslocamento da curva de relaxamento do labda-15-óico para a direita e reduziu o relaxamento máximo induzido pelo labdano em anéis de aorta com endotélio. Uma vez que o efeito do L-NAME foi observado somente em anéis com endotélio, concluímos que o NO atuante no processo de relaxamento causado pelo labda-15-óico é de origem endotelial.

O endotélio desempenha importante efeito regulador do tônus vascular e das respostas contráteis do músculo liso vascular, funcionando como sensor das alterações hemodinâmicas e sinais humorais pela liberação de fatores relaxantes e contráteis em condições basais e em resposta a estímulos por agentes vasoativos ou alterações no fluxo sanguíneo (Furchgott, 1984; Gryglewski et al., 1988). O endotélio é a principal fonte de NO, o qual se difunde rapidamente para as células da musculatura lisa adjacente (Mistry e Garland, 1998). Uma vez que o endotélio vascular participa potencializando a resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico e há participação da NOS, nós avaliamos a participação do NO nesta resposta vasodilatadora através do uso de diversas ferramentas farmacológicas.

Existem três isoformas da sintase do NO: a iNOS (ou NOS-2) que é uma isoforma induzível da enzima e duas isoformas constitutivas, a NOS endotelial (eNOS ou NOS-3) e a NOS neuronal (nNOS ou NOS-1). Estas três isoformas receberam seus respectivos nomes de acordo com o tecido em que foram primeiramente descritas (Bonilla, 2012). Em nosso estudo, o 7-nitroindazol, inibidor seletivo da nNOS, promoveu deslocamento da curva de relaxamento do labda-15-óico para a direita evidenciando a participação da nNOS nessa resposta vasorelaxante. A hemoglobina, um sequestrador de NO extracelular (Martin et al., 1985), atua impedindo que o NO se difunda para as células da musculatura lisa. Para confirmar a participação do NO na resposta relaxante produzida pelo labdano, nós incubamos as preparações de artéria aorta com a hemoglobina e observamos uma redução do relaxamento

e um deslocamento da curva do labda-15-óico para a direita evidenciando a participação do NO na resposta de relaxamento provocada pelo labdano.

Diante dos resultados obtidos evidenciando a participação do NO na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico, o nosso próximo passo foi quantificar os níveis teciduais de nitrato em anéis de aorta com endotélio. Nós observamos que labda-15-óico aumentou os níveis de nitrato. Além disso, as células endoteliais isoladas de aorta de ratos ao serem expostas ao labda-15-óico e posterior análise citofluorimétrica apresentaram maior concentração de NO citoplasmático. Estes resultados mostram que o labda-15-óico induz aumento da geração de NO endotelial.

O NO produzido no endotélio difunde-se para as células do músculo liso vascular onde atua na enzima guanilil ciclase solúvel (GCs), seu principal alvo nesse tecido (Murad, 1994). Esta enzima, uma vez estimulada, promove a conversão do nucleotídeo GTP em GMPc (Ignarro et al., 1987). O GMPc promove relaxamento ao ativar uma cascata de reações intracelulares, como a ativação da PKG, que levará a vários eventos que induzirão ao relaxamento, como por exemplo, a redução da concentração citoplasmática de íons Ca^{2+} (Macdaniel et al., 1992), abertura dos canais para K^+ , levando à hiperpolarização da membrana e inibição de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (Miyoshi et al., 1994) e a desfosforilação da cadeia leve de miosina (Murad, 1986). Assim, uma vez que o NO endotelial participa da resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico, nós avaliamos a participação da enzima guanilil ciclase nessa resposta. O ODQ, um inibidor seletivo da enzima guanilil ciclase (Garthwaite et al., 1995), reduziu o relaxamento e provocou um deslocamento da curva do labda-15-óico para a direita, evidenciando a participação da guanilil ciclase nessa resposta.

Considerando que há participação da enzima guanilil ciclase, que converte o GTP em GMPc, para promover o relaxamento vascular, nosso próximo passo foi confirmar esta resposta através das dosagens dos níveis de GMPc em anéis de aorta com endotélio. Os níveis de GMPc mostraram-se aumentados no tecido aórtico estimulado com o labdano, confirmando a participação deste nucleotídeo cíclico na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico. Este resultado corrobora os dados obtidos por Neto et al. (2011), onde foi observado que o labdano forscolina causa um aumento dos níveis de GMPc em anéis de aorta com endotélio.

Conforme citado anteriormente, a ativação da PKG levará a vários eventos intracelulares que induzirão ao relaxamento vascular. Logo, avaliamos a participação da PKG na reposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico e observamos que o Rp-8-Br-Pet, um

inibidor da PKG, promoveu redução do efeito vasodilatador do labdano, evidenciando a participação desta quinase na resposta de relaxamento induzida pelo labdano.

A fosforilação da enzima Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), juntamente com a hidrólise do ATP, resulta na captação de íons Ca^{2+} para o lúmen do retículo sarcoplasmático (Lompré et al., 1999), resultando na diminuição de Ca^{2+} citoplasmático e promovendo o relaxamento. Como uma das ações intracelulares da PKG é a de promover captação de Ca^{2+} citoplasmático para o retículo, e tal processo acontece via ativação da SERCA, nós avaliamos a participação desse processo na resposta de relaxamento ao labda-15-óico. Para isso, utilizamos como ferramenta inibitória a tapsigargina, um inibidor da SERCA (Lompré et al., 1999), e observamos um deslocamento da curva do labda-15-óico para a direita, sugerindo sua participação na resposta relaxante do labda-15-óico. Portanto, os resultados obtidos até o momento atuam reforçando as evidências experimentais do envolvimento da via NO/GMPc/PKG na resposta vasorelaxante do labdano.

O NO pode modular a ação dos canais para potássio através da PKG (Archer et al., 1994) ou por ação direta sobre estes canais (Mistry e Garland, 1998). A abertura de canais para K^+ na membrana celular do músculo liso vascular aumenta a saída de K^+ causando hiperpolarização da membrana levando à vasodilatação (Nelson e Quayle, 1995). Por essa razão, investigamos o envolvimento de canais de K^+ no efeito vasorelaxante do labda-15-óico. O tetraetilamônio, um bloqueador não seletivo de canais para K^+ , promoveu deslocamento da curva de relaxamento do labda-15-óico para a direita em anéis com endotélio, mostrando o envolvimento de canais para K^+ nessa resposta.

Células do músculo liso vascular expressam diferentes tipos de canais para K^+ (Kuriyama et al., 1995). Com o objetivo de avaliar o subtipo de canal para K^+ envolvido na vasodilatação induzida pelo labda-15-óico, vários inibidores seletivos foram utilizados. Nossos resultados mostram que há envolvimento dos quatro tipos de canais estudados, sendo os canais para K^+ sensíveis a voltagem e ao ATP e dos canais para K^+ de alta e baixa condutância ativados pelo Ca^{2+} . Duarte et al. (1992) observaram a participação de canais para K^+ na resposta de relaxamento induzida pelo diterpeno jatrofona e Tirapelli et al. (2004a) obtiveram a mesma resposta com o ácido caurenóico.

Outra importante via para a formação de NO é a via PI3K/AKT, a qual medeia a ativação da eNOS via fosforilação do resíduo de serina 1177, para posterior síntese e liberação de NO nas células endoteliais. Tal mecanismo acontece independente de Ca^{2+} (Dimmeler et al., 1999). Com o objetivo de avaliar a participação da PI3K/AKT no processo de relaxamento induzido pelo labda-15-óico, nós utilizamos dois inibidores seletivos da PI3K,

o wortmanin e o LY29402. Tais inibidores não alteraram a resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico, descartando o envolvimento desta via.

Compostos vasodilatadores provenientes do metabolismo do ácido araquidônico, como a prostaciclina (PGI_2), induzem relaxamento vascular (Cherry et al., 1982; Forstermann et al., 1986). A PGI_2 é formada a partir da biotransformação do ácido araquidônico onde por ação da enzima ciclooxigenase formam-se endoperóxidos cíclicos, prostaglandina G_2 (PGG_2) e, subsequentemente, prostaglandina H_2 (PGH_2). Os endoperóxidos PGH_2 são convertidos em PGI_2 no endotélio por ação da enzima prostaciclina sintase (Vane et al. 1990). O efeito vasodilatador da PGI_2 ocorre pela ativação da adenilil ciclase e aumento nos níveis de AMPc (Vane et al. 1990). O AMPc ativa a PKA que atua fosforilando inúmeras proteínas essenciais que agem reduzindo tanto o influxo de Ca^{2+} transsarcolemal como a sensibilidade ao Ca^{2+} , e principalmente aumentando a captação do Ca^{2+} do meio intracelular para o interior do retículo sarcoplasmático, levando ao relaxamento do músculo liso vascular (Werstiuk e Lee, 2000). Para avaliar o envolvimento de prostanóides vasodilatadores no relaxamento induzido pelo labda-15-óico, foi usado a indometacina, um inibidor não seletivo das ciclooxigenases. Observamos que a indometacina não alterou a resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico em anéis de aorta com e sem endotélio, descartando a participação de prostanóides vasodilatadores na resposta relaxante induzida pelo labda-15-óico.

O ácido covalênico é um diterpeno que induz hipotensão por um mecanismo que envolve a ativação de receptores muscarínicos (Saleem et al., 2005). O receptor muscarínico responsável pelo relaxamento vascular é o receptor do subtipo M_3 , que está localizado no endotélio vascular (Eglen et al., 1996). Os receptores muscarínicos quando estimulados por um agonista induzem ao aumento de Ca^{2+} nas células endoteliais e levam a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina, ativação da NOS e produção de NO. Em nosso estudo, a atropina, um antagonista dos receptores muscarínicos (Sawayer, 1999), não alterou a resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico, descartando a participação dos receptores M_3 nessa resposta.

Os receptores β -adrenérgicos, acoplados à proteína Gs, medeiam as respostas de relaxamento em tecidos vasculares a partir da ativação da via de sinalização AMPc/PKA (Dixon et al., 1986), com diminuição dos níveis citoplasmático de Ca^{2+} , levando a vasodilatação (Werstiuk e Lee, 2000). O propranolol foi uma das primeiras drogas desenvolvidas que antagonizam o receptor β -adrenérgico (Black et al., 1964). Com o objetivo de avaliar a participação dos receptores β -adrenérgicos na resposta de relaxamento ao labda-15-óico, nós incubamos as preparações de aorta com o propranolol. Os resultados mostram

que não há participação de receptores β -adrenérgicos na resposta de relaxamento induzida pelo composto em estudo.

Considerando que o labda-15-óico exerce efeitos vasorelaxantes *in vitro*, nós avaliamos como seriam seus efeitos *in vivo* sobre a pressão arterial. A principal constatação deste estudo realizado em ratos normotensos foi que o diterpeno labda-15-óico promoveu uma acentuada atividade hipotensora na dose máxima de 3 mg/Kg. Tal efeito se mostrou transitório. Em compensação, a forskolina promoveu uma queda da pressão arterial média nas 3 doses administradas (0,1-1 mg/kg), e seu efeito perdurou por mais tempo quando comparado ao labda-15-óico. Tal observação reforça a idéia de Tirapelli et al. (2005) de que pequenas alterações na estrutura química dos diterpenos modificam suas respostas cardiovasculares. A pré-administração de L-NAME, inibidor da NOS, aumentou significativamente os valores basais da PAM e reduziu a resposta hipotensora induzida pelo labda-15-óico na dose de 3mg/Kg, confirmando a participação do NO na resposta cardiovascular induzida pelo labda-15-óico. O efeito hipotensor de diterpenos foi previamente descrito. Nesse sentido, Silva et al. (2005) mostraram que o diterpeno trans-dehidrocrotonin, nas doses 5-15mg/kg, causava hipotensão em ratos; de Oliveira et al. (2006) mostraram que o labdano-302, nas doses 5-30 mg/kg, causava hipotensão em ratos e observaram que tal efeito foi significativamente inibido pelo L-NAME. O labda-15-óico exerceu seu efeito hipotensor em uma dose menor que as observadas com os diterpenos supracitados, podendo ser um composto promissor no tratamento da hipertensão arterial.

Assim, nossos resultados estão de acordo com diversos estudos que mostram que diterpenos atuam em diferentes sítios de ação para promover seus efeitos cardiovasculares (Melis, 1997; Muller et al., 2003; De Oliveira et al., 2006; Lahlou et al., 2007). É interessante notar que, apesar de pertencerem à mesma classe de diterpenos e causarem efeito vasorelaxante, os labdanos forskolina e labda-15-óico podem atuar por diferentes mecanismos de ação vascular para promoverem o relaxamento.

Em síntese, o presente estudo mostrou que o labda-15-óico causa hipotensão *in vivo* e efeito vasorelaxante *in vitro*, onde atua por meio de diferentes vias de sinalização celular para causar o relaxamento vascular e, de forma geral, o endotélio potencializa essa resposta. O músculo liso vascular é o principal sítio de ação onde o labda-15-óico bloqueia canais para Ca^{2+} sensíveis a voltagem e operados por receptores, levando à redução do influxo de Ca^{2+} extracelular. No endotélio, o labda-15-óico ativa a via de sinalização do NO-GMPc com conseqüente abertura de canais para K^+ sensíveis a voltagem e ao ATP e dos canais para K^+ de alta e baixa condutância ativados pelo Ca^{2+} presentes no músculo liso vascular.

REFERÊNCIAS

Aceret TL, Brown L, Miller J, Coll JC, Sammarco PW. Cardiac and vascular responses of isolated rat tissues treated with diterpenes from *Sinularia flexibilis* (coelenterata: octocorallia). *Toxicon*. 1996 Oct;34(10):1165-71.

Adelstein RS, Sellers JR, Conti MA, Pato MD, Lanerolle P. Regulation of smooth muscle contractile proteins by calmodulin and cyclic AMP. *Fed. Proc.* 1982 Oct;41(12):2873-8.

Ahmad, M, Asmawi, MZ. Some Pharmacological Effects Of Aqueous Extract Of *Andrographis Paniculata* Nees. In: The International Conference On The Use Of Traditional Medicine And Other Natural Products In Health-Care (Abstract). Gan Ek, Ed. Malaysia: School Of Pharmaceutical Sciences, University Of Science Malaysia, 1993: 122.

Araujo CBL, Bendhack LM. Calcium and anococcygeus smooth muscle contraction. *Current Topics In Pharmacology*. 2003; 7(2):143-153.

Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 2;91(16):7583-7.

Baccelli C, Block S, Van Holle B, Schanck A, Chapon D, Tinant B, et al. Diterpenes isolated from *Croton zambesicus* inhibit KCl-induced contraction. *Planta Med.* 2005 Nov;71(11):1036-9.

Bhat SV, Dohadwalla AN, Bajwa BS, Dadkar NK, Dornauer H, de Souza NJ. The antihypertensive and positive inotropic diterpene forskolin: effects of structural modifications on its activity. *J Med Chem.* 1983 Apr;26(4):486-92.

Black JW, Crowther AF, Shanks RG, Smith LH, Dornhorst AC. A New Adrenergic Betareceptor Antagonist. *Lancet*. 1964 May 16;1(7342):1080-1.

Bonaventura D, Lunardi CN, Rodrigues GJ, Neto MA, Bendhack LM. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. *Nitric Oxide*. 2008 Jun;18(4):287-95.

Calixto JB, Sant'ana AE. Evidence for the mechanism of the inhibitory action of jatrophone in the isolated rat uterine muscle. *Gen Pharmacol.* 1990;21(1):117-22.

Cavalcanti BC, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Burbano RR, Silveira ER, Cunha KM, et al. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in *Copaiba* oil. *Food Chem Toxicol.* 2006 Mar;44(3):388-92.

Chan P, Tomlinson B, Chen YJ, Liu JC, Hsieh MH, Cheng JT. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *Br J Clin Pharmacol*. 2000 Sep;50(3):215-20.

Chan P, Xu DY, Liu JC, Chen YJ, Tomlinson B, Huang WP, et al. The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 1998; 63(19):1679-84.

Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Mar;79(6):2106-10.

Costa-Lotufo LV, Cunha GM, Farias PA, Viana GS, Cunha KM, Pessoa C, et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon*. 2002 Aug;40(8):1231-234.

David FL, Montezano ACI, Rebouças NA, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MHC, et al. Gender differences in vascular expression of endothelin and ETA/ETB receptors, but not in calcium handling mechanisms, in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2002 Sep;35(9):1061-8.

De Alencar Cunha KM, Paiva LA, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VS. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus in vitro. *Phytother Res*. 2003 Apr;17(4):320-4.

De Oliveira AP, Furtado FF, Da Silva MS, Tavares JF, Mafra RA, Araújo Da Cruz JS, et al. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). *Vasc Pharmacol* 2006 May;44(5):338-44.

De Souza NJ, Dohadwalla AN, Reden J. Forskolin: a labdane diterpenoids with antihypertensive, positive inotropic, platelet aggregation inhibitory, and adenylate cyclase activating properties. *Med Res Rev*. 1983 Apr-Jun;3(2):201-19

Den Hertog A, Pielkenrood J, Van den Akker J. The effect of forskolin on smooth muscle cells of guinea-pig taenia caeci. *Eur J Pharmacol*. 1984 Oct 30;106(1):181-4.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999 Jun 10;399(6736):601-5.

Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, et al. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*. 1986 May 1-7;321(6065):75-9.

Duarte DF, Sant'Ana AE, Calixto JB. Analysis of the vasorelaxant action of jatrophone in the isolated aorta of the rat: influence of potassium channel blockers. *Eur J Pharmacol*. 1992 Apr 29;215(1):75-81.

Eckert RE, Karsten AJ, Utz J, Ziegler M. Regulation of renal artery smooth muscle tone by alpha1-adrenoceptors: role of voltage-gated calcium channels and intracellular calcium stores. *Urol Res*. 2000 Apr;28(2):122-7.

Eglen RM, Hegde SS, Watson N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol Rev*. 1996 Dec;48(4):531-65

El Bardai S, Morel N, Wibo M, Fabre N, Llabres G, Lyoussi B, et al. The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Planta Med*. 2003a Jan;69(1):75-7.

El Bardai S, Wibo M, Hamaide M-C, Lyoussi B, Quetin-Leclercq J, Morel N. Characterisation of marrubenol, a diterpene extracted from *Marrubium vulgare*, as an L-type calcium channel blocker. *Br J Pharmacol*. 2003b Dec;140(7):1211-6.

Forstermann U, Hertting G, Neufang B. The role of endothelial and non-endothelial prostaglandins in the relaxation of isolated blood vessels of the rabbit induced by acetylcholine and bradykinin. *Br J Pharmacol*. 1986 Mar;87(3):521-32.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27;288(5789):373-6..

Furchgott RF. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1984;24:175-97.

Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol*. 1995 Aug;48(2):184-8.

Godfraind T, Egleme C, Al Osachie I. Role of endothelium in the contractile response of rat aorta to alpha-adrenoceptor agonists. *Clin Sci (Lond)*. 1985;68 Suppl 10:65s-71s.

Godfraind T, Kaba A. Blockade or reversal of the contraction induced by calcium and adrenaline in depolarized arterial smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1969 Jul;36(3):549-60.

Gryglewski RJ, Botting RM, Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension*. 1988 Dec;12(6):530-48.

Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res*. 2008 Dec 16;195(1):198-213.

Hanson JR, De Oliveira BH. Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides. *Nat Prod Rep*. 1993 Jun;10(3):301-9.

Hipolito UV, Rodrigues GJ, Lunardi CN, Bonaventura D, Ambrosio SR, de Oliveira AM, et al. Mechanisms underlying the vasorelaxant action of the pimarane ent-8(14),15-pimaradien-3beta-ol in the isolated rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 2009 Aug 15;616(1-3):183-91.

Hirata S, Enoki T, Kitamura R, Vinh VH, Nakamura K, Mori K. Effects of isoflurane on receptor-operated Ca^{2+} channels in rat aortic smooth muscle. *Br J Anaesth*. 1998 Oct;81(4):578-83.

Hostettmann K, Wolfender JL. The search for biologically active secondary metabolites. *Pesticide Sci*. 1997; 51: 471-82.

Hsieh MH, Chan P, Sue YM, Liu JC, Liang TH, Huang TY, et al. Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with mild essential hypertension: a two-year, randomized, placebo-controlled study. *Clin Ther*. 2003 Nov;25(11):2797-808.

Insel PA, Ostrom RS. Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. *Cell Mol Neurobiol*. 2003 Jun;23(3):305-14.

Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev*. 1997 Jun;49(2):157-230.

Khandelwal Y, Rajeshwari K, Rajagopalan R, Swamy L, Dohadwalla AN, de Souza NJ, et al. Cardiovascular effects of new water-soluble derivatives of forskolin. *J Med Chem*. 1988 Oct;31(10):1872-9.

Lahlou S, de Barros Correia CA, Jr., Vasconcelos Dos Santos M, David JM, David JP, Duarte GP, et al. Mechanisms underlying the cardiovascular effects of a labdenic diterpene isolated from *Moldenhawera nutans* in normotensive rats. *Vascul Pharmacol*. 2007 Jan;46(1):60-6.

Lee CH, Poburko D, Sahota P, Sandhu J, Ruehlmann DO, van Breemen C. The mechanism of phenylephrine-mediated $[Ca^{2+}]_i$ oscillations underlying tonic contraction in the rabbit inferior vena cava. *J Physiol*. 2001 Aug 1;534(Pt 3):641-50.

Lee CN, Wong KL, Liu JC, Chen YJ, Cheng JT, Chan P. Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension. *Planta Med*. 2001 Dec;67(9):796-9.

Leijten PA, van Breemen C. The effects of caffeine on the noradrenaline-sensitive calcium store in rabbit aorta. *J Physiol*. 1984 Dec;357:327-39.

Lincoln TM, Fisher-Simpson V. A comparison of the effects of forskolin and nitroprusside on cyclic nucleotides and relaxation in the rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 1984 May 18;101(1-2):17-27.

Lindner E, Dohadwalla AN, Bhattacharya BK. Positive inotropic and blood pressure lowering activity of a diterpene derivative isolated from *Coleus forskohli*: Forskolin. *Arzneimittelforschung*. 1978;28(2):284-9.

Lompre AM. Sarcoplasmic reticulum in vascular cells in hypertension and during proliferation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999 Jul;26(7):553-7.

Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985 Mar;232(3):708-16.

McDaniel NL, Chen XL, Singer HA, Murphy RA, Rembold CM. Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing $[Ca^{2+}]_i$ and uncoupling stress from myosin phosphorylation. *Am J Physiol*. 1992 Aug;263(2 Pt 1):C461-7.

Melis MS, Sainati AR. Effect of calcium and verapamil on renal function of rats during treatment with stevioside. *J Ethnopharmacol*. 1991 Jul;33(3):257-62.

Melis MS. Effects of Steviol on renal function and mean arterial pressure in rats. *Phytomedicine*. 1997 Feb;3(4):349-52.

Metzger H, Lindner E. The positive inotropic-acting forskolin, a potent adenylate cyclase activator. *Arzneimittelforschung*. 1981;31(8):1248-50.

Mistry DK, Garland CJ. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 1998 Jul;124(6):1131-40

Miyoshi H, Nakaya Y, Moritoki H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K^{+} channel of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 1994 May 23;345(1):47-9.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol*. 1989 Jun 1;38(11):1709-15.

Montanari CA, Bolzani V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*. 2001; 24, 105-111.

Muller MJ, Baer HP. Relaxant effects of forskolin in smooth muscle. Role of cyclic AMP. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1983 Feb;322(1):78-82.

Muller S, Tirapelli CR, De Oliveira AM, Castro RMV, Merforta I. Studies of ent-kaurane diterpenes from *Oyedaea verbesinoides* for their inhibitory activity on vascular smooth muscle contraction. *Phytochemistry* 2003 Jun;63(4):391-6..

Murad F. The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Recent Prog Horm Res*. 1994;49:239-48.

Murad FJ. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *Clin. Invest*. 1986 Jul;78(1):1-5.

Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of K^{+} channels in arterial smooth muscle. *Am J. Physiol*. 1995 Apr;268(4 Pt 1):C799-822.

Neto MA, Lunardi CN, Rodrigues G J, Bendhack LM. Vasodilatation induced by forskolin involves cyclic GMP production. *J Biophysical Chem*. 2011 Aug; 02: 373-379.

Norton RS. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon*. 1991;29(9):1051-84.

Ohashi K, Bohgaki T, Matsubara T, Shibuya H. Chemical structures of two new migrated pimarane-type diterpenes, neoorthosiphols A and B, and suppressive effects on rat thoracic aorta of chemical constituents isolated from the leaves of *Orthosiphon aristatus* (Lamiaceae). *Chem Pharm Bull* . 2000 Mar; 48(3):433-5.

Orlov SN, Tremblay J, Hamet P. cAMP signaling inhibits dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ influx in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1996 Mar;27(3 Pt 2):774-80.

Paiva LA, de Alencar Cunha KM, Santos FA, Gramosa NV, Silveira ER, Rao VS. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytother Res*. 2002 Dec;16(8):737-9.

Paiva LA, Gurgel LA, De Sousa ET, Silveira ER, Silva RM, Santos FA, et al. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. *J Ethnopharmacol*. 2004 Jul;93(1):51-6.

Paiva LA, Rao VS, Gramosa NV, Silveira ER. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. *J Ethnopharmacol*. 1998 Aug;62(1):73-8.

Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 2001; 39:603-613.

Rodrigues GJ, Lunardi CN, Lima RG, Santos CX, Laurindo FR, da Silva RS, et al. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. *Nitric Oxide*. 2008 May;18(3):176-83.

Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Williams & Wilkins. 1996; 9th ed.

Saleem R, Ahmed M, Ahmed SI, Azeem M, Khan RA, Rasool N, et al. Hypotensive activity and toxicology of constituents from root bark of *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. *Phytother Res*. 2005 Oct;19(10):881-4.

Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol*. 2008 Nov 20;120(2):204-8.

Sawyer BD, Bymaster FP, Calligaro DO, Falcone J, Mitch CH, Ward JS, et al. Direct pharmacological comparison of the muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in the rabbit thoracic aorta. *Gen Pharmacol*. 1999 Apr;32(4):445-52.

Seamon KB, Padgett W, Daly JW. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Jun;78(6):3363-7.

Silva RM, Oliveira FA, Cunha KM, Maia JL, Maciel MA, Pinto AC, et al. Cardiovascular effects of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* in rats. *Vascul Pharmacol*. 2005 Jun;43(1):11-8.

Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*. 1994 Nov 17;372(6503):231-6.

Somova LI, Shode FO, Moodley K, Govender Y. Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopia aethiopica* and *Alepidea amatymbica*. *J Ethnopharmacol*. 2001 Oct;77(2-3):165-74.

Tirapelli CR, Ambrosio SR, Coutinho ST, de Oliveira DC, da Costa FB, de Oliveira AM. Pharmacological comparison of the vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid and pimaradienoic acid. *J Pharm Pharmacol*. 2005 Aug;57(8):997-1004.

Tirapelli CR, Ambrosio SR, da Costa FB, Coutinho ST, de Oliveira DC, de Oliveira AM. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 2004a May 25;492(2-3):233-41.

Tirapelli CR, Ambrosio SR, da Costa FB, de Oliveira AM. Diterpenes: a therapeutic promise for cardiovascular diseases. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*. 2008a Jan;3(1):1-8.

Tirapelli CR, Ambrosio SR, da Costa FB, de Oliveira AM. Evidence for the mechanisms underlying the effects of pimaradienoic acid isolated from the roots of *Viguiera arenaria* on rat aorta. *Pharmacology*. 2004b Jan;70(1):31-8.

Tirapelli CR, Ambrosio SR, Da Costa FB, De Oliveira AM. Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid contraction. *Fitoterapia*. 2002 Feb;73(1):56-62.

Tirapelli CR, Ambrosio SR, de Oliveira AM, Tostes RC. Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: a therapeutic promise for the treatment of hypertension. *Fitoterapia*. 2010 Oct;81(7):690-702.

Tirapelli CR, dos Anjos Neto Filho M, Bonaventura D, Melo MC, Ambrosio SR, de Oliveira AM, et al. Pimaradienoic acid inhibits vascular contraction and induces hypotension in normotensive rats. *J Pharm Pharmacol*. 2008b Apr;60(4):453-9.

Turner DM. Natural product source material use in the pharmaceutical industry: the Glaxo experience. *J Ethnopharmacol.* 1996 Apr;51(1-3):39-43

Valdir F. Veiga Junior e Angelo C. Pinto. O gênero *Copaifera* L. *Quim. Nova.* 2002. Vol. 25, No. 2, 273-286.

Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med.* 1990 Jul 5;323(1):27-36.

Velikova M, Bankova V, Tsvetkova I, Kujumgiev A, Marcucci MC. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia.* 2000 Dec;71(6):693-6.

Walsh MP. Calmodulin and the regulation of smooth muscle contraction. *Mol Cell Biochem.* 1994 Jun 15;135(1):21-41.

Werstiuk ES, Lee RM. Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. *Can J Physiol Pharmacol.* 2000 Jun;78(6):433-52.

Wesselman JP, VanBavel E, Pfaffendorf M, Spaan JA. Voltage-operated calcium channels are essential for the myogenic responsiveness of cannulated rat mesenteric small arteries. *J Vasc Res.* 1996 Jan-Feb;33(1):32-41.

Wong S, Mok W, Phaneuf S, Katz S, Salari H. Forskolin inhibits platelet-activating factor binding to platelet receptors independently of adenylyl cyclase activation. *Eur J Pharmacol.* 1993 Mar 15;245(1):55-61.

Zhang C, Kuroyangi M, Tan BK. Cardiovascular activity of 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide in the anaesthetised rat and isolated right atria. *Pharmacol Res.* 1998 Dec;38(6):413-7.

Zhang CY, Tan BK. Hypotensive activity of aqueous extract of *Andrographis paniculata* in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996 Aug;23(8):675-8.

ANEXO

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.1007.53.0) intitulado "Avaliação do Efeito Cardiovascular do Labdano Ácido *ent*-3-acetóxi-labda-8(17), 13-dieno-15-óico", de autoria de **Carlos Renato Tirapelli**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 02.09.2009.

Ribeirão Preto, 2 de setembro de 2009

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro