UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ARIADNE SANTANA E NEVES MONTEIRO

Efeito do diterpeno Manool sobre a função vascular
de ratos normotensos e hipertensos.

Ribeirão Preto
2016

ARIADNE SANTANA E NEVES MONTEIRO

Efeito do diterpeno Manool sobre a função vascular de ratos normotensos e hipertensos.

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

Área de Concentração: Morfologia e Cirurgia Experimental

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andrea Carla Celotto

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa Évora

Ribeirão Preto
2016

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.

Monteiro, Ariadne Santana e Neves

Efeito do diterpeno Manool sobre a função vascular de ratos normotensos e hipertensos, 2016.

67 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Morfologia e Cirurgia Experimental.

Orientadora: Celotto, Andrea Carla.

Co-orientador: Évora, Paulo Roberto Barbosa.

1. Diterpeno. 2. Manool. 3. Hipertensão arterial. 4. Reatividade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: MONTEIRO, Ariadne Santana e Neves

Título: Efeito do diterpeno Manool sobre a função vascular de ratos normotensos e hipertensos.

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

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof^a.Dr^a. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof^a.Dr^a. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Dedico esta conquista aos meus queridos pais Jamilson
e Maria José, minha irmã Isadora, e minhas avós Eldevir e Air.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Jamilson e Maria José, agradeço pelo amor incondicional, por acreditarem sempre que sou capaz de realizar meus sonhos, e por me ensinarem a importância do estudo. Tudo o que sou hoje e ainda pretendo ser, é (e será) fruto do amor constante que sempre me deram e ainda me dão. Saibam, meus queridos pais: essa vitória também foi de vocês! Jamais se esqueçam do quanto os amo, e que este sentimento é infinito!

A minha querida irmã, Isadora, que é fundamental na minha vida, importante em todos os sentidos, e sempre ao meu lado em todas as situações. Compartilhar momentos juntas torna tudo mais leve e engraçado. Não poderia esquecer do Bento, nossa fonte de boas risadas e alegrias!

Minhas avós, Eldevir e Air, agradeço por todo carinho, cuidado e zelo. Vocês merecem muito mais do que este agradecimento, merecem todo o meu amor.

Aos meus tios e tias, primos e primas, pela torcida, incentivo, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa Évora, por confiar em mim e permitir a realização deste grande sonho. Agradeço pelos ensinamentos (não apenas acadêmicos, mas também de vida), pela dedicação integral, pelo bom humor sempre infalível, pelos momentos de descontração, momentos culturais (assistindo trechos de filmes renomados, concertos clássicos e Bom Jovi), pelo carinho inesgotável, enfim, por ter sido muito mais do que um professor, um verdadeiro “pai”.

À Carla, uma pessoa maravilhosa, uma verdadeira heroína, que sempre nos momentos de desespero e dificuldade, estava ao meu lado para me orientar/salvar.

Agradeço por todos os seus ensinamentos, pela paciência em me ajudar, dedicação, pela confiança depositada em mim, pelo carinho e educação. Um grande exemplo de profissional e pessoa. Obrigada por ser LUZ em meio à escuridão! Sou eternamente grata, querida Carla!

À Agnes, outra pessoa maravilhosa que tive a honra de conhecer e conviver, me auxiliou desde o meu primeiro dia dentro do laboratório, mostrou como toda aquela “mágica” acontecia, me ensinou a manter a calma em meio ao caos, vibrando junto comigo em cada momento de alegria, perdendo horas do seu trabalho para ajudar no meu. Como o professor sempre diz: você sorri com os olhos!

Agradeço a Debinha, amiga de longa data, desde os tempos de faculdade, e novamente juntas em nosso trabalho conjunto de Mestrado. Foram ótimos e engraçados momentos compartilhados, assim como nossos momentos de dificuldade, que nos fizeram crescer e amadurecer muito. Formamos uma ótima dupla, Deb!

À Mari e Bru, grandes amigas que sempre estiveram ao meu lado mesmo com toda a distância, e nesse momento não seria diferente. Muito obrigada!

À todas as pessoas que tive a oportunidade de conhecer nesse período.

Felizmente, o Mestrado me possibilitou a convivência com diversos “mundos”, culturas, realidades e pensamentos. Como diz Antoine de Saint-Exupéry: “Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Às técnicas do laboratório de Bioquímica, pelo auxílio em vários momentos, sempre prestativas.

À todos os técnicos, técnicas e bioteristas do setor de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP.

À todos os funcionários e funcionárias do biotério, obrigada por toda a atenção, educação, e bom humor.

À todas as secretárias do Departamento de Cirurgia e Anatomia, especialmente à Jú, Camilinha e Larissa. Sempre me ajudando em todo o necessário, sempre educadas, carinhosas, e com um sorriso leve no rosto. Obrigada por toda a ajuda!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP – USP (FAEPA) pelo apoio financeiro.

Meu eterno agradecimento a todos!

“Que nada nos defina. Que nada nos sujeite.
Que a liberdade seja a nossa própria substância, já que viver é ser livre.”

Simone de Beauvoir

RESUMO

MONTEIRO, A. S. N. **Efeito do diterpeno Manool sobre a função vascular de ratos normotensos e hipertensos**. 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Introdução: A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. Nos últimos anos, estudos demonstraram o efeito cardiovascular de diversos metabólitos originados de várias espécies de plantas. O diterpeno é um exemplo, o qual age por meio de diversos mecanismos farmacológicos. Sabendo que o Manool pertence a esta classe de compostos, isso o torna uma substância com potencial uso no tratamento da HAS, motivo pelo qual se propôs o desenvolvimento deste trabalho. **Objetivos:** 1) Avaliar *in vivo* o possível efeito vasodilatador de diferentes doses do Manool e o efeito sobre os níveis plasmáticos de óxido nítrico (NO), em animais normotensos e hipertensos e; 2) Verificar *in vitro* os mecanismos endoteliais envolvidos na resposta de relaxamento, em anéis de aorta de ratos. **Material e métodos:** Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: hipertenso e normotenso. Os animais do grupo hipertenso foram submetidos ao procedimento cirúrgico 2R1C para indução de hipertensão, enquanto os animais do grupo normotenso foram sham-operados. A pressão arterial (PA) não-invasiva, foi mensurada utilizando-se um manguito, conectado a um sensor para registro de PA, colocado em torno da cauda do animal. Para identificar os efeitos *in vivo* do composto, três doses do composto foram aplicadas nos animais, a monitorização invasiva da PA foi realizada por meio do MP System 100 A. Para a medida do óxido nítrico (NO) plasmático, foi utilizada a técnica de quimiluminescência NO/ozônio (O₃). Com intuito de observar os mecanismos envolvidos no relaxamento induzido pelo composto, curvas concentração-resposta para o Manool, foram obtidas em anéis de aorta com e sem endotélio, na presença e ausência de L-NAME e ODQ. **Resultados:** Os resultados sobre a Δ PAS mostrou que o Manool, promoveu redução da PAS tanto em normotensos quanto hipertensos. Os resultados das curvas dose-resposta mostraram que o manool promoveu relaxamento

dependente do endotélio e este foi inibido na presença de L-NAME e ODQ. Não foi observado diferença na dosagem de NOx. **Conclusão:** Em resposta aos objetivos propostos para a presente investigação pode-se concluir que o Manool é uma droga hipotensora, possivelmente dependente em grande parte da função endotelial via NO/cGMP.

Palavras chave: Diterpeno, Manool, Hipertensão arterial, Reatividade.

ABSTRACT

MONTEIRO, A. S. N. **The effect of diterpene Manool on vascular function of normotensive and hypertensive rats.** 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Introduction: Systemic hypertension (SH) is a multifactorial clinical condition characterized by high and sustained levels of blood pressure. In recent years, studies have demonstrated the cardiovascular effect of various metabolites derived from many plant species. The diterpene is an example, which acts through different pharmacological mechanisms. The Manool belongs to this class of compounds, that makes a substance with potential use in the treatment of SH, which let us to propose the development of this work. **Objectives:** 1) To evaluate *in vivo* the possible vasodilator effect of different doses of Manool and the effect on the plasma levels of nitric oxide (NO) in normotensive and hypertensive animals; 2) Evaluate *in vitro* endothelial mechanisms involved in the relaxation response in rat aortic rings. **Material and methods:** The animals were randomly divided in two groups: normotensive and hypertensive. The animals of the hypertensive group underwent the surgical procedure 2K1C for hypertension induction, while the animals of the normotensive group were sham-operated. The blood pressure (BP) non-invasive, was measured using a cuff, connected to a sensor for registration BP, placed around the animal's tail. To identify the *in vivo* effects of the compound, three doses of the compound were applied in animals, invasive BP monitoring was performed using the System MP 100 A. For the measurement of NO plasma, we used the technique of chemiluminescence NO/ozone (O₃). In order to observe the mechanisms involved in the relaxation induced by compound concentration-response curves for Manool were obtained in the aorta rings with and without endothelium in the presence and absence of L-NAME and ODQ. **Results:** The results on variation of systolic blood pressure (Δ SBP) showed that Manool, decreases the SBP in both normotensive as hypertensive. The results of the dose-response curves showed that the Manool promoted endothelium dependent relaxation and this was inhibited in the presence of L-NAME and ODQ. There was no difference in NO_x dosage. **Conclusion:** In response to the proposed

objectives for the present investigation may conclude that the Manool is a hypotensive drug, possibly dependent in large part on endothelial function NO / cGMP pathway.

Keywords: Diterpene, Manool, Hypertension, Reactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do Manool.....	32
Figura 2: Via da desoxi-xilulose para a biossíntese de isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP)	33
Figura 3: Reação de produção do 2E,6E,10E-geranilgeranilpirofosfato (GGPP)	34
Figura 4: Ciclização do GGPP e formação do esqueleto dos labdanos e dos <i>ent</i> -labdanos	35
Figura 5: Fotos da artéria renal esquerda isolada (A) e com o clipe de prata (B)	39
Figura 6: Mensuração da pressão arterial (PA) não-invasiva em ratos.....	39
Figura 7: Cateteres localizados na artéria e veia femorais do rato, respectivamente....	41
Figura 8: Evolução temporal da pressão arterial sistólica não invasiva em animais normotensos e hipertensos	44
Figura 9: Evolução do peso corporal de animais normotensos e hipertensos	45
Figura 10: Imagem representativa da variação da PA máxima, diante da aplicação de doses de Manool e Veículo.....	47
Figura 11: Imagem representativa da comparação do NO plasmático após aplicação de doses de Manool e Veículo.....	48
Figura 12: Curva dose-resposta para Manool em anéis com e sem endotélio	49
Figura 13: Efeito relaxante máximo para o Manool.....	49
Figura 14: Curva dose-resposta de Manool na presença dos inibidores	50
Figura 15: Efeito relaxante máximo na presença dos inibidores	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Evolução da PAS não invasiva em animais normotensos e hipertensos.....	45
Tabela 2: Evolução temporal do peso corporal de animais normotensos e hipertensos	46
Tabela 3: Relação entre a dose (mg/Kg) de Manool e Veículo na variação da PA máxima	47
Tabela 4: Comparação do NO plasmático entre grupo Manool e Veículo	48
Tabela 5: Efeito máximo do Manool em anéis com e sem endotélio	50
Tabela 6: Efeito relaxante máximo na presença dos inibidores	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC: Antagonistas dos canais de cálcio

ARAIIs: Antagonistas de receptor de angiotensina II

AR: Ácido rosmarínico

BRA II: Bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina

BP: Blood Pressure

C: Celsius

Ca²⁺: Cálcio

CETEA: Comissão de Ética em Experimentação Animal

CE: Com endotélio

DCV: Doença cardiovascular

DMAPP: Dimetilalil difosfato

DMSO: Dimetilsulfóxido

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

FR: Fatores de risco

FPP: Farnesilpirofosfato

GCs: Gualinato ciclase solúvel

GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina

GTP: Guanosina trifosfato

GGPP: 2E,6E,10E-geranilgeranilpirofosfato

g: Grama

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

iECA: Inibidores da enzima conversora da angiotensina

IPP: Isopentenil difosfato

K⁺: Potássio

Kg: Quilograma

L-NAME: N^G-nitro-L-arginine methyl ester

MN: Manool

mg: Miligrama

n: Número de amostras

NOS: Enzima óxido nítrico sintase

NO: Óxido nítrico

NO₂: Dióxido de nitrogênio

NO²⁻: Nitrito

NO³⁻: Nitrato

NO_x: NO₂- + NO₃-

O₂: Oxigênio

O₂⁻: ânion superóxido

O₃: Ozônio

OMS: Organização Mundial da Saúde

ODQ: 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4, 3-a]quinoxalin-1-one

PA: Pressão arterial

PAS: Pressão arterial sistólica

Phe: Fenilefrina

PKG: Proteína Quinase G

ΔPAS: Variação da pressão arterial sistólica

ΔSBP: Variation of systolic blood pressure

SRAA: Sistema renina angiotensina aldosterona

SE: Sem endotélio

SH: Hypertension Systemic

USP: Universidade de São Paulo

VL: Veículo

1R1C: 1 rim - 1 clipe

2R1C: 2 rins -1 clipe

2R2C: 2 rins - 2 cliques

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
2. Revisão da literatura.....	24
2.1. Hipertensão arterial sistêmica.....	24
2.2. Drogas anti-hipertensivas.....	25
2.2.1. Diuréticos.....	25
2.2.2. Antagonista adrenérgico	26
2.2.3. Vasodilatadores diretos	26
2.2.4. Bloqueadores dos canais para Ca^{+2}	26
2.2.5. Inibidores direto da renina	27
2.2.6. Antagonistas do receptor de Ang II	27
2.2.7. Inibidores de ECA	28
2.3. Modelos experimentais de hipertensão	28
2.4. Produtos naturais	29
2.5. Manool	31
3. Objetivos	37
3.1. Objetivo geral	37
3.1. Objetivo geral	37
4. Materiais e Métodos	38
4.1. Drogas	38
4.2. Animais	38
4.3. Indução da hipertensão 2R1C	38
4.4. Mensuração da PA não-invasiva	39

4.5. Avaliação do efeito do composto Manool e veículo, sobre as pressões sistólica, diastólica e média em animais normotensos e hipertensos	40
4.6. Determinação indireta de NO plasmático pela dosagem de nitrito (NO^{2-}) e nitrato (NO^{3-}) (NO_x)	41
4.7. Estudo da reatividade vascular da aorta	42
4.8. Análise estatística	43
5. Resultados	44
5.1. Desenvolvimento do modelo experimental	44
5.1.1. PAS não invasiva	44
5.1.2. Peso corporal	45
5.2. Estudo sobre o efeito do Manool in vivo	46
5.2.1. Efeito da administração aguda de Manool e Veículo na variação da PA máxima	46
5.2.2. Análise do NO plasmático através da dosagem de nitrito e nitrato	47
5.3. Estudo do efeito do Manool sobre a reatividade vascular	48
5.3.1. Efeito do Manool em anéis de aorta torácicas com e sem endotélio.....	48
5.3.2. Efeito dos inibidores sobre o relaxamento induzido pelo Manool	50
6. Discussão	52
7. Conclusão	58
8. Referências	59

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial ^[1]. Frequentemente é associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais ^[21].

No Brasil são cerca de 17 milhões de portadores de HAS, 35% da população de 40 anos ou mais. E esse número é crescente; seu aparecimento está cada vez mais precoce e estima-se que cerca de 4% das crianças e adolescentes também sejam portadores ^[2].

O controle da circulação depende de diferentes sistemas controladores que garantem, a todo momento, ajustes apropriados da frequência e da contratilidade cardíacas, e do estado contrátil dos vasos de capacitância e de resistência ^[8]. A pressão arterial pode ser controlada essencialmente por dois tipos de mecanismos: regulação neural, que é feita primariamente pelo sistema nervoso autônomo (associado aos barorreceptores e quimiorreceptores) e a regulação humoral, que é feita por uma variedade de substâncias liberadas por distintos tipos celulares, como as células endoteliais e as células justaglomerulares ^[64,6].

Os barorreceptores aórticos e carotídeos, podem ser estimulados pelo aumento da pressão arterial, conseqüentemente, desencadeia de maneira reflexa uma inibição da descarga simpática, enquanto que uma queda produz o efeito contrário. Já os quimiorreceptores (localizados na aorta e carótida), respondem a estímulos químicos de pressão parcial de oxigênio, pressão parcial de dióxido de carbono e pH, sendo extremamente importantes em estados de anoxia e/ou hipóxia ^[8,63,64].

O controle humoral é feito por diversos tipos celulares. As células justaglomerulares presentes nos rins, compõem o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), a qual desempenha fundamental papel não só na regulação da pressão arterial, como também no equilíbrio eletrolítico ^[3,8,7,25,30,33,64].

As células endoteliais, possuem importante papel no controle do tônus cardiovascular, regulando as seguintes funções: vasomotricidade, permeabilidade vascular, metabolismo de substâncias endógenas e exógenas, e a atividade plaquetária

e leucocitária.

Em destaque, o óxido nítrico (NO) produzido pelas células endoteliais, desempenha um papel de grande relevância no controle cardiovascular, tanto no controle da resistência periférica vascular como na agregação plaquetária. O NO é um vasodilatador potente, e seu papel no controle da pressão arterial é de extremo valor. Além disso, por inibir a agregação plaquetária, impede a formação de trombos e, conseqüentemente, previne os processos de trombose e doenças atero-trombóticas [27,29,6,64,65].

O principal objetivo do tratamento da hipertensão arterial é a redução da morbidade e da mortalidade cardiovasculares^[9]. Assim, os anti-hipertensivos devem não só reduzir a pressão arterial, mas também os eventos cardiovasculares fatais e não-fatais, e, se possível, a taxa de mortalidade^[10].

As evidências de estudos com desfechos clinicamente relevantes, demonstram redução de morbidade e mortalidade em tratamentos com diuréticos, betabloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA), bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina (BRA II) e com antagonistas dos canais de cálcio (ACC), embora em sua maioria, utilizem associação de anti-hipertensivos^[1].

A preocupação da indústria farmacêutica, diante dos produtos quirais, intensificou-se após os graves efeitos causados por drogas como a talidomida. Haja visto que a maioria dos fármacos prescritos em doenças cardiovasculares, são formulados e comercializados sob a forma racêmica, embora, para alguns deles, já tenha sido demonstrado que os efeitos farmacológicos e/ou tóxicos estejam relacionados apenas a um dos enantiômeros^[13,66].

Diante disso, uma atenção especial quanto a quiralidade dos compostos terapêuticos, é muito importante do ponto de vista farmacológico, farmacocinético, toxicológico e nos órgãos fiscais de controle de qualidade de medicamentos^[66].

Dessa forma, sabendo do acúmulo de substâncias enantiomericamente puras, pelas plantas, e de estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional, a indústria farmacêutica passou a reativar o seu interesse por medicamentos de origem vegetal^[13].

A própria Organização Mundial da Saúde (OMS), reconhece o conhecimento tradicional sobre produtos da biodiversidade, como sendo um importante

instrumento, no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos para o combate de doenças que assolam as populações dos países em desenvolvimento ^[14].

A opção de conduzir pesquisas, a partir da indicação de plantas utilizadas por comunidades, encurta o percurso do desenvolvimento de uma nova droga, já que os pesquisadores dispõem, antes mesmo de iniciarem os estudos científicos, de uma indicação de qual atividade biológica esta droga poderia apresentar ^[12].

Diterpenos, em particular, estão entre os principais compostos com ligação às propriedades cardiovasculares, tais como: vasorelaxante, inotrópica, diurética e atividade hipotensora ^[16].

A ação vascular exercida por esses compostos parece envolver múltiplos mecanismos, como endotélio dependente e endotélio independente, aumento de prostaciclina e bloqueio de canais de cálcio dependentes de voltagem ^[16].

Sabendo que o Manool (MN) pertence à classe dos compostos Diterpenos, do tipo labdanos, e que diversos outros compostos da classe, estruturalmente semelhante ao MN, apresentaram importante ação hipotensora e anti-hipertensiva, torna-o uma substância com potencial uso no tratamento da HAS.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Hipertensão arterial sistêmica

A HAS é a mais frequente das doenças cardiovasculares, associada a baixas taxas de controle ^[1,2]. Apresenta custos médicos e socioeconômicos elevados, decorrentes principalmente das suas complicações, tais como: doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular de extremidades ^[21]. Considerada um dos principais fatores de risco (FR) modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública ^[1,23,26].

Dessa forma, a HAS caracteriza-se como uma das causas de maior redução da qualidade e expectativa de vida dos indivíduos ^[19,20].

A mortalidade por doença cardiovascular (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial (PA) a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente ^[1].

Mundialmente ocorrem 7,5 milhões de mortes (13% do total) atribuíveis a doenças associadas à HAS ^[4]. No Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 33% dos óbitos com causas conhecidas. Além disso, essas doenças foram a primeira causa de hospitalização no setor público, entre 1996 e 1999, e responderam por 17% das internações de pessoas com idade entre 40 e 59 anos, e 29% daquelas com 60 ou mais anos ^[20].

A dificuldade quanto ao estudo da HAS se deve ao fato desta doença possuir etiologia heterogênea e multifatorial ^[22]. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da HAS pode-se citar: idade, gênero, etnia, obesidade, sedentarismo, ingestão de álcool e sal, além de fatores socioeconômicos e ambientais ^[21,22]. Também pode ser classificada em primária ou essencial e secundária ^[1].

2.2 Drogas anti-hipertensivas

O objetivo primordial do tratamento da HAS é a redução da morbidade e da mortalidade cardiovascular do paciente hipertenso, aumentadas em decorrência dos altos níveis tensionais e de outros fatores agravantes ^[2]. Assim, os anti-hipertensivos devem não só reduzir a pressão arterial, mas também os eventos cardiovasculares fatais e não-fatais ^[21].

Os agentes anti-hipertensivos exercem sua ação terapêutica através de distintos mecanismos que interferem na fisiopatologia da HAS. Basicamente, podem ser catalogados em cinco classes: diuréticos, agonistas e antagonistas adrenérgicos, vasodilatadores diretos, antagonistas ou bloqueadores de canais para Ca^{+2} , inibidores direto da renina, antagonistas de receptor de angiotensina II (ARAIIs) e iECA ^[1,21].

2.2.1 Diuréticos

O mecanismo anti-hipertensivo dos diuréticos está relacionado, numa primeira fase, à depleção de volume e, em um segundo momento, à redução da resistência vascular periférica decorrente de mecanismos diversos ^[34]. São eficazes no tratamento da HAS, tendo sido comprovada sua eficácia na redução da morbidade e da mortalidade cardiovasculares ^[21].

São muito utilizados devido à sua eficácia, baixo custo e poucos efeitos colaterais ^[35].

Diuréticos podem ser divididos em quatro grandes grupos de acordo com o seu principal local de ação no túbulo renal: túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e túbulo coletor ^[35].

Os tiazídicos e similares, em baixas doses, são preferidos como anti-hipertensivos. Já os diuréticos de alça são reservados para situação de HAS associada à insuficiência renal e cardíaca com retenção de volume. Os poupadores de potássio apresentam pequena eficácia diurética, mas, quando associados aos tiazídicos e aos diuréticos de alça, são úteis na prevenção e no tratamento de hipopotassemia. Porém, seu uso em pacientes com redução da função renal poderá acarretar em hiperpotassemia ^[1].

Sendo uma característica comum a todos os diuréticos, a ação natriurética, que leva à diminuição do Na^+ corporal total ^[35].

2.2.2 Antagonistas adrenérgicos

Esta classe de medicamentos é dividida em três grupos, de acordo com o seu local de ação: central, alfa-1-antagonista e beta antagonista ^[21].

Os fármacos de ação central, atuam estimulando os receptores alfa-2 adrenérgicos pré-sinápticos no sistema nervoso central, reduzindo o tônus simpático. Úteis em associação com medicamentos de outros grupos, particularmente quando há evidência de hiperatividade simpática ^[1].

Já os medicamentos alfa-1-antagonista, possuem baixa eficácia como monoterapia, devendo ser utilizados em associação com outros anti-hipertensivos ^[34].

Por último, os beta antagonistas possuem mecanismo anti-hipertensivo a qual envolve diminuição inicial do débito cardíaco, redução da secreção de renina, readaptação dos barorreceptores, além da redução das catecolaminas nas sinapses nervosas ^[21].

2.2.3 Vasodilatadores diretos

Atuam sobre a musculatura da parede vascular, gerando relaxamento muscular com consequente vasodilatação e redução da resistência vascular periférica ^[1].

Por induzir vasodilatação arterial direta, acabam promovendo retenção hídrica e taquicardia reflexa, o que gera contraindicação de seu uso como monoterapia ^[21].

2.2.4 Bloqueadores dos canais para Ca^{+2}

Esse grupo é dividido em três subgrupos, com características químicas e farmacológicas diferentes: fenilalquilaminas, benzotiazepinas e diidropiridinas ^[1,21].

Apesar da subdivisão do grupo, possuem o mecanismo final comum: redução da resistência vascular periférica, por diminuição da concentração de cálcio nas células musculares lisas vasculares ^[34,35]. São eficazes em reduzir tanto a pressão sistólica

quanto a diastólica^[35].

2.2.5 Inibidores direto da renina

Os fármacos inibidores diretos da renina, possuem grande afinidade pela renina, impedindo-a de clivar o angiotensinogênio, promovendo então um bloqueio mais completo do SRAA. Isso decorre do fato, de a renina ser limitante da velocidade de reação e ter grande especificidade pelo seu substrato, o angiotensinogênio^[36].

O bloqueio direto, logo no início da ativação do SRAA, diminui a probabilidade de efeitos colaterais. Além disso, não alteram o metabolismo das cininas e não devem causar tosse ou edema angioneurótico como os iECAs^[36].

Estudos de eficácia anti-hipertensiva comprovam sua capacidade, em monoterapia, de redução da pressão arterial de intensidade semelhante aos demais anti-hipertensivos^[1].

2.2.6 Antagonistas do receptor de Ang II

Os ARA II são uma nova classe de anti-hipertensivos, que atuam bloqueando o SRAA, por antagonizar seletivamente os receptores de Ang II, subtipo AT1 [1,37,31]. Inibindo seletivamente tais receptores, evitam a interferência em respostas fisiológicas, resultantes da estimulação crônica de receptores AT2 (e outros) que, entre diversas respostas, poderiam resultar em aumento de renina ou liberação de angiotensina^[5].

No tratamento da HAS, especialmente em populações de alto risco cardiovascular ou com comorbidades, proporcionam redução da morbidade e mortalidade cardiovascular^[21].

Estudos comprovam seu efeito benéfico em situações de insuficiência cardíaca congestiva, além de serem úteis na prevenção do acidente vascular cerebral. Também possuem efeito nefroprotetor no paciente com diabetes melito tipo 2 com nefropatia estabelecida e incipiente^[1].

2.2.7 Inibidores de ECA

O mecanismo de ação dessas substâncias, é fundamentalmente dependente da inibição da enzima conversora, bloqueando a transformação da Ang I em Ang II no sangue e nos tecidos, embora outros fatores possam estar envolvidos neste mecanismo de ação ^[34,38]. Dessa forma, são particularmente efetivos no tratamento da HAS de pacientes hiperreninêmicos ^[5].

São eficazes no tratamento da HAS, reduzindo a morbidade e a mortalidade cardiovasculares nos hipertensos. Também são úteis em pacientes com insuficiência cardíaca, infarto agudo do miocárdio (em especial, quando apresentam baixa fração de ejeção), quadro de alto risco para doença aterosclerótica, além de serem benéficos quanto a prevenção secundária do acidente vascular encefálico ^[1].

2.3 Modelos experimentais de hipertensão

Pesquisadores se mantêm em uma busca extenuante, por um modelo experimental, que possa melhor caracterizar uma doença tão importante para o ser humano como a HAS ^[39]. O que torna essa busca ainda mais intensa, é saber que se origina de diversos fatores ^[41,1].

Dessa forma, é justamente a origem multifatorial que fez com que ao longo do tempo, fossem propostos os mais diversos modelos experimentais de HAS, cada um deles envolvendo um ou mais mecanismos, contribuindo para a montagem do “quebra-cabeça” que é esta condição clínica ^[39].

O primeiro modelo animal de HAS foi desenvolvido quando Harry Goldblatt implantou um clipe de prata na artéria renal de um cão, e produziu uma forma secundária de hipertensão, iniciando assim, o desenvolvimento de uma ampla variedade de modelos para o estudo da HAS ^[24,43,39]. Desde então, diversos modelos experimentais de HAS, baseados na redução do fluxo sanguíneo renal, têm sido criados em várias espécies animais, recebendo o nome genérico de modelos de hipertensão de Goldblatt ^[39].

Para a produção experimental de hipertensão no rato, vários métodos foram empregados, como as várias técnicas de Goldblatt: Goldblatt I (GI): 1 rim - 1 clipe

(1R1C) caracterizada pela constrição da artéria renal esquerda e nefrectomia contralateral; Goldblatt II (GII): 2 rins -1 clipe (2R1C), ambos os rins permanecem intactos, mas há constrição da artéria renal de um deles; Goldblatt III (GIII): 2 rins - 2 cliques (2R2C), com redução dos diâmetros de ambas artérias renais ^[42,32].

O mecanismo básico de hipertensão, é diferente em cada um dos modelos desenvolvidos por Goldblatt ^[42,44]. No modelo 1R1C, o mecanismo é a expansão de volume corporal com aumento da pressão circulatória média, volume sanguíneo e rendimento cardíaco ^[42]. Já no modelo 2R1C, a ativação do SRAA desempenha papel essencial na gênese da HAS, da hipertrofia e fibrose intersticial miocárdica, bem como da remodelação vascular ^[40].

No rato com hipertensão 2R1C, a atividade de renina plasmática um mês após a constrição da artéria renal apresenta-se elevada. A concentração de renina no rim, cuja artéria está parcialmente ocluída, é 3 a 4 vezes maior que o normal dentro de uma semana, enquanto no rim contralateral (não ocluído) os níveis de renina são quase indetectáveis ^[39].

Tanto a redução da pressão de perfusão, quanto a redução do fluxo sanguíneo renal, impostos pela constrição da artéria renal são, certamente, o estímulo para o aumento da produção de renina no rim isquêmico. O desenvolvimento da hipertensão, com consequente aumento da pressão de perfusão e do fluxo sanguíneo renal, bem como o aumento de renina circulante, explica a depleção de renina do rim normal ^[39].

Utilizando o modelo 2R1C, a lesão final do órgão alvo, depende em parte da técnica de clipagem da artéria renal e, particularmente, depende do tamanho do clipe, e da idade no animal no momento deste procedimento. Como consequência, a hipertrofia cardíaca pode variar entre 25% à 50%. A ocorrência de insuficiência cardíaca crônica não tem sido descrita, já a falência renal raramente se apresenta, porém, mudanças menores no rim intacto tem sido relatados ^[43].

2.4 Produtos naturais

A natureza, de maneira geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. No entanto, é o Reino Vegetal, que tem contribuído de forma

realmente significativa, para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem a humanidade. A grande variedade e complexidade de metabólitos especiais, biossintetizados pelas plantas, teriam se formado e evoluído, como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação [46,13].

Os produtos naturais pertencem a cinco grandes classes químicas: carboidratos, lipídeos, compostos nitrogenados (aminoácidos, peptídeos, proteínas e glicosídeos cianogênicos e alcalóides), terpenóides e fenilpropanóides^[11].

Neste contexto, os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, seja *per-se*, seja como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos. Tanto que atualmente, metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo, tem sua origem em produtos naturais de plantas (incluindo os fungos), assim, as companhias farmacêuticas, da mesma maneira que os herboristas, dependem parcialmente da natureza para produzir as drogas comercializadas em farmácias^[47,11].

Em âmbito cardiovascular, drogas sintéticas tais como captopril, ou teprotida (nanopéptido isolado a partir do veneno de *Bothrops jararacussu*, a qual possui atividade inibitória da ECA), são utilizadas como drogas de primeira linha, tanto no tratamento da HAS primária quanto secundária. Porém, o custo crescente destas e de outras drogas anti-hipertensivas importadas, estimula a avaliação de novos produtos com uma fonte de substâncias mais baratas^[48].

Em recente estudo, a qual foi avaliado e comparado o efeito do ácido rosmarínico (AR, encontrado em maior concentração na cultura de suspensão de *Salvia officinalis*), sobre a PA de ratos normotensos e hipertensos, foi possível observar que, após a administração de 3 doses crescentes de AR, houve uma redução na PA, a qual foi maior nos animais hipertensos, mostrando que o AR pode apresentar efeito anti-hipertensivo, mas sem causar hipotensão, ou seja, sem reduzir a PA quando esta se encontra em níveis normais^[67,68].

Dessa forma, a interação de empresas com universidades e centros de pesquisa é essencial, pois o governo estimularia a pesquisa e o desenvolvimento de produtos de que o país necessita, enquanto que as empresas manteriam suas atenções voltadas ao

mercado, procurando novas oportunidades de negócios ^[12].

Como consequência, seria atingido um dos fatores fundamentais, para o desejado desenvolvimento biotecnológico no setor farmacêutico, que é a formulação de uma política de saúde oficial, que fomente o desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional, e possibilite o acesso equitativo de seus cidadãos a medicamentos apropriados para o tratamento de suas enfermidades (como a Austrália fez na década de 1990, tendo apresentado resultados positivos menos de uma década depois) ^[12].

2.5 Manool

Diterpenos constituem uma ampla classe de metabólitos químicos, a qual são amplamente distribuídos em todo o reino vegetal, com mais de 12.000 compostos conhecidos ^[52,55].

Podem ser divididos em dois tipos: diterpenos de metabolismo especializado (secundário) e metabolismo geral (primário). Os secundários podem ter funções, nas interações ecológicas das plantas com outros organismos, e também beneficiar a humanidade com produtos farmacêuticos, perfumes, resinas e outros bioprodutos industriais. Possuindo então, grande relevância econômica ^[52,55].

Vários metabólitos secundários, tais como: terpenos, ácidos fenólicos, polifenóis, flavonoides e antocianinas, foram relatados a partir de espécies de *Salvia*. Estas espécies são vistas como excelentes fontes de diterpenos ^[51].

De acordo com achados quimiotaxonômicos, o MN (figura 1) foi previamente relatado nas seguintes espécies de *Salvia*: *S. sclarea*, *S. pubescens*, *S. lavandulifolia*, *S. hypoleuca*, *S. miltiorrhizae*. Além de estar presente em outras espécies, como: *Pinus caribaea* (Pinaceae), *Lourteigia stoechadifolia* (Asteraceae) e *Halocarpus biformis* (Podocarpaceae). Contudo, o MN é o principal diterpeno das diversas espécies de *Salvia*, e se encontra em maior concentração na espécie *Salvia officinalis* ^[59,56,50,51,53,54,52,16,62,57].

Figura 1: Estrutura química do Manool ^[56,57].

A sálvia (*Salvia officinalis* L.), conhecida popularmente como salva, salva-das-boticas ou salva-dos-jardins, é uma espécie da família Lamiaceae (Labiatae), originária da região meridional da Europa. Apresenta hábito de crescimento herbáceo ou arbustivo de pequeno porte, é planta perene que floresce no Hemisfério Sul entre os meses de agosto e dezembro ^[58].

A biossíntese das unidades estruturais isoprênicas, de uma vasta variedade de terpenos, incluindo os diterpenos, ocorre pela via da deoxi-xilulose (por décadas, a comunidade científica acreditou que a biogênese ocorria exclusivamente pela via do ácido mevalônico). Esta via dará origem a dois distintos produtos: isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) (Figura 2) ^[60,61,62].

Figura 2: Via da desoxi-xilulose para a biossíntese de IPP e DMAPP ^[61].

De maneira mais específica, o MN, que possui composição química: $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}$, é um diterpeno do tipo labdano bicíclico, sua estrutura se baseia em um esqueleto carbonado do tipo 2E,6E,10E-geranilgeranilpirofosfato (GGPP). O GGPP é produto da reação entre o Farnesilpirofosfato (FPP, precursor dos sesquiterpenos) e o IPP (figura 3) ^[16,62,61].

Figura 3: Reação de produção do 2E,6E,10E-geranylgeranilpirofosfato (GGPP) ^[61].

Existem duas formas possíveis de ciclização do GGPP, sendo que a principal forma (responsável pela formação do esqueleto dos labdanos e dos *ent*-labdanos), inicia-se com a protonação da ligação dupla isopropilideno terminal, conduzindo a formação de compostos bicíclicos. Este tipo de ciclização conduz a duas séries enantioméricas, dependendo da configuração dos carbonos 5, 9 e 10: a série é dita *normal* se a fusão dos anéis A/B é semelhante a dos esteroides (labdanos), e denominada como *ent* se a mesma fusão é inversa (*ent*-labdanos) (Figura 4) ^[61].

Figura 4: Ciclização do GGPP e formação do esqueleto dos labdanos e dos *ent*-labdanos ^[61].

Pesquisas anteriores, mostraram que os diterpenos labdano, têm uma ampla gama de efeitos farmacológicos, tais como: a capacidade de inibir a replicação do vírus HIV, prevenir resfriados comuns, ação antimalárica, antibacteriana, anti-inflamatório, efeito anti-hiperglicêmico, evitar a disenteria, além de suprimir diversas células cancerosas ^[62,15].

Já em aspecto cardiovascular, evidenciaram: significativa redução de estenose em artérias ateroscleróticas, associada à redução das taxas de reestenose após angioplastia em coelhos; redução da agregação plaquetária *in vitro*, e ação anti-hipertensiva em ratos ^[62,15,71,72,73,74,75,76,77].

Lindner et al descreveram a habilidade do labdano forscolina (7 beta-acetoxi-8 alfa, 13-epoxi-1, 6-beta, 9 alfa-tri-hidroxi-labda-14-eno-11-ona) induzir hipotensão em cães e gatos, além de apresentar atividade hipotensora em ratos [77]. Em 1981, a forscolina se mostrou um potente ativador seletivo da adenilato ciclase, enzima responsável pelo aumento intracelular do AMPc [83].

A partir de então, a forscolina se tornou uma importante ferramenta

farmacológica para estudo do AMPc em diversos tecidos. Bhat et al mostraram que a administração oral de labdanos derivados da forskolina, promoviam redução da pressão arterial em ratos hipertensos ^[78].

Dessa forma, os diterpenos, em especial os labdanos, são vistos como fonte promissora de protótipos, para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes na terapêutica cardiovascular ^[16,75].

Tanto a atividade hipotensora quanto anti-hipertensiva dos diterpenos do tipo labdanos está, parcialmente, envolvida com sua capacidade de promover relaxamento do músculo liso vascular. Nesse processo estão envolvido, aumento de AMPc ^[82], ativação de PKA ^[81], mobilização de cálcio ^[80] e NO ^[79]. Também é importante ressaltar que peculiaridades na estrutura química de cada labdano, podem inferir diferentes mecanismos, envolvidos em seus efeitos cardiovasculares.

Até o momento, estudos constataram apenas o efeito antimicrobiano do Manool. Entretanto, pesquisas realizadas, abordando a medicina tradicional chinesa no tratamento de doenças cardiovasculares ^[49,53,54], mostram que esse composto, por suas características químicas, e semelhança estrutural com outros compostos da classe, é um candidato promissor aos estudos também no âmbito vascular.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial efeito vasodilatador (*in vitro* e *in vivo*) do diterpeno Manool.

3.2 Objetivo específico

1. Verificar o efeito do Manool, sobre a PA dos animais, após administração de diferentes doses do composto;
2. Verificar o efeito do Manool, sobre os níveis plasmáticos de NO, em animais normotensos e hipertensos;
3. Avaliar o possível efeito vasodilatador do composto Manool, em anéis de aorta de ratos;
4. Verificar quais os mecanismos celulares, envolvidos na resposta de relaxamento mediada pelo Manool, em anéis de aorta de ratos;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Drogas

O composto utilizado foi adquirido da Glycosyn, e as demais drogas foram adquiridas da Sigma. O MN foi solubilizado em Dimetilsulfóxido (DMSO) e diluído em solução etanol + água (2:10).

4.2 Animais

Ratos Wistar machos (250 - 300 g), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), foram utilizados neste estudo. Os animais foram acondicionados em ambiente com temperatura (22-25°C) e ciclo luz/escuro (12:12 horas) controlados. Tiveram livre acesso à água e à ração.

Os procedimentos, bem como os protocolos experimentais deste estudo, foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da USP.

4.3 Indução da hipertensão 2R1C

Os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/Kg) e xilazina (20 mg/Kg) via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada tricotomia da região abdominal e assepsia do local. Para realização do procedimento cirúrgico, a cavidade abdominal foi aberta por incisão longitudinal na linha alba (laparotomia), o intestino foi deslocado para visualização do rim esquerdo e a artéria renal esquerda foi clampeada com um clipe de prata (abertura interna 0,1 mm) (figura 5). Os animais normotensos foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico com exceção da colocação do clipe. Após esse procedimento, a cavidade abdominal foi suturada em dois planos: no plano muscular com pontos contínuos e no plano da pele com pontos individuais.

Foram considerados hipertensos, os animais que apresentaram aumento mínimo de pressão arterial sistólica (PAS) de cauda, de 30 mmHg após 3 semanas da indução de hipertensão.

Figura 5: Fotos da artéria renal esquerda isolada (A) e com o clipe de prata (B).

4.4 Mensuração da PA não-invasiva

A PA não-invasiva, foi mensurada utilizando-se um manguito, conectado a um sensor para registro de PA (Kent Scientific Corporation, Connecticut, USA), colocado em torno da cauda do animal, a qual foi previamente aquecida. Esse procedimento foi realizado 24 horas antes da intervenção, para avaliar o quadro de hipertensão do animal (pletismografia de cauda) (figura 6).

Figura 6: Mensuração da PA não-invasiva em ratos.

4.5. Avaliação do efeito do composto Manool e veículo, sobre as pressões sistólica, diastólica e média em animais normotensos e hipertensos

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: hipertenso e normotenso. Os animais do grupo hipertenso foram submetidos ao procedimento cirúrgico 2R1C para indução de hipertensão, enquanto os animais do grupo normotenso foram sham-operados.

Três semanas após a cirurgia, os animais foram submetidos a nova agrupação, de acordo com a abordagem realizada: (1) estudo do efeito direto do MN sobre a PA, pela administração de 3 doses crescentes do composto e (2) possível efeito do veículo (VL) (DMSO + etanol + água) sobre a PA, pela administração de 3 doses crescentes da solução veicular. Na sequência, os animais foram anestesiados com Uretano via intraperitoneal. A artéria e a veia femorais foram isoladas, e um cateter (24G x 0,75" Angiocath BD®) foi inserido em cada vaso, a fim de monitorar a PA e manter um acesso venoso para a administração de drogas, respectivamente (Figura 7).

Após 15 minutos de monitorização, tempo necessário para estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, foram aplicadas 3 doses da substância referente a cada grupo, nas concentrações 10, 20 e 40 mg/Kg, com intervalos de 6 minutos entre cada dose, tempo suficiente para a pressão retornar ao nível basal. Durante a curva dose-resposta foram realizadas medidas da PA.

A monitorização da PA, foi realizada por meio do MP System 100 A (BioPac System, Inc., Santa Barbara, CA, USA). O MP System 100 A é um sistema capaz de coletar, analisar, armazenar e recuperar dados biofísicos. Conectado a um PC Gateway (Gateway, Sioux City, SD, USA) com sistema operacional Windows 2000. O cateter instalado na artéria femoral, foi conectado a transdutores de pressão, e estes, ao sistema de registro contínuo MP System 100 A.

Figura 7: Cateteres localizados na artéria e veia femorais do rato, respectivamente.

4.6. Determinação indireta de NO plasmático pela dosagem de nitrito (NO^{2-}) e nitrato (NO^{3-}) (NO_x)

As amostras de sangue total foram coletadas pela artéria femoral, após a última curva dose-resposta, e colocadas em tudo heparinizado. O plasma foi obtido por centrifugação 2.500 g (10 minutos, 4°C) e mergulhado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenado em freezer (-70°C) para posterior dosagem do $\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$ plasmáticos.

Alíquotas de 25 µl de plasma foram desproteinizadas por incubação com etanol absoluto (4°C), mantidas por 30 minutos em freezer (-20°C), e em seguida, centrifugadas a 4000 x g por 10 minutos (Eppendorf Centrifuge 5810R, Hamburg, Alemanha) para posterior dosagem do NO_x .

Para a medida do NO plasmático, foi utilizada a técnica de quimioluminescência NO/ozônio (O_3) utilizando-se o analisador Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280 (GE Analytical Instruments, Boulder, CO, EUA).

Das amostras desproteinizadas, utilizou-se o volume de 5 µl, que foi injetado na câmara de reação do analisador contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em 1N de HCl à 95°C) que converte o $\text{NO}^{2-} + \text{NO}^{3-}$ em NO, em quantidades equimolares. O NO é sugado para a câmara de quimioluminescência do analisador e reage com o O_3 , formando dióxido de nitrogênio (NO_2). O NO_2 apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma

superfície foto-sensível de uma célula fotomultiplicadora. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. A corrente de elétrons é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico, em que a área sob a curva gerada pela corrente elétrica corresponde à concentração de NOx na amostra. A concentração de NOx foi calculada por comparação com uma curva padrão usando concentrações conhecidas (5 µM, 10 µM, 15 µM, 25 µM, 50 µM e 100 µM) de nitrato de sódio. Os valores de NOx foram expressos em µM.

A dosagem do NOx foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP.

4.7. Estudo da reatividade vascular da aorta

Após completa anestesia (xilazina/ketamina 20/50 mg/Kg), foi realizada uma toracotomia e a aorta foi retirada cuidadosamente e imediatamente imersa em solução de Krebs a 37º Celsius (C). A amostra da aorta de cada animal, mantida em solução de Krebs, foi dissecada para remoção de tecidos externos à adventícia e seccionada em 4 anéis (4 mm de extensão cada) que foram utilizados no estudo da reatividade vascular.

Após esta preparação inicial, cada anel foi suspenso entre duas alças de aço inoxidável, passadas através de sua luz, e este conjunto foi imerso em uma cuba (10 ml) do sistema de banho orgânico para tecido isolado. As cubas foram preenchidas com solução de Krebs (composição milimolar: NaCl 118,3; KCl 4,7; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,22; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25,0 e C₆H₁₂O₆ 11,1; pH 7,4), mantidas a 37°C e aeradas com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). Uma das alças foi ancorada a um suporte fixo, e a outra conectada a um transdutor (Grass force-displacement transducer FT03, Grass Instrument CO, Quincy, EUA), para mensuração da tensão isométrica. Os transdutores foram acoplados a um registrador de 8 canais (Gould, Cleveland, EUA), permitindo desta forma, o registro simultâneo da tensão isométrica.

Antes de iniciar os experimentos farmacológicos propriamente ditos, os anéis vasculares foram submetidos ao ponto ótimo de estiramento-tensão de 2 g, por meio de um sistema micrométrico, e permaneceram em repouso sob esta tensão durante 40

minutos. Após este período de estabilização, foi induzida a contração dos anéis mediante uso de fenilefrina (Phe- 10^{-7} M), esta contração permitiu avaliar a integridade da musculatura lisa. Depois de atingido o platô de contração, a presença ou a ausência de endotélio nos anéis, foi confirmada mediante a indução de relaxamento pela utilização de acetilcolina (ACh- 10^{-6} M). Foram considerados com endotélio, os anéis que relaxaram ao menos em 75% a pré-contração. Subsequentemente, a solução das cubas foi substituída por uma solução de Krebs pura, e a preparação foi deixada em repouso por 30 minutos. Após este segundo período de estabilização, foram obtidas curvas concentração-resposta com concentrações cumulativas do composto a ser testado, em artérias com e sem endotélio, na presença e ausência de inibidores das vias de produção de NO^- .

Curvas concentração-resposta para diterpeno manool foram obtidas em anéis de aorta, com endotélio, pré-contraídos com Phe 10^{-7} M. A resposta de relaxamento foi expressa como a porcentagem de relaxamento relativa à pré-contração com Phe.

Com intuito de observar os mecanismos envolvidos no relaxamento induzido pelo composto, curvas concentração-resposta para o MN, foram obtidas em anéis de aorta com endotélio, pré-contraídos com Phe 10^{-7} M, após incubação por 30 minutos com dois inibidores diferentes (tais substâncias não foram utilizadas simultaneamente): [1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4, 3-a]quinoxalin-1-one] (ODQ - 1 $\mu\text{mol/L}$, inibidor específico da gualinato ciclase solúvel, GCs) e N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME - 100 $\mu\text{mol/L}$, inibidor não seletivo da NO sintase, NOs).

4.8. Análise estatística

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni ou test t student pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 4.0). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Desenvolvimento do modelo experimental.

5.1.1 PAS não invasiva.

A figura 8 demonstra a evolução temporal da PAS não invasiva nos grupos normotenso e hipertenso. Diante da evolução dos animais do grupo normotenso, pode-se observar que PAS apresentou pouca alteração, variando de 120,714 (pré-cirurgia) à 130,626 (3ª semana/pós-cirurgia), ao passo que a análise feita dos animais pertencentes ao grupo hipertenso, nos evidenciou importante aumento da PAS, variando de 133,869 (pré-cirurgia) à 192,977 (3ª semana/pós-cirurgia). Os respectivos valores encontram-se na tabela 1.

Figura 8: Evolução temporal da pressão arterial sistólica não invasiva em animais normotensos e hipertensos. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média ($n = 5$ para ambos os grupos) da PAS antes da cirurgia 2R1C (pré-cirurgia) e nas 3 semanas subsequentes a cirurgia. * ($p < 0,05$) indicada diferença significativa do grupo hipertenso em relação ao grupo normotenso referente a 1ª semana/Pós-cirurgia e # ($p < 0,01$) indica diferença significativa do grupo hipertenso em relação ao grupo normotenso referente a 2ª e 3ª semanas/Pós-cirurgia.

Tabela 1: Evolução da PAS não invasiva em animais normotensos e hipertensos.

Evolução temporal da PAS				
Grupos	Pré-2R1C	1º semana	2º semana	3º semana
Normotenso	120,714	132,119	131,388	130,626
Hipertenso	133,869	179,704*	185,368 [#]	192,977 [#]

Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão da média. Duas vias ANOVA, pós-teste de Bonferroni. * ($p < 0,05$) e # ($p < 0,01$) indicam diferença significativa entre os grupos. ($n = 5$).

5.1.2 Peso corporal.

A avaliação do peso corporal evidenciou que na primeira semana, ambos os grupos apresentavam pesos semelhantes, no entanto, ao término das três semanas, o grupo hipertenso apresentou valores significativamente menores em relação ao grupo normotenso (figura 9). Conferir respectivos valores na tabela 2.

Figura 9: Evolução do peso corporal de animais normotensos e hipertensos.

Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média ($n=5$ para ambos os grupos) do peso corporal dos animais na fase inicial (primeira semana) e na fase final (quarta semana). * indica diferença significativa do grupo hipertenso em relação ao grupo normotenso ($p < 0,05$).

Tabela 2: Evolução temporal do peso corporal de animais normotensos e hipertensos.

Evolução do peso corporal		
Grupo	Inicial	Final
Normotenso	233,4	480,2
Hipertenso	239,4	404,8*

Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão da média. Duas vias ANOVA, pós-teste t student. * ($p < 0,05$) indica diferença significativa do grupo hipertenso em relação ao grupo normotenso ($n = 5$).

5.2 Estudo sobre o efeito do Manool *in vivo*.

5.2.1. Efeito da administração aguda de Manool e veículo na variação PA máxima.

A figura 10 ilustra a variação da pressão arterial sistólica (Δ PAS), após receberem administrações consecutivas de 3 doses crescentes de MN e VL (10, 20 e 40 mg/Kg) em ratos normotensos e hipertensos. A análise do efeito do MN sobre a Δ PAS mostrou que, em ambos os grupos, houve uma importante redução da Δ PAS. Em contraponto, o efeito da substância VL apresentou discreto efeito redutor. A variação da pressão referente a cada grupo, está descrita na Tabela 3.

Figura 10: Imagem representativa da variação da pressão arterial máxima, diante da aplicação de doses de Manool e Veículo.

Neste experimento *in vivo*, foram realizadas administrações de 3 doses consecutivas e crescentes de Manool e veículo (10, 20 e 40 mg/Kg) em ratos normotensos e hipertensos. * indica diferença entre grupos Hipertenso Manool e veículo para $p=0.02$. ($n = 5$)

Tabela 3: Relação entre a dose (mg/Kg) de Manool e veículo na variação PA máxima.

Dose (mg/Kg)	Normotenso Manool	Hipertenso Manool	Veículo
10	-24,17	-32,92	-4,22
20	-29,89	-45,76*	-4,86
40	-27,06	-46,05*	-1,21

Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão da média. Duas vias ANOVA, pós-teste de Bonferroni. * indica diferença significativa entre grupos hipertenso Manool e Veículo.

5.2.2. Análise do NO plasmático através da dosagem de nitrito e nitrato.

A figura 11 ilustra a análise das dosagens do NOx plasmático, feita entre os grupos em que foram utilizados MN e VL. O resultado não evidenciou diferença estatística significativa. Valores referentes a cada grupo estão destacados na Tabela 4.

Figura 11: Imagem representativa da comparação do NO plasmático após aplicação de doses de Manool e Veículo.

As amostras de sangue total foram coletadas pela artéria femoral, após a última curva dose-resposta de Manool e Veículo. Não houve indicativo de diferença estatística significativa. (n = 5)

Tabela 4: Comparação do NO plasmático entre grupo Manool e Veículo.

	Manool	Veículo
NOx Plasmático (μM)	55.3318	63.9988

Cada valor representa a média ± erro padrão da média. Duas vias ANOVA, pós-teste de Bonferroni. Sem diferença significativa entre grupos Manool e Veículo.

5.3. Estudo do efeito do Manool sobre a reatividade vascular.

5.3.1 Efeito do Manool em anéis de aorta torácicas com e sem endotélio.

A administração de concentrações cumulativas do MN, para realização de curvas dose-resposta, nos revelou padrões totalmente opostos e com diferenças significativas.

A comparação feita a cada dose do composto, entre anéis com e sem endotélio, revelou que, exceto na primeira dose, onde a diferença foi de $p < 0,05$, em todos os demais pontos de dosagem, a diferença foi de $p < 0,001$ (Figura 12). Na figura 13 e

tabela 5 estão representados os valores do efeito relaxante máximo, obtido a partir das curvas.

Figura 12: Curva dose-resposta para Manool em anéis com e sem endotélio Após a pré-contracção com Phe 10^{-7} M, os anéis foram submetidos a uma curva dose-resposta de 10^{-10} a 10^{-4} . * ($p < 0.05$) e # ($p < 0.001$) indicam diferença significativa entre os grupos. ($n = 5$).

Figura 13: Efeito relaxante máximo para o Manool. O efeito máximo foi calculado a partir das curvas dose-resposta. P* ($p < 0.001$) indica diferença significativa entre os grupos. ($n = 5$).

Tabela 5: Efeito máximo do Manool em anéis com e sem endotélio.

Grupos	% de relaxamento
Manool CE	50,23*
Manool SE	15,25

Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão da média. Duas vias ANOVA, pós-teste de Bonferroni. * ($p < 0.001$) indica diferença significativa entre os grupos. ($n = 5$).

5.3.2. Efeito dos inibidores sobre o relaxamento induzido pelo Manool.

O MN foi utilizado nas curvas concentração-resposta, na presença dos inibidores L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$) e ODQ (100 $\mu\text{mol/L}$). Os inibidores de óxido nítrico sintase e guanilato ciclase foram tão eficientes quanto a retirada do endotélio, em inibir o relaxamento induzido pelo MN (Figura 14 e 15). A variação da porcentagem de relaxamento - Emax está presente na tabela 6.

Figura 14: Curva dose-resposta de Manool, na presença dos inibidores. Após a pré-contracção com Phe 10^{-7}M , os anéis foram submetidos a uma curva dose-resposta de 10^{-10} a 10^{-4} na presença dos inibidores L-NAME e ODQ. * ($p < 0,05$) e # ($p < 0,001$) indicam diferença significativa entre os grupos com inibidores e controle.

Figura 15: Efeito relaxante máximo na presença dos inibidores. Todos os anéis foram submetidos a 11 doses crescentes e diferentes de Manool, porém, cada grupo apresentava uma condição particular: 1) anéis CE, 2) anéis SE, 3) anéis CE e L-NAME e 4) anéis CE e ODQ. Cada grupo foi submetido à análise e comparação de seu respectivo efeito sobre o anel. (n = 5 para cada grupo).

Tabela 6: Efeito relaxante máximo na presença dos inibidores.

Grupos	% de relaxamento
Manool CE	50,23
Manool SE	15,25*
L-NAME	3,94*
ODQ	7,18*

Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão da média. Duas vias ANOVA, pós-teste de Bonferroni. * ($p < 0.0001$) indica diferença significativa entre os grupos. (n = 5).

6. DISCUSSÃO

Atualmente, o leque de agentes anti-hipertensivos disponíveis para o tratamento da HAS, está cada vez mais diverso, embora saibamos que, problemas cardiovasculares relacionados à hipertensão, continuam a afetar milhões de pessoas em todo mundo.

Neste contexto, os produtos naturais vêm recuperando espaço e sua devida importância na indústria farmacêutica, seja *per-se*, seja como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos. Na Europa, a fitoterapia já é parte da medicina tradicional, sendo que extratos de plantas, componentes ativos e produtos medicinais acabados, estão descritos em muitas farmacopéias. Assim como nos Estados Unidos, onde 25% das prescrições dispensadas nos últimos 25 anos estavam relacionadas a medicamentos que continham princípios ativos de origem natural ou semi-sintética [47].

O crescente interesse por plantas medicinais que possuem atividade anti-hipertensiva e de proteção cardiovascular, relaciona-se a vários fatores, entre eles o alto custo dos medicamentos industrializados, a crise econômica, e a falta de acesso da população à assistência médica e farmacêutica [69]. Vale ressaltar que, no início da década de 1990, a OMS divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento, dependiam integralmente das plantas medicinais como única alternativa de acesso aos cuidados básicos de saúde [70].

Embora o governo disponibilize alguns anti-hipertensivos, a descoberta de novas substâncias com atividade anti-hipertensiva, baixo custo e poucos efeitos adversos é ainda um aspecto desejável e de importância para a utilização clínica [67].

Porém, várias dificuldades são encontradas para este fim, como a escolha do modelo experimental, obtenção de extratos padronizados, isolamento e identificação das substâncias ativas [67,13].

Os diterpenos constituem uma extensa classe de metabólitos secundários derivados de plantas. Vários estudos já reportaram suas diversas atividades biológicas, e principalmente o seu significativo efeito cardiovascular [75]. Dessa forma, diversos estudos enxergam estas substâncias, como sendo uma fonte promissora de novos protótipos, para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes destinados à

terapêutica cardiovascular ^[16].

Até o momento, estudos já constataram sua ação antimicrobiana, e pesquisas dirigidas por Li et al. e Wang et al., constataram que, apesar do MN possuir atividades ainda desconhecidas do ponto de vista cardiovascular, ele deve ser considerado como fator crucial nos estudos a serem realizados. Podendo ser visto como novo condutor para tratamento de doenças cardíacas, merecendo mais investigação ^[49,53,54,74]. Com base nas considerações desses pesquisadores, decidimos por avaliar como seriam os efeitos cardiovasculares do MN sobre a PA.

O modelo 2R-1C, utilizado no presente estudo para a indução de HAS, apresentou resultados satisfatórios, com aumento significativo na PAS dos animais.

Os valores elevados da PAS, encontrados após 3 semanas nos animais hipertensos, corroboram com os valores anteriormente encontrados em estudo realizado por Garros ^[67]. É válido destacar que nessa pesquisa, a autora utilizou clipe de prata com abertura interna de 0,2 mm, por um período de 4 semanas, e nós utilizamos uma abertura interna de 0,1 mm, por 3 semanas. Esse destaque nos revela uma possível relação entre menor abertura interna do clipe, e consequente redução do período necessário, para se atingir os devidos fins com esse modelo de experimento, que é a instalação da HAS.

Os resultados obtidos em relação ao peso corporal, mostraram que ao final das 3 semanas, os animais do grupo hipertenso apresentaram menor peso. Resultado similar também foi observado por Garros ^[67]. Essa atenuação do ganho de peso, pode estar relacionada com a redução na ingestão de alimentos ^[67].

Os resultados obtidos após a administração de 3 doses crescentes de MN, demonstram que ele promoveu uma redução na PA, a qual foi significativa nos animais hipertensos, evidenciando que este composto pode apresentar efeito anti-hipertensivo, mas sem causar severa hipotensão.

Diversos achados na literatura, confirmam o efeito vascular dessa classe de compostos, é o caso do diterpeno labdano Ácido (8)17,12*E*,14-labdatríeno-18-óico (labdano 302), que após ter sido administrado por via intravenosa em doses de 5, 10, 20 e 30 mg/kg em ratos normotensos, induziu a uma hipotensão de curta duração ^[18].

A Trans-deidrocrotonina, considerado o composto mais ativo, com vasto perfil farmacológico, incluindo ações vasorrelaxante, induziu hipotensão e bradicardia em

ratos normotensos, após injeções intravenosas em doses de 10 e 15 mg/kg^[17].

Outro achado em nossos experimentos *in vivo*, foi o efeito bradicárdico induzido pelo MN, principalmente presente após a aplicação da segunda dose do composto (20mg/kg). A bradicardia evoluiu para um quadro de parada cardíaco-respiratória em animais hipertensos, onde 3 animais foram a óbito, e 2 evoluíram com sucesso após o procedimento de ressuscitação cardiopulmonar.

Este evento também esteve presente em estudo realizado com animais normotensos, associado à aplicação de diversos outros diterpenos, a exemplo temos: Trans-deidrocrotonina, Ácido ent-kaur-16-en-19-óico (diterpeno Kaurane), Ácido ent-kaur-16-en-15-one-19-óico (diterpeno Kaurane), dentre vários outros^[75]. Estudo realizado a cerca do primeiro composto exemplificado, correlaciona a bradicardia *in vivo* ao efeito cronotrópico negativo direto sobre o átrio direito de ratos^[69,75].

O NO de origem endotelial, é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, um vasodilatador com importante função no controle do tônus vascular^[85, 86].

Pesquisadores evidenciaram que a L-arginina induz relaxamento de maneira dependente e independente do endotélio em aorta de ratos, deixando claro que o músculo liso vascular também possui mecanismos bioquímicos para a conversão da L-arginina em NO^[87]. Partindo desse princípio, e considerando que diversos estudos mostram que as ações cardiovasculares de alguns diterpenos é mediada pela via do NO^[79,88], decidimos por avaliar e reconfirmar o possível envolvimento do NO endotelial e do músculo liso vascular, no relaxamento induzido pelo MN em experimento *in vitro*.

Dessa forma, a realização de curvas dose-resposta nos evidenciou que, em anéis de aorta torácica CE, pré-contraídos com Phe, o composto induziu a uma porcentagem de relaxamento de exatamente 50,23%, ao passo que as curvas realizadas em anéis SE, também pré-contraídos com Phe, apresentaram uma redução dessa porcentagem (15,25%).

Com metodologia baseada na reatividade vascular, Mondolis et al. concluíram que o MN não apresenta efeito vasorrelaxante significativo em anéis aórticos com a presença de endotélio^[16]. Esse dado se contrapõe aos resultados que obtivemos, a qual houve importante ação vasodilatadora através de provável mecanismo endotélio-dependente.

Essa diferença de resultados, pode ser justificada pelo fato de que em nossa

metodologia, utilizamos solução de Krebs, Phe 10^{-7} M, e a aorta sempre mantida em solução com 37°C , ao passo que o artigo em análise, utilizou solução de Krebs Heinseleit, Phe 10^{-6} , e inicialmente a aorta foi mantida a 4°C , após serem devidamente posicionadas nas cubas de reatividade, que passaram a ser mantidas com temperatura de 37°C .

O L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, reduziu o relaxamento induzido pelo MN em anéis de aorta CE. Sabendo que o efeito do L-NAME foi avaliado apenas em anéis CE, podemos concluir que o NO atuante no processo de relaxamento é de origem endotelial.

O NO endotelial difunde-se para as células do músculo liso vascular, e atua na enzima GCs, seu principal alvo nesse tecido ^[89]. Ao ser estimulada, a GCs promove a conversão do nucleotídeo GTP em GMPc ^[90]. O GMPc induz relaxamento ao ativar uma cascata de reações intracelulares, como a ativação da PKG, que irá fomentar vários eventos, os quais ocasionaram o relaxamento, como por exemplo: a redução da concentração citoplasmática de íons Ca^{2+} ^[91]; abertura dos canais para K^{+} , levando à hiperpolarização da membrana e inibição de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem ^[92]; e a desfosforilação da cadeia leve de miosina ^[93]. Deste modo, uma vez que o NO endotelial está envolvido no relaxamento induzido pelo MN, avaliamos a participação da enzima GCs nessa resposta. O ODQ, um inibidor seletivo da enzima GCs ^[94], reduziu o relaxamento provocado pelo MN, evidenciando a participação desta enzima na resposta final.

A realização das curvas nos fizeram concluir que, o L-NAME e ODQ foram tão eficientes quanto a retirada do endotélio, em inibir o relaxamento. Mesmo sabendo que houve discreto nível de relaxamento nos modelos de curva “com inibidores” e “sem endotélio”, entende-se como sendo uma perda normal de pré-tensão.

Toda essa sequência de resultados da metodologia realizada *in vitro*, nos destaca que o mecanismo envolvido na redução da PA é provavelmente dependente de NO.

Trabalho realizado por Oliveira et al. e Lalhous et al., apresentou ação semelhante sobre a PA, porém, concluiu que alguns diterpenos do tipo labdano, têm sido associados a ação vasorrelaxante independente do endotélio ^[72,73]. Dessa forma, vários mecanismos de ação têm sido propostos para explicar esta atividade vascular:

(1) bloqueio do influxo extracelular de Ca^{2+} , (2) bloqueio do influxo intracelular Ca^{2+} e (3) aumento de nucleotídeos cíclicos ^[16].

Alguns exemplos desses diterpenos labdano são: Marrubenol (extraído da planta *Marrubium vulgare* -Horehound, Lamiaceae-), que através do bloqueio de canais de Ca^{2+} , é capaz de induzir o relaxamento vascular e diminuir a PAS em ratos espontaneamente hipertensos ^[71,75,76]; e Acetato de Jhanidiol (extraído da planta *Espeletia schultzii* -Asteraceae-), que em anéis aórticos CE e SE, é capaz de apresentar excelente efeito relaxante, sugerindo efeito endotélio-independente ^[16].

Sabe-se que esses diversos mecanismos desempenham um papel importante na regulação do tônus vascular e, portanto, têm sido usados no desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças cardiovasculares ^[71,16].

Tais achados nos reforçam a ideia de Tirapelli et al., a qual pequenas alterações na estrutura química dos diterpenos modificam suas respostas cardiovasculares ^[84].

O fato de uma substância atuar através de diversos mecanismos de ação, também é uma característica presente em diversos diterpenos, a exemplo disso temos o Esteviosídeo, um diterpeno glicosídico extraído da planta *Stevia rebaudiana*, que em estudo realizado por Melis et al., produziu efeito hipotensor de forma dose-dependente, diurese e natriurese, após a infusão intravenosa do composto (8 e 16 mg/kg por hora) em ratos normotensos. Os autores sugeriram que o efeito vasodilatador ocorreu por provável bloqueio dos canais de Ca^{2+} , uma vez que o Verapamil (bloqueador de canal de Ca^{2+}), aumentou o efeito sistêmico da substância, enquanto a infusão de CaCl_2 reduziu tal resposta.

Já em anéis aórticos de ratos contraídos com Vasopressina, o Esteviosídeo foi capaz de relaxar aqueles que possuíam endotélio, assim como aqueles que não o apresentavam, em somatória, o relaxamento não foi afetado pelo Azul de Metileno (inibidor da GCs), evidenciando a não intervenção da GMPc – Via de NO ^[75,28].

Por último, através da cultura de células da musculatura lisa aórtica, os autores observaram que o Esteviosídeo bloqueou o influxo de Ca^{2+} , porém, isso não foi efetivo em inibir a liberação de Ca^{2+} intracelular. Consequentemente, esses resultados indicam que a vasodilatação induzida pelo composto foi mediada principalmente através da inibição do influxo de Ca^{2+} extracelular ^[75,28]. Este mesmo estudo descreve que, os experimentos realizados em artérias mesentéricas superiores de ratos, confirmaram a

atuação do NO, bem como a participação do vasodilatador Prostaglandina em relaxamento *in vitro* induzido pela substância.

Além disso, este diterpeno é capaz de bloquear a entrada de Ca^{2+} através de canais dependentes de voltagem, esta observação se baseia em resultados onde o composto inibiu a contração induzida por Ca^{2+} em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos e reduziu as correntes em canais de Ca^{2+} tipo L ^[18].

A pesquisa literária nos revelou outros tantos diterpenos, com esta mesma característica peculiar, tais como: Ácido Pimaradienóico, Ácido Caurenóico, Jatrophone, dentre outros ^[75].

Assim como acontece com qualquer molécula mensageira, alterações nos níveis de concentração do NO endógeno (tanto deficiência, quanto excesso), podem desencadear diversos processos fisiopatológicos. A produção deficitária pode resultar em HAS, angina e impotência, enquanto a superprodução pode ocasionar respostas inflamatórias severas, choque circulatório e até mesmo infarto. Nesse sentido, duas abordagens terapêuticas distintas, emergem para o tratamento destas doenças. Em situação de baixa produção, o uso de doadores de NO pode aumentar sua biodisponibilidade, e em caso de superprodução, a utilização de inibidores da NOS (enzima responsável pela sua biossíntese), podendo reduzir sua biodisponibilidade ^[77].

Vários métodos que incorporam tecnologias avançadas, têm sido propostos para quantificação de NO, tanto de forma direta quanto indireta, através de ensaios que reflitam a sua presença. A determinação direta de NO é obtida utilizando-se metodologias complexas (como a ressonância eletrônica paramagnética e a quimioluminescência) e detecção eletroquímica, através de sensores intravasculares.

Já a determinação indireta pode ser feita por dosagem plasmática ou urinária de nitrato e nitrito (produtos da reação do NO com o oxigênio), e de diversos outros marcadores [78,79,80].

Com base nesses aspectos, e objetivando reconfirmar o possível papel do NO nos efeitos anti-hipertensivos do MN, realizamos a determinação indireta de NOx, através da dosagem de NO^{2-} e NO^{3-} , porém, não foi identificada nenhuma diferença estatística entre os grupos a qual foi utilizado MN e VL.

Esse achado pode ser justificado pelo fato do NO se apresentar em uma concentração ínfima (geralmente menor ou igual a nanomolar); e por possuir caráter

radicalar (molécula neutra com 11 elétrons na camada de valência, e um elétron não emparelhado), o que lhe confere uma alta reatividade, especialmente frente a outras moléculas paramagnéticas, tais como oxigênio molecular (O_2) e ânion superóxido (O_2^-). Essa alta labilidade do NO, faz com que sua meia-vida seja extremamente curta: 5 a 10 segundos *in vitro*, 4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos nos tecidos ^[77,78,79].

Contrapondo aos nossos achados, estudo que buscava evidenciar a participação do NO na resposta de relaxamento induzida pelo labda-15-óico (diterpeno labdano), através da quantificação dos níveis teciduais de nitrato em anéis de aorta com endotélio, foi possível observar que a substância 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.

7. Conclusão

Em resposta aos objetivos propostos para a presente investigação, pode-se concluir que o MN é uma droga anti-hipertensiva, provavelmente dependente da função endotelial via NO/GMPc. Embora o inibidor da NOS seja inespecífico, existe grande possibilidade da síntese de NO a partir da L-arginina seja mediada pela isoforma constitutiva da NOS (eNOS) cuja expressão é dependente do cálcio.

Referências¹

- 1 Sociedade Brasileira de Cardiologia. **VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial**. Arq Bras Cardiol. 2010:1-51.
- 2 Hipertensão arterial sistêmica para o Sistema Único de Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006. 58 p. – (Cadernos de Atenção Básica; 16) (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- 3 Fonseca, F.A.H.; Izar, M.C.O. **Polimorfismos em genes relacionados ao Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona**: associação com a doença arterial coronariana e suas características anatômicas. Arquivos Brasileiros de Cardiologia - Volume 83, Nº 5, Novembro 2004.
- 4 Van Vark, L.C. et al. **Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce mortality in hypertension**: a meta analysis of randomized clinical trials of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors involving 158 998 patients. Eur Heart J 2012 Aug; 33 (16): 2088-97.
- 5 Ribeiro, W.; Muscará, M.N. **Características farmacocinéticas de antagonistas de cálcio, inibidores da ECA e antagonistas de angiotensina II em humanos**. Rev Bras Hipertens 8: 114-24, 2001.
- 6 Alarcón, G.V. **Fisiopatogenia de la hipertensión**. Vol. 76 Supl. 2/Abril-Junio 2006:S2, 157-160.
- 7 Rigatto, K.V.; Böhlke, M.; Irigoyen, M.C. **SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**: da Fisiologia ao Tratamento. Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul - Ano XIII nº 03 Set/Out/Nov/Dez 2004.
- 8 Irigoyen, M.C.; Consolim-Colombo, F.M.; Krieger, E.M. **Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático**. Rev Bras Hipertens 8: 55-62, 2001.

---

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

-
- 9 Padwal, R.; Straus, S.E.; McAlister, F.A. **Cardiovascular risk factors and their effects on the decision to treat hypertension**: evidence based review. BMJ: VOLUME 322 21 APRIL 2001.
- 10 Wright, J.M.; Lee, C.H.; Chambers, G.K. **Systematic review of antihypertensive therapies**: Does the evidence assist in choosing a first-line drug? CMAJ - JULY 13, 1999; 161 (1).
- 11 Pletschi, M. **Compostos naturais biologicamente ativos**. Biotecnologia ciência & Desenvolvimento.
- 12 Funari, C.S.; Ferro, V.O. **Uso ético da biodiversidade brasileira**: necessidade e oportunidade. Revista Brasileira de Farmacognosia, 15(2): 178-182, Abr./Jun. 2005.
- 13 Montanari, C.A.; Bolzani, V.S. **Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais**. Química Nova, 2001. 24(1): p. 105-111.
- 14 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Who police perspectives on medicines**. Geneva, 2002.
- 15 Awang, K. et al. **Cardiovascular activity of labdane diterpenes from Andrographis paniculata in isolated rat hearts**. Hindawi Publishing Corporation, Journal of Biomedicine and Biotechnology - Volume 2012, Article ID 876458, 5 pages, doi:10.1155/2012/876458.
- 16 Mondolis, E. et al. **Vasorelaxant effects in aortic rings of eight diterpenoids isolated from three Venezuelan plants**. Rev Bras Farmacogn 23(2013): 769-775.
- 17 Silva, R.M. et al. **Cardiovascular effects of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from Croton cajucara in rats**. Vascul Pharmacol 2005;43(1):11-8.
- 18 De Oliveira, A.P. 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)**. Vascul Pharmacol 2006;44(5):338-44.

- 19 Williams, B. **The Year in Hypertension**. JACC Vol. 55, No. 1, 2010, December 29, 2009/January 5, 2010:65–73.
- 20 Passos, V.M.A.; Assis, T.D.; Barreto, S.M. **Hypertension in Brazil**: Estimates from Population-Based Prevalence Studies. Epidemiologia e Serviços de Saúde 2006; 15(1) : 35 – 45.
- 21 Sociedade Brasileira de Cardiologia. **V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão**. Arq Bras Cardiol. 2006:1-78.
- 22 AMERICAN HEART ASSOCIATION, INC. **Hypertension**: The Hypertension primer project an educational experiment. Dallas, 1999. 33:167-168.
- 23 Olmos, R.D.; Lotufo, P.A. **Epidemiologia da hipertensão no Brasil e no mundo**. Rev Bras hipertens 9: 21-23, 2002.
- 24 Goldblatt, H.; Kahn, J.R.; Hanzal, R.F. **Studies of experimental hypertension**.
- 25 Phillips, M.I.; Schmidt-Ott, K.M. **The Discovery of Renin 100 Years Ago**. News Physiol. Sci. - Volume 14 - December 1999.
- 26 Lifton, R.P.; Gharavi, A.G.; Geller, D.S. **Molecular Mechanisms of Human Hypertension**. Cell, Vol. 104, 545–556, February 23, 2001.
- 27 Panza, J.A. et al. **Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension**. The new England journal of medicine. July 5, 1990. Vol. 323, n1.
- 28 Melis, M.S.; Sainati, A.R. **Effect of calcium and verapamil on renal function of rats during treatment with stevioside**. J Ethnopharmacol 1991;33(3): 257–62.
- 29 Calver, A.; Collier, J.; Valiance, P. **Inhibition and Stimulation of Nitric Oxide Synthesis in the Human Forearm Arterial Bed of Patients with Insulin-dependent Diabetes**. J. Clin. Invest. The American Society for Clinical Investigation, Inc. Volume 90, December 1992, 2548-2554.

-
- 30 Carey, R.M.; Wang, Z.Q.; Siragy, H.M. **Role of the Angiotensin Type 2 Receptor in the Regulation of Blood Pressure and Renal Function.** Hypertension. 2000;35[part 2]:155-163.
- 31 INTERNACIONAL UNION OF PHARMACOLOGY. XXIII. **The Angiotensin II Receptors.** Pharmacological Reviews, Vol. 52, No. 3. Pharmacol Rev, 52:415–472, 2000.
- 32 Cervenka, L. et al. **Essential Role of AT1A Receptor in the Development of 2K1C Hypertension.** Hypertension, November 2002.
- 33 Navar, L.G. et al. **Regulation of Intrarenal Angiotensin II in Hypertension.** Hypertension. 2002;39[part 2]:316-322.
- 34 CONSELHO BRASILEIRO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. **III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial.** Arq Bras Endocrinol Metab vol 43, n 4 Agosto, 1999.
- 35 Nigro, D.; Fortes, Z.B. **Efeitos farmacológicos dos diuréticos e dos bloqueadores dos canais de cálcio.** Rev Bras Hipertens vol. 12(2): 103-107, 2005.
- 36 Ribeiro, A.B. **Inibidores da renina:** uma nova classe de hipertensivos. Rev Bras Hipertens vol.13(3): 219-220, 2006.
- 37 Ribeiro, J.M.; Florêncio, L.P. **Bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina-aldosterona:** inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT1. Rev Bras Hipertens 3: 293-302, 2000.
- 38 Gonzaga, C.C.; Passarelli, O.; Amodeo, C. **Interações medicamentosas:** inibidores da enzima conversora da angiotensina, bloqueadores dos receptores da angiotensina II, inibidores diretos da renina. Rev Bras Hipertens vol.16(4):221-225, 2009.
- 39 Fazan, R.; Silva, V.J.D.; Salgado, H.C. **Modelos de hipertensão arterial.** Rev Bras Hipertens, vol 8(1): janeiro/março de 2001.

-
- 40 Matsubara, L.S. et al. **Remodelação miocárdica na sobrecarga crônica de pressão ou de volume no coração de ratos**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia - Volume 86, Nº 2, Fevereiro 2006.
- 41 Oparil, S.; Zaman, M.A.; Calhoun, D.A. **Pathogenesis of Hypertension**. 4/November/2003, Annals of Internal Medicine, Volume 139, number 9.
- 42 Dias, R. et al. **Hipertensão Arterial Experimental e Prenhez em Ratas: Uso do modelo Goldblatt I (1 rim - 1 clipe)**. RBGO - v. 21, nº 4, 1999.
- 43 Pinto, Y.M.; Paul, M.; Ganten, D. **Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic Engineering**. Cardiovascular Research 39 (1998) 77–88.
- 44 Ledingham, J.M. **Mechanisms in Renal Hypertension**. Proc. roy. Soc. Med. Volume 64, April/1971.
- 45 Sharifi, A.M. et al. **Alteration of local ACE activity and vascular responsiveness during development of 2K1C renovascular hypertension**. Pharmacol Res 2003; 47: 201-9.
- 46 Pinto, A.C. et al. **Produtos naturais: atualidade, desafios e respectivas**. Quim. Nova, Vol. 25, Supl. 1, 45-61, 2002.
- 47 Viegas, C.; Bolzani, V.S.; Barreiro, E.J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna**. Quim. Nova, Vol. 29, No. 2, 326-337, 2006.
- 48 Barbosa, J.M. et al. **Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980 – 2000**. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 16(3): 421-446, Jul./Set. 2006.
- 49 Souza, A.B. et al. **Antimicrobial evaluation of Diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria**. Molecules 2011, 16, 9611-9619; doi:10.3390/molecules16119611.

- 50 Gong, H.Y.; Zeng, Y.; Chen, X.Y. **Diterpene synthases and their responsible cyclic natural products**. Nat. Prod. Bioprospect. (2014) 4:59–72.
- 51 Saeidnia, S. et al. **Terpenes from the root of *Salvia hypoleuca* benth.** DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 2012, 20:66.
- 52 Caniard, A. et al. **Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfume manufacture**. BMC Plant Biology 2012, 12:119.
- 53 Li, X. et al. **A system-level investigation into the mechanisms of chinese traditional medicine: compound Danshen formula for cardiovascular disease treatment**. PLOS ONE - www.plosone.org, September 2012, volume 7, issue 9, e43918.
- 54 Wang, X. et al. **A systems biology approach to uncovering pharmacological synergy in herbal medicines with applications to cardiovascular disease**. Evidence-Based complementary and alternative medicine, volume 2012, article ID 519031.
- 55 Zerbe, P. et al. **Gene discovery of modular diterpene metabolism in nonmodel systems**^{1[W][OA]}. Plant Physiology, June 2013, Vol. 162, pp.
- 56 Shechter, I.; West, C.A. **Biosynthesis of Gibberellins: IV. Biosynthesis of cyclic diterpenes from tranx-geranylgeranyl pyrophosphate**. The journal of biological chemistry, vol. 244, no.12, issue of June 25, pp.3200-3209,1969.
- 57 Moreira, M.R. et al. **RP-HPLC analysis of manool-rich *Salvia officinalis* extract and its antimicrobial activity against bacteria associated with dental caries**. Rev Bras Farmacogn 23(2013): 870-876.
- 58 Ilkiu-Vidal, L.H.; Souza, J.R.P.; Viani, R.A.G. **Ação de potenciais hidrogeniônicos no crescimento e produtividade de sálvia (*Salvia officinalis* L.)**. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.12, n.1, p.43-47, 2010.

- 59 Pierozan, M.K. et al. **Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 29(4): 764-770, out.-dez. 2009.
- 60 Santos, M.R.V. et al. **Cardiovascular effects of monoterpenes: a review**. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 21(4): 764-771, Jul./Aug. 2011.
- 61 VALENTE, I.L.P. **Terpenóides de *Euphorbia mellifera* AIT.** - Pesquisa de moduladores do fenómeno de multirresistência em células tumorais. 2007. 154 f. Dissertação (Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica) - Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.
- 62 TEJERA, J.I.J. **Síntesis del diterpeno tipo labdano 12S-Zerumin B. Sartenejas**. 2005. 103 f. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em Química) - Coordinación de Licenciatura em Química, Universidad Simón Bolívar, Sartenejas, 2005.
- 63 Campagnole-Santos, M.J.; Haibara, A.S. **Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial**. Rev Bras Hipertens 8: 30-40, 2001.
- 64 Zago, A.S.; Zanesco, A. **Óxido Nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico**. Arq Bras Cardiol 2006; 87(6) : e264-e270.
- 65 Vanhoutte, P.M. **Endothelial control of vasomotor function (from health to coronary disease)**. Circulation Journal Vol.67, July 2003.
- 66 Singh, A.K.; Kedor-Hackmann, E.R.M.; Santoro, M.I.R.M. **Cromatografia líquida com fase quiral aplicada na separação enantiomérica de fármacos cardiovasculares**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 42, n. 4, out./dez., 2006.
- 67 FERREIRA, L.G. **Efeito do ácido rosmarínico sobre a pressão arterial em ratos normotensos e hipertensos**. 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- 68 Hippolyte, I. et al. **Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L.** Plant Cell Reports (1992) 11:109-112.

- 69 Magos, G.A. et al. **Hypotensive and vasorelaxant effects of the procyanidin fraction from *Guazuma ulmifolia* bark in normotensive and hypertensive rats.** Journal of ethnopharmacology. 2008 Apr 17;117(1):58-68.
- 70 Junior, V.F.V.; Pinto, A.C. **Plantas medicinais: cura segura?** Quim. Nova, Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.
- 71 El Bardai, S. et al. **The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*.** Planta Med (2003). 69, 75-77.
- 72 Oliveira, A.P. 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). 44, 338-344.
- 73 Lahlou, S. et al. **Mechanisms underlying the cardiovascular effects of a labdenic diterpene isolated from *Moldenhawera nutans* in normotensive rats.** Vasc. Pharmacol (2007). 46, 60-66.
- 74 Leung, P.C. et al. **Ten Years' Research on a Cardiovascular Tonic: A Comprehensive Approach—From Quality Control and Mechanisms of Action to Clinical Trial.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2013, Article ID 319703, 6 pages.
- 75 Tirapelli, C.R. et al. **Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: A therapeutic promise for the treatment of hypertension.** Fitoterapia 81 (2010) 690–702.
- 76 El Bardai, S. et al. **The vasorelaxant activity of Marrubenol and Marrubiin from *Marrubim vulgare*.** Planta Med, 2003; 69: 75 -77.
- 77 Lindner, E.; Dohadwalla, A.N.; Bhattacharya, B.K. **Positive inotropic and blood pressure lowering activity of a diterpene derivative isolated from *Coleus forskohli*:** Forskolin. Arzneimittelforschung. 1978;28(2):284-9.
- 78 Bhat, S.V. et al. **The antihypertensive and positive inotropic diterpene forskolin: effects of structural modifications on its activity.**

JMedChem. 1983, Apr;26(4):486-92.

79 de Oliveira, A.P. 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).** Vascul Pharmacol. 2006 May;44(5):338-44. Epub 2006, Mar 9.

80 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.

81 Lincoln, T.M.; 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.

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

83 Seamon, K.B.; Padgett, W.; Daly, J.W. **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.

84 Tirapelli, C.R. et al. **Pharmacological comparison of the vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid and pimaradienoic acid.** J Pharm Pharmacol. 2005 Aug;57(8):997-1004.

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

86 Moncada, S.; Palmer, R.M.; Higgs, E.A. **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.

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

- 88 Silva, R.M. et al. **Cardiovascular effects of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from Croton cajucara in rats.** Vascu Pharmacol. 2005 Jun;43(1):11-8.
- 89 Murad F. **The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication.** Recent Prog Horm Res. 1994;49:239-48.
- 90 Insel, P.A.; Ostrom, R.S. **Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling.** Cell Mol Neurobiol. 2003 Jun;23(3):305-14.
- 91 McDaniel, N.L. et al. **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.
- 92 Miyoshi, H.; Nakaya, Y.; Moritoki, H. **Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATPsensitive K^+ channel of vascular smooth muscle cells.** FEBS Lett. 1994 May 23;345(1):47-9.
- 93 Murad, F.J. **Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation.** Clin. Invest. 1986 Jul;78(1):1-5.
- 94 Garthwaite, J. et al. **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.