

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

ITALO ROSSI ROSENO MARTINS

**PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE POTÁSSIO NO EFEITO
RELAXANTE DO ÁCIDO *ENT-7 α* -HIDROXITRAQUILOBAN-18-OICO
EM TRAQUEIA ISOLADA DE COBAIA**

João Pessoa - PB

2012

ITALO ROSSI ROSENO MARTINS

**PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE POTÁSSIO NO EFEITO
RELAXANTE DO ÁCIDO *ENT-7 α* -HIDROXITRAQUILOBAN-18-OICO
EM TRAQUEIA ISOLADA DE COBAIA**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos do
Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal da Paraíba como
parte dos requisitos para obtenção do
título de MESTRE EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS.
Área de Concentração:
FARMACOLOGIA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

João Pessoa - PB

2012

M386p Martins, Italo Rossi Roseno.

Participação dos canais de potássio no efeito relaxante do ácido ent-7 α -hidroxitraquiloban-18-oico em traqueia isolada de cobaia / Italo Rossi Roseno Martins. - - João Pessoa: [s.n.], 2012.

135f. : il.

Orientadora: Bagnólia Araújo da Silva.

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. *Xylopi* *langsdo* *fiana*. 3. Annonaceae. 4. Canais de potássio. 5. Diterpeno. 6. Traquilobano.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

ITALO ROSSI ROSENO MARTINS

**PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE POTÁSSIO NO EFEITO
RELAXANTE DO ÁCIDO *ENT-7 α* -HIDROXITRAQUILOBAN-18-OICO
EM TRAQUEIA ISOLADA DE COBAIA**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos do
Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal da Paraíba como
parte dos requisitos para obtenção do
título de MESTRE EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS.
Área de Concentração:
FARMACOLOGIA

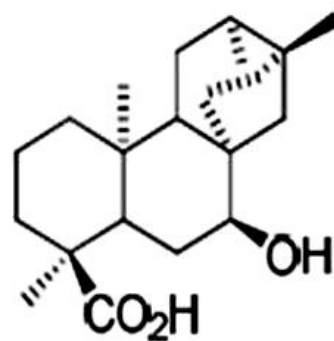
Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
Orientadora

Profa. Dra. Tatiane Santi Gadelha
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Externa

Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Interno

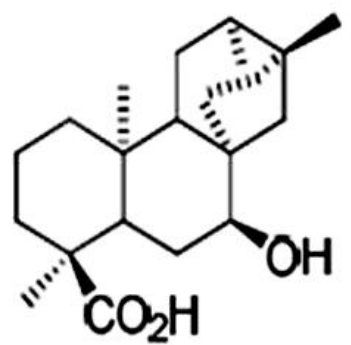


Dedicat3ria

Aos meus pais, Benedito Martins Filho e Maria Zilá Roseno Martins, por todo empenho e amor que tiveram por mim até hoje, por acreditarem no caminho que escolhi para minha vida e sempre o apoiarem incondicionalmente.

Aos meus irmãos, Priscilla Karla Roseno Martins e Lucas Vinícius Roseno Martins, pelo apoio e torcida desprendidos a mim durante toda a minha trajetória acadêmica e pessoal.

A minha amada companheira de todas as horas e momentos, Jacqueline Alves Leite, por todo amor, compreensão e apoio. Enfim, por tornar essa longa estrada que tomamos como vida mais prazerosa e afável.



Agradecimientos

A Deus por todas as oportunidades, mas principalmente pelos desafios e dificuldades, colocados em minha vida, por ter me concedido a coragem, paciência e disposição para assim encontrar a melhor saída possível, que nem sempre é a vitória, mas que sempre nos deixa um ensinamento para a vida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva pelo exemplo de moral e conduta que possui, sempre nos estimulando a dar o melhor que temos, e se ainda não o temos, mostra o caminho a ser traçado. Um modelo de profissional e mestre que todos deveriam adotar.

Aos amigos queridos do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas: Ana Caroline L. Silva, Gislaine A. Oliveira, Juliana N. Carreiro e Rafael A. Travassos pelo companheirismo, amizade, apoio científico e por partilharem comigo os mais diversos momentos e sentimentos que este meio nos é capaz de proporcionar.

A minhas tutoras científicas Fabiana A. Cavalcante e Rosimeire F. Santos por todos os ensinamentos de bancada, acadêmicos e pessoais que com certeza serão muito úteis na minha vida.

A todos os colegas e amigos que estão ou passaram pelo Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, entre eles, Aline F. Brito, Ana Carolina C. Correia, Anne Kaliery A. Alves, Maria da Conceição C. Silva, Cybelle A. N. Silva, Cibério L. Macêdo, Fabio S. Monteiro, Fernando R. Queiroga, Iara L. L. Souza, Joedna C. Pereira, Joelmir L. V. Silva, José Rabelo, Luiz H. C. Vasconcelos, Massilon S. M. Santos Junior, Núbia M. Sousa, Polyana C. B. Silva e Tamiris F. Ferreira pela ajuda, amizade e boa convivência.

A todos os colegas e amigos da turma do Mestrado 2010 do PPgPNSB pelos bons momentos e aperreios passados juntos.

Aos professores deste Programa de Pós-Graduação que contribuíram tanto com a minha formação acadêmica.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos em nome dos Professores Dra. Maria de Fátima Agra e Dr. Josean Fachine Tavares pela competência pela qual coordenam este Programa.

À Tania Maria Alves e Caroline Manguiera, secretárias da Pós-Graduação, por toda dedicação e eficiência.

À Direção do então Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF/UFPB), hoje Centro de Biotecnologia (CBiotec/UFPB) na pessoa do Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga pelo apoio Institucional.

A José Crispim Duarte pela competência e auxílio técnico nos mais variados problemas no Laboratório e no Biotério.

A Luís Cordeiro e Adriano Cordeiro pela colaboração no Biotério e no laboratório, por sua prestatividade e dedicação aos trabalhos do PgPNSB.

A Mônica da manutenção por sua alegria, bom humor e por manter nosso ambiente de trabalho/estudo sempre em condições salutareas para nossas tarefas diárias.

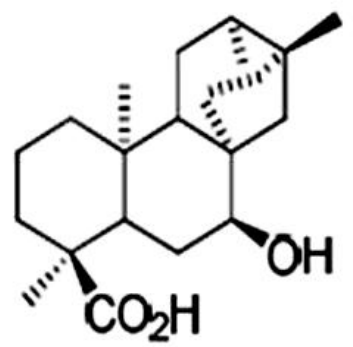
Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida e pelo suporte técnico-científico através do Portal Periódicos, respectivamente.

À Universidade Federal da Paraíba, instituição responsável pela minha formação profissional.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a produção desta dissertação de mestrado.

Muito Obrigado!

Italo Rossi Roseno Martins

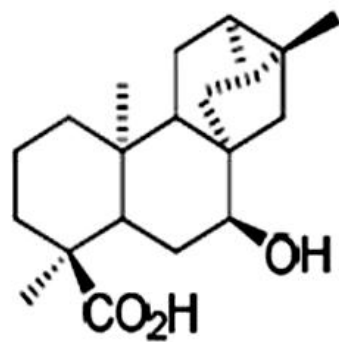


Resumo

RESUMO

A partir das cascas do caule de *Xylopia langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul. foi isolado o diterpeno da classe dos traquilobanos, *ent-7 α* -hidroxitraquiloban-18-oico (traquilobano-318) que em estudos anteriores mostrou-se capaz de relaxar a traqueia de cobaia pré-contraída com carbacol (CCh). Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o mecanismo de ação envolvido nesta atividade relaxante do traquilobano-318. Os anéis de traqueia foram suspensos em cubas para órgão isolado, contendo solução de Krebs, a 37° C e aerados com carbogênio. As contrações isométricas foram registradas com o auxílio de um sistema de aquisição digital. Para avaliar uma possível ação direta do diterpeno sobre o complexo Ca²⁺-calmodulina foi utilizado a clorpromazina (CPZ) (10⁻⁶ M), um inibidor da calmodulina, e observou-se que o efeito relaxante do traquilobano-318 (pD₂ = 4,38 ± 0,07, n = 5) não foi significativamente alterado na presença deste inibidor (pD₂ = 4,25 ± 0,07, n = 5). Em seguida foi realizado um protocolo usando diferentes concentrações extracelulares de potássio (K⁺) que indicaram que o traquilobano-318 estaria agindo como um possível ativador dos canais de K⁺, uma vez que seu efeito relaxante mostrou-se mais potente quando a traqueia era pré-contraída por 18 mM de KCl (pD₂ = 4,90 ± 0,25, n = 5) do que quando pré-contraída por 60 mM de KCl (pD₂ = 3,88 ± 0,01, n = 5). Para confirmar a participação dos canais de K⁺ utilizou-se um bloqueador não seletivo destes canais, tetraetilamônio (TEA⁺) (10 mM) que foi pré-incubado antes da adição de CCh, o que resultou na atenuação do relaxamento promovido pelo diterpeno (pD₂ = 4,01 ± 0,06, n = 5). Com o objetivo de se determinar quais subtipos de canais de potássio estariam envolvidos na ação relaxante do traquilobano-318, a curva de relaxamento do diterpeno foi avaliada na presença de vários bloqueadores seletivos destes canais. O fato da curva de relaxamento do traquilobano-318 (pD₂ = 4,38 ± 0,07) ter sido desviada para direita, de maneira significativa, na presença de 4-AP, bloqueador dos canais de K⁺ sensíveis a voltagem (K_v) (pD₂ = 3,91 ± 0,003); glibenclamida, bloqueador dos canais de K⁺ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (pD₂ = 4,00 ± 0,06); apamina, bloqueador dos canais de K⁺ ativados pelo cálcio de pequena condutância (SK_{Ca}) (pD₂ = 3,45 ± 0,14) e na presença de iberiotoxina, bloqueador dos canais de K⁺ ativados pelo cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) (pD₂ = 3,80 ± 0,05) sugere que o diterpeno está modulando positivamente estes canais para exercer seu efeito relaxante. Por outro lado a participação dos canais de potássio retificadores de entrada (K_{ir}) foi descartada pois a curva de relaxamento do traquilobano-318 não foi alterada (pD₂ = 4,15 ± 0,10, n = 5) na presença do BaCl₂, bloqueador seletivos destes canais. A participação dos nucleotídeos cíclicos foi descartada, uma vez que a curva de relaxamento em traqueia pré-contraída por CCh obtida com aminofilina (pD₂ = 4,27 ± 0,09, n = 5), um inibidor não seletivo das fosfodiesterases (PDEs), não foi alterada na presença do traquilobano-318 (pD₂ = 4,46 ± 0,08, n = 5). Assim, o efeito relaxante do traquilobano-318 parece envolver a modulação positiva dos subtipos de canais de potássio K_{ATP}, K_v, SK_{Ca} e BK_{Ca} em traqueia isolada de cobaia.

Palavras-chave: músculo liso das vias aéreas, canais de potássio, diterpeno, traquilobano, *Xylopia langsdorfiana*, Annonaceae.



Abstract

ABSTRACT

From *Xylopia langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul. stem bark was isolated the diterpene of trachylobane class, *ent*-7 α -hydroxytrachyloban-18-oic acid (trachylobane-318) that in previous studies showed to be able to relax guinea-pig trachea pre-contracted by carbachol (CCh). Thus, we aimed to investigate the action mechanism underlying in this trachylobane-318 relaxant activity. Trachea rings were suspended in organ baths, containing Kreb's solution, at 37 °C and aired with carbogenic mixture. Isometric contractions were registered using a digital acquisition system. In order to evaluate a direct effect of the diterpene in Ca²⁺-calmodulin complex was used chlorpromazine (CPZ) (10⁻⁶ M), a calmodulin inhibitor, and we observed that trachylobane-318 relaxation effect (pD₂ = 4.38 $\pm$ 0.07, n = 5) was not significantly altered in presence of this inhibitor (pD₂ = 4.25 $\pm$ 0.07, n = 5). Then, was performed a protocol using different potassium (K⁺) extracellular concentrations which indicated that trachylobane-318 would be acting as a possible potassium channels activator since its relaxation was more potent when guinea-pig trachea was pre-contracted by KCl 18 mM (pD₂ = 4.90 $\pm$ 0.25, n = 5) than by KCl 60 mM (pD₂ = 3.88 $\pm$ 0.01, n = 5). To confirm the potassium channels participation was used a non-selective potassium channels blocker, tetraethylammonium (TEA⁺) 10 mM, that was pre-incubated before CCh addition, that resulted in an attenuation of diterpene relaxation (pD₂ = 4.01 $\pm$ 0.06, n = 5). To determinate which potassium channels subtypes would be involved in the trachylobane-318 action, the diterpene relaxation curve was assessed in the presence of several potassium channels selective blockers. The fact of the trachylobane-318 relaxation curve was shifted to the right in a significant manner in the presence of 4-AP, a selective blocker of voltage activated K⁺ channels (K_v) (pD₂ = 4.00 $\pm$ 0.06, n = 5); glibenclamide, a selective blocker of ATP-sensitive K⁺ channel (K_{ATP}) (pD₂ = 3.91 $\pm$ 0.003, n = 5); apamin, a selective blocker of small conductance calcium-activated K⁺ channels (SK_{Ca}) (3.45 $\pm$ 0.14, n = 5) and big conductance calcium-activated K⁺ channels (BK_{Ca}) (3.80 $\pm$ 0.05, n = 5) is suggestive that the diterpene is modulating positively these channels to exert its relaxant effect. On the other hand, the inwardly rectifying K⁺ channels (K_{ir}) was discarded since the relaxation curve was not altered (pD₂ = 4.15 $\pm$ 0.10, n = 5) in the presence of BaCl₂, selective blocker of these channels. Cyclic nucleotides participation was discarded since the relaxation curve obtained with aminophylline on guinea-pig contracted by CCh (pD₂ = 4.27 $\pm$ 0.09, n = 5), a phosphodiesterases (PDEs) non-selective inhibitor, was not altered in trachylobane-318 presence (pD₂ = 4.46 $\pm$ 0.08, n = 5). Thus, trachylobane-318 relaxant effect seems to involve the positive modulation of potassium channels subtypes K_v, K_{ATP}, SK_{Ca} and BK_{Ca} on guinea pig trachea.

Keywords: airway smooth muscle, potassium channels, diterpene, trachylobane, *Xylopia langsdorfiana*, Annonaceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de distribuição da família Annonaceae no mundo, representado em vermelho	25
Figura 2 – Foto de <i>Xylopia langsdorfiana</i> A. St.-Hil. & Tul. (A); detalhes da folha e da flor (B)	27
Figura 3 – Estrutura química do ácido <i>ent</i> -7 α -acetoxitraquilobano-18-oico (traquilobano-360)	29
Figura 4 – Estrutura química do ácido <i>ent</i> -7 α -hidroxitraquilobano-18-oico (traquilobano-318)	29
Figura 5 – Esquema da via da fosfolipase C	33
Figura 6 – Regulação independente de Ca ²⁺ da fosforilação e desfosforilação da MLC ₂₀	35
Figura 7 – Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 10 ⁻⁶ M de CCh na ausência (A) e na presença de 10 ⁻⁶ M de clorpromazina (B) em traqueia isolada de cobaia	55
Figura 8 – Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 18 mM de KCl (A) e por 60 mM de KCl (B) em traqueia isolada de cobaia.	58
Figura 9 – Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 10 ⁻⁶ M de CCh na ausência (A) e na presença de 10 mM de TEA ⁺ (B) em traqueia isolada de cobaia	61

Figura 10 – Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 2×10^{-3} M de 4-AP (B) em traqueia isolada de cobaia.....64

Figura 11 – Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 3×10^{-6} M de glibenclamida (B) em traqueia isolada de cobaia..66

Figura 12 – Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10^{-6} M de apamina (B) em traqueia isolada de cobaia.....68

Figura 13 - Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10^{-7} M de IbTx (B) em traqueia isolada de cobaia.....70

Figura 14 - Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10^{-4} M de BaCl_2 (B) em traqueia isolada de cobaia.....72

Figura 15 - Registro representativo do efeito relaxante da aminofilina sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 3×10^{-5} M do traquilobano-318 (B) em traqueia isolada de cobaia76

Figura 16 – Esquema representativo do mecanismo de ação relaxante do traquilobano-318 em traqueia isolada de cobaia.....90

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência (○) e presença (●) de clorpromazina em anéis traqueia de cobaia56
- Gráfico 2** – Efeito relaxante (A) e os valores de pD_2 (B) do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 18 mM de KCl (□) e 60 mM de KCl (■) em anéis de traqueia isolada de cobaia59
- Gráfico 3** – Efeito relaxante (A) e os valores de pD_2 (B) do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh em anéis de traqueia isolada de cobaia na ausência (○) e na presença (◆) de 10 mM de TEA^+ 62
- Gráfico 4** – Efeito relaxante (A) e os valores de pD_2 (B) do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh em anéis de traqueia isolada de cobaia na ausência (○) e na presença (■) de 2×10^{-3} M de 4-AP65
- Gráfico 5** – Efeito relaxante (A) e os valores de pD_2 (B) do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh em anéis de traqueia isolada de cobaia na ausência (○) e na presença (▼) de 3×10^{-6} M de glibenclamida67
- Gráfico 6** – Efeito relaxante (A) e os valores de pD_2 (B) do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh em anéis de traqueia isolada de cobaia na ausência (○) e na presença (▲) de 10^{-6} M de apamina69
- Gráfico 7** – Efeito relaxante (A) e os valores de pD_2 (B) do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh em anéis de traqueia isolada de cobaia na ausência (○) e na presença (★) de 10^{-7} M de IbTx71
- Gráfico 8** – Efeito relaxante do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh em anéis de traqueia isolada de cobaia na ausência (○) e na presença (◇) de 10^{-4} M de $BaCl_2$73

Gráfico 9 – Efeito relaxante da aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh em anéis de traqueia isolada de cobaia na ausência ($\triangle$) e na presença ($\blacktriangle$) de 3×10^{-5} M de traquilobano-318**77**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise entre os valores de pD_2 de traquilobano-318 em traqueia de cobaia na ausência e presença dos bloqueadores de canais de K^+	74
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

$[(Ca^{2+})_4\text{-CaM}]$	complexo cálcio - calmodulina
$[Ca^{2+}]$	concentração de Ca^{2+}
$[Ca^{2+}]_c$	concentração de Ca^{2+} citosólico
$[K^+]_e$	concentração extracelular de potássio
$[K^+]_i$	concentração intracelular de potássio
4-AP	4-aminopiridina
AA	ácido araquidônico
ACh	acetilcolina
AMPc	monosfato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
BK_{Ca}	canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de grande condutância
CaM	calmodulina
Ca_v	canais de cálcio dependentes de voltagem
Ca_v1	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 1
Ca_vL	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L
CBiotec	Centro de Biotecnologia
CCh	carbacol
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CE₅₀	concentração molar de uma substância necessária para produzir 50% de seu efeito máximo
CPI-17	inibidor da fosfatase da miosina potencializado pela PKC
CPZ	clorpromazina
DAG	diacilglicerol

e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
G_{q/11}	proteína G _q ou proteína G ₁₁
G_{αq}	subunidade α da proteína G _q
G_{12/13}	proteína G ₁₂ ou proteína G ₁₃
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	receptor acoplado à proteína G
GTP	trifosfato de guanosina
IbTx	iberiotoxina
IK_{Ca}	canais de K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de condutância intermediária
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP₃ R	receptor de IP ₃
K_{ATP}	canais de potássio sensíveis ao ATP
K_{Ca}	canais de potássio ativados por Ca ²⁺
K_{ir}	canais de potássio retificadores de entrada
K_v	canais de K ⁺ dependentes de voltagem
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
MLCP	fosfatase da cadeia leve da miosina
MYPT1	subunidade 1 condutora da fosfatase da miosina
NO	óxido nítrico
pD₂	logaritmo negativo, na base 10, da CE ₅₀
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	proteína cinase dependente de AMPc
PKG	proteína cinase dependente de GMPc
PLC	fosfolipase C

PLD	fosfolipase D
PMCA	Ca ²⁺ ATPase da membrana plasmática
PPgPNSB	Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
RhoA	pequena proteína G ligante de GTP
ROK	cinase dependente de RhoA
RYR	receptor de rianodina
RS	retículo sarcoplasmático
SERCA	Ca ²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático
SK_{Ca}	canais de K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de pequena condutância
TEA⁺	íon tetraetilamônio
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
V_m	potencial de membrana
ZIPK	proteína cinase de interação zíper

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Produtos naturais	23
1.2 A Família Annonaceae e a espécie <i>Xylopia langsdorfiana</i> A.St.-Hil. & Tul	25
1.3 Regulação da contração e relaxamento do músculo liso	30
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivos gerais.....	43
2.2 Objetivos específicos.....	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 MATERIAL	45
3.1.1 Material botânico	45
3.1.2 Substância teste	45
3.1.3 Animais.....	45
3.1.4 Drogas e reagentes	46
3.1.5 Soluções nutritivas	46
3.1.6 Preparação da solução-estoque da substância em estudo	47
3.1.7 Aparelhos	47
3.2 MÉTODOS	48
3.2.1 Investigação do mecanismo de ação do traquilobano-318 em traqueia isolada de cobaia.....	48
3.2.1.1 Preparação dos anéis de traqueia isolada de cobaia	48
3.2.1.2 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol na ausência e na presença de clorpromazina	49

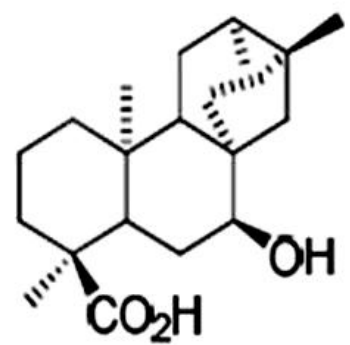
3.2.1.3 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 18 ou 60 mM de KCl.....	49
3.2.1.4 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol na ausência e na presença de TEA ⁺ (10 mM)	50
3.2.1.5 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol na ausência e na presença de 4-AP, glibenclamida, apamina, IbTx e BaCl ₂	50
3.2.1.6 Efeito do traquilobano-318 no relaxamento induzido por aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol.....	51
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
4 RESULTADOS.....	53
4.1 Investigação do mecanismo de ação do traquilobano-318 em traqueia isolada de cobaia.....	54
4.1.1 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol na ausência e na presença de clorpromazina	54
4.1.2 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 18 ou 60 mM de KCl em traqueia isolada de cobaia	57
4.1.3 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol na ausência e na presença de TEA ⁺ (10 mM).....	60
4.1.4 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol na ausência e na presença de 4-AP, glibenclamida, apamina, IbTx e BaCl ₂	63
4.1.5 Efeito do traquilobano-318 no relaxamento induzido por aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol.....	75
5 DISCUSSÃO	78
6 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS.....	91

APÊNDICE..... 109

Apêndice A - Artigo submetido à revista científica Fundamental & Clinical Pharmacology 110

ANEXO 135

Anexo A - Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) 136



1 Introdução

1.1 Produtos naturais

Ao longo dos tempos, a natureza tem suprido as necessidades básicas dos seres humanos, fornecendo inúmeros produtos naturais para o tratamento de um amplo espectro de enfermidades (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009). Sendo ainda relatado que desde o início da vida social organizada, a humanidade tem buscado combater as doenças e melhorar a sua qualidade de vida através de uma série de tentativas e erros, os quais construíram o conhecimento sobre as ervas medicinais que foram reunidos e resumidos em farmacopeias que remontam à antiguidade (BORCHARDT, 2002).

A história do desenvolvimento das civilizações oriental e ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque as civilizações egípcia, greco-romana e chinesa. Esta última desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados pela atual farmacologia na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

As plantas, em particular, têm desempenhado um papel dominante no desenvolvimento de sofisticados sistemas da medicina tradicional (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009), fornecendo um vasto arsenal terapêutico contra inúmeras doenças, desde as mais simples até as mais complexas, compreendendo assim uma fonte de inestimável valor às necessidades medicinais da humanidade.

Os produtos naturais têm servido como fonte e inspiração para uma grande fração da atual farmacopeia. Uma revisão realizada por Newman e Cragg (2007) analisando as fontes de novas drogas entre os anos de 1981 e 2006, e utilizando uma definição bastante ampla do que constitui uma “droga derivada de produto natural” também indicou que quase 50% das novas drogas introduzidas neste período eram originadas de produtos naturais, reforçando a ideia anteriormente exposta. Embora as estimativas variem, é seguro dizer que entre 25 e 50% dos medicamentos atualmente comercializados devem suas origens aos produtos naturais (KINGSTON, 2011).

Um exemplo desta utilização foi que, em 1806, o jovem farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Adam Serturner (1783–1841) relatou o isolamento de um pó cristalino branco a partir do ópio (*Papaver somniferum*), o qual recebeu o nome de morfina, em alusão a Morpheus (deus grego dos sonhos) (HUXTABLE; SCHWARZ, 2001). O isolamento da morfina foi o marco inicial para a descoberta de muitos outros produtos naturais utilizados na terapêutica, incluindo estricnina, colchicina, codeína, entre outros (HESSE, 2002). Dessa forma, mesmo após mais de 200 anos, a morfina ainda tem sido utilizada por suas propriedades analgésicas, sendo considerado um dos fármacos mais potentes desta classe terapêutica, e ainda servindo como inspiração para obtenção de novas moléculas com atividades biológicas relevantes.

Adicionalmente, 13 drogas relacionadas a produtos naturais foram aprovadas entre 2005 e 2007, das quais 5 destas são mencionadas como sendo o primeiro representante (protótipo) de novas classes de drogas: os peptídios exenatide (controle do *diabetes mellitus* tipo II) e ziconotide (potente analgésico não opióide e não AINEs), além das moléculas ixabepilone (agente anti-tumoral), retapamulin (agente antibacteriano contra impetigo) e trabectedin (agente anti-tumoral) (HARVEY, 2008). Dessa forma, a natureza como uma fonte não só de agentes quimioterápicos potenciais, mas também de compostos que serviram de base e inspiração para a semissíntese ou síntese total de novos fármacos ainda mostra-se uma alternativa bastante interessante e viável.

Em adição, a vinblastina, a quinina, a vincristina, a artemisinina, o etoposídeo, o teniposídeo, o paclitaxel e os derivados de camptotecina, topotecano e irinotecano também são exemplos de fármacos isolados de plantas que contribuíram de maneira significativa para ampliação das possibilidades terapêuticas na espécie humana (KINGSTON, 2011).

Dessa maneira, partindo do princípio que o Brasil é o país de maior biodiversidade mundial e de onde a grande maioria das plantas nativas ainda não tem estudos farmacológicos e/ou fitoquímicos, sendo assim um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas, vislumbrando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos (FOGLIO et al., 2006).

carminativo, tônico pós-parto, para distúrbios estomacais, no tratamento de bronquite, em distúrbios biliares e disenteria (ASFAW; DEMISSEW, 1994), assim como para o tratamento da malária (ETKIN, 1997). As sementes de *Xylopia frutescens* Aubl. são usadas no Brasil como agente antimicrobiano e contra reumatismo, entre outros usos (MELO et al., 2001). Atividades leishmanicida e tripanossomicida já foram relatadas anteriormente para *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. (OSORIO et al., 2007).

Diversas classes de metabólitos secundários têm sido encontradas em várias espécies do gênero *Xylopia*, das quais se destacam as acetogeninas (ALFONSO et al., 1996; COLMAN-SAIZARBITORIA et al., 1995, 1994), sesquiterpenos, alcaloides (MARTINS et al., 1998; SILVA et al., 2009), flavonoides (SANTOS; SALATINO, 2000) e terpenoides, estes tendo uma importância tanto para a sobrevivência das espécies de *Xylopia* como propriedades biológicas benéficas para os humanos (AHARONI et al., 2005).

Os terpenoides podem ser ainda subdivididos em outras categorias de acordo com a quantidade de grupos isoprênicos existentes na molécula, porém dentre estas classes acredita-se que os diterpenos, como por exemplo, labdanos, cauranos, caurenos e traquilobanos (CAMPOS DE ANDRADE et al., 2004; MARTINS et al., 1998; MELO et al., 2001; TAVARES et al., 2006; VILEGAS et al., 1991) sejam metabólitos secundários característicos das espécies de *Xylopia*, e assim com potencial quimiotaxonômico para este gênero (VILEGAS et al., 1991).

A espécie *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (Figura 2) é uma árvore medindo de 5 a 7 metros de altura (MAAS et al., 2001), sendo popularmente conhecida como “pimenteira-da-terra” no Nordeste do Brasil, porém sem uso conhecido na medicina popular (CORRÊA, 1984).

Figura 2 - Foto de *Xylopia langsdorffiana* A. St.-Hil. & Tul. (A); detalhes da folha e da flor (B).



Fonte: Fernando A. C. Viana, 2007.

O extrato etanólico bruto (EEtOH) das partes aéreas de *Xylopia langsdorffiana* é relatado por apresentar atividade antidiarréica em camundongos (SILVA et al., 2010). Além disso, o EEtOH e a fase hexânica (FaHex) das partes aéreas de *X. langsdorffiana* mostraram atividade gastroprotetora em ratos (MONTENEGRO et al., 2011).

Da fase hexânica obtida do extrato etanólico bruto das cascas do caule de *X. langsdorffiana* foi isolado um diterpeno da classe dos labdanos, identificado como sendo o ácido 8(17),12E,14-labdatrieno-18-oico (labdano-302) que mostrou efeito espasmolítico em útero isolado de rata e íleo isolado de cobaia, bem como efeito relaxante em traqueia isolada de cobaia e aorta isolada de rato (RIBEIRO, 2003).

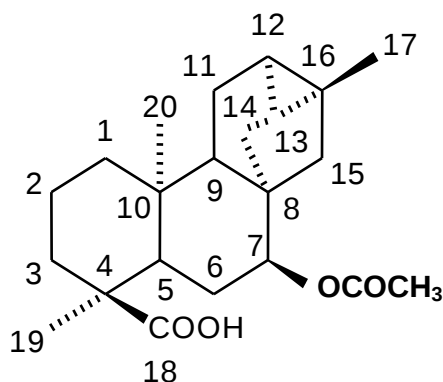
Em traqueia de cobaia, o efeito relaxante do labdano-302 envolve a ativação dos canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de grande condutância (BK_{Ca}) e da proteína cinase dependente de AMPc (PKA) (RIBEIRO et al., 2007). Em aorta de rato, o mecanismo pelo qual o labdano-302 promove relaxamento se dá pela ativação de

canais de potássio sensíveis a voltagem e retificadores de entrada (K_V e K_{ir} , respectivamente), além da ativação da via de sinalização monosfato cíclico de adenosina (AMPC)-PKA e bloqueio dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (Ca_VL). O labdano-302 ainda reduz as correntes de K^+ através dos K_V 1.3, expressos heterologamente em células de fibroblastos de camundongo da linhagem L929, sendo este efeito provavelmente dependente da fosforilação dos K_V 1.3 via PKA (RIBEIRO, 2007).

Além disso, o labdano-302 também possui atividade hipotensora e taquicárdica reflexa em ratos normotensos não anestesiados e efeito vasorelaxante em artéria mesentérica superior de ratos (OLIVEIRA et al., 2006). Em íleo de cobaia, a ação espasmolítica de labdano-302 se dá por modulação positiva dos canais de K^+ , o que indiretamente bloqueia o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V (MACÊDO, 2008). Em útero isolado de rata, o labdano-302 exerce seu efeito tocolítico por modulação positiva dos canais de potássio de pequena condutância ativados por cálcio (SK_{Ca}) além da participação de fosfodiesterases (PDEs) (TRAVASSOS, 2010).

Outro diterpeno, da classe dos traquilobanos, foi isolado da fase hexânica do extrato etanólico bruto das cascas do caule de *X. langsdorfiana* e identificado como ácido *ent-7 α -acetoxitraquiloban-18-oico*, codificado como traquilobano-360 (Figura 3). Havendo relatos de seu efeito antitumoral em células leucêmicas (SILVA et al., 2005), bem como, em células de sarcoma 180 (PITA et al., 2009); atividade moluscicida frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata* (QUEIROGA et al., 2006) e atividade antinociceptiva no modelo de contorção abdominal em camundongos Swiss (CUPERTINO-SILVA et al., 2006).

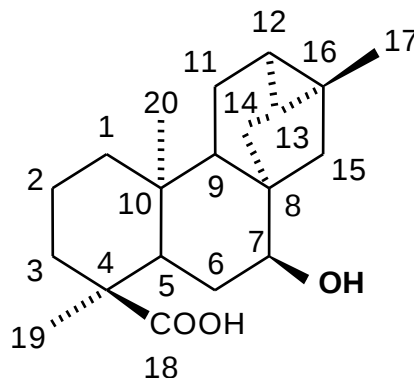
Figura 3 - Estrutura química do ácido *ent*-7 α -acetoxitraquiloban-18-oico (traquilobano-360).



Fonte: Tavares et al., 2006.

Outro diterpeno isolado da fase hexânica do extrato etanólico bruto das cascas do caule de *X. langsdorfiana* foi o ácido *ent*-7 α -hidroxitraquiloban-18-oico, codificado como traquilobano-318 (Figura 4), e que até então havia sido somente estudado quanto a sua atividade antitumoral em células de sarcoma 180 (PITA et al., 2009). Devido ao baixo rendimento na obtenção deste diterpeno, torna-se mais viável a sua obtenção por síntese a partir do traquilobano-360, onde a partir deste precursor é feita uma modificação estrutural na posição 7, no grupo acetato de etila, através de uma reação de desacetilação gerando um grupo hidroxila na mesma posição, e assim originando-se o traquilobano-318 com um rendimento aproximado de 80%.

Figura 4 - Estrutura química do ácido *ent*-7 α -hidroxitraquiloban-18-oico (traquilobano-318).



Fonte: Tavares et al., 2006.

Em nosso laboratório foi realizada uma triagem farmacológica do traquilobano-360 e traquilobano-318 em modelos experimentais de vários músculos lisos (útero de rata, aorta de rato, traqueia e íleo de cobaia). Nesses estudos foi constatado que ambos os compostos não possuíam atividade espasmolítica significativa em útero de rata e aorta de rato, mas apresentaram efeito espasmolítico em íleo de cobaia (SANTOS, 2010; SANTOS et al., 2011a). Em especial, no íleo de cobaia, ambos os diterpenos relaxaram este órgão através da modulação positiva dos canais de potássio e modulação negativa dos Ca_v , eventos que culminam com a redução da $[Ca^{2+}]_c$ e consequente relaxamento deste músculo liso (SANTOS, 2010; SANTOS et al., 2011b).

Em traqueia de cobaia os diterpenos se comportaram distintamente, onde o traquilobano-360 não relaxou a traqueia tanto na ausência quanto na presença de epitélio funcional, enquanto que, interessantemente, o traquilobano-318 relaxou a traqueia de maneira independente de epitélio funcional (SANTOS, 2010; SANTOS et al., 2011a). Assim foi hipotetizado que o efeito relaxante do traquilobano-318 fosse devido à diferença estrutural que há em relação ao traquilobano-360, a qual consiste na substituição de um grupo acetoxi por um grupamento hidroxil no carbono 7 (Figuras 3 e 4). Esse resultado nos motivou a continuar com a investigação do mecanismo de ação do traquilobano-318 em traqueia de cobaia.

1.3 Regulação da contração e relaxamento do músculo liso

O músculo liso é amplamente distribuído por todo o corpo, incluindo os vasos sanguíneos, vias respiratórias, trato gastrointestinal, urinário e reprodutivo, apresentando uma variedade de funções essenciais à vida, tais como controle da pressão arterial, respiração e peristaltismo gastrointestinal, dentre outros. Anormalidades no processo de contratilidade do músculo liso acarretam em várias desordens e doenças como hipertensão, cólicas uterinas, disfunção erétil, dispepsia e asma (KIM et al., 2008). Dessa forma, o modelo experimental de músculo liso tem uma grande importância na busca por moléculas de interesse terapêutico, que venham a restabelecer as funções fisiológicas deste músculo e, consequentemente, o bem-estar do indivíduo.

O cálcio é um segundo mensageiro importante que desempenha um papel essencial a uma grande variedade de processos biológicos, incluindo a regulação enzimática, expressão gênica, tráfego de proteína, proliferação celular, apoptose e a coordenação do acoplamento excitação-contração do músculo (CARAFOLI; BRINI, 2007). Em geral, existem duas fontes deste íon sinalizador na célula: uma extracelular que permite o influxo de Ca^{2+} para o citoplasma, através dos canais na membrana plasmática e outra intracelular representada pelos estoques internos, principalmente o retículo sarcoplasmático (RS) que liberam Ca^{2+} para o citosol (MA; PAN, 2003).

O íon cálcio age como um segundo mensageiro e é responsável por muitos processos intracelulares através de ligações a sítios específicos em proteínas de ligação ao Ca^{2+} . A calmodulina (CaM) é a mais conhecida destas proteínas, com alta afinidade pelo Ca^{2+} . As proteínas da família S100 (S100A1, S100A4, S100A6 e S100A10) que são pequenas proteínas ácidas com peso molecular de 11 kDa (HEIZMANN, 1991) também tem afinidade pelo Ca^{2+} no músculo liso e estão envolvidas na regulação de diferentes mecanismos de sinalização intracelular dependentes de cálcio (DONATO, 1999, 2001).

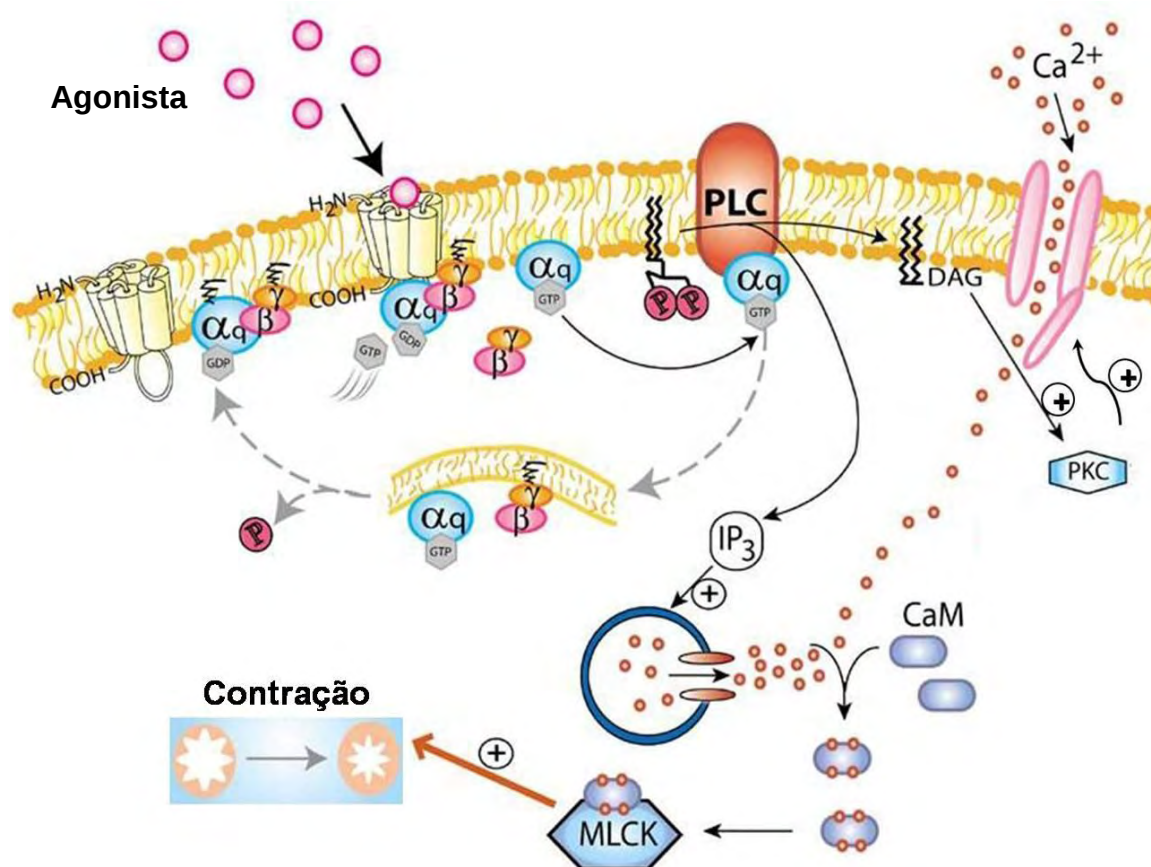
No músculo liso um aumento na concentração citoplasmática de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) é a causa primária para a produção da contração. Esta elevação no conteúdo citosólico de Ca^{2+} também está envolvido na proliferação celular do músculo liso (BREEMEN; SAIDA, 1989). A regulação funcional da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, para dar início a uma resposta contrátil no músculo liso depende de dois estímulos que levam a dois tipos de acoplamentos: o acoplamento eletromecânico, que está envolvido com a mudança do potencial de membrana e o acoplamento fármaco-mecânico, que acontece quando a contração promovida por um agonista é maior que a observada só com a mudança do potencial de membrana (V_m) (REMBOLD, 1992).

O disparo da contração do músculo liso é inicialmente o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (SOMLYO; SOMLYO, 1994), seja pela liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares ou pela entrada deste íon através de canais de Ca^{2+} na membrana plasmática. Enquanto a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, mediada por ativação através do uso de agonistas como a histamina, acetilcolina entre outros, contribui para o início do desenvolvimento da força de contração (THORNELOE; NELSON, 2005).

O retículo sarcoplasmático (RS) representa a principal fonte de Ca^{2+} intracelular, onde a liberação de Ca^{2+} desta organela é, principalmente, decorrente da ativação de receptores de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3R), que são canais de Ca^{2+} ativados pelo 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e também pelos receptores de rianodina (RyR), que são canais de Ca^{2+} que são ativados pelo próprio Ca^{2+} , ambos receptores permitem a liberação de Ca^{2+} do RS para o citosol aumentando a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (DELLIS et al., 2006). O IP_3 , responsável pelo aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_c$, provém da ativação de receptores acoplados a proteína G (GPCR), sobretudo àqueles acoplados as proteínas G_q ou G_{11} , cujas suas subunidades α ativam a fosfolipase C (PLC) e consequentemente promovem hidrólise de fosfolipídios presentes na membrana produzindo o IP_3 e diacilglicerol (DAG) (Figura 5) (BERRIDGE, 2008; BILLINGTON; PENN, 2003). Exemplos de receptores acoplados as proteínas G_q ou G_{11} que promovem contração na musculatura lisa da traqueia, como representante do sistema respiratório, incluem M_3 para ACh e H_1 para histamina (BILLINGTON; PENN, 2003). RyR são ativados pelo Ca^{2+} previamente liberado via IP_3R num processo denominado de liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} (CICR) (MCHALE et al., 2006).

Não importando a fonte, o Ca^{2+} quando em quantidades elevadas no meio intracelular liga-se a CaM formando um complexo $[(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}]$ que ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). O complexo $[(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM-MLCK}]$ constitui a forma ativa da MLCK, que tem como função fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC) e esta fosforilação permite o desencadeamento do mecanismo de ciclicização das pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina favorecendo um deslizamento entre estes filamentos, com o consequente desenvolvimento da contração (SOMLYO; SOMLYO, 1994; SOMLYO; SOMLYO, 2003).

Figura 5 - Esquema da via da fosfolipase C.



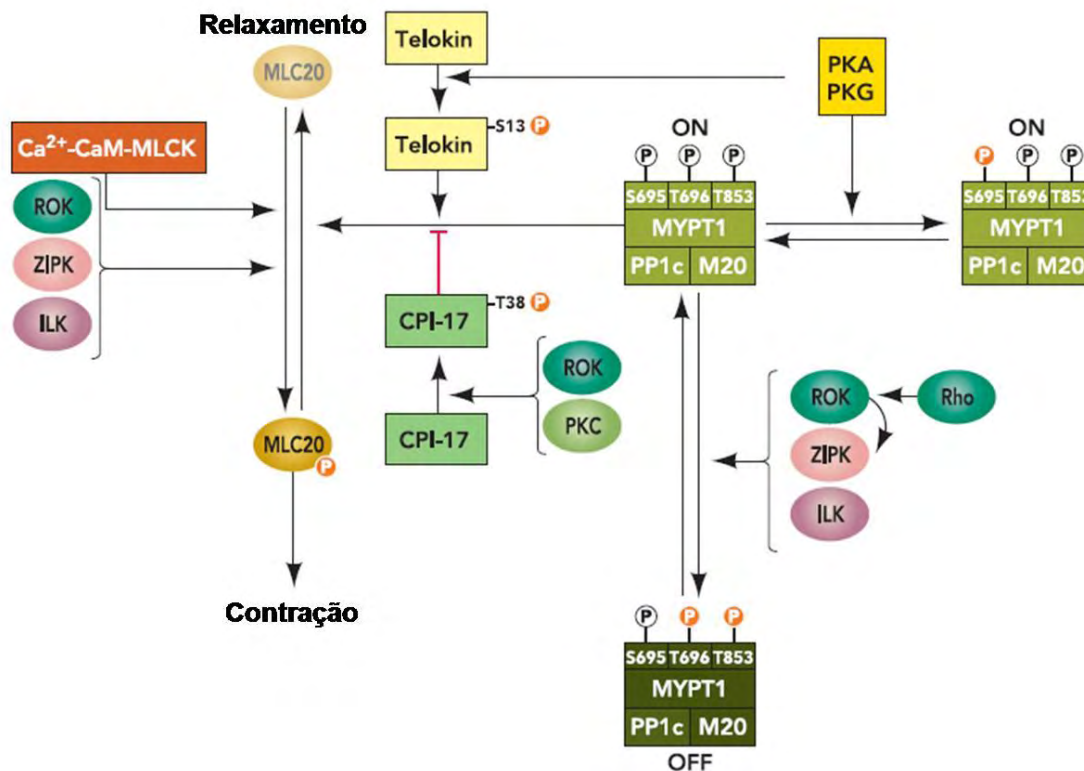
Fonte: Adaptado de Billington; Penn, 2003.

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

Esse mecanismo se dá a partir da pequena proteína ligante de ATP (RhoA) e o seu alvo cinase dependente de RhoA (ROK) que desempenham um papel importante na regulação da atividade da MLCP. A MLCP consiste em 3 subunidades: uma catalítica, PP1c; uma regulatória, MYPT1 e outra de 20 kDa de função ainda desconhecida (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A ROK, uma cinase de serina/treonina, fosforila a subunidade de ligação da miosina da MLCP, inibindo a sua atividade e, assim, promovendo o estado fosforilado da MLC. Inibidores

farmacológicos da ROK, como o Y-27632, bloqueiam a sua atividade por competir com o sítio de ligação do ATP na enzima (CHITALEY; WEBER; WEBB, 2001; UEHATA et al., 1997).

A inibição da MLCP é iniciada pela ativação da RhoA, dependente das proteínas G heterotriméricas $G_{12/13}$ e $G_{q/11}$, via uma pequena proteína G associada a um fator de troca de nucleotídeos de guanina (RhoGEFs). A RhoGEFs faz com que a RhoA troque GDP por GTP e uma vez RhoA-GTP ligado estimula a sua cinase associada (ROK) e uma fosfolipase D (PLD) específica para fosfatidilcolina, liberando ácido fosfatídico que é desfosforilado a DAG levando a ativação sustentada da proteína cinase C (PKC) (EXTON, 1997; MURTHY, 2006). A ativação da PKC pode resultar da ativação, dependente de $G_{q/11}$, da fosfolipase C (PLC) que forma DAG a partir da hidrólise do 4,5-bisfosfato de inositol (PIP_2). A ROK e a PKC agem isoladas ou cooperativamente para inibir a atividade da MLCP (SOMLYO; SOMLYO, 2000). Embora a ROK fosforile diretamente a MLC (TOTSUKAWA et al., 2000), sua ação principal na sensibilização ao cálcio parece ser a inibição da MLCP, esta ação se dá pela fosforilação direta dos resíduos de Thr⁶⁹⁶ e Thr⁸⁵³ da subunidade regulatória da fosfatase da miosina (MYPT1) (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A ROK pode também ativar uma proteína cinase independente de Ca^{2+} , mais conhecida como proteína cinase de interação zíper (ZIPK). A ZIPK pode fosforilar diretamente a MLC, no entanto seu alvo principal é o resíduo de Thr⁶⁹⁶ da MYPT1 o qual é fosforilado inibindo a ação da MLCP (MURTHY, 2006). A PKC pode fosforilar o resíduo de Thr³⁸ da proteína inibitória endógena CPI-17, aumentando assim sua potência inibitória sobre a subunidade catalítica da MLCP (PP1c) por mais de 1000 vezes, inibindo assim a ação da MLCP (Figura 6) (MURTHY, 2006; SOMLYO; SOMLYO, 2003).

Figura 6 - Regulação independente de Ca^{2+} da fosforilação e desfosforilação da MLC

Fonte: Adaptado de Puetz; Lubomirov; Pfitzer, 2009.

Os mecanismos que levam a uma resposta contrátil através do acoplamento eletromecânico são devido a uma despolarização de membrana diretamente pelo aumento da concentração extracelular de K^+ ($[\text{K}^+]_e$) ou indiretamente pela ligação dos agonistas aos seus receptores levando à abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_V), causando aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ e, conseqüentemente, a contração (REMBOLD, 1992).

Os canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_V) são complexos proteicos formados por 4 ou 5 subunidades distintas: a subunidade α_1 , que é a maior delas e constitui o poro do canal, além de possuir o sensor de voltagem que controla sua abertura; a subunidade α_2 que esta ligada a subunidade γ por uma ponte de dissulfeto e a subunidade β que é intracelular. Essa família de canais de Ca^{2+} possui 10 membros, classificados segundo sua sequência primária de aminoácidos e suas funções fisiológicas. Segundo suas características funcionais os Ca_V são classificados como: os $\text{Ca}_V\text{-L}$ ($\text{Ca}_V1.1$, $\text{Ca}_V1.2$, $\text{Ca}_V1.3$ e $\text{Ca}_V1.4$), onde o “L” vem do inglês “large”, indicando que estes canais necessitam de uma grande variação no

potencial de membrana para serem ativados, sendo estes os principais Ca_v envolvidos na contração muscular; os $\text{Ca}_v\text{-P/Q}$ ($\text{Ca}_v2.1$); os $\text{Ca}_v\text{-N}$ ($\text{Ca}_v2.2$); os $\text{Ca}_v\text{-R}$ ($\text{Ca}_v2.3$) e os $\text{Ca}_v\text{-T}$ ($\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ e $\text{Ca}_v3.3$) (CATTERALL et al., 2005).

Os Ca_v do tipo L tem sido chamados como $\text{Ca}_v1.1$ – $\text{Ca}_v1.4$ que são sensíveis a di-hidropiridina e ativados por alta voltagem (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2008). Uma importante localização dos canais do tipo Ca_v1 , que são alvos de bloqueadores de canais de cálcio usados na terapêutica, são as células musculares cardíacas e lisas (WATERMAN, 2000). Esses canais possuem como sítio de ligação para seus bloqueadores a subunidade α_1 , embora nele existam quatro outras unidades complexadas (2α , 1β e 1γ) (KURIYAMA; KITAMURA; NABATA, 1995).

Os mecanismos fármaco-mecânicos da contração incluem (1) aumento de IP_3 e DAG por ligação do agonista com o receptor ativando o sistema efetor proteína $\text{G}_{q/11}\text{-PLC}$. O IP_3 liga-se a um receptor de IP_3 permitindo a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares que favorecerá a formação do complexo $[(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}]$ disparando o início do mecanismo contrátil (REMBOLD, 1992); (2) aumento do influxo de Ca^{2+} através da abertura do canal $\text{Ca}_v\text{-L}$ por um mecanismo que não envolve mudança no potencial de membrana e (3) liberação do Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} através de receptores de rianodina (sensíveis à cafeína) presentes na membrana do RS (BRAINARD; KOROVIKINA; ENGLAND, 2007).

Sendo o aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ o sinal que leva à contração, consequentemente seu relaxamento se dá por diminuição dos níveis deste íon no citosol (SOMLYO; SOMLYO, 1994). Esta diminuição na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ pode ocorrer por um mecanismo eletromecânico, caracterizado pela repolarização (ou hiperpolarização) da membrana, ou pelo mecanismo fármaco-mecânico, que se dá pela ativação de receptores de membrana e inibição das vias bioquímicas que levam a contração (WOODRUM; BROPHY, 2001).

Agentes importantes no relaxamento do músculo liso são os nucleotídeos cíclicos, pois um aumento nos níveis citosólicos de monosfato cíclico de guanosina (GMPc) ou do AMPc nas células musculares lisas é considerado um dos maiores mecanismos que medeiam seu relaxamento sob condições fisiológicas (PUETZ; LUBOMIROV; PFITZER, 2009).

O principal mecanismo celular para o aumento nos níveis de GMPc incluem a inibição de vários subtipos de fosfatases, a ativação da ciclase de guanilil solúvel pelo óxido nítrico (NO) ou monóxido de carbono (CO), e a ativação da ciclase de guanilil particulada, pelo peptídeo natriurético atrial (PNA) (BEAVO, 2005; FRIEBE; KOESLING, 2003; VAANDRAGER; JONGE, 1996). O aumento nos níveis de GMPc leva a ativação da proteína cinase dependente de GMPc, a proteína cinase G (PKG), a qual reduz a $[Ca^{2+}]_c$ e a sensibilidade do Ca^{2+} aos miofilamentos nas células do músculo liso (NISHIMURA et al., 1992; VAANDRAGER; JONGE, 1996). Os mecanismos que explicam a redução do Ca^{2+} pela PKG incluem: ativação da captação de Ca^{2+} pelos estoques intracelulares; aumento do efluxo de Ca^{2+} ; inibição da liberação de Ca^{2+} do RS; hiperpolarização de membrana via ativação direta e/ou indireta de canais de K^+ ; inibição direta de Ca_v (ORALLO, 1996; VAANDRAGER; JONGE, 1996) ou indireta por ativação de canais de K^+ (KUME et al., 1994, 1989; WHITE et al., 1993).

De maneira similar, um aumento nos níveis de AMPc exerce profunda influência sobre a mobilização de Ca^{2+} através da ativação da proteína cinase dependente de AMPc, a PKA que terá ações semelhantes às das PKGs como, por exemplo, a ativação dos canais de K^+ (MINAMI et al., 1993; REMBOLD, 1992) e fosforilação da MLCK e assim diminuição de sua afinidade pelo complexo $[(Ca^{2+})_4-CaM]$ (REMBOLD, 1992).

Outra via relacionada ao acoplamento eletromecânico de relaxamento envolve a abertura de canais de K^+ , que neste contexto, desempenham um papel chave na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular, sendo que a contração no músculo liso depende do balanço entre o aumento da condutância ao K^+ , levando a uma hiperpolarização, enquanto a diminuição de sua condutância levaria a uma despolarização (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996).

Os canais de K^+ conduzem íons K^+ através da membrana plasmática a favor de seu gradiente eletroquímico, que normalmente constitui uma corrente de saída, no sentido do meio intracelular para o meio extracelular. A condução ao K^+ determina vários processos celulares incluindo controle do volume celular, secreção hormonal e controle da formação e propagação de sinais elétricos em células excitáveis (MACKINNON, 2003).

Sabe-se que em células da musculatura lisa, há pelo menos quatro diferentes famílias de canais de K^+ identificados. Esses incluem os K_V , os K_{ATP} , os K_{Ca} e os K_{ir} (NELSON; QUAYLE, 1995). Dentre estas famílias de canais de K^+ , a repolarização ou hiperpolarização de membrana ocorre devido, principalmente, a ativação dos K_V , em decorrência à despolarização de membrana, e a ativação dos K_{Ca} , que são ativados quando a $[Ca^{2+}]_c$ se eleva na ordem de μM . A ativação destes canais tem como consequência uma redução no influxo de Ca^{2+} através da inibição dos Ca_V o que causa uma redução da $[Ca^{2+}]_c$ (LEDOUX et al., 2006), levando o músculo ao relaxamento.

Os canais de potássio dependentes de voltagem (K_V) são o protótipo dos canais dependentes de voltagem, sendo de maneira simplificada, um homotetrâmero com cada subunidade contendo um sensor de voltagem e contribuindo para a formação do poro central. Cada subunidade padrão formadora do K_V contém seis regiões transmembranares (S1 – S6), onde as regiões carboxi e amino terminal encontram-se no lado intracelular da membrana (YELLEN, 2002) e sendo a porção S4 identificada como o sensor de voltagem por possuir um aminoácido básico (lisina ou arginina) a cada três resíduos (JAN; JAN, 1992).

Os canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) são complexos proteicos que existem na forma de octâmeros contendo dois tipos distintos de subunidades proteicas. Os canais consistem de quatro subunidades dos canais de potássio retificadores de entrada (K_{ir}), K_{ir} 6.1 ou K_{ir} 6.2, onde cada subunidade está associada com uma porção regulatória que é um receptor para sulfonilureia (SUR) (BABENKO; AGUILAR-BRYAN; BRYAN, 1998). A diversidade molecular dos K_{ATP} através dos diversos tecidos e espécies é decorrente da presença de múltiplas isoformas do SUR (SUR1, SUR2A, SUR2B) (BRAYDEN, 2002).

Uma característica primária deste canal é ser inativado por ATP intracelular, sulfonilureias como, por exemplo, a glibenclamida e a tolbutamida, e por baixa concentração de Ba^{2+} (FLAGG et al., 2010; SANBORN, 2000; STANDEN et al., 1989). No entanto, hoje se sabe que existem subtipos de K_{ATP} que são relativamente insensíveis aos níveis basais de ATP, mas são bloqueados seletivamente pela glibenclamida do mesmo modo que os demais (FLAGG et al., 2010).

Outra família de canais de potássio existente é a dos canais de potássio ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}), a qual é vastamente expressa em tecidos neuronais e não neuronais, como epitélios, células sensoriais e músculos lisos onde podem responder a estímulos vindos de alterações do potencial de membrana, bem como de modificações da $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$, além de contribuir para a repolarização do potencial de ação (BERKEFELD; FAKLER; SCHULTE, 2010; PETERSEN; MARUYAMA, 1984; VERGARA et al., 1998).

Esta família é dividida em três grandes grupos com base em sua condutância, cinética e farmacologia (SAH; FABER, 2002): 1) canais de potássio ativados por Ca^{2+} de pequena condutância (SK_{Ca}), são bloqueados por apamina; 2) canais de potássio ativados por Ca^{2+} de condutância intermediária (IK_{Ca}) bloqueados pelo clotrimazol e 3) canais de potássio ativados por Ca^{2+} de grande condutância (BK_{Ca}) que são bloqueados por toxinas, como caribdotoxina e iberiotoxina, ou por baixas concentrações de TEA^{+} . Os canais do tipo SK_{Ca} e IK_{Ca} são insensíveis à voltagem e ativados por baixa concentração de Ca^{2+} intracelular ($< 1,0 \mu\text{M}$), em contraste aos BK_{Ca} que são ativados tanto por voltagem como por Ca^{2+} (WEI et al., 2005).

Os canais K_{Ca} foram subdivididos da seguinte forma: no grupo dos BK_{Ca} são chamados de $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ (WEI et al., 2005), enquanto que no grupo dos SK_{Ca} estão incluídos os $\text{K}_{\text{Ca}2.1}$, 2.2 e 2.3 (KÖHLER et al., 1996), e os IK_{Ca} passaram a ser chamados de $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ (ISHII; MAYLIE; ADELMAN, 1997; JOINER et al., 1997). Três outros membros deste grupo, $\text{K}_{\text{Ca}4.1}$; 4.2 e 5.2 (JOINER et al., 1997; SCHREIBER et al., 1998; YUAN et al., 1998), foram incluídos no grupo dos K_{Ca} , uma vez que todos apresentam uma semelhança estrutural (WEI et al., 2005), apesar de não serem ativados por Ca^{2+} . Os canais $\text{K}_{\text{Ca}4.2}$ e $\text{K}_{\text{Ca}4.1}$ são ativados por Na^{+} e Cl^{-} intracelular (YUAN et al., 1998), enquanto o $\text{K}_{\text{Ca}5.1}$ é sensível ao pH (SCHREIBER et al., 1998).

Estruturalmente, os BK_{Ca} são compostos por quatro subunidades formadoras de poro, onde cada uma dessas é formada por 7 segmentos transmembranares ($\text{S0} - \text{S6}$) e uma grande região citoplasmática carboxi-terminal (SALKOFF et al., 2006). S1-S4 formam o domínio sensor de voltagem primário, S5 e S6 juntos formam o principal domínio de permeação para os íons (JIANG et al., 2002). A subunidade β é composta por dois domínios transmembrana com uma grande alça extracelular, e as caudas NH_2 e COOH terminais localizadas no citoplasma

(BOYLE; TOMASIC; KOTLIKOFF, 1992; FLEISCHMANN; WASHABAU; KOTLIKOFF 1993; LEE; CUI, 2010). As propriedades fisiológicas dos BK_{Ca} , incluindo a sensibilidade ao Ca^{2+} , são moduladas pelas subunidades β acessórias. As estimativas da sua densidade média, em músculo liso variam entre 1 a 4 canais/ μm^2 (BENHAM; BOLTON, 1986; SINGER; WALSH, 1987).

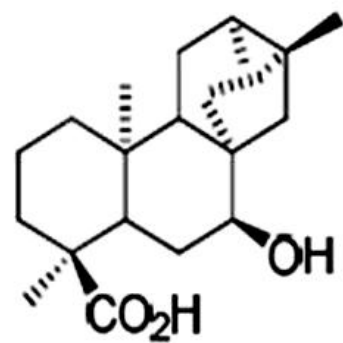
Os canais de potássio retificadores de entrada (K_{ir}) foram primeiramente identificados no músculo esquelético (KATZ, 1949), mas atualmente já se sabe que sua distribuição é muito ampla: neurônios (BROWN et al., 1990), miócitos cardíacos (BEELER; REUTER, 1970), células sanguíneas (MCKINNEY; GALLIN, 1988), células epiteliais (LORENZ et al., 2002), músculo liso traqueal (NAKAJIMA et al., 1995), entre outros. Esses canais não são típicos canais de potássio, pois ao invés de gerarem correntes de saída de K^+ , produzem um fluxo de entrada de íons K^+ na célula. Dessa forma, as correntes dos K_{ir} foram originalmente ditas como anômalas, quando comparadas as correntes de potássio geradas pelos K_v , que são correntes de saída (HODGKIN et al., 1952).

Essa característica das correntes iônicas dos K_{ir} não é resultado de alterações das regras da química biológica (gradiente eletroquímico) por parte dos K_{ir} , mas de uma abertura assimétrica do poro do canal que é bloqueada por cátions divalentes (Mg^{2+}) e outras moléculas intracelulares (poliaminas). Adicionalmente, na estrutura dos K_{ir} há ausência de um sensor de voltagem, que é uma região conservada e comum aos canais dependentes de voltagem de Na^+ , Ca^{2+} e K^+ , e como resultado os K_{ir} são insensíveis a variações na voltagem da membrana celular (HIBINO et al., 2010).

Os mecanismos de relaxamento do músculo liso via acoplamento fármaco-mecânico incluem a fosforilação via PKG (proteína cinase dependente de GMPc) ou PKA de vários substratos, levando a: 1) o aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA), aumentando assim o sequestro e extrusão de Ca^{2+} , respectivamente, diminuindo a $[Ca^{2+}]_c$; 2) a inativação dos IP_3R e reduzindo assim a sua capacidade de liberar o Ca^{2+} do RS; 3) diminuição da formação do IP_3 e consequente diminuição da liberação de Ca^{2+} do RS; 4) inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo $[(Ca^{2+})_4-CaM]$, causando uma redução nos níveis de MLC fosforilada e assim do processo contrátil; 5) inibição dos

Ca_v , causando uma redução da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ por diminuir o influxo de Ca^{2+} ; 6) ativação de canais de K^+ , que indiretamente, por repolarização ou hiperpolarização, causam a desativação dos Ca_v (DANILA; HAMILTON, 2004; DUTTA et al., 2002; WOODRUM; BROPHY, 2001).

Dessa forma, diante do exposto, investigou-se de que maneira o traquilobano-318 estaria atuando sobre as vias que regulam o processo de contração e relaxamento do músculo liso traqueal para assim desencadear seu efeito espasmolítico nesse músculo, utilizando para tanto técnicas e ferramentas farmacológicas em nível funcional.



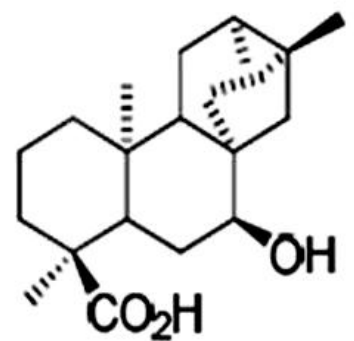
2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

- Contribuir para o estudo farmacológico da família Annonaceae, em particular da espécie *Xylopia lagsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul..
- Investigar o mecanismo de ação espasmolítica do ácido *ent-7 α* -hidroxitraquilobano-18-oico (traquilobano-318) em traqueia isolada de cobaia, através de estudos funcionais.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar um possível efeito direto do traquilobano-318 sobre a calmodulina.
- Comparar o perfil relaxante de traquilobano-318 na presença de moderada ou elevada concentração de potássio no meio extracelular.
- Avaliar o efeito do traquilobano-318 sobre os canais de potássio.
- Determinar os subtipos de canais de potássio que participam do efeito relaxante do traquilobano-318.
- Investigar o efeito de traquilobano-318 na via de sinalização dos nucleotídeos cíclicos.



3 Material e Métodos

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material botânico

A espécie *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hill. & Tul. foi coletada no município de Cruz do Espírito Santo, Estado da Paraíba, em setembro de 2000. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do Setor de Botânica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Uma exsicata da planta está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da UFPB sob código de identificação AGRA 5541.

3.1.2 Substância teste

O diterpeno ácido *ent*-7 α -hidroxitraquiloban-18-oico (traquilobano-318) de massa molecular 318,2129 u.m.a e com fórmula molecular C₂₀H₃₀O₃ foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Josean Fachine Tavares do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF)/Centro de Ciências da Saúde (CCS)/UFPB e membro do Setor de Fitoquímica do PPgPNSB do CCS/UFPB.

3.1.3 Animais

Cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos eram utilizados, pesando entre 300-500 g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia (CBiotec)/UFPB.

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada à base de ração tipo *pellets* (Purina) com acesso à água *ad libitum*, com ventilação e temperatura (21 $\pm$ 1 °C) controladas e constantes. Os experimentos eram realizados no período entre 08h00 e 20h00,

sendo todos os procedimentos experimentais realizados seguindo os princípios de cuidados com animais aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA).

3.1.4 Drogas e Reagentes

O bicarbonato de sódio (NaHCO_3), cloreto de potássio (KCl), sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4), cloreto de cálcio bi-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e glicose foram obtidos da Vetec (Brasil). O cloreto de sódio (NaCl) foi obtido da Dinâmica (Brasil). O cloridrato de carbamilcolina (CCh) foi obtido da Merck (Brasil). A iberiotoxina (IbTX), cloreto de cézio (CsCl), cloreto de tetraetilamônio (TEA^+), glibenclamida, clorpromazina, ácido araquidônico (AA), dimetilsufóxido (DMSO), cloreto de bário (BaCl_2), apamina, 4-aminopiridina (4-AP), aminofilina e o óleo de castor (Cremophor[®]) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA).

A mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) foi adquirida da White Martins (Brasil).

Todas as substâncias eram mantidas em um “freezer” à temperatura de - 20 °C, dissolvidas e diluídas em água destilada, exceto o ácido araquidônico e a glibenclamida que eram dissolvidos em etanol absoluto.

3.1.5 Soluções Nutritivas

De acordo com os experimentos realizados, eram utilizadas soluções nutritivas aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2), onde todas as soluções tiveram seu pH ajustado com HCl ou NaOH 1 N para 7,4 e cujas composições estão descritas abaixo:

Solução de Krebs Normal (mM): NaCl 118,0; KCl 4,6; MgSO_4 5,7; KH_2PO_4 1,1; CaCl_2 2,5; glicose 11,0; NaHCO_3 25,0.

Solução de Krebs Normal despolarizante (KCl 18 mM) (mM): NaCl 104,6; KCl 18,0; MgSO_4 5,7; KH_2PO_4 1,1; CaCl_2 2,5; glicose 11,0; NaHCO_3 25,0.

Solução de Krebs Normal despolarizante (KCl 60 mM) (mM): NaCl 62,6; KCl 60,0; MgSO₄ 5,7; KH₂PO₄ 1,1; CaCl₂ 2,5; glicose 11,0; NaHCO₃ 25,0.

3.1.6 Preparação da solução-estoque da substância em estudo

O traquilobano-318 era solubilizado em Cremophor[®] (3%) acrescido de DMSO (7%) e diluído em água destilada para obtenção da solução estoque (10^{-2} M) que foi armazenada em “freezer”, a 10 °C, sendo novamente diluída em água destilada de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. A concentração final de Cremophor[®] nas cubas nunca excedeu 0,01% (v/v), assim como a de DMSO. Nesta concentração, tanto o Cremophor[®] quanto o DMSO são desprovidos de efeito contrátil ou relaxante em traqueia de cobaia, de acordo com resultados obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa.

3.1.7 Aparelhos

Para registro das contrações isométricas os órgãos eram suspensos em cubas de vidro (5 mL) aquecidas à 37 °C por bombas termostáticas modelo 597 (FISATOM, Brasil) e modelo Polystat 12002 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA). As contrações eram registradas através de transdutores de força modelo FORT-10 conectados a um amplificador modelo TMB4M (ambos da World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA), que por sua vez estava conectado a uma placa conversora analógico/digital instalada em um microcomputador contendo o programa BioMed[®] versão Rv2 (BioData, João Pessoa, PB, Brasil).

Os valores de pH eram aferidos através de um pHmetro digital modelo PG 2000 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil). As substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG200 e os animais em balança semi-analítica (ambas da GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Investigação do mecanismo de ação do traquilobano-318 em traqueia isolada de cobaia

3.2.1.1 Preparação dos anéis de traqueia isolada de cobaia

Os cobaias eram eutanasiadas por descolamento cervical. A traqueia era retirada e limpa de todo o tecido conectivo e adiposo, em seguida dividido em segmentos, contendo 3-4 anéis de cartilagem cada. Esses segmentos eram suspensos individualmente por hastes de aço inoxidável em cubas de vidro (5 mL) contendo solução nutritiva de Krebs normal e sob tensão de 1 g. Estes tecidos eram mantidos a uma temperatura de 37 °C, aerados com carbogênio, e mantidos em repouso durante no mínimo 60 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos. Após o período de estabilização, uma primeira contração era induzida pela adição de 10^{-6} M de CCh à cuba.

A integridade do epitélio da traqueia era verificada pela adição de AA à cuba na concentração de 10^{-4} M (TSCHIRHART et al., 1987) durante a fase tônica da primeira resposta induzida por CCh, onde anéis que apresentaram relaxamentos superiores a 50% (em relação a força de contração inicial) eram considerados com epitélio funcional. Os anéis de traqueia sem epitélio eram obtidos através da retirada do mesmo por uma leve fricção da camada epitelial que se encontra voltada para a luz do órgão utilizando-se uma haste de aço inoxidável envolta em algodão e embebida com solução de Krebs. A retirada do epitélio era confirmada pela ausência de relaxamento em resposta à adição de AA à cuba ou quando este relaxamento era inferior a 10%, sendo este anel considerado sem epitélio funcional. Todos os experimentos eram realizados apenas com anéis de traqueia desprovidos de epitélio funcional, uma vez que já foi demonstrado não haver diferença entre a resposta relaxante de traquilobano-318 na ausência e na presença de epitélio funcional (SANTOS et al., 2011a). Após a verificação da retirada do epitélio, a solução de banho era trocada, sendo as preparações lavadas a cada 15 minutos com solução de Krebs normal durante um período total de 30 minutos.

O relaxamento produzido pelo traquilobano-318 foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de pD_2 (logaritmo negativo na base 10 da concentração molar de uma substância necessária para produzir 50% de seu efeito máximo) de traquilobano-318 foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta.

3.2.1.2 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol na ausência e na presença de clorpromazina

A traqueia era montada segundo o item 3.2.1.1 e após os procedimentos iniciais, era adicionado à cuba clorpromazina na concentração de 10^{-6} M (ESTRADA-SOTO et al., 2010; NAGAI et al., 1985), um inibidor da calmodulina. Em seguida, após a estabilização dessa segunda contração, durante a sua fase tônica e sustentada, o traquilobano-318 era adicionado à cuba de maneira cumulativa e seu efeito relaxante era registrado. Foram comparados os valores de pD_2 e efeito máximo (E_{max}) na ausência e na presença do inibidor (ESTRADA-SOTO et al., 2010).

3.2.1.3 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 18 ou 60 mM de KCl

A traqueia era montada segundo o item 3.2.1.1 e após o período de 60 minutos de estabilização, eram induzidas duas contrações de magnitude similares com KCl nas concentrações de 18 ou 60 mM, consideradas como controle (RAEBURN; GIEMBYCZ, 1995). Durante a fase tônica sustentada da segunda contração, o traquilobano-318 era adicionado de forma cumulativa à cuba. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por KCl e os valores de pD_2 para traquilobano-318 foram determinados como descrito anteriormente.

3.2.1.4 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol na ausência e na presença de TEA⁺ (10 mM)

A traqueia era montada segundo descrito no item 3.2.1.1, e após os procedimentos iniciais, era adicionado à cuba 10 mM de TEA⁺, o qual nessa concentração é usado como bloqueador não seletivo de canais de K⁺ (NIU et al., 2008), por um período de 20 min. e em seguida uma nova contração com CCh (10⁻⁶ M) era induzida ainda na presença desse bloqueador. Durante a fase tônica sustentada dessa segunda contração, o traquilobano-318 era adicionado à cuba de maneira cumulativa. Simultaneamente eram realizados experimentos onde não havia a pré-incubação da preparação com o bloqueador (controle). O relaxamento produzido pelo traquilobano-318 foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de pD₂ do traquilobano-318 foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença de TEA⁺.

3.2.1.5 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol na ausência e na presença de 4-AP, glibenclamida, apamina, IbTx e BaCl₂

A traqueia era montada como descrito no item 3.2.1.1 e a seguir, preparações distintas eram expostas por 20 minutos na presença dos seguintes bloqueadores: 4-AP na concentração de 2 x 10⁻³ M (LI et al., 1999), bloqueador seletivo dos canais de potássio dependentes de voltagem (K_v); glibenclamida na concentração de 3 x 10⁻⁶ M (CUNHA et al., 2001), um bloqueador seletivo dos canais de K⁺ sensíveis ao ATP (K_{ATP}); apamina na concentração de 10⁻⁶ M (DEVILLIER et al., 2001), um bloqueador seletivo dos canais de K⁺ de pequena condutância ativados por Ca²⁺ (SK_{Ca}); IbTx na concentração de 10⁻⁷ M (YAGI; KUWAHARA; TSUBONE, 2002), um bloqueador seletivo dos canais de K⁺ de grande condutância ativados por Ca²⁺ (BK_{Ca}) (GALVEZ et al., 1990; STAAZ et al., 1999); BaCl₂ na concentração de 10⁻⁴ M (NAKAHARA et al., 2001; NELSON; QUAYLE, 1995), um bloqueador seletivo dos

canais de potássio retificadores de entrada (K_{ir}) antes da indução de uma segunda resposta contrátil ao CCh. Após a estabilização dessa segunda contração, durante a sua fase tônica e sustentada, o traquilobano-318 era adicionado à cuba, em diferentes preparações, de maneira cumulativa e seu efeito relaxante era registrado. Eram realizados experimentos concomitantes, onde o efeito relaxante de traquilobano-318 era avaliado na ausência do bloqueador (controle). Foram comparados os valores de pD_2 e E_{max} na ausência e presença de cada bloqueador.

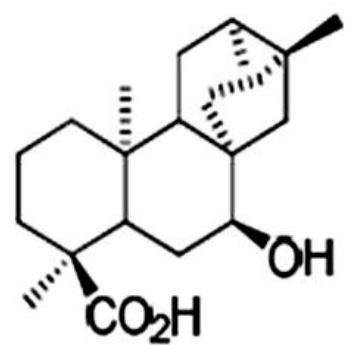
3.2.1.6 Efeito do traquilobano-318 no relaxamento induzido por aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol

A traqueia será montada como descrito no item 3.2.1.1, era induzida uma contração com 10^{-6} M de CCh e em seguida uma curva de relaxamento concentração-resposta era obtida com aminofilina (10^{-9} - 10^{-3} M), um inibidor não seletivo das fosfodiesterases (HIRSH et al., 2004). Posteriormente, as preparações eram expostas por 20 minutos ao traquilobano-318 antes da indução de uma terceira resposta contrátil ao CCh. Após a estabilização dessa segunda contração, durante a sua fase tônica e sustentada, uma nova curva de relaxamento com aminofilina era obtida na presença do traquilobano-318. Foram comparados os valores de pD_2 e E_{max} da aminofilina na ausência (controle) e presença do diterpeno.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos como a média e o erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste *t* não pareado ou a análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do teste de Bonferroni quando apropriados, onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Os valores de pD_2 foram calculados por regressão não-linear para todos os experimentos realizados (NEUBIG et al., 2003).

Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA).



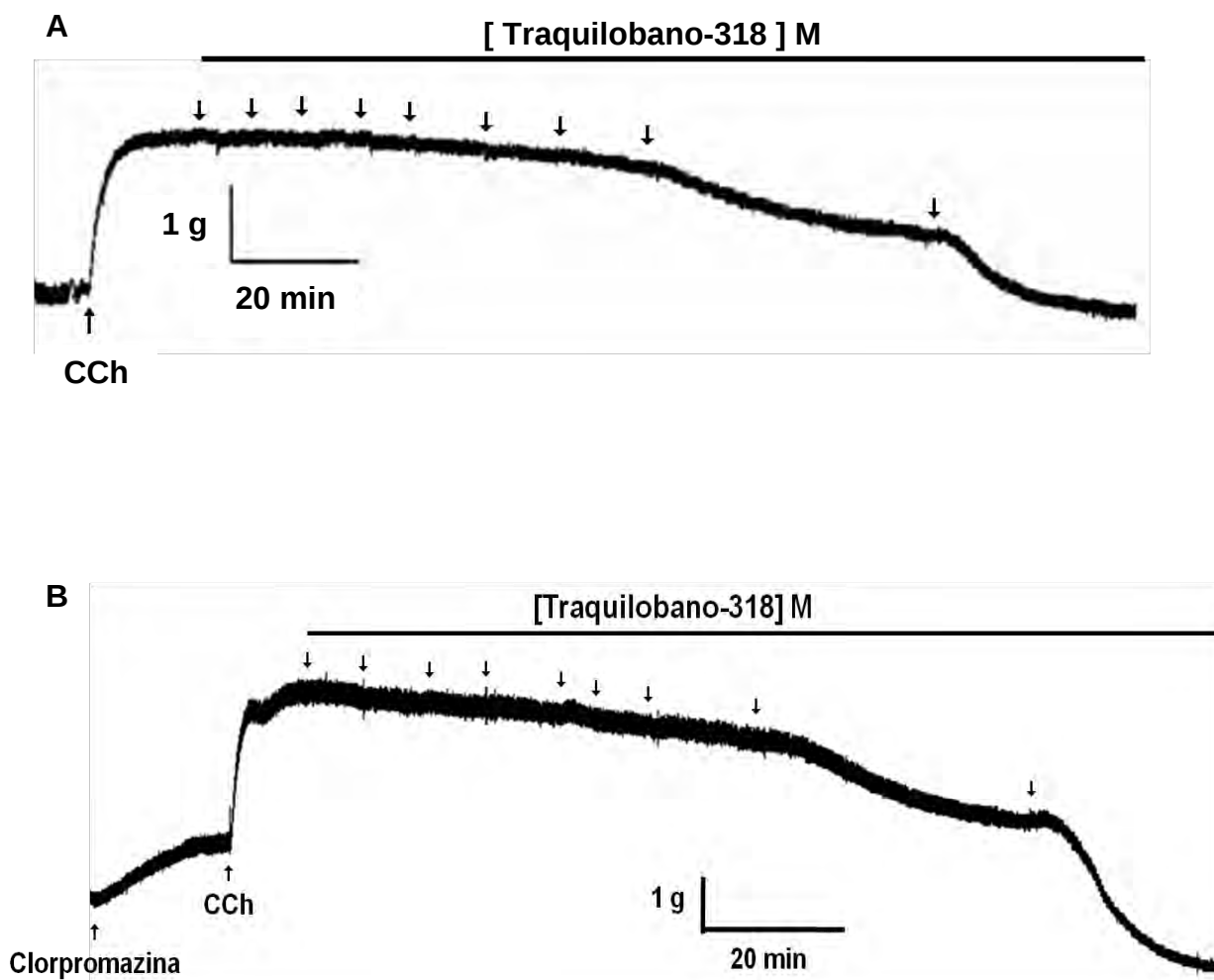
4 Resultados

4.1 Investigação do mecanismo de ação do traquilobano-318 em traqueia isolada de cobaia

4.1.1 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol na ausência e na presença de clorpromazina

O efeito relaxante do traquilobano-318 (Figura 7) em traqueia de cobaia pré-contraída por CCh ($pD_2 = 4,38 \pm 0,07$, $n = 5$) não foi alterado de maneira significativa na presença de 10^{-6} M de clorpromazina, que nesta concentração atua como um inibidor da proteína ligante de cálcio, calmodulina ($pD_2 = 4,15 \pm 0,07$, $n = 5$) (Gráfico 1). No entanto foi observado que o tempo médio de relaxamento do traquilobano-318 foi alterado de maneira significativa na presença do inibidor, passando de 123,4 minutos para 103,6 minutos.

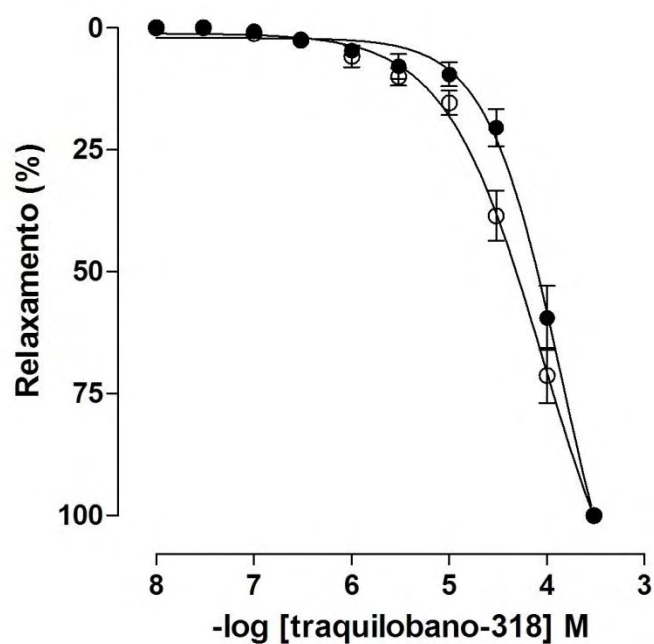
Figura 7 - Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10^{-6} M de clorpromazina (B) em traqueia isolada de cobaia.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do traquilobano-318 nas concentrações de 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, respectivamente.

Fonte: Martins, 2012.

Gráfico 1 - Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por CCh na ausência (○) e presença (●) de 10^{-6} M de clorpromazina em anéis de traqueia de cobaia.



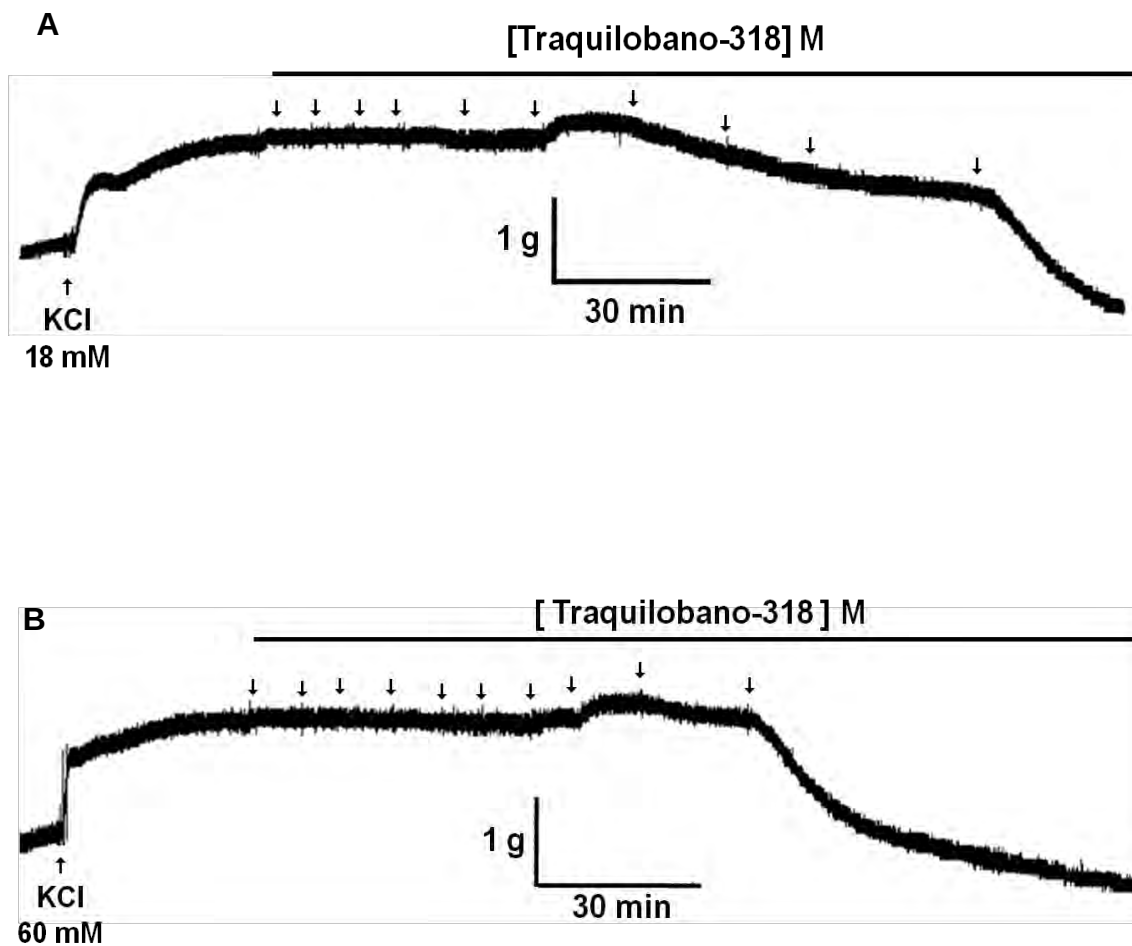
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$).

Fonte: Martins, 2012.

4.1.2 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 18 ou 60 mM de KCl

O traquilobano-318 (10^{-8} – 3×10^{-4} M) relaxou a traqueia de cobaia pré-contraída tanto por 18 mM de KCl (Figura 8A) quanto por 60 mM de KCl (Figura 8B) ($pD_2 = 4,90 \pm 0,25$ e $pD_2 = 3,88 \pm 0,01$, $n = 5$, respectivamente), sendo que a potência relaxante do diterpeno foi cerca de 5 vezes maior quando a traqueia era pré-contraída com 18 mM de KCl (Gráfico 2). O tempo médio de relaxamento do traquilobano-318 quando o órgão era pré-contraído por 18 mM de KCl foi de 195 minutos, já quando pré-contraído por 60 mM de KCl foi de 284,7 minutos.

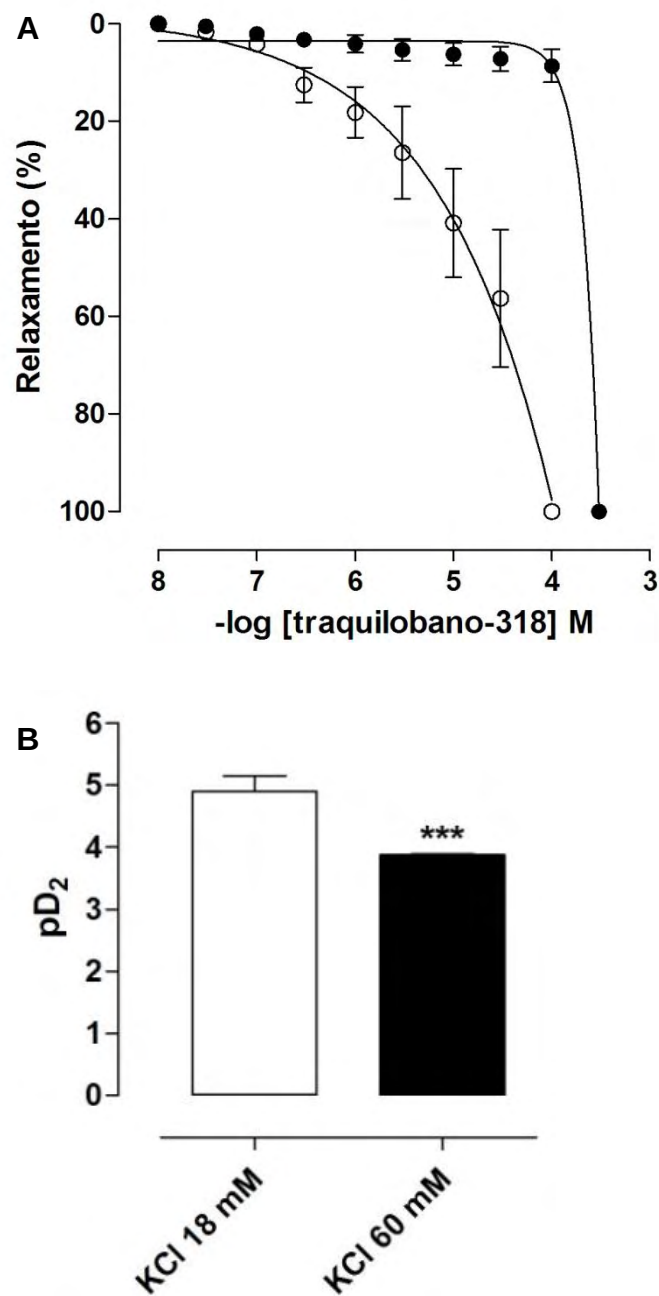
Figura 8 - Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 18 mM de KCl (**A**) e por 60 mM de KCl (**B**) em traqueia isolada de cobaia.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do traquilobano-318 nas concentrações de 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, respectivamente.

Fonte: Martins, 2012.

Gráfico 2 - Efeito relaxante (A) e os valores de pD_2 (B) do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 18 mM de KCl (○) e 60 mM de KCl (●) em anéis de traqueia isolada de cobaia.

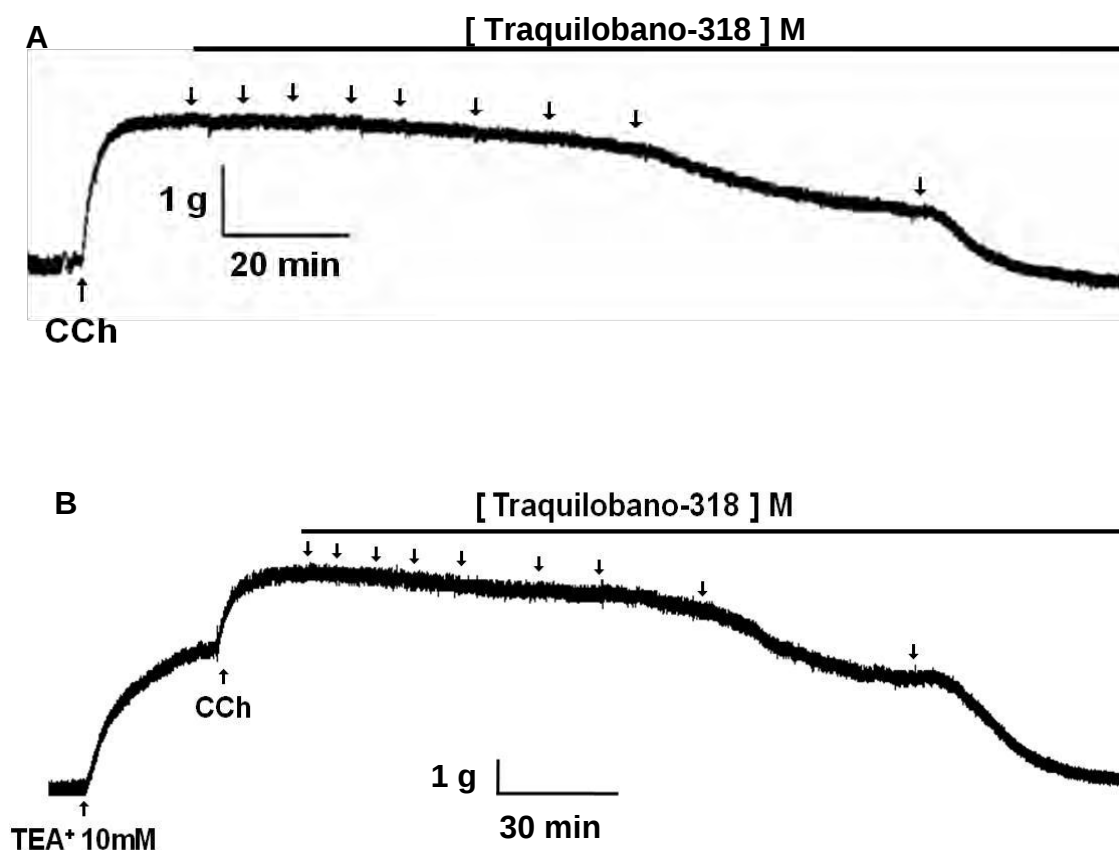


A. Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). **B.** As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. *** $p < 0,001$ (teste t : KCl 18 mM vs. KCl 60 mM).

4.1.3 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol na ausência e na presença de TEA⁺ (10 mM)

O efeito relaxante do traquilobano-318 (3×10^{-8} – 3×10^{-4} M) em traqueia de cobaia pré-contraída por CCh ocorreu de maneira significativa e dependente de concentração, tanto na ausência (Figura 9A) quanto na presença (Figura 9B) de 10 mM de TEA⁺, que nesta concentração é um bloqueador não seletivo dos canais de K⁺. No entanto, na presença deste bloqueador a curva de relaxamento do traquilobano-318 foi desviada para direita 2,37 vezes, evidenciando uma redução em sua potência relaxante como se pode verificar pelos valores de pD₂ que passou de $4,38 \pm 0,07$ (n = 5) para $4,01 \pm 0,06$ (n = 5) (Gráfico 3). O tempo médio de relaxamento do traquilobano-318 não foi alterado de maneira significativa na presença deste bloqueador.

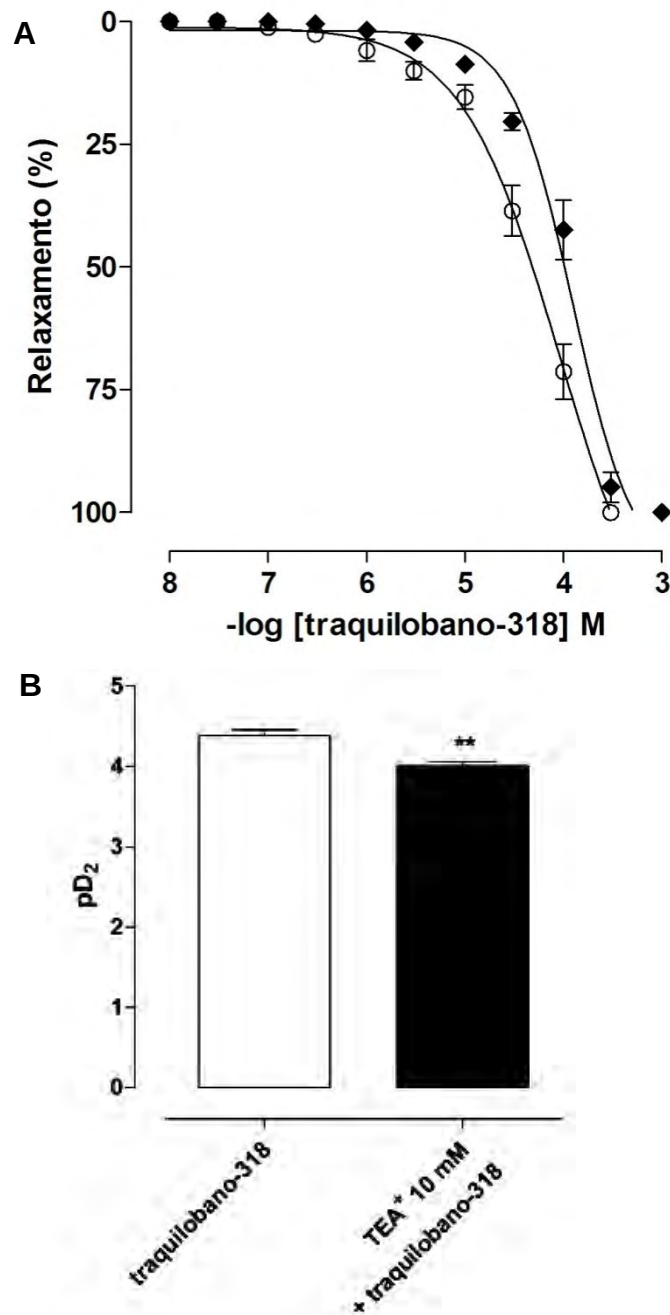
Figura 9 - Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10 mM de TEA⁺ (B) em traqueia isolada de cobaia.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do traquilobano-318 nas concentrações de 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, respectivamente.

Fonte: Martins, 2012.

Gráfico 3 - Efeito relaxante (A) e os valores de pD_2 (B) do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh em anéis de traqueia isolada de cobaia na ausência (○) e na presença (◆) de 10 mM de TEA^+ .

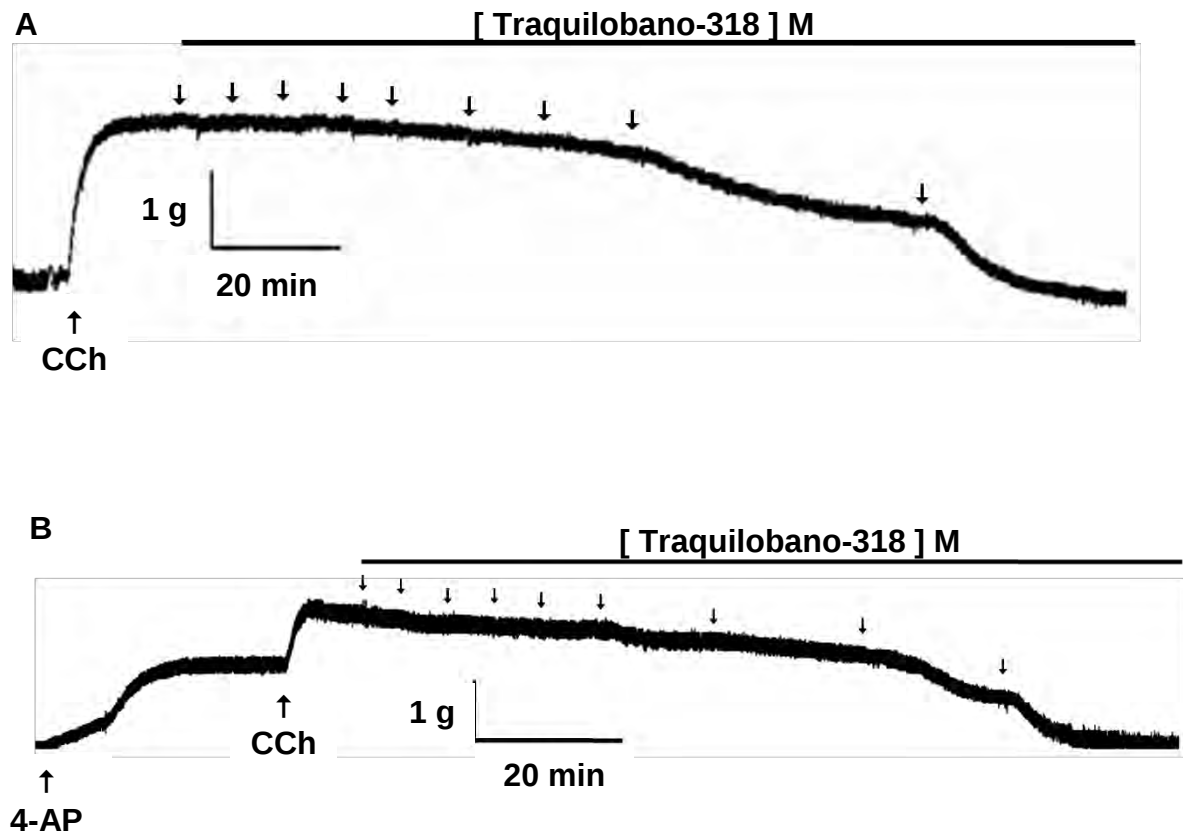


A. Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). **B.** As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m, respectivamente. $**p < 0,01$ (teste t : controle vs. TEA^+ 10 mM).

4.1.4 Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol na ausência e na presença de 4-AP, glibenclamida, apamina, IbTx e BaCl₂

A curva de relaxamento do traquilobano-318 ($3 \times 10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) ($pD_2 = 4,38 \pm 0,07$, $n = 5$) foi desviada para a direita de maneira significativa na presença dos seguintes bloqueadores de canais de potássio: 4-AP, bloqueador dos K_v ($pD_2 = 4,00 \pm 0,06$, Figura 10 e Gráfico 4); glibenclamida, bloqueador dos K_{ATP} ($pD_2 = 3,91 \pm 0,003$, Figura 11 e Gráfico 5); apamina, bloqueador dos SK_{Ca} ($pD_2 = 3,45 \pm 0,14$, Figura 12 e Gráfico 6) e IbTx, bloqueador dos BK_{Ca} ($pD_2 = 3,80 \pm 0,05$, Figura 13 e Gráfico 7), sendo a potência relaxante do diterpeno atenuada cerca de 2, 3, 9 e 4 vezes, respectivamente (Tabela 1). No entanto, na presença do BaCl₂, bloqueador dos K_{ir} , não observou-se alteração significativa na ação relaxante do traquilobano-318 ($pD_2 = 4,15 \pm 0,10$, Figura 14 e Gráfico 8). O tempo médio de relaxamento do traquilobano-318 não foi alterado de maneira significativa na presença de nenhum dos bloqueadores.

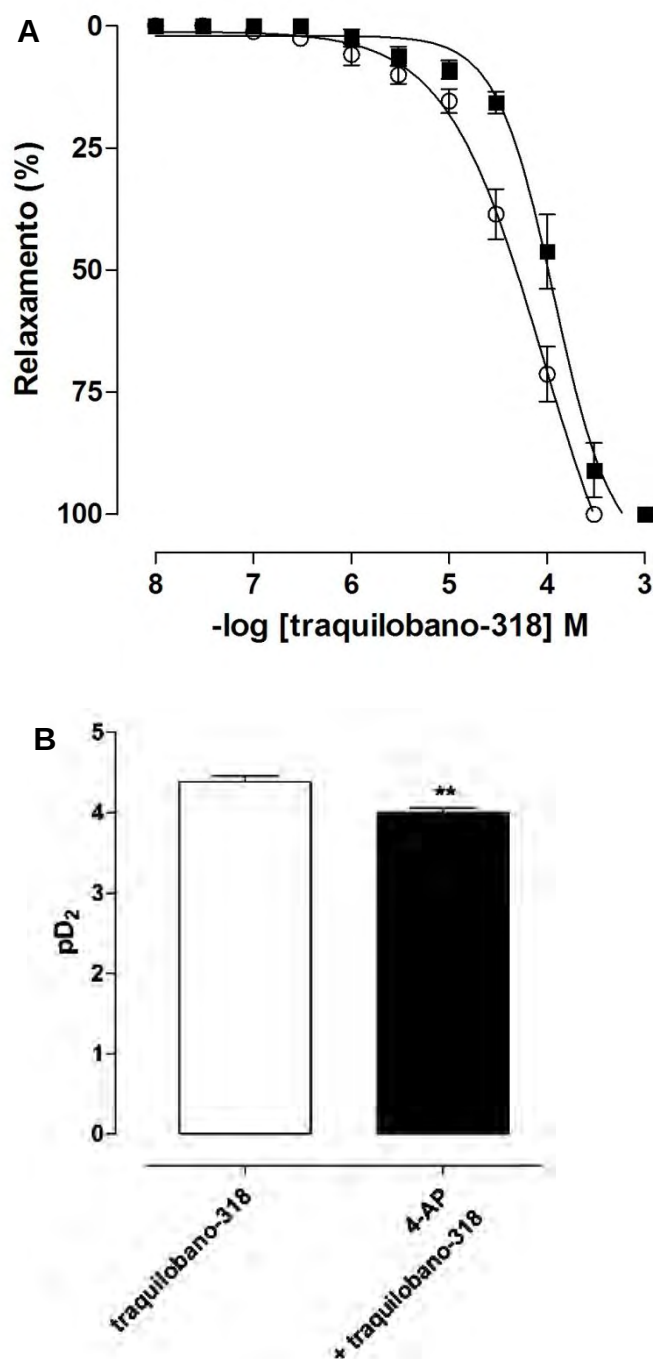
Figura 10 - Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 2×10^{-3} M de 4-AP (B) em traqueia isolada de cobaia.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do traquilobano-318 nas concentrações de 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, respectivamente.

Fonte: Martins, 2012.

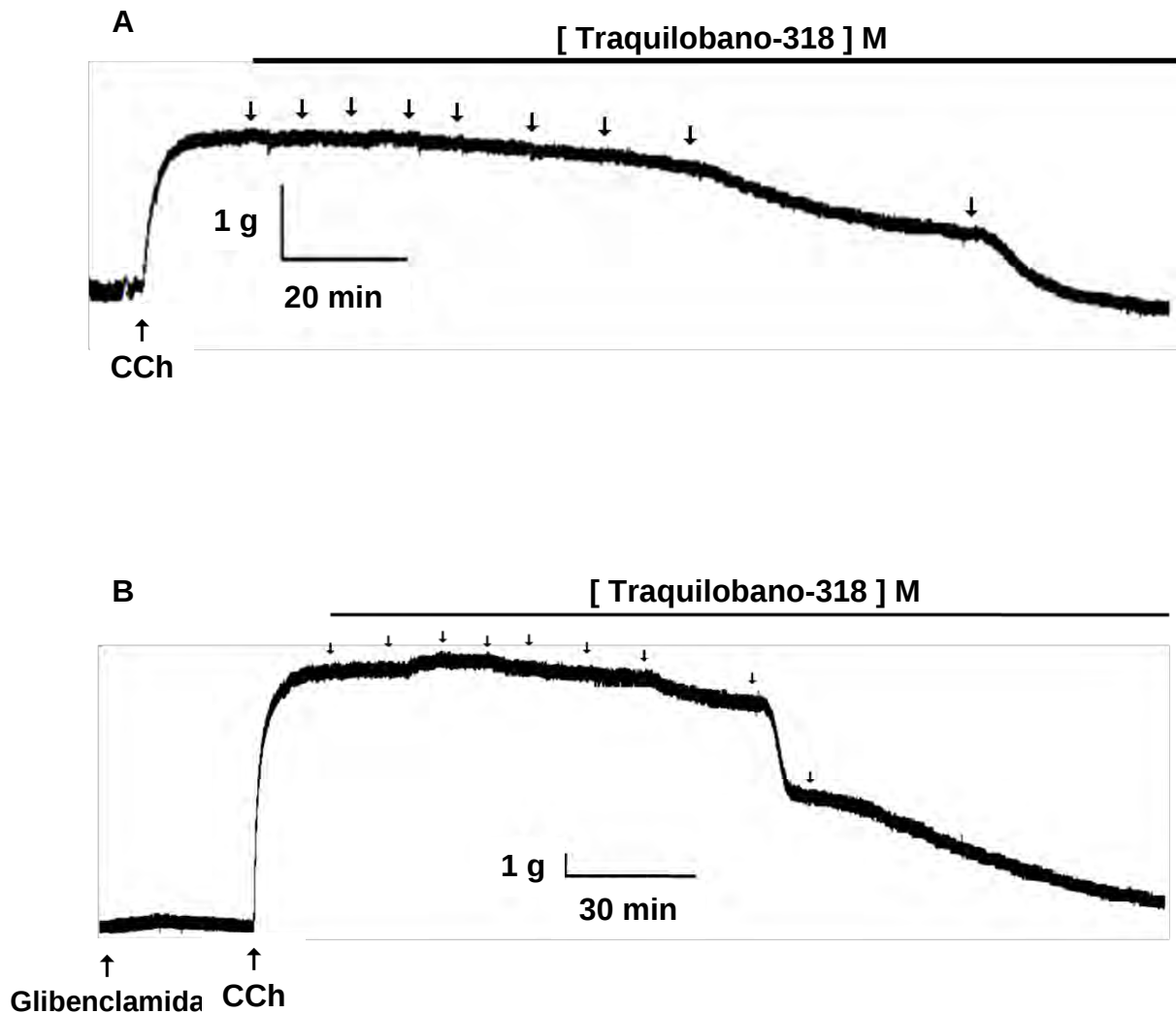
Gráfico 4 - Efeito relaxante (A) e os valores de pD_2 (B) do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh em anéis de traqueia isolada de cobaia na ausência (○) e na presença (■) de 2×10^{-3} M de 4-AP.



A. Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). **B.** As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. $**p < 0,01$ (teste t : controle vs. 4-AP).

Fonte: Martins, 2012.

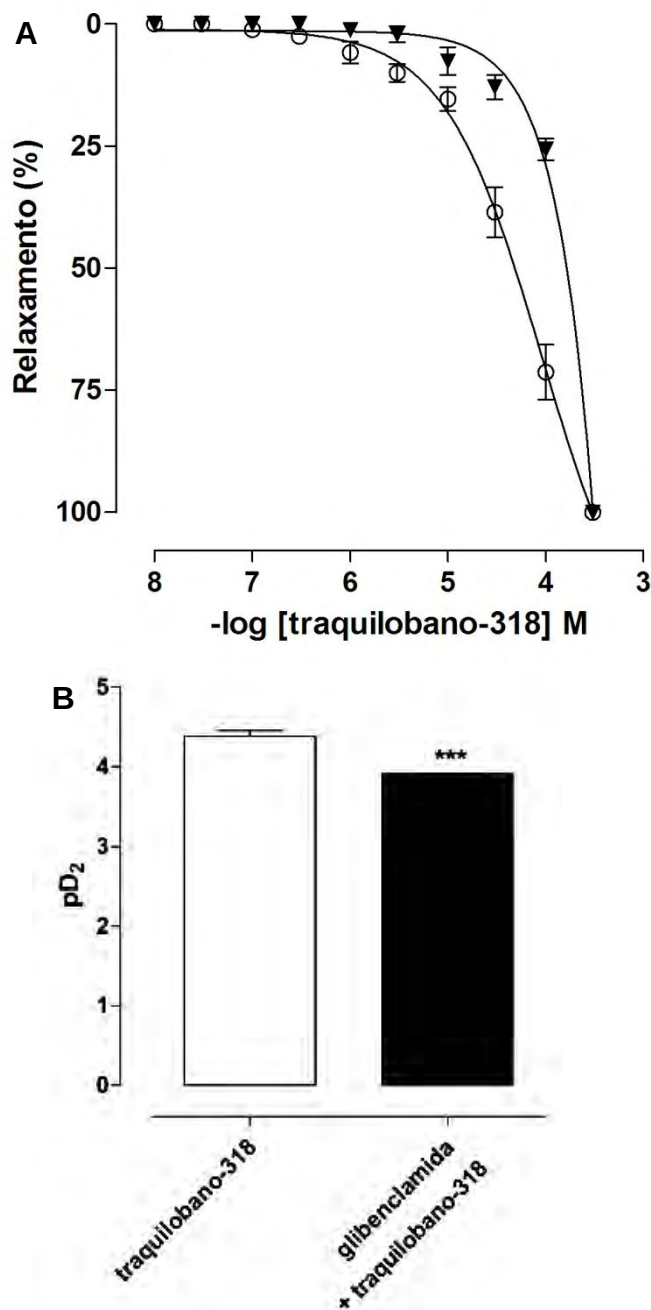
Figura 11 - Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 3×10^{-6} M de glibenclamida (B) em traqueia isolada de cobaia



As setas para baixo representam a adição cumulativa do traquilobano-318 nas concentrações de 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, respectivamente.

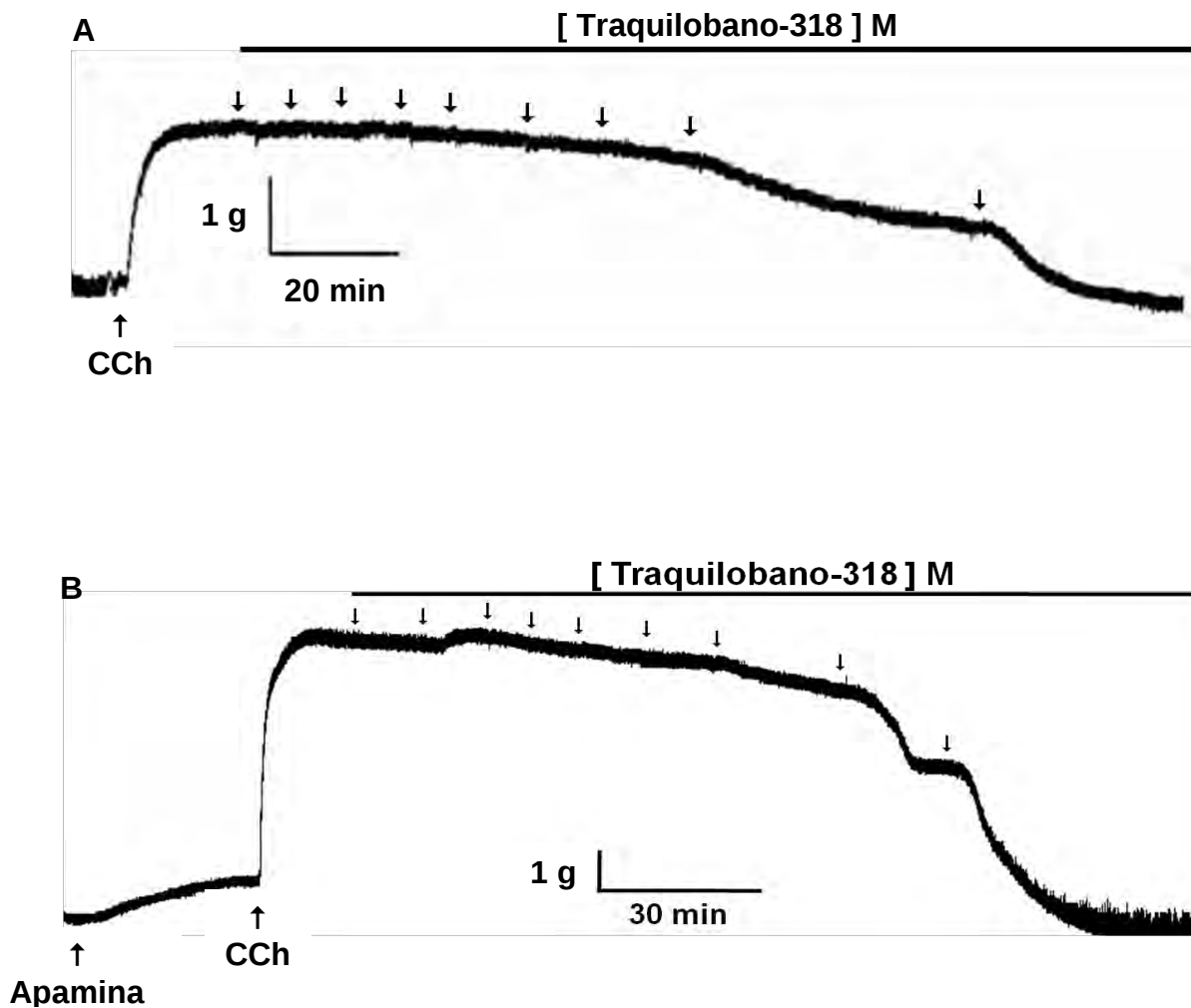
Fonte: Martins, 2012.

Gráfico 5 - Efeito relaxante (**A**) e os valores de pD_2 (**B**) do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh em anéis de traqueia isolada de cobaia na ausência (○) e na presença (▼) de 3×10^{-6} M de glibenclamida.



A. Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). **B.** As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. *** $p < 0,001$ (teste t : controle vs. glibenclamida).

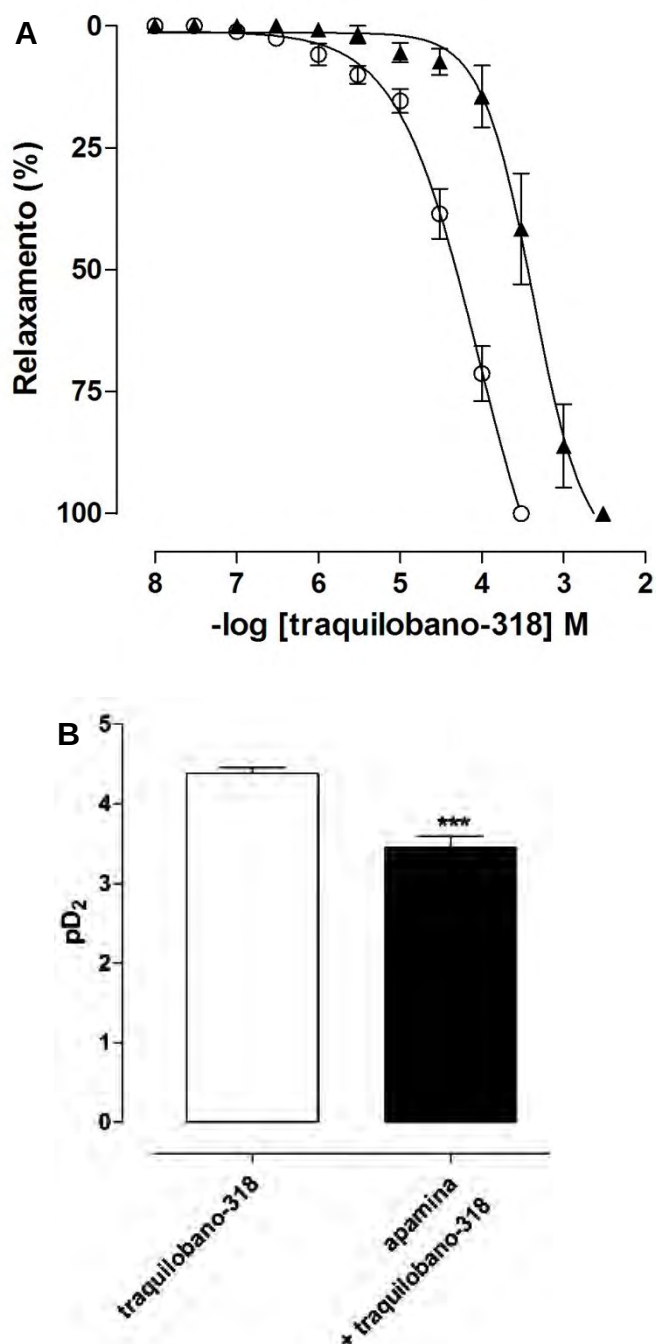
Figura 12 - Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10^{-6} M de apamina (B) em traqueia isolada de cobaia.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do traquilobano-318 nas concentrações de 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, respectivamente.

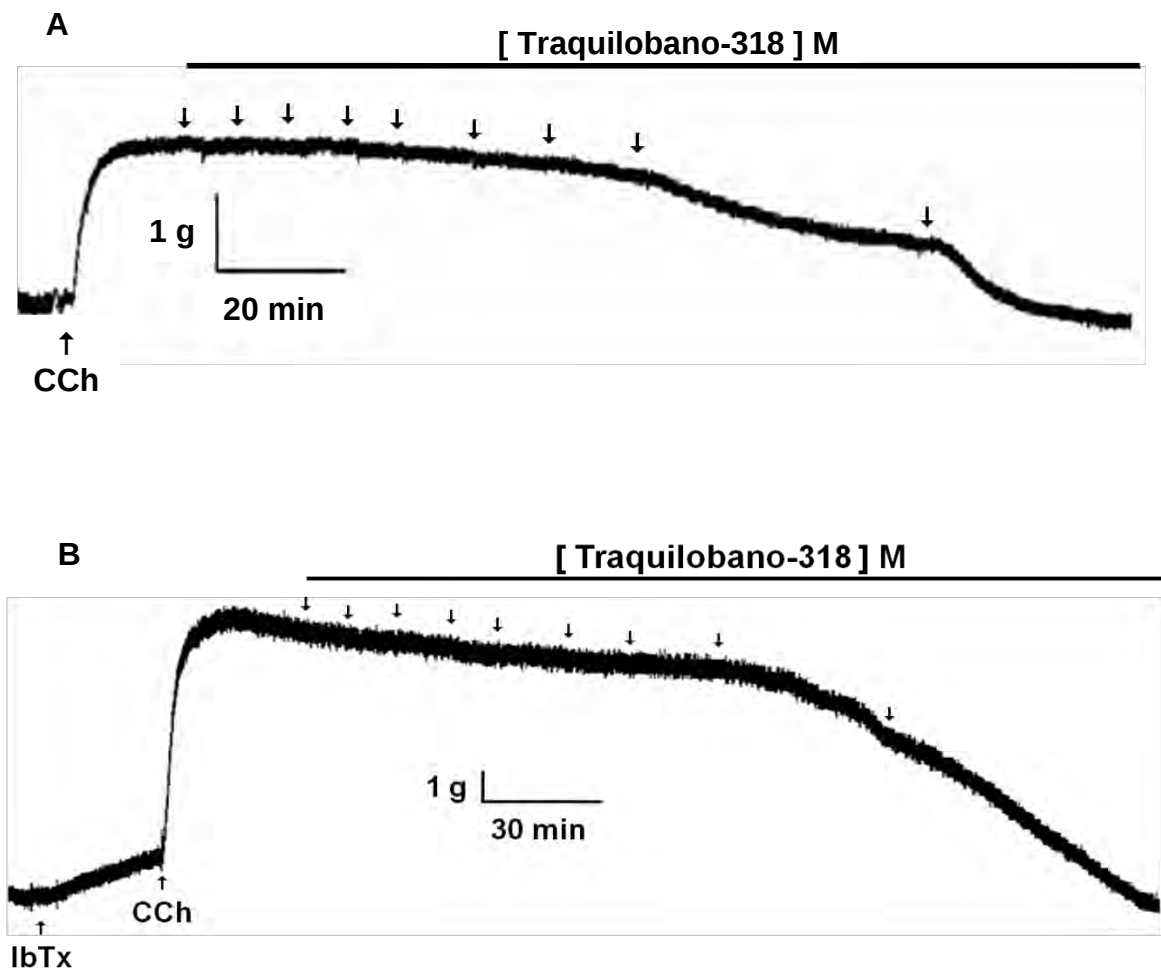
Fonte: Martins, 2012.

Gráfico 6 - Efeito relaxante (**A**) e os valores de pD_2 (**B**) do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh em anéis de traqueia isolada de cobaia na ausência (○) e na presença (▲) de 10^{-6} M de apamina.



A. Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). **B.** As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. *** $p < 0,001$ (teste t : controle vs. apamina).

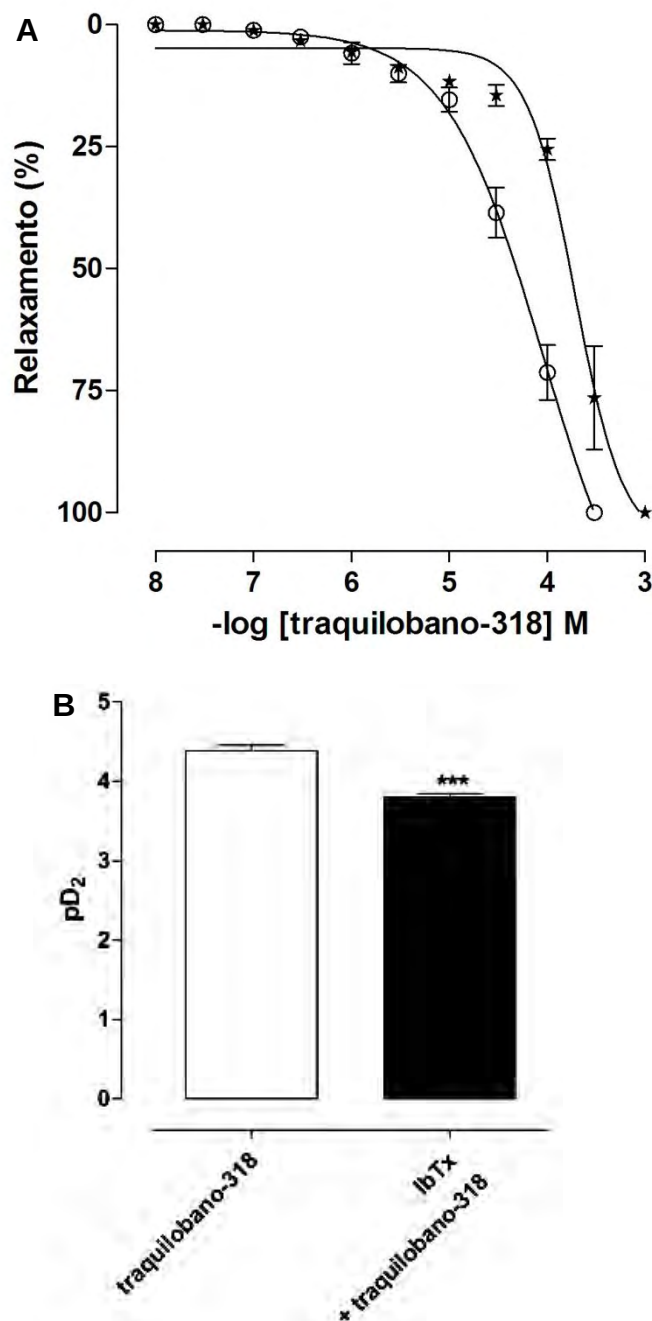
Figura 13 - Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10^{-7} M de IbTx (B) em traqueia isolada de cobaia.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do traquilobano-318 nas concentrações de 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, respectivamente.

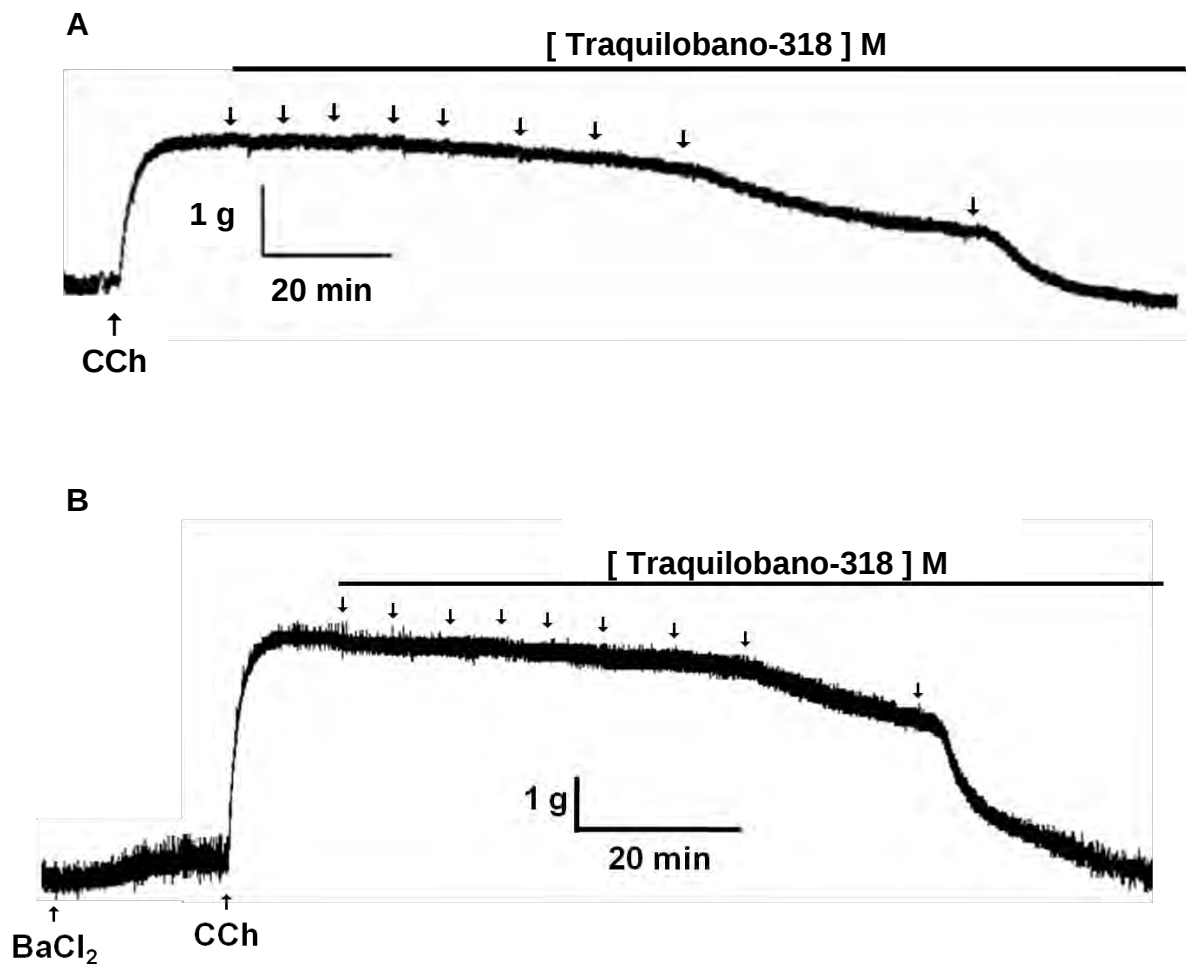
Fonte: Martins, 2012.

Gráfico 7 - Efeito relaxante (**A**) e os valores de pD_2 (**B**) do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh em anéis de traqueia isolada de cobaia na ausência (○) e na presença (★) de 10^{-7} M de IbTx.



A. Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). **B.** As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. *** $p < 0,001$ (teste t : controle vs. IbTx).

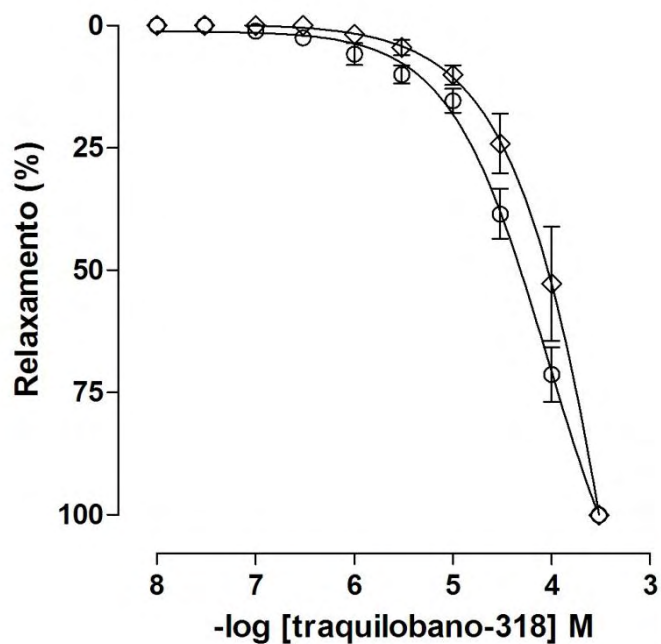
Figura 14 - Registro representativo do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 10^{-4} M de BaCl_2 (B) em traqueia isolada de cobaia.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do traquilobano-318 nas concentrações de 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, respectivamente.

Fonte: Martins, 2012.

Gráfico 8. Efeito relaxante do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh em anéis de traqueia isolada de cobaia na ausência ($\circ$) e na presença ($\diamond$) de 10^{-4} M de BaCl_2 .



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

Fonte: Martins, 2012.

Tabela 1 - Análise entre os valores de pD_2 de traquilobano-318 em traqueia de cobaia na ausência e presença dos bloqueadores de canais de K^+ .

Bloqueadores	pD_2
Controle	$4,38 \pm 0,07$
TEA ⁺ 10 mM	$4,01 \pm 0,06$ *, ##
4-AP	$4,00 \pm 0,06$ *, ##
Glibenclamida	$3,91 \pm 0,003$ **, #
Apamina	$3,45 \pm 0,14$ ***
Ibtx	$3,80 \pm 0,05$ ***
BaCl ₂	$4,15 \pm 0,10$ ###

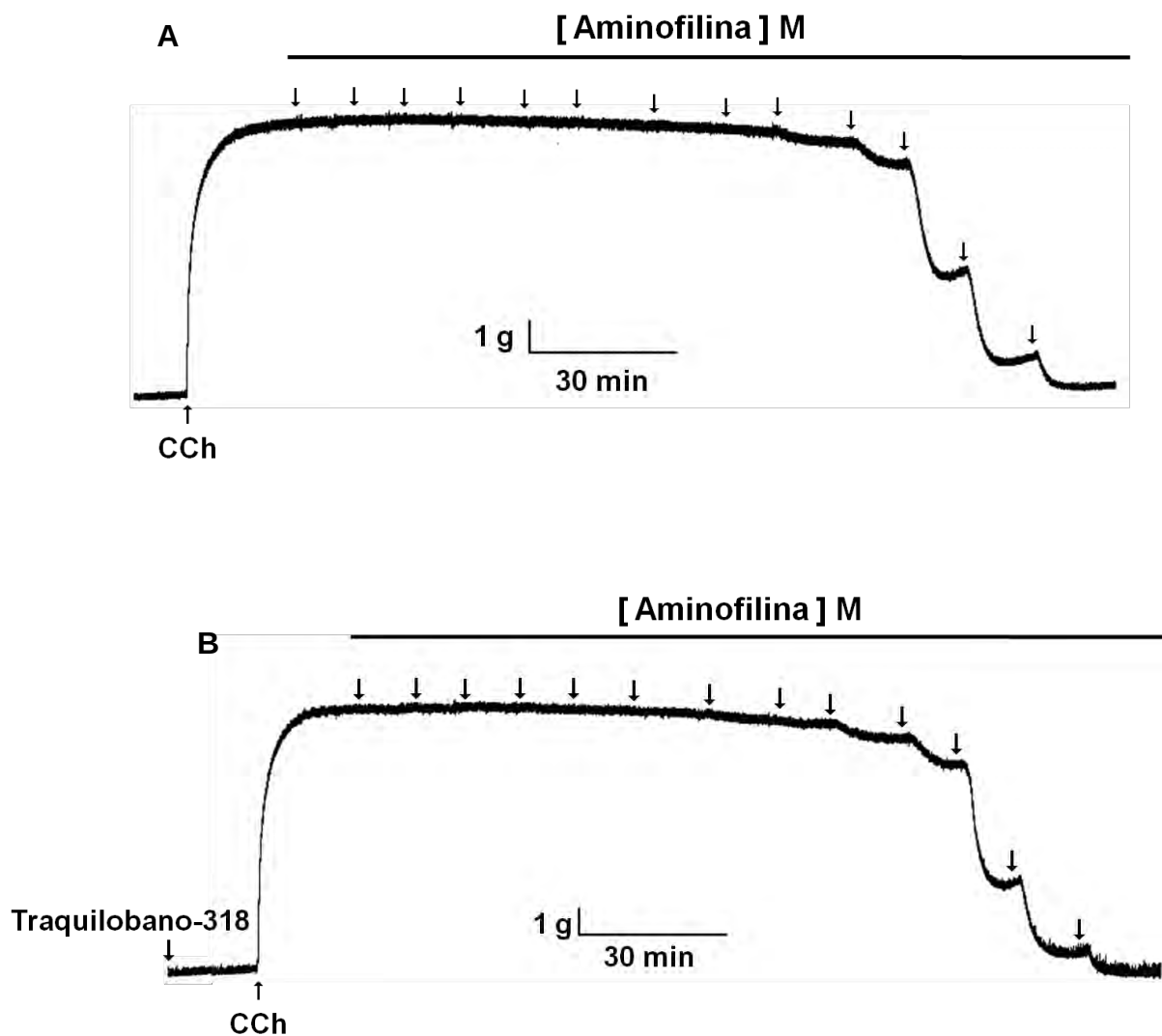
ANOVA *One-way* seguida do pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ controle vs. bloqueadores) e # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ (apamina vs. bloqueadores).

Fonte: Martins, 2012.

4.1.5 Efeito do traquilobano-318 no relaxamento induzido por aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol

O traquilobano-318 (3×10^{-5} M) (Figura 15B) não interferiu no efeito relaxante da aminofilina (10^{-9} – 10^{-3} M) (Figura 15A), um inibidor não seletivo das fosfodiesterases, em traqueia de cobaia, como evidenciou-se através dos valores de pD_2 da aminofilina na ausência ($4,27 \pm 0,09$, $n = 5$) e presença ($4,46 \pm 0,08$, $n = 5$) do diterpeno (Gráfico 9). O tempo médio de relaxamento da aminofilina (161,4 minutos) não foi alterado na presença do traquilobano-318 (162,2 minutos).

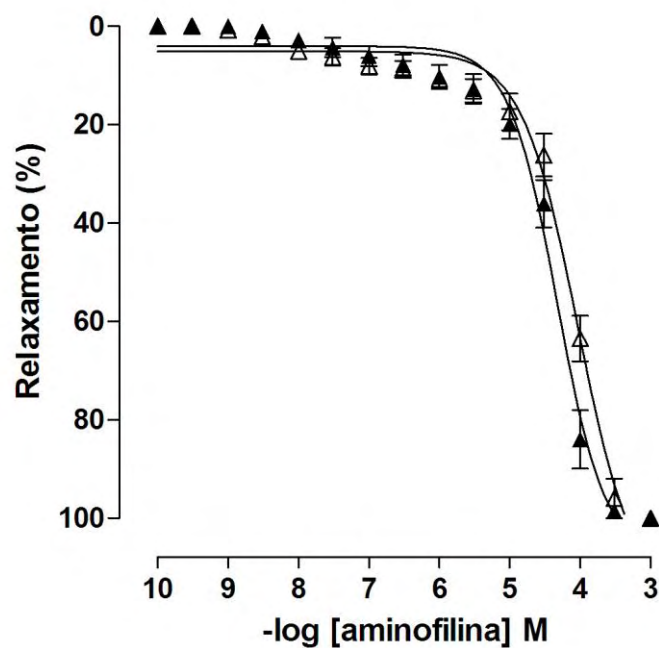
Figura 15 - Registro representativo do efeito relaxante da aminofilina sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de CCh na ausência (A) e na presença de 3×10^{-5} M do traquilobano-318 (B) em traqueia isolada de cobaia.



As setas para baixo, sob a barra, representam a adição cumulativa da aminofilina nas concentrações de 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} e 10^{-3} M, respectivamente.

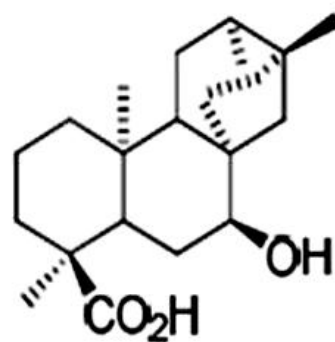
Fonte: Martins, 2012.

Gráfico 9. Efeito relaxante da aminofilina sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de CCh em anéis de traqueia isolada de cobaia na ausência ($\triangle$) e na presença ($\blacktriangle$) de 3×10^{-5} M de traquilobano-318.



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

Fonte: Martins, 2012.



5 Discussão

No presente estudo é descrito parte do mecanismo de ação pelo qual o ácido *ent-7 α* -hidroxitraquiloban-18-oico (traquilobano-318) relaxa o músculo liso da traqueia isolada de cobaia, ficando evidenciado que o mesmo atua de maneira a modular positivamente alguns subtipos de canais de potássio em nível funcional.

Santos et al. (2011a) demonstraram que os diterpenos traquilobano-360 e traquilobano-318 isolados de *X. langsdorfiana* apresentam efeitos divergentes, ou não, a depender do modelo de músculo liso em que foram testados. Ambos os compostos comportaram-se de maneira semelhante em aorta de rato, útero de rata e íleo de cobaia, onde nos dois primeiros não foi observado efeito espasmolítico e no terceiro os dois traquilobanos apresentaram ação espasmolítica, através da modulação de canais de potássio e cálcio que culminam com a redução da $[Ca^{2+}]_c$ (SANTOS et al., 2011b). No entanto, no modelo de músculo liso de traqueia de cobaia os diterpenos apresentaram efeitos distintos, onde apenas o traquilobano-318 apresentou ação relaxante independente de epitélio funcional, e ainda que a responsividade da traqueia ao agonista contrátil testado foi restabelecida após 1 hora da retirada do traquilobano-318 da cuba (SANTOS, 2010). Uma vez que, estruturalmente esses compostos diferem entre si somente pela presença de uma acetoxila na posição 7 no caso do traquilobano-360 e de uma hidroxila na mesma posição para o traquilobano-318, pode-se sugerir que a ação observada na traqueia de cobaia é resultado desta alteração química.

A calmodulina (CaM), uma proteína mensageira ligante de cálcio multifuncional, é ubiquamente expressa nas células eucarióticas e transduz sinais de cálcio através da ligação aos íons cálcio com consequente modificação e interação a vários alvos proteicos (STEVENS, 1983). A CaM medeia vários processos como inflamação, metabolismo, apoptose, movimento intracelular, memória a curto e longo prazo, resposta imune e contração do músculo liso (CHIN; MEANS, 2000). Neste último, em especial, a CaM ligada aos íons cálcio ativa a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), uma enzima capaz de fosforilar a cadeia leve de miosina (MLC) na presença de ATP. As MLCs são subunidades regulatórias de 20 kD encontradas nas cabeças de miosina, que ao serem fosforiladas levam a formação das pontes cruzadas entre as cabeças de miosina e os filamentos de actina com consequente contração do músculo liso (GAO et al., 2001).

De início, avaliou-se a hipótese de que o traquilobano-318 estaria atuando sobre uma das partes da via clássica pela qual a contração do músculo liso é iniciada, o complexo $[(Ca^{2+})_4-CaM]$, visto que a formação deste complexo é um passo limitante deste processo. No entanto, o resultado mostrou que a presença da clorpromazina, um inibidor da calmodulina (ESTRADA-SOTO et al., 2010), não modificou a resposta relaxante do traquilobano-318 (Gráfico 1), o que descarta uma possível ação do diterpeno sobre a calmodulina, e consequentemente sobre o complexo $[(Ca^{2+})_4-CaM]$.

O epitélio das vias aéreas é responsável pela produção de várias substâncias capazes de dificultar ou favorecer o processo de relaxamento do músculo liso traqueal, como por exemplo, ATP (FERGUSON; KENNEDY; BURTON, 1997), NO (BIRDER et al., 1998), endotelina (HENRY, 1999) e prostaglandinas (RUAN; ZHOU; CHAN, 2011), sendo essas últimas, em especial a prostaciclina (PGI_2), muito bem documentada por seus efeitos regulatórios sobre a contração do músculo liso, bem como sobre as funções fisiológicas do mesmo, parecendo ser o mais importante fator derivado do epitélio (RUAN; ZHOU; CHAN, 2011). Como descrito anteriormente, Santos et al. (2011a) evidenciou que os efeitos relaxantes do traquilobano-318 no músculo liso da traqueia isolada de cobaia ocorreu de maneira independente dos fatores derivados do epitélio, dessa forma esse estudo foi direcionado a investigar uma possível ação modulatória do diterpeno sobre alguns canais iônicos relacionados ao controle do tônus das vias aéreas.

Os canais iônicos são proteínas formadoras de poros que auxiliam no controle e estabilização do potencial de membrana das células excitáveis por permitir que os íons atravessem a membrana plasmática de acordo com seus respectivos gradientes eletroquímicos (HILLE, 2001). Duas classes de canais iônicos muito importantes para regulação dos processos de contração e relaxamento do músculo liso são os canais de cálcio e os canais de potássio (THORNELOE; NELSON, 2005).

A contração deflagrada por broncoconstritores, como por exemplo, a acetilcolina e o CCh, resulta num aumento na $[Ca^{2+}]_c$ de 0,1 μM para 1 μM , sendo esse aumento de 10 vezes nos níveis de Ca^{2+} responsável por ativar a maquinaria contrátil gerando o aumento no tônus da traqueia (BARNES, 1998). No músculo liso,

os Ca_v1 são melhores caracterizados e são o maior responsável pelo influxo de Ca^{2+} (KURIYAMA; KITAMURA; NABATA, 1995).

Os canais de potássio desempenham um papel chave na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular, sendo a contração do músculo liso dependente do balanço entre o aumento da condutância ao íon K^+ , levando a uma hiperpolarização/repolarização e a diminuição da condutância ao K^+ , levando a uma despolarização (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). Eles estão envolvidos em várias funções fisiológicas, tais como, potencial de membrana celular e secreção de hormônios e de neurotransmissores. Sua atividade pode ser regulada por voltagem, Ca^{2+} ou por neurotransmissores e consequentemente as vias de sinalização que eles estimulam (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2008) e é o movimento dos íons K^+ por canais presentes na membrana plasmática que regula o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v (THORNELOE; NELSON, 2005).

Já é bem relatado na literatura que os ativadores de canais de K^+ são eficazes em relaxar a musculatura lisa em condições de aumento moderado da $[\text{K}^+]_e$ enquanto que, em maiores $[\text{K}^+]_e$ este efeito é bastante atenuado, visto que na presença de altas $[\text{K}^+]_e$ o potencial de equilíbrio do K^+ torna-se menos negativo que o limiar de abertura dos Ca_v . Os ativadores de canais de K^+ não são capazes de hiperpolarizar/repolarizar a membrana suficientemente para fechar os Ca_v e evitar o influxo de Ca^{2+} por esses canais, ou seja, há uma grande redução no gradiente eletroquímico para o K^+ (GURNEY, 1994; NIELSEN-KUDSK, 1996; THIRSTRUP; NIELSEN-KUDSK; MELLEMKJAER, 1997). Um exemplo disso, são os ativadores de canais de K^+ , cromacalina e pinacidil, que apresentam maior eficácia em relaxar o músculo liso pré-contraído em resposta a um aumento moderado de K^+ extracelular, como é o caso de KCl 18 mM, do que em resposta a um aumento acentuado, como na situação de KCl 60 mM (GURNEY, 1994; RAEBURN; GIEMBYCZ, 1995).

Dessa maneira, para verificar se o traquilobano-318 estaria agindo por diminuir o influxo de Ca^{2+} através do bloqueio direto dos Ca_v ou por uma modulação positiva dos canais de K^+ , avaliou-se o efeito relaxante desse diterpeno sobre as contrações induzidas por um aumento moderado da concentração de potássio extracelular ($[\text{K}^+]_e$), 18 mM, e por altas $[\text{K}^+]_e$, 60 mM (RAEBURN; GIEMBYCZ, 1995), levando em consideração que em condições fisiológicas a $[\text{K}^+]_e$ em uma célula

excitável típica varia entre 3 a 5 mM e que a concentração intracelular de K^+ ($[K^+]_i$) é de aproximadamente 150 mM (HILLE, 2001).

Assim, se o traquilobano-318 estivesse modulando positivamente os canais de potássio se esperaria um efeito muito mais pronunciado do mesmo em relaxar o órgão pré-contraído com baixas do que com altas $[K^+]_e$, e foi o que ocorreu. O diterpeno apresentou uma maior potência relaxante, cerca de 5 vezes, quando a traqueia era pré-contraída por 18 mM de KCl do que com 60 mM de KCl (Gráfico 2). Na literatura há relato de que outro diterpeno, o labdano-302, apresentou maior potência e eficácia em relaxar a traqueia de cobaia pré-contraída com 18 mM do que com 60 mM de KCl, sendo sugerido que o efeito deste composto também estaria se dando por uma modulação positiva dos canais de K^+ (RIBEIRO et al., 2007),

Dessa forma, tem-se um indício que o traquilobano-318 estaria atuando sobre os canais de potássio para relaxar a traqueia de cobaia. Para confirmar ou descartar essa hipótese, investigou-se como ocorreria o efeito relaxante do diterpeno na presença de um bloqueador não seletivo para os canais de potássio, TEA^+ 10 mM, onde ficou evidenciado, pelo desvio da curva de relaxamento para a direita com alteração significativa dos valores de pD_2 (Gráfico 3), que há modulação positiva dos canais de potássio no efeito relaxante desse diterpeno, fato esse que corrobora com os achados da figura 1, uma vez que houve diminuição do tempo de relaxamento mas não da potência relaxante do traquilobano-318 na presença da CPZ o que indica ter havido um efeito sinérgico entre o inibidor da CaM e o traquilobano-318. Além disso, esse resultado está em conformidade com os achados de Santos et al. (2011b), que demonstrou haver modulação positiva dos canais de potássio no mecanismo de ação do traquilobano-318, bem como do traquilobano-360, em íleo isolado de cobaia. Posteriormente, o questionamento a ser respondido foi o seguinte: quais subtipos de canais de potássio estariam envolvidos no mecanismo relaxante do traquilobano-318?

Diversos tipos de canais de potássio são expressos pelo músculo liso das vias aéreas, sendo responsáveis pela regulação do potencial de membrana e excitabilidade, induzindo hiperpolarização e relaxamento (CAMPOS-BEDOLLA et al., 2008). Os principais canais de potássio expressos nesse tecido são: K_v (ZHAO; XU; et al., 2004), K_{ATP}

(MURRAY; BOYLE; SMALL., 1989), SK_{Ca} (GUTMAN et al., 2005), BK_{Ca} (SNETKOV et al., 1995) e K_{ir} (OONUMA et al., 2002).

Sendo os K_v importantes canais que contribuem para o potencial de repouso em diversos músculos lisos (ARCHER, 2002; BARDOU; TRINH; BROCHIERO, 2009; BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007; GORDIENKO; ZHOLOS; BOLTON, 1999), dentre eles o da traqueia de cobaia (KOTLIKOFF, 1993), decidiu-se avaliar a possível participação destes canais através da utilização da 4-aminopiridina (4-AP), uma ferramenta farmacológica conhecida por bloquear os canais K_v , a qual é usada para o estudo do mecanismo de ação de várias substâncias com atividade relaxante da musculatura lisa (HUANG, 1998; JAHANGIR; TERZIC, 2005; MALERBA et al., 2010; PELAIA et al., 2002; SATAKE; SHIBATA; SHIBATA, 1997).

Como ficou demonstrado pelo Gráfico 4, o traquilobano-318 teve seu efeito relaxante atenuado na presença da 4-AP sugerindo que, em nível funcional, este diterpeno relaxa a traqueia de cobaia por modulação positiva dos K_v . Corroborando com esta observação, em íleo isolado de cobaia, Santos et al. (2011b) evidenciaram que o traquilobano-318 também modulou positivamente os K_v em seu efeito espasmolítico.

Os K_{ATP} foram primeiro identificados em miócitos ventriculares (NOMA, 1983). Depois foram identificados em células β -pancreáticas, músculo esquelético, neurônios e músculos lisos (TERAMOTO, 2006). Vários tipos de K_{ATP} nativos foram identificados em vários tipos de músculos lisos vasculares, viscerais e das vias aéreas (CUI et al., 2002; MURRAY; BOYLE; SMALL, 1989; YUNOKI; TERAMOTO; ITO, 2003). No músculo liso das vias aéreas, os K_{ATP} ditos como sendo um *link* entre a excitabilidade da membrana e o metabolismo celular (RODRIGO; STANDEN, 2005), podendo esses canais ser ativados por agonistas endógenos, como a adenosina, levando a uma hiperpolarização de membrana e consequente relaxamento do músculo liso, uma resposta que pode ser mimetizada por substâncias exógenas, como os abridores de canais de potássio cromacalina e pinacidil (TERAMOTO, 2006).

Assim, a fim de avaliar a participação dos K_{ATP} no efeito relaxante do traquilobano-318, uma curva concentração-resposta deste diterpeno foi obtida na

presença da glibenclamida. Dessa maneira foi evidenciada uma redução na potência relaxante do composto (Gráfico 5), sugerindo que os K_{ATP} podem estar sendo ativados para que o diterpeno exerça sua ação relaxante na traqueia de cobaia. Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente, onde o traquilobano-318 também parece modular positivamente os K_{ATP} em seu mecanismo de ação espasmolítico em íleo de cobaia (SANTOS et al., 2011b).

Uma vez ativados, pelo aumento da $[Ca^{2+}]_c$, os K_{Ca} dão início ao efluxo dos íons K^+ que via re/hiperpolarização do potencial de membrana restabelece as $[Ca^{2+}]_c$ através da limitação do influxo do íon Ca^{2+} seja pela desativação dos Ca_v ou pelo aumento da atividade do trocador Na^+/Ca^{2+} . Portanto, os K_{Ca} regulam a amplitude e duração das modificações de $[Ca^{2+}]_c$ e assim afetam as vias de sinalização que são disparadas pelo íon Ca^{2+} (FAKLER; ADELMAN, 2008).

Os canais $K_{Ca1.1}$ ou BK_{Ca} são encontrados em cérebro, cóclea, músculo esquelético e músculo liso. Já os $K_{Ca2.1}$; 2.2 e 2.3 ou SK_{Ca} são largamente encontrados em cérebro, coração e alguns tipos de músculo liso. Enquanto que os $K_{Ca3.1}$ ou IK_{Ca} estão presentes na placenta, próstata, linfócitos, pâncreas e endotélio vascular (WEI et al., 2005). Os SK_{Ca} estão constitutivamente associados a calmodulina, que media a abertura do canal através da ligação com o cálcio (BERKEFELD; FAKLER; SCHULTE, 2010). Os canais de K^+ ativados por cálcio de pequena condutância (SK_{Ca}) geram uma corrente hiperpolarizante em células excitáveis após a geração do potencial de ação, e assim levam ao relaxamento do músculo liso (BERKEFELD; FAKLER; SCHULTE, 2010; BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

A possível participação dos SK_{Ca} no efeito relaxante do traquilobano-318 em traqueia de cobaia foi confirmada, uma vez que, na presença de apamina, um inibidor seletivo dos SK_{Ca} (DEVILLIER et al., 2001), a curva de relaxamento do diterpeno foi atenuada de maneira significativa (Gráfico 6), sugerindo que assim como os K_{ATP} e os K_v , os SK_{Ca} também estão envolvidos no mecanismo de ação do traquilobano-318. Semelhantemente, em íleo de cobaia, também se evidenciou que este diterpeno parece ativar os SK_{Ca} em sua ação espasmolítica (SANTOS et al., 2011b).

Fisiologicamente, a ativação dos BK_{Ca} provê um mecanismo de *feedback* que limita a contração por causar hiperpolarização e redução da duração do potencial de ação no músculo liso, limitando assim a entrada de Ca²⁺ através dos Ca_v (PONTE et al., 2012). Dessa forma, a modulação positiva destes canais mostra-se uma alternativa bastante interessante a ser investigada.

Os BK_{Ca} tiveram sua contribuição confirmada no mecanismo de ação relaxante do traquilobano-318 em traqueia isolada de cobaia através da utilização da ferramenta farmacológica IbTx, uma toxina isolada do escorpião *Buthus tamulus* (GALVEZ et al., 1990), capaz de bloquear especificamente os BK_{Ca}. Na presença desta toxina, o efeito relaxante do diterpeno foi atenuado de maneira significativa (Gráfico 7), evidenciando a participação deste canal. De maneira contrária, os BK_{Ca} não são modulados positivamente no mecanismo de ação espasmolítico do traquilobano-318 em íleo de cobaia (SANTOS et al., 2011b). No entanto, outro diterpeno também isolado de *X. langsdorfiana*, o labdano-302 parece ativar os BK_{Ca} em sua ação relaxante em traqueia isolada de cobaia (RIBEIRO, 2007).

Outro importante subtipo de canal de potássio são os K_{ir}, que em condições fisiológicas, geram uma grande condutância ao K⁺ em potenciais negativos ao potencial de repouso do K⁺ (E_K), mas permite um menor fluxo de corrente em potenciais positivos ao E_K (MIYAZAKI et al., 1974). Assim, nas células que expressam uma grande quantidade de K_{ir} espera-se que mostrem um potencial de repouso (E_{rest}) próximo ao E_K e pouca atividade elétrica espontânea. Isso, e sua essencial independência a voltagem, permite aos K_{ir} desempenharem um papel chave na manutenção do E_{rest} e na regulação de duração do potencial de ação em células excitáveis (MIYAZAKI et al., 1974; SAKMANN; TRUBE, 1984).

Com a finalidade de avaliar a participação dos K_{ir} no mecanismo relaxante do traquilobano-318, utilizamos o BaCl₂ que na concentração de 10⁻⁴ M é um bloqueador seletivo dos K_{ir} (NAKAHARA et al., 2001; NELSON; QUAYLE, 1995). E de acordo com o Gráfico 8 ficou estabelecido que não houve desvio da curva de relaxamento do diterpeno, o que descarta a participação dos K_{ir} na ação do produto natural.

Dessa forma, nossos achados estão em conformidade e são corroborados com o estudo de Santos et al. (2011b), uma vez que ficou evidenciado que o

traquilobano-318 relaxa a traqueia de cobaia através da modulação positiva dos subtipos de canais de potássio K_{ATP} , SK_{Ca} e K_v , além do BK_{Ca} o que, supostamente, também culmina numa diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ para que assim ocorra o relaxamento do músculo liso das vias aéreas.

Adicionalmente, existem evidências de substâncias capazes de modular indiretamente a abertura de canais de K^+ (BOLOTINA et al., 1994; DENSON et al., 2005; FINN; GRUNWALD; YAU, 1996; GRIBKOFF; STARRETT; DWORETZKY, 2001; LIU et al., 2003), algumas delas, como a forskolina (FSK) que é um diterpeno do tipo labdano isolado de *Coleus forskohlii* (Laminaceae), são capazes de modular positivamente a abertura de canais de K^+ por fosforilação via PKA (MASON et al., 2002; WINKLHOFFER et al., 2003). Em nosso grupo de estudo foi demonstrado que o labdano-302, outro diterpeno isolado de *X. langsdorfiana*, parece exercer seu efeito espasmolítico sobre traqueia de cobaia, aorta de rato, íleo de cobaia e útero de rata através da via de sinalização AMPc-PKA (RIBEIRO et al., 2007; RIBEIRO, 2007; MACÊDO, 2008; TRAVASSOS, 2010).

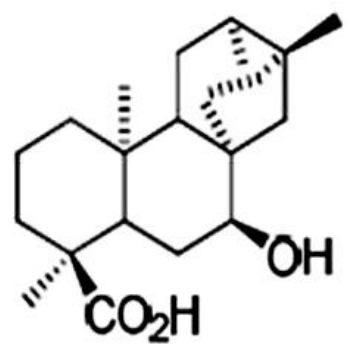
As fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDEs) estão amplamente distribuídas em vários tecidos de mamíferos, incluindo o músculo liso, sendo distribuídas em 11 famílias distintas (PDE1-11) e tendo como função a hidrólise do AMPc e do GMPc resultando em seus produtos inativos, o 5'-AMP e o 5'-GMP, que não são capazes de ativar, respectivamente, a PKA e a PKG, cessando assim a sinalização celular dependente do aumento destes nucleotídeos cíclicos (LUGNIER, 2006).

Substâncias capazes de aumentar o conteúdo intracelular de AMPc ou GMPc tem seu efeito relaxante potencializado pela inibição das PDEs em vários tecidos devido ao acúmulo do conteúdo total desses nucleotídeos (BENDER; BEAVO, 2006; LUGNIER, 2006). Uma maneira indireta para se investigar a participação de nucleotídeos cíclicos em nível funcional no efeito relaxante de uma droga teste é a utilização de inibidores de PDEs, como a aminofilina (JENNE, 1992; LIU et al., 2003).

O efeito relaxante do traquilobano-318 em traqueia de cobaia parece não envolver a participação de nucleotídeos cíclicos (AMPc e/ou GMPc). Uma vez que o

efeito relaxante promovido pelo inibidor inespecífico de PDEs, aminofilina, não foi alterado na presença do diterpeno (Gráfico 9).

Por fim, tendo em vista os resultados obtidos, fica evidenciado pela primeira vez na literatura científica que o mecanismo da ação relaxante do traquilobano-318 em traqueia isolada de cobaia, em nível funcional, dá-se por uma modulação positiva dos canais de potássio, em especial dos subtipos K_V , K_{ATP} , SK_{Ca} e BK_{Ca} , com maior potência na ativação dos K_{Ca} , o que possivelmente acarretaria uma hiperpolarização de membrana com consequente fechamento dos Ca_v , redução da $[Ca^{2+}]_c$ e relaxamento do músculo liso traqueal. No entanto, para uma melhor caracterização do mecanismo relaxante deste diterpeno faz-se necessário a investigação de outras vias de sinalização que levam ao relaxamento não estudadas, além da realização de experimentos em nível celular e molecular.

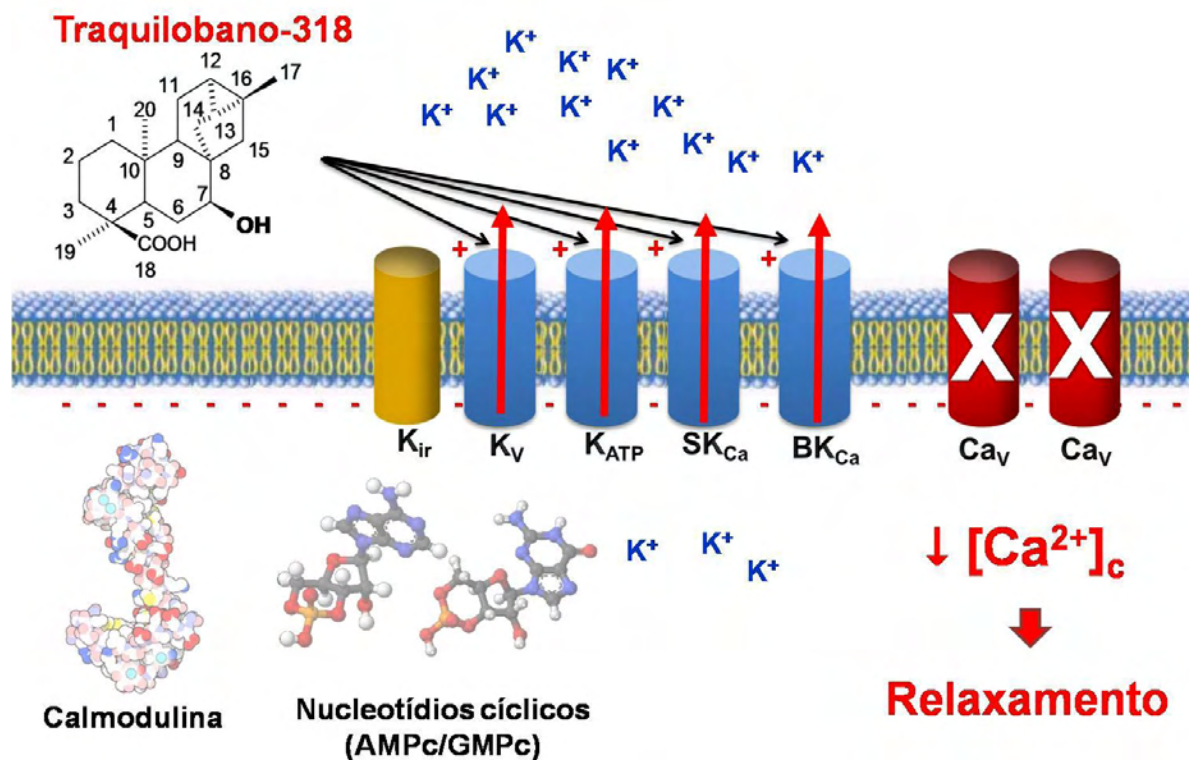


6 Conclusões

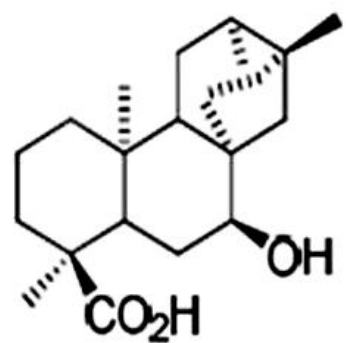
Neste trabalho de investigação da atividade relaxante do ácido *ent-7 α* -hidroxitraquiloban-18-oico (traquilobano-318) visando elucidar o mecanismo de ação deste diterpeno em traqueia isolada de cobaia, pode-se concluir, em nível funcional, que:

- A calmodulina não é alvo do diterpeno;
- A participação dos canais de potássio foi evidenciada nesta investigação;
- Os subtipos de canais de potássio K_V , K_{ATP} , SK_{Ca} e BK_{Ca} mostraram-se como sendo alvos farmacológicos do diterpeno;
- Os nucleotídeos cíclicos parecem não estar envolvidos.

Figura 16 – Esquema representativo do mecanismo de ação relaxante do traquilobano-318 em traqueia isolada de cobraia



Fonte: Martins, 2012



Referências

AHARONI, A.; JONGSMA, M. A.; BOUWMEESTER, H. J. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 12, p. 594-602, 2005.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edition. **British Journal of Pharmacology**, v. 153 Suppl 2, p. S1-209, 2008.

ALFONSO, D.; GENG-XIAN, Z.; GUOEN, S; Qing, Y.; SCHWEDLER, J.T.; MCLAUGHLIN, J.L.; COLMAN-SAIZARBITORIA, T. Aromin and Aromicin, Two New Bioactive Annonaceous Acetogenins, Possessing an Unusual Bis-THF Ring Structure, from *Xylopiia aromatica* (Annonaceae). **Tetrahedron**, v. 52, n. 12, p. 4215-4224, 1996.

ARCHER, S. L. Potassium channels and erectile dysfunction. **Vascular Pharmacology**, v. 38, n. 1, p. 61-71, 2002.

ASFAW, N.; DEMISSEW, S. Handbook of African medicinal plants. **Economic Botany**, v. 48, n. 1, p. 64-64, 1994.

BABENKO, A. P.; AGUILAR-BRYAN, L.; BRYAN, J. A view of sur/KIR6.X, KATP channels. **Annual Review of Physiology**, v. 60, p. 667-687, 1998.

BARDOU, O.; TRINH, N. T. N.; BROCHIERO, E. Molecular diversity and function of K⁺ channels in airway and alveolar epithelial cells. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 296, n. 2, p. L145 -L155, 2009.

BARNES, P. J. Pharmacology of airway smooth muscle. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 158, n. 5 Pt 3, p. S123-132, 1998.

BEAVO, J. A. Regulation of cyclic nucleotide hydrolysis by cGMP. **BMC Pharmacology**, v. 5, n. Suppl 1, p. S9, 2005.

BEEELER, G. W., Jr; REUTER, H. Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres. **The Journal of Physiology**, v. 207, n. 1, p. 165-190, 1970.

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 488-520, 2006.

BENHAM, C. D.; BOLTON, T. B. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. **The Journal of Physiology**, v. 381, p. 385-406, 1986.

BERKEFELD, H.; FAKLER, B.; SCHULTE, U. Ca^{2+} -Activated K^+ Channels: From Protein Complexes to Function. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 4, p. 1437 -1459, 2010.

BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 21, p. 5047-5061, 2008.

BILLINGTON, C. K.; PENN, R. B. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. **Respiratory Research**, v. 4, n. 1, p. 2, 2003.

BIRDER, L. A.; APODACA, G.; GROAT, W. C. DE; KANAI, A. J. Adrenergic- and capsaicin-evoked nitric oxide release from urothelium and afferent nerves in urinary bladder. **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 2 Pt 2, p. F226-229, 1998.

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-853, 1994.

BORCHARDT, J. K. The Beginnings of Drug Therapy: Ancient Mesopotamian Medicine. **Drug News & Perspectives**, v. 15, n. 3, p. 187-192, 2002.

BOYLE, J. P.; TOMASIC, M.; KOTLIKOFF, M. I. Delayed rectifier potassium channels in canine and porcine airway smooth muscle cells. **The Journal of Physiology**, v. 447, p. 329-350, 1992.

BRAINARD, A. M.; KOROVKINA, V. P.; ENGLAND, S. K. Potassium channels and uterine function. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 18, n. 3, p. 332-339, 2007.

BRAYDEN, J. E. Functional Roles Of KATP Channels In Vascular Smooth Muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 4, p. 312-316, 2002.

BREEMEN, C.; SAIDA, K. Cellular mechanisms regulating $[\text{Ca}^{2+}]_i$ smooth muscle. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 315-329, 1989.

BROWN, D. A.; GÄHWILER, B. H.; GRIFFITH, W. H.; HALLIWELL, J. V. Membrane currents in hippocampal neurons. **Progress in Brain Research**, v. 83, p. 141-160, 1990.

BRUMMITT, R.K.; POWELL, C.E. **Authors of Plant Names**. Royal Botanic Gardens, Kew, 1992

CAMPOS DE ANDRADE, N.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; MAIA, J. G. S. Diterpenes and volatile constituents from the leaves of *Xylopia cayennensis* Maas. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 11, p. 1055-1058, 2004.

CAMPOS-BEDOLLA, P.; VARGAS, M. H.; SEGURA, P.; CARBAJAL, V.; CALIXTO, E.; FIGUEROA, A.; FLORES-SOTO, E.; BARAJAS-LÓPEZ, C.; MENDOZA-PATIÑO, N.; MONTAÑO, L.M. Airway smooth muscle relaxation induced by 5-HT(2A) receptors: role of Na(+)/K(+)-ATPase pump and Ca²⁺-activated K⁺ channels. **Life Sciences**, v. 83, n. 11-12, p. 438-446, 2008.

CARAFOLI, E.; BRINI, M. **Calcium signalling and disease: molecular pathology of calcium**. [S.l.]: Springer, 2007.

CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 411-425, 2005.

CHIN, D.; MEANS, A. R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 8, p. 322-328, 2000.

CHITALEY, K.; WEBER, D.; WEBB, R. C. RhoA/Rho-kinase, vascular changes, and hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 3, n. 2, p. 139-144, 2001.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; ZENG, L.; KOZLOWSKI, J.F.; MCLAUGHLIN, J.L. Venezenin: a new bioactive Annonaceous acetogenin from the bark of *Xylopia aromatica*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 4, p. 532-539, 1995.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; ZAMBRANO, J.; FERRIGNI, N. R.; GU, Z. M.; NG, J. H.; SMITH, D. L.; MCLAUGHLIN, J.L. Bioactive Annonaceous Acetogenins from the Bark of *Xylopia aromatica*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 4, p. 486-493, 1994.

CORRÊA, P. M. In: **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e Exóticas Cultivadas** p.479, Brasil, IBDF, Ministério da Agricultura, v.5, 1984

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012-3043, 2009.

CUI, Y.; TRAN, S.; TINKER, A.; CLAPP, L. H. The molecular composition of K(ATP) channels in human pulmonary artery smooth muscle cells and their modulation by

growth. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 135-143, 2002.

CUNHA, J. F.; CAMPESTRINI, F. D.; CALIXTO, J. B.; SCREMIN, A.; PAULINO, N. The mechanism of gentisic acid-induced relaxation of the guinea pig isolated trachea: the role of potassium channels and vasoactive intestinal peptide receptors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 3, p. 381-388, 2001.

CUPERTINO-SILVA, Y. K.; DIAS, T. L. M. F.; MUNIZ, G.; SANTOS, M. S.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; ARAUJO JUNIOR, J. X.; ALEXANDRE MOREIRA, M. S. Atividade antinoceptiva de diterpenos isolados de *Xylopia langgsdorffiana* (ANNONACEAE) **Anais 38° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**. Ribeirão Preto-SP, 2006.

DANILA, C. I.; HAMILTON, S. L. Phosphorylation of ryanodine receptors. **Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 521-525, 2004.

DELLIS, O.; DEDOS, S. G.; TOVEY, S. C.; TAUFIQ-UR-RAHMAN, DUBEL, S.J.; TAYLOR, C.W. Ca^{2+} entry through plasma membrane IP_3 receptors. **Science**, v. 313, n. 5784, p. 229-233, 14, 2006.

DENSON, D. D.; LI, J.; WANG, X.; EATON, D. C. Activation of BK channels in GH3 cells by a c-PLA2-dependent G-protein signaling pathway. **Journal of Neurophysiology**, v. 93, n. 6, p. 3146-3156, 2005.

DEVILLIER, P.; COROMPT, E.; BRÉANT, D.; CARON, F.; BESSARD, G. Relaxation and modulation of cyclic AMP production in response to atrial natriuretic peptides in guinea pig tracheal smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 430, n. 2-3, p. 325-333, 2001.

DONATO, R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1450, n. 3, p.191-231, 1999.

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 7, p. 637-668, 2001.

DUTTA, K.; CARMODY, M. W.; CALA, S. E.; DAVIDOFF, A. J. Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, n. 8, p. 985-996, 2002.

ESTRADA-SOTO, S.; GONZÁLEZ-MALDONADO, D.; CASTILLO-ESPAÑA, P.; AGUIRRE-CRESPO, F.; SÁNCHEZ-SALGADO, J. C. Spasmolytic effect of *Mentha*

pulegium L. involves ionic flux regulation in rat ileum strips. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 46, n. 2, p. 107-117, 2010.

ETKIN, N. L. Antimalarial plants used by Hausa in northern Nigeria. **Tropical Doctor**, v. 27 Suppl 1, p. 12-16, 1997.

EXTON, J. H. New developments in phospholipase D. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 25, p. 15579-15582, 1997.

FAKLER, B.; ADELMAN, J. P. Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. **Neuron**, v. 59, n. 6, p. 873-881, 2008.

FERGUSON, D. R.; KENNEDY, I.; BURTON, T. J. ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes-a possible sensory mechanism? **The Journal of Physiology**, v. 505, n. Pt 2, p. 503-511, 1997.

FINN, J. T.; GRUNWALD, M. E.; YAU, K. W. Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels: An Extended Family With Diverse Functions. **Annual Review of Physiology**, v. 58, n. 1, p. 395-426, 1996.

FLAGG, T. P.; ENKVETCHAKUL, D.; KOSTER, J. C.; NICHOLS, C. G. Muscle KATP Channels: Recent Insights to Energy Sensing and Myoprotection. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 799 -829, 2010.

FLEISCHMANN, B. K.; WASHABAU, R. J.; KOTLIKOFF, M. I. Control of resting membrane potential by delayed rectifier potassium currents in ferret airway smooth muscle cells. **The Journal of Physiology**, v. 469, p. 625-638, 1993.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **MultiCiência: construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, 2006.

FRIEBE, A.; KOESLING, D. Regulation of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase. **Circulation Research**, v. 93, n. 2, p. 96 -105, 2003.

GALVEZ, A.; GIMENEZ-GALLEGO, G.; REUBEN, J. P.; ROY-CONTANCIN, L.; FEIGENBAUM, P.; KACZOROWSKI, G. J.; GARCIA, M. L. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 19, p. 11083-11090, 1990.

GAO, Y.; YE, L.; KISHI, H.; OKAGAKI, T.; SAMIZO, K.; NAKAMURA, A.; KOHAMA, K. Myosin Light Chain Kinase as a Multifunctional Regulatory Protein of Smooth Muscle Contraction. **IUBMB Life**, v. 51, n. 6, p. 337-344, 2001.

GORDIENKO, D. V.; ZHOLOS, A. V.; BOLTON, T. B. Membrane ion channels as physiological targets for local Ca^{2+} signalling. **Journal of Microscopy**, v. 196, p. 305-316, 1999.

GRIBKOFF, V. K.; STARRETT, J. E.; DWORETZKY, S. I. Maxi-K Potassium Channels: Form, Function, and Modulation of a Class of Endogenous Regulators of Intracellular Calcium. **The Neuroscientist**, v. 7, n. 2, p. 166-177, 2001.

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 242-251, 1994.

GUTMAN, G. A.; CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; LAZDUNSKI, M.; MCKINNON, D.; PARDO, L. A.; ROBERTSON, G. A.; RUDY, B.; SANGUINETTI, M. C.; STUHMER, W.; WANG, X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 473 -508, 2005.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.

HENRY, P. J. Endothelin Receptor Distribution and Function in the Airways. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 26, n. 2, p. 162-167, 1999.

HEIZMANN, C.W. (Ed.) **Novel Calcium-Binding Proteins**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 65–99. , 1991

HESSE, M. **Alkaloids: nature's curse or blessing?** [S.l.]: Helvetica Chimica Acta, 2002.

HIBINO, H.; INANOBE, A.; FURUTANI, K.; MURAKAMI, S.; FINDLAY, I.; KURACHI, Y.. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 1, p. 291 -366, 2010.

HILLE, B. **Ion channels of excitable membranes**. 3. ed. Sunderland Mass.: Sinauer, 2001.

HIRSH, L.; DANTES, A.; SUH, B.S.; YOSHIDA, Y.; HOSOKAWA, K.,; TAJIMA, K.; KOTSUJI, F.; MERIMSKY, O.; AMSTERDAM, A. Phosphodiesterase inhibitors as anti-cancer drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 981-988, 2004.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F.; KATZ, B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. **The Journal of Physiology**, v. 116, n. 4, p. 424-448, 1952.

HUANG, Y. Hydroxylamine-induced relaxation inhibited by K⁺ channel blockers in rat aortic rings. **European Journal of Pharmacology**, v. 349, n. 1, p. 53-60, 1998.

HUXTABLE, R. J.; SCHWARZ, S. K. The isolation of morphine first principles in science and ethics. **Molecular Interventions**, v. 1, n. 4, p. 189-191, 2001.

ISHII, T. M.; MAYLIE, J.; ADELMAN, J. P. Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 37, p. 23195-23200, 1997.

JAHANGIR, A.; TERZIC, A. K channel therapeutics at the bedside. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 39, n. 1, p. 99-112, 2005.

JAN, L. Y.; JAN, Y. N. Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. **Annual Review of Physiology**, v. 54, p. 537-555, 1992.

JENNE, J. Theophylline produces over-additive relaxation of canine tracheal smooth muscle when combined with beta-agonists: The dose-response relationship. **Pulmonary Pharmacology**, v. 5, n. 4, p. 239-249, 1992.

JIANG, Y.; LEE, A.; CHEN, J.; CADENE, M.; CHAIT, B. T.; MACKINNON, R. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. **Nature**, v. 417, n. 6888, p. 515-522, 2002.

JOINER, W. J.; WANG, L.-Y.; TANG, M. D.; KACZMAREK, L. K. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 20, p. 11013-11018, 1997.

KATZ, B. Les constantes électriques de la membrane du muscle. **Archives des sciences physiologiques**, n. 3, p. 285-299, 1949.

KESSLER, P. J. A. Annonaceae In: The families and genera of vascular plants. Flowering plants, Dicotyledons, Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families, **Springer Verlag**, p. 93-129, Berlin, v. 2, 1993.

KIM, H. R.; APPEL, S.; VETTERKIND, S.; GANGOPADHYAY, S. S.; MORGAN, K. G. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6a, p. 2165-2180, 2008.

KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.

KÖHLER, M.; HIRSCHBERG, B.; BOND, C. T.; KINZIE, J. M.; MARRION, N. V.; MAYLIE, J.; ADELMAN, J. P. Small-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels from Mammalian Brain. **Science**, v. 273, n. 5282, p. 1709 -1714, 1996.

KOTLIKOFF, M. I. Potassium channels in airway smooth muscle: A tale of two channels. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 58, n. 1, p. 1-12, 1993.

KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In BÁRÁNY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. San Diego, Academic Press, 203-219, 1996.

KUME, H.; HALL, I. P.; WASHABAU, R. J.; TAKAGI, K.; KOTLIKOFF, M. I. Beta-adrenergic agonists regulate K_{Ca} channels in airway smooth muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 1, p. 371-379, 1994.

KUME, H.; TAKAI, A.; TOKUNO, H.; TOMITA, T. Regulation of Ca^{2+} -dependent K^{+} -channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. **Nature**, v. 341, n. 6238, p. 152-154, 1989.

KURIYAMA, H.; KITAMURA, K.; NABATA, H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. **Pharmacological Reviews**, v. 47, n. 3, p. 387-573, set 1995.

LEDOUX, J.; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. **Physiology**, v. 21, n. 1, p. 69 -78, 2006.

LEE, U. S.; CUI, J. BK channel activation: structural and functional insights. **Trends in Neurosciences**, v. 33, n. 9, p. 415-423, 2010.

LI, L.; VAALI, K.; VAPAATALO, H.; KANKAANRANTA, H. Effects of K^{+} channel inhibitors on relaxation induced by flufenamic and tolifenamic acids in guinea-pig trachea. **European Journal of Pharmacology**, v. 383, n. 2, p. 169-176, 1999.

LIU, X.S.; XU, Y.J.; ZHANG, Z.X.; LI, C.Q.; YANG, D.L.; ZHANG, N.; NI, W. Isoprenaline and aminophylline relax bronchial smooth muscle by cAMP-induced stimulation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, n. 5, p. 408-414, 2003.

LORENZ, J. N.; BAIRD, N. R.; JUDD, L. M.; NOONAN, W.T.; ANDRINGA, A.; DOETSCHMAN, T.; MANNING, P.A.; LIU, L.H.; MILLER, M.L.; SHULL, G.E. Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a

model for type II Bartter's syndrome. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37871-37880, 2002.

LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 109, n. 3, p. 366-398, 2006.

MA, J.; PAN, Z. Retrograde activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**, v. 33, n. 5-6, p. 375-384, 2003.

MAAS, P.J.M; MAAS-VAN DE KAMER, H.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 52, n. 80, p. 65-98, 2001.

MACÊDO, C. L. Envolvimento dos canais de K⁺ na ação espasmolítica do ácido labda 8-(17), 12E, 14-trien-18-oico (labdano-302) isolado de *Xylopi langsdorfiana* A. St.-Hill & Tul. em íleo isolado de cobaia. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2008.

MACKINNON, R. Potassium channels. **FEBS Letters**, v. 555, n. 1, p. 62-65, 27 2003.

MALERBA, M.; RADAELI, A.; MANCUSO, S.; POLOSA, R. The potential therapeutic role of potassium channel modulators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 24, n. 2, p. 123-130, 2010.

MARTINS, D.; OSSHIRO, E.; ROQUE, N. F.; MARKS, V.; GOTTLIEB, H. E. A sesquiterpene dimer from *Xylopi aromatica*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 677-680, 1998.

MARTINS, I. R. R. Participação dos canais de potássio no efeito relaxante do ácido *ent*-7 α -hidroxitraquiloban-18-oico em traqueia isolada de cobaia. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2012.

MASON, H. S.; LATTEN, M. J.; GODOY, L. D.; HOROWITZ, B.; KENYON, J. L. Modulation of Kv1.5 currents by protein kinase A, tyrosine kinase, and protein tyrosine phosphatase requires an intact cytoskeleton. **Molecular Pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 285-293, 2002.

MCHALE, N.; HOLLYWOOD, M.; SERGEANT, G.; THORNBURY, K. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 570, n. Pt 1, p. 23-28, 2006.

MCKINNEY, L. C.; GALLIN, E. K. Inwardly rectifying whole-cell and single-channel K currents in the murine macrophage cell line J774.1. **The Journal of Membrane Biology**, v. 103, n. 1, p. 41-53, 1988.

MELO, A. C.; COTA, B. B.; OLIVEIRA, A. B. DE; BRAGA, F. C. HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopia* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 40-45, 2001.

MINAMI, K.; FUKUZAWA, K.; NAKAYA, Y.; ZENG, X. R.; INOUE, I. Mechanism of activation of the Ca(2+)-activated K⁺ channel by cyclic AMP in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. **Life Sciences**, v. 53, n. 14, p. 1129-1135, 1993.

MIYAZAKI, S.-I.; TAKAHASHI, K.; TSUDA, K.; YOSHII, M. Analysis of non-linearity observed in the current—voltage relation of the tunicate embryo. **The Journal of Physiology**, v. 238, n. 1, p. 55-77, 1974.

MONTENEGRO, C.A., LIMA, G.R.M., JESUS, N.Z.T., LEITE, T.J.A., GOMES, I.F., TAVARES, J.F., BATISTA, L.M. Investigation of the gastroprotective action mechanism of *Xylopia langsdorffiana* A. St.-Hil & Tul. (ANNONACEAE). **XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

MOTULSKY, H. J.; CHRISTOPOULOS, A. In: **Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting**. GraphPad Software Inc., 2003.

MURRAY, M. A.; BOYLE, J. P.; SMALL, R. C. Cromakalim-induced relaxation of guinea-pig isolated trachealis: antagonism by glibenclamide and by phentolamine. **British Journal of Pharmacology**, v. 98, n. 3, p. 865-874, 1989.

MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 345-374, 2006.

NAGAI, H.; YAMADA, H.; GOTO, S.; INAGAKI, N.; KODA, A. Reduction of antigen-induced contraction of sensitized guinea-pig tracheal smooth muscle in vitro by calmodulin inhibitors. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 76, n. 3, p. 251-255, 1985.

NAKAHARA, T.; MORIUCHI, H.; TANAKA, Y.; YUNOKI, M.; KUBOTA, Y.; SAKAMATO, K.; SHIGENOBU, K.; ISHII, K. Role of K⁺ channels in N-

acetylprocainamide-induced relaxation of bovine tracheal smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 415, n. 1, p. 73-78, 2001.

NAKAJIMA, T.; HAZAMA, H.; HAMADA, E.; OMATA, M.; KURACHI, Y. Ionic basis of neurokinin-A-induced depolarization in single smooth muscle cells isolated from guinea-pig trachea. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 430, n. 4, p. 552-562, 1995.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 268, n. 4, p. C799 -C822, 1995.

NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 597-606, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NIELSEN-KUDSK, J. E. Potassium channel modulation: a new drug principle for regulation of smooth muscle contractility. Studies on isolated airways and arteries. **Danish Medical Bulletin**, v. 43, n. 5, p. 429-447, 1996.

NISHIMURA, J.; MORELAND, S.; AHN, H. Y.; KAWASE, T., MORELAND, R.S., VAN BREEMEN, C. Endothelin increases myofilament Ca^{2+} sensitivity in alpha-toxin-permeabilized rabbit mesenteric artery. **Circulation Research**, v. 71, n. 4, p. 951-959, 1992.

NIU, L. G.; ZHANG, M. S.; LIU, Y.; XUE, W. X.; LIU, D. B.; ZHANG, J.; LIANG, Y.Q. Vasorelaxant effect of taurine is diminished by tetraethylammonium in rat isolated arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 580, n. 1-2, p. 169-174, 2008.

NOMA, A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. **Nature**, v. 305, n. 5930, p. 147-148, 1983.

OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; MAFRA, R. A.; ARAÚJO, D. A.; CRUZ, J.S.; MEDEIROS, I. A. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). **Vascular Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 338-344, 2006.

OONUMA, H.; IWASAWA, K.; IIDA, H.; NAGATA, T.; IMUTA, H.; MORITA, Y.; YAMAMOTO, K.; NAGAI, R.; OMATA, M.; NAKAJIMA, T. Inward Rectifier K^+ Current in Human Bronchial Smooth Muscle Cells. Inhibition with Antisense Oligonucleotides

Targeted to Kir2.1 mRNA. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 26, n. 3, p. 371-379, 2002.

ORALLO, F. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 153-171, 1996.

OSORIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M. A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630-635, 2007.

PELAIA, G.; GALLELLI, L.; VATRELLA, A.; GREMBIALE, R. D.; MASELLI, R.; DE SARRO, G. B.; MARSICO, S.A. Potential role of potassium channel openers in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Life Sciences**, v. 70, n. 9, p. 977-990, 2002.

PETERSEN, O. H.; MARUYAMA, Y. Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. **Nature**, v. 307, n. 5953, p. 693-696, 1984.

PITA, J. C. L. R.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R. J.; MORELI, S.; RODRIGUES, V. M.; TAVARES, J. F.; CASTELLO BRANCO, M. V. S.; SILVA, M. S.; DINIZ, M. F. F. M. Antitumor activity of constituents from *Xylopia langsdorffiana* against sarcoma 180 cells. **Anais, 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**. Ribeirão Preto, São Paulo, 2009.

PONTE, C. G.; MCMANUS, O. B.; SCHMALHOFER, W. A.; SHEN, D.-M.; DAI, G.; STEVENSON, A.; SUR, S.; SHAH, T.; KISS, L.; SHU, M.; DOHERTY, J. B.; NARGUND, R.; KACZOROWSKI, G. J.; SUAREZ-KURTZ, G.; GARCIA, M. L. Selective, direct activation of high-conductance, calcium-activated potassium channels causes smooth muscle reaxation. **Molecular Pharmacology**, 2012 (*in press*).

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, P. J. M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 281-293, 2004.

PUETZ, S.; LUBOMIROV, L. T.; PFITZER, G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 24, p. 342-356, 2009.

QUEIROGA, K. F.; TAVARES, J. F.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MARTINS, R. M.; SILVA, T. M. S.; SILVA, M. S. Atividade Moluscicida de diterpenos isolados de *Xylopia Langsdorffiana* A.St.; Hil & Tul (Annonaceae). In: **29ª Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Química**, Águas de Lindóia, 2006.

RAEBURN, D.; GIEMBYCZ, M. A. **Airways smooth muscle: peptide receptors, ion channels, and signal transduction**. Basel; Boston: Birkhäuser Verlag, 1995.

REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, n. 2, p. 129-137, 1992.

RIBEIRO, L. A. A. A ação relaxante do ácido labda-8(17),12E,14-trien-18-oico, diterpeno isolado de *Xylopia langsdorffiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae), envolve canais de potássio. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2003.

RIBEIRO, L. A. A. Estudo do efeito relaxante do ácido 8(17),12e,14-labdatrieno-18-oico (labdano-302): um novo diterpeno ativador da via da ciclase de adenilil? 2007. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2007.

RIBEIRO, L. A. A.; TAVARES, J. F.; ANDRADE, N. C.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. O Ácido (8)17,12E,14-labdatrieno-18-oico (labdano302), diterpeno tipo labdano isolado de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, 2007.

RODRIGO, G. C.; STANDEN, N. B. ATP-sensitive potassium channels. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 15, p. 1915-1940, 2005.

RUAN, Y. C.; ZHOU, W.; CHAN, H. C. Regulation of Smooth Muscle Contraction by the Epithelium: Role of Prostaglandins. **Physiology**, v. 26, n. 3, p. 156 -170, 2011.

SAH, P.; FABER, E. S. L. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 5, p. 345-353, 2002.

SAKMANN, B.; TRUBE, G. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. **The Journal of Physiology**, v. 347, p. 641-657, 1984.

SALKOFF, LAWRENCE; BUTLER, A.; FERREIRA, G.; SANTI, C.; WEI, AGUAN. High-conductance potassium channels of the SLO family. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 12, p. 921-931, 2006.

SANBORN, B. M. Relationship of ion channel activity to control of myometrial calcium. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 7, n. 1, p. 4-11, 2000.

SANTOS, D. Y.; SALATINO, M. L. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 567-573, 2000.

SANTOS, R. F. Participação do cálcio citosólico sobre a ação espasmolítica do ácido *ent-7 α -acetoxitraquiloban-18-oico* e de seu derivado hidroxilado em íleo isolado de cobaia. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2010.

SANTOS, R. F.; MARTINS, I. R. R.; MONTEIRO, F. S.; TRAVASSOS, R. A.; JANEIRO, D. I.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. Spasmolytic activity of trachylobanes *ent-7 α -acetoxyltrachyloban-18-oic acid* and *ent-7 α -hydroxyltrachyloban-18-oic acid* isolated from *Xylopia langsdorffiana* A. St Hil. & Tul (Annonaceae). **Natural Products Research**, 2011a (*in press*).

SANTOS, R. F.; MARTINS, I. R. R.; TRAVASSOS, R. A.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; PAREDES-GAMERO, E. J.; FERREIRA, A. T.; NOUAILHETAS, V. L.; ABOULAFIA, J.; RIGONI, V. L.; SILVA, B. A. *Ent-7 α -acetoxyltrachyloban-18-oic acid* and *ent-7 α -hydroxyltrachyloban-18-oic acid* from *Xylopia langsdorffiana* A. St-Hil. & Tul. modulate K⁺ and Ca²⁺ channels to reduce cytosolic calcium concentration on guinea pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, 2011b (*in press*).

SATAKE, N.; SHIBATA, M.; SHIBATA, S. The involvement of K_{Ca}, K_{ATP} and K_V channels in vasorelaxing responses to acetylcholine in rat aortic rings. **General Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 453-457, 1997.

SCHREIBER, M.; WEI, A.; YUAN, A.; GAUT, J.; SAITO, M.; SALKOFF, L.; Slo3, a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 6, p. 3509-3516, 1998.

SILVA, M. V. B.; ANAZETTI, M. C.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; DINIZ, M. F. F. M.; MELO, P. S.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of diterpenes isolated from *Xylopia langsdorffiana* on human leukaemia cells. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 41, p. 481, 2005.

SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, S. A. S. Alcalóides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, 2009.

SILVA, K. M.; SILVA, A. D. S.; LIMA, L. O.; CLEMENTINO-NETO, J.; MEDEIROS, V. M.; COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; CAVALCANTE, F. A. Investigation of toxic and antidiarrheal activities of ethanol extract of aerial parts from *Xylopia langsdorffiana* A. St. Hil. & Tul. (Annonaceae) in mice. **42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, Ribeirão Preto, São Paulo, 2010.

SINGER, J. J.; WALSH JR., J. V. Characterization of calcium-activated potassium channels in single smooth muscle cells using the patch-clamp technique. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 408, n. 2, p. 98-111, 1987.

SNETKOV, V. A.; HIRST, S. J.; TWORT, C. H.; WARD, J. P. Potassium currents in human freshly isolated bronchial smooth muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 115, n. 6, p. 1117-1125, 1995.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231-236, 1994.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325 -1358, 2003.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **The Journal of Physiology**, v. 522, n. 2, p. 177 -185, 2000.

STAAY, F. J.; FANELLI, R. J.; BLOKLAND, A.; SCHMIDT, B. H. Behavioral effects of apamin, a selective inhibitor of the SK(Ca)-channel, in mice and rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 8, p. 1087-1110, 1999.

STANDEN, N.; QUAYLE, J.; DAVIES, N.; BRAYDEN, J. E.; HUANG, Y.; NELSON, M. T. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K^+ channels in arterial smooth muscle. **Science**, v. 245, n. 4914, p. 177-180, 1989.

STEVENS, F. C. Calmodulin: an introduction. **Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 61, n. 8, p. 906-910, 1983.

TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; SILVA, M. V. B.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V.; SIMONE, C. A.; ARAÚJO-JR J. X., MELO, P. S.; HAUN, M.; SILVA, M. S. *ent*-Trachylobane Diterpenoids from *Xylopia langsdorffiana*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 6, p. 960-962, 2006.

TERAMOTO, N. Physiological roles of ATP-sensitive K^+ channels in smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 572, n. Pt 3, p. 617-624, 2006.

THIRSTRUP, S.; NIELSEN-KUDSK, J. E.; MELLEMKJAER, S. Involvement of K^+ channels in the relaxant effect of vasoactive intestinal peptide and atrial natriuretic peptide in isolated guinea-pig trachea. **European Journal of Pharmacology**, v. 319, n. 2-3, p. 253-259, 1997.

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

TOTSUKAWA, G.; YAMAKITA, Y.; YAMASHIRO, S.; HARTSHORNE, D.J.; SASAKI, Y.; MATSUMURA, F. Distinct Roles of Rock (Rho-Kinase) and Mlck in Spatial Regulation of Mlc Phosphorylation for Assembly of Stress Fibers and Focal Adhesions in 3t3 Fibroblasts. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, n. 4, p. 797-806, 2000.

TRAVASSOS, R. A. Caracterização do mecanismo de ação tocolítica do ácido labda 8-(17), 12E, 14-trien-18-oico (labdano-302) isolado de *Xylopi langsdorfiana* A. St.-Hill & Tul. em útero isolado de rata. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2010.

TSCHIRHART, E.; FROSSARD, N.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 243, n. 1, p. 310-316, 1987.

UEHATA, M.; ISHIZAKI, T.; SATOH, H.; ONO, T.; KAWAHARA, T.; MORISHITA, T.; TAMAKAWA, H.; YAMAGAMI, K.; INUI, J.; MAEKAWA, M.; NARUMIYA, S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature**, v. 389, n. 6654, p. 990-994, 1997.

VAANDRAGER, A.; JONGE, H. Signalling by cGMP-dependent protein kinases. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 157, n. 1-2, 1996.

VERGARA, C.; LATORRE, R.; MARRION, N. V.; ADELMAN, J P. Calcium-activated potassium channels. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 8, n. 3, p. 321-329, 1998.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

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

WATERMAN, S. A. Voltage-gated calcium channels in autonomic neuroeffector transmission. **Progress in Neurobiology**, v. 60, n. 2, p. 181-210, fev 2000.

WEI, A. D.; GUTMAN, G. A.; ALDRICH, R.; CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; WULFF, H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 463-472, 2005.

WHITE, R. E.; LEE, A. B.; SHCHERBATKO, A. D.; LINCOLN, T.M.; SCHONBRUNN, A.; ARMSTRONG, D.L. Potassium channel stimulation by natriuretic peptides through cGMP-dependent dephosphorylation. **Nature**, v. 361, n. 6409, p. 263-266, 1993.

WINKLHOFER, M.; MATTHIAS, K.; SEIFERT, G.; STOCKER, M.; SEWING, S.; HERGET, T.; STEINHÄUSER, C.; SAALER-REINHARDT, S. Analysis of phosphorylation-dependent modulation of $K_v1.1$ potassium channels. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 6, p. 829-842, 2003.

WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, n. 1-2, p. 135-143, 2001.

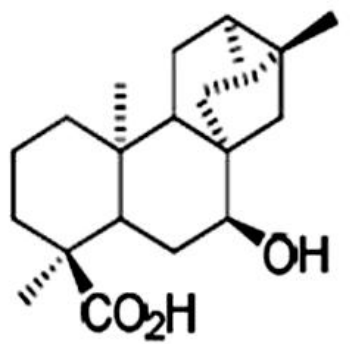
YAGI, Y.; KUWAHARA, M.; TSUBONE, H. Ca^{2+} -activated K^+ channel blockers induce PKC modulated oscillatory contractions in guinea pig trachea. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP**, v. 131, n. 4, p. 511-519, 2002.

YELLEN, G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. **Nature**, v. 419, n. 6902, p. 35-42, 2002.

YUAN, X. J.; WANG, J.; JUHASZOVA, M.; GOLOVINA, V. A.; RUBIN, L. J. Molecular basis and function of voltage-gated K^+ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. **The American Journal of Physiology**, v. 274, n. 4, p. 621-635, 1998.

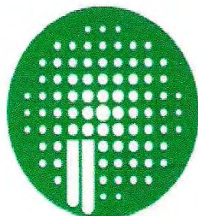
YUNOKI, T.; TERAMOTO, N.; ITO, Y. Functional involvement of sulphonylurea receptor (SUR) type 1 and 2B in the activity of pig urethral ATP-sensitive K^+ channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 3, p. 652-660, 2003.

ZHAO, L.M.; XU, Y.J.; ZHANG, Z.X.; NI, W.; CHEN, S.X. Effect of passive sensitization by serum from allergic asthmatic patients on the activity and expression of voltage-dependent delayed rectifier potassium channel in human bronchial smooth muscle cells. **Chinese Medical Journal**, v. 117, n. 11, p. 1630-1636, 2004.



Anexo

ANEXO A – Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA)



PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
CERTIDÃO**

João Pessoa, 15 de março de 2011

CEPA Nº. 0203/11

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Profa. Dra. BAGNÓLIA ARAÚJO DA SILVA

Orientando(a): ÍTALO ROSSI ROSENO MARTINS

Departamento/Setor: LTF

Ref: Caracterização do Mecanismo de Ação Espasmolítica do Ácido ent-7 α -hidroxitraquiloban-18-óico (traquilobano-318), Isolado de *Xylopija langsdorfiana* A.St.-Hil. & Tul., em Traquéia Isolada de Cobaia.

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Número de animais: 60 cobaias.

Período: 03/2011 até 02/2012.

Atenciosamente,



Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB