

ROSIMEIRE FERREIRA DOS SANTOS

**PARTICIPAÇÃO DO CÁLCIO CITOSÓLICO SOBRE A AÇÃO
ESPASMOLÍTICA DO ÁCIDO *ENT-7 α* -ACETOXITRAQUILOBAN-18-
ÓICO E DE SEU DERIVADO HIDROXILADO EM ÍLEO ISOLADO DE
COBAIA**

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

João Pessoa - PB

2010

ROSIMEIRE FERREIRA DOS SANTOS

**PARTICIPAÇÃO DO CÁLCIO CITOSÓLICO SOBRE A AÇÃO
ESPASMOLÍTICA DO ÁCIDO *ENT-7 α* -ACETOXITRAQUILOBAN-18-
ÓICO E DE SEU DERIVADO HIDROXILADO EM ÍLEO ISOLADO DE
COBAIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOLOGIA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Vivianne Louise A. Nouailhetas

João Pessoa - PB

2010

S376p Santos, Rosimeire Ferreira dos
**PARTICIPAÇÃO DO CÁLCIO CITOSÓLICO SOBRE
A AÇÃO ESPASMOLÍTICA DO ÁCIDO
ENT-7 α -ACETOXITRAQUILOBAN-18-ÓICO E DE SEU
DERIVADO HIDROXILADO EM ÍLEO ISOLADO DE
COBAIA**

/ Rosimeire Ferreira dos Santos. – João Pessoa,
2010.

129f.: il.

Orientadores: Bagnólia Araújo da Silva e
Vivianne Louise A. Nouailhetas

Tese (Doutorado) – CCS/UFPB

1. Farmacologia. 2. Traquilobano. 3. Atividade
espasmolítica.

UFPB / BC

CDU: 615 (043)

ROSIMEIRE FERREIRA DOS SANTOS

**PARTICIPAÇÃO DO CÁLCIO CITOSÓLICO SOBRE A AÇÃO
ESPASMOLÍTICA DO ÁCIDO *ENT-7 α -ACETOXITRAQUILOBAN-18-*
ÓICO E DE SEU DERIVADO HIDROXILADO EM ÍLEO ISOLADO DE
COBAIA**

Aprovada em 30/03/2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
Orientadora

Prof. Dr. Roberto Kenji Nakamura Cuman
Examinador Externo

Profa. Dra Simone dos Santos Maciel
Examinadora Externa

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Examinadora Interna

Prof. Dr. Luis Fernando Marques dos Santos
Examinador Interno

Dedicatórias

Aos meus pais, Jader Ferreira dos Santos e Maria José dos Santos, por todo esforço e amor que tiveram por mim até hoje, o senhor e a senhora são o que eu tenho de melhor na minha vida, amo vocês.

A minha irmã Rosimar “tuti”, minha eterna companheira, que sempre vibrou com as minhas conquistas, apoiou nos momentos difíceis e sempre se orgulhou de mim, te amo sempre.

À Mariana e à Amanda, mesmo distantes vocês são as inspirações na minha vida.

Ao Lucas, que amo tanto, você é uma luz na nossa família, representa a certeza que os dias melhores chegaram.

Agradecimientos

A Deus por ter me concedido a vida, me dado coragem e força pra superar os tantos desafios e sempre alcançar as vitórias.

À minha orientadora, Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva pelo exemplo de profissional e pessoa que é. Devo tudo que sou como profissional a ela, que acreditou e confiou em mim. Obrigada por ter iniciado minha vida profissional, confiando suas turmas de farmacodinâmica para eu ministrar aulas no estágio docência. Obrigada por sempre ter uma palavra de conforto, pelos toques “de vida” e pela maravilhosa convivência. Tenho orgulho de ser sua discípula.

Às minhas co-orientadoras Viviane L. A. Nouailhetas e Jeannine Aboulafia do Laboratório de Eletrofisiologia da UNIFESP, por terem aberto as portas de seu laboratório e ter concedido vários materiais para a execução dos experimentos, muito obrigada. Agradeço ainda a amiga Vera Rigone pela inestimável contribuição e excelente convivência nestes meses em São Paulo, por todos ensinamentos na parte de cultura de células.

Ao Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva e ao Prof. Dr. Josean Fachine Tavares pelo fornecimento das substâncias, objetos de estudo neste trabalho.

À Profa. Dra Alice Ferreira Teixeira e especialmente aos seus alunos, o Pós-Doutorando Edgar J. Paredes-Gamero a amiga e Doutoranda Telma L. Nascimento e a mestrandia Renata pelos experimentos de fluorescência, por todas as discussões levantadas, pela paciência e também por todos os reagentes concedidos.

Aos funcionários técnicos do Departamento de Biofísica/UNIFESP-EPM, Dra. Sandra Claro pelas dicas e ensinamentos na cultura de células. Chandler Tahan pelo acolhimento e apoio, por sempre serem prestativos, pela companhia e amizade no dia-a-dia.

À Profa. Dra. Caden Souccar pelos ensinamentos prestados bem pela acolhida no seu Laboratório de Produtos Naturais no Departamento de Farmacologia da UNIFESP.

Aos maravilhosos presentes de Deus, amigos queridos do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas: Ana Caroline Lima, Gislaine Oliveira, Italo Rossi, Juliana Carreiro e Rafael Travassos por tudo que

vocês representam pra mim: amizade, carinho, respeito, meus “cobaias” da vida acadêmica, eternos “ICs”, amo vocês.

A todos os colegas e amigos que estão ou passaram pelo Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, entre eles, Ana Carolina Correia, Ana Caroline Lima, Anne Abreu, Cibério Macêdo, Daniele Janebro, Fabiana Cavalcante, Fabio Monteiro, Fabrício Garcia, Gislaine Oliveira, Hilzeth de Luna Freire Pessôa, Iara Luna, Italo Martins, Joelmir Silva, Juliana Carreiro, Kaila Petronila Alarcón, Luciano Ribeiro, Massilon Junior, Polyana Silva, Rafael Travassos, Rita Meneses Oliveira, Tamyris Ferreira e Julianeli pela ajuda, amizade e boa convivência.

A todos os colegas e amigos da turma do Doutorado 2006, do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Aos meus professores do Programa de Pós-Graduação que contribuíram tanto no mestrado quanto no doutorado, com a minha formação acadêmica, muito obrigada.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos em nome dos Professores Dra. Márcia Regina Piuvezam e Dr. Eduardo de Jesus Oliveira pela competência pela qual coordenam este Programa.

À Tania M. A. Araújo, secretária da Pós-Graduação, por toda dedicação, eficiência e amizade.

À Direção do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF/UFPB) na pessoa da Profa. Silvana Teresa Lacerda Jales e do Professor Emidio Vasconcelos Leitão da Cunha, pelo apoio Institucional.

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

A Luís C. Silva e Adriano S. Cordeiro pela colaboração no Biotério e no laboratório, por serem prestativos e dedicados aos trabalhos do LTF.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida e pelo suporte técnico-científico através do Portal Periódicos.

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

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a produção desta tese de doutorado.

Muito Obrigada!

Rosimeire Ferreira dos Santos

RESUMO

Das cascas do caule da *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae), conhecida popularmente como “pimenteira da terra” foi isolado o diterpeno ácido ent-7 α -acetoxitraquiloban-18-óico (traquilobano-360) que sofreu uma modificação estrutural do grupo acetoxi pelo hidroxí gerando o ácido ent-7 α -hidroxitraquiloban-18-óico (traquilobano-318). O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo comparativo de uma possível atividade espasmolítica dos diterpenos em aorta de rato, útero de rata, traquéia e íleo de cobaia. Foram realizadas medidas de contrações isotônicas e isométricas e do cálcio citosólico. Em aorta de rato e útero de rata nenhum dos diterpenos promoveu efeito espasmolítico significativo até a concentração de 10^{-4} M. Já em traquéia de cobaia, apenas o traquilobano-318 relaxou este órgão pré-contraído com carbacol (CCh) na presença e na ausência de epitélio funcional, de maneira equipotente, sugerindo um possível efeito direto no músculo liso traqueal e que a modificação estrutural foi essencial para o efeito relaxante neste órgão. Por outro lado, em íleo de cobaia, ambos os diterpenos inibiram as contrações fásicas induzidas por CCh ou por histamina. No íleo pré-contraído com KCl, CCh ou histamina os diterpenos induziram relaxamento e este efeito não se dá por antagonismo competitivo dos receptores histaminérgicos, o que foi confirmado pelo desvio das curvas cumulativas induzidas pela histamina para a direita com redução dos E_{max} . Como o componente tônico da contração induzida por KCl, CCh ou histamina é mantido principalmente pela abertura dos Ca_v , hipotetizou-se que os traquilobanos poderiam estar agindo sobre estes canais. Hipótese confirmada com a observação de que ambos diterpenos antagonizaram as contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante sem Ca^{2+} além de relaxarem o íleo pré-contraído por S(-) Bay K 8644, agonista dos Ca_v1 ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ e $5,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M, respectivamente) confirmando assim que o subtipo de Ca_v envolvido é o $Ca_v1.2$. Para investigar a participação dos canais para K^+ no efeito dos diterpenos, observou-se que as curvas de relaxamento do traquilobano-360 ($CE_{50} = 0,5 \pm 0,04 \times 10^{-4}$ M) e do traquilobano-318 ($CE_{50} = 2,0 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M) foram significativamente desviadas para a direita na presença de 5 mM de TEA $^+$, bloqueador não seletivo dos canais para K^+ , sugerindo a participação destes canais no efeito dos diterpenos. O efeito do traquilobano-360 parece não envolver os subtipos de canais para K^+ (K_{ATP} , SK_{Ca} , K_v e BK_{Ca}) uma vez que o relaxamento não foi alterado na presença dos bloqueadores destes canais. Entretanto, o efeito do traquilobano-318 parece envolver a ativação dos canais do tipo K_{ATP} , SK_{Ca} e K_v mas não dos BK_{Ca} , fato este evidenciado pelos desvios da curva de relaxamento para direita na presença dos bloqueadores de canais para K^+ como glibenclâmida, apamina e 4-AP, respectivamente. Estes resultados sugerem que a modificação estrutural foi essencial para esses efeitos diferenciados, mas não para o envolvimento da via dos nucleotídeos cíclicos, uma vez que na presença da aminofilina as curvas de relaxamento dos traquilobanos não foram alteradas. Os dois diterpenos reduziram a intensidade de fluorescência em miócitos intestinais de íleo de cobaia estimulados por histamina em consequência da redução da $[Ca^{2+}]_c$, o que explica os efeitos espasmolíticos destes diterpenos em nível funcional.

Palavras-chave: *Xylopia langsdorfiana*, traquilobano-360, traquilobano-318, ação espasmolítica, cálcio.

ABSTRACT

From the stem bark of *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae), popularly known as “pimenteria da terra”, was isolated the diterpene *ent*-7 α -acetoxytrachyloban-18-oic acid (trachylobane-360) from which it was made a structural modification in which the acetoxy group was substituted by hydroxy generating the *ent*-7 α -hidroxitrachyloban-18-oic acid (trachylobane-318). How there are some reports that show spasmolytic activity of some diterpenes, we aimed to investigate this activity on male rat aorta, rat uterus, guinea-pig trachea and ileum. On rat aorta and rat uterus nor trachylobane-360 or its derivative trachylobane-318 promoted significant spasmolytic effect until the concentration of 10^{-4} M. However on guinea-pig trachea, only the derivative relaxed this organ pre-contracted with carbachol (CCh) in the presence ($EC_{50} = 3.3 \pm 0.9 \times 10^{-5}$ M) and absence ($EC_{50} = 3.5 \pm \times 10^{-5}$ M) of functional epithelium, in a equipotent manner, suggesting a possible direct effect on tracheal smooth muscle and that the structural modification was essential for the relaxant effect in this organ. On the other hand, on guinea pig ileum, both diterpenes inhibited the phasic contractions induced by CCh or histamine. When the ileum was pre-contracted with KCl, CCh or histamine, the diterpenes induced relaxation and this effect is not by competitive antagonism of histamine, which was confirmed by the shifted of the cumulative curves to histamine to the right, in a non-parallel manner with reduction of the maximal effect (E_{max}). How the tonic component of contraction induced by KCl, CCh or histamine is maintained mainly by the opening of Ca_v , we hypothesized that the trachylobanes could be acting on these channels. The hypothesis was confirmed with the observation that both diterpenes antagonized the $CaCl_2$ -induced contractions in depolarizing Ca^{2+} -free solution also relaxed the ileum pre-contracted by S(-) Bay K 8644, an Ca_v1 agonist ($EC_{50} = 3.5 \pm 0.7 \times 10^{-5}$ e $5.5 \pm 0.3 \times 10^{-5}$ M, respectively) confirming that the Ca_v subtype involved is the L-type ($Ca_v1.2$). To investigate the involvement of K^+ channels to the effect of diterpenes as observed that the relaxation curves of trachylobane-360 ($EC_{50} = 0.5 \pm 0.04 \times 10^{-4}$ M) and trachylobane-318 ($EC_{50} = 2.0 \pm 0.5 \times 10^{-5}$ M) were significantly shifted to the right in the presence of 5 mM TEA^+ , a non-selective channel blocker for K^+ , suggesting involvement of these channels in the effects of diterpenes. The effect of trachylobane-360 appears to involve the subtypes of K^+ channels (K_{ATP} , SK_{Ca} , K_v and BK_{Ca}) since the CE_{50} have not changed in the presence of blockers of these channels. Interestingly the effect of trachylobane-318 appears to involve the activation of the channel type K_{ATP} , K_v and SK_{Ca} but not BK_{Ca} , evidenced by shifts from the relaxation curves to the right in the presence of K^+ channels blockers as glibenclamide, apamin and 4-AP, respectively. These results all together suggest that the structural change was essential for these differentiated effects, but not for the involvement of the cyclic nucleotides pathway, since that in the presence of aminophylline the relaxation curves of trachylobanes were not modified. Both diterpenes reduce the intensity of fluorescence on intestinal myocytes of guinea-pig ileum stimulated by histamine which reflect reduction of $[Ca^{2+}]_i$, what would explain the spasmolytic effects of these diterpenes in functional level.

Keywords: *Xylopia langsdorfiana*, trachylobane-360, trachylobane-318, spasmolytic action, calcium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Foto de <i>Xylopia langsdorfiana</i> A. St.- Hil. & Tul. (A); detalhes da folha e da flor (B)	6
Figura 2 – ácido <i>ent-7α</i> -acetoxitraquiloban-18-óico (A) ou ácido <i>ent-7α</i> -hidroxitraquiloban-18-óico (B).	7
Figura 3 – Esquema da via da fosfolipase C (PLC)	10
Figura 4 – Via de sensibilização da contração no músculo liso	12
Figura 5 – Registro original representativo do efeito do (A) traquilobano-360 (B), traquilobano-318 na presença de endotélio funcional em aorta de rato.....	37
Figura 6 – Registro original representativo do efeito do (A) traquilobano-360 (B), traquilobano-318 na ausência de endotélio funcional em aorta de rato	38
Figura 7 – Registros originais representativos do efeito do traquilobano-360 sobre a traquéia pré-contraída por carbacol na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional	42
Figura 8 – Registros originais representativos do efeito do traquilobano-318 sobre a traquéia pré-contraída por carbacol na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.....	43
Figura 9 – Registros originais do efeito relaxante do traquilobano-360 sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (A), 10^{-6} M de carbacol (B) e histamina (C) em íleo isolado de cobaia.	51
Figura 10 – Registros originais do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (A), 10^{-6} M de carbacol (B) e histamina (C) em íleo isolado de cobaia.	52
Figura 11 – Registro original representativo do efeito do traquilobano-360 (A e B), e do traquilobano-318 (C e D) na ausência e presença de 5 mM de TEA ⁺ , respectivamente em íleo de cobaia.....	59
Figura 12 – Registro original representativo do efeito do traquilobano-318 na ausência (A, 10^{-7} – 10^{-4} M) e presença (B, 3×10^{-9} – 3×10^{-4} M) de glibenclamida em íleo de cobaia	62
Figura 13 – Registro original representativo do efeito do traquilobano-318 na ausência (A, 10^{-7} – 10^{-4} M) e presença (B, 10^{-8} – 3×10^{-4} M) de 4-AP em íleo de cobaia.	64
Figura 14 – Registro original representativo do efeito do traquilobano-318 na ausência (A, 10^{-7} – 10^{-4} M) e presença (B, 10^{-8} – 3×10^{-4} M) de apamina em íleo de cobaia	66
Figura 15 – Registros originais representativos do controle (A) e do efeito de traquilobano-360 (B) e traquilobano-318 (C) sob o sinal de cálcio em células musculares lisas de íleo de cobaia estimuladas com histamina e carregadas com fluo-4.	74

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Efeito do traquilobano-360 e traquilobano-318 frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (**A** e **C**) e de carbacol (**B** e **D**) em útero isolado de rata 40
- Gráfico 2** – Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol em anéis de traquéia com (■) e sem (□) epitélio funcional. 44
- Gráfico 3** – Efeito do traquilobano-360 frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol (**A**) e de histamina (**B**) em íleo isolado de cobaia funcional 46
- Gráfico 4** – Efeito do traquilobano-318 frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol (**A**) e de histamina (**B**) em íleo isolado de cobaia..... 47
- Gráfico 5** – Curvas concentrações-resposta cumulativas à histamina na ausência (■) e na presença de traquilobano-360 (**A**) ou traquilobano-318 (**B**): 3×10^{-5} (□), 10^{-4} (●) e 3×10^{-4} M (○) em íleo isolado de cobaia..... 49
- Gráfico 6** – Efeito do traquilobano-360 (**A**) ou traquilobano-318 (**B**) sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (■) e por 10^{-6} M de carbacol (□) e de histamina (●) em íleo isolado de cobaia 53
- Gráfico 7** – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (■) e na presença de traquilobano-360 (**A**) ou traquilobano-318 (**B**): 3×10^{-5} (□), 10^{-4} (●) e 3×10^{-4} M (○) em íleo de cobaia 55
- Gráfico 8** – Efeito de traquilobano-360 (**A**, n=5) e do traquilobano-318 (**B**, n=3) sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (■) e 40 mM de KCl (○) em íleo isolado de cobaia..... 57
- Gráfico 9** – Efeito de traquilobano-360 (**A**) e de traquilobano-360 (**B**) sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (▼) e na presença (△) de 5 mM de TEA^+ em íleo isolado de cobaia..... 60

Gráfico 10 – Efeito da traquilobano-360 (A) e de traquilobano-318 (B) sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (○) de 10^{-5} M de glibenclamida, em íleo isolado de cobaia..... **63**

Gráfico 11 – Efeito da traquilobano-360 (A) e de traquilobano-318 (B) sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (○) de 0,3 mM de 4-AP, em íleo isolado de cobaia **65**

Gráfico 12 – Efeito da traquilobano-360 (A) e de traquilobano-318 (B) sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (○) de 100 nM de apamina, em íleo isolado de cobaia **67**

Gráfico 13 – Efeito da traquilobano-360 (A) e de traquilobano-318 (B) sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (○) de 1,0 mM de TEA⁺, em íleo isolado de cobaia..... **68**

Gráfico 14 – Efeito da traquilobano-360 (A) e de traquilobano-318 (B) sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (○) de 97 nM de iberitoxina, em íleo isolado de cobaia **69**

Gráfico 15 – Efeito da traquilobano-360 (A) e de traquilobano-318 (B) sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (△) de aminofilina, em íleo isolado de cobaia **72**

Gráfico 16 – Efeito do traquilobano-360 (A) e do traquilobano-318 (B) sobre a fluorescência induzidas por 10^{-6} M de histamina em miócitos de íleo de cobaia. . **75**

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]	concentração de Ca ²⁺
[Ca²⁺]_c	concentração de Ca ²⁺ citosólico
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 para K ⁺ de larga condutância ativados por Ca ²⁺
CaM	calmodulina
Ca_v	canais para cálcio dependentes de voltagem
Ca_v1	canais para cálcio dependentes de voltagem do tipo 1
Ca_vL	canais para cálcio dependentes de voltagem do tipo L
CCh	carbacol
CE₅₀	concentração de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo
CI₅₀	concentração de uma substância que inibe 50% do efeito máximo produzido por um agonista
DAG	diacilglicerol
e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
FEN	fenilefrina
G_{q/11}	proteína G _q ou proteína G ₁₁

Gα_q	subunidade α da proteína G _q
G_{12/13}	proteína G ₁₂ ou proteína G ₁₃
GMPc <i>monofosfato cíclico de guanosina</i>	
GPCRs	receptores acoplados à proteína G
GTP	trifosfato de guanosina
IbTx	iberiotoxina
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol
K_{ATP}	canais para potássio sensíveis ao ATP
K_v	canais para K ⁺ dependentes de voltagem
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”
M	concentração molar (mols/L)
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
pD'₂	logaritmo negativo (na base 10) da concentração do antagonista que reduz a 50% uma resposta máxima do agonista
PIP₂	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PKA	proteína cinase A
PKG	proteína cinase G
PLC	fosfolipase C
RhoA	pequena proteína ligante de GTP
ROK	cinase dependente de RhoA
RS	retículo sarcoplasmático

S-(-)-Bay K 8644	1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]3-piridina carboxílico ácido metil éster
SK_{Ca}	canais para K ⁺ de pequena condutância ativados por Ca ²⁺
TEA⁺	íon tetraetilamônio
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 MATERIAL	20
3.1.1 Animais.....	20
3.1.2 Substâncias e sais	20
3.1.3 Soluções nutritivas	22
3.1.4 Aparelhos e equipamentos.....	23
3.1.5 Substâncias teste	24
3.2 MÉTODOS	26
3.2.1 TRIAGEM FARMACOLÓGICA	26
3.2.1.1 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta isolada de rato	26
3.2.1.2 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero isolado de rata	27
3.2.1.3 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre a fase tônica das contrações induzidas por carbacol em traquéia isolada de cobaia	27
3.2.1.4 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina em íleo isolado de cobaia.....	28
3.2.2 NVESTIGAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO EM ÍLEO ISOLADO DE COBAIA.....	29
3.2.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por histamina	29

3.2.2.2 Efeito do traquilobano-360 e de seu derivado sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por carbacol ou por histamina em íleo isolado de cobaia.....	30
3.2.2.3 Efeito traquilobano-360 e do traquilobano-318 frente às contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+}	30
3.2.2.4 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644	31
3.2.2.5 Avaliação da participação dos canais de potássio no efeito espasmolítico dos diterpenos.....	31
3.2.2.5.1 Efeito comparativo dos diterpenos, sobre as contrações induzidas por histamina na ausência e na presença de TEA^+ (5 mM)	31
3.2.2.5.2 Efeito do traquilobano-360 e traquilobano-318 sobre as contrações induzidas por histamina na ausência e na presença de glibenclamida, 4-AP, apamina, TEA^+ ou iberiotoxina	32
3.2.2.6 Avaliação da participação da via de sinalização das PDE-nucleotídeos cíclicos no efeito espasmolítico do traquilobano-360 e do traquilobano-318	33
3.2.2.6.1 Efeito de traquilobano-360 e traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de aminofilina	33
3.2.7 Efeito dos diterpenos sobre a concentração citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) em miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia	33
3.2.7.1 Cultura de miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia	33
3.2.7.2 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre a $[\text{Ca}^{2+}]_c$	34
3.2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Triagem Farmacológica.....	37
4.1.1 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta isolada de rato.....	37
4.1.2 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero isolado de rata.....	39

4.1.3 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre a fase tônica das contrações induzidas por carbacol em traquéia isolada de cobaia.....	41
4.1.4 Efeito do traquilobano-360 e de seu derivado traquilobano-318 frente às contrações fásicas induzidas por carbacol e histamina em Íleo isolado de cobaia.....	45
4.2 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ESPASMOLÍTICA DO TRAQUILOBANO-360 E DE SEU DERIVADO TRAQUILOBANO-318 EM ÍLEO ISOLADO DE COBAIA.....	48
4.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por histamina	48
4.2.2 Efeito traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por carbacol ou por histamina em íleo isolado de cobaia.....	50
4.2.3 Efeito do traquilobano-360 e de derivados traquilobano-318 frente às contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+}	54
4.2.4 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644.....	56
4.2.5 Avaliação da participação dos canais de potássio no efeito espasmolítico do traquilobano-360 e de seu derivado traquilobano-318	58
4.2.5.1 Efeito dos diterpenos sobre as contrações induzidas por histamina na ausência e na presença de TEA^+ 5 mM	58
4.2.5.2 Efeito do traquilobano-360 e de seu derivado traquilobano-318 sobre as contrações induzidas por histamina na ausência e na presença de glibenclamida, 4-AP, apamina, TEA^+ , ou iberiotoxina	61
4.2.6 Avaliação da participação da via de sinalização das PDE/nucleotídeos cíclicos no efeito espasmolítico do traquilobano-360 e do traquilobano-318	71
4.2.6.1 Efeito de traquilobano-360 e traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de aminofilina	71
4.2.7 Efeito dos diterpenos sobre a concentração citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) em miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia	73

4.2.7.3 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre a $[Ca^{2+}]_c$	73
5 DISCUSSÃO	76
6 CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS.....	96
APENDICES	115
ANEXOS	129

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos antigos. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. 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 a civilização 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 na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

As plantas medicinais têm sido utilizadas tradicionalmente para o tratamento de várias enfermidades. Sua aplicação é vasta e abrange desde o combate ao câncer até os microrganismos (SILVA; CARVALHO, 2004; CALIXTO, 2000). As plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica, como a emetina, a vincristina, a colchicina, a rutina. A cada momento são relacionadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica como a forskolina, o taxol e a artemisinina (, 1998).

Como emprego medicinal poder-se-ia citar centenas de exemplos, porém alguns são clássicos como é o caso da *Papaver somniferum* L. conhecida por papoula onde o componente majoritário é a morfina, substância hipnoanalgésica utilizada até hoje para o combate das dores terminais. Outro exemplo é o da *Digitalis purpurea* L. e a *Digitalis lanata* Ehr., de onde extraem-se glicosídeos cardiotônicos, sendo os mais utilizados **CECHINEL FILHO** a digitoxina e a digoxina (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

No Brasil 20 % da população consome 63 % dos medicamentos alopáticos, o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas, uma fonte alternativa de medicamento. Nos anos 70, nenhuma das grandes companhias farmacêuticas mundiais mantinha programas nesta linha e

atualmente isto tem mudado. Dentre os fatores que têm contribuído para um aumento nas pesquisas está a comprovada eficácia de substâncias originadas de espécies vegetais como os alcalóides da vinca, com atividade antileucêmica, ou do jaborandi, com atividade antiglaucoma, ambos ainda considerados indispensáveis para o tratamento e por muitas plantas serem matéria-prima para a síntese de novos fármacos (FOGLIO et al., 2006).

Cerca de 50 % dos medicamentos utilizados são de origem sintética e cerca de 25 % de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese. Apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e dos processos biotecnológicos, cerca de 25 % dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas, oriundos de nada mais do que 90 espécies, na utilização na terapia moderna. No entanto, durante os últimos 20 anos, os fármacos de origem natural que apareceram no mercado são quase que na totalidade, oriundos das pesquisas científicas de países como China (CALIXTO, 2000).

O uso da fitoterapia na prática médica vem crescendo visivelmente. Em uma época em que as exigências de segurança, eficácia e qualidade, estabelecidas pelas agências regulamentadoras tornaram-se cada vez mais rígidas, a entrada dos fitoterápicos no mercado deve estar vinculada aos estudos científicos necessários para que a população tenha acesso a uma terapia alternativa de qualidade, a qual não é tão econômica quanto se pensa, visto que exige um razoável investimento em pesquisas (PUPO; GALLO, 2007).

Além disso, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos publicou, em janeiro de 2009, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS). Nessa lista, constam as plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS. Considerando que o uso de plantas é prática prevalente em ampla faixa populacional brasileira, uma série de outras plantas poderão vir a ser incluídas no RENISUS a partir do relato do uso freqüente na medicina popular. Assim, é evidente a necessidade de pesquisas que avaliem as potencialidades farmacológicas dessas plantas para que possam ser indicadas para uso na rede pública de saúde (BRASIL, 2009).

Grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não tem estudos aprofundados mesmo o Brasil sendo um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas. Desta forma, considera-se este um fator de grande incentivo ao estudo com plantas, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos (FOGLIO et al., 2006).

1.2 A família Annonaceae e o gênero *Xylopia*

Na flora mundial, a família Annonaceae é uma das maiores da classe Magnoliid possuindo 128 gêneros e aproximadamente 2300 espécies com distribuição pantropical (KESSLER, 1993). No Brasil, a família Annonaceae possui 26 gêneros e 260 espécies (MAAS et al., 2001), dentre os quais se inclui o gênero *Xylopia*, que possui aproximadamente 160 espécies (TAKAHASHI et al., 2001). No estado da Paraíba há 7 gêneros de Annonaceae e 12 espécies de *Xylopia* (PONTES et al., 2004).

Algumas espécies de *Xylopia* apresentam usos na medicina popular, como por exemplo, os frutos de *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich que são usados como carminativo, tônico pós-parto, para problemas estomacais, no tratamento de bronquite, em problemas biliares e disenteria (IWU, 1993), 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 (COLMAN-SAIZARBITORIA et al., 1994; COLMAN-SAIZARBITORIA et al., 1995; ALFONSO et al., 1996), sesquiterpenos, alcalóides (MARTINS et al., 1998), flavonóides (SANTOS; SALATINO, 2000), terpenóides, estes tendo uma importância tanto para a sobrevivência das espécies de *Xylopia* como propriedades biológicas benéficas para os humanos (AHARONI et al., 2005), possuindo ainda um papel nutricional, como por exemplo o α - e β -carotenos, e medicinal como os retinóides (WAGNER; ELMADFA, 2003). Estes terpenóides

podem ser ainda divididos em monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e tetraterpenos (AHARONI et al., 2005), porém dentre estas classes acredita-se que os diterpenos, como por exemplo, labdanos, cauranos, caurenos e traquilobanos (HASAN et al., 1982; VILEGAS et al., 1991; MARTINS et al., 1999; MELO et al., 2001; ANDRADE et al., 2004; TAVARES et al., 2006) sejam os marcadores químicos do gênero *Xylopi*a (VILEGAS et al., 1991).

Há relatos de várias espécies de plantas, dentre elas as do gênero *Xylopi*a, que contém diterpenos, aos quais são atribuídas algumas atividades biológicas, como exemplo tem-se o ácido caurenóico, encontrado nas sementes de *Xylopi*a *frutescens* eficaz contra o protozoário *Trypanasoma cruzi*, *in vitro*, bem como contra cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina (MELO et al., 2001), ainda mostrou atividade antimicrobiana e antiinflamatória (JENETT-SIEMS et al., 1999). Os ácidos caurenóico, diidro-caurenóico e xilópico isolados de *Xylopi*a *aethiopica* e *Alepidea amatymbica* têm demonstrado atividade hipotensora, bradicárdica e diurética em ratos (SOMOVA et al., 2001). Os labdanos ent-13-epi-12- α -acetoxi-manoil e ent-8-alfa-hidroxi-labda-13(16),14-dieno que possuem atividade antiinflamatória (DE LAS HERAS et al., 1994); o ácido 15,16-bisnor-13-oxolabda-8(17),11E-dien-19-oíco que possui atividade antiviral e antitumoral (TANAKA et al., 2000); jatrofone que possui atividade vasorelaxante em aorta de rato (DUARTE et al., 1992) e antiespasmódica em útero isolado de rata (CALIXTO; SANT'ANA, 1990); a 13-epi-9-dideoxiforscolina que possui atividade anti-hipertensiva em ratos (TANDON et al., 1992); a forscolina (FSK) e a 1,9-dideoxiforscolina que possuem atividade anti-espasmódica em útero de rata (VEDERNIKOV et al., 2000), vasorelaxante aorta de rato (ABE; KARAKI, 1992) e atividade relaxante em traquéia de cobaia (CHANG et al., 1984; DEVILLIER et al., 2001).

1.3 A espécie *Xylopi*a *langsдорfiana* A. St.-Hil. & Tul.

A espécie *Xylopi*a *langsдорfiana* A. St. - Hil. & Tul., (Figura 1) 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). Da fase hexânica

obida do extrato etanólico bruto das cascas do caule de *Xylopia langsdorfiana* foi isolado um diterpeno da classe dos labdanos, identificado como sendo o ácido 8(17),12*E*,14-labdatrieno-18-óico (labdano-302) que mostrou efeito espasmolítico em útero isolado de rata e íleo isolado de cobaia, bem como efeito relaxante em traquéia isolada de cobaia e aorta isolada de rato (RIBEIRO, 2003). Em traquéia de cobaia, o efeito relaxante do labdano-302 envolve a ativação dos canais para K^+ de grande condutância sensíveis ao Ca^{2+} e voltagem (BK_{Ca}) e da proteína cinase dependente de AMP_c (PKA), sem a aparente participação do AMPc. Em aorta de rato, o mecanismo pelo qual o labdano-302 promove relaxamento se dá pela ativação de canais para potássio dos tipos K_v e K_{ir} além da ativação da via de sinalização AMPc-PKA e bloqueio dos Ca_v do tipo L. O labdano-302 ainda reduz as correntes de K^+ através dos $K_v1.3$, expressos heterologicamente em células de fibroblastos de camundongo da linhagem L929, sendo este efeito provavelmente dependente da fosforilação dos $K_v1.3$ 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 dá-se por modulação positiva dos canais para 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 para potássio de pequena condutância sensíveis ao cálcio (SK_{Ca}) além da participação de fosfodiesterases (PDEs) (TRAVASSOS, 2010).



Fonte: Fernando A. C. Viana

Figura 1 - Foto de *Xylopia langsdorfiana* A. St.- Hil. & Tul. (A); detalhes da folha e da flor (B).

Os diterpenos do tipo traquilobano constituem uma classe de metabólitos secundários bastante raros na natureza e pouco estudados. Block e colaboradores (2004) relataram atividade apoptótica em células leucêmicas promielocíticas humanas apresentada pelo ent-traquiloban-3 β -ol, isolado das folhas de *Croton zambesicus*. Foram ainda relatadas para os diterpenos do tipo traquilobano atividades citotóxica e antimicrobiana (LI et al., 2005), relaxante em aorta de rato (BACELLI et al., 2005) e citotóxica em células leucêmicas humanas (SILVA et al., 2005; TAVARES et al., 2006). Recentemente cinco diterpenos foram isolados do extrato de *Trewia nudiflora* (Euphorbiaceae) (WU; LU; SHEN, 2009), incluindo três novos diterpenos do tipo traquilobanos, o ácido (3 α)-3-hidroxi-ent-traquilonano-17,19-dióico, 19-metil éster; o ácido ent-traquilonano-17,19-dióico, 19-metil éster e o ácido , ent-traquilonano-17,19-dióico, e dois

diterpenos do tipo atisano já relatados na literatura, são eles o ácido (16 α)-16,17-diidroxi-*ent*-atisan-19-óico metil éster, e o ácido 17-hidroxi-*ent*-atisan-19-óico metil éster. Esses diterpenos mostraram atividade antibacteriana. (WU; LU; SHEN, 2009).

Outro diterpeno da classe dos traquilobanos, foi isolado da fase hexânica do extrato etanólico bruto das cascas do caule de *Xylopia langsdorfiana* e identificado como ácido *ent*-7 α -acetoxitraquiloban-18-óico, codificado como traquilobano-360 (Figura 2A). Este diterpeno trata-se de uma substância cujas propriedades farmacológicas até então são muito pouco conhecidas, porém há 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 antinoceptiva no modelo de contorção abdominal em camundongos Swiss (CUPERTINO-SILVA et al., 2006).

A partir do traquilobano-360 foi feita uma modificação estrutural na posição 7 do grupo acetato de etila através de uma reação de desacetilação gerando um grupo hidroxí, o qual foi identificado como sendo o ácido *ent*-7 α -hidroxitraquiloban-18-óico (traquilobano-318, Figura 2B), e que até então apresentou atividade antitumoral em células de sarcoma 180 (PITA et al., 2009). Da espécie *Xylopia langsdorfiana* pode ser isolado o traquilobano-318, porém, devido ao baixo rendimento na obtenção deste diterpeno, torna-se mais viável a sua obtenção por síntese a partir do traquilobano-360.

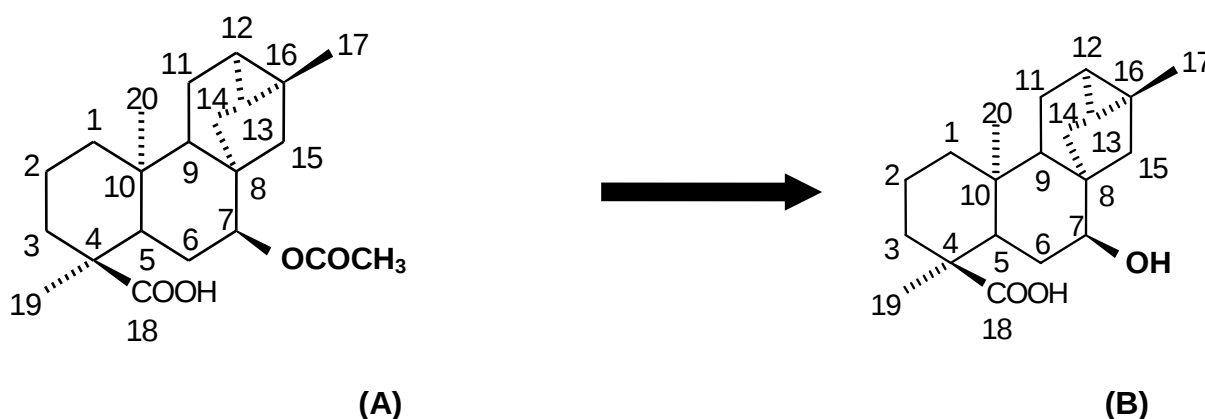


Figura 2 - ácido *ent*-7 α -acetoxitraquiloban-18-óico (A) ou ácido *ent*-7 α -hidroxitraquiloban-18-óico (B).

1.4 Contração e relaxamento da musculatura lisa

O músculo liso é um músculo involuntário que se encontra nas paredes de órgãos ocos, tais como os vasos sanguíneos, bexiga urinária, trato respiratório, ductos biliares, ureteres, útero e trato gastrointestinal. Esse tipo de músculo tem a função de impulsionar sangue, urina, espermatozoides, bile, o conteúdo do trato gastrointestinal bem como o do útero.

Há um grande interesse em se investigar drogas obtidas diretamente de plantas ou seus derivados que atuem sobre a musculatura lisa, pois o músculo liso é agora visto como um excelente modelo de investigação de vias de sinalização celular devido à enorme variedade de células do músculo liso encontrado (WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005).

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 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; DONATO, 2001; HEIZMANN, 1991).

No músculo liso um aumento na concentração de cálcio citoplasmático ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) é o que dispara a contração e está igualmente envolvido na proliferação celular no músculo liso (VAN 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, 1996).

O que dispara a 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 para Ca^{2+} na membrana plasmática (THORNELOE; NELSON, 2005). 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.

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 para Ca^{2+} ativados pelo IP_3 , e também pelos receptores de rianodina (RyR), que são canais para Ca^{2+} que são ativados pelo próprio Ca^{2+} , ambos receptores permitem a liberação de Ca^{2+} do R.S. 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 GPCR, sobretudo àqueles acoplados as proteínas G_q ou G_{11} , cujas suas subunidades α ativam a fosfolipase C (PLC) e conseqüente promovem hidrólise de fosfolipídios presentes na membrana produzindo o IP_3 e diacilglicerol (DAG) (Figura 3) (PAYNE et al., 1986; BERRIDGE, 2005). Exemplos de receptores acoplados as proteínas G_q ou G_{11} que promovem contração na musculatura lisa da aorta e na traquéia, como representantes dos sistemas vascular e respiratório, incluem o receptor α_1 -adrenérgico e M_3 -muscarínico, respectivamente (FOORD et al., 2005). Já os 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).

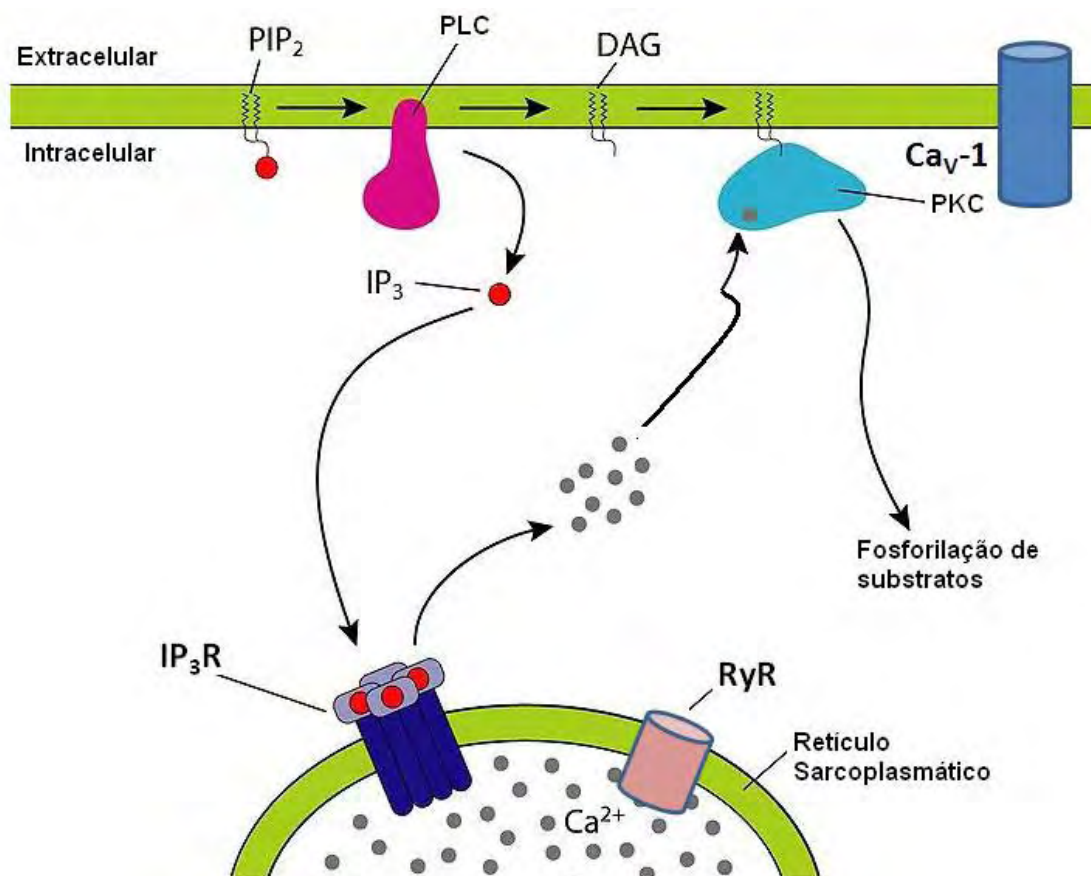


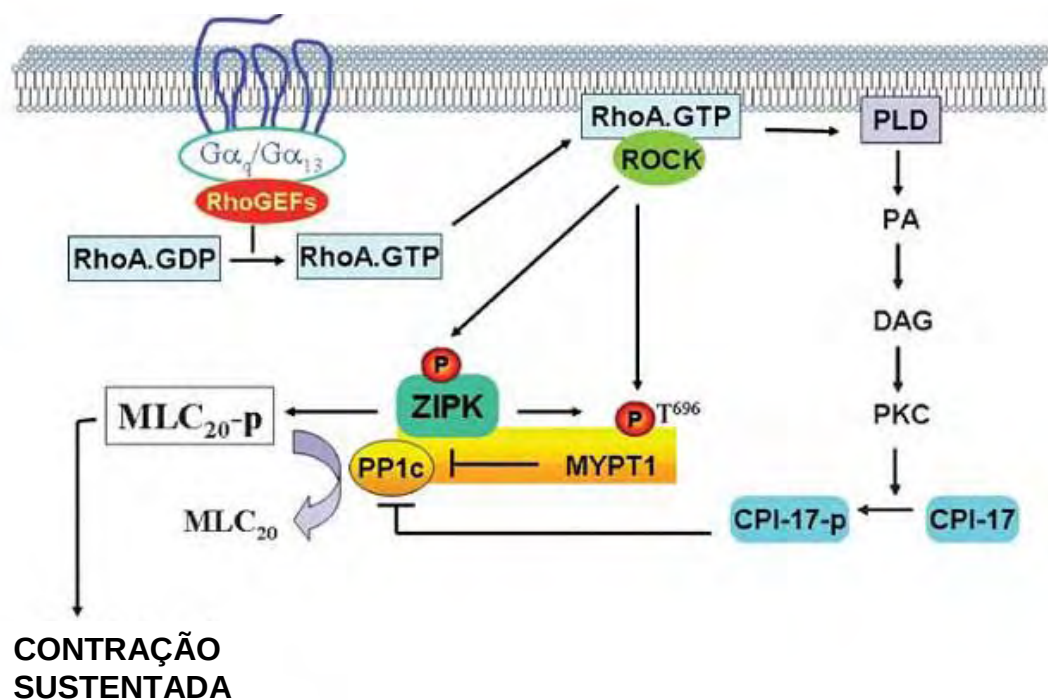
Figura 3 – Esquema da via da fosfolipase C (PLC).

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

Esse mecanismo se dá a partir da pequena proteína G (RhoA) e o seu alvo Rho cinase (ROCK) 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 ROCK, 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 ROCK, como o Y-27632, bloqueiam a sua atividade por

competir com o sítio de ligação do ATP na enzima (UEHATA, 1997; CHITALEY; WEBER; WEBB, 2001).

A inibição da MLCP é iniciada pela ativação da RhoA, dependente das proteínas G heterotriméricas $G_{12/13}$ e G_q , 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 (ROCK) e uma fosfolipase D (PLD) específica para fosfatidilcolina, liberando ácido fosfatídico que é desfosforilado a diacilglicerol (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 ROCK e a PKC agem isoladas ou cooperativamente para inibir a atividade da MLCP (SOMLYO; SOMLYO, 2000). Embora a ROCK 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 ROCK pode também ativar uma proteína cinase independente de Ca^{2+} , mais conhecida como proteína cinase de interação “zipper” (ZIPK). A ZIPK pode fosforilar diretamente a MLC, no entanto seu alvo principal é o resíduo de Thr⁶⁹⁶ da MYPT1 o qual é fosforilado inibindo a ação da MLCP (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 4.) (SOMLYO; SOMLYO, 2003; MURTHY, 2006).



Adaptado de MURTHY, 2006

Figura 4 - Sinalização por receptores acoplados a proteína G durante a fase sustentada da contração. A fosforilação da MLC₂₀ e a contração do músculo são iniciadas por ativação da RhoA iniciando duas vias envolvendo a ROCK e PKC que culminam com a inibição da MLCP, mantendo assim a contração sustentada.

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 conseqüente desenvolvimento da contração (SOMLYO; SOMLYO, 1994; SOMLYO; SOMLYO, 2003).

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 Ca_v , causando aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ e, conseqüentemente, a contração (REMBOLD, 1996).

Os mecanismos fármaco-mecânicos da contração incluem (1) aumento de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG) por ligação do agonista com o receptor ativando o sistema efetor proteína $\text{G}_{q/11}$ -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, 1996); (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 (KOMORI et al., 1995).

Sendo o aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ o sinal que leva à contração, conseqüentemente seu relaxamento se dá por diminuição dos níveis deste íon no citosol (SOMLYO et al., 2004). Esta diminuição na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ pode se dar 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).

O acoplamento eletromecânico de relaxamento envolve a abertura de canais para 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 et al., 1996).

Os canais para cálcio sensíveis a voltagem (Ca_v) são complexos protéicos 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 está ligada a subunidade γ por uma ponte de dissulfeto e a subunidade β que é intracelular. Essa família de canais para 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 Ca_v -L ($Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ e $Ca_v1.4$), onde o “L” vem do inglês “large”, indicando que estes canais necessitam de uma grande variação no V_m para serem ativados, sendo estes os principais Ca_v envolvidos na contração muscular; os Ca_v -P/Q ($Ca_v2.1$); os Ca_v -N ($Ca_v2.2$); os Ca_v -R ($Ca_v2.3$) e os Ca_v -T ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ e $Ca_v3.3$) (CATTERALL et al., 2005).

A atividade dos canais para potássio constitui um mecanismo essencial na regulação do potencial de membrana das células musculares lisas, sendo um determinante importante do tonus destes músculos.

Os canais para 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, até o momento, que em células da musculatura lisa, há pelo menos quatro diferentes famílias de canais para K^+ identificados. Esses incluem os K_{ATP} , os K_{Ca} , os K_v e os K_{ir} (NELSON; QUAYLE, 1995). Dentre estas famílias de canais para 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 (LEDOUX et al., 2006). 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 dos $[Ca^{2+}]_c$ (LEDOUX et al., 2006; LIN et al., 2006) levando o músculo ao relaxamento.

Os canais para K^+ de grande condutância sensíveis ao cálcio (BK_{Ca}) são assim denominados devido a sua alta condutância (130-300 os) (LATORRE, 1989). Esses canais são amplamente distribuídos nos neurônios (MAUE; DIONNE, 1987), músculo liso e estriado; glândulas endócrina e exócrinas. Embora em alguns casos o papel destes canais não esteja bem determinado, estudos utilizando a técnica de “patch-clamp” tem mostrado que eles medeiam a hiperpolarização e é devido a um aumento da probabilidade de abertura destes canais K (Ca) com uma condutância de 200-250 pS.

Os mecanismos de relaxamento 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 R.S. (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA), aumentando assim tanto o seqüestro 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 de Ca^{2+} do R.S.; (3) a diminuição da formação do IP_3 e conseqüente diminuição da liberação de Ca^{2+} do R.S.; (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 $[Ca^{2+}]_c$ por diminuir o influxo de Ca^{2+} ; (6) ativação de canais para K^+ , que indiretamente, por repolarização ou hiperpolarização, causam a desativação dos Ca_v (WOODRUM; BROPHY, 2001; DUTTA et al., 2002; DANILA; HAMILTON, 2004).

Outros agentes importantes no relaxamento do músculo liso são os nucleotídeos cíclicos, pois um aumento nos níveis citosólicos de GMPc ou do AMPc nas células musculares lisas é considerado um dos maiores mecanismos que medeiam seu relaxamento sob condições fisiológicas.

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 NO ou CO, e a ativação da ciclase de guanilil particulada, pelo PNA (SONNENBURG; BEAVO, 1994; VAANDRAGER; DE JONGE, 1996;

JOHNS, 1997; SCHULZ; WALDMAN, 1999). 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 (VAANDRAGER; DE JONGE, 1996; NISHIMURA et al., 1992). 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 R.S. ; hiperpolarização de membrana via ativação direta e/ou indireta de canais para K^+ ; inibição direta de Ca_v (ORALLO, 1996; VAANDRAGER; DE JONGE, 1996) ou indireta por ativação de canais para K^+ (KUME et al., 1989; WHITE et al., 1993; KUME et al., 1994).

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 para K^+ (REMBOLD, 1992; MINAMI et al., 1993) e fosforilação da MLCK e assim diminuição de sua afinidade pelo complexo $[4Ca^{2+}-CaM]$ (REMBOLD, 1992).

Neste trabalho objetivou-se investigar um possível mecanismo de ação espasmolítica de dois diterpenos do tipo traquilobano, utilizando para tanto técnicas e ferramentas farmacológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Contribuir para o estudo farmacológico da família Annonaceae, em particular da espécie *Xylopi langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. com a finalidade de descobrir drogas potencialmente terapêuticas ou que atuem como ferramentas farmacológicas.

Investigar e caracterizar um possível efeito espasmolítico do traquilobano-360, diterpeno isolado das cascas do caule de *Xylopi langsdorfiana* bem como de seu derivado hidroxilado traquilobano-318, realizando um estudo comparativo entre esses dois diterpenos com base nos parâmetros de potência e eficácia utilizando para isso técnicas funcionais e celulares.

2.2 Específicos

Investigar:

- 1- o efeito dos diterpenos em músculos lisos isolados (aorta de rato, útero de rata, traquéia e íleo de cobaia);
- 2- a participação dos canais para cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), caracterizando o subtipo tipo de Ca_v envolvido;
- 3- o envolvimento dos canais para K^+ no efeito dos diterpenos;
- 4- a participação dos nucleotídeos cíclicos.
- 5- a interferência dos diterpenos sobre a concentração citosólica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_c$) em miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratas virgens Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 150 – 250 g, ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 250 – 350 g e cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos pesando entre 300 – 500 g todos provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Purina) com livre acesso a água, com ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) controladas e constantes. Todos os experimentos eram realizados no período de 8h00 às 20h00 horas. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal – CEPA (Certidão Nº 0101/08) do LTF/UFPB.

3.1.2 Substâncias e sais

Quadro 1: Substâncias e sais utilizados

Cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cloreto de potássio (KCl), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato de potássio monobásico ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Laboratório Vetec (Brasil)
Fosfato monossódico 1-hidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), sulfato de magnésio monohidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e o ácido clorídrico (HCl P.A.)	Nuclear (Brasil)
Cloreto de sódio (NaCl)	Dinâmica (Brasil)
O cloridrato de carbamilcolina (CCh)	Merck. (Brasil)
Dietilestilbestrol, cloridrato de histamina, apamina, S-(–)-Bay K8644 (1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]3-piridina carboxílico ácido metil éster), cloreto de tetraetilamônio (TEA^+),	Sigma-Aldrich (EUA).

cloridrato de glibenclamida, óleo de castor (cremophor [®]), aminofilina, dimetilsufóxido (DMSO), iberiotoxina (IbTx), penicilina, sulfato de estreptomicina, elastase I, o ácido [etilenodinitrilo]tetracético (EDTA), o ácido (N-[2-hidroxietilpiperazina-N'-[2-etanosulfônico]] (HEPES), ácido araquidônico (AA) e PFA	Sigma-Aldrich (EUA).
4-aminopiridina (4-AP)	Fluka and Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha).
Ocitocina foi obtida da União Química (Brasil).	União Química (Brasil).
Mistura carbogênica (95 % de O ₂ e 5 % de CO ₂)	White Martins (Brasil).
Fenilefrina (FEN)	Pfizer (EUA).
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), soro fetal bovino, glutamina e a solução de tripsina/EDTA (1:250)	Cultilab

Todas as substâncias foram mantidas em um “freezer” a uma temperatura de -20 °C, dissolvidas e diluídas em água destilada, exceto o ácido araquidônico, S-(–)-Bay K8644, dietilestilbestrol e a glibenclamida que foram dissolvidos em etanol absoluto e diluídos em água destilada.

3.1.3 Soluções nutritivas

De acordo com os protocolos experimentais realizados eram utilizadas diferentes soluções nutritivas, todas aeradas com carbogênio. O pH era ajustado para 7,4 com solução de HCl ou NaOH 1 N e mantidas a temperaturas adequadas. As composições destas soluções estão descritas a seguir:

- **Composição da solução de Krebs normal (mM):** NaCl (118,0); KCl (4,6); KH_2PO_4 (1,1); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,7); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,5); NaHCO_3 (25,0); Glicose (11,0).
- **Composição da solução de Locke Ringer de acordo com Revuelta; Cantabrana; Hidalgo (2000) (mM):** NaCl (154,0); KCl (5,6); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,1); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,2); NaHCO_3 (6,0); Glicose (5,6).
- **Composição da solução de Krebs de acordo com Sun e Benishn (1994) (mM):** NaCl (117,0); KCl (4,7); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,2); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,3); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,5); NaHCO_3 (25,0); Glicose (11,0).
- **Composição da solução de Krebs despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} (mM):** NaCl (51,7); KCl (70,0); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,2); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,3); NaHCO_3 (25,0); Glicose (11,0).
- **Composição da solução (“Physiological Buffer Solution”) (mM):** NaCl (140,0); Na_2HPO_4 (3,9); NaHPO_4 (1,7); NaHCO_3 (4,2); EDTA (0,2).
- **Composição do meio para cultura de miócitos. O DMEM foi suplementado com soro fetal bovino (10 %) e glutamina (1 %), ajustado para pH 7,2. (mM):** NaHCO_3 (25,0); Glicose (11,0); HEPES (11,0)

Para se tornarem estéreis, algumas soluções eram filtradas em membranas de filtro (Milipore), seguida da adição de penicilina e estreptomicina (1 %). As soluções finais eram acondicionadas em garrafas estéreis de 100 mL e mantidas à 0 °C e descongeladas em banho-maria a 37°C. Todo este procedimento era realizado em ambiente estéril.

3.1.4 Aparelhos e equipamentos

Para registro das contrações isotônicas tanto o útero de rata quanto o íleo de cobaia eram suspensos em cubas de 6 mL e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição frontal em cilindros esfumaçados de um quimógrafo (DTF, Brasil). As contrações isométricas 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 executando o programa BioMed[®] versão Rv2 (BioData, João Pessoa, PB, Brasil). As contrações isométricas também foram registradas através de transdutores de força TIM-50 AVS Projetos, Brasil que estavam acoplados em um amplificador AECAD 04F que por sua vez estava conectado a uma placa conversora que executava o programa AQCAD versão 2.03.

As células em cultura eram observadas em microscópio óptico comum (Nikon, Japão). Já as imagens das células eram captadas por microscópio óptico invertido (Nikon, Japão) que estava acoplado à câmera de vídeo (Nikon – DS Camera Head DSFil/DS-5M, Japão).

As medidas de fluorescência eram realizadas em um aparelho de medidas de cálcio, Flex station 3, Molecular Devices e analisadas no programa Soft Max Pro.

A manipulação de células em cultura era realizada em uma capela de fluxo laminar (GermFree Laboratories, EUA).

As culturas de células eram mantidas em estufa úmida de CO₂ à 37 °C (Forma Scientific, EUA).

Os valores de pH eram verificados através de um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil). A temperatura das cubas era controlada com bombas termostáticas 597 (FISATOM, Brasil) ou do modelo POLYSTAT 12002 (Cole-Palmer, EUA).

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

3.1.5 Substâncias teste

O diterpeno ácido *ent-7 α -acetoxitraquiloban-18-óico* foi isolado das cascas do caule de *Xylopia langsdorfiana*, codificado como (traquilobano-360), foi dissolvido em cremofor e diluído em água destilada, já o diterpeno ácido *ent-7 α -hidroxitraquiloban-18-óico* (traquilobano-318) pode ser encontrado nas cascas do caule de *X. langsdorfiana*, no entanto devido ao baixo rendimento de obtenção, o mesmo foi obtido por síntese a partir do traquilobano-360 (TAVARES et al., 2006) e foi dissolvido em 7% de DMSO e cremofor. O traquilobano-318 possui massa molecular de 318 u.m.a e foi cedido pelos pesquisadores Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva e Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, ambos do Setor de Fitoquímica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros /UFPB.

Após a obtenção de soluções de 10^{-2} M dos diterpenos (solução-estoque), estas eram estocadas à - 20 °C, sendo diluídas em água destilada para por ocasião da execução do protocolo experimental.

Tanto a concentração final de DMSO quanto a de cremofor era desprovida de efeito contrátil ou relaxante nos experimentos realizados.

Na triagem farmacológica preliminar eram testadas as concentrações submáxima (3×10^{-5}) e a máxima (10^{-4} M) dos diterpenos em órgãos de três animais diferentes. Caso os diterpenos não apresentassem efeito significativo, esses experimentos eram repetidos por três vezes e concluía-se que os diterpenos não tinham efeito espasmolítico até a concentração de 10^{-4} M, concentração esta considerada alta para experimentos *in vitro*. Caso fossem obtidas respostas significantes, seguiam-se com os experimentos buscando a concentração que produzisse 0% de efeito para só então realizar a curva concentração-resposta cumulativa. Para a realização dos testes farmacológicos foi testada a concentração que produzisse 0% de efeito e em incrementos de três as concentrações foram aumentadas até atingir o efeito máximo produzido pelos diterpenos.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 TRIAGEM FARMACOLÓGICA

3.2.1.1 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta isolada de rato

Os ratos eram eutanasiados por deslocamento cervical e exsanguinados. Os anéis aórticos de 3 – 5 mm eram obtidos livres de tecido conjuntivo e gordura a partir da aorta torácica. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis eram suspensos individualmente por uma alça de aço inoxidável em cubas de vidro (6 mL) contendo solução de Krebs Normal a 37 °C aerados com carbogênio. As preparações eram estabilizadas por um período de uma hora, durante o qual eram mantidas sob uma tensão de repouso de 1 g. Durante esse período, a solução nutritiva era renovada a cada 15 min. para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização eram induzidas duas contrações com fenilefrina (3×10^{-7} M) de magnitude similares, e durante o componente tônico, 12 a 15 min. da segunda resposta, era adicionado 10^{-6} M de acetilcolina à todas as preparações para verificar a integridade do endotélio (FURCHGOTT; ZAWDZKI, 1980). O endotélio vascular era considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentaram relaxamento igual ou superior a 50% (AJAY; GILANI; MUSTAFA, 2003). A retirada do endotélio se dava através do atrito da parede interna do órgão com uma haste envolta em algodão e embebida com solução de Krebs e era confirmada pela ausência de relaxamento em resposta à adição de acetilcolina à cuba ou quando este relaxamento era inferior a 10%, sendo este anel considerado sem endotélio funcional. Após a lavagem, esperava-se 30 min, e durante o componente tônico de uma terceira resposta ao agonista, o traquilobano-360 e o seu derivado, traquilobano-318 eram adicionados, de maneira cumulativa à cuba, em preparações diferentes.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração induzida por fenilefrina. Os valores da concentração do composto que produz 50% de seu efeito máximo (CE_{50}) foram obtidos por regressão não-linear a

partir das curvas concentrações-resposta obtidas para os diterpenos em anéis com e sem endotélio funcional.

3.2.1.2 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero isolado de rata

As ratas eram tratadas 24 horas antes com dietilestilbestrol (0,1 mg/kg) via subcutânea, para indução do estro. Decorrido este tempo, eram eutanasiadas por deslocamento cervical seguido de secção dos vasos cervicais. Após aberta a cavidade abdominal, era feita a dissecação do útero colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Locker Ringer a 32 °C sob aeração com carbogênio. Em seguida os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de vidro (6 mL). Para a estabilização da preparação, esta era mantida em repouso por 45 min. antes do contato com qualquer agente, sob tensão de 1 g, efetuando neste período, a renovação da solução nutritiva da cuba a cada 10 min. As curvas concentrações-resposta simples para ocitocina ou para carbacol eram obtidas, e registradas através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal em um cilindro esfumaçado de um quimógrafo. O traquilobano-360 e seu derivado eram incubados por 15 min. em preparações diferentes e a inibição da resposta submáxima de ocitocina e carbacol era avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição a cuba. Os valores de CI_{50} (concentração de uma substância que inibe 50% do efeito máximo produzido por um agonista) eram obtidos por regressão não-linear.

3.2.1.3 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre a fase tônica das contrações induzidas por carbacol em traquéia isolada de cobaia

Os cobaias eram eutanasiados por concussão cerebral seguida por secção dos vasos cervicais. O método de deslocamento cervical não foi utilizado para não provocar danos devido a um estiramento demasiado da traquéia. O tórax da cobaia era aberto e dissecado, a traquéia era retirada e limpa de todo o

tecido conjuntivo e adiposo. O órgão era dividido em segmentos, contendo de 3 a 4 anéis de cartilagem. Os segmentos eram suspensos individualmente através de hastes de aço inoxidável em cubas de vidro (6 mL), contendo solução nutritiva de Krebs normal sob tensão de 1 g. Estes segmentos eram mantidos a uma temperatura de 37 °C e permaneciam em repouso durante 60 min., sendo a solução trocada a cada 15 min.. Após esse período de estabilização, eram obtidas duas contrações tônicas de magnitudes similares induzidas por 10^{-6} M de carbacol e consideradas como controle. Anéis de traquéia sem epitélio eram obtidos através da retirada do mesmo por atrito da parede interna do órgão com uma haste envolta em algodão e embebida com solução de Krebs.

A integridade do epitélio traqueal era verificada pela adição de ácido araquidônico (AA) à cuba na concentração de 10^{-4} M (TSCHIRHART et al., 1987) durante a fase tônica da segunda resposta induzida por carbacol, onde anéis que obtiveram relaxamentos iguais ou superiores a 50% (em relação à força de contração inicial) eram considerados com epitélio. 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. Durante a fase tônica da terceira resposta ao carbacol, os diterpenos eram adicionados de maneira cumulativa à cuba em preparações diferentes.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por carbacol e os valores de CE_{50} foram calculados como descrito no item 3.2.2.1.

3.2.1.4 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina em íleo isolado de cobaia

Os cobaias eram mantidos em jejum por um período de 18 horas, tendo acesso à água *ad libitum* antes do início dos experimentos. Após este período eram eutanasiados por deslocamento cervical seguido de secção dos vasos cervicais. O abdômen era aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento era retirado e colocado em uma placa

de Petri contendo solução nutritiva de Krebs modificado a 37 °C sob aeração com carbogênio.

Após cuidadosa dissecação, o segmento do íleo era seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, suspensos individualmente em cubas de vidro e mantidos em repouso por 30 min., tempo necessário para perfeita estabilização da preparação, durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 15 min. Após o período de estabilização, duas contrações fásicas de magnitudes similares, com intervalo de 15 min. entre ambas, eram obtidas com 10^{-6} M de carbacol ou de histamina, concentração submáxima que produz cerca de 80 % da resposta máxima, e registradas através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal em um cilindro esfumaçado de um quimógrafo. Aqui foi testado o efeito inibitório tanto do traquilobano-360 como do traquilobano-318 em várias concentrações. Estes eram incubados, individualmente, por 15 min. em preparações diferentes, e a inibição da resposta submáxima de carbacol ou de histamina era avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição a cuba.

Os valores de CI_{50} foram obtidos em cada um dos experimentos e calculados por regressão não-linear.

3.2.2 INVESTIGAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO EM ÍLEO ISOLADO DE COBAIA

3.2.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por histamina

A montagem do íleo para este experimento era semelhante ao descrito anteriormente. Após o período de estabilização duas curvas concentrações-resposta cumulativas similares à histamina eram obtidas. Em seguida, na ausência da histamina, os diterpenos eram incubados por 15 min. em diferentes concentrações e em experimentos independentes. Após este período, na presença dos diterpenos, uma nova curva concentração-resposta cumulativa à histamina era obtida. Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença dos diterpenos com àquela obtida pela amplitude média das curvas controle (na ausência dos diterpenos). O

antagonismo destes diterpenos foi analisado com base nos valores da inclinação do gráfico de Schild (ARUNLAKSHANA; SCHILD, 1959) e suas potências pelo valor do pD'_2 , que é definido como logaritmo negativo da concentração molar de um antagonista que produz 50% de efeito máximo (E_{max}) produzido por um agonista (VAN ROSSUM, 1963).

3.2.2.2 Efeito do traquilobano-360 e de seu derivado sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por carbacol ou por histamina em íleo isolado de cobaia

Após o período de estabilização sob as condições já descritas, duas contrações submáximas similares eram obtidas com KCl (40 mM), carbacol (10^{-6} M) ou histamina (10^{-6} M). Durante a fase tônica sustentada da segunda resposta, tanto o traquilobano-360 como o seu derivado eram aplicados de maneira cumulativa, em preparações diferentes. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelos agentes contráteis. A CE_{50} foi obtida por análise de regressão não-linear como descrito anteriormente.

3.2.2.3 Efeito traquilobano-360 e do traquilobano-318 frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+}

A montagem do íleo para este experimento era semelhante ao descrito anteriormente. O tecido permanecia em repouso por 30 min. com a solução de Krebs modificado e 45 min. com a solução despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} . Eram induzidas duas curvas similares de maneira concentração-resposta cumulativa para $CaCl_2$. Após estas respostas, as preparações eram lavadas e então traquilobano-360 ou traquilobano-318 eram incubados na ausência de $CaCl_2$ em preparações diferentes durante 15 min. e após este período uma terceira curva cumulativa ao $CaCl_2$ era obtida na presença de diferentes concentrações dos diterpenos. Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença de traquilobano-360 ou do traquilobano-318 com aquela obtida pela amplitude média das curvas

controle. O antagonismo destes diterpenos foi analisado com base nos valores da inclinação do gráfico de Schild (ARUNLAKSHANA; SCHILD, 1959) e suas potências pelo valor do pD'_2 .

3.2.2.4 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644

Após a estabilização por 30 min. em solução de Krebs modificado, o íleo foi parcialmente despolarizado pela adição de 15 mM de KCl por 10 min., pois é relatado que as respostas contráteis aos ativadores de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v) como o S-(-)-Bay K8644 e FPL 64176, são potencializadas pelo aumento para 8-20 mM, concentrações estas superiores àquelas da solução de Krebs (WEI et al., 1986; CONTE-CAMERINO et al., 1987; ZHENG et al., 1991; USOWICZ et al., 1995). Em sua presença foi induzida uma contração com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644, um agonista seletivo dos Ca_v do tipo L ou Ca_v1 (FERRANTE et al., 1989). Durante a estabilização da fase tônica da contração induzida por S-(-)-Bay K8644 os diterpenos eram adicionados de maneira cumulativa em preparações diferentes. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo S-(-)-Bay K8644. A CE_{50} foi obtida por análise de regressão não-linear.

3.2.2.5 Avaliação da participação dos canais de potássio no efeito espasmolítico dos diterpenos

3.2.2.5.1 Efeito comparativo dos diterpenos, sobre as contrações induzidas por histamina na ausência e na presença de TEA^+ (5 mM)

As contrações tônicas à histamina eram obtidas como descrito no item 3.2.2.4. Em seguida, a preparação era incubada por 20 min. com TEA^+ (5 mM), um bloqueador que nesta concentração torna-se não seletivo para os canais de K^+ (LATORRE et al., 1989), e ainda na sua presença, uma nova contração com histamina era obtida. Em seguida os diterpenos eram aplicados cumulativamente sobre a fase tônica da contração em preparações diferentes. A percentagem de

inibição foi calculada comparando-se as respostas antes e após a adição do bloqueador. A potência relaxante dos diterpenos foi avaliada comparando-se os valores de CE_{50} na ausência e na presença de TEA^+ .

3.2.2.5.2 Efeito do traquilobano-360 e traquilobano-318 sobre as contrações induzidas por histamina na ausência e na presença de glibenclamida, 4-AP, apamina, TEA^+ ou iberiotoxina

As contrações tônicas à histamina eram obtidas como descrito anteriormente. Em seguida, o tecido era incubado por 20 min. com 10^{-5} M de glibenclamida, um bloqueador específico de canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (SUN; BENISHN, 1994), ou com 0,3 mM de 4-AP, um bloqueador não seletivo dos canais de K^+ dependentes de voltagem (K_V) (ROBERTSON; NELSON, 1994) ou com 100 nM de apamina, um bloqueador específico dos canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de pequena condutância (SK_{Ca}) (ISHII; MAYLIE; ADELMAN, 1997; VAN DER STAAY et al., 1999) e ainda com 1 mM de TEA^+ , que até esta concentração é um bloqueador específico dos canais de K^+ ativados por Ca^{2+} e por voltagem de grande condutância (BK_{Ca}) (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996) ou com iberiotoxina (IbTx), um bloqueador específico dos canais BK_{Ca} (GALVEZ et al., 1990; CANDIA; GARCIA; LATORRE, 1992; ABOULAFIA et al., 2002), em preparações diferentes, e ainda na presença dos bloqueadores, uma nova contração com histamina era obtida. Em seguida, os diterpenos eram aplicados cumulativamente sobre a fase tônica da contração em diferentes preparações. A percentagem de inibição foi calculada comparando-se as respostas antes e após a adição dos bloqueadores de canais de K^+ testados. A potência relaxante dos diterpenos foi avaliada comparando-se os valores de CE_{50} na ausência e na presença dos bloqueadores.

3.2.2.6 Avaliação da participação da via de sinalização das PDE-nucleotídeos cíclicos no efeito espasmolítico do traquilobano-360 e do traquilobano-318

3.2.2.6.1 Efeito de traquilobano-360 e traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de aminofilina

O íleo era montado como descrito anteriormente. Após a contração controle induzida por histamina, as preparações eram pré-incubadas por 20 min. com 10^{-4} M de aminofilina, um inibidor não seletivo das enzimas fosfodiesterases (PDE) (HIRSH et al., 2004). Uma segunda resposta contrátil à histamina era induzida e após a estabilização desta contração, durante a sua fase tônica, os diterpenos eram adicionados às cubas, em diferentes preparações, de maneira cumulativa e seus efeitos eram registrados. Os valores de CE_{50} dos diterpenos foram calculados e comparados a partir das curvas concentrações-resposta, na presença e na ausência de aminofilina.

3.2.7 Efeito dos diterpenos sobre a concentração citosólica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_c$) em miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia

3.2.7.1 Cultura de miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia

Os animais eram eutanasiados por deslocamento cervical e exsanguinados. Do íleo era retirada uma amostra de 15 cm da camada longitudinal e dissecada, para retirada de tecido conjuntivo e adiposo em solução estéril de Tyrode. O órgão era lavado, repetidas vezes, em solução estéril de PSS sem Ca^{2+} e com penicilina. Após sucessivas lavagens colocavam-se quatro amostras do tecido (camada) em uma garrafa de cultura pequena e estéril. Após a observação de que o tecido se encontrava aderido à parede da garrafa, adicionava-se 5 mL de meio de cultura DMEM suplementado com glutamina e 10 % de soro fetal bovino era adicionado levemente, e levados à estufa de CO_2 . Após 24 h, adicionava-se 5 mL de meio de cultura à garrafa (adaptado de CHAMLEY; CAMPBELL et al., 1977).

A cada 48 horas, lavavam-se as garrafas com PBS e trocava-se por novo meio de cultura. Após confluência das células na garrafa, retirava-se o meio, adicionava-se 2 mL de tripsina, e deixava-se por aproximadamente 2 min. em

estufa. Ressuspendia-se em meio de cultura, transferia para tubos Falcons, seguidos de centrifugação (1500 rpm) por 5 min. O sobrenadante era desprezado e os *pellets* formados (contendo as células) eram utilizados para os protocolos experimentais descritos posteriormente.

Todos esses procedimentos eram realizados em ambiente asséptico com a utilização de uma capela de fluxo laminar.

3.2.7.2 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre a $[Ca^{2+}]_c$

Os *pellets* homogeneizados com meio de cultura eram semeados em placas de 96 poços, com cerca de 40.000 células por poço e deixados em estufa por 24 h para adesão das células.

Após o período de aderência das células era desprezado o meio de cultura de cada poço e adicionados 50µL de solução de fluo-4 e deixados em repouso por 1 hora, à 37 °C em estufa de CO₂ e ambiente ao abrigo de luz. Após o período de incorporação do fluoróforo a placa era levada ao Flex Station 3 para a leitura da fluorescência, uma medida indireta da concentração cistossólica de cálcio. As imagens eram obtidas sem interrupção em até 3 min. A intensidade de fluorescência era aumentada com 10⁻⁶ M de histamina (controle) e subsequente administração de 3x10⁻⁵ M dos diterpenos em preparações separadas.

3.2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados estão expressos como a média $\pm$ e.p.m e foram analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” de Student ou análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do teste de Bonferroni, onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Os valores de CE_{50} e de CI_{50} (NEUBIG et al., 2003) foram calculados por regressão não-linear para todos os experimentos realizados, onde a CE_{50} corresponde a concentração de uma substância que promove 50% de seu efeito máximo e a CI_{50} é a concentração de uma substância que causa uma inibição de 50% da resposta induzida por um agonista.

O “slope” do plote de Schild, que provê informação sobre a natureza do antagonismo, foi calculado usando uma regressão linear baseada nas equações de Schild (ARUNLAKSHANA; SCHILD, 1959), onde foram usados os valores de log (DR-1) em função do log das concentrações dos diterpenos. Também foram calculados os valores de pD'_2 ($-\log CI_{50}$).

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

4 RESULTADOS

4.1 Triagem Farmacológica

4.1.1 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta isolada de rato

Tanto o traquilobano-360 quanto o seu derivado traquilobano-318 até a concentração de 10^{-4} M, não apresentaram efeito relaxante significativo ($n = 3$) em anéis de aorta com e sem endotélio funcional pré-contraídos por 3×10^{-7} M de fenilefrina (Figuras 5 e 6).

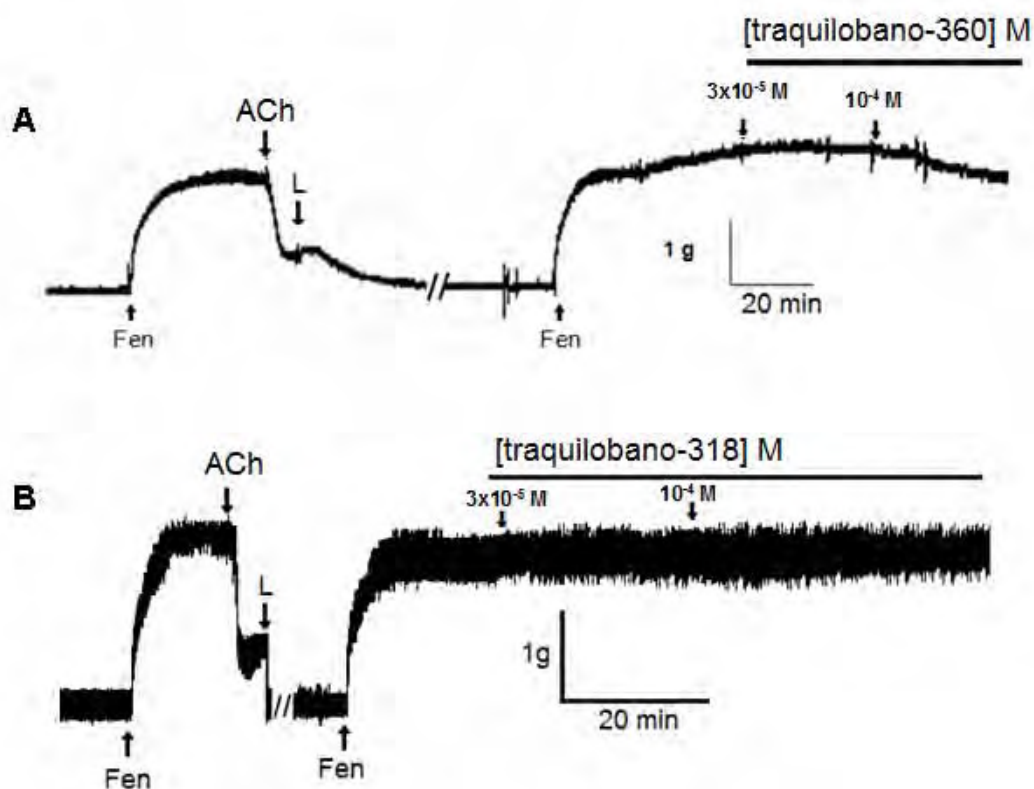


Figura 5 – Registro original representativo do efeito do traquilobano-360 (A), e do traquilobano-318 (B) na presença de endotélio funcional em aorta isolada de rato pré-contraídas por fenilefrina (Fen) ($n = 3$). L=Lavagem. Acetilcolina (ACh).

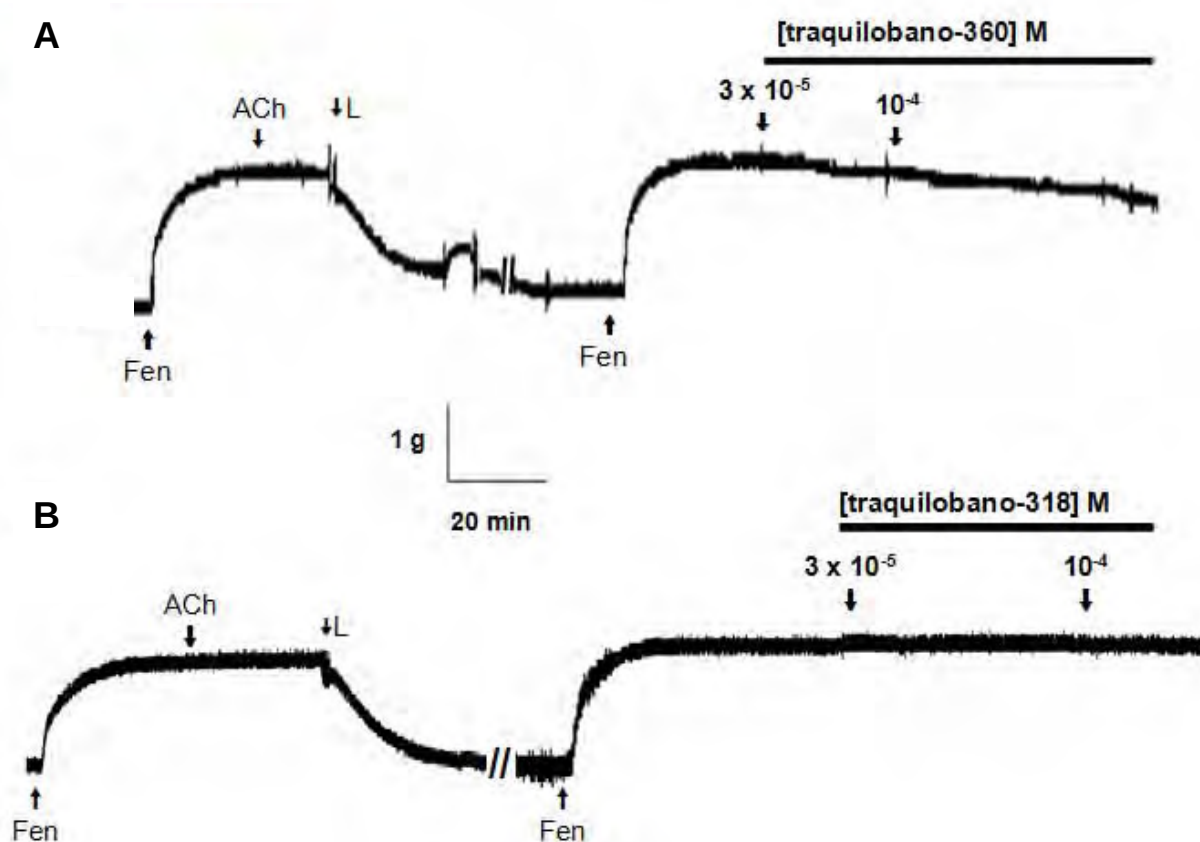


Figura 6 – Registro original representativo do efeito do traquilobano-360 (A), e do traquilobano-318 (B) na ausência de endotélio funcional em aorta isolada de rato pré-contraídas por fenilefrina (Fen). L=Lavagem. Acetilcolina (ACh). (n = 3).

4.1.2 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero isolado de rata

Os dois diterpenos (traquilobano-360 e traquilobano-318; até a concentração de 10^{-4} M, não apresentaram efeito inibitório superior a 30% ($n = 3$) das contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL ocitocina, agonista dos receptores OT (Gráfico 1A e 1C) ou 10^{-5} M de carbacol, um agonista dos receptores muscarínicos, (Gráfico 1B e 1D) em útero isolado de rata.

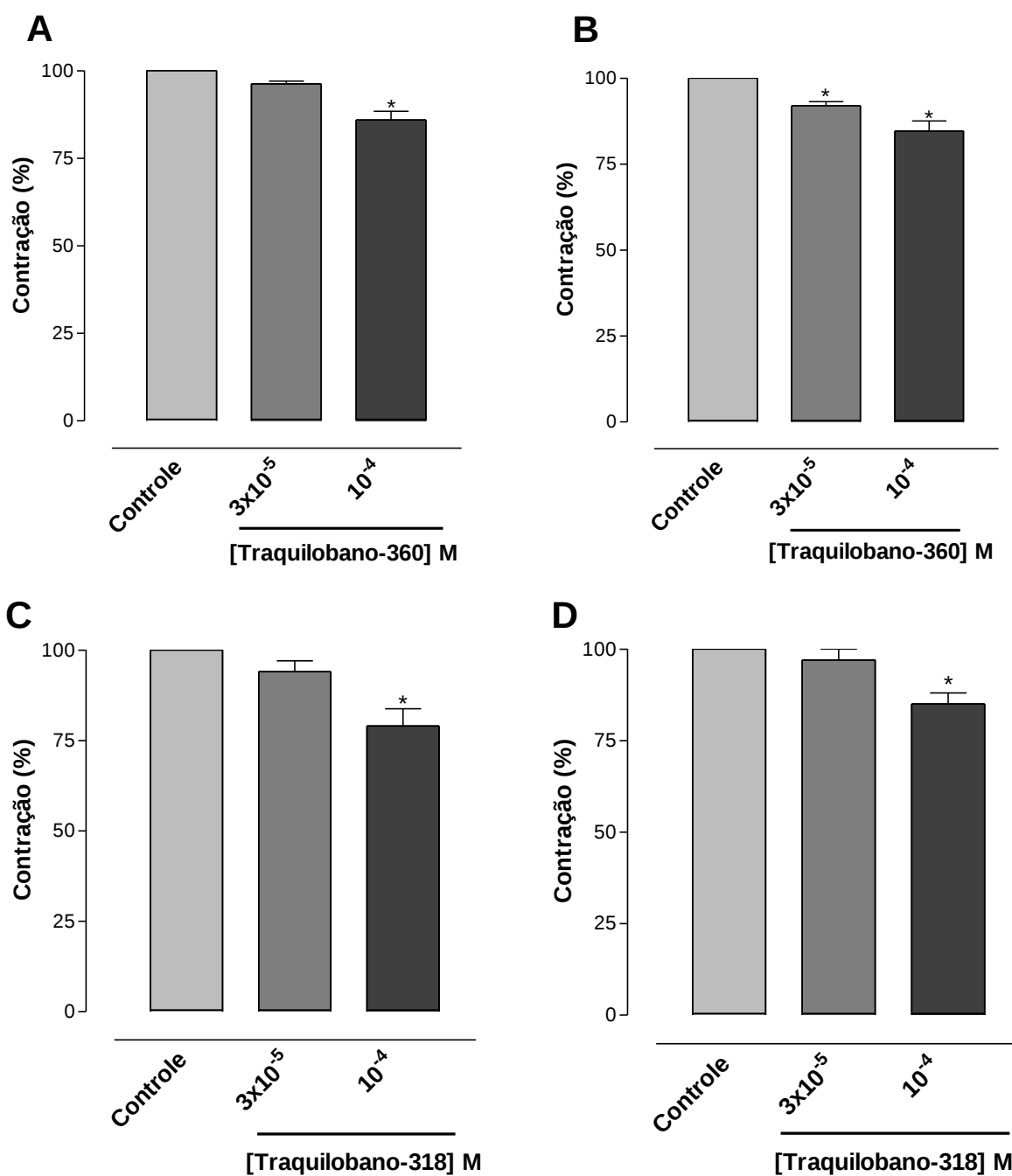


Gráfico 1 – Efeito do traquilobano-360 e traquilobano-318 frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (**A e C**) e de carbacol (**B e D**) em útero isolado de rata (n = 3). As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “one way” seguido por Bonferroni; * $p < 0,05$ (controle vs. traquilobano-360 ou traquilobano-318).

4.1.3 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre a fase tônica das contrações induzidas por carbacol em traquéia isolada de cobaia

Nas concentrações de 3×10^{-5} e 10^{-4} M, o traquilobano-360 não apresentou efeito espasmolítico significativo sobre anéis de traquéia, com e sem epitélio funcional, pré-contraídos por 10^{-6} M de carbacol ($n = 3$) (Figura 7A e 7B), entretanto, o traquilobano -318 (3×10^{-8} – 3×10^{-4} M) relaxou, de maneira significativa e dependente de concentração a traquéia de cobaia pré-contraída por 10^{-6} M de carbacol tanto na presença ($CE_{50} = 3,3 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M) como na ausência ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,9 \times 10^{-5}$ M) de epitélio funcional ($n = 5$) (Gráfico 2 e figura 8A e 8B), não mostrando diferença significativa entre as potências relaxantes.

O tempo médio para o traquilobano-318 atingir o seu E_{max} foi em média 120 min. A responsividade da traquéia ao carbacol foi restabelecida em média 60 min após a retirada do traquilobano-318 da cuba.

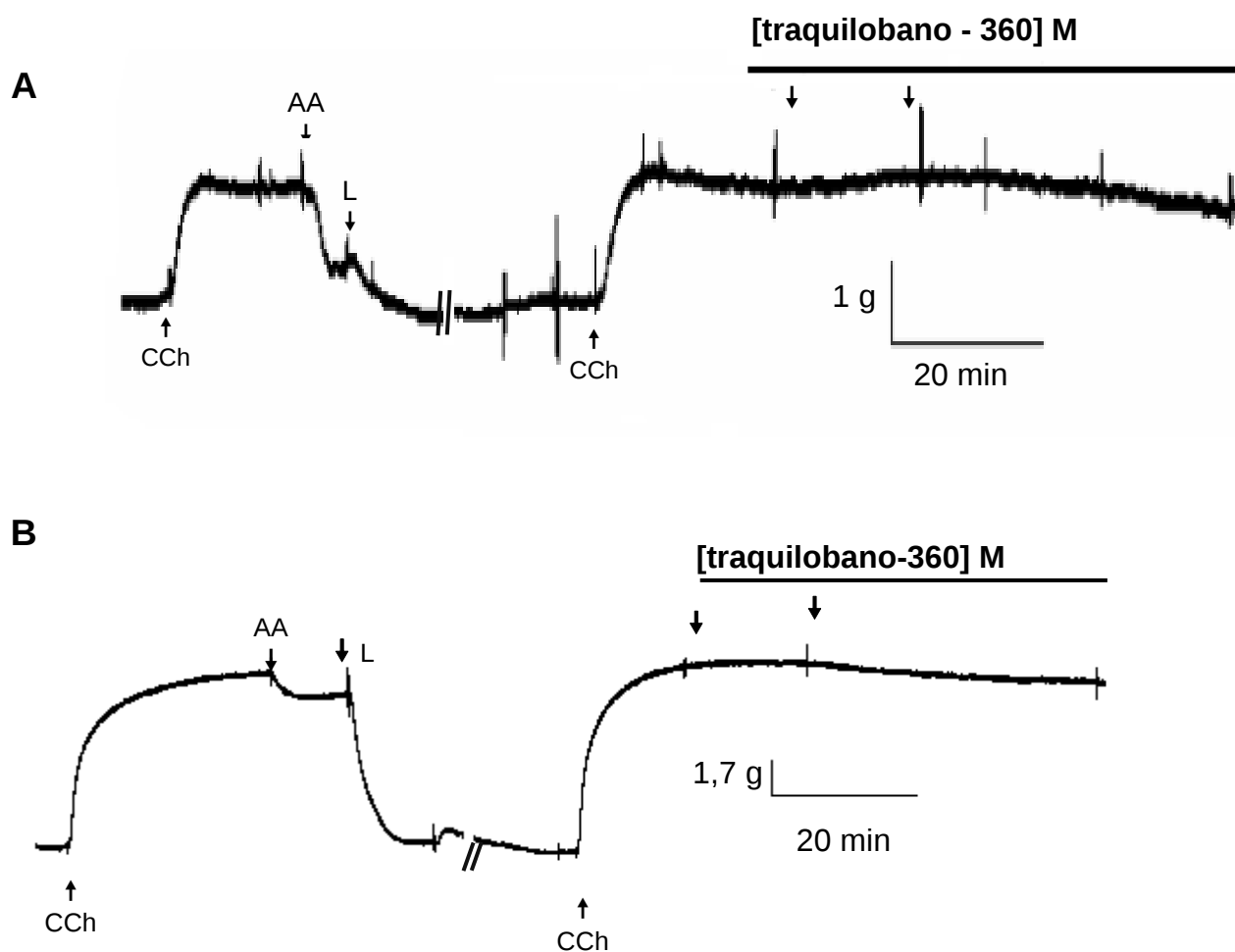


Figura 7 – Registros originais representativos do efeito do traquilobano-360 sobre a traquéia pré-contraída por carbacol (CCh) na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional (n = 3). L= lavagem. AA= ácido araquidônico. As setas para baixo indicam as concentrações de traquilobano-360 (3×10^{-5} e 10^{-4} M).

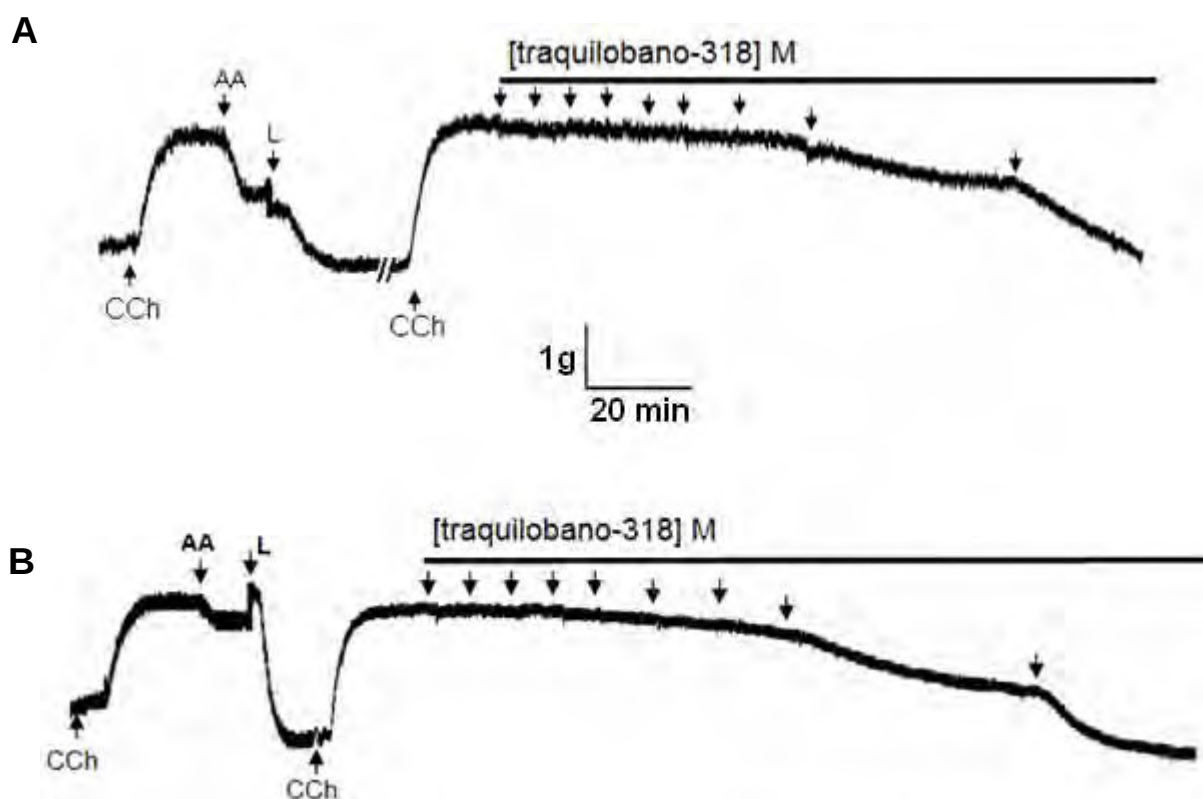


Figura 8 – Registros originais representativos do efeito do traquilobano-318 sobre a traquéia pré-contraída por carbacol (CCh) na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional (n = 5). L= lavagem. AA= ácido araquidônico. As setas para baixo indicam as concentrações de traquilobano-318 (3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M).

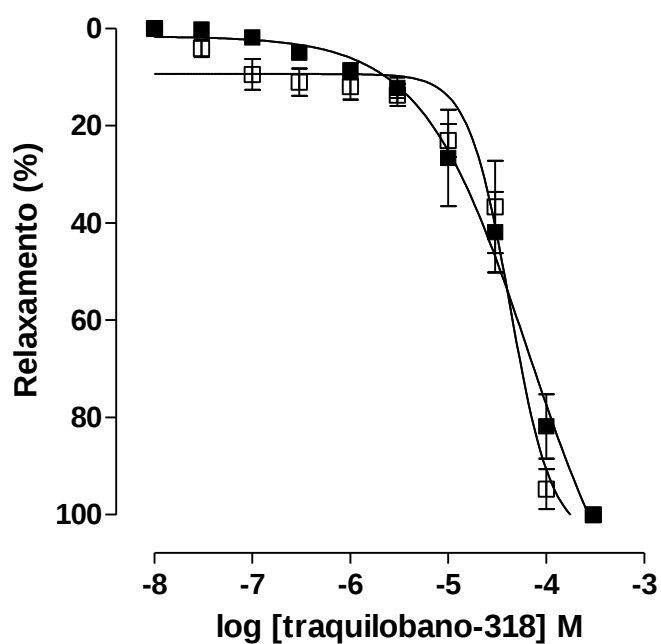


Gráfico 2 – Efeito do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol em anéis de traquéia com (■) e sem (□) epitélio funcional ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

4.1.4 Efeito do traquilobano-360 e de seu derivado traquilobano-318 frente às contrações fásicas induzidas por carbacol e histamina em Íleo isolado de cobaia

Tanto o traquilobano-360 (10^{-7} – 3×10^{-4} M) quanto seu derivado, traquilobano-318, antagonizaram as contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol e de histamina em íleo isolado de cobaia (Gráficos 3 e 4, n = 5) de maneira significativa e dependente de concentração. Os valores de CI_{50} para o traquilobano-360 e traquilobano-318 foram respectivamente de $2,4 \pm 0,4$ e $2,8 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M frente ao carbacol e $3,1 \pm 0,6$ e $3,8 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M frente à histamina.

A responsividade do íleo de cobaia aos agentes contráteis testados foi restabelecida em média 60 min após a retirada do traquilobano-360 ou do traquilobano-318 da cuba.

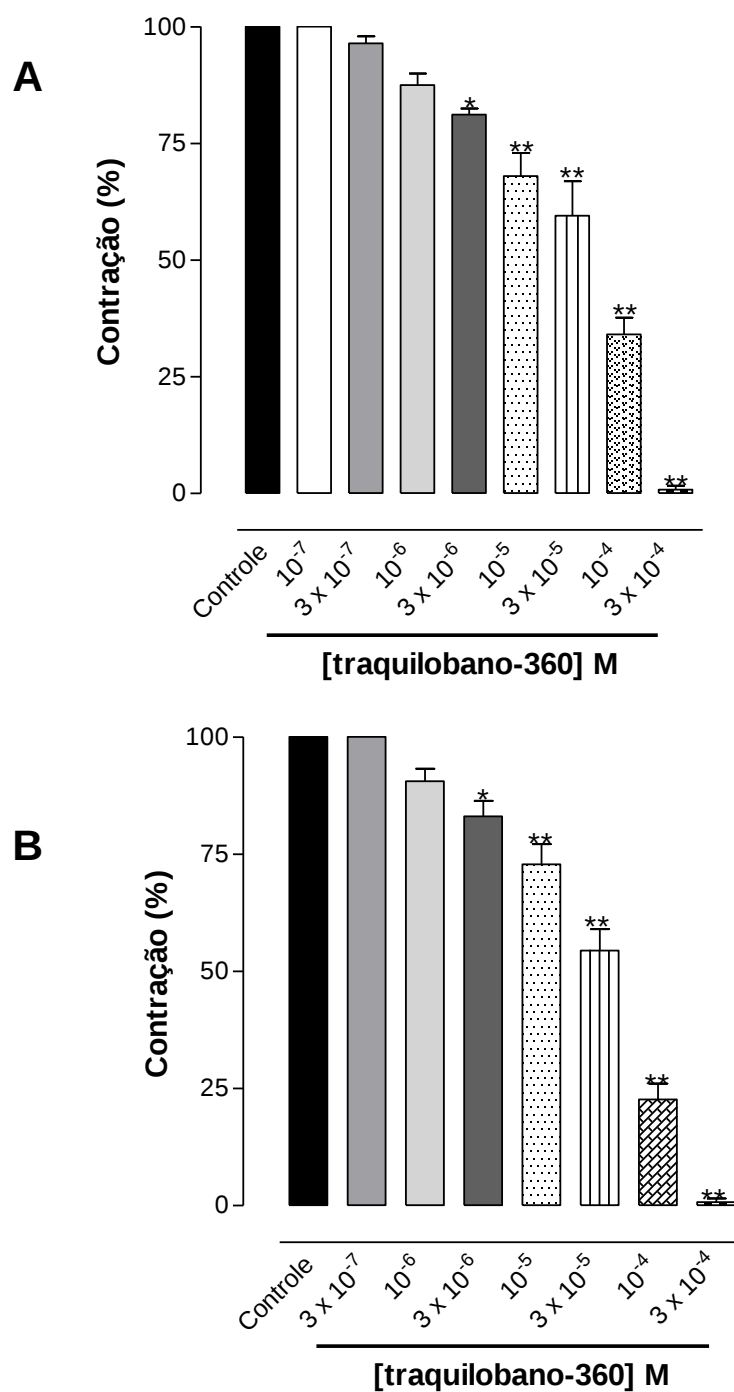


Gráfico 3 – Efeito do traquilobano-360 frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de carbachol (**A**) e de histamina (**B**) em íleo isolado de cobaia (n = 5). As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “one way” seguido por Bonferroni; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ (controle vs. traquilobano-360).

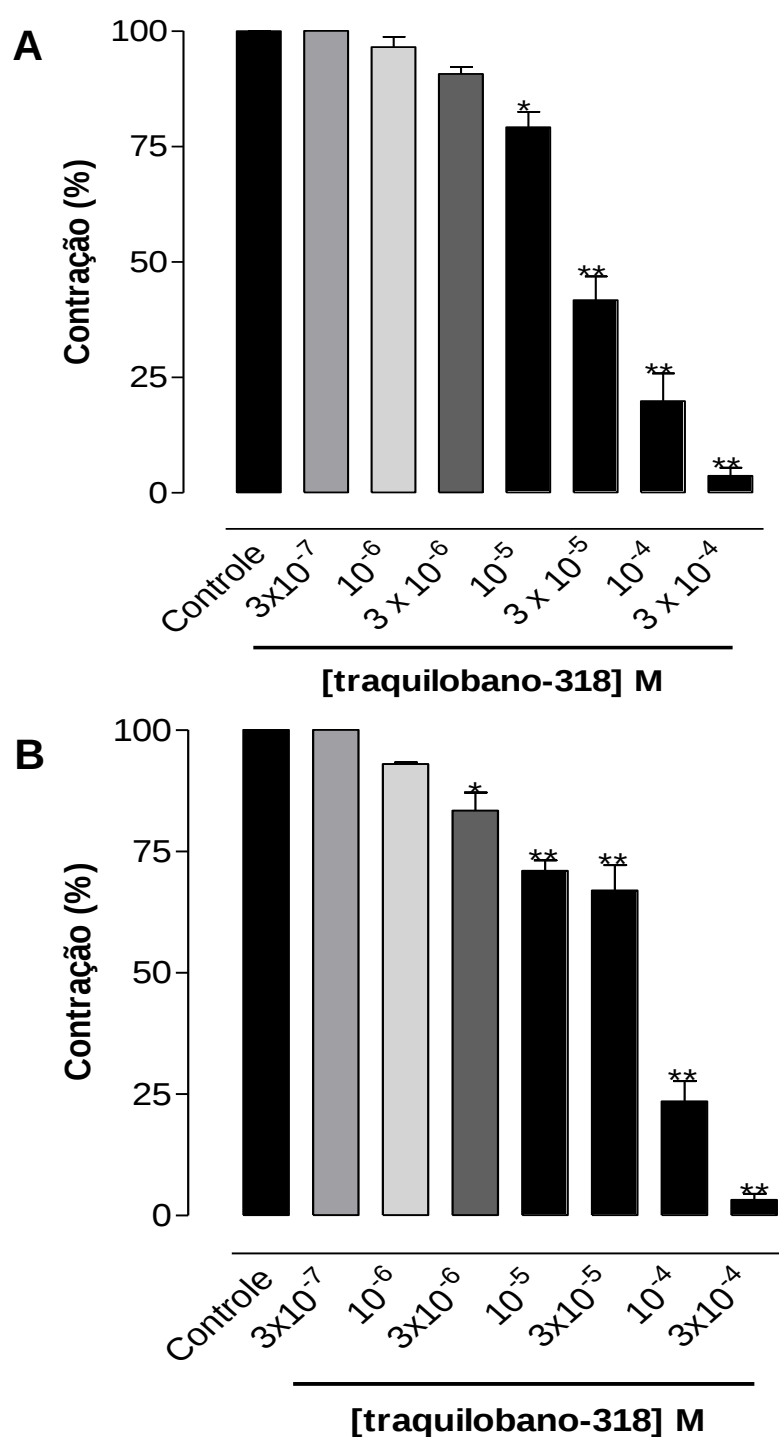


Gráfico 4 – Efeito do traquilobano-318 frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol (A) e de histamina (B) em íleo isolado de cobaia (n = 5). As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “one way” seguido por Bonferroni; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ (controle vs. traquilobano-318).

4.2 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ESPASMOLÍTICA DO TRAQUILOBANO-360 E DE SEU DERIVADO TRAQUILOBANO-318 EM ÍLEO ISOLADO DE COBAIA

4.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por histamina

O traquilobano-360 (3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M) inibiu de maneira dependente de concentração ($r^2 = 0,9 \pm 0,02$), as contrações cumulativas induzidas por histamina com desvio da curva controle para a direita de maneira não paralela e com redução do $E_{\max}$ (Gráfico 5A). A análise do gráfico de Schild indica um antagonismo do tipo não competitivo exercido pelo traquilobano-360 que foi confirmado pelo valor de “slope” = $3,5 \pm 0,9$ que diferiu da unidade. A potência do traquilobano-360 foi determinada pelo valor de $pD'_2 = 4,1 \pm 0,3$. Da mesma forma o traquilobano-318 (3×10^{-5} ; 10^{-4} e 3×10^{-4} M) inibiu de maneira dependente de concentração ($r^2 = 0,94 \pm 0,02$), as contrações cumulativas induzidas por histamina com desvio da curva controle para a direita de maneira não paralela e com redução do $E_{\max}$ (Gráfico 5B). A análise do gráfico de Schild indica um antagonismo do tipo não competitivo exercido pelo traquilobano-318 que foi confirmado pelo valor de “slope” = $4,4 \pm 0,7$ que diferiu da unidade. A potência do traquilobano-318 foi determinada pelo valor de $pD'_2 = 4,7 \pm 0,06$.

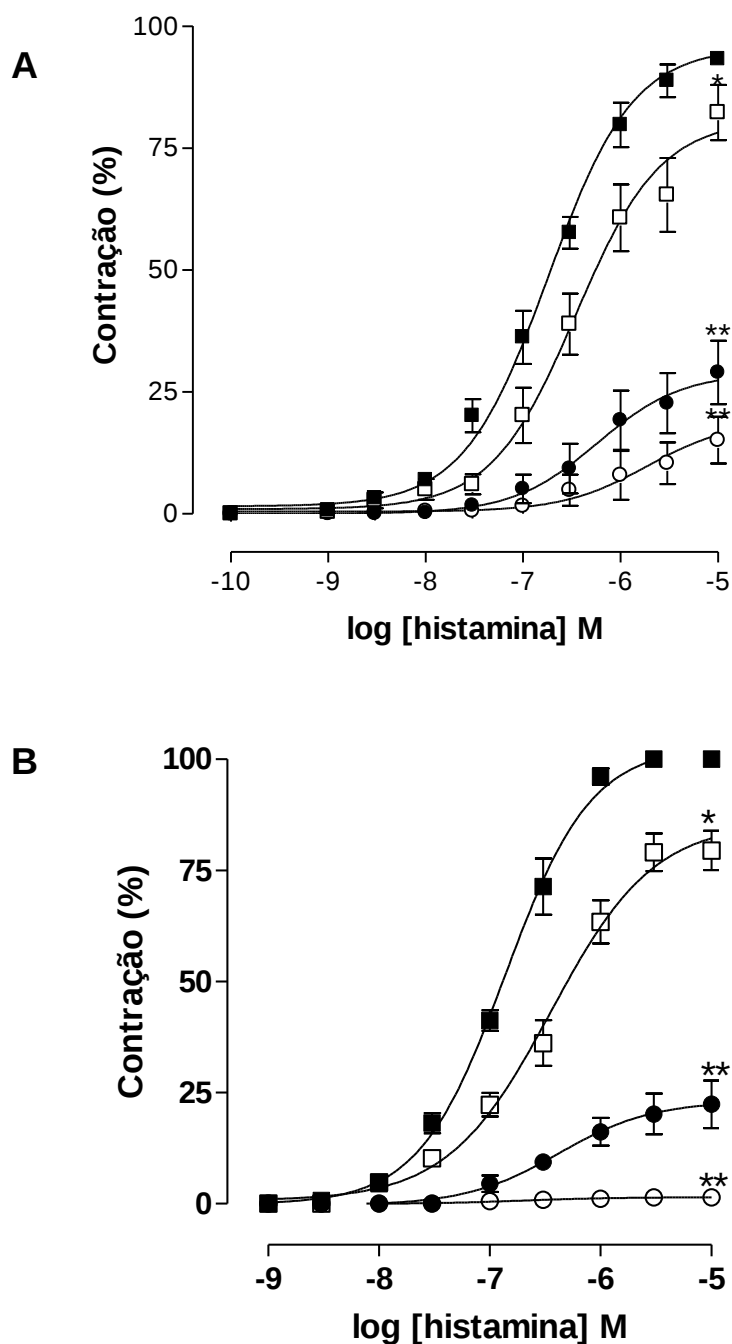


Gráfico 5 – Curvas concentrações-resposta cumulativas à histamina na ausência (■) e na presença de traquilobano-360 (**A**) ou traquilobano-318 (**B**): 3×10^{-5} (□), 10^{-4} (●) e 3×10^{-4} M (○) em íleo isolado de cobaia ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way” seguido por Bonferroni; $*p < 0,05$ e $**p < 0,001$ (controle vs. traquilobano-360 ou traquilobano-318).

4.2.2 Efeito traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por carbacol ou por histamina em íleo isolado de cobaia

Tanto o traquilobano-360 (Figura 9) como o seu derivado traquilobano-318 (Figura 10) ($n = 5$) relaxaram de maneira significativa e dependente de concentração (Gráfico 6A e B) o íleo de cobaia pré-contraído com 40 mM de KCl ($CE_{50} = 1,1 \pm 0,0,2$ e $1,4 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ M, respectivamente), com 10^{-6} M de carbacol ($CE_{50} = 1,4 \pm 0,3$ e $1,3 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ M, respectivamente) e de histamina ($CE_{50} = 1,5 \pm 0,3$; e $0,1 \pm 0,01 \times 10^{-5}$ M, respectivamente). O tempo médio para o traquilobano-360 atingir o seu E_{max} foi em torno de 60 min. para as preparações pré-contraídas com KCl, carbacol ou histamina, respectivamente e para seu derivado traquilobano-318 foi de 113, 55 e 52 min respectivamente.

A responsividade do íleo de cobaia aos agentes contráteis testados foi restabelecida em média 60 min após a retirada do traquilobano-360 ou do traquilobano-318 da cuba.

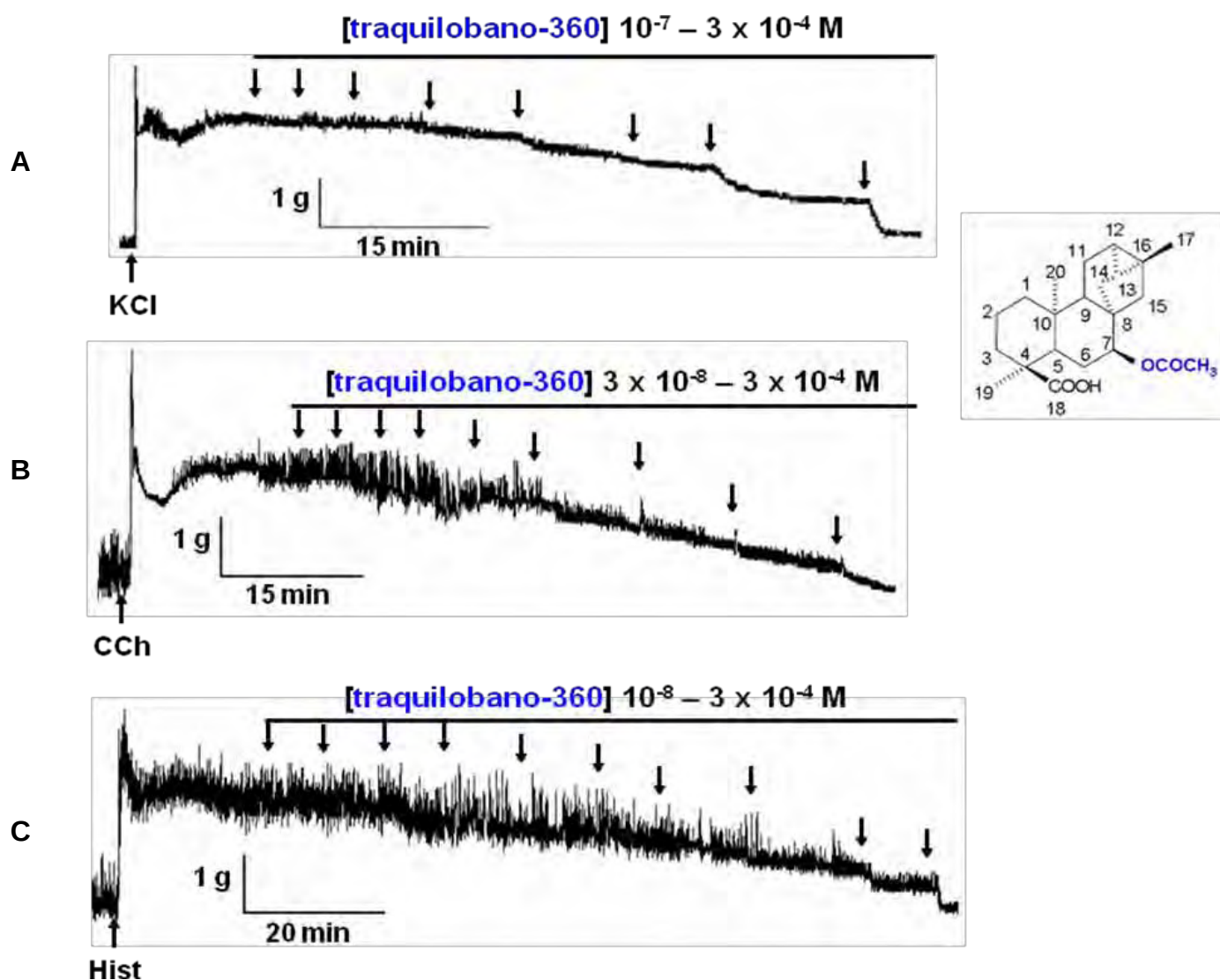


Figura 9 – Registros originais do efeito relaxante do traquilobano-360 sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (**A**), 10^{-6} M de carbacol (**B**) e histamina (**C**) em íleo isolado de cobaia. As setas para baixo representam as concentrações cumulativas (10^{-8} - 3×10^{-4} M, respectivamente) do traquilobano-360.

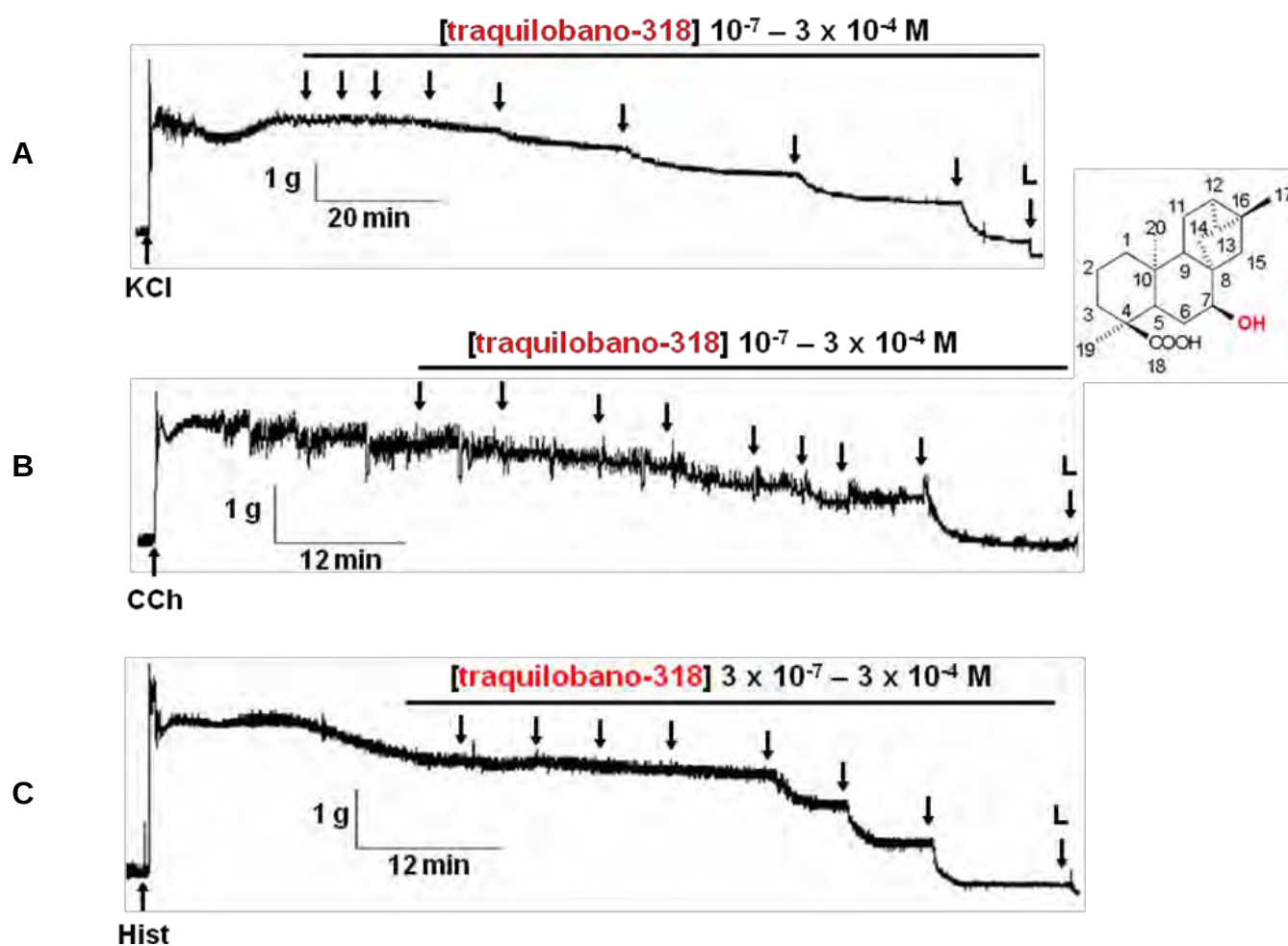


Figura 10 – Registros originais do efeito relaxante do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (**A**), 10^{-6} M de carbacol (**B**) e histamina (**C**) em íleo isolado de cobaia. As setas para baixo representam as concentrações cumulativas (10^{-8} - 3×10^{-4} M, respectivamente) do traquilobano-318.

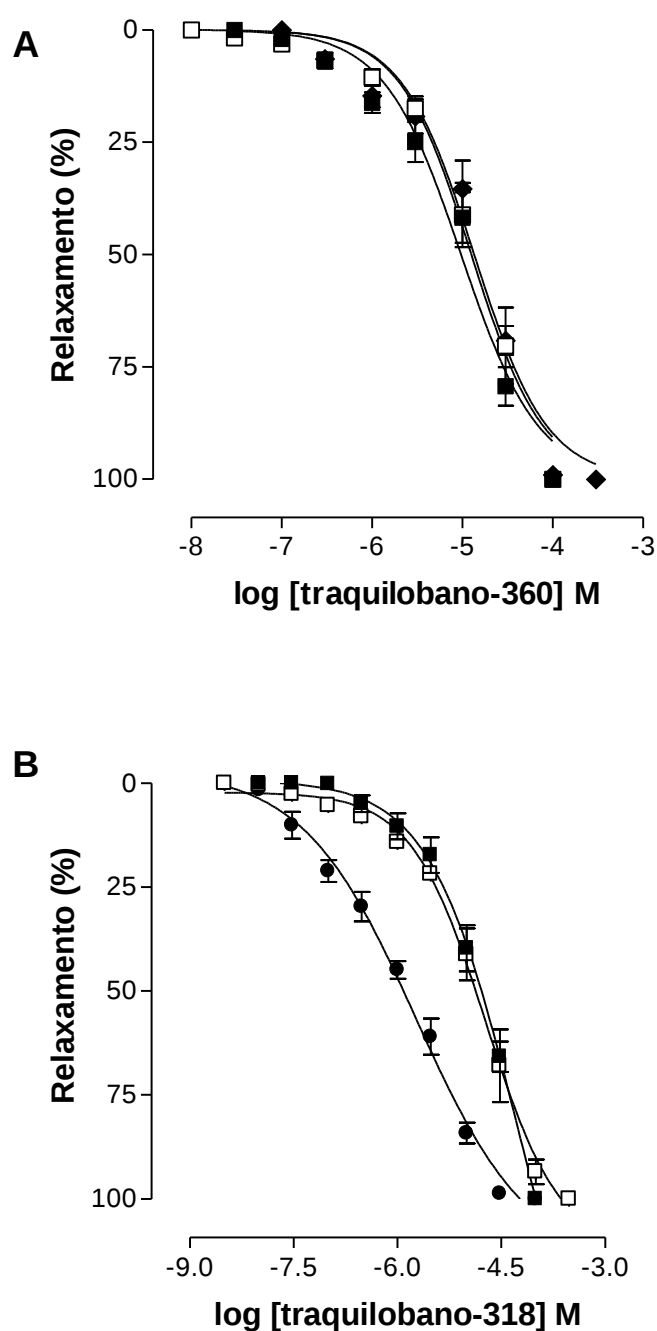


Gráfico 6 – Efeito do traquilobano-360 (**A**) ou traquilobano-318 (**B**) sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (■) e por 10^{-6} M de carbacol (□) e de histamina (●) em íleo isolado de cobaia (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

4.2.3 Efeito do traquilobano-360 e de derivados traquilobano-318 frente às contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+}

O Traquilobano-360 e seu derivado traquilobano-318 inibiram de forma dependente de concentração as contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} . As curvas cumulativas ao CaCl_2 foram desviadas para direita de forma não paralela e com inibição do efeito máximo, ou seja, por antagonismo não competitivo (Gráficos 7A e 7B). Os valores da inclinação do gráfico de Schild foram de $2,79 \pm 0,62$ e $3,5 \pm 0,36$, para o traquilobano-360 e traquilobano-318, respectivamente.

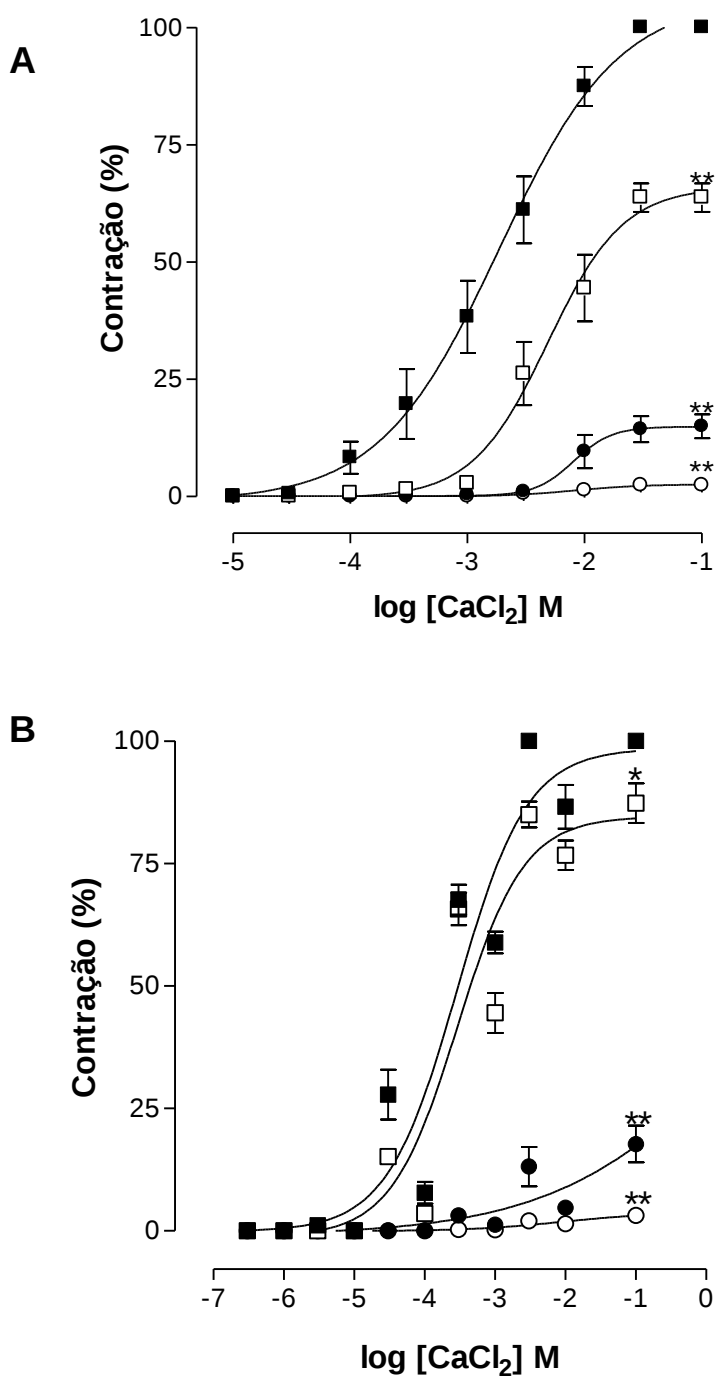


Gráfico 7 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl₂ em meio despolarizante nominalmente sem Ca²⁺ na ausência (■) e na presença de traquilobano-360 (**A**) ou traquilobano-318 (**B**): 3 × 10⁻⁵ (□), 10⁻⁴ (●) e 3 × 10⁻⁴ M (○) em íleo de cobraia (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way” seguido por Bonferroni; **p* < 0,05 (controle vs. traquilobano-318) e ***p* < 0,001 (controle vs. traquilobano-360 ou traquilobano-318).

4.2.4 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644

A adição cumulativa de traquilobano-360 ($10^{-7} - 3 \times 10^{-4}$ M) durante o componente tônico da contração induzida por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644, um agonista de canal de cálcio do tipo di-hidropiridina, resultou em um relaxamento dependente de concentração (Gráfico 8A). Este efeito relaxante do traquilobano-360 ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M, $n = 5$) foi três vezes menos potente comparado com seu efeito quando a contração era induzida por 40 mM de KCl ($CE_{50} = 1,1 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ M).

Assim como traquilobano-360, seu derivado traquilobano-318 (10^{-7} - 3×10^{-4} M) ($n = 3$), relaxou de maneira significativa e dependente de concentração o íleo de cobaia (parcialmente despolarizado) pré-contraído com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (Gráfico 8B). Os valores de CE_{50} de traquilobano-318 ($CE_{50} = 5,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) foi cerca de 4 vezes maior quando comparado ao íleo pré-contraído com KCl ($CE_{50} = 1,4 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ M).

O tempo médio para o traquilobano-360 atingir o seu E_{max} foi de 60 min. para preparações pré-contraídas com S-(-)-Bay K8644 e para seu derivado traquilobano-318 foi em torno de 105 min respectivamente.

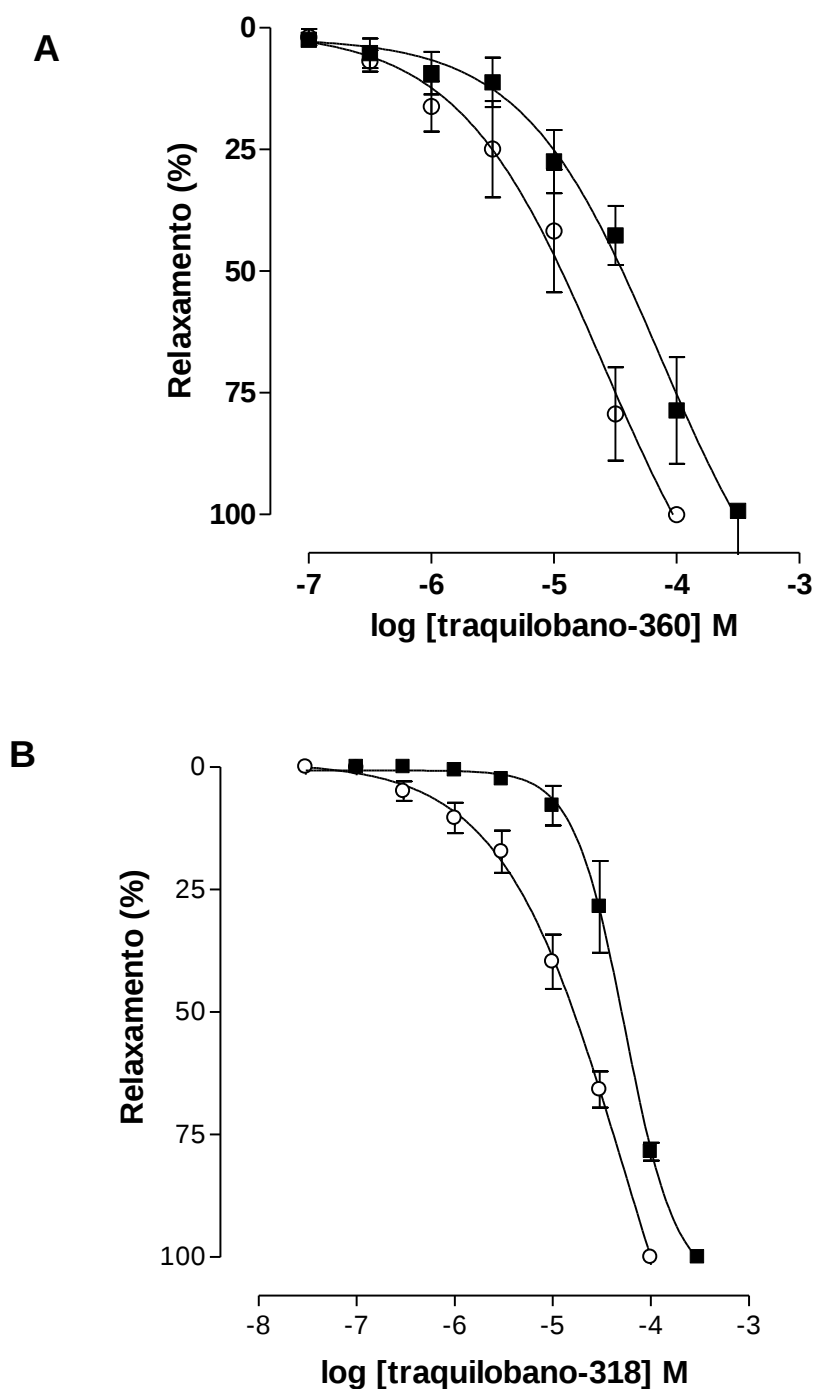


Gráfico 8 – Efeito de traquilobano-360 (**A**, $n=5$) e do traquilobano-318 (**B**, $n=3$) sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (■) e 40 mM de KCl (○) em íleo isolado de cobaia parcialmente despolarizado. Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

4.2.5 Avaliação da participação dos canais de potássio no efeito espasmolítico do traquilobano-360 e de seu derivado traquilobano-318

4.2.5.1 Efeito dos diterpenos sobre as contrações induzidas por histamina na ausência e na presença de TEA⁺ 5 mM

Tanto o traquilobano-360 quanto o seu derivado traquilobano-318 relaxaram ($CE_{50} = 0,5 \pm 0,04 \times 10^{-4}$ M e $2,0 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M, Figura 11B e 11D) o íleo de cobaia pré-contraído com histamina na presença de 5 mM de Tea⁺, um bloqueador não seletivo de canais para K⁺, porém com uma potência cerca de 3 e 20 vezes menor quando comparada ao relaxamento produzido por traquilobano-360 e traquilobano-318, respectivamente na ausência deste bloqueador ($CE_{50} = 1,5 \pm 0,3$ e $0,1 \pm 0,01 \times 10^{-5}$ M (Gráfico 11A e 11C).

O tempo médio para o traquilobano-360 atingir o seu E_{max} na presença de TEA⁺ 5 mM foi de 80 min. e para seu derivado traquilobano-318 foi de 125 min.

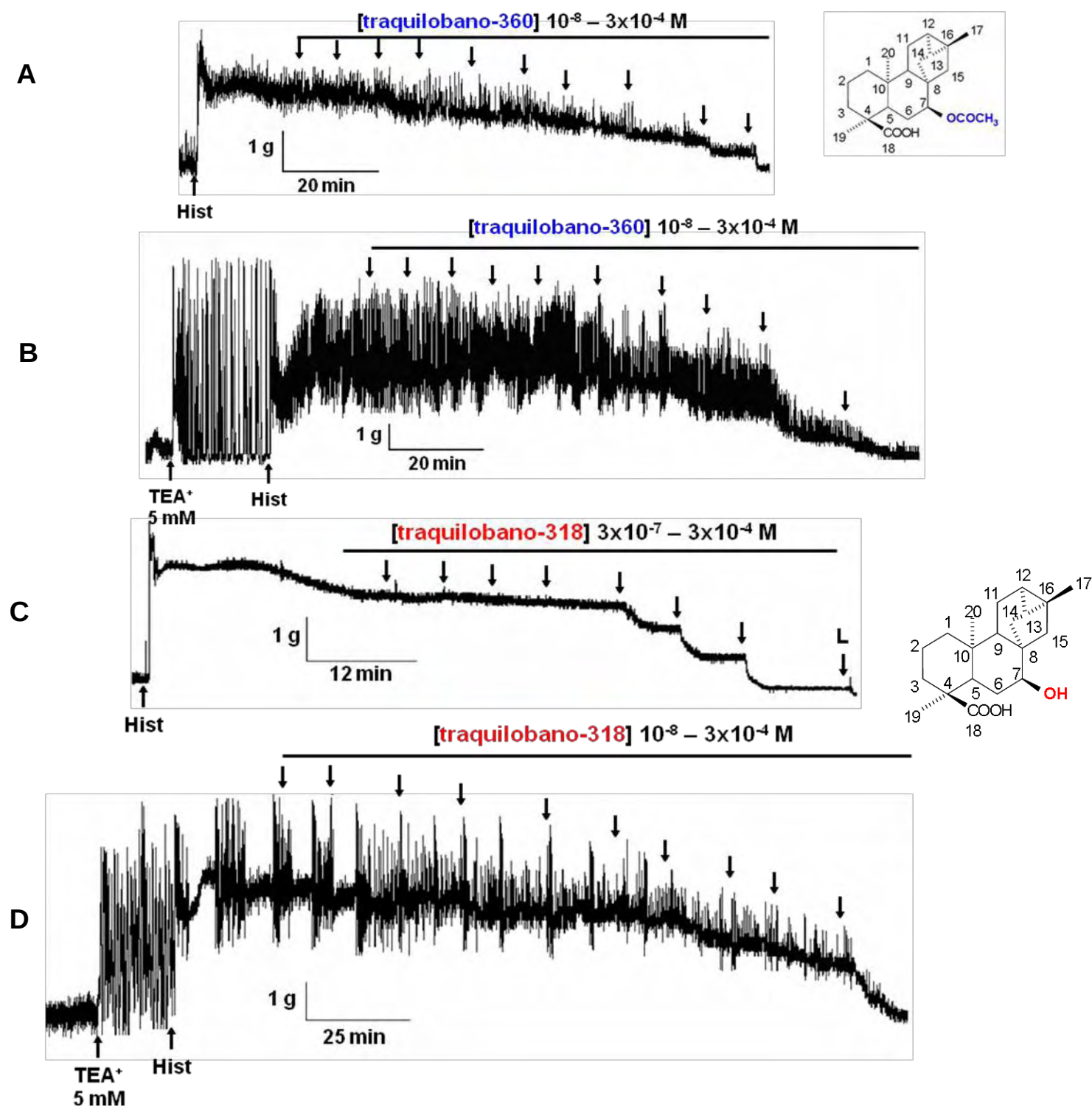


Figura 11 – Registros originais representativo do efeito do traquilobano-360 (**A e B**), e do traquilobano-318 (**C e D**) na ausência e presença de 5 mM de TEA⁺, respectivamente em íleo de cobaia (n = 5). As setas para baixo representam as concentrações dos diterpenos (M).

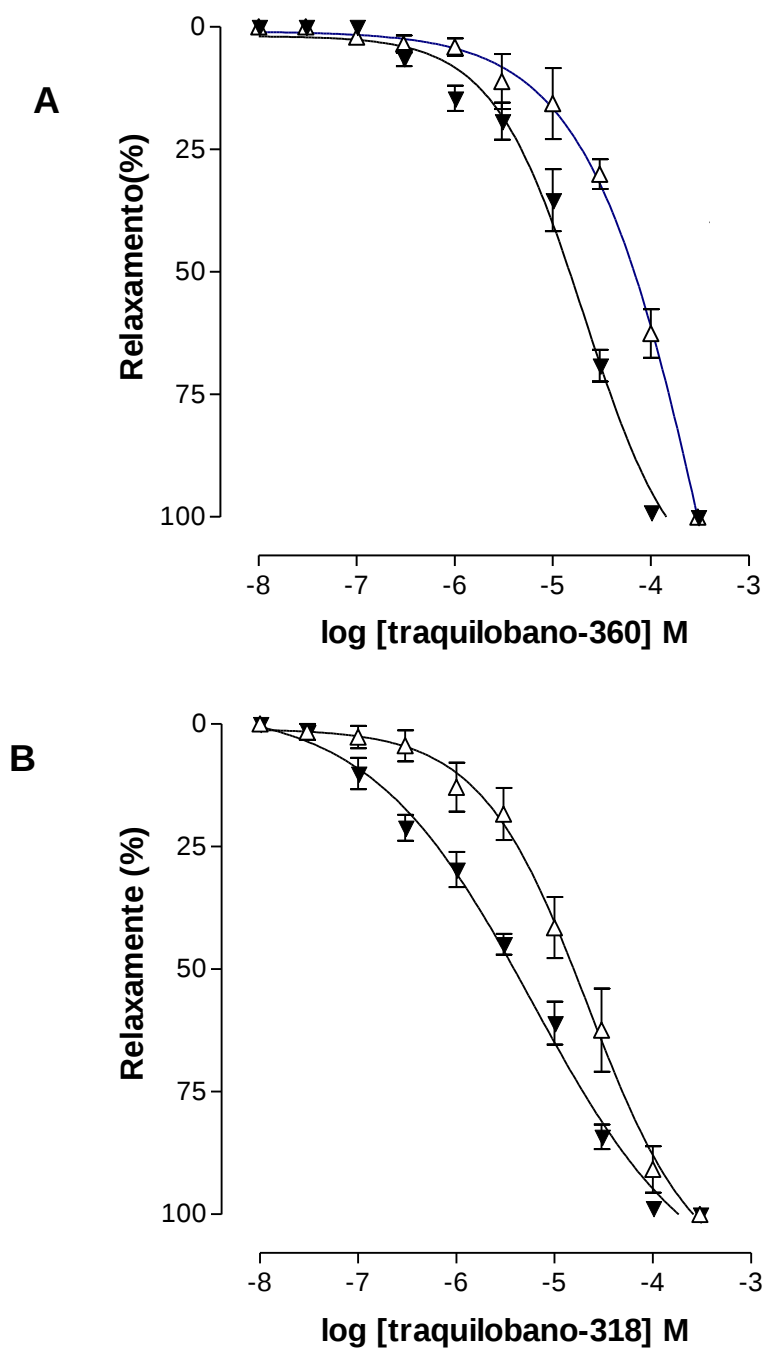


Gráfico 9 – Efeito de traquilobano-360 (**A**) e de traquilobano-360 (**B**) sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência ($\blacktriangledown$) e na presença ($\triangle$) de 5 mM de TEA^+ em íleo isolado de cobaia ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

4.2.5.2 Efeito do traquilobano-360 e de seu derivado traquilobano-318 sobre as contrações induzidas por histamina na ausência e na presença de glibenclamida, 4-AP, apamina, TEA⁺, ou iberiotoxina

A curva de relaxamento do traquilobano-360 ($n = 5$), com CE_{50} de $1,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M, não foi deslocada para direita na presença de 10^{-5} M de glibenclamida, bloqueador dos K_{ATP} , ($CE_{50} = 0,8 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M, Gráfico 10A); de 0,3 mM de 4-AP, bloqueador dos K_V , ($CE_{50} = 2,1 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M, Figura 12 e Gráfico 11A); de 100 nM de apamina, bloqueador dos SK_{Ca} , ($CE_{50} = 1,2 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M, Gráfico 12A), 1 mM de TEA⁺, bloqueador dos BK_{Ca} , ($CE_{50} = 1,9 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M, Gráfico 13A) ou de 97 nM de IbTx bloqueador dos BK_{Ca} , ($CE_{50} = 1,1 \pm 0,1 \times 10^{-5}$ M, Gráfico 14A). Já a curva de relaxamento do traquilobano-318 ($n = 5$), com CE_{50} de $0,1 \pm 0,01 \times 10^{-5}$ M, foi deslocada para direita na presença de 10^{-5} M de glibenclamida ($CE_{50} = 1,1 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M, Figura 12 e Gráfico 10B); de 0,3 mM de 4-AP ($CE_{50} = 0,7 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ M, Figura 13 e Gráfico 11B) e de 100 nM de apamina ($CE_{50} = 0,7 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ M, Figura 14 e Gráfico 12B). A curva de relaxamento do traquilobano-318 não foi alterada nem na presença de 1 mM de TEA⁺ ($CE_{50} = 0,4 \pm 0,1 \times 10^{-5}$ M, Gráfico 13B) como na presença de 97 nM de IbTx ($CE_{50} = 0,2 \pm 0,07 \times 10^{-5}$ M, Gráfico 14B).

O tempo médio para o traquilobano-318 atingir o seu E_{max} na presença de glibenclamida, 4-AP e apamina foi de 112,5; 120 e 110 min., respectivamente.

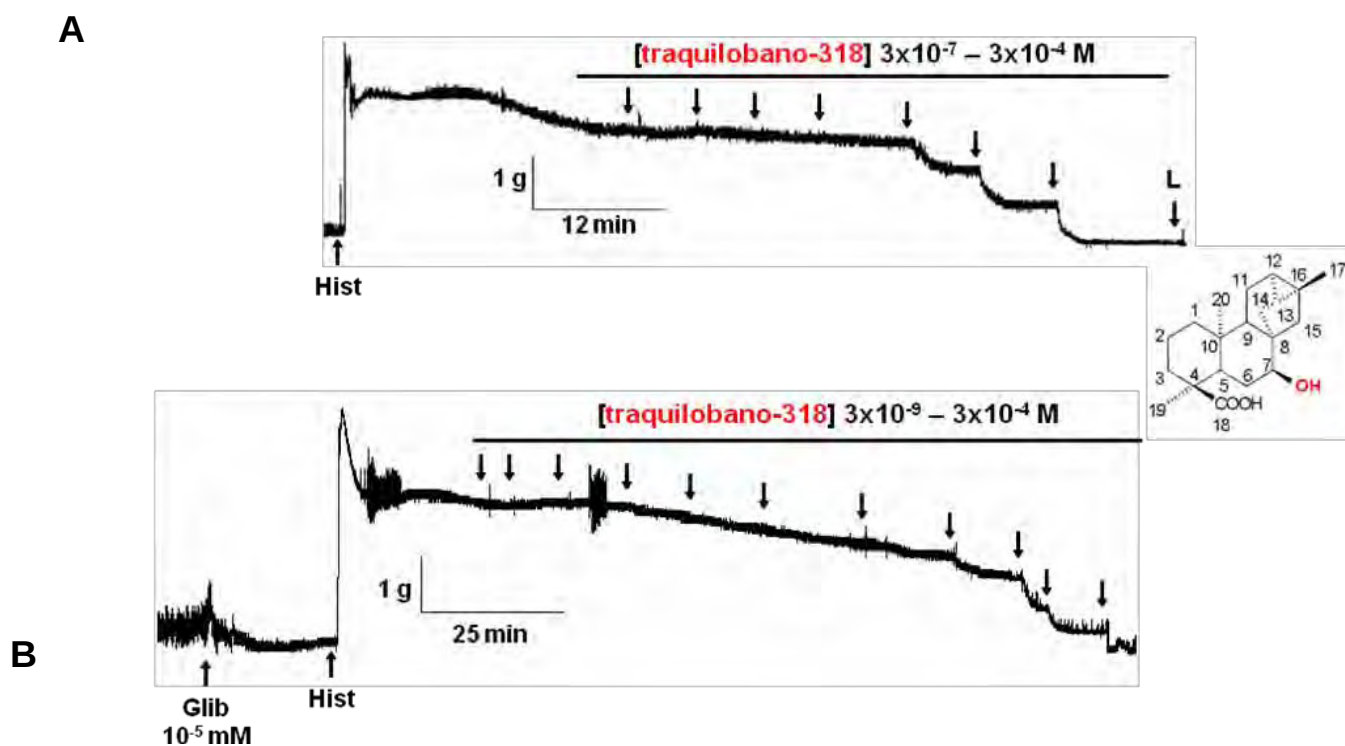


Figura 12 – Registro original representativo do efeito do traquilobano-318 na ausência (**A**, 10^{-7} – 10^{-4} M) e presença (**B**, 3×10^{-9} – 3×10^{-4} M) de glibenclamida em íleo de cobaia ($n = 5$). As setas para baixo representam as concentrações do traquilobano-318 em molar.

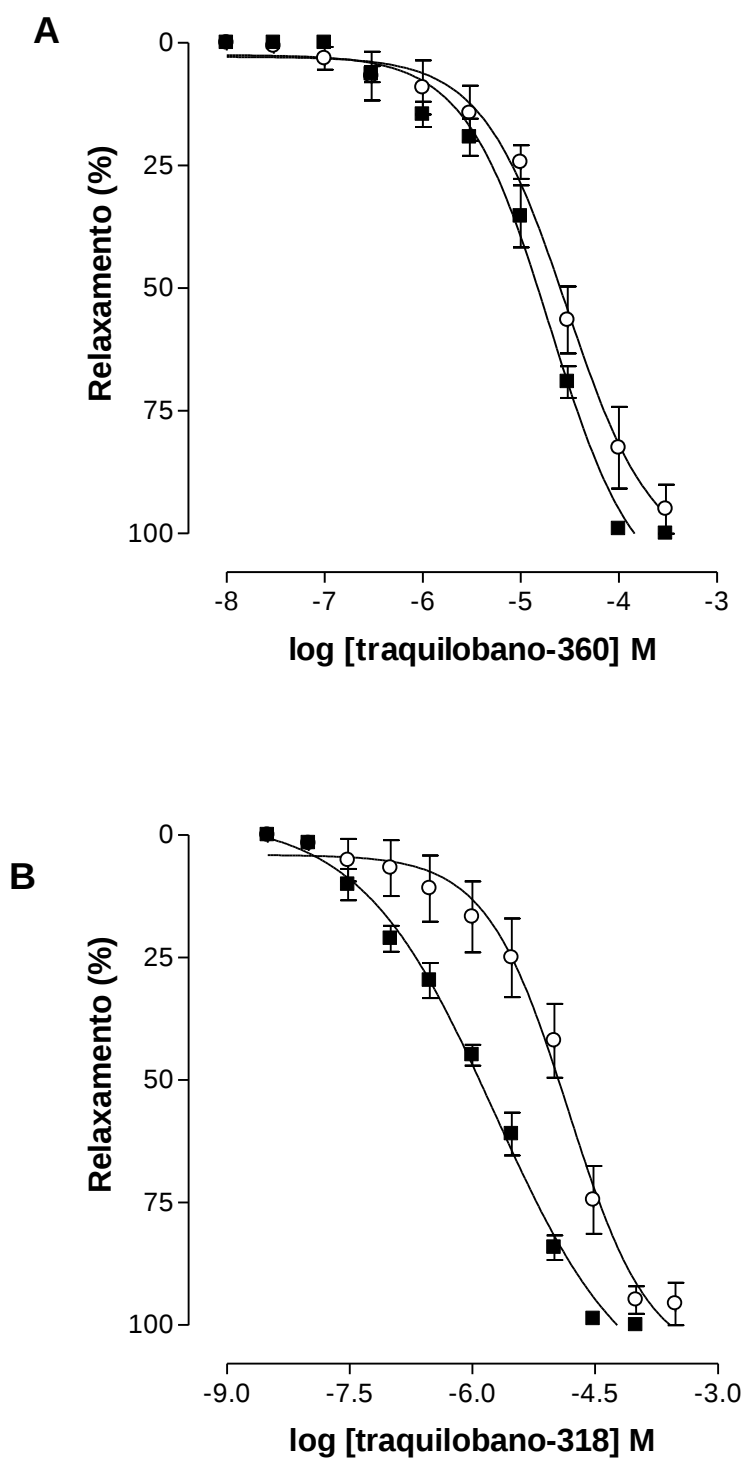


Gráfico 10 – Efeito da traquilobano-360 (**A**) e de traquilobano-318 (**B**) sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (○) de 10^{-5} M de glibenclamida, em íleo isolado de cobaia ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

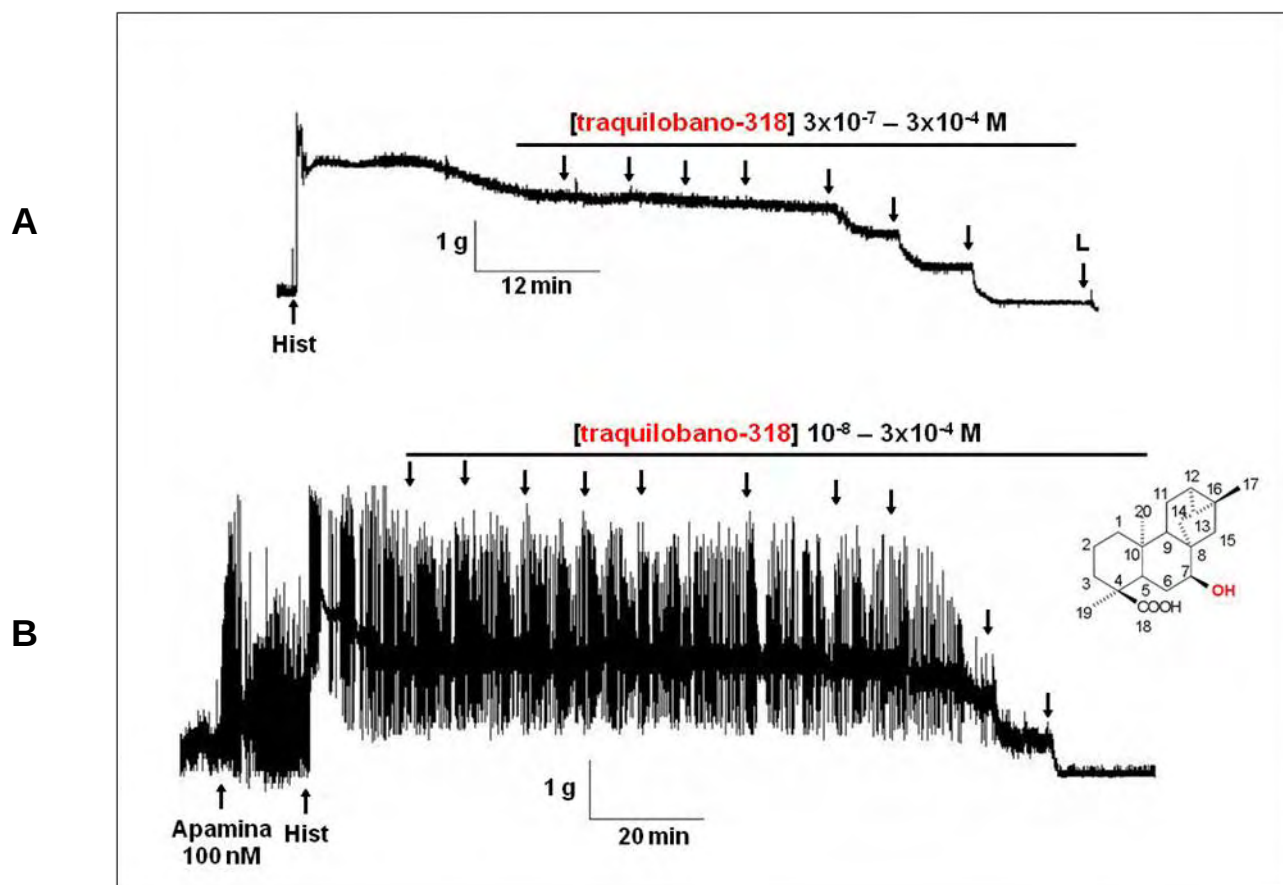


Figura 13 – Registro original representativo do efeito do traquilobano-318 na ausência (**A**, $10^{-7} - 10^{-4}$ M) e presença (**B**, $10^{-8} - 3 \times 10^{-4}$ M) de 4-AP em íleo de cobaia ($n = 5$). As setas para baixo representam as concentrações do traquilobano-318 em molar.

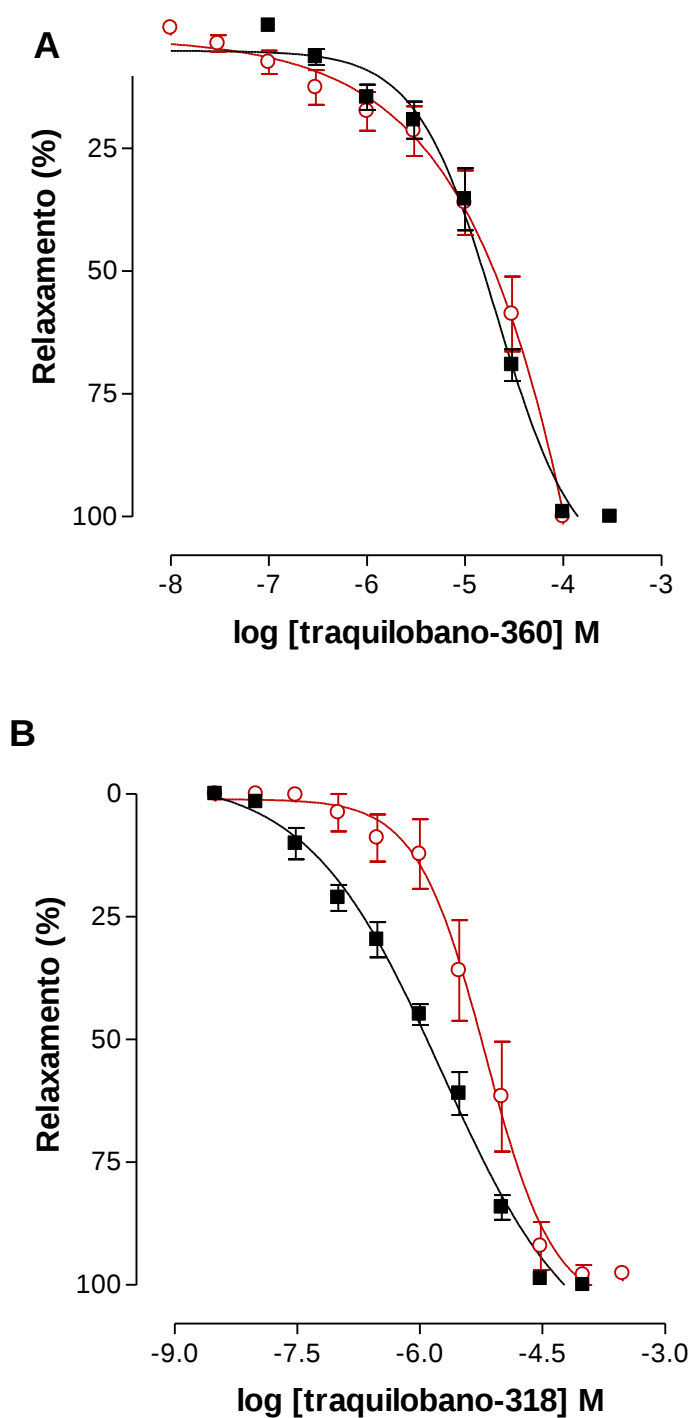


Gráfico 11 – Efeito da traquilobano-360 (**A**) e de traquilobano-318 (**B**) sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (○) de 0,3 mM de 4-AP, em íleo isolado de cobaia (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

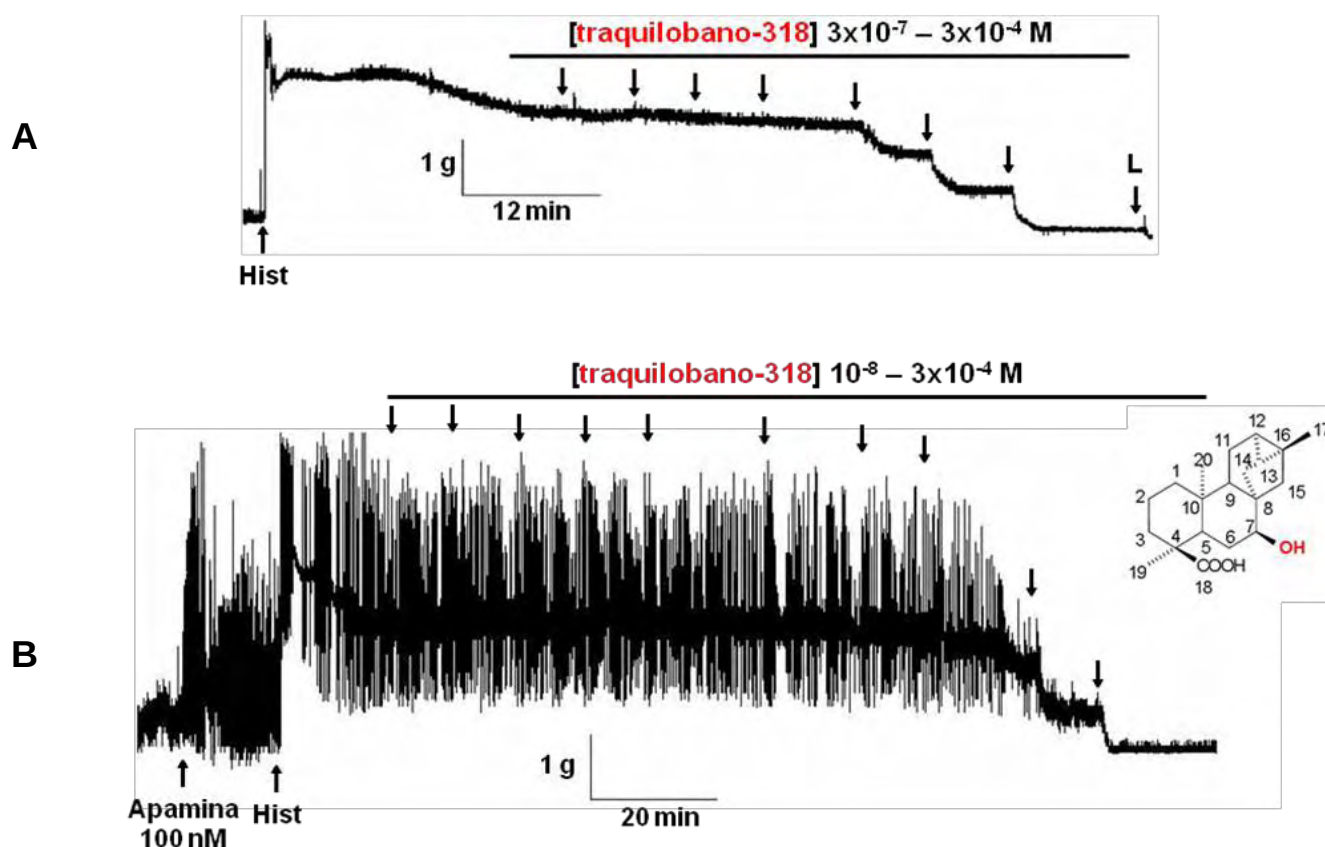


Figura 14 – Registro original representativo do efeito do traquilobano-318 na ausência (**A**, 10^{-7} – 10^{-4} M) e presença (**B**, 10^{-8} – 3×10^{-4} M) de apamina em óleo de cobaia ($n = 5$). As setas para baixo representam as concentrações do traquilobano-318 em molar.

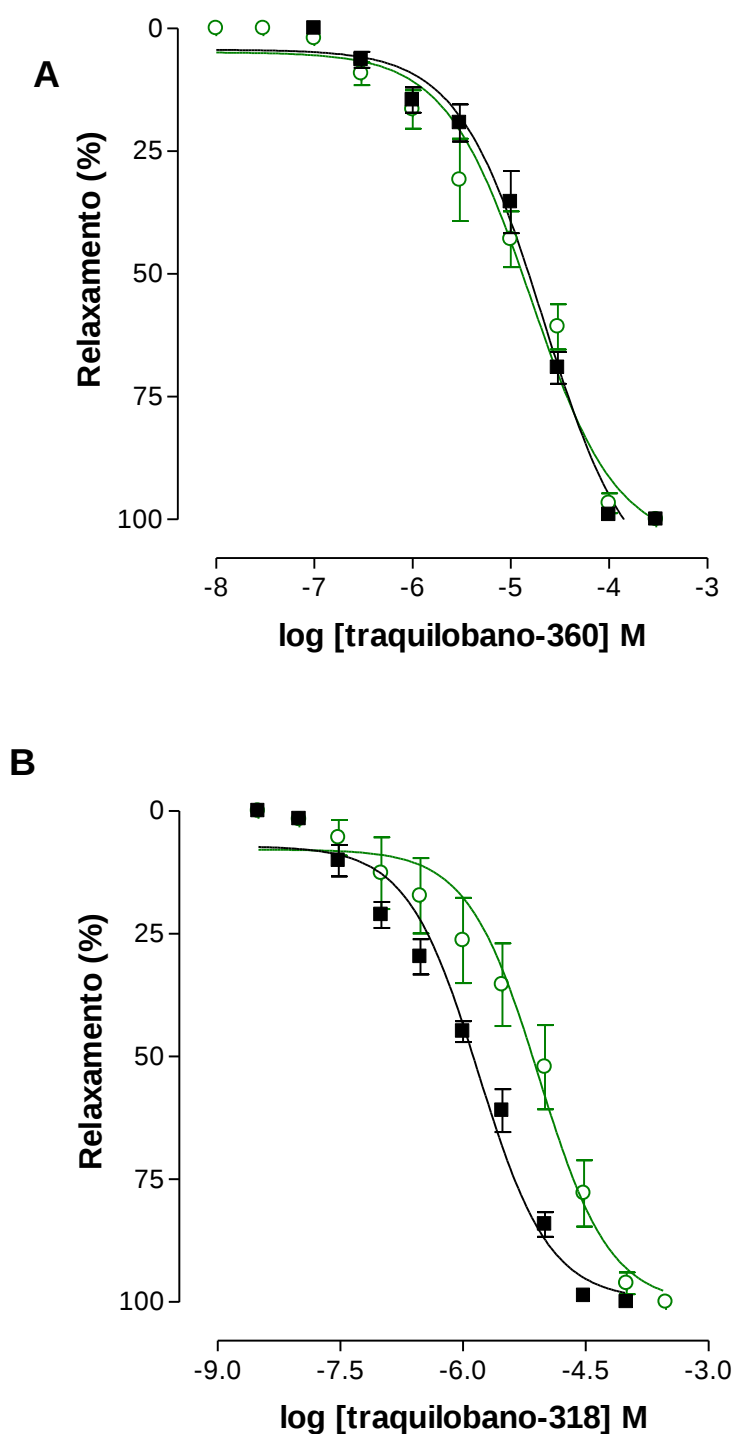


Gráfico 12 – Efeito da traquilobano-360 (**A**) e de traquilobano-318 (**B**) sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (○) de 100 nM de apamina, em íleo isolado de cobaia (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

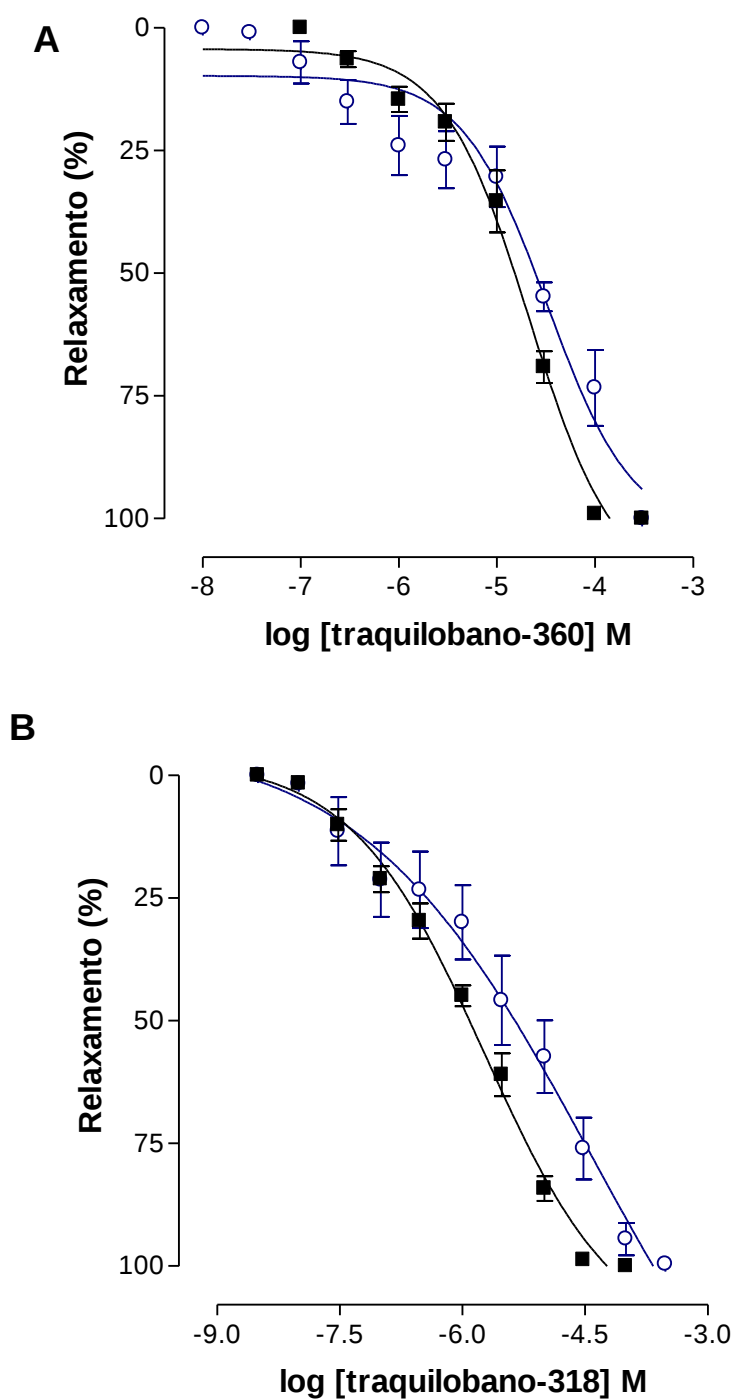


Gráfico 13 – Efeito da traquilobano-360 (**A**) e de traquilobano-318 (**B**) sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (○) de 1,0 mM de TEA^+ , em íleo isolado de cobaia ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

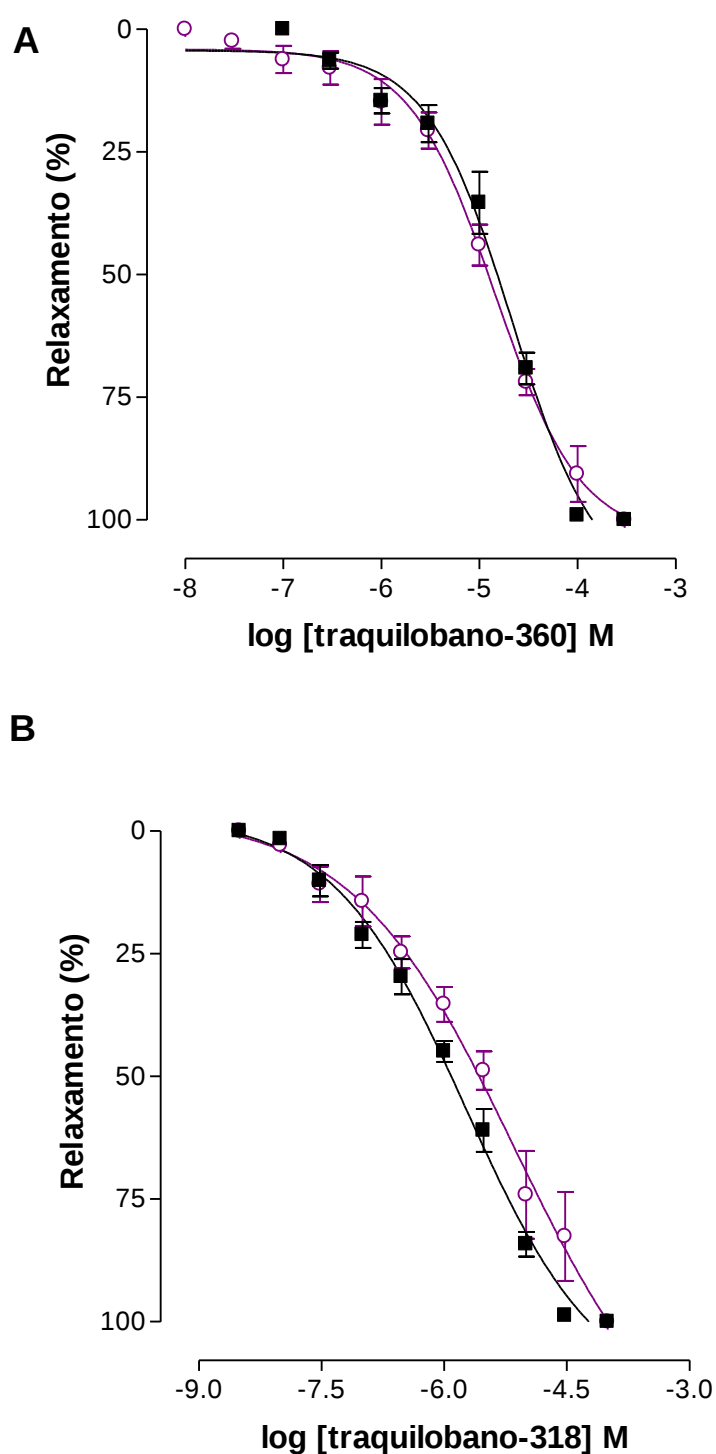


Gráfico 14 – Efeito da traquilobano-360 (**A**) e de traquilobano-318 (**B**) sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (○) de 97 nM de iberitoxina, em íleo isolado de cobaia (n = 4). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

4.2.6 Avaliação da participação da via de sinalização das PDE/nucleotídeos cíclicos no efeito espasmolítico do traquilobano-360 e do traquilobano-318

4.2.6.1 Efeito de traquilobano-360 e traquilobano-318 sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de aminofilina

Tanto a curva de relaxamento do traquilobano-360 (n = 5) (Gráficos 15A e 15B) com CE_{50} de $1,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M, como a curva de relaxamento do traquilobano-318 com CE_{50} de $0,1 \pm 0,01 \times 10^{-5}$ M, não foram alteradas significativamente na presença de aminofilina, um bloqueador não seletivo das fosfodiesterases.

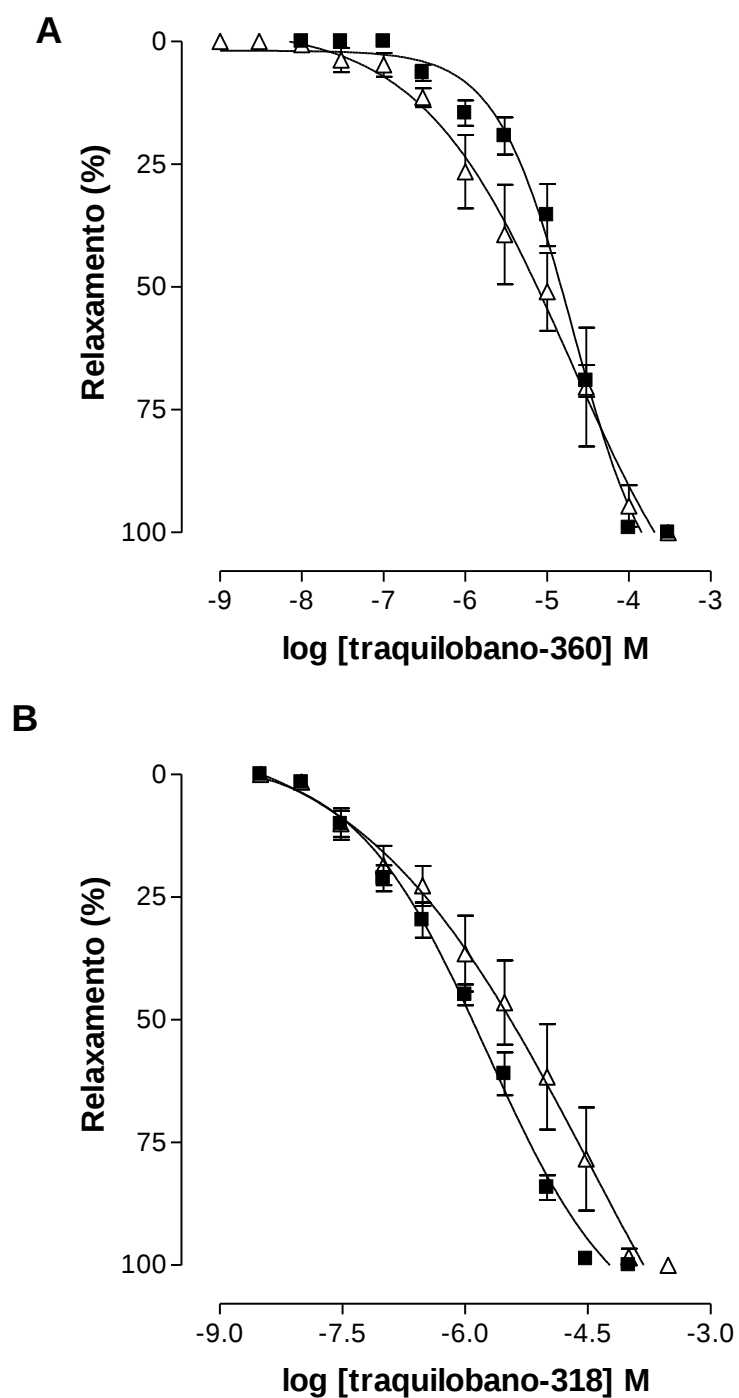


Gráfico 15 – Efeito da traquilobano-360 (A) e de traquilobano-318 (B) sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (△) de aminofilina, em íleo isolado de cobaia (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

4.2.7 Efeito dos diterpenos sobre a concentração citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) em miócitos da camada longitudinal do íleo isolado de cobaia

4.2.7.1 Efeito do traquilobano-360 e do traquilobano-318 sobre a $[\text{Ca}^{2+}]_c$

A figura 15 mostra a intensidade de fluorescência do Ca^{2+} citosólico marcado com fluo-4 em miócitos de cultura da camada longitudinal de íleo de cobaia. A histamina (10^{-6} M) induziu um aumento bifásico de fluorescência, onde o pico máximo de fluorescência ocorreu em 20 s de exposição das células à histamina, com uma queda da fluorescência que se mantém elevada durante todo o tempo de duração da estimulação (180 s) (Figura 15A). Após a estabilização do aumento da fluorescência induzida por histamina (10^{-6} M), o traquilobano-360 (3×10^{-5} M) diminuiu a intensidade de fluorescência ($26,6 \pm 14,3\%$) nos primeiros 10 s de exposição das células ao diterpeno, mantendo essa redução ($36,2 \pm 13,8\%$) durante todo tempo de observação, indicando assim uma diminuição significativa na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ em miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia (Figura 15B e Gráfico 16A) da mesma forma o traquilobano-318 (3×10^{-5} M) diminuiu a intensidade de fluorescência ($56,6 \pm 11,7\%$) nos primeiros 10 s de exposição das células ao diterpeno, mantendo essa redução ($69,3 \pm 7,9\%$) durante todo tempo de observação, indicando assim uma diminuição significativa na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ em miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia (Figura 14C e Gráfico 16B).

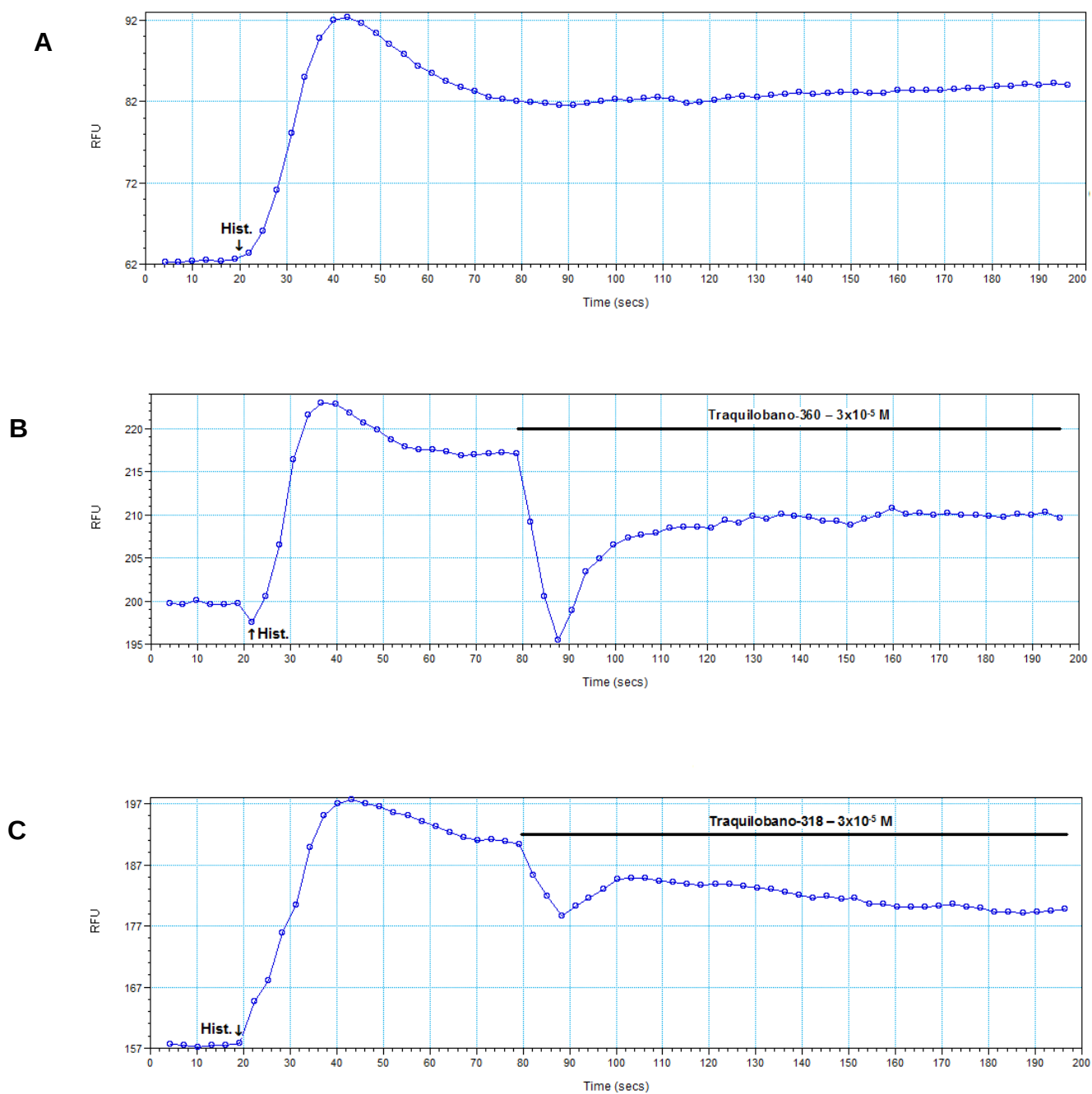


Figura 15 – Registros originais representativos do controle (A) e do efeito de traquilobano-360 (B) e traquilobano-318 (C) sob o sinal de cálcio em células musculares lisas de íleo de cobaia estimuladas com histamina e carregadas com fluo-4.

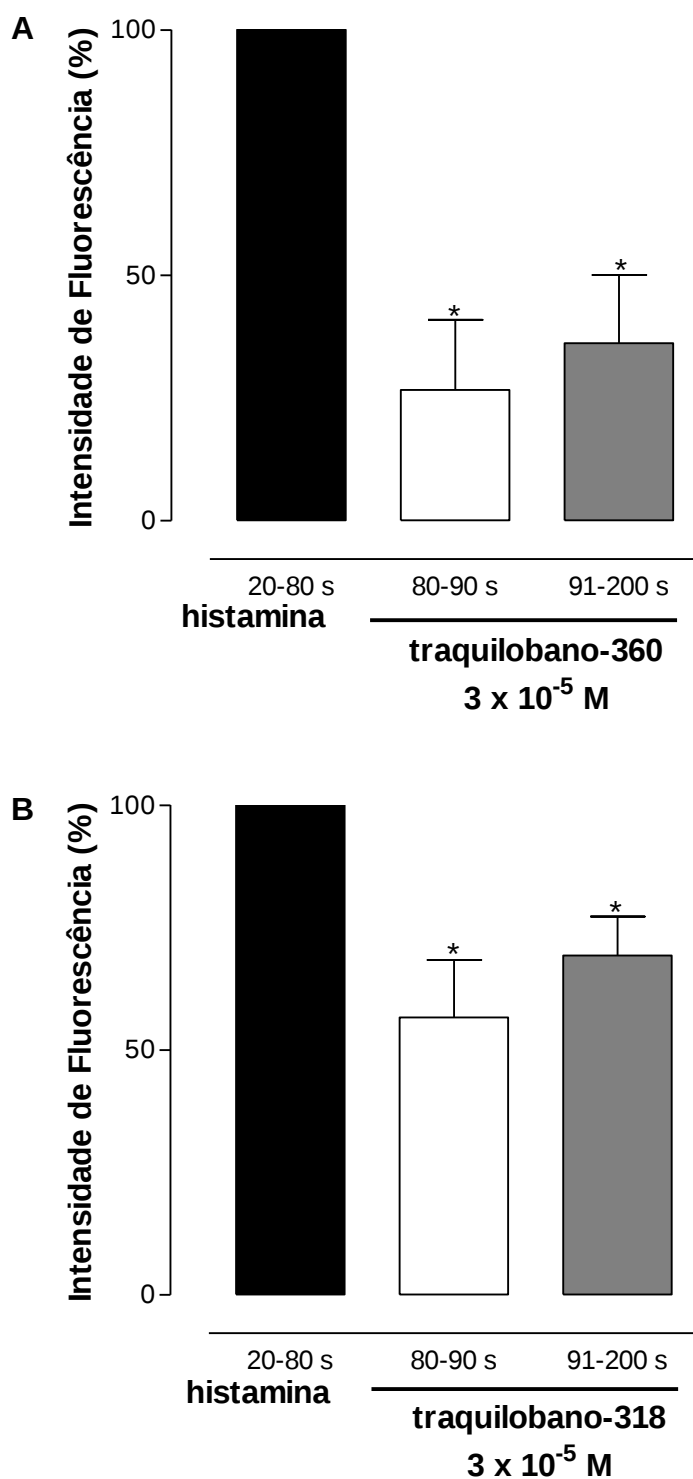


Gráfico 16 – Efeito do traquilobano-360 (**A**) e do traquilobano-318 (**B**) sobre a fluorescência induzidas por 10^{-6} M de histamina em miócitos de íleo de cobaia ($n = 3$). As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. Test t; $*p < 0,05$ (histamina vs. diterpenos).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram descritos parte dos mecanismos pelos quais o diterpeno traquilobano-360 bem como o seu derivado hidroxilado, traquilobano-318, exercem seus efeitos espasmolíticos. Demonstra-se ainda que a modificação estrutural foi responsável por mecanismos de ação diferentes bem como o surgimento de efeito em traquéia, antes não observado com o diterpeno natural, traquilobano-360.

Com base na triagem farmacológica preliminar realizada em aorta isolada de rato, útero isolado de rata, traquéia e íleo isolados de cobaia, com o diterpeno traquilobano-360, isolado das cascas do caule de *Xylopia langsdorfiana*, bem como o seu derivado, observamos que ambos os diterpenos nem promoveram efeito relaxante em aorta isolada de rato com e sem endotélio funcional (Figura 5 e 6) demonstrando-se assim que mesmo a modificação estrutural realizada no traquilobano-360 não foi suficiente para causar efeito espasmolítico em aorta de rato, independente da presença ou ausência do endotélio funcional. De maneira semelhante, em útero isolado de rata, nenhum dos diterpenos promoveu efeito tocolítico, tanto frente às contrações induzidas por ocitocina quanto às contrações induzidas por carbacol, sugerindo que a modificação realizada no traquilobano-360 não foi suficiente para a obtenção do efeito tocolítico em útero isolado de rata (Gráfico 1A, 1B, 1C e 1D). Esses resultados diferem dos encontrados com outro diterpeno isolado também de *Xylopia langsdorfiana*, o labdano-302, onde Ribeiro (2007) demonstrou que este diterpeno promovia efeito vasorelaxante em aorta de rato e esse mecanismo parece envolver a participação dos canais para potássio sensíveis a voltagem, os canais para K^+ retificadores de entrada, canais para cálcio dependentes de voltagem do tipo L (Ca_v-L) além da participação da via AMPc-PKA neste efeito. Ainda, Travassos (2010) comprovou, a nível funcional, que o labdano-302 promove efeito tocolítico em útero isolado de rata e este se dá por ativação dos canais para K^+ de grande condutância sensíveis ao Ca^{2+} , dos canais para K^+ de pequena condutância sensíveis ao Ca^{2+} além de envolver a via dos nucleotídeos cíclicos.

Com o intuito de se investigar uma possível atividade relaxante do traquilobano-360 e seu derivado, traquilobano-318, sobre a musculatura das vias aéreas, avaliou-se seus efeitos sobre a traquéia isolada de cobaia. Neste órgão, traquilobano-360, até a concentração de 10^{-4} M, foi incapaz de promover efeito relaxante neste órgão tanto na presença quanto na ausência de epitélio funcional (Figura 7A e 7B), no entanto, a modificação estrutural realizada por uma reação de desacetilação do grupo acetato de etila da posição 7 do anel central de traquilobano-360, conferiu atividade relaxante em traquéia isolada de cobaia tanto na presença como na ausência de epitélio funcional (Figura 8A e 8B e Gráfico 2). Com base nestes resultados pode-se concluir que a hidroxilação da molécula de traquilobano-360 na posição 7 do anel central está fortemente relacionada com o surgimento do efeito relaxante observado por traquilobano-318 em traquéia de cobaia.

O epitélio da traquéia tem um papel chave na modulação das respostas a diversos agonistas no músculo liso das vias aéreas, onde a remoção mecânica deste epitélio aumenta a resposta a diversos broncoconstritores como a histamina, acetilcolina e leucotrienos bem como a diversos broncodilatadores como isoprenalina e nitroprussiato de sódio (SHIKADA; TANAKA, 1995; FEDAN; SCOTT; JOHNSTON, 2001). Para verificar a integridade do epitélio traqueal foi utilizado o ácido araquidônico conhecido por promover um efeito relaxante dependente de epitélio em traquéia (TSCHIRHART et al., 1987). Foi observado que o efeito de traquilobano-318 independe da presença de epitélio funcional, ou seja, os fatores derivados do epitélio não estão envolvidos no efeito deste diterpeno em traquéia isolada de cobaia, e que provavelmente tal efeito esteja ocorrendo diretamente na musculatura lisa deste órgão.

Em íleo isolado de cobaia, tanto o traquilobano-360, como seu derivado traquilobano-318, apresentaram efeito antiespasmódico significativo, eles foram capazes de inibir as contrações fásicas induzidas por carbacol e histamina (Gráficos 3 e 4). Comparando-se os valores de CI_{50} do traquilobano-360 e de seu derivado traquilobano-318 sobre as contrações fásicas induzidas por carbacol e histamina em íleo de cobaia, pode-se verificar que não houve nenhuma diferença significativa entre os valores de CI_{50} destes diterpenos. Com isso, pode-se afirmar

que eles apresentam efeito antiespasmódico não seletivo em relação aos agonistas testados.

O modelo do músculo liso intestinal é um meio importante para se investigar mecanismos de ação de substâncias que possam ser utilizadas em processos fisiopatológicos, como diarreias e cólicas intestinais.

Em íleo de cobaia, vários agentes contráteis, como os agonistas muscarínicos (TRIGGLE et al., 1989) e o KCl (TRIGGLE; TRIGGLE, 1976), causam uma resposta contrátil bifásica, consistindo em uma contração inicial transiente – componente fásico (< 30 s), seguido por uma contração sustentada – componente tônica, que se desenvolve lentamente ao longo de 15 minutos e é mantida durante o período de exposição ao agente contrátil (TRIGGLE; TRIGGLE, 1976; VAN BREEMEN; AARONSON; LOUTZENHISER, 1979; BOLTON, 1979). Esta resposta bifásica é devido à fonte dual de Ca^{2+} no músculo liso. É sugerido que a contração fásica é causada por liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares mediados por IP_3 (ABDELLATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989) enquanto que a contração tônica é atribuída ao influxo de Ca^{2+} através dos canais para cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), uma vez que a contração tônica é suprimida pelo bloqueador de Ca_v , verapamil (JIM et al., 1981).

No músculo liso de íleo de cobaia, tanto a contração fásica como a tônica são dependes do Ca^{2+} extracelular, uma vez que ambas as contrações foram inibidas na ausência de Ca^{2+} extracelular (HONDA; TAKANO; KAMIYA, 1996). A remoção de íons Ca^{2+} do meio externo bloqueia totalmente a resposta contrátil tanto a agentes despolarizantes como a agonistas em poucos segundos, sugerindo que as fontes intracelulares de Ca^{2+} não contribuem significativamente para o nível de tensão atingido (NOUAILHETAS et al., 1985). No entanto, a influencia do Ca^{2+} extracelular é relativamente maior na resposta contrátil tônica comparado com a fásica (TRIGGLE et al., 1979).

Como os mecanismos envolvidos na manutenção da fase tônica da contração diferem daqueles da fase fásica em íleo isolado (ABDELLATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989; HONDA; TAKANO; KAMIYA, 1996), resolveu-se verificar se os diterpenos além de promover efeito antiespasmódico ainda promoveriam o relaxamento do íleo isolado de cobaia pré-contraído com KCl, carbacol e histamina.

Como o íleo é um órgão totalmente dependente de variação do potencial de membrana (NOUAILHETAS et al., 1985) e como o componente tônico da contração induzida por agonistas de acoplamento misto (UNNO; KOMORI; OHASHI, 1995; BOLTON et al., 1981) ou por um agente despolarizante (KCl) é mantido quase que exclusivamente por influxo de cálcio através dos Ca_v (BOLTON, 1979; REMBOLD, 1996; BOLTON et al., 2006), levantou-se a hipótese de que os diterpenos poderiam estar agindo por bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v .

Para verificar esta hipótese, avaliou-se o efeito do traquilobano-360 e de seu derivado traquilobano-318 sobre o componente tônico da contração induzida por KCl (acoplamento eletromecânico) e carbacol ou histamina, que agem por acoplamento misto (BOLTON et al., 1981) em íleo de cobaia. Como mostram as figuras 9 e 10 e gráficos 6A e 6B, semelhante ao observado com a avaliação frente às contrações fásicas, ambos diterpenos testados inibiram de maneira dependente de concentração as contrações tônicas induzidas por todos os agentes contráteis utilizados, indicando que os mecanismos de ação relaxantes podem ser semelhantes aqueles que inibem as contrações induzidas por agonistas em íleo de cobaia.

Analizando os valores de CE_{50} do traquilobano-360 e do seu derivado, traquilobano-318, verifica-se que: tanto quando o órgão era pré-contraído com KCl ou com carbacol não foi observada diferença significativa entre as potências farmacológicas dos diterpenos, sugerindo que provavelmente a parte da molécula responsável pelo efeito espasmolítico em íleo de cobaia pré-contraído por KCl ou carbacol não é o grupo da posição 7 do anel central da molécula de traquilobano-360. Interessantemente, quando o órgão era pré-contraído por histamina, foi observada uma diferença significativa entre a potência farmacológica do traquilobano-360 e de seu derivado traquilobano-318. A potência farmacológica do derivado traquilobano-318 foi cerca de 15 vezes maior quando comparada a do seu diterpeno de origem, traquilobano-360, o que nos leva a acreditar que a hidroxila na posição 7 do anel central de traquilobano-318 é a responsável pelo aumento da potência farmacológica em íleo de cobaia pré-contraído por histamina.

Assim, com o intuito de verificar se o efeito dos diterpenos estaria ocorrendo por uma ação direta nos receptores de histamina decidiu-se investigar a natureza do antagonismo exercido pelo traquilobano-360 e traquilobano-318 frente às contrações induzidas por histamina em íleo de cobaia, avaliando uma possível interação direta entre os diterpenos e os receptores H_1 da histamina. Verificamos que tanto o traquilobano-360 quanto o traquilobano-318 inibiram, de forma significativa e dependente de concentração, as contrações cumulativas induzidas por histamina. O fato das curvas controles cumulativas à histamina terem sido desviadas para a direita de forma não paralela e com inibição dos efeitos máximos é sugestivo de antagonismo não competitivo (Gráficos 5A e 5B), o que foi confirmado pelos valores dos “slopes” do gráfico de Schild para traquilobano-360 e traquilobano-318 terem diferido da unidade. Descartando-se assim a possibilidade destes estarem ligando-se diretamente aos receptores histaminérgicos H_1 para exercer seus efeitos espasmolíticos em íleo de cobaia.

O fato do traquilobano-360 e seu derivado traquilobano-318 ter relaxado o íleo pré-contraído por agentes (fármaco e eletromecânico), somado ao fato dos diterpenos não terem ação direta nos receptores histaminérgicos é sugestivo de que eles possam estar agindo por bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v , uma vez que a manutenção da contração tônica é majoritariamente sustentada pelo influxo de Ca^{2+} através dos destes canais (JIM et al., 1981).

Diante do exposto, com o objetivo de verificar se o traquilobano-360 e o traquilobano-318 estariam agindo no bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v em íleo de cobaia, avaliou-se os seus efeitos frente às contrações cumulativas induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} . Este protocolo baseia-se no fato de que a contração se dará, quase que exclusivamente, pelo Ca^{2+} proveniente do meio extracelular, já que a despolarização promovida pela elevada $[K^+]_e$ induz a abertura dos Ca_v (REMBOLD, 1996). Observamos que o traquilobano-360 e traquilobano-318 inibiram, de maneira dependente de concentração, as contrações induzidas por $CaCl_2$. As curvas cumulativas ao $CaCl_2$ foram desviadas para a direita com redução do E_{max} (Gráfico 7A e 7B). Os valores de CE_{50} do $CaCl_2$ aumentaram na presença de concentrações crescentes tanto da traquilobano-360 quanto de seu derivado, traquilobano-318. Esses resultados mostram que a modificação

estrutural realizada no traquilobano-360 não foi capaz de conferir efeito diferenciado para o traquilobano-318, e que, provavelmente não é o grupamento presente na posição 7 da molécula de traquilobano-360 o responsável pelo efeito antagonizador das contrações induzidas pelo CaCl_2 em íleo de cobaia. Resultados semelhantes foram obtidos com labdano-302, outro diterpeno isolado de *Xylopija langsdorfiana*, por Macêdo (2008) em íleo isolado de cobaia.

Esses dados, tomados em conjunto reforçam a hipótese que os diterpenos estão inibindo o influxo de Ca^{2+} provavelmente através dos Ca_v . A pergunta que veio na sequência foi: qual subtipo de canal de cálcio dependente de voltagem estaria envolvido no efeito dos diterpenos em íleo isolado de cobaia?

Os canais para cálcio dependentes de voltagem têm sido inicialmente classificados como sendo do tipo L, N, P/Q, R e T dependendo de várias propriedades eletrofisiológicas e farmacológicas (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; os do tipo N como $\text{Ca}_v2.2$, os do tipo P/Q como $\text{Ca}_v2.1$, os do tipo R como $\text{Ca}_v2.3$ que são sensíveis a di-hidropiridina e ativados por alta voltagem; e os canais do tipo T como $\text{Ca}_v3.1$ – $\text{Ca}_v3.3$ que são canais ativados por baixa voltagem (ERTEL et al., 2000; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007).

Uma importante localização dos canais do tipo Ca_v1 , que são alvos de bloqueadores de canais para cálcio usados na terapêutica, são as células musculares cardíacas e lisas. Os neurônios expressam principalmente $\text{Ca}_v2.2$, $\text{Ca}_v2.1$ e $\text{Ca}_v2.3$ (listados na ordem de importância). $\text{Ca}_v2.2$ e $\text{Ca}_v2.1$ são os canais responsáveis pela liberação de neurotransmissor tanto nas sinapses centrais quanto nas periféricas. (LUNDY; FREW, 1988,1994; WATERMAN, 2000).

No músculo liso, os Ca_v1 são melhores caracterizados e é o maior responsável pelo influxo de Ca^{2+} , cujo sítio de ligação para seus bloqueadores está na subunidade α_1 , embora nele existam quatro outras unidades complexadas (2 α , 1 β e 1 γ) (VOGALIS et al., 1991; KURIYAMA; KITAMURA; NABATA, 1995; KNOT et al., 1996). Um dos Ca_v envolvido com funções fisiológicas da contração do músculo liso é o $\text{Ca}_v3.2$ ou Ca_v -T (SARSERO et al., 1998; CATERRALL et al., 2005), além dos canais que são mais expressos em íleo de cobaia, que são os do

tipo L ($\text{Ca}_v\text{-L}$) (BOLTON, 1979; TOMITA, 1981) recentemente descritos por Caterral e colaboradores (2005) como Ca_v 1.2.

Com o intuito de verificar se o Ca_v envolvido na ação espasmodolítica de traquilobano-360 e traquilobano-318 seria o $\text{Ca}_v\text{-1}$ avalisou-se o efeito dos mesmos sobre as contrações tônicas induzidas pelo sobre o íleo pré-contraído com o derivado di-hidropiridínico S-(-)-Bay K8644, um agonista dos $\text{Ca}_v\text{1}$, que age por ligação direta na sua subunidade α_1 e não por despolarização (SPEDDING, PAOLETTI, 1992). Nestas condições foi observado que tanto traquilobano-360 como traquilobano-318 (Gráficos 8A e 8B) induziram relaxamento do íleo, de maneira dependente de concentração. Comparando-se esse efeito espasmodolítico com o que foi observado quando as contrações tônicas foram induzidas por KCl, um agente despolarizante de acoplamento eletromecânico (que causa ativação de Ca_v), pode-se constatar que não houve diferença significativa entre os valores de CE_{50} , confirmando a participação dos $\text{Ca}_v\text{-L}$ no mecanismo de ação relaxante do traquilobano-318. Entretanto, não se descarta a participação de outros mecanismos envolvidos no efeito destes diterpenos.

Os canais para 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 et al., 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 conseqüentemente 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).

Diante dos resultados com o S-(-)-Bay K 8644, criou-se a hipótese de que os diterpenos poderiam estar ativando canais para K^+ e bloqueando, assim, indiretamente os canais Ca_v .

Os ativadores de canais para K^+ são substâncias que incluem um grupo de diversas moléculas com um largo potencial terapêutico (QUEST, 1992;

EMPFIELD; RUSSELL; TRAINOR, 1995). Estes compostos abrem os canais para K^+ , causando hiperpolarização de membrana através do aumento do efluxo de K^+ , desta forma causando diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ e conseqüente relaxamento do músculo liso (QUEST; COOK, 1989).

A associação entre o aumento da atividade dos canais para K^+ e o relaxamento do músculo liso vem sendo estudada em vários tecidos e em diversos tipos de canais para K^+ . Alguns autores descreveram a presença dos canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) em traquéia de cobaia (SHIKADA; TANAKA, 1995), em músculo longitudinal de íleo de rato (DAVIES; McCURRIE; WOOD, 1996) e de cobaia (SUN; BENISHIN, 1994), uretra de cobaia (TERAMOTO; BRADING; ITO, 1999), e em traquéia de gato (TERAMOTO; NAKASHIMA; ITO, 2000) e dos canais para K^+ dependentes de voltagem (K_V) em artérias pulmonar (WANG et al., 1997; YUAN et al., 1998; DAVIES; KOZLOWSKI, 2001), mesentérica (XU et al., 1999), e aorta de rato (RIBEIRO et al., 2007); em músculo liso gastrintestinal (SCHMALZ et al., 1998; FREY et al., 2000). Também foi evidenciada a presença de canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de pequena condutância em útero de rata (SILVA; OKUYAMA; PAIVA, 1996), em aorta de rato (SILVA et al., 1994) e de canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de grande condutância (BK_{Ca}) em músculo longitudinal de íleo de cobaia (UYAMA; IMAIZUMI; WATANABE, 1993), em traquéia de porco (KANNAN; JOHNSON, 1995), e de cobaia (HIRAMATSU et al., 1994; GARCIA-CALVO et al., 1994; RIBEIRO et al., 2007), em aorta de coelho (DEMIREL et al., 1994), em miométrio humano (ANWER et al., 1993; MEERA et al., 1995), em artérias mesentérica de cobaia (HILL et al., 1997), e aorta de rato (BELEVYCH et al., 2002), em íleo de cobaia (HONG; ROAN; CHANG, 1997; SILVA; NOUAILHETAS; ABOULAFIA, 1999) e na bexiga urinária (PETKOV et al., 2001), entre outros.

No presente estudo, a participação dos canais para K^+ no efeito espasmolítico do traquilobano-360 e do traquilobano-318 em íleo de cobaia foi investigada, utilizando bloqueadores de canais para K^+ como ferramentas farmacológicas, comparando os efeitos obtidos com o diterpeno natural com os efeitos obtidos com o seu derivado hidroxilado, traquilobano-318.

O fato da curva de relaxamento tanto do traquilobano-360 (Gráfico 9 A) como a de seu derivado traquilobano-318 (Gráfico 9 B) ter sido desviada

significativamente para a direita na presença de tetraetilamônio na concentração de 5mM, que é relatada como sendo inespecífica para todos os canais para K^+ , sugere a participação destes canais no efeito espasmolítico dos diterpenos em estudo em íleo de cobaia.

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 e viscerais (YUNOKI; T, TERAMOTO; ITO, 2002; CUI et al., 2002).

Uma característica primária deste canal é ser inibido por ATP intracelular, sulfoniluréias como, por exemplo, a glibenclamida e a tolbutamida, e por baixa concentração de Ba^{2+} (STANDEN et al., 1989; SANBORN, 2000). 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 (MISHRA; AARONSON, 1999). Sun e Benishin (1994) mostraram que os K_{ATP} podem estar presentes em músculo longitudinal de íleo de cobaia, pois a cromakalina, nicorandil e pinacidil, ativadores desses canais, foram capazes de inibir as contrações tônicas induzidas por histamina (0,5 μ M) e KCl (30 mM).

Para verificar se traquilobano-360 e traquilobano-318 estariam ativando os K_{ATP} , avaliou-se o efeito relaxante destes na ausência e presença de glibenclamida, um bloqueador dos K_{ATP} . A curva de relaxamento promovida por se traquilobano-360 (Gráfico 10A) na presença de glibenclamida não diferiu daquela na ausência deste bloqueador, descartando assim a participação dos K_{ATP} no efeito deste diterpeno. Interessantemente, a curva de relaxamento do traquilobano-318 foi significativamente desviada para a direita passando de $0,1 \pm 0,01 \times 10^{-5}$ M para $1,1 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M (Gráfico 10B) com uma redução de cerca de 11 vezes na potência farmacológica do traquilobano-318. Este fato é sugestivo de que traquilobano-318 está promovendo o seu efeito espasmolítico por ativação dos K_{ATP} , sugerindo ainda que a modificação estrutural esteja relacionada com tal efeito uma vez que a porção hidroxil presente na posição 7 da molécula do diterpeno é o que há de diferente na molécula precursora.

Sabendo-se da importância dos canais para K^+ sensíveis a voltagem (K_V) na manutenção do potencial de repouso no íleo de cobaia e por sua grande densidade neste órgão (GORDIENKO et al., 1999), levantou-se a hipótese de que traquilobano-360 e traquilobano-318 poderiam estar relaxando íleo de cobaia por ativação dos K_V e, indiretamente, bloqueando o influxo de Ca^{2+} via Ca_V .

A 4-aminopiridina (4-AP) é uma ferramenta farmacológica conhecida por bloquear os canais K_V e é usada para o estudo do mecanismo de ação de várias substâncias com atividade relaxante da musculatura lisa (SATAKE; SHIBATA; SHIBATA, 1997; HUANG et al., 1999; LI et al., 1999; PELAIA et al., 2002). Sendo assim, foi investigada a participação dos K_V , bloqueados pela 4-AP, no efeito relaxante dos diterpenos em íleo de cobaia. A curva de relaxamento do traquilobano-360 (Gráfico 11A) não mostrou qualquer alteração significativa na presença da 4-AP, descartando a hipótese de envolvimento destes canais no efeito de traquilobano-360. De forma diferente, a curva de relaxamento do traquilobano-318 foi desviada para a direita (Gráfico 11B) com redução em torno de 7 vezes na potência farmacológica deste derivado. Esses resultados sugerem que, em nível funcional, este diterpeno relaxa o íleo de cobaia por ativação dos canais para K^+ sensíveis à voltagem e que este efeito possa estar se dando por contribuição da hidroxila na posição 7 da molécula do diterpeno.

Outra família de canais para K^+ existentes é a dos canais para K^+ ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}). Estes contribuem para a repolarização do potencial de ação e são divididos em três grandes famílias com base em suas condutância, cinética e farmacologia (SAH; FABER, 2002): 1) canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de pequena condutância (SK_{Ca}), são bloqueados por apamina; 2) canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de condutância intermediária (IK_{Ca}) bloqueados pelo clotrimazole, e 3) canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de larga condutância (BK_{Ca}) que são bloqueados por toxinas, como caribdotoxina e iberitoxina, 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 ($< 1,0 \mu M$), 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 $K_{Ca1.1}$ (WEI et al., 2005), enquanto que no grupo dos SK_{Ca} estão incluídos os $K_{Ca2.1}$, 2.2 e 2.3 (KOHLE et al., 1996), e os IK_{Ca}

passaram a ser chamados de $K_{Ca3.1}$ (ISHII et al., 1997; JOINER et al., 1997). Três outros membros deste grupo, $K_{Ca4.1}$; 4.2 e 5.2 (JOINER et al., 1997; SCHREIBER et al., 1998; YUAN et al., 2003), 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 $K_{Ca4.2}$ e $K_{Ca4.1}$ são ativados pelo Na^+ e Cl^- intracelular (YUAN et al., 2003), enquanto o $K_{Ca5.1}$ é sensível ao pH (SCHREIBER et al., 1998).

Os canais $K_{Ca1.1}$ são encontrados em cérebro, cóclea, músculo esquelético e músculo liso. Já os $K_{Ca2.1}$; 2.2 e 2.3 são largamente encontrados em cérebro, coração e alguns tipos de músculo liso. Enquanto que os $K_{Ca3.1}$ estão presentes na placenta, próstata, linfócitos, pâncreas e endotélio vascular (WEI et al., 2005).

Inicialmente, hipotetizou-se que os canais K_{Ca2} poderiam ser alvos para os diterpenos em estudo para que os mesmos causassem seus efeitos espasmolíticos. Para confirmar essa hipótese se fazia necessário que houvesse uma inibição da curva de relaxamento induzido pelos diterpenos, o que não foi observado para o traquilobano-360 (Gráfico 12A), onde a curva de relaxamento não foi modificada pela presença de apamina, um bloqueador dos SK_{Ca} . Já a curva de relaxamento induzida por traquilobano-318, em íleo de cobaia, foi desviada para a direita de maneira significativa, com redução em cerca de 7 vezes na potência relaxante (Gráfico 12B), também sugerindo que assim como os K_{ATP} , K_V , também os SK_{Ca} estão envolvidos no efeito espasmolítico do traquilobano-318 e não de seu diterpeno de origem, traquilobano-360, reforçando a idéia de que possa ser a presença da hidroxila na posição 7 deste diterpeno o grupamento responsável por tal efeito.

Romero et al. (1998) utilizando a configuração “cell-attached” da técnica de “patch-clamp” caracterizou uma população de canais BK_{Ca} que são indiretamente ativados pela angiotensina II, um agonista contrátil que induz dessensibilização do componente tônico da contração em íleo de cobaia. Logo depois, Silva, Nouailhetas e Aboulafia (1999) demonstraram que a dessensibilização do componente tônico induzida pela angiotensina II é devido à abertura dos BK_{Ca} levando a uma repolarização e consequentemente fechando os Ca_V responsáveis pelo influxo de Ca^{2+} que sustenta o componente tônico no íleo

de cobaia. A hiperpolarização resultante do aumento da atividade destes canais, constitui desta forma, um importante mecanismo de “feedback” para regulação dos Ca_v . Os BK_{Ca} são sensíveis ao Ca^{2+} e a voltagem, desta forma a sua sensibilidade aparente ao Ca^{2+} é aumentada quando a membrana está despolarizada (McMANUS et al., 1995).

Diante dessas premissas passou-se a investigar se traquilobano-360 e traquilobano-318 estariam agindo sobre os canais BK_{Ca} , ativando-os e conseqüentemente levando a uma repolarização de membrana que levaria a um bloqueio indireto dos Ca_v . Em presença de 1 mM de TEA^+ , uma concentração específica para bloquear apenas os BK_{Ca} (LATORRE et al., 1989; KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996), a curva de relaxamento tanto do traquilobano-360 quanto a curva do traquilobano-318 não foram desviadas para direita (Gráfico 13A e 13B) quando comparadas com as curvas na ausência deste bloqueador. Estes dados demonstram que provavelmente o relaxamento produzido pelos diterpenos em íleo isolado de cobaia não está associado à abertura dos BK_{Ca} . Por TEA^+ se tratar de um íon e, portanto poder se ligar em outros canais, para confirmar que realmente os BK_{Ca} não estariam envolvidos no efeito dos diterpenos, verificou-se que iberiotoxina, um bloqueador específico dos BK_{Ca} (GALVEZ et al., 1990; CANDIA; GARCIA; LATORRE, 1992; ABOULAFIA et al., 2002), também não deslocou para direita a curva de relaxamento de traquilobano-360 (Gráfico 14A) bem como de seu derivado traquilobano-318 (Gráfico 14B). Dessa maneira podemos sugerir que: a modificação estrutural realizada no traquilobano-360 não foi suficiente para o surgimento do efeito do diterpeno sobre os canais BK_{Ca} e os diterpenos não tem os BK_{Ca} como alvos farmacológicos para promoverem seus efeitos.

Desta forma podemos sugerir que o traquilobano-360 pode estar atuando em outros tipos de canais para K^+ aqui não estudados como os canais retificadores de entrada (K_{ir}), mas não pelos K_{ATP} , K_v , SK_{Ca} e BK_{Ca} para promover efeito espasmolítico em íleo de cobaia. Ainda que traquilobano-318 relaxa íleo de cobaia por ativar canais para K^+ (K_{ATP} , K_v e SK_{Ca}) o que poderia levar a uma repolarização de membrana das células musculares de íleo de cobaia, conseqüentemente bloquearia o influxo de Ca^{2+} , reduzindo assim a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ e produzindo relaxamento deste órgão. O fato de os tempos médios de relaxamento

do íleo de cobaia ter aumentado significativamente na presença dos bloqueadores dos canais K_{ATP} , K_V e SK_{Ca} , reforça a hipótese da participação destes canais no mecanismo de ação espasmolítica de traquilobano-318.

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 (HIRSCH et al., 2000).

É relatado que os canais para K^+ possuem moduladores intracelulares, e um grupo de grande relevância são os nucleotídeos cíclicos, como o AMPc e o GMPc, de maneira direta ou por ativação de suas proteínas cinases específicas, PKA e PKG, respectivamente. (KUME et al., 1989; WHITE et al., 1993; KUME et al., 1994; REMBOLD, 1992; MINAMI et al., 1993). Se o efeito dos diterpenos dependesse do aumento nos níveis dos nucleotídeos cíclicos, as suas respostas deveriam ser potencializadas na presença deste inibidor. Os resultados mostram que a aminofilina não modificou a resposta relaxante nem de traquilobano-360 (Gráfico 15A) nem de seu derivado, traquilobano-318 (Gráfico 15B), o que descarta a participação dos nucleotídeos cíclicos para uma provável ativação dos canais para K^+ .

Para ocorrer o relaxamento da musculatura lisa faz-se necessário a redução da $[Ca^{2+}]_c$, uma vez que o desencadeamento da contração é parte da manutenção desta contração depende do aumento da $[Ca^{2+}]_c$ (SOMLYO; SOMLYO, 1994). Com o advento das técnicas de medida de íons Ca^{2+} utilizando como ferramentas indicadores fluorescentes sensíveis ao Ca^{2+} , as mudanças na

$[Ca^{2+}]_c$ tem sido realizadas em vários tipos de músculos lisos. E recentes avanços direcionados na tecnologia de imagem, especialmente com microscopia confocal, facilitaram a observação das características espaciais dos eventos e suas relações entre organelas e microdomínios de membrana (WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005).

Para se comprovar uma possível redução na $[Ca^{2+}]_c$ por parte de traquilobano-360 e seu derivado traquilobano-318, o efeito dos mesmos foi observado sobre a intensidade de fluorescência do Ca^{2+} citoplasmático marcado com fluo-4 e detectado em miócitos de cultura da camada longitudinal de íleo de cobaia. Os registros mostram que a concentrações de 3×10^{-5} M dos diterpenos, em experimentos separados, foram capazes de reduzir, em poucos segundos, a intensidade de fluorescência, o que reflete a diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ (Figura 15 e Gráfico 16A e 16B). Estes resultados em miócitos confirmam, em nível funcional, o efeito relaxante observado em íleo de cobaia, e como não houve diferença significativa entre a redução da intensidade de fluorescência induzida pelos dois diterpenos é plausível afirmar que a modificação estrutural dada pela substituição do grupo acetoxi pelo grupo hidroxil não é determinante para a redução da $[Ca^{2+}]_c$.

Como o traquilobano-318 envolve modulação positiva de canais K^+ (K_{ATP} , SK_{Ca} e K_v) (Gráficos 10B, 11B e 12B) e o traquilobano-360 não (Gráficos 10A, 11A e 12A) então pode-se sugerir que a redução da $[Ca^{2+}]_c$ induzida pelos dois diterpenos em nível celular parece não ser a consequência majoritária da modulação positiva dos canais para K^+ , uma vez que a redução $[Ca^{2+}]_c$ ocorre de maneira equípote com os dois diterpenos testados.

Desta forma, este trabalho relata, pela primeira vez na literatura científica, parte do mecanismo de ação espasmolítica do traquilobano-360 bem como de seu derivado hidroxilado, traquilobano-318, em íleo isolado de cobaia.

6 CONCLUSÕES

No estudo da investigação do efeito espasmolítico do traquilobano-360 bem como de seu derivado hidroxilado traquilobano-318 visando elucidar o mecanismo de ação destes diterpenos, pode-se concluir que:

- Os diterpenos não possuem efeito espasmolítico significativo em aorta de rato independente de endotélio funcional e útero de rata;
- A modificação estrutural realizada na posição 7 do traquilobano-360, com a substituição do grupo acetoxi pelo hidroxil, foi determinante para o efeito relaxante em traquéia isolada de cobaia;
- Possuem efeito espasmolítico não seletivo em íleo isolado de cobaia em relação aos agentes contracturantes testados;
- O efeito espasmolítico exercido pelos diterpenos em íleo de cobaia não se dá por bloqueio competitivo dos receptores de histamina;
- Os diterpenos bloqueiam os canais para cálcio operados por voltagem (Ca_v), em especial os do tipo 1.2;
- O efeito de traquilobano-318 tem como alvo farmacológico, em nível funcional, os canais para potássio, particularmente, os subtipos K_{ATP} , K_v e SK_{Ca} , enquanto que seu precursor, traquilobano-360 parece não ter esses canais como alvo para seu efeito espasmolítico;
- O efeito dos diterpenos não envolve a via dos nucleotídeos cíclicos
- Os diterpenos reduzem, de maneira equipotente, a $[Ca^{2+}]_c$ em miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia.
- A redução da $[Ca^{2+}]_c$ induzida pelos dois diterpenos em nível celular não é consequência majoritária da modulação positiva dos canais K_{ATP} , K_v e SK_{Ca} .

REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphospholinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Sci.**, v. 45, p. 757-786, 1989.
- ABE, A.; KARAKI, H. Calcium channel blocker-like action of 1,9-dideoxyforskolin in vascular smooth muscle. **Japan. J. of Pharmacol.** v. 60, n. 4, p. 389-392, 1992.
- ABOULAFIA, J.; SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A. Protein kinase C modulators enhance angiotensin II desensitization of guinea pig ileum via maxi-K⁺ channels. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 442, p. 29-36, 2002.
- 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.
- AJAY, M.; GILANI, A. H.; MUSTAFA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **L. Sci.**, v. 74, p. 603–612, 2003.
- ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 2nd edition (2007 Revision). **Br. J. Pharmacol.**, v. 150 (Suppl. 1), p. S1 – S168, 2007.
- ALEXANDER, S.P.; MATHIE, A.; PETERS, J.A. Guide to Receptors and Channels (GRAC); pp. S1–S209. **Br J Pharmacol.** 3. Suppl 2. v.p. 153. 2008.
- ALFONSO, D.; COLMAN-SAZARBITORIA, T.; ZHAO, G.-X.; SHI, G.; YE, Q.; SCHWEDLER, J. T.; McLAUGHLIN, J. L. Aromin and aromicin, two new bioactive annonaceous acetogenins, possessing an unusual bis-THF ring structure, from *Xylopiya aromatica* (Annonaceae). **Tetrahedron**, v. 52, n. 12, p. 4215-4224, 1996.
- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **A. J. of Physiol.**, v. 219, n. 6, p. 1698 – 1705, 1970.
- ANDRADE, N. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; MAIA, J. G. S. Diterpenes and volatile constituents from the leaves of *Xylopiya cayennensis* Maas. **Biochem. System. and Ecol.**, v. 32, n. 11, p. 1055-1058, 2004.
- ANWER, K.; OBERTI, C.; PEREZ, G. J.; PEREZ-REYES, N.; McDOUGALL, J. K.; MONGA, M.; SANBORN, B. M.; STEFANI, E.; TORO, L. Calcium-activated K⁺ channels as modulators of human myometrial contractile activity. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. C976-C985, 1993.
- ARUNLAKSHANA, O.; SCHILD, H. O. Some quantitative uses of drug antagonists. **Br. J. Pharmacol.** v. 14, p. 48 - 58, 1959

BACCELLI, C.; BLOCK, S.; HOLLE, B. V.; SCHANCK, A.; CHAPON, D.; TINANT, B.; MEERVELT, L. V.; MOREL, N.; QUETIN-LECLERCQ, J. Diterpenes isolated from *Croton zambesicus* inhibit KCl-induced contraction. **Planta Med** v.71, p. 1036 – 1039, 2005.

BELEVYCH, A. E.; BECK, R.; TAMMARO, P.; POSTON, L.; SMIRNOV, S. V. Developmental changes in the functional characteristics and expression of voltage-gated K⁺ channel currents in rat aortic myocytes. **Cardiovasc. Res.**, v. 54, n. 1, p. 152-161, 2002.

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

BERRIDGE, M. J. Unlocking the secrets of cell signaling. **An. Rev. of Physiol.**, v. 67, p. 1-21, 2005.

BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; MEERVELT, L. V.; ROZENBERG, R.; JIWAN, J. H.; LLABRE` S, G.; PAUW-GILLET, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochem.**, v. 65, p. 1165–1171, 2004.

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

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

BOLTON, T. B.; CLARK, J. P.; KITAMURA, K.; LANG, bR. J. **Evidence that histamine and carbachol may open the same ion channels in longitudinal smooth muscle of guinea-pig ileum.** **J. Physiol.**, v. 320, p. 363-379, 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais.** Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENIUSUS.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2009.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. and Biol. Res.**33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; SANT'ANA, A. E. Evidence for the mechanism of the inhibitory action of jatrophone in the isolated rat uterine muscle. **Gen. Pharmacol.**, v. 21, n. 1, p. 117-122., 1990.

CANDIA, S.; GARCIA, M. L.; LATORRE, L. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. **Biophys. J.**, v. 63, p. 583–590, 1992.

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. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, p. 411–425, 2005.

CHANG, J.; HAND, J. M.; SCHWALM, S.; DERVINIS, A.; LEWIS, A. J. Bronchodilating activity of forskolin *in vitro* and *in vivo*. **Eur. J. of Pharmacol.**, v. 101, n. 3-4, p. 271-274, 1984.

CHITALEY, K.; WEBER, D. S.; WEBB, R. C. RhoA/Rho-kinase, vascular changes and hypertension. **C. Hypertens. Reports**, v. 3, 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*. **J. of Nat.Prod.-Lloydia**, 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*. **J. of Nat.Prod.-Lloydia**, v. 57, n. 4, p. 486-493, 1994.

CONTE-CAMERINO, D.; LOGRANO, M. D.; DE LUCIA, A.; PERSICHELLA, M.; FRANCONI, F. The effects of the calcium channel agonist, Bay k-8644, on guinea-pig ileum ant rat uterine horn. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 39, p. 954-957, 1987.

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

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. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 26, p. 135–143. 2002.

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 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**.Ribeirão Preto-SP, 2006.

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

DAVIES, A. R.; KOZLOWSKI, R. Z. K_V channel subunit expression in rat pulmonary arteries. **Lung**, v. 179, p. 147–161, 2001.

DAVIES, M.P.; McCURRIE, J.R.; WOOD, D. Comparative effects of K⁺ channel modulating agents on contractions of rat intestinal smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 297, p. 249-256, 1996.

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

DELLIS, OLIVIER; DEDOS, SHARLATOS G.; TOVEY, STEPHEN, C.; Taufiq-Ur-Rahman, DUBEL, STEFAN J.; TAYLOR, COLIN W. Ca^{2+} Entry Through Plasma Membrane IP_3 Receptors. *Science*, v. 313. n. 5784, p. 229 – 233, 2006.

DEMIREL, E.; RUSKO, J.; LASKEY, R. E.; ADAMS, D. J.; VAN BREEMEN, C. TEA inhibits ACh-induced EDRF release: endothelial Ca^{2+} -dependent K^+ channels contribute to vascular tone. *Am. J. Physiol.*, v. 267, p. H1135-H1141, 1994.

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

DONATO, R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding pro-teins of the EF-hand type, *Biochim. Biophys. Acta* 1450 191–231. 1999.

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *J. Biochem. Cell Biol.* 33 637–668. 2001.

DUARTE, D. F. P.; SANT'ANA, A. E. G.; CALIXTO, J. B. Analysis of the vasorelaxant action of jatrophone in the isolated aorta of the rat: influence of potassium channel blockers. *E. J. of Pharmacol.*, v. 215, n. 1, p. 75-81, 1992.

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. *J. of Mol. Cell Cardiol.* v. 34, n. 8, p. 985-996, 2002.

EDWARDS, G.; WESTON, A. H. The pharmacology of ATPsensitive potassium channels. *An. R. in Pharmacol. and Toxicol.*, v. 33, p. 597-637; 1993.

EMPFIELD, J. R.; RUSSELL, K.; TRAINOR, D. A. Potassium channel openers: therapeutic possibilities. *Pharmac. News*, v. 6, p. 23-27, 1995.

ERTEL, E. A.; CAMPBELL, K. P.; HARPOLD, M. M.; HOFMANN, F.; MORI, Y.; PEREZ-REYES, E.; SCHWARTZ, A.; SNUTCH, T. P.; TANABE, T.; BIRNBAUMER, L.; TSIEN, R. W.; CATTERALL, W. A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, v. 25, p. 533–535, 2000.

ETKIN, N. L. Antimalarial Plants Used by Hausa in Northern Nigeria. *Tropical Doctor*, 27(1), p. 12. 1997.

EXTON, J. H. New Developments in phospholipase D. *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 15579-15582, 1997.

FEDAN, J. S.; VAN SCOTT, M. R.; JOHNSTON, R. A. Pharmacological techniques for the in vitro study of airways. **J. of Pharmacol. and Toxicol. Methods**, v. 45, n. 2, p. 159-174, 2001.

FERRANTE, J.; LUCHOWSKI, E.; RUTLEDGE, A.; TRIGGLE, D.J. Binding of a 1,4-dihydropyridine calcium channel activator, (-) S Bay K 8644, to cardiac preparations. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 158, p. 149-154, 1989.

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.

FOORD, S. M.; BONNER, T. I.; NEUBIG, R. R.; ROSSER, E. M.; PIN, J. P.; DAVENPORT, A. P.; SPEDDING, M.; HARMAR, A. J. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, n. 2, p. 279-288, 2005.

FREY, B. W.; LYNCH, F. T.; KINSELLA, J. M.; HOROWITZ, B.; SANDERS, K. M.; CARL, A. Blocking of cloned and native delayed rectifier K channels from visceral smooth muscles by phencyclidine. **Neurogast. Motil**, v. 12, p. 509–516, 2000.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADKI, J. V. – The obligatory role of endothelium cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 286, p. 373 – 376, 1980.

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*. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 19, p. 11083-11090, 1990.

GARCIA-CALVO, M.; KNAUS, H. G.; MCMANUS, O. B.; GIANGIACOMO, K. M.; KACZOROWSKI, G. J.; GARCIA, M. L. Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 676–682, 1994.

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.

HASAN, C. M.; HEALEY, T. M.; WATERMAN, P. G. Kaurane and Kaurene Diterpenes from the Stem Bark of *Xylopia Acutiflora*. **Phytochem.**, 21, p. 2134. 1982.

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

HILL, C. E.; KIRTON, A.; WU, D. D.; VANNER, S. J. Role of maxi- K^+ channels in endothelin-induced vasoconstriction of mesenteric and submucosal arterioles. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. G1087-G1093, 1997.

HIRAMATSU, T.; KUME, H.; KOTLIKOFF, M. I.; TAKAGI, K. Role of calcium-activated potassium channels in the relaxation of tracheal smooth muscles by forskolin. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 21:, p. 367-375, 1994.

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. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, n. 6, p. 981-988, 2004.

HONDA, K.; TAKANO, Y.; KAMIYA, H. Involvement of protein kinase C in muscarinic agonist-induced contractions of guinea pig ileal longitudinal muscle. **Gen. Pharmac.**, v. 27, n. 6, p. 957-961, 1996.

HONG, S. J.; ROAN, Y.; CHANG, C. C. Spontaneous activity of guinea pig ileum longitudinal muscle regulated by Ca^{2+} -activated K^+ channel. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. G962-G971, 1997.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores. **Série de textos da Escola de Verão em Química-IV**, São Carlos, SP, EdUFSCar, p.152, 2003.

HUANG, Y.; LAU, C. W.; CHAN, F. L.; YAO, X. Q. Contribution of nitric oxide and K^+ channel activation to vasorelaxation of isolated rat aorta induced by procaine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 367, n. 2-3, p. 231-237, 1999.

HURWITZ, L.; MCGUFFEE, L. J.; LITTLE, S. A.; BLUMBERG, H. Evidence for two distinct types of potassium-activated calcium channels in an intestinal smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 214, p. 574-581, 1980.

ISHII, T. M.; MAYLIE, J.; ADELMAN, J. P. Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 23195–23200, 1997.

IWU, M. In: **Handbook of African medicinal plants**. Boca Raton, CRC Press, p. 145, 1993.

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

JIM, K.; HARRIS, A.; ROSENBERGER L. B.; TRIGGLE, D. J. Stereoselective and non-stereoselective effects of D 600 (Methoxyverapamil) in smooth muscle. **Eur. J. Pharmac.**, v. 76, p. 67-72, 1981.

JOHNS, R. A. The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway. In: Yaksh TL, Lynch III C, Zapol WM, Maze M, Biebuyck JF, Saidman LJ (eds). **Anesthesia: biologic foundations**. New York: Lippincott–Raven, p. 131–143; 1997.

JOINER, W. J.; WANG, L. Y.; TANG, M. D.; KACZMAREK, L.K. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 11013–11018, 1997.

KANNAN, M. S.; JOHNSON, ID. E. Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels. **Life Sci.**, v. 56, p. 2229-2238, 1995.

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

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.

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

KOBAYASHI, S.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and α -adrenergic Ca^{2+} -release in smooth muscle: physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 17997 - 18004, 1989.

KOHLER, 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. **Sc.**, v. 273, p. 1709–1714, 1996.

KOMORI, S.; ITAKAKI, M.; UNNO, T.; OHASHI, H. Caffeine and carbachol act on common Ca^{2+} stores to release Ca^{2+} in guinea-pig ileal smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 277, n. 2-3, p. 173-180, 1995.

KUME, H.; HALL, I. P.; WASHBAU, 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, 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, p. 152–154; 1989.

LATORRE, R.; OBERHAUSER, A.; LABARCA, P.; ALVAREZ, O. Varieties of calcium-activated potassium channels. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 51, p. 385 - 399, 1989.

LEDOUX, J.; WERNER, M.E.; BRAYDEN, J.E.; NELSON, M.T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology**, v. 21, p. 69-78, 2006.

LI, L.; VAALI, K.; VAPAATALO, H.; KANKAANRANTA, H. Effects of K^{+} channel inhibitors on relaxation induced by flufenamic and tolafenamic acids in guinea-pig trachea. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 383, n. 2, p.169-176, 1998.

LI, C.; LEE, D.; GRAF, T. N.; PHIFER, S. S.; NAKANISHI, Y.; BURGESS, J. P.; RISWAN, S.; SETYOWATI, F. M.; SARIBI, A. M.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; FALKINHAM, J. O.; KROLL, D. J.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C.; OBERLIES, N. H. A Hexacyclic ent-Trachylobane Diterpenoid Possessing an Oxetane Ring from *Mitrephora glabra*. **Organic Letters**, v. 7, n. 25, p. 5709-5712, 2005.

LIN, M. T.; HESSINGER, D. A.; PEARCE, W. J.; LONGO, L. D. Modulation of BK channel calcium affinity by differential phosphorylation in developing ovine basilar artery myocytes. **American Journal of Physiol - Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 2, p. H732-740, 2006.

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

LUNDY, P. M.; FREW, R. E. Evidence of ω -conotoxin GVIA-sensitive Ca^{2+} channels in mammalian peripheral nerve terminals, **Eur. J. Pharmacol.** **156** p. 325-330. 1988.

LUNDY, P. M.; FREW, R. Effect of ω -agatoxin-IVA on autonomic neurotransmission, **Eur. J. Pharmacol.** 261 p. 79-84. 1994.

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M.-V. D.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R. D.;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-óico (labdano-302) isolado de *Xylopiá langsdorfiana* A. St.-Hill & Tul. Em íleo isolado de cobaia. 2008. **Dissertação (Mestrado)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba.

MACKINNON, R. Potassium channels. **Feder. of Europ. Biochem. Soc. Letters**, v. 555, n. 1, p. 62-65, 2003.

MARTINS, D.; HAMERSKI, L.; ALVARENGA, S. A. V.; ROQUE, N. F. Labdane dimers from *Xylopiá aromática*. **Phytochem.**, v. 51, n. 6, p. 813-817, 1999.

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

MAUE, R. A.; DIONNE, V. E. Patch-clamp studies of isolated mouse olfactory receptor neurons. **The J. of Gen. Physiol.**, v. 90, p. 95-125, 1987.

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

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

McMANUS, O. B.; HELMS, L. M. H.; PALLANCK, L.; GANETZKY, B.; SWANSON, R.; LEONARD, R. J. Functional role of the β subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. **Neuron**, v. 14, p. 645-650, 1995.

MEERA, P.; ANWER, K.; MONGA, M.; OBERTI, C.; STEFANI, E.; TORO, L.; SAMBOR, B. M. Relaxin stimulates myometrial calcium-activated potassium channel activity via protein kinase A. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. C312 - C317, 1995.

MELO, A. C., COTA, B. B., OLIVEIRA, A. B., BRAGA, F. C. HPLC quantitation of Kaurane Diterpene in *Xylopia* Species. **Fitoter.**, 72, p. 40. 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 Sci* 53:1129–1135; 1993.

MISHRA, S. K.; AARONSON, P. I. A role for a glibenclamide-sensitive, relatively ATP-insensitive K^+ current in regulating membrane potential and current in rat aorta. **Cardiovasc. Res.**, v. 44, n. 2, p. 429-435, 1999.

MUNIZ, G.; CUPERTINO-SILVA, Y. K.; SILVA, D. J. C.; SOUZA, E. T.; TAVARES, J. F.; MATTA, C. B. B.; SILVA, M. S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória de diterpenos isolados de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). **Anais 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**. Ribeirão Preto-SP, 2009.

MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of th gut. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 68, p. 345-374, 2006.

NELSON, M. T., QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **A. J. of Physiol.**, v. 268, p. C799–C822 (*Cell Physiology* 37), 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. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, n. 4, p. 597–606, 2003.

NISHIMURA, J.; MORELAND, S.; AHN, H.; KAWASE, T.; MORELAND, R.; VAN BREEMEN, C. Endothelin increases myofibrillar Ca^{2+} sensitivity in α -toxin-permeabilized rabbit mesenteric artery. **Circ. Res.**, v. 71, p. 951–959; 1992.

NOUAILHETAS, V. L. A.; SHIMUTA, S. I.; PAIVA, A. C. M.; PAIVA, T. B. Calcium and sodium dependence of the biphasic response of the guinea-pig ileum agonists. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 116, p. 41-47, 1985.

OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; MAFRA, R. A.; ARAUJO, D. A. M.; 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). **V. Pharmacol.**, v. 44, n. 5, p. 338-344, 2006.

ORALLO, F. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. **Pharmacol. and Therap.**, v. 69, p. 153-171; 1996.

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

PAYNE, R.; CORSON, D. W.; FEIN, A.; BERRIDGE, M. J. Excitation and adaptation of Limulus ventral photoreceptors by inositol 1,4,5 triphosphate result from a rise in intracellular calcium. **The J. of Gen. Physiol.**, v. 88, n. 1, p. 127-142, 1986.

PELAIA, G.; GALLELLI, L.; VATRALLA, 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 Sci.**, v. 70, n. 9, p. 977-990, 2002.

PETKOV, G. V.; BONEV, A. D.; HEPPNER, T. J.; BRENNER, R.; ALDRICH, R. W.; NELSON, M. T. Related beta1-subunit of the Ca^{2+} -activated K^{+} channel regulates contractile activity of mouse urinary bladder smooth muscle. **J. Physiol.**, v. 537, p. 443-452, 2001.

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-SP, 2009.

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

PRIOR, H. M.; YATES, M. S.; BEECH, D. J. Functions of large conductance Ca^{2+} -activated (BKCa), delayed rectifier (K_v) and background K^{+} channels in the control of membrane potential in rabbit renal arcuate artery. **J. of Physiol.**, 511.1, p. 159-169, 1998.

PUPO, M.T.; GALLO, M. B. C. Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Quím. Nov.**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

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, 2006, Águas de Lindóia. **Livro de Resumos da 28ª reunião anual da sociedade brasileira de química**, 2006.

QUEST, U. Potassium channel openers: pharmacological and clinical aspects. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 6, p. 279–293, 1992.

QUEST, U.; COOK, N. S. Moving together: K⁺-channel openers and ATP-sensitive K⁺-channels. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 10, p. 431–435, 1989.

REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension** 20:129–137; 1992.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; M. **B. of Smooth Muscle Contraction**. San Diego, Academic Press, p. 227 –239, 1996.

RIBEIRO, L. A. A. A ação relaxante do ácido labda-8(17),12E,14-trien-18-óico, diterpeno isolado de *Xylopija langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae), envolve canais de potássio. 2003. **Dissertação (Mestrado)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

RIBEIRO, L. A. A. Estudo do efeito relaxante do ácido 8(17),12e,14-labdatrieno-18-óico (labdano-302): um novo diterpeno ativador da via da ciclase de adenilil? 2007. **Tese (Doutorado)** Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 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-óico (labdano302), diterpeno tipo labdano isolado de *Xylopija langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 17, n. 2, p. 197-203, 2007.

ROBERTSON, B. E.; NELSON, M. T. Aminopyridine inhibition and voltage dependence of K⁺ currents in smooth muscle cells from cerebral arteries. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. C1589-C1597, 1994.

ROMERO, F.; SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A.; ABOULAFIA, J. Activation of Ca²⁺-activated K⁺ (maxi-K⁺) channel by angiotensin II in myocytes of the guinea-pig ileum. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. C983-C991, 1998.

SAH, P.; FABER, E. S. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. **Prog. Neurobiol.**, v. 66, p. 345–353, 2002.

SANBORN, B. M. Relationship of Ion Channel Activity to Control of Myometrial Calcium. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v. 7, p. 4–11, 2000.

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

SARSERO, D.; FUJIWARA, T.; MOLENAAR, P.; ANGUS, J. A. Human vascular to cardiac tissue selectivity of L- and T-type calcium channel antagonists. **Br. J. Pharmacol.**, v. 125, p. 109–119, 1998.

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. **Gen. Pharmacol.**, v. 28, n. 3, p. 453-457, 1997.

SCHMALZ, F.; KINSELLA, J.; KOH, S. D.; VOGALIS, F.; SCHNEIDER, A.; FLYNN, E. R.; KENYON, J. L.; HOROWITZ, B. Molecular identification of a component of delayed rectifier current in gastrointestinal smooth muscles. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. G901-G911, 1998.

SCHREIBER, M.; WEI, A.; YUAN, A.; GAUT, J.; SAITO, M.; SALKOFF, L. Slo3, a novel pH-sensitive K^+ channel from mammalian spermatocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 3509-3516, 1998.

SCHULZ, S.; WALDMAN, S. A. The guanylyl cyclase family of natriuretic peptide receptors. **Vitamins and hormones**. V. 57, p. 123-51, 1999.

SHIKADA, K. & TANAKA, S. K^+ channel openers produce epithelium-dependent relaxation of the guinea-pig trachea. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 282, p. 193-197, 1995.

SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A.; ABOULAFIA, J. Desensitization to ANG II in guinea-pig ileum depends on membrane repolarization: role of maxi- K^+ channel. **Am. J. Physiol. - Cell Physiol.**, v. 277, n. 4, p. C739-C745, 1999.

SILVA, E. G.; FREDIANI-NETO, E.; FERREIRA, A. T.; PAIVA, A. C. M.; PAIVA, T. B. Role of Ca^{2+} -dependent K -channel in the membrane potential and contractility of aorta from spontaneously hypertension rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 113, p. 1022-1028, 1994.

SILVA, E. G.; OKUYAMA, P.; PAIVA, T. B. Role of Ca^{2+} -dependent K^+ channels in the membrane potential and contractility of uterus from spontaneously hypertensive rats. **Pathophysiol.**, v. 3, p. 259-265, 1996.

SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. Plantas Medicinais: In: J. C. T. Carvalho, Fitoterápicos. Antiinflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP, **Tecmedd**, p. 480, 2004.

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. **Braz. J. Pharm. Sci.** **41**, p. 481, 2005.

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

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **J. Physiol.**, v. 522, p. 177-185, 2000.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 1325-1358, 2003.

SOMLYO, A. V.; KHROMOV, A. S.; WEBB, M. R.; FERENCZI, M. A.; TRENTAM, D. R.; HE, Z. H.; SHENG, S.; SHAO, Z.; SOMLYO, A. P. Smooth muscle myosin: regulation and properties. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 359, n. 1452, p. 1921-1930, 2004.

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

SONNENBURG, W. K.; BEAVO, J. A. Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. **Adv Pharmacol**, v. 26, p. 87-114, 1994.

SPEDDING, M.; PAOLETTI, R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. **Pharmacol. Rev.**, v. 44, p. 363-376, 1992.

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

SUN, Y. D.; BENISHIN, C. G. K^+ channel openers relaxes longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 271, p. 453-459, 1994.

TAKAHASHI, J. A.; VIEIRA, H. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Mono and diterpenes from seeds of *Xylopi sericea*. **Q. Nov.**, v. 24, n. 5, p. 616-618, 2001.

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

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

TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; SILVA, M. V. B.; DINIZ, M. F. F. M.; FILHO, J. M.; DA-CUNHA, E. V.; SIMONE, C. A.; JUNIOR, J. X.; MELO, P. S.; HAUN, M.; SILVA, M. S. ent-trachylobane diterpenoids from *Xylopi langsdorffiana*. **J. of Nat. Prod.**, v. 69, n. 6, p. 960-962, 2006.

TERAMOTO, N. Physiological roles of ATP-sensitive K^+ channels in smooth muscle. **J. Physiol.**, v. 572, p. 617-624, 2006.

TERAMOTO, N.; BRADING, A. F.; ITO, Y. Glibenclamide-sensitive K^+ channels underlying levromakalim-induced relaxation in pig urethra. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 365, p. 291-300, 1999.

TERAMOTO, N.; NAKASHIMA, T.; ITO, Y. Properties and pharmacological modification of ATP-sensitive K⁺ channels in cat thacheal myocytes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 130, p. 625-635, 2000.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 83, p. 215–242, 2005.

TOMITA, T. Eletrical activity (spickes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscles. In: **Smo. Mus.: An asses. of cur. Knowl.**, p. 127-156, 1981.

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. **J. Cell Biol.**, v. 150, p. 797–806, 2000.

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

TRIGGLE, C. R.; SWAMY, V. C.; TRIGGLE, D. J. Calcium antagonists and contractile responses in rat vas deferens and guinea pig ileal smooth muscle. **Can. J. Phvsiol. Pharmac.**, v. 57, p. 804 818, 1979.

TRIGGLE, C. R.; TRIGGLE, D. J. An analysis of the action of cations of the lanthanide series on the mechanical responses of guinea-pig ileal longitudinal muscle. **J. Physiol. (Lond)**, v. 254, p. 39-54, 1976.

TRIGGLE, D. J.; ZHENG, W.; HAWTHORN, M.; KWON, Y. W.; WEI, X. Y.; JOSLYN, A.; FERRANTE, J.; TRIGGLE, A. M. Calcium channels in smooth muscle. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 560, p. 215-229, 1989.

TSCHIRHART, E.; FROSSARD, N.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 243, n. 1, p. 310-316, 1987.

UNNO, T.; KOMORI, S.; OHASHI, H. Inhibitory effect of muscarinic receptor activation on Ca²⁺ channel current in smooth muscle cells of guinea-pig ileum. **J. Physiol.**, v 484, n. 3, p. 567-581,1995.

USOWICZ, M. M.; GIGG, M.; JONES, L M. E.; CHEUNG, C. W.; HARTLEY, S. A. Allosteric interactions at L-type calcium channels between FPL 641 76 and the enantiomers of the dihydropyridine Bay K 8644. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 275, p. 638-645, 1995.

UYAMA, Y.; IMAIZUMI, Y.; WATANABE, M. Cyclopiazonic acid, an inhibitor of Ca²⁺-ATPase in sarcoplasmic reticulum, increases excitability in ileal smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 565-572, 1993.

VAANDRAGER, A. B.; DE JONGE, H. R. Signalling by cGMP-dependent protein kinases. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 157, p. 23–30; 1996.

VAN BREEMEN, C.; AARONSON, P.; LOUTZENHISER, R. Sodium-Calcium interaction in mammalian smooth muscle. **Pharmacol. Rev.**, v. 30, p. 167-208, 1979.

VAN DER 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. **Neuros. and Biobeh. Revie.**, v. 23, n. 8, p. 1087-1110, 1999.

VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 143, p. 299-330, 1963.

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

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nov.**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

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

VOGALIS, F.; WARD, S. M.; SANDERS, K. M. Correlation between electrical and morphological properties of canine pyloric circular. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. v. 260, p.390-398, 1991.

WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. **An. of Nutri. and Metabol.**, v. 47, n. 3-4, p. 95-106, 2003.

WANG, J.; JUHASZOVA, M.; RUBIN, L. J.; YUAN, X. J. Hypoxia inhibits gene expression of voltage-gated K⁺-channel subunits in pulmonary artery smooth muscle cells. **J. Clin. Invest.**, v. 100, p. 2347–2353, 1997.

WATERMAN, S.A. Voltage-gated calcium channels in autonomic neuroeffector transmission, **Prog. Neurobiol.** 60, p. 81–210. 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. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, 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, p. 263– 266; 1993.

WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 177, n. 1-2, p. 135-143, 2001.

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium signalling in smooth muscle. **Cell Cal.**, v. 38, p. 397–407; 2005.

WU, X.; LU, C. H.; SHEN, Y. M. Three New *ent*-Trachylobane Diterpenoids from Co-cultures of the Calli of *Trewia nudiflora* and *Fusarium* sp. WXE. **Helv. Chim. Ac.**, v.92 (12), p. 2783-2789, 2009.

XU, C.; LU, Y.; TANG, G.; WANG, R. Expression of voltage-dependent K⁺ channel genes in mesenteric artery smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 277, p. G1055–G1063, 1999.

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. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. L621-L635, 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. **Br. J. Pharmacol.**, v. 139, p. 652–660, 2002.

ZHENG, W.; RAMPE, D.; TRIGGLE, D. J. Pharmacological, radioligand binding, and electrophysiological characteristics of FPL 64176, a novel nondihydropyridine Ca²⁺ channel activator, in cardiac and vascular preparations. **Mol Pharmacol.**, v. 40, p. 734-741, 1991.

Anexos



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
CERTIDÃO

João Pessoa, 29 de janeiro de 2008

CEPA Nº. 0101/08

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadores – Orientadora: Prof^a.Dr^a. Bagnólia Araújo da Silva; Co-Orientadora:
Prof^a.Dr^a. Jeannine Aboulafia; Colaborador: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva; Doutoranda:
Rosimeire Ferreira dos Santos.

Departamento/Setor: DCF/LTF

Ref.: Projeto de Pesquisa: “INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA DO
ÁCIDO *ENT-7 α -ACETOXYTRACHYLOBAN-18-OICO* (TRACHYLOBANE-360)
ISOLADO DE *Xylopi langsdorffiana* St-Hil. & Tul. (ANNONACEAE), E DOS SEUS
DERIVADOS SINTÉTICOS”

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.

Atenciosamente,

Prof. Dr. REINALDO NOBREGA DE ALMEIDA
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB