

RAFAEL DE ALMEIDA TRAVASSOS

**ENVOLVIMENTO DE CANAIS PARA POTÁSSIO E DE
NUCLEOTÍDIOS CÍCLICOS NO MECANISMO DE AÇÃO
TOCOLÍTICO DO ÁCIDO 8(17),12*E*,14-LABDATRIENO-18-ÓICO
(LABDANO-302) EM ÚTERO ISOLADO DE RATA**

**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

RAFAEL DE ALMEIDA TRAVASSOS

**ENVOLVIMENTO DE CANAIS PARA POTÁSSIO E DE
NUCLEOTÍDIOS CÍCLICOS NO MECANISMO DE AÇÃO
TOCOLÍTICO DO ÁCIDO 8(17),12*E*,14-LABDATRIENO-18-ÓICO
(LABDANO-302) EM ÚTERO ISOLADO DE RATA**

Dissertação 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 MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOLOGIA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

João Pessoa - PB

2010

T779e Travassos, Rafael de Almeida

Envolvimento de canais para potássio e de nucleotídeos cíclicos no mecanismo de ação tocolítico do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrieno-18-óico (labdano-302) em útero isolado de rata / Rafael de Almeida Travassos – João Pessoa [s.n.], 2010.

120f.: il.

Orientadora: Bagnólia Araújo da Silva
Dissertação (Mestrado) – CCS/UFPB

1. Farmacologia. 2. Labdano-302 3. Ação tocolítica. 4. Canais para potássio.
5. Nucleotídeos cíclicos

UFPB / BC

CDU: 615 (043)

RAFAEL DE ALMEIDA TRAVASSOS

**ENVOLVIMENTO DE CANAIS PARA POTÁSSIO E DE
NUCLEOTÍDIOS CÍCLICOS NO MECANISMO DE AÇÃO
TOCOLÍTICO DO ÁCIDO 8(17),12E,14-LABDATRIENO-18-ÓICO
(LABDANO-302) EM ÚTERO ISOLADO DE RATA**

Aprovada em / /

BANCA DE EXAMINADORA

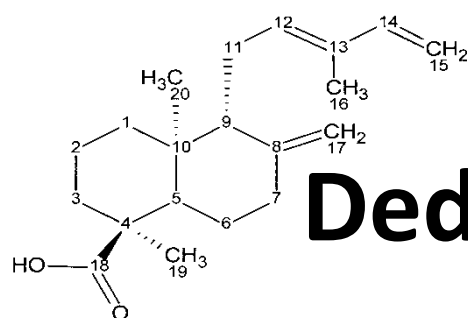
**Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora**

**Profa. Dra. Leônia Maria Batista
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Interna**

**Prof. Dr. Luciano Augusto de Araújo Ribeiro
(Universidade Federal do Vale do São Francisco)
Examinador Externo**

“Se **A** é sucesso na vida, então $A = x + y + z$; onde x = trabalho, y = diversão e z = ficar com a boca fechada.”

(Albert Einstein)



Dedicatórias

Aos meus pais,

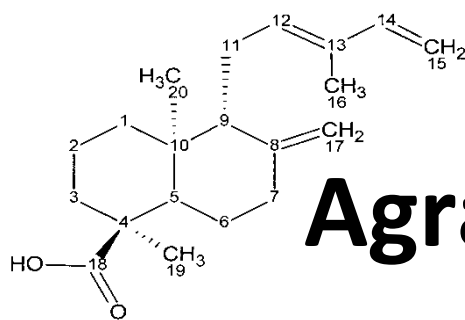
Antonio Eustaquio R. Travassos e Martha Helena de A. Travassos, que me apoiaram em todas as etapas desde o início, dando-me os suportes material e espiritual para que eu não desanimasse diante das adversidades. Por terem norteado minha formação ética e moral, que carregarei por toda minha vida. Exemplos de luta e coragem conseguiram fazer com que eu desse o melhor de mim naquilo que me propus a fazer.

À minha irmã,

Renata de Almeida Travassos, pelo carinho e amor a mim dispensados, minha amiga de sempre e para sempre.

À minha querida avó,

Maria das Neves Coutinho de Almeida, sempre pronta a me ajudar, ouvindo-me nos momentos de incerteza e transmitindo o seu amor de avó nos momentos difíceis. Com seu amor, conseguiu estimular-me a criatividade necessária para transpor os desafios, transmitindo a sua forma positivista de observar o mundo. Eternas saudades. (*In memoriam*)



Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por colocar no meu caminho pessoas tão especiais.

À minha orientadora, Profa. Dra. Bagnólia A. Silva. Porque orientar não é simplesmente ensinar e indicar rumos no trabalho, mas ser orientador é, sobretudo, ser exemplo. Obrigado pela confiança e oportunidade que me foi oferecida, mas principalmente pela amizade, pelos sorrisos e pelos excelentes ensinamentos que certamente foram muito além do científico e que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

Agradeço especialmente a doutoranda Rosimeire Ferreira dos Santos, que caminha comigo desde a iniciação científica, pela competência, (muita) paciência e dedicação. Não há palavras suficientes para agradecer por sempre acreditar em mim, e por todo carinho, amizade, incentivo e apoio a mim dispensados durante toda essa jornada.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas: Italo Martins, Juliana Carreiro, Ana Caroline Lima e Gislaine Oliveira, pelo companheirismo, amizade, empenho, apoio científico, e pelos momentos agradáveis dentro e fora do laboratório.

A todos os colegas e amigos que estão ou passaram pelo Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, entre eles, Rosimeire Santos, Juliana Carreiro, Italo Martins, Gislaine Oliveira, Ana Caroline Lima, Fabio Monteiro, Anne Abreu, Joelmir Silva, Luciano Ribeiro, Cibério Macêdo, Ana Carolina Correia, Pollyana Meirelle, Fabrício Garcia, Vicente Costa, Fabiana Cavalcante, pela amizade e boa convivência.

A todos os colegas e amigos da turma do Mestrado 2009, do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Aos meus professores do Programa de Pós-Graduação, Bagnólia A. Silva, Demétrius A. M. Araújo, Isac A. Medeiros, Margareth F. F. Melo Diniz, José M. Barbosa-Filho, Celidarque S. Dias, Rui O. Macêdo, Reinaldo N. Almeida, Luíz Cezar, Cláudio Santos, Stuckert-Seixas, entre outros, muito obrigado.

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

À Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa do Departamento de Biologia Molecular/UFPB por ter me cedido o labdano-302, objeto de estudo neste trabalho, que ainda tinha em seu poder, contribuindo de maneira inestimável para o andamento deste trabalho.

À Coordenação da Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos em nome dos Professores Dra. Márcia Regina Piuvezam e Dr. *Eduardo* de Jesus Oliveira, pela dedicação, empenho e competência.

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

A José Crispim Duarte, pela sua amizade, competência e auxílio técnico nos mais variados problemas.

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

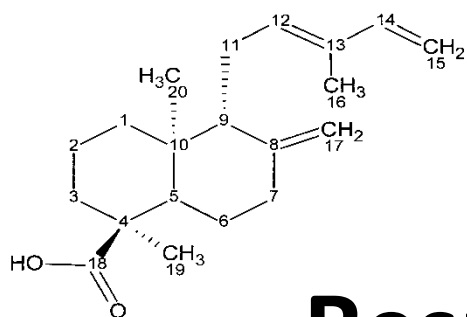
Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro na concessão da minha bolsa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte técnico-científico através do Portal Periódicos.

À Universidade Federal da Paraíba, instituição maior, pelo desenvolvimento na minha carreira profissional.

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

Muito Obrigado!

Rafael de Almeida Travassos

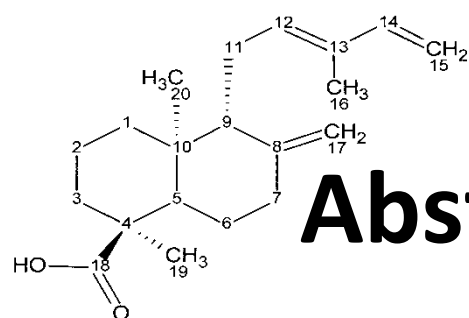


Resumo

RESUMO

O ácido 8(17),12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano-302) é um diterpeno isolado das cascas do caule de *Xylopia langsdorffiana* A. St.-Hil. & Tul. Em estudos anteriores Ribeiro (2003) demonstrou que o labdano-302 inibiu de maneira equípote as contrações fásicas induzidas por carbacol e ocitocina em útero de rata. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar o mecanismo de ação tocolítico do labdano-302. As contrações isométricas e isotônicas foram monitoradas e os parâmetros de potência e eficácia relativas foram determinados a partir de curvas de concentrações-resposta cumulativas. O labdano-302 inibiu as curvas cumulativas ao carbacol ($pD'_2 = 3,4 \pm 0,1$; $r^2 = 0,9 \pm 0,05$) e ocitocina ($pD'_2 = 3,8 \pm 0,2$; $r^2 = 0,9 \pm 0,04$) e estas foram desviadas para direita, de forma não paralela ("slope" de Schild = $0,15 \pm 0,04$ e $1,13 \pm 0,1$ respectivamente), com redução do E_{max} , sugerindo um antagonismo não competitivo. O labdano-302 não foi eficaz em antagonizar as contrações induzidas por 60 mM de KCl apresentando um $E_{max} = 9,75 \pm 0,07\%$, por outro lado, labdano-302 relaxou de maneira significativa e dependente de concentração quando o útero era pré-contraído por ocitocina ($pD_2 = 4,3 \pm 0,06$), sugerindo que este diterpeno deve estar agindo por uma modulação positiva de canais para potássio. Os canais para K^+ desempenham um papel chave na regulação do potencial de membrana e modulação dos Ca_v , então decidiu-se investigar a participação desses canais na ação tocolítica do labdano-302. A potência relaxante de labdano-302 ($pD_2 = 4,3 \pm 0,06$) foi reduzida em aproximadamente 16 vezes na presença de CsCl ($pD_2 = 3,1 \pm 0,06$), bloqueador não seletivo dos canais para K^+ , confirmando a participação de canais para K^+ no efeito relaxante do labdano-302. Para verificar qual(is) canal(is) para K^+ estariam envolvidos usou-se bloqueadores seletivos desses canais. O fato da 4-aminopiridina, bloqueador seletivo dos canais para K^+ abertos por voltagem (K_v), e da glibenclamida, bloqueador seletivo dos canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) não alterar o efeito relaxante do labdano-302 indica que os K_v e os K_{ATP} não estariam envolvidos em seu mecanismo de ação tocolítico. Entretanto, a curva concentração-resposta de relaxamento induzida pelo labdano-302 foi desviada para direita na presença de apamina ($pD_2 = 3,8 \pm 0,03$), um bloqueador seletivo dos canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de pequena condutância (SK_{Ca}), ou de tetraetilamônio 1 mM ($pD_2 = 3,6 \pm 0,04$), que nesta concentração é um bloqueador seletivo dos canais para K^+ de grande condutância ativados por cálcio (BK_{Ca}). A participação dos BK_{Ca} foi confirmada utilizando um bloqueador específico para esses canais a iberiotoxina (IbTx) ($pD_2 = 3,8 \pm 0,06$), sugerindo o envolvimento dos SK_{Ca} e dos BK_{Ca} no mecanismo de ação tocolítico do labdano-302 em útero isolado de rata. A aminofilina um inibidor não seletivo de fosfodiesterases (PDE) potencializou ($pD_2 = 7,8 \pm 0,1$) em cerca de 320 vezes o relaxamento produzido por labdano-302 em útero de rata. Conclui-se que o mecanismo de ação relaxante do labdano-302 em útero isolado de rata envolve a modulação positiva de canais para K^+ , mais especificamente os SK_{Ca} e BK_{Ca} , que modulam indiretamente os Ca_v , levando a uma conseqüente redução da $[Ca^{2+}]_c$, e que nucleotídeos cíclicos como o AMPc e GMPc podem estar envolvidos nesta ação.

Palavras-chave: Labdano-302. Ação tocolítica. Canais para potássio. Nucleotídeos cíclicos. Útero de rata.



Abstract

ABSTRACT

8(17),12E,14-labdatrien-18 oic acid (labdane-302), is a diterpene isolated from the stem bark of *Xylopiá langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. In a preliminary study, Ribeiro (2003) demonstrated that labdane-302 inhibited in an equipotent manner the phasic contractions induced by carbachol or oxytocin in rat uterus. The aim of the present study was to investigate the spasmolytic action mechanism of labdane-302 in that organ. Isometric and isotonic contractions were monitored and the parameters of relative potency and efficacy were determined from cumulative concentration-response curves. Labdane-302 inhibited the cumulative concentration-response curves to carbachol ($pD'_2 = 3.4 \pm 0.1$; $r^2 = 0.9 \pm 0.05$) and oxytocin ($pD'_2 = 3.8 \pm 0.2$; $r^2 = 0.9 \pm 0.04$) these were shifted to the right, in a non-parallel manner (Schild plot slope = 0.15 ± 0.04 and 1.13 ± 0.1 respectively), with reduction of the maximal effect (E_{max}), suggesting a noncompetitive antagonism. Labdane-302 was not effective in relaxing the uterus pre-contracted by 60 mM KCl ($E_{max} = 9.75 \pm 0.07\%$), on the other hand, relaxed in a significant and concentration dependent manner the rat uterus pre-contracted by oxytocin ($pD_2 = 4.3 \pm 0.06$), suggesting a possible involvement of the K^+ channels in the spasmolytic effect caused by labdane-302. Because K^+ channels play a major role in the regulation of membrane potential and modulation of Ca_v , we decided to investigate the participation of K^+ channels in the spasmolytic action of labdane-302. The relaxant potency of labdane-302 ($pD_2 = 4.3 \pm 0.06$) was decreased about 16 times in the presence of CsCl ($pD_2 = 3.1 \pm 0.06$), a non-selective K^+ channels blocker, suggesting a possible involvement of the K^+ channels in the tocolytic effect of the labdane-302. In order to verify which subtypes of K^+ channels could be involved we used selectives blockers of these channels. The observation that 4-aminopyridine, a selective blocker of voltage-gated K^+ channels (K_v), and that glibenclamide, a selective blocker of the ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP}) did not change the relaxant effect of labdane-302 suggests that K_v and K_{ATP} are not involved in its action mechanism. However, the log concentration-response curve induced by labdane-302 was shifted to the right in the presence of apamine ($pD_2 = 3.8 \pm 0.03$), a selective blocker of the small-conductance calcium-activated K^+ channels (SK_{Ca}) and TEA $^+$ 1 mM ($pD_2 = 3.6 \pm 0.04$), a selective blocker of the large conductance calcium-activated K^+ channels (BK_{Ca}). The involvement of BK_{Ca} was confirmed using a specific blocker of that channels iberitoxin (IbTx) ($pD_2 = 3.8 \pm 0.06$), suggesting the involvement of SK_{Ca} and BK_{Ca} in the tocolytic action mechanism induced by labdane-302 on uterus rat. The aminophylline a nonselective inhibitor of phosphodiesterases (PDE) potentiated ($pD_2 = 7.8 \pm 0.1$) in about 320 times the relaxation produced by labdane-302 in rat uterus. The results suggest that effect of labdane-302 on uterus rat, involves the activation of the SK_{Ca} e BK_{Ca} , which modulate indirectly the Ca_v , leading to a decrease the $[Ca^{2+}]_c$, and cyclic nucleotides like cAMP and cGMP may be involved in this tocolytic action.

Keywords: Labdane-302. Tocolytic action. Potassium channels. Cyclic nucleotides. Rat uterus.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotografia de *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (A); detalhe das folhas e flores (B).....08
- Figura 2.** Estrutura química do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrieno-18-óico (labdano-302).....08
- Figura 3.** Sinalização mediada por receptores acoplados a G_q e/ou G₁₃ durante a fase sustentada da contração (Adaptado de MURTHY, 2006).....15
- Figura 4.** Aparelhos utilizados para o registro de contrações: aparato para registro das contrações isotônicas com cilindro esfumaçado de um quimógrafo (A), transdutor de força FORT 10 (B), aparato para registro das contrações isométrica e amplificador TMB4M (C), cuba de banho para órgão isolado (D), sistema de banho para órgão isolado com transdutor de força isométrico TIM 50 (E), amplificador AECAD 04F (F)..... 22
- Figura 5.** Registros originais representativos do efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl, na ausência (A) e na presença do labdano-302 (B) em útero isolado de rata.....32
- Figura 6.** Registros originais representativos do efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença de labdano-302 (B) em útero isolado de rata.....33
- Figura 7.** Registros originais representativos do efeito relaxante do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença de 5 mM de CsCl (B) em útero isolado de rata.....36

Figura 8. Registros originais representativos do efeito relaxante do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença de 3 mM de 4-AP (**B**) em útero isolado de rata.....39

Figura 9. Registros originais representativos do efeito relaxante do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença de glibenclamida (**B**) em útero isolado de rata.....42

Figura 10. Registros originais representativos do efeito relaxante do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença de apamina (**B**) em útero isolado de rata.....45

Figura 11. Registros originais representativos do efeito relaxante do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença de 1 mM de TEA⁺ (**B**) em útero isolado de rata.....48

Figura 12. Registros originais representativos do efeito relaxante do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença de 100 nM de IbTx (**B**) em útero isolado de rata.....51

Figura 13. Registros originais representativos do efeito relaxante do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença de 100 nM de aminofilina (**B**) em útero isolado de rata.....54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curvas concentrações-resposta cumulativas ao carbacol **(A)** na ausência (■) e na presença de labdano-302 nas concentrações de 3×10^{-5} (□), 10^{-4} (●) e 3×10^{-4} M (○) em útero isolado de rata (n = 5). O gráfico **(B)** representa o log (DR-1) em função do log da concentração molar do labdano-302.....29

Gráfico 2. Curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina **(A)** na ausência (■) e na presença de labdano-302 nas concentrações de 3×10^{-4} (□), 10^{-3} (●) e 3×10^{-3} M (○) em útero isolado de rata (n = 3). O gráfico **(B)** representa o log (DR-1) em função do log da concentração molar do labdano-302.....30

Gráfico 3. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (■) em útero isolado de rata (n = 5).....34

Gráfico 4. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 5 mM de CsCl em útero isolado de rata (n = 5).....37

Gráfico 5. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 3 mM de 4-AP em útero isolado de rata (n = 5).....40

Gráfico 6. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 3×10^{-5} M de glibenclamida em útero isolado de rata (n = 5).....43

Gráfico 7. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 100 mM de apamina em útero isolado de rata (n = 5).....46

Gráfico 8. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 1 mM de TEA⁺ em útero isolado de rata (n = 5).....49

Gráfico 9. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 100 nM de IbTx em útero isolado de rata (n = 5).....52

Gráfico 10. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 10^{-4} M de aminofilina em útero isolado de rata (n = 5).....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da solução de Locke Ringer.....20

Tabela 2. Valores de pD_2 e CE_{50} do labdano-302 na ausência (controle) e na presença de diversos bloqueadores de canais para potássio.....52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP	4-aminopiridina
AMPC	monosfato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
BK_{Ca}	canais para potássio de grande condutância ativados por cálcio
[Ca²⁺]	concentração de Ca ²⁺
[Ca²⁺]_c	concentração de Ca ²⁺ citosólico
CaM	calmodulina
Ca_v	canais para cálcio abertos por voltagem
Ca_v1	canais para cálcio dependentes de voltagem do subtipo 1
Ca_vL	canais para cálcio dependentes de voltagem do subtipo 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
CsCl	cloreto de cério
DAG	diacilglicerol
e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
G_{αq}	subunidade α da proteína G _q
G_{12/13}	proteínas G heterotriméricas tipos 12 e 13
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GPCRs	receptores acoplados a proteína G
GTP	trifosfato de guanosina
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol

K_{ATP}	canais para potássio sensíveis ao ATP
K_v	canais para potássio abertos por voltagem
K_{ir}	canais para potássio retificadores de entrada
labdano-302	ácido 8(17),12 <i>E</i> ,14-labdatrieno-18-óico
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
<i>p</i>	probabilidade
pD₂	logaritmo negativo (na base 10) da concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo
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
r²	coeficiente de correlação linear
R²	coeficiente de correlação não-linear
RhoA	pequena proteína ligante de GTP
ROCK	cinase dependente de RhoA
RS	retículo sarcoplasmático
SK_{Ca}	canais para K ⁺ de pequena condutância ativados por Ca ²⁺
TEA⁺	íon tetraetilamônio
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

vs

versus

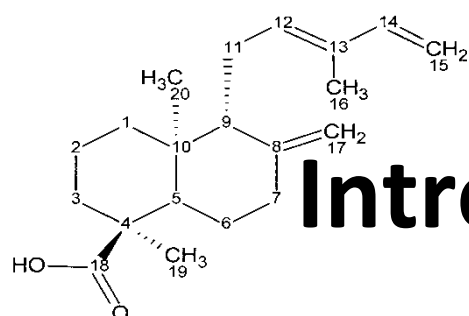
OBS: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicos.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 MATERIAL.....	19
3.1.1 Material Botânico.....	19
3.1.2 Animais.....	19
3.1.3 Drogas e Reagentes.....	19
3.1.4 Solução Nutritiva.....	20
3.1.5 Preparação da solução-estoque da substância em estudo.....	20
3.1.6 Aparentagem.....	21
3.2 MÉTODOS.....	23
3.2.1 Investigação do mecanismo de ação tocolítico do labdano-302 em útero isolado de rata.....	23
3.2.1.1 Característica do antagonismo da contração induzida por carbacol ou por ocitocina.....	23
3.2.1.2 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou ocitocina.....	24
3.2.2 Avaliação do envolvimento dos canais para potássio no mecanismo de ação tocolítico do labdano-302.....	24
3.2.2.1 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl).....	24

3.2.2.2 Efeito do labdano-302 sobre às contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de 4 aminopiridina (4-AP), glibenclamida, apamina, tetraetilamônio (TEA+) ou iberiotoxina (IbTx).....	25
3.2.3 Investigação da participação dos nucleotídeos cíclicos no mecanismo da ação tocolítico do labdano-302.....	26
3.2.3.1 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de aminofilina.....	26
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4 RESULTADOS.....	28
4.1 Investigação do mecanismo de ação tocolítico de labdano-302 em útero isolado de rata.....	29
4.1.1 Característica do antagonismo da contração induzida por carbacol ou por ocitocina.....	29
4.1.2 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina ou KCl.....	32
4.2 Avaliação do envolvimento dos canais para potássio no mecanismo de ação tocolítico do labdano-302.....	36
4.2.1 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de cloreto de cézio (CsCl).....	36
4.2.2 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de 4-aminopiridina (4-AP).....	39
4.2.3 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de glibenclamida.....	42
4.2.4 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de apamina.....	45
4.2.5 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de tetraetilamônio (TEA+).....	48

4.2.6 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de iberiotoxina (IbTx).....	51
4.2.7 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de aminofilina.....	54
5 DISCUSSÃO.....	57
6 CONCLUSÕES.....	69
7 PERSPECTIVAS.....	71
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO.....	93



Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

A busca para o alívio e/ou a cura das doenças pelo homem por milhares de anos era conseguida através da utilização dos produtos naturais, os quais existiam na forma de tinturas, chás e pós (BALICK, 1997; VIEGAS-JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Antes da “era sintética”, no início do ano de 1900, registrou-se que 80% dos remédios eram obtidos através de raízes, cascas e folhas (McCHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007).

Na década de 1940 com a segunda guerra mundial, os conflitos entre os povos impulsionaram o desenvolvimento tecnológico, principalmente da indústria farmacêutica. Esta aproveitou o desenvolvimento da informática e investiu no planejamento racional de fármacos. A idéia que se tinha era a de que seria possível a descoberta de moléculas biologicamente ativas e que combateriam todos os males da sociedade. Porém, a indústria farmacêutica em 2004 divulgou que o investimento na química computacional não correspondeu ao lançamento de fármacos inovadores. Além disso, a maioria da população não tem poder aquisitivo para compra de medicamentos inovadores (VIEGAS-JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Diante disso, houve um ressurgimento dos produtos naturais para a descoberta de novos fármacos ou mesmo de fitoterápicos, o que incentivou a pesquisa científica para a comprovação dos efeitos observados empiricamente (SIXEL; PECINALLI, 2005).

A pesquisa moderna em produtos naturais no Brasil teve início em meados do século passado e tem sido foco de constantes revisões, indicando uma preocupação com a diversidade a ser pesquisada, a qualidade e objetividade dos trabalhos bem como sua divulgação no meio científico (PUPO; GALLO, 2007)

Os produtos naturais são muito bem sucedidos como fontes de fármacos (HARVEY, 2000; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Aproximadamente 60% da população mundial depende quase que exclusivamente de plantas como remédio e os produtos naturais têm sido largamente reconhecidos como uma importante fonte de remédios terapeuticamente eficazes (FARNSWORTH, 1994; HARVEY, 2000).

Aproximadamente 50% das drogas introduzidas no mercado durante os últimos anos são derivadas, direta ou indiretamente, de pequenas moléculas biogênicas. No futuro, os produtos naturais irão desempenhar um grande papel como substâncias ativas, moléculas modelo para a descoberta e validação de drogas alvo (VUORELA et al, 2004).

A utilização das plantas medicinais na terapêutica tem em comum tanto bases históricas como químicas, sendo estas últimas fundamentadas na estrutura dos princípios ativos, independentemente da sua origem, natural ou semi-sintética. A maior parte dos fármacos empregados atualmente derivou direta ou indiretamente de princípios ativos isolados a partir de plantas (MONTEIRO, 2008).

O isolamento de substâncias a partir de plantas medicinais levou ao surgimento dos primeiros fármacos, como a cocaína, codeína, digitoxina, quinina e morfina (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; BUTLER, 2004; SAMUELSSON, 2004). O isolamento e caracterização de compostos farmacologicamente ativos de plantas medicinais continua até os dias atuais (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

A importância da utilização das moléculas de origem vegetal, pela indústria farmacêutica, repercute-se nos números dos medicamentos utilizados atualmente, sendo que cerca de 50% das mesmas são de origem sintética e aproximadamente 25% de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese. Assim, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e dos processos biotecnológicos, em torno de 25% dos medicamentos prescritos, nos países industrializados, ainda são originados de plantas, oriundos de mais de 90 espécies (FOGLIO et al., 2006).

Independente da razão pela qual os produtos naturais são largamente usados na produção de medicamentos, alguns dados merecem ser destacados. Em uma extensa análise de novas drogas introduzidas entre 1981 e 2002, 28% das 868 novas entidades químicas foram produtos naturais ou derivados de produtos naturais, com outros 24% criados de um farmacóforo de um produto natural (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Além desses produtos lançados, pelo menos 70 compostos relacionados com produtos naturais foram submetidos a ensaios clínicos em 2004 (BUTLER, 2005).

Nas áreas da terapêutica do câncer e doenças infecciosas, 60% e 75% dos novos medicamentos, respectivamente, foram originados a partir de fontes naturais entre 1981 e 2002 (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Entre

2001 e 2005, 23 novas drogas derivadas de produtos naturais foram introduzidas para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, câncer, diabetes, dislipidemia, dermatite atópica, doença de Alzheimer e as doenças genéticas, como a tirosinemia e a doença de Gaucher (LAM, 2007).

Pelo menos 23 drogas obtidas a partir de produtos naturais ou derivadas de produtos naturais, foram lançados na Europa, Japão ou Estados Unidos entre 2001 e 2005. Além disso, um total de 136 novas drogas obtidas de produtos naturais ou derivadas de produtos naturais tenha passado por diversas fases do desenvolvimento clínico em todas as principais áreas terapêuticas (BUTLER, 2005).

É importante ressaltar a diminuição no número de aprovações de novos medicamentos pelo FDA (Food and Drug Administration) através dos anos (40 aprovações de medicamentos em 1996 para 20 em 2006) e levando em consideração as contribuições dos produtos naturais na descoberta de novas drogas, pode-se avaliar a importância dos estudos químicos e farmacológicos desses produtos (HARVEY, 2007).

Nos últimos anos o interesse em trabalhar com fitoterapia tem ressurgido. Na última década, registrou-se um aumento expressivo no interesse em substâncias derivadas de espécies vegetais, o que incentivou a pesquisa científica para a comprovação dos efeitos observados empiricamente. Outro fator que incentiva esses estudos com espécies vegetais é a complexidade na descoberta de novas drogas; atualmente são necessários de sete a dez anos para o desenvolvimento completo de um novo medicamento (FLISCHER; MONTARI, 1995; CALIXTO, 2000; SIXEL; PECINALLI, 2005).

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 complementar 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 na 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).

1.2 A família Annonaceae e o gênero *Xylopia*

Dentre as famílias presentes na flora brasileira, merece destaque a família Annonaceae Juss. que possui distribuição pantropical com cerca de 2150 espécies distribuídas entre 112 gêneros (MABBERLEY, 1997). No Brasil essa família apresenta 26 gêneros e 260 espécies (MASS et al., 2001). No estado da Paraíba existem aproximadamente 7 gêneros e 12 espécies, sendo conhecidos pelos seus frutos comestíveis e espécies medicinais (PONTES et al., 2004).

A família Annonaceae é constituída por plantas arbóreas ou arbustivas sendo as trepadeiras também muito frequentes (HEGNAUER, 1964). A grande maioria está distribuída nos trópicos onde crescem em baixas altitudes e o maior número dos gêneros ocorre nas Américas com predominância na América do Sul. O grande centro de distribuição da família é, sem dúvida, a região amazônica, as Guianas e o sudeste do Brasil. Suas espécies habitam as florestas de terra firme, as várzeas, os cerrados e os campos (SILVA; SILVA, 2006), onde o gênero *Xylopia* contém aproximadamente cerca de 160 espécies (MASS et al., 2001).

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), bem como antimicrobiano contra *Aspergillus flavus* e *Sitophilus zeamais* (TATSADJIEU, 2010). 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 de terpenóides, acredita-se que os diterpenos são marcadores químicos do gênero *Xylopia* (VILEGAS et al., 1991). Esta hipótese pode ser confirmada devido à presença de várias classes de terpenóides em espécies do gênero *Xylopia*, 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).

1.3 A espécie *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul.

A espécie *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (Figura 1) é uma árvore medindo entre 5 e 7 metros de altura (MAAS et al., 2001), e é popularmente conhecida como “pimenteira-da-terra” no Brasil (CORRÊA, 1984), onde até o momento não há relatos de seu uso na medicina popular.

A partir do extrato etanólico bruto, obtido das cascas do caule dessa espécie, foi isolado um diterpeno do tipo labdano, sendo este identificado como sendo o ácido 8(17),12*E*,14-labdatrieno-18-óico (Figura 2), com fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_2$ e massa molecular de 302,451 u.m.a. codificado por labdano-302, em decorrência da classificação do diterpeno e da massa molecular (BOHLMANN et al., 1980; ANDRADE et al., 2002).



Figura 1. Fotografia de *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (A); detalhe das folhas e flores (B). **Fonte:** Josean Fechine Tavares

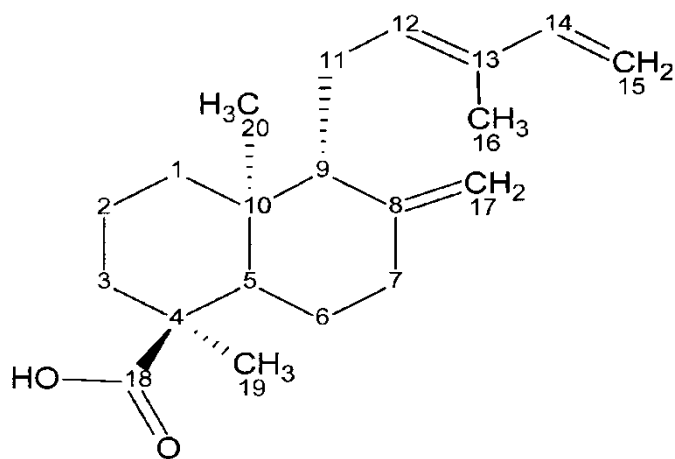


Figura 2. Estrutura química do ácido 8(17),12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano-302).

1.4 Atividades biológicas dos terpenos

Os terpenóides, também referidos como terpenos, são os maiores grupos de compostos naturais. Muitos terpenos têm atividades biológicas e são utilizados para o tratamento de doenças humanas. Em 2002 as vendas mundiais de produtos farmacêuticos, à base de terpenos, foram de aproximadamente US\$ 12 bilhões. Entre estes fármacos, o antineoplásico paclitaxel (Taxol®) e o antimalárico artimesinina são dois dos mais renomados terpenos. Todos os terpenóides são sintetizados a partir de dois blocos de cinco carbonos. Com base no número de blocos, os terpenóides são comumente classificados como monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), e sesterterpenos (C25). Estes terpenóides exibem uma ampla gama de atividades biológicas contra o câncer, malária, inflamação e uma variedade de doenças infecciosas virais e bacterianas (WANG; TANG; BIDIGARE, 2005).

Há relatos de várias espécies de plantas, dentre elas as do gênero *Xylopi*, que contém diterpenos, aos quais são atribuídas algumas atividades biológicas, como exemplo, tem-se o ácido caurenóico, encontrado nas sementes de *Xylopi frutescens* eficaz contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*, bem como contra cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina (MELO et al., 2001), ainda mostrando atividade antimicrobiana e antiinflamatória (JENETT-SIEMS et al., 1999). Os ácidos caurenóico, diidro-caurenóico e xilópico isolados de *Xylopi 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); jatrofona 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 antiespasmódica em útero de rata (VEDERNIKOV et al., 2000), vasorelaxante em aorta de rato (ABE; KARAKI, 1992) e atividade relaxante em traquéia de cobaia (CHANG et al., 1984; DEVILLIER et al., 2001).

Os diterpenos do tipo labdano apresentam diversas atividades farmacológicas em músculo liso, como atividade antiespasmódica do 1,9-dideoxiforscolina (VEDERNIKOV et al., 2000) e do jatrofone em útero de rata (CALIXTO; SANT'ANA, 1990); efeito anti-hipertensivo do 13-epi-9-deoxyforscolina (TANDON et al., 1992); efeito relaxante de forscolina (LINCOLN; FISHERSIMPSON, 1983; LINDGREN; ANDERSSON, 1991; HUANG, 1998) e jatrofone (DUARTE et al., 1992) em aorta de rato.

Foi demonstrado que o labdano-302 apresentou atividade citotóxica em fibroblastos de pulmão de hamster chinês da linhagem V79, porém não foi tóxico para hepatócitos de rato (TAVARES et al., 2006), apresentou ainda efeito hipotensor e vasorelaxante em artéria mesentérica superior de ratos normotensos (OLIVEIRA et al., 2006).

Estudos realizados por nossa equipe no Laboratório de Farmacologia Funcional “Prof. George Thomas” do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” mostraram em uma triagem farmacológica preliminar para atividade espasmolítica, que o labdano-302 apresenta efeito antiespasmódico 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+} (BK_{Ca}) e da proteína cinase dependente de AMPc (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 K^+ dos tipos K_V e K_{ir} além da ativação da via de sinalização AC-AMPc-PKA e modulação negativa 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). Em íleo de cobaia, a ação espasmolítica do labdano-302 envolve a modulação positiva dos canais para K^+ dos tipos K_{ATP} e SK_{Ca} , o que indiretamente reduz o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V , além da participação dos nucleotídeos cíclicos (MACÊDO, 2008).

1.5 Contração e relaxamento da musculatura lisa

Há um grande interesse em se investigar drogas obtidas diretamente de plantas, ou seus derivados, que atuem na musculatura lisa, pois esse músculo é o principal responsável pelo controle da maioria dos órgãos e dos sistemas do corpo. As células da musculatura lisa estão presentes nas paredes de vários órgãos, incluindo os vasos sanguíneos, estômago, bexiga, vias aéreas, intestinos e útero (WEBB, 2003).

A regulação da contração do músculo liso apresenta um papel importante em muitos processos fisiopatológicos autonômicos como a hipertensão arterial, vasoespasmos cerebrais e coronarianos, asma brônquica, disfunção erétil e possíveis complicações no trabalho de parto, resultado da contração anormal dessa musculatura (WEBB, 2003).

No músculo liso um aumento na $[Ca^{2+}]_c$ é a causa primária para a produção da contração. Esta elevação no conteúdo citosólico de Ca^{2+} também está envolvida na proliferação celular do músculo liso (VAN BREEMEN; SAIDA, 1989).

O cálcio é um importante segundo mensageiro que desempenha um papel essencial em uma grande variedade de processos biológicos, incluindo a regulação enzimática, expressão gênica, tráfego de proteína, proliferação celular, apoptose, e a coordenação do acoplamento excitação-contracção do músculo (CARAFOLI, 2002). Em geral, existem duas fontes deste íon sinalizador na célula: uma extracelular que permite o influxo de Ca^{2+} , através dos canais na membrana plasmática, e outra intracelular representada pelos estoques internos, principalmente o retículo sarcoplasmático (RS) que liberam Ca^{2+} para o citosol (PAN; MA, 2003).

A principal porta de entrada para o Ca^{2+} que vem do meio extracelular são os canais para cálcio abertos por voltagem (Ca_v) (CATTERALL, 2000), os quais estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). A entrada de cálcio em músculo liso visceral é controlada pelo potencial de membrana, uma vez que este determina a abertura dos Ca_v (SHMIGOL; EISNER; WRAY, 1998; WRAY et al., 2001). Os Ca_v1 (ativados por alta voltagem e sensíveis à di-hidropiridinas) são os principais, e muitas vezes o único tipo de canal para Ca^{2+} expresso em muitos músculos lisos (THORNELOE; NELSON, 2005; WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005).

O movimento dos íons K^+ através de canais localizados na membrana regulam o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v (THORNELOE; NELSON, 2005). Os canais para potássio desempenham um papel chave na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular, sendo a contração no músculo liso dependente do balanço entre o aumento da condutância ao íon K^+ , levando a uma hiperpolarização, e a diminuição da condutância ao K^+ , levando a uma despolarização (KNOT et al., 1996).

No músculo liso, o tônus basal pode ser regulado por vários tipos de canais para K^+ , entre eles: canais para K^+ abertos por voltagem (K_v); canais para potássio de grande condutância ativados por cálcio (BK_{Ca}); canais para K^+ de pequena condutância ativados por Ca^{2+} (SK_{Ca}); canais para K^+ retificadores de entrada (K_{IR}); canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), entre outros (THORNELOE; NELSON, 2005). Sendo que, a repolarização ou hiperpolarização de membrana ocorre devido, principalmente, a ativação dos BK_{Ca} , que são ativados quando a $[Ca^{2+}]_c$ se eleva na ordem de μM , e a ativação dos K_v , em decorrência à despolarização de membrana (LEDOUX et al., 2006). Tal ativação leva a uma redução no influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v por sua inibição e, conseqüentemente, a uma redução da $[Ca^{2+}]_c$ (LEDOUX et al., 2006; LIN et al., 2006).

Diante do exposto, compostos como os ativadores de canais para K^+ podem hiperpolarizar a membrana e, indiretamente, fechar os Ca_v1 , inibir o influxo de Ca^{2+} e, conseqüentemente, diminuir a $[Ca^{2+}]_c$ (LEDOUX et al., 2006; LIN et al., 2006).

O aumento da $[Ca^{2+}]_c$ favorece a ligação do Ca^{2+} à calmodulina (CaM) e este complexo ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) para fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC) e promover a interação de miosina com actina, levando a contração. No músculo liso, a contração pode ser alcançada quer através da despolarização da membrana (acoplamento eletromecânico), levando a um aumento da $[Ca^{2+}]_c$ e contração muscular, ou induzida por um agonista (acoplamento fármaco-mecânico) que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003). Os agonistas tais como ocitocina, serotonina, carbacol e histamina se ligam a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata do inositol, geralmente através da proteína $G_{q/11}$ mediando a produção de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3), que estimulam a liberação de Ca^{2+} do RS (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). Os agonistas

contráteis podem também elevar a $[Ca^{2+}]_c$ através de receptores de rianodina (RyR) e estimular a entrada de Ca^{2+} através dos múltiplos tipos de canais, incluindo canais para Ca^{2+} operados por estoque (SOCC), por receptor ou por voltagem (SANDERS, 2001; McFADZEAN; GIBSON, 2002).

O relaxamento no músculo liso ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de uma substância que estimula a inibição do mecanismo contrátil (MORGAN, 1990). Independentemente, o processo requer uma diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ e aumento da atividade da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) (SOMLYO et al., 1999).

O mecanismo eletromecânico para o relaxamento muscular se dá pela hiperpolarização da membrana, que pode ocorrer em função da liberação de óxido nítrico (NO) pelo endotélio dos vasos sanguíneos uterinos e por neurônios não-adrenérgicos não-colinérgico (NANC), que ativa diretamente uma ciclase de guanilil solúvel ou, no caso dos agonistas que induzem relaxamento, a ligação aos seus receptores ativa diretamente uma ciclase de guanilil ou de adenilil, resultando na formação do monofosfato cíclico de guanosina (GMP_c) e monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c), respectivamente (REMBOLD, 1996). O aumento na $[GMP_c]$ ativa a proteína cinase G (PKG), enquanto que o aumento na $[AMP_c]$ ativa tanto uma proteína cinase dependente de AMP_c (PKA) como a PKG, quando em altas concentrações, que resultam na ativação de canais para K^+ (REMBOLD, 1996). Além disso, a hiperpolarização da membrana das células musculares lisas pode ser produzida por substâncias que abrem canais para K^+ (por exemplo, cromacalina, levocromacalina e nicorandil) e, conseqüentemente, aumentam o efluxo de K^+ da célula (EDWARDS; WESTON, 1990; GURNEY, 1994). Dessa maneira, a hiperpolarização reduz o influxo de Ca^{2+} através dos canais Ca_v1 , diminuindo, portanto, a $[Ca^{2+}]_c$, a fosforilação da miosina e a contração (REMBOLD, 1996).

Os mecanismos de relaxamento envolvidos no acoplamento fármaco-mecânico incluem: (1) aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase tanto do RS como da membrana plasmática através da PKG ou da PKA, levando a um aumento do seqüestro e da saída de Ca^{2+} , respectivamente, diminuindo assim a $[Ca^{2+}]_c$; (2) diminuição da formação do IP_3 , levando a uma diminuição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares; (3) redução da $[Ca^{2+}]_c$ pelo AMP_c -PKA por diminuir o influxo de Ca^{2+} indiretamente por hiperpolarização ou por ação direta nos Ca_v1 , e,

finalmente, (4) diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ por estimulação do trocador Na^+/Ca^{2+} (BLAUSTEIN, 1989).

O músculo liso possui um sistema de manutenção da contração mesmo em baixa $[Ca^{2+}]_c$ através de um balanço entre processos de fosforilações/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; MURTHY, 2006). 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 et al., 1997; CHITALEY; WEBER; WEBB, 2001).

A inibição da MLCP é iniciada pela ativação da RhoA, dependente das proteínas G heterotriméricas G_{12} , G_{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 1.000 vezes, inibindo assim a ação da MLCP (SOMLYO; SOMLYO, 2003; MURTHY, 2006) (Figura 3).

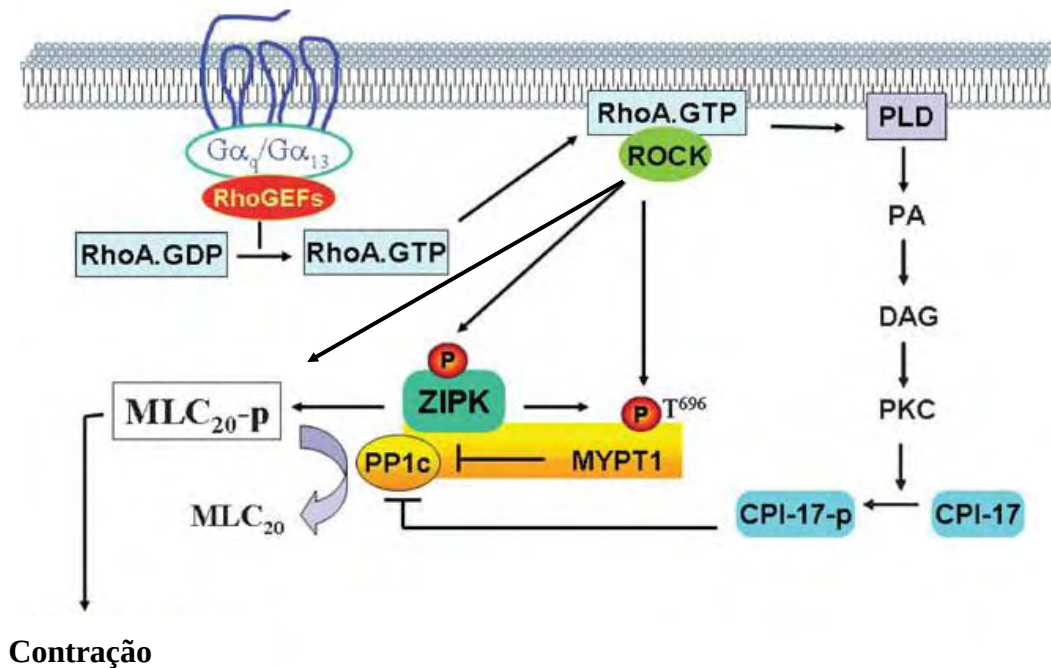
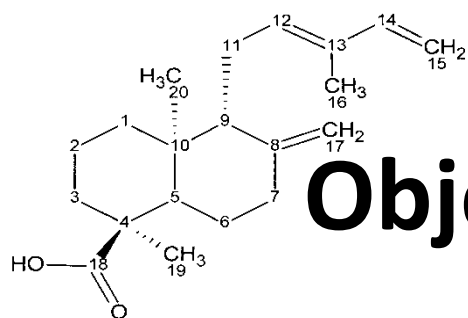


Figura 3. Sinalização mediada por receptores acoplados a G_q e/ou G₁₃ durante a fase sustentada da contração (Adaptado de MURTHY, 2006).

Uma vez que o labdano-302 apresenta ação espasmolítica tanto em músculo liso vascular (OLIVEIRA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007b) como em músculo liso das vias aéreas (RIBEIRO et al., 2007a) e em músculo liso intestinal (MACÊDO, 2008), resolveu-se investigar o mecanismo de ação espasmolítica deste diterpeno em útero isolado de rata, como modelo de músculo liso representante do sistema reprodutor feminino.



Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar o mecanismo de ação tocolítico do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrieno-18-óico (labdano-302), isolado das cascas do caule de *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae), em útero isolado de rata.

2.2 Específicos

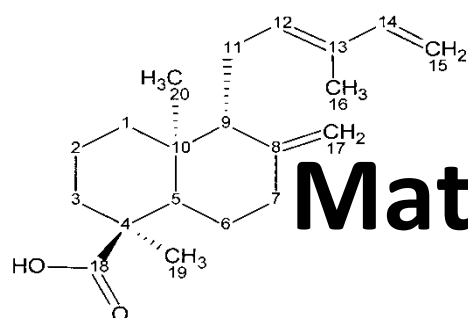
Caracterizar o tipo de antagonismo exercido pelo labdano-302 frente às contrações induzidas por carbacol ou ocitocina.

Avaliar o efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina.

Investigar o efeito do labdano-302 sobre os canais para potássio.

Determinar qual(ais) tipo(s) de canais para potássio está(ão) envolvido(s) no mecanismo de ação tocolítico do labdano-302.

Investigar a participação dos nucleotídeos cíclicos como moduladores do efeito tocolítico do labdano-302.



Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material Botânico

A espécie *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hill. & Tul. foi coletada no município de Cruz do Espírito Santo, Estado da Paraíba. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do Setor de Botânica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” da Universidade Federal da Paraíba (LTF/UFPB). Uma exsicata da planta está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), da UFPB sob código de identificação AGRA 5541.

3.1.2 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) virgens pesando entre 200 e 280g, todas procedentes do Biotério “Prof. Thomas George” do LTF/UFPB.

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

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do LTF/UFPB, sob certidão de número 0705/09 (Anexo A).

3.1.3 Drogas e Reagentes

O bicarbonato de sódio (NaHCO_3), cloreto de potássio (KCl), sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), cloreto de cálcio bi-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) cloridrato de carbamilcolina (CCh), fosfato monossódico 1-hidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e glicose foram obtidos da Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ, EUA).

Iberiotoxina (IbTX), cloreto de céσιο (CsCl), cloreto de tetraetilamônio (TEA⁺), glibenclamida, apamina, 4-aminopiridina (4-AP), aminofilina e óleo de castor (cremophor[®]) foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, MO, EUA).

3.1.4 Solução Nutritiva

Foi utilizada solução nutritiva de Locke Ringer, aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). O pH era ajustado para valores entre 7,2 e 7,4 com solução de HCl ou NaOH (1N) e mantida a temperatura constante de 32 ± 1 °C. A composição desta solução está descrita a seguir (Tabela 1).

Tabela 1. Composição da solução de Locke Ringer (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 2000).

Substância	Concentração (mM)
NaCl	154,0
KCl	5,63
CaCl ₂	2,16
MgCl ₂	2,10
Glicose	5,55
NaHCO ₃	5,95

3.1.5 Preparação da solução-estoque da substância em estudo

O labdano-302 foi solubilizado em cremofor e diluído em água destilada para obtenção da solução estoque (10⁻² M, 3% cremofor v/v) a qual foi estocada em “freezer” a uma temperatura de -14 a -18 °C, sendo novamente diluída em água destilada de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. A concentração final de cremofor nas cubas nunca excedera 0,01% (v/v). Nesta concentração o cremofor é desprovido de efeito contrátil ou relaxante significativo no órgão estudado, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório.

3.1.6 Aparelhagem

Para registro das contrações isométricas e isotônicas os órgãos eram suspensos em cubas de vidro (5 mL) (Figura 4D) aquecidas à temperatura adequada por bombas termostáticas modelo 597 FISATOM (São Paulo, SP, Brasil) e modelo Polystat 12002 Cole-Parmer (Vernon Hills, IL, EUA). As contrações isométricas eram registradas através de transdutores de força modelo FORT-10 (Figura 4B) conectados a um amplificador modelo TMB4M (Figura 4C) ambos da World Precision Instruments (Sarasota, FL, EUA), que por sua vez estava conectado a uma placa conversora analógico/digital instalada em um computador contendo o programa BioMed[®] versão Rv2 BioData (João Pessoa, PB, Brasil). As contrações isométricas também foram registradas através de transdutores de força TIM-50 (Figura 4E) AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil) que estavam acoplados em um amplificador AECAD 04F (Figura 4F) que por sua vez estava conectado a um computador contendo o programa AQCAD versão 2.03 ambos da AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

As contrações isotônicas eram registradas por meio de uma alavanca isotônica de inscrição frontal em cilindros esfumaçados de um quimógrafo DTF (Figura 4A) (São Paulo, SP, Brasil). Os valores de pH eram aferidos através de um pHmetro digital modelo PG 2000 GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil). As substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG200 e os animais em balança semi-analítica ambas da GEHAKA (São Paulo, SP, Brasil).

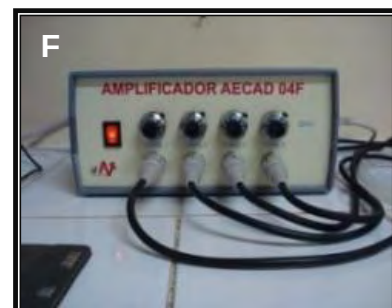
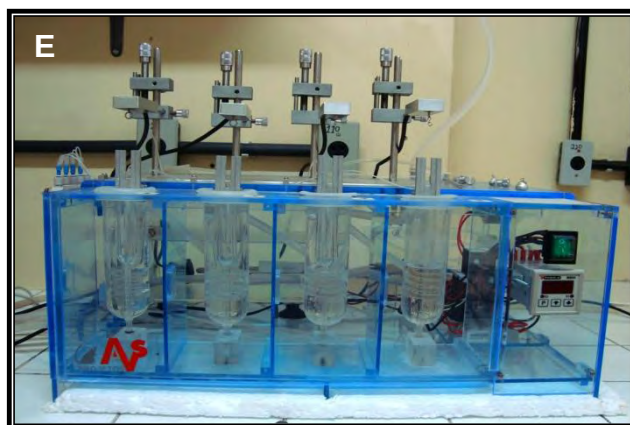
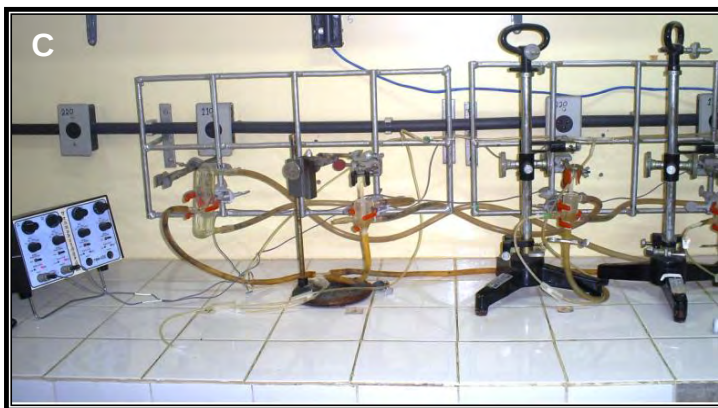


Figura 4. Aparelhos utilizados para o registro de contrações: aparato para registro das contrações isotônicas com cilindro esfumado de um quimógrafo (A), transdutor de força FORT-10 (B), aparato para registro das contrações isométrica e amplificador TMB4M (C), cuba de banho para órgão isolado (D), sistema de banho para órgão isolado com transdutor de força isométrico TIM-50 (E), amplificador AECAD 04F (F).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Investigação do mecanismo de ação tocolítico do labdano-302 em útero isolado de rata

3.2.1.1 Característica do antagonismo da contração induzida por carbacol ou por ocitocina

As ratas eram tratadas 24 h antes do início dos experimentos com dietilestilbestrol (1 mg/kg s.c.) para indução do estro. Decorrido este tempo, eram sacrificadas por deslocamento cervical seguido por secção dos vasos cervicais. Após abertura da cavidade abdominal, era feita a dissecação do útero, colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Locke Ringer a 32 °C. Em seguida, os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de vidro (5 mL). Para estabilização da preparação, esta era mantida em repouso por 40 min antes do contato com qualquer agente, sob tensão de repouso de 1 g, efetuando, neste período, a renovação da solução nutritiva a cada 10 min. Após o período de estabilização, duas curvas consecutivas e do tipo concentração-resposta cumulativas similares ao carbacol (10^{-8} – 10^{-2} M) ou ocitocina (10^{-5} – 3×10^{-1} M) eram obtidas. Em seguida, na ausência do carbacol ou da ocitocina, o labdano-302 era incubado por 15 min em diferentes concentrações e em experimentos independentes. Após este período, ainda na presença de labdano-302, uma nova curva concentração-resposta cumulativa ao carbacol ou a ocitocina era obtida. Os resultados foram avaliados comparando-se a porcentagem da resposta contrátil na presença do labdano-302 com aquela obtida pela amplitude média das curvas controle na ausência do mesmo.

O tipo de antagonismo exercido pelo labdano-302 foi analisado com base nos valores da inclinação do gráfico de Schild (ARUNLAKSHANA; SCHILD, 1959) e sua potência pelo valor do pD'_2 , que é definido como logaritmo negativo (na base 10) da concentração molar de um antagonista que reduz a 50% uma resposta máxima de um agonista (VAN ROSSUM, 1963).

3.2.1.2 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou ocitocina

O útero era montado como descrito no item 3.2.1.1. Após o período de estabilização, eram obtidas duas curvas concentração-resposta de amplitude similar induzidas por 60 mM de KCl ou 10^{-2} UI/mL de ocitocina, em preparações diferentes. Durante a fase tônica sustentada da segunda contração, o labdano-302 era adicionado cumulativamente à cuba. O relaxamento produzido por labdano-302 foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelos agonistas contráteis.

Os valores de pD_2 , que é definido como logaritmo negativo (na base 10) da concentração em molar de uma substância que promove 50% do seu efeito máximo, foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) dos valores individuais de pD_2 , obtidos a partir dos valores de CE_{50} (calculados pelo uso da regressão não linear de cada curva concentração-resposta de relaxamento para o labdano-302) de cada um dos experimentos.

3.2.2 Avaliação do envolvimento dos canais para potássio no mecanismo de ação tocolítico do labdano-302

3.2.2.1 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl)

O útero era montado como descrito no item 3.2.1.1. Após o período de estabilização, eram obtidas duas curvas concentração-resposta de amplitude similar com 10^{-2} UI/mL de ocitocina, em preparações diferentes, antes da segunda curva concentração-resposta o CsCl 5 mM, bloqueador não seletivo dos canais para potássio, era incubado por 20 min (LATORRE et al., 1989). Durante a fase tônica sustentada da segunda contração, o labdano-302 era adicionado cumulativamente à cuba, em preparações diferentes. O relaxamento produzido pelo labdano-302 foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pela ocitocina. Os valores de pD_2 foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença de 5 mM de CsCl.

3.2.2.2 Efeito do labdano-302 sobre às contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de 4-aminopiridina (4-AP), glibenclamida, apamina, tetraetilamônio (TEA⁺) ou iberiotoxina (IbTx)

O útero era montado como descrito no item 3.2.1.1. O tecido permanecia em repouso por 40 min em contato com a solução de Locke Ringer. Após este período era induzida uma contração pela adição de 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sob o componente tônico da contração era adicionando labdano-302 de forma cumulativa (curva controle). Em outro experimento, era adicionado a outra cuba por 20 min 3 mM de 4-AP, um bloqueador dos canais para potássio abertos por voltagem (K_V) (AARONSON et al., 2006), 3×10^{-5} M de glibenclamida, um bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (HUGHEST; HOLLINGSWORTH, 1997), 100 nM de apamina, um bloqueador seletivo de canais para potássio de pequena condutância ativados pelo Ca^{2+} (SK_{Ca}) (TSAI et al., 1998), 1 mM de tetraetilamônio (TEA⁺), que nessa concentração é um bloqueador seletivo dos canais para potássio de grande condutância ativados pelo Ca^{2+} (BK_{Ca}) (HUANG, 1998, MURRAY et al., 1991), ou com 100 nM de iberiotoxina (IbTx) um bloqueador específico dos canais BK_{Ca} (GALVEZ et al., 1990; CANDIA; GARCIA; LATORRE, 1992; ABOULAFIA et al., 2002). Após esse período uma nova contração pela adição de 10^{-2} UI/mL de ocitocina era induzida na presença desses bloqueadores. Durante a fase tônica sustentada da segunda contração, o labdano-302 era adicionado cumulativamente à cuba, em preparações diferentes. O relaxamento produzido pelo labdano-302 foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pela ocitocina. Os valores de pD_2 foram calculados como descrito anteriormente.

3.2.3 Investigação da participação dos nucleotídeos cíclicos no mecanismo da ação tocolítico do labdano-302

3.2.3.1 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de aminofilina

O útero era montado como descrito no item 3.2.1.1. Após o período de estabilização, eram obtidas duas curvas concentração-resposta de amplitude similar com 10^{-2} UI/mL de ocitocina, em preparações diferentes, antes da segunda curva concentração-resposta. Em seguida, antes da segunda contração, a preparação era incubada por 20 min com 10^{-4} M de aminofilina, inibidor inespecífico das enzimas fosfodiesterases (URUNO et al., 1974) e, ainda na sua presença, uma nova contração induzida por ocitocina era obtida. Em seguida, labdano-302 era adicionado cumulativamente sobre a fase tônica da contração. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo agente contrátil na ausência e na presença da aminofilina. Os valores de pD_2 foram calculados como descrito anteriormente.

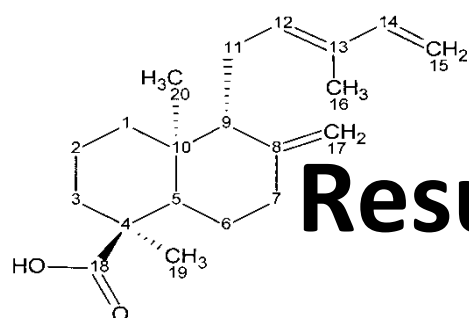
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

Os valores de pD_2 logaritmo negativo (na base 10) da concentração em molar de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo foram calculados por regressão não-linear para todos os experimentos realizados (NEUBIG et al., 2003).

A inclinação do gráfico de Schild, que provê informação sobre a natureza do antagonismo, foi calculada por 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 da substância testada. Também foram calculados os valores de r^2 (coeficiente de regressão linear) que provê informações sobre a correlação concentração-resposta e os valores de pD'_2 (parâmetro de potência do antagonista), obtidos por regressão linear.

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



Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Investigação do mecanismo de ação tocolítico de labdano-302 em útero isolado de rata

4.1.1 Característica do antagonismo da contração induzida por carbacol ou por ocitocina

O labdano-302, nas concentrações de 3×10^{-5} M, 10^{-4} M e 3×10^{-4} M para carbacol e 3×10^{-4} , 10^{-3} e 3×10^{-3} M para ocitocina, inibiu de maneira dependente de concentração ($r^2 = 0,90 \pm 0,05$ e $0,90 \pm 0,04$ respectivamente), as contrações cumulativas induzidas por carbacol ou por ocitocina com desvio da curva controle para a direita de maneira não paralela e com redução do $E_{\max}$ (Gráfico 1A e 2A). A análise do gráfico de Schild (Gráfico 1B e 2B) indica um antagonismo do tipo não competitivo exercido pelo labdano-302 que foi confirmado pelo valor de “slope” = $0,15 \pm 0,04$ e $1,13 \pm 0,1$ que diferiu significativamente da unidade, para carbacol e ocitocina respectivamente. A potência do labdano-302 em antagonizar as contrações cumulativas induzidas por carbacol ou por ocitocina foi determinada pelo valor de $pD'_2 = 3,4 \pm 0,1$ e $3,8 \pm 0,2$ respectivamente.

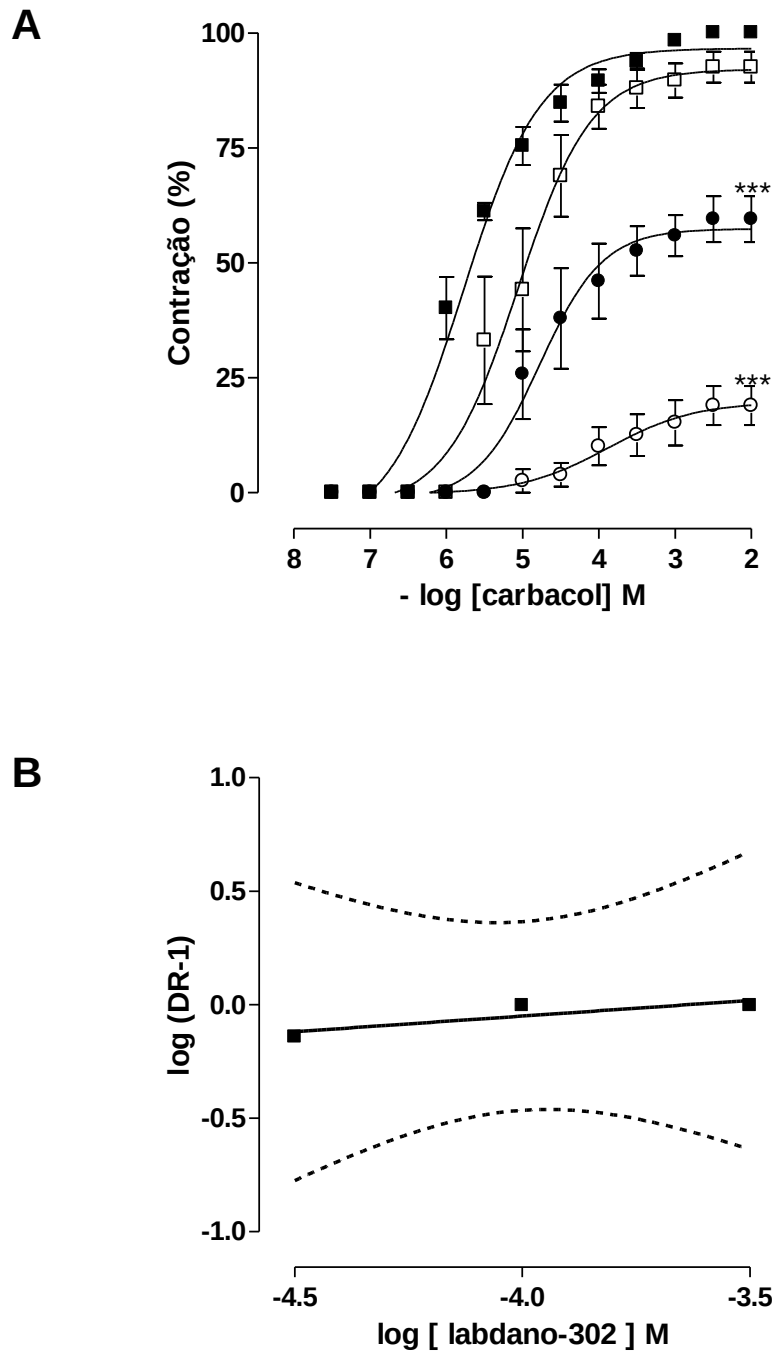


Gráfico 1. Curvas concentrações-resposta cumulativas ao carbacol (**A**) na ausência (■) e na presença de labdano-302 nas concentrações de 3×10^{-5} (□), 10^{-4} (●) e $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ (○) em útero isolado de rata ($n = 5$). O gráfico (**B**) representa o log (DR-1) em função do log da concentração molar do labdano-302. Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way” seguido por Bonferroni, *** $p < 0,001$ (controle vs. labdano-302).

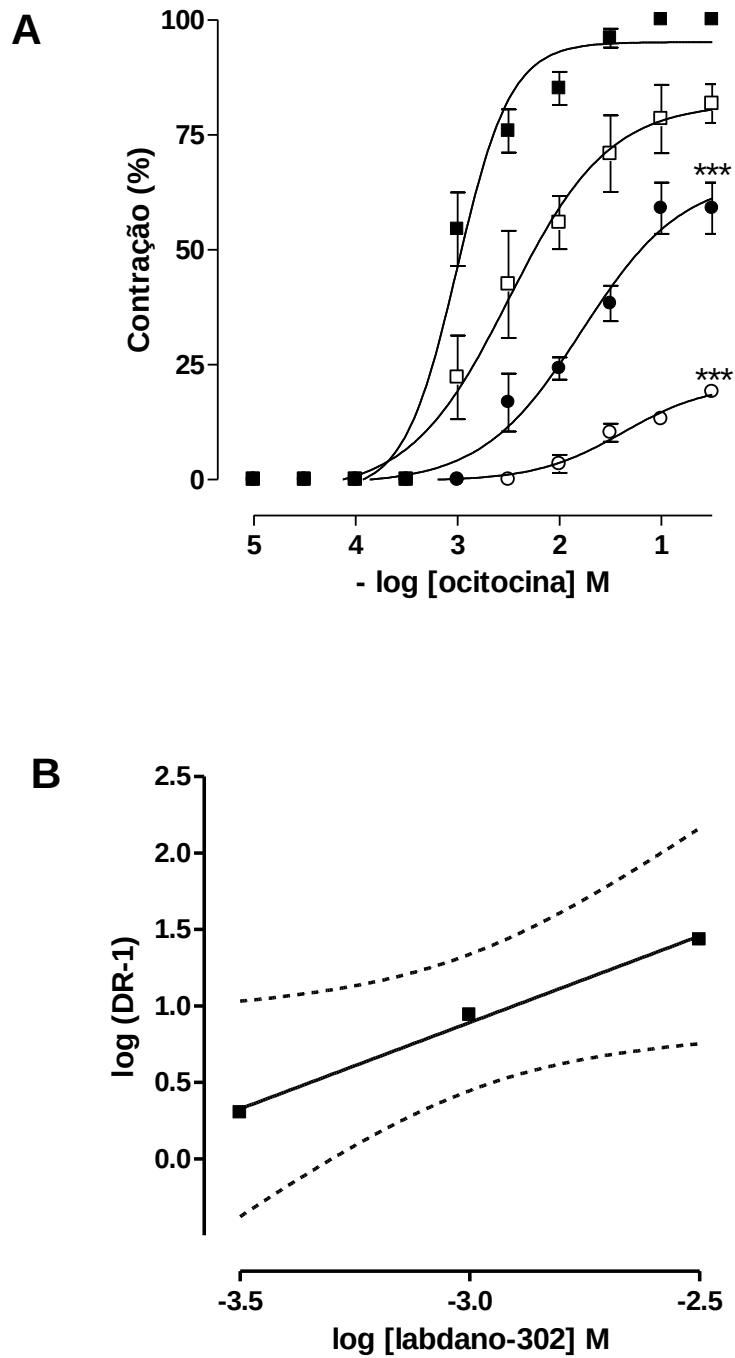


Gráfico 2. Curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina (**A**) na ausência (■) e na presença de labdano-302 nas concentrações de 3×10^{-4} (□), 10^{-3} (●) e $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ (○) em útero isolado de rata ($n = 3$). O gráfico (**B**) representa o log (DR-1) em função do log da concentração molar do labdano-302. Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way” seguido por Bonferroni, *** $p < 0,001$ (controle vs. labdano-302).

4.1.2 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina ou KCl

O labdano-302 (3×10^{-5} e 10^{-4} M) não induziu relaxamento de maneira significativa no útero pré-contraído por 60 mM de KCl, apresentando um $E_{\max} = 9,75 \pm 0,07\%$ ($n = 3$) (Figura 5). Por outro lado, labdano-302 (10^{-7} - 3×10^{-4} M) relaxou de maneira significativa ($pD_2 = 4,3 \pm 0,06$) e dependente de concentração ($R^2 = 0.98 \pm 0.005$) quando o útero era pré-contraído por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (Figura 6 e Gráfico 3). Quando o útero foi pré-contraído por ocitocina o valor de $E_{\max} = 100\%$ foi atingido numa concentração de 3×10^{-4} M do labdano-302, e o tempo médio para atingir esse $E_{\max}$ foi de aproximadamente $186,6 \pm 3,4$ min. Em até 1 h após a retirada do labdano-302 da cuba, os agentes contráteis produziram contrações com a mesma amplitude em relação a contração inicial, indicando que o efeito do diterpeno é reversível neste órgão.

A

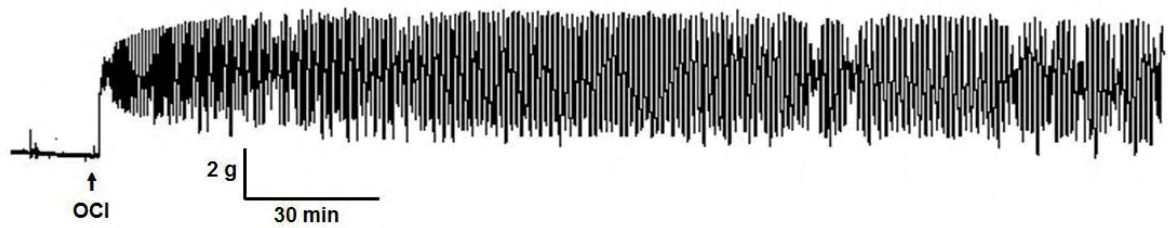


B



Figura 5. Registros originais representativos do efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl, na ausência (**A**) e na presença do labdano-302 (**B**), em útero isolado de rata. As setas para baixo representam as concentrações cumulativas (3×10^{-5} e 10^{-4} M) do labdano-302.

A



B

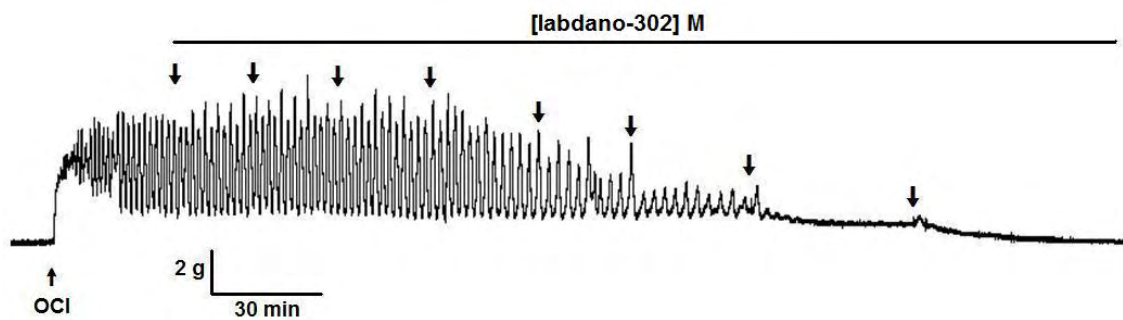


Figura 6. Registros originais representativos do efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença de labdano-302 (**B**), em útero isolado de rata. As setas para baixo representam as concentrações cumulativas (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} M) (**B**) do labdano-302.

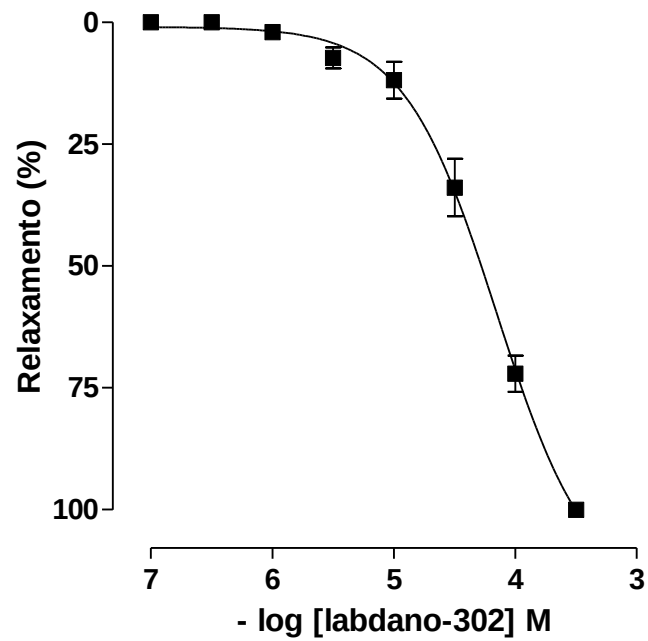


Gráfico 3. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (■) em útero isolado de rata ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

4.2 Avaliação do envolvimento dos canais para potássio no mecanismo de ação tocolítico do labdano-302

4.2.1 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl)

O labdano-302 (10^{-7} – 3×10^{-3} M) relaxou o útero isolado de rata pré-contráído com ocitocina na ausência ($pD_2 = 4,3 \pm 0,06$) e na presença ($pD_2 = 3,1 \pm 0,06$) de 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais para potássio (Figura 7). A potência relaxante do labdano-302 foi reduzida cerca de 16 vezes significativamente ($p < 0,0001$) quando comparada ao relaxamento produzido pelo diterpeno na ausência do CsCl (Gráfico 4). Tanto na presença como na ausência do bloqueador o valor de $E_{max} = 100\%$ foi alcançado, porém na presença de CsCl esse E_{max} foi alcançado na concentração de 3×10^{-3} M do labdano-302, uma concentração 10 vezes maior do que a necessária na condição controle, que foi de 3×10^{-4} M. O tempo médio para atingir o E_{max} , $183,9 \pm 1,8$ min, não foi alterado de maneira significativa na presença do CsCl quando comparado ao controle ($186,6 \pm 3,4$ min).

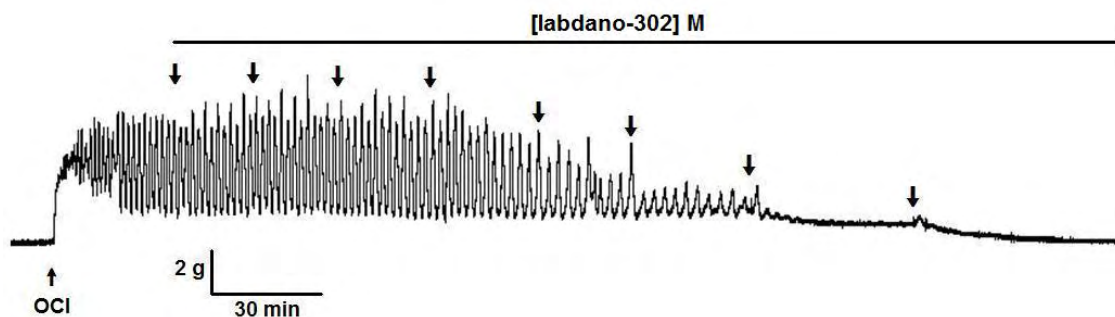
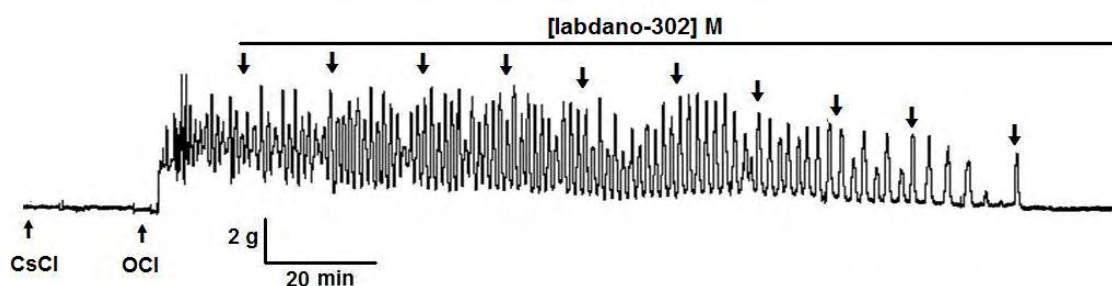
A**B**

Figura 7. Registros originais representativos do efeito relaxante do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença de 5 mM de CsCl (**B**), em útero isolado de rata. As setas para baixo representam as concentrações cumulativas (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} M) (**A**) e (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} , 10^{-3} e 3×10^{-3} M) (**B**) do labdano-302.

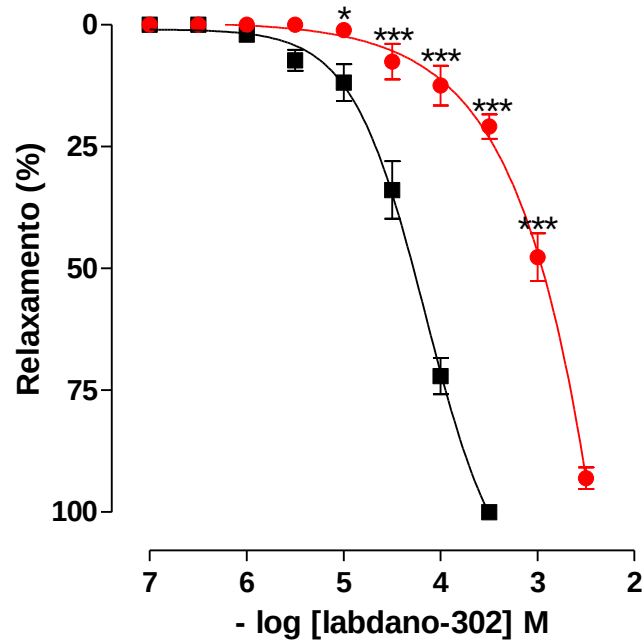


Gráfico 4. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 5 mM de CsCl, em útero isolado de rata ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “two-way” seguido por Bonferroni, $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$ (controle vs. CsCl).

4.2.2 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de 4-aminopiridina (4-AP)

O labdano-302 (10^{-7} – 3×10^{-4} M) relaxou o útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina na ausência ($pD_2 = 4,3 \pm 0,06$) e na presença ($pD_2 = 4,1 \pm 0,08$) de 3 mM de 4-AP, um bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis a voltagem (K_V) (Figura 8). A potência relaxante do labdano-302 não foi alterada na presença de 4-AP (Gráfico 5). Tanto na presença como na ausência do bloqueador o valor de $E_{max} = 100\%$ foi atingido na concentração de 3×10^{-4} M do labdano-302. O tempo médio para atingir o E_{max} foi de $186,6 \pm 3,4$ min na ausência de 4-AP e de $153 \pm 9,6$ min na presença desse inibidor, apresentando uma redução significativa ($p < 0,05$) de aproximadamente 33 min no tempo médio de relaxamento.

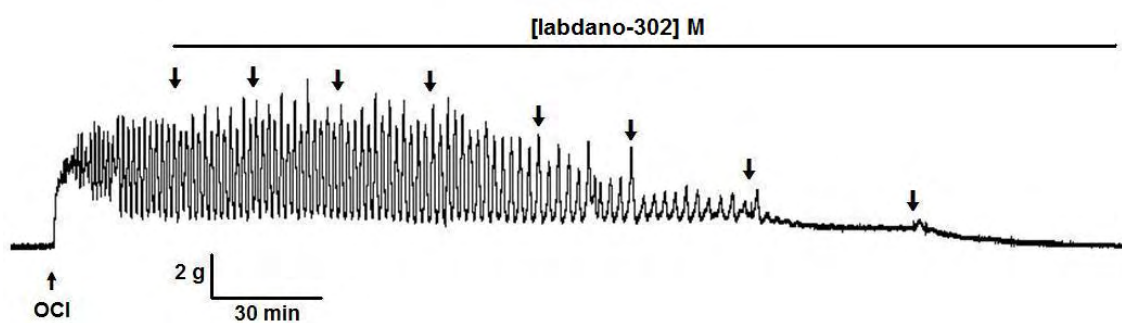
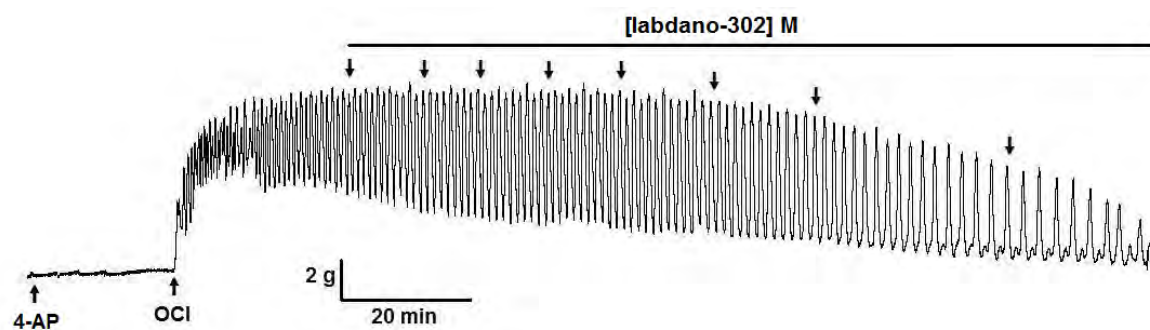
A**B**

Figura 8. Registros originais representativos do efeito relaxante do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença de 3 mM de 4-AP (**B**), em útero isolado de rata. As setas para baixo representam as concentrações cumulativas (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} M) (**A**) e (**B**) do labdano-302.

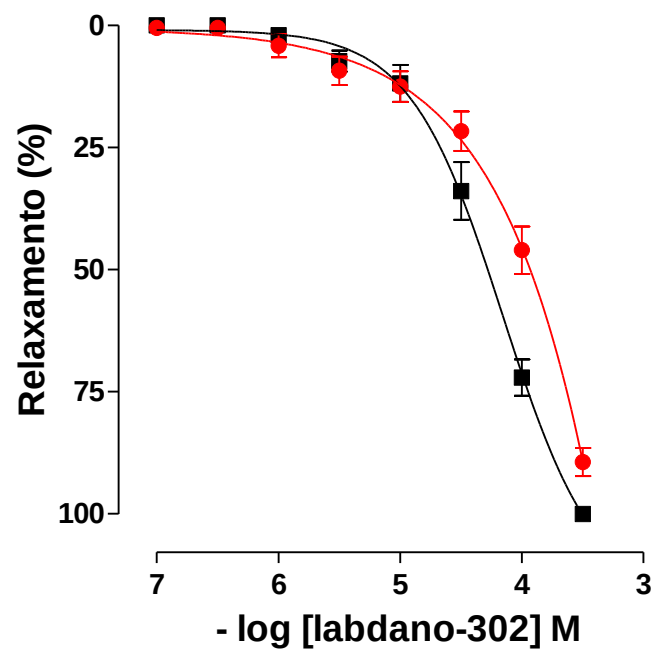


Gráfico 5. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 3 mM de 4-AP, em útero isolado de rata ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

4.2.3 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de glibenclamida

O labdano-302 (10^{-7} – 3×10^{-4} M) relaxou o útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina na ausência ($pD_2 = 4,3 \pm 0,06$) e na presença ($pD_2 = 4,1 \pm 0,05$) de 3×10^{-5} M de glibenclamida, um bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (Figura 9). A potência relaxante do labdano-302 não foi alterada na presença de glibenclamida (Gráfico 6). Tanto na presença como na ausência do bloqueador o valor de $E_{max} = 100\%$ foi atingido na concentração de 3×10^{-4} M do labdano-302. O tempo médio para atingir o E_{max} foi de $186,6 \pm 3,4$ min na ausência de glibenclamida e de $163,3 \pm 13,3$ min na presença desse inibidor, apresentando uma redução significativa ($p < 0,05$) de aproximadamente 23 min no tempo médio de relaxamento.

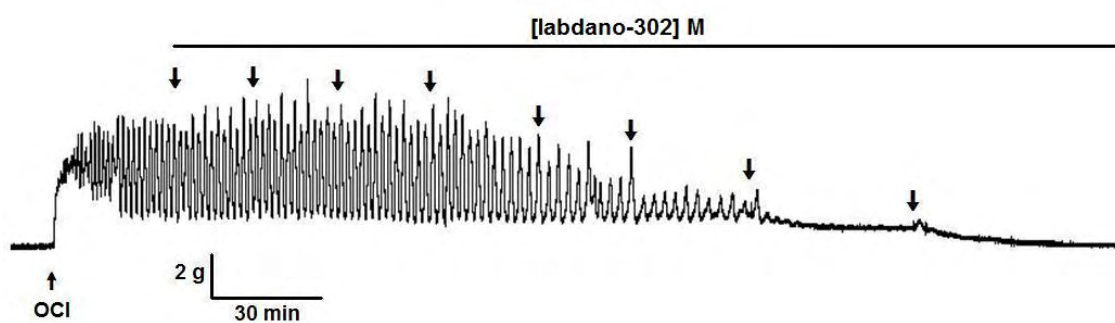
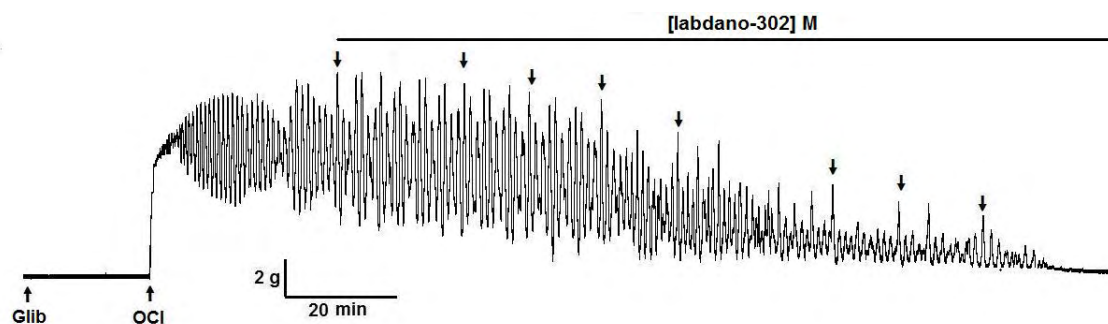
A**B**

Figura 9. Registros originais representativos do efeito relaxante do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença de glibenclamida (**B**), em útero isolado de rata. As setas para baixo representam as concentrações cumulativas (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} M) (**A**) e (**B**) do labdano-302.

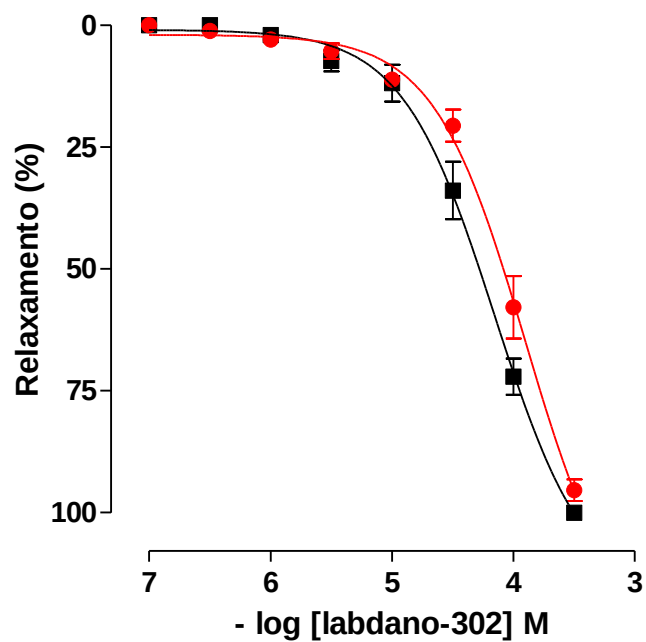


Gráfico 6. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 3×10^{-5} M de glibenclamida, em útero isolado de rata ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

4.2.4 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de apamina

O labdano-302 ($10^{-7} - 10^{-3}$ M) relaxou o útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina na ausência ($pD_2 = 4,3 \pm 0,06$) e na presença ($pD_2 = 3,8 \pm 0,03$) de 100 nM de apamina, um bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de pequena condutância (SK_{Ca}) (Figura 10). A potência relaxante do labdano-302 foi reduzida cerca de 3 vezes significativamente ($p < 0,0001$) quando comparada ao relaxamento produzido pelo diterpeno na ausência da apamina (Gráfico 7). Tanto na presença como na ausência do bloqueador o valor de $E_{max} = 100\%$ foi alcançado, porém na presença de apamina esse E_{max} foi alcançado na concentração de 10^{-3} M do labdano-302, uma concentração cerca de 3 vezes maior do que a necessária na condição controle, que foi de 3×10^{-4} M. O tempo médio para atingir o E_{max} $182,7 \pm 4,9$ min, não foi alterado de maneira significativa na presença da apamina quando comparado ao controle ($186,6 \pm 3,4$ min).

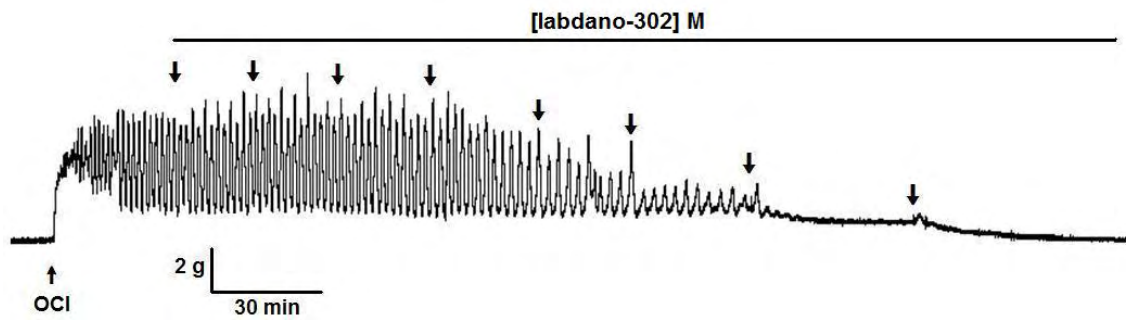
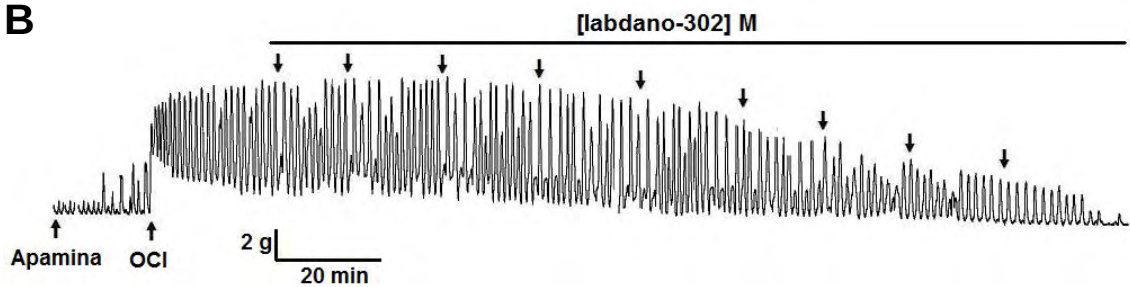
A**B**

Figura 10. Registros originais representativos do efeito relaxante do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença de apamina (**B**), em útero isolado de rata. As setas para baixo representam as concentrações cumulativas (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} M) (**A**) e (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} e 10^{-3}) (**B**) do labdano-302.

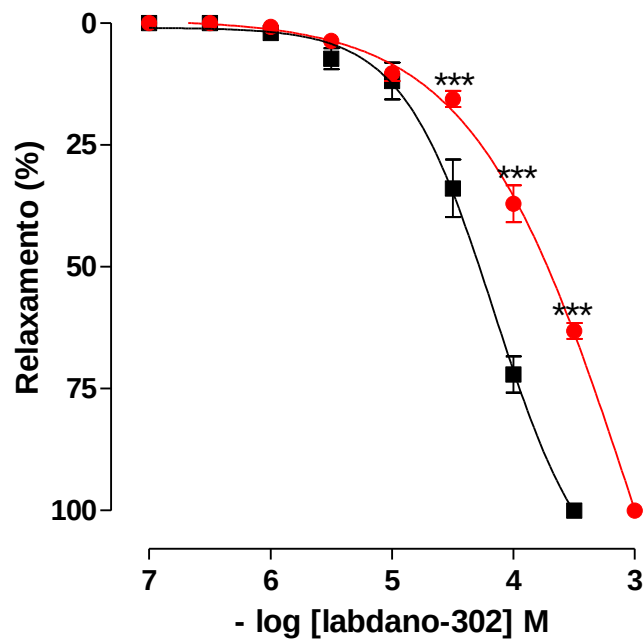


Gráfico 7. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 100 mM de apamina, em útero isolado de rata (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “two-way” seguido por Bonferroni, *** $p < 0,001$ (controle vs. apamina).

4.2.5 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de tetraetilamônio (TEA⁺)

O labdano-302 (10^{-7} – 10^{-3} M) relaxou o útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina na ausência ($pD_2 = 4,3 \pm 0,06$) e na presença ($pD_2 = 3,6 \pm 0,04$) de 1 mM de TEA⁺, um bloqueador seletivo dos canais para potássio grande condutância sensíveis ao cálcio (BK_{Ca}) (Figura 11). A potência relaxante do labdano-302 foi reduzida cerca de 5 vezes significativamente ($p < 0,05$) quando comparada ao relaxamento produzido pelo diterpeno na ausência do tetraetilamônio (Gráfico 8). Tanto na presença como na ausência do bloqueador o valor do $E_{max} = 100\%$ foi alcançado, porém na presença de TEA⁺ esse E_{max} foi alcançado na concentração de 10^{-3} M do labdano-302, uma concentração cerca de 3 vezes maior do que a necessária na condição controle, que foi de 3×10^{-4} M. O tempo médio para atingir o E_{max} $170 \pm 7,6$ min, não foi alterado de maneira significativa na presença de TEA⁺ quando comparado ao controle ($186,6 \pm 3,4$ min).

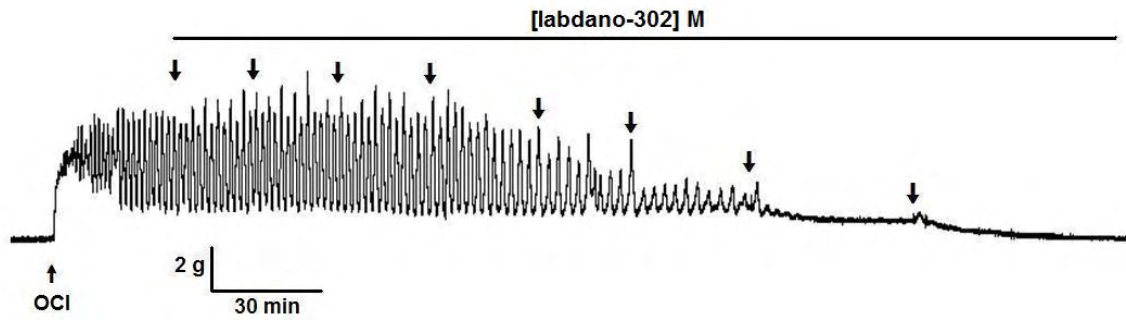
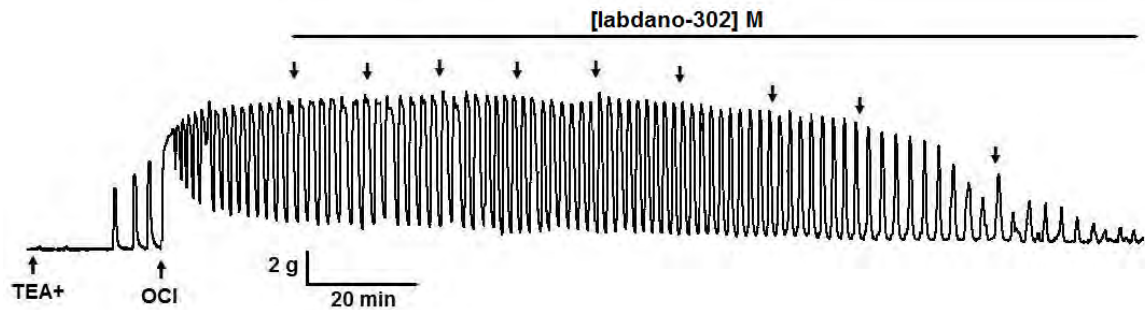
A**B**

Figura 11. Registros originais representativos do efeito relaxante do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença de 1 mM de TEA^+ (**B**), em útero isolado de rata. As setas representam as concentrações cumulativas (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} M) (**A**) e (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} e 10^{-3}) (**B**) do labdano-302.

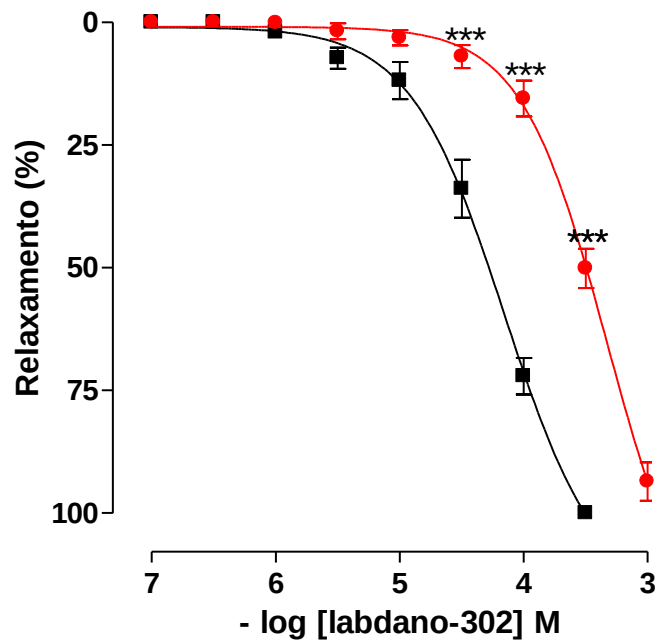


Gráfico 8. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 1 mM de TEA⁺, em útero isolado de rata (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “two-way” seguido por Bonferroni, *** $p < 0,001$ (controle vs. TEA⁺).

4.2.6 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de iberiotoxina (IbTx)

O labdano-302 (10^{-7} – 10^{-3} M) relaxou o útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina na ausência ($pD_2 = 4,3 \pm 0,06$) e na presença ($pD_2 = 3,8 \pm 0,06$) de 100 nM de IbTx, um bloqueador seletivo dos canais para potássio de grande conduância sensíveis ao cálcio (BK_{Ca}) (Figura 12). A potência relaxante do labdano-302 foi reduzida cerca de 3 vezes significativamente ($p < 0,0007$) quando comparada ao relaxamento produzido pelo diterpeno na ausência da iberiotoxina (Gráfico 9). Tanto na presença como na ausência do bloqueador o valor de $E_{max} = 100\%$ foi alcançado, porém na presença de IbTx esse E_{max} foi alcançado na concentração de 10^{-3} M do labdano-302, uma concentração cerca de 3 vezes maior do que a necessária na condição controle, que foi de 3×10^{-4} M. O tempo médio para atingir o E_{max} $200,3 \pm 12,4$ min, não foi alterado de maneira significativa na presença da IbTx quando comparado ao controle ($186,6 \pm 3,4$ min).

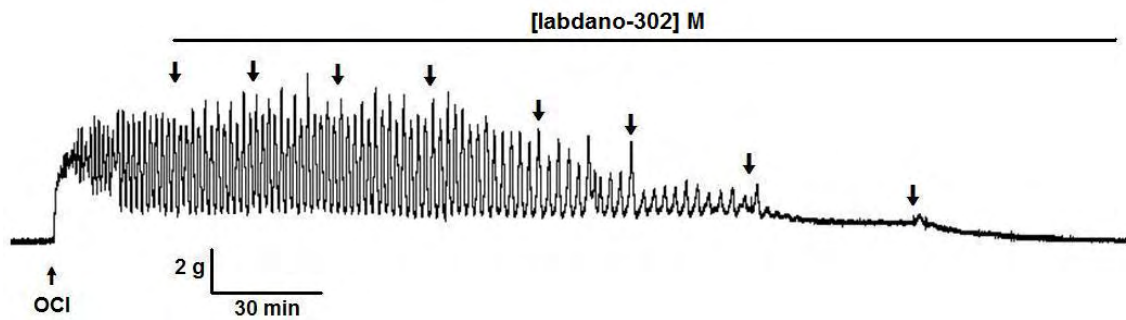
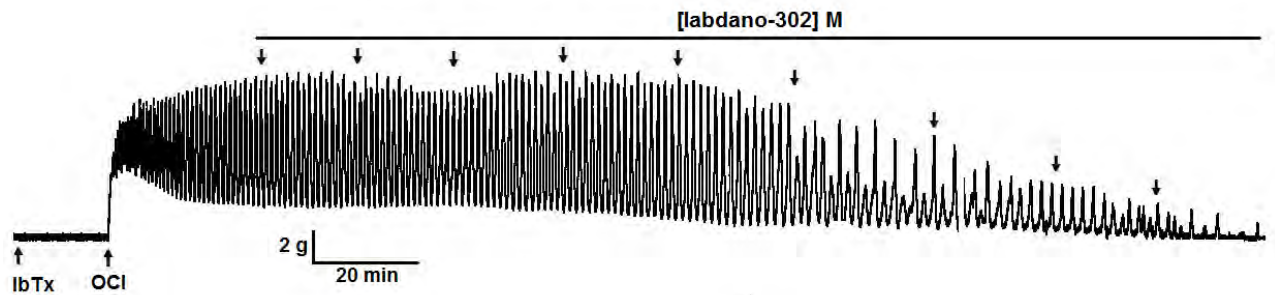
A**B**

Figura 12. Registros originais representativos do efeito relaxante do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença de 100 nM de IbTx (**B**), em útero isolado de rata. As setas representam as concentrações cumulativas (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} M) (**A**) e (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} e 10^{-3}) (**B**) do labdano-302.

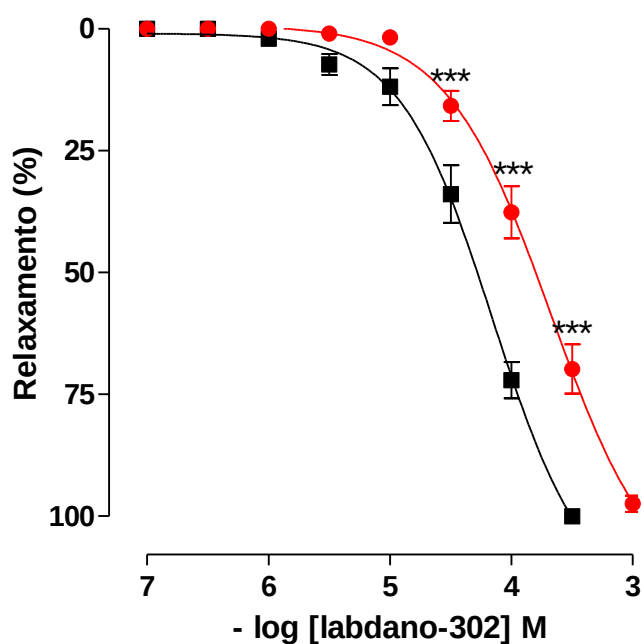


Gráfico 9. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 100 nM de IbTx, em útero isolado de rata ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “two-way” seguido por Bonferroni, *** $p < 0,001$ (controle vs. IbTx).

Tabela 2. Valores de pD_2 e CE_{50} do labdano-302 na ausência (controle) e na presença de diversos bloqueadores de canais para potássio.

Bloqueador	pD_2	CE_{50} (M)
-	$4,3 \pm 0,06$	$4,9 \pm 0,6 \times 10^{-5}$
CsCl	$3,1 \pm 0,06$	$7,3 \pm 1,3 \times 10^{-4}$
4-aminopiridina	$4,1 \pm 0,08$	$7,8 \pm 1,4 \times 10^{-5}$
Glibenclamida	$4,1 \pm 0,05$	$6,8 \pm 0,9 \times 10^{-5}$
Apamina	$3,8 \pm 0,03$	$1,6 \pm 0,1 \times 10^{-4}$
TEA ⁺	$3,6 \pm 0,04$	$2,5 \pm 0,05 \times 10^{-4}$
IbTx	$3,8 \pm 0,06$	$1,6 \pm 0,01 \times 10^{-4}$

4.2.7 Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de aminofilina

O labdano-302 (10^{-12} – 3×10^{-4} M) relaxou o útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina na ausência ($pD_2 = 4,3 \pm 0,06$) e na presença ($pD_2 = 7,8 \pm 0,1$) de 10^{-4} M de aminofilina, um inibidor não seletivo de fosfodiesterases (Figura 13). A potência relaxante do labdano-302 foi aumentada cerca de 320 vezes ($p < 0,0001$) quando comparada ao relaxamento produzido pelo diterpeno na ausência da aminofilina (Gráfico 10). Tanto na presença como na ausência do inibidor o valor de $E_{max} = 100\%$ foi alcançado na concentração de 3×10^{-4} M do labdano-302. No entanto a concentração mínima em que o labdano-302 produz efeito tocolítico foi alterada 3×10^{-12} M na presença do inibidor, uma concentração cerca de 100.000 vezes menor que a utilizada no controle, que foi de 3×10^{-7} M. O tempo médio para atingir o E_{max} foi de $186,6 \pm 3,4$ min na ausência da aminofilina e de $302,3 \pm 12,4$ min na presença desse inibidor, apresentando um aumento significativo ($p < 0,0002$) de aproximadamente 115 min no tempo médio de relaxamento.

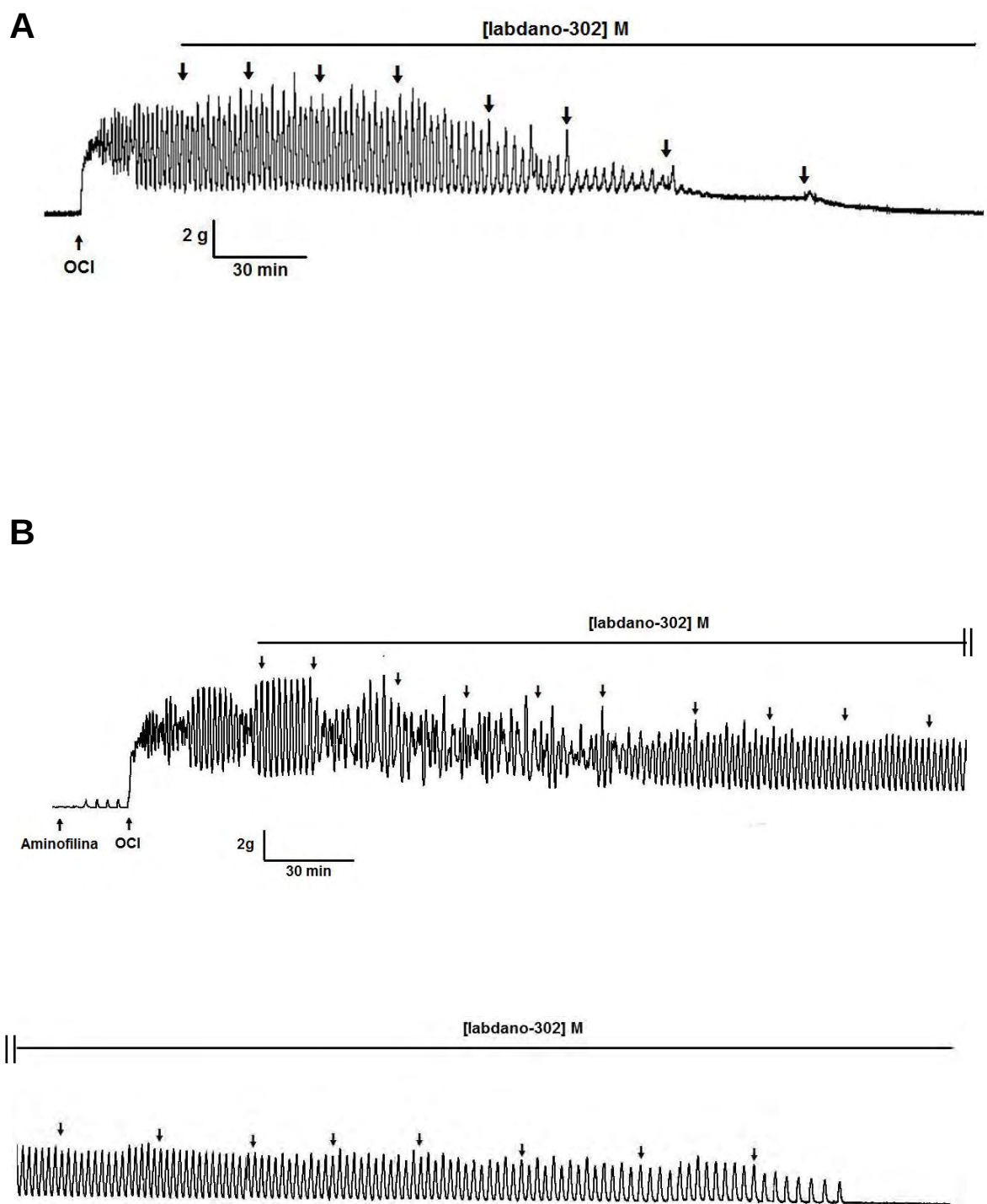


Figura 13. Registros originais representativos do efeito relaxante do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença de 100 nM de aminofilina (**B**), em útero isolado de rata. As setas representam as concentrações cumulativas (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} M) (**A**) e (10^{-12} , 3×10^{-12} , 10^{-11} , 3×10^{-11} , 10^{-10} , 3×10^{-10} , 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4}) (**B**) do labdano-302.

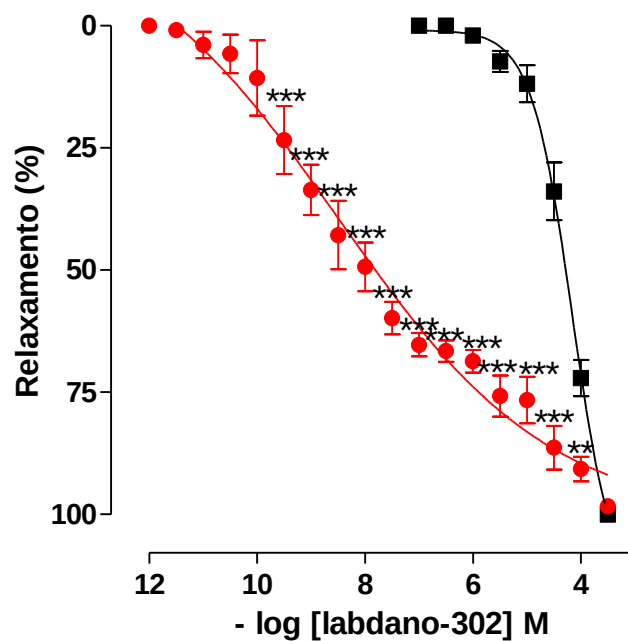
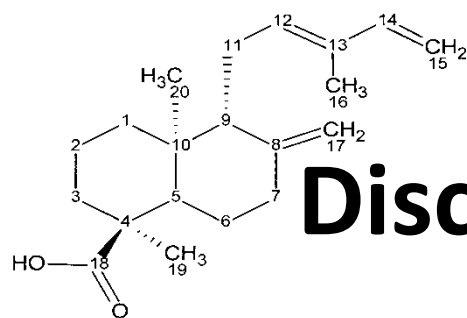


Gráfico 10. Efeito do labdano-302 sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (■) e na presença (●) de 10^{-4} M de aminofilina, em útero isolado de rata ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “two-way” seguido por Bonferroni, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ (controle vs. aminofilina).



Discussão

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram reunidas evidências farmacológicas que dão suporte a hipótese de que o ácido 8(17),12*E*,14-labdatrieno-18-óico (labdano-302), diterpeno da classe dos labdanos isolado das cascas do caule da espécie *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul., exerce seu efeito tocolítico em útero isolado de rata através da modulação positiva de canais para K⁺ de grande condutância ativados pelo cálcio (BK_{Ca}) e os canais para K⁺ de pequena condutância ativados pelo cálcio (SK_{Ca}), além da participação dos nucleotídeos cíclicos.

Em estudos anteriores Ribeiro (2003) demonstrou que o labdano-302 apresentou efeito tocolítico em útero de rata por inibir de maneira eqüipotente as contrações fásicas induzidas por carbacol e por ocitocina. O fato do labdano-302 ter antagonizado as contrações induzidas tanto por carbacol quanto por ocitocina, de maneira eqüipotente, é sugestivo que o diterpeno não está agindo em nível de receptor, e sim em um passo comum da via de sinalização que leva à contração por estes agonistas, uma vez que cada agonista tem seu próprio sistema receptor específico, ou agindo através de uma via de sinalização que leve ao relaxamento deste órgão. Com o intuito de dar continuidade aos resultados obtidos por Ribeiro (2003), decidiu-se investigar o possível mecanismo de ação tocolítica do labdano-302 em útero isolado de rata.

Para confirmar ou descartar a hipótese de que labdano-302 não estaria agindo em nível de receptor muscarínico e de ocitocina, decidiu-se caracterizar o bloqueio exercido pelo diterpeno frente às curvas concentrações-resposta cumulativas induzidas por carbacol ou por ocitocina. Foi observado um desvio das curvas para direita, de forma não-paralela e com redução do E_{max} (Gráfico 1A e 2A), sugerindo um antagonismo do tipo não-competitivo, que foi confirmado pelo valor de “slope” do gráfico de Schild (Gráfico 1B e 2B) o qual diferiu significativamente da unidade, confirmando a hipótese que o labdano-302 não está agindo em nível de receptores muscarínicos e de ocitocina para promover seu efeito tocolítico.

O íon cálcio (Ca²⁺) é responsável por desencadear uma variedade de processos celulares nos neurônios, músculos e muitas células não-excitáveis e tem como função mais importante a sinalização celular quando do aumento da [Ca²⁺]_c (BERRIDGE; DUPONT, 1995; BERRIDGE, 1997; BERRIDGE; BOOTMAN;

LIPP, 1998; BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000; BOOTMAN; LIPP; BERRIDGE, 2001; SCHUSTER; MARHL; HÖFER, 2002). O Ca^{2+} , um regulador celular universal (CAMPBELL, 1983), é um sinal primário responsável pela ativação da contração do músculo liso (NEERING; MORGAN, 1980; MORGAN; MORGAN, 1982).

A contração do músculo liso é disparada principalmente pelo aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, e pode ser alcançada tanto via despolarização de membrana, levando ao aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ através dos canais para cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), como pela ligação do agonista a um receptor, que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003), originalmente designados por acoplamentos eletromecânico e fármaco-mecânico, respectivamente (SOMLYO; SOMLYO, 1968). Agonistas como o carbacol e a ocitocina ligam-se a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata de fosfoinosítídeos, usualmente através da produção de IP_3 mediada pelas proteínas G_q e G_{11} , estimulando, assim a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). Os agonistas contráteis podem também elevar a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ através de receptores de rianodina e estimular a entrada de Ca^{2+} através dos múltiplos tipos de canais, incluindo canais para Ca^{2+} operados por estoque, por receptor ou por voltagem (SANDERS, 2001; McFADZEAN; GIBSON, 2002).

Em músculo liso, vários agentes contráteis causam uma resposta contrátil bifásica, consistindo em uma contração inicial transiente – componente fásico (< 30 s), seguido por uma contração sustentada – componente tônico, que se desenvolve lentamente ao longo de 15 min e é mantida durante o período de exposição ao agente contrátil (para revisão ver VAN BREEMEN; AARONSON; LOUTZENHISER, 1979; BOLTON, 1979).

Baseado no fato de que os mecanismos envolvidos na manutenção da fase tônica da contração são diferentes em relação aos da fase fásica (ABDELLATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989; HONDA; TAKANO; KAMIYA, 1996), resolveu-se verificar se o labdano-302 promoveria o relaxamento do útero pré-contraído com ocitocina e KCl.

Como um dos passos comum às vias de sinalização da ocitocina e do KCl é a despolarização da membrana plasmática, com conseqüente abertura dos Ca_v que leva a um influxo de Ca^{2+} , resultando na manutenção da fase tônica

da contração (WRAY, 1993), levantou-se a hipótese de que o labdano-302 poderia estar agindo por bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v .

Para verificar esta hipótese, avaliou-se o efeito do diterpeno sobre o componente tônico da resposta contrátil induzida por KCl (acoplamento eletromecânico) e por ocitocina, que age por acoplamento misto (fármaco e eletromecânico) em útero isolado de rata. Como mostra a Figura 5 o labdano-302 não relaxou de maneira significativa ($E_{\text{max}} = 9,75 \pm 0,07\%$) o útero pré-contraído com KCl, entretanto relaxou com eficácia máxima ($E_{\text{max}} = 100\%$) e de maneira dependente de concentração o útero pré-contraído com ocitocina (Gráfico 3). O fato do labdano-302 não relaxar o útero pré-contraído com KCl 60 mM é sugestivo de que o mecanismo de ação espasmolítica do mesmo não envolva bloqueio direto dos Ca_v , e sim ativação de canais para potássio. Pois, já é bem relatado na literatura que ativadores de canais para potássio são praticamente ineficazes em induzir relaxamento de músculo liso pré-contraído por elevadas concentrações de K^+ no meio extracelular, devido à grande redução no gradiente eletroquímico para o efluxo de K^+ (GURNEY, 1994; NIELSEN-KUDSK, 1996).

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, secreção de hormônios e de neurotransmissores. Sua atividade pode ser regulada por voltagem, Ca^{2+} , por neurotransmissores e conseqüentemente as vias de sinalização que eles estimulam, estímulos químicos e físicos, incluindo a tensão de oxigênio, pH, lipídios, estiramento mecânico, GPCRs, entre outros estímulos (LESAGE; LAZDUNSKI, 2000; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). O movimento dos íons K^+ através de canais localizados na membrana regulam o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v (THORNELOE; NELSON, 2005).

A associação entre o aumento da atividade dos canais para K^+ e o relaxamento do músculo liso vem sendo estudada em vários tecidos e com diversos canais para K^+ . Alguns autores apresentam evidências da participação de vários canais para K^+ na regulação do músculo liso, tanto em nível funcional como em nível eletrofisiológico, como por exemplo: K_v em íleo de cobaia (LIMA,

2004; CAVALCANTE, 2008) e aorta de rato (RIBEIRO et al., 2007a). BK_{Ca} em íleo de cobaia (SILVA; NOUAILHETAS; ABOULAFIA, 1999; CAVALCANTE, 2001; CAVALCANTE, 2008; LIMA, 2008), músculo longitudinal de íleo de cobaia (UYAMA; IMAIZUMI; WATANABE, 1993), traquéia de cobaia (HIRAMATSU et al., 1994, RIBEIRO, 2007), artéria mesentérica de rato (OLIVEIRA et al., 2004), traquéia de cão (WADE; SIMS, 1993), traquéia de porco (KUME et al., 1994; KANNAN; JOHNSON, 1995; YAMAKAGE; HIRSHMAN; CROXTON, 1996), útero de rata (LIMA, 2008, TRAVASSOS et al. 2009), aorta de coelho (DEMIREL et al., 1994), artérias submucosas e mesentéricas de cobaia (HILL et al., 1997) e no miométrio humano (ANWER et al., 1993, MEERA et al., 1995). SK_{Ca} em íleo de cobaia (CAVALCANTE, 2008, MACÊDO, 2008), útero de rata (SILVA; OKUYAMA; PAIVA, 1996) e em aorta de rato (SILVA et al., 1994). K_{ATP} em íleo de cobaia (CAVALCANTE, 2008, MACÊDO, 2008), traquéia de cobaia (SHIKADA; TANAKA, 1995), músculo longitudinal de íleo de rato (DAVIES; McCURRIE; WOOD, 1996) e de cobaia (SUN; BENISHIN, 1994), em uretra de cobaia (TERAMOTO; BRADING; ITO, 1999) e em traquéia de gato (TERAMOTO; NAKASHIMA; ITO, 2000).

O efluxo de potássio em células miométriais resulta em repolarização de membrana e este efluxo é a corrente iônica primária responsável pela manutenção do potencial de repouso no útero (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

No músculo liso uterino, os mais abundantes e mais bem estudados canais para K^+ são: K_V ; BK_{Ca} ; SK_{Ca} ; K_{ATP} (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

Fundamentado no fato de que recentemente foram demonstradas evidências farmacológicas de que o mecanismo de ação relaxante do labdano-302 em traquéia de cobaia se dá pela participação dos BK_{Ca} (RIBEIRO et al., 2007a), em aorta de rato pela participação dos K_V e K_{ir} (RIBEIRO, 2007) e, em íleo de cobaia pela participação dos SK_{Ca} e K_{ATP} (MACÊDO, 2008), decidiu-se investigar a participação dos canais para potássio no efeito tocolítico promovido por labdano-302 em útero isolado de rata.

No presente estudo, a participação dos canais para K^+ no efeito tocolítico do diterpeno foi investigada em nível funcional, utilizando-se bloqueadores desses canais como ferramentas farmacológicas. Uma vez que a potência relaxante do labdano-302 na presença de CsCl, bloqueador não seletivo dos canais para K^+ , foi reduzida significativamente em aproximadamente 16

vezes, ocorrendo um desvio da curva de relaxamento do labdano-302 para direita no útero pré-contraído com ocitocina é sugestivo de que haja a participação de canais para K^+ no mecanismo de ação tocolítica do diterpeno em útero de rata (Gráfico 4).

Os canais para K^+ sensíveis a voltagem (K_V) são amplamente expressos no músculo liso uterino. Cada canal é composto de quatro subunidades, sendo que cada subunidade (S) possui seis regiões hidrofóbicas (S1-S6), que formam o domínio transmembrana. Essas regiões hidrofóbicas são ligadas por seqüências de aminoácidos hidrofílicos, os quais são expostos no espaço intra- ou extracelular. Cada subunidade contém um domínio carboxi- e amino-terminal citoplasmático. A região S4 é carregada, contendo um aminoácido básico (lisina ou arginina) a cada três resíduos, sendo essa região um importante componente do sensor de voltagem do canal. A via de permeação do canal é formada, em parte, pela região de ligação das seqüências transmembrana S5 e S6 e é chamada de H5 ou região do poro (JAN; JAN, 1992)

Visto que os K_V contribuem para o potencial de repouso nesta células, uma vez que em resposta a despolarização, o efluxo de K^+ através destes canais induz repolarização das células para restabelecer o potencial de repouso (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007), levantou-se a hipótese de que o labdano-302 poderia estar induzindo o efeito tocolítico por ativação dos K_V que ao repolarizar a membrana levaria indiretamente ao bloqueio do influxo de Ca^{2+} via Ca_V e por fim ao relaxamento. Para tanto avaliou-se o efeito relaxante do labdano-302 na presença e na ausência da 4-AP, um bloqueador seletivo dos K_V , e o observado foi que não há a participação dos K_V no mecanismo de ação tocolítica do labdano-302, uma vez que a 4-AP em nada alterou as curvas de relaxamento do diterpeno em útero pré-contraído com ocitocina (Gráfico 5), semelhante ao observado por Macêdo (2008) em íleo de cobaia e por Ribeiro et al. (2007a) em aorta de rato.

Os canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) estão presentes em vários tipos de músculos lisos. Uma característica primária destes canais é a de sua abertura ser inibida por concentrações basais de ATP intracelular, por sulfoniluréias e por baixas concentrações 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).

Os canais K_{ATP} são um complexo de pelo menos duas proteínas, o receptor de sulfoniluréias (SUR) associado a uma subunidade formadora do poro que pertence à família Kir6.0. A estequiometria do canal consiste de um tetrâmero de subunidades Kir6.0 (principalmente Kir6.1 e Kir6.2), que forma o poro do canal, rodeada de quatro proteínas SUR. Para formar um canal funcional, ambas as subunidades SUR e Kir6.1 ou Kir6.2 são essenciais, já que nenhum canal é formado quando essas proteínas são expressas sozinhas. São as subunidades SUR que conferem ao canal sensibilidade às sulfoniluréias e aos abridores do canal, como o diazóxido, e uma vez que essas subunidades possuem o domínio de ligação de nucleotídeos, elas também conferem sensibilidade ao ATP (STANDEN, 1997). A isoforma predominante dos K_{ATP} em células miométriais é a $K_{ir6.1}/SUR2B$, apesar da isoforma $K_{ir6.2}/SUR1$ também já ter sido evidenciada (CHIEN et al., 1999; CURLEY et al., 2002). As correntes através dos K_{ATP} não têm sido diretamente medidas em células miométriais, mas a ação delas está implicada na função miométrial. Os ativadores dos K_{ATP} diminuem as contrações uterinas, no entanto, eles são mais potentes em miométrio humano não grávido do que em grávido (SANBORN, 2000). O papel destes canais, no tecido muscular liso é menos claro e, provavelmente, reflete a grande diversidade de funções deste tecido (KHAN et al., 2001).

Para avaliar se os K_{ATP} estariam participando do mecanismo de ação espasmolítica do labdano-302 em útero isolado de rata, testou-se o efeito do extrato na presença de glibenclamida, inibidor seletivo destes canais, e observou-se que a curva de relaxamento induzida pelo diterpeno no útero pré-contraído com ocitocina não foi alterado na presença de glibenclamida (Gráfico 6), sugerindo que esse tipo de canal para K^+ não está participando do efeito tocolítico promovido pelo labdano-302, semelhante ao que foi observado por Ribeiro (2007) em traquéia de cobaia e aorta de rato, o que não foi observado por Macêdo (2008) em íleo de cobaia.

Os canais para K^+ ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}) 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) SK_{Ca} , são bloqueados por apamina; 2) canais para K^+ de condutância intermediária ativados por Ca^{2+} (IK_{Ca}) bloqueados pelo clotrimazole, e 3) BK_{Ca} que são

bloqueados por toxinas, como caribdotoxina e iberiotoxina, ou por baixas concentrações de TEA^+ . Os canais do tipo SK_{Ca} e IK_{Ca} são insensíveis à voltagem e ativados por baixa concentração de Ca^{2+} citosólico ($< 1,0 \mu\text{M}$), em contraste aos BK_{Ca} que são ativados tanto por voltagem como por Ca^{2+} (WEI et al., 2005). Os BK_{Ca} são encontrados em cérebro, cóclea, músculo esquelético e músculo liso. Já os SK_{Ca} são largamente encontrados em cérebro, coração e alguns tipos de músculo liso. Enquanto que os IK_{Ca} estão presentes na placenta, próstata, linfócitos, pâncreas e endotélio vascular (WEI et al., 2005).

Os canais K_{Ca} foram subdivididos da seguinte forma: no grupo dos BK_{Ca} são chamados de $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ (WEI et al., 2005), enquanto que no grupo dos SK_{Ca} estão incluídos os $\text{K}_{\text{Ca}2.1}$, 2.2 e 2.3 (KOHLE et al., 1996), e os IK_{Ca} passaram a ser chamados de $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ (ISHII et al., 1997; JOINER et al., 1997). Três outros membros deste grupo, $\text{K}_{\text{Ca}4.1}$; 4.2 e 5.2 (JOINER et al., 1997; SCHREIBER et al., 1998; YUAN et al., 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 $\text{K}_{\text{Ca}4.2}$ e $\text{K}_{\text{Ca}4.1}$ são ativados pelo Na^+ e Cl^- intracelular (YUAN et al., 2003), enquanto o $\text{K}_{\text{Ca}5.1}$ é sensível ao pH (SCHREIBER et al., 1998).

Os canais $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ são encontrados em cérebro, cóclea, músculo esquelético e músculo liso. Já os $\text{K}_{\text{Ca}2.1}$; 2.2 e 2.3 são largamente encontrados em cérebro, coração e alguns tipos de músculo liso. Enquanto que os $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ estão presentes na placenta, próstata, linfócitos, pâncreas e endotélio vascular (WEI et al., 2005).

Os canais SK_{Ca} geram uma corrente hiperpolarizante em células excitáveis após a geração do potencial de ação, e assim levam ao relaxamento do músculo liso (BRAINARD; KOROVIKINA; ENGLAND, 2007). Os SK_{Ca} estão constitutivamente associados a calmodulina, que medeia a abertura do canal através da ligação com o cálcio (XIA et al., 1998).

Inicialmente, hipotetizou-se que os canais SK_{Ca} poderiam estar envolvido no mecanismo de ação induzido pelo labdano-302. Caso essa hipótese fosse verdadeira o relaxamento do útero de rata induzido pelo diterpeno deveria ser atenuado na presença de apamina, um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} . O fato da curva de relaxamento produzida por labdano-302 ter sido deslocada para a direita na presença de apamina e ter reduzido sua potência em torno de 3 vezes (Gráfico 7) é sugestivo que o labdano-302 esteja promovendo seu efeito tocolítico

através de uma modulação positiva desses canais. Estes dados estão em acordo com os encontrados em íleo de cobaia por Macêdo (2008).

Os canais BK_{Ca} (também conhecido como maxi-K) são um dos canais iônicos mais estudados no músculo liso do útero devido a sua abundância e significativa corrente de repolarização. Relativamente poucos canais BK_{Ca} precisam ser ativados para produzir relaxamento uterino, assim, estes canais podem ter efeitos profundos sobre a atividade miométrial, principalmente em úteros gravídicos, onde há uma maior expressão desses canais, impedindo assim as contrações uterinas e, conseqüentemente, o aborto (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

Os canais BK_{Ca} são compostos de quatro subunidades α e quatro subunidades β . A subunidade α é a porção formadora do poro do canal e consiste de 11 domínios hidrofóbicos (S0-S10). O domínio transmembrana (S0-S6) constitui o núcleo da subunidade α com uma cauda NH_2 terminal. Os quatro demais domínios (S7-S10) são localizados no citoplasma e forma a cauda $COOH$ terminal da proteína. As subunidades α podem associar-se com diferentes subunidades β , o que explica diferentes propriedades dos BK_{Ca} em diferentes tecidos. A subunidade β é composta por dois domínios transmembrana com uma grande alça extracelular, e as caudas NH_2 e $COOH$ terminais localizadas no citoplasma. (PAULSON; NEWMAN, 1987; BOYLE et al., 1992). As propriedades fisiológicas dos BK_{Ca} , incluindo a sensibilidade ao Ca^{2+} , são moduladas pelas subunidades β acessórias. As estimativas da sua densidade média, em músculo liso variam entre 1 a 4 canais/ μm^2 (BENHAM; BOLTON, 1986; SINGER; WALSH JR. 1987; PEREZ et al., 1999).

Diante dessas premissas passou-se a investigar se o labdano-302 estaria agindo sobre os canais BK_{Ca} , ativando-os, e conseqüentemente levando a uma repolarização de membrana que levaria indiretamente ao fechamento 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 promovida pelo labdano-302 foi desviadas para direita (Gráfico 8) tendo sua potência relaxante diminuída em torno de 5 vezes quando comparada com a curva de relaxamento na ausência deste bloqueador. Estes dados demonstram que provavelmente o relaxamento produzido pelo diterpeno em útero isolado de rata está associado à abertura dos BK_{Ca} , semelhante ao observado por Ribeiro et al. (2007a) em traquéia de cobaia. Pelo TEA^+ se tratar

de um íon e, portanto poder se ligar em outros canais iônicos, para confirmar que realmente os BK_{Ca} estariam envolvidos no efeito do diterpeno, utilizou-se a iberiotoxina, um bloqueador específico desses canais (GALVEZ et al., 1990; CANDIA; GARCIA; LATORRE, 1992; ABOULAFIA et al., 2002). Foi verificado que a potência relaxante labdano-302 (Gráfico 9) diminuindo significativamente em torno de 3 vezes quando comparada na ausência da iberiotoxina, confirmando assim a participação dos BK_{Ca} no mecanismo de ação tocolítico do diterpeno.

Desta forma podemos sugerir que o labdano-302 pode estar atuando em útero de rata através de uma modulação positiva de canais K_{Ca}, mais especificamente os SK_{Ca} e BK_{Ca}, o que poderia levar a uma repolarização de membrana das células musculares de útero de rata, conseqüentemente redução do influxo de Ca²⁺ via Ca_v, reduzindo assim a [Ca²⁺]_c e produzindo relaxamento deste órgão.

Contudo, existem várias evidências de substâncias capazes de modular indiretamente a abertura de canais para K⁺ (LIU et al., 2003; DENSON et al., 2005; YANG et al., 2005), algumas delas, como a forskolina (FSK) que é um diterpeno do tipo labdano, são capazes de modular positivamente a abertura de canais para K⁺ por fosforilação via PKA, por ativar diretamente a adenilil ciclase (WELLMAN et al., 1998; WALDRON; COLE, 1999; MASON et al., 2002; WINKLHOFER et al., 2003).

As fosfodiesterases (PDEs) estão amplamente distribuídas em vários tecidos de mamíferos, incluindo o músculo liso uterino, sendo distribuídas em 11 famílias distintas (PDE1-11) e tendo como função a hidrólise do AMPc (3',5'-monofosfato cíclico de adenosina) e do GMPc (3',5'-monofosfato cíclico de guanosina) resultando em seus produtos inativos, o 5'-AMP e o 5'-GMP, que não mais são capazes de ativar, respectivamente, a PKA (proteína cinase dependente de AMPc) e a PKG (proteína cinase dependente de GMPc), 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 a um acúmulo do conteúdo total desses nucleotídeos (BENDER; BEAVO, 2006; LUGNIER, 2006).

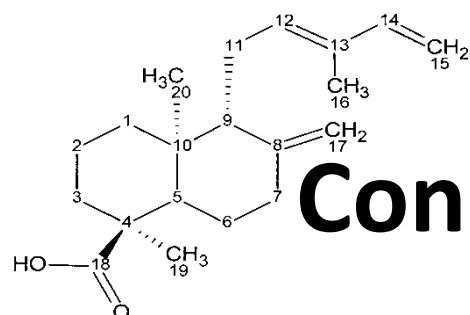
Uma maneira indireta de se investigar a participação de nucleotídeos cíclicos no efeito relaxante de uma droga teste é a utilização de inibidores de

PDEs, onde se espera que a potência relaxante de substâncias que estejam agindo aumentando os níveis de nucleotídeos cíclicos seja maior. Então surgiu a questão: será que o diterpeno estaria agindo por aumentar os níveis de nucleotídeos cíclicos? Para confirmar ou descartar esta hipótese lançou-se mão de um conhecido inibidor das PDEs, a aminofilina (HIRSH et al., 2004), e observou-se que a aminofilina promoveu uma significativa potencialização do efeito relaxante do labdano-302 (Gráfico 10) em torno de 320 vezes. Estes dados estão em concordância com os da literatura, pois outros diterpenos do tipo labdano como a FSK tem seu efeito relaxante potencializado pela presença de inibidores de PDEs em vários músculos lisos, como artéria coronária de boi e cães, intestino delgado de coelho, aorta de rato e traquéia de cobaia (MULLER; BAER, 1983; SATAKE et al., 1995; TRUSS et al., 1996; TANIZAWA et al., 1998). Resultados semelhantes foram observados por Ribeiro (2007) em aorta de rato e por Macêdo (2008) em íleo de cobaia.

Sendo assim, o fato do efeito tocolítico do labdano-302 ter sido potencializado pela presença de aminofilina pode indicar que os nucleotídeos cíclicos, possivelmente o AMPc, de alguma forma, esteja participando do mecanismo de ação tocolítico do labdano-302 em útero isolado de rata.

As evidências apresentadas aqui levam a propor que, em nível funcional, o mecanismo de ação para explicar o efeito tocolítico do labdano-302 em útero isolada de rata se dá por uma modulação positiva de canais para potássio sensíveis ao cálcio (K_{Ca}), especificamente os SK_{Ca} e os BK_{Ca} . Essa modulação parece envolver a participação dos nucleotídeos cíclicos uma vez que labdano-302 teve sua potência relaxante deveras aumentada na presença de um inibidor inespecífico de PDE, sugerindo assim que o diterpeno poderia estar aumentando os níveis intracelulares de AMPc o que levaria a uma subsequente ativação da PKA e esta seria capaz de fosforilar canais para K^+ levando a uma repolarização/hiperpolarização da membrana plasmática e conseqüentemente redução do influxo de cálcio via Ca_v . No entanto mais protocolos experimentais são necessários para que possamos confirmar essa hipótese.

Outras vias de sinalização intracelular, ainda não investigadas, podem ter um grande papel no efeito relaxante do labdano-302 sobre os músculos lisos, ainda sendo necessárias futuras investigações para a obtenção de uma visão total do mecanismo de ação pelo qual o diterpeno exerce seus efeitos.



Conclusões

6 CONCLUSÕES

No estudo do efeito tocolítico do ácido 8(17),12*E*,14-labdatrieno-18-óico (labdano-302), diterpeno isolado das cascas do caule de *Xylopia langsdoirina* A. St.-Hil. & Tul., visando elucidar o mecanismo de ação em útero isolado de rata, pode-se concluir que:

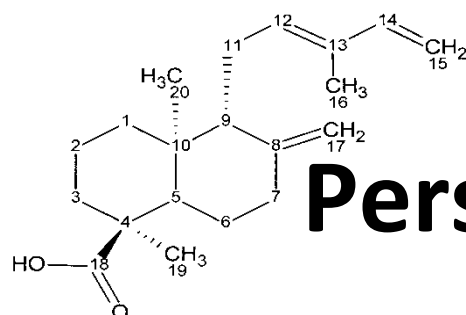
a) O labdano-302 não está agindo diretamente em nível de receptor muscarínico e de ocitocina para produzir efeito tocolítico;

b) Não há envolvimento dos canais para potássio do tipo K_V e K_{ATP} na ação tocolítica do labdano-302;

c) O labdano-302 modula positivamente os canais para potássio do tipo SK_{Ca} e BK_{Ca} , o que indiretamente reduziria o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V com consequente relaxamento;

d) Os nucleotídeos cíclicos estão envolvidos no efeito tocolítico do labdano-302;

e) Não se podem descartar outras vias de sinalização que ainda não foram investigadas.



Perspectivas

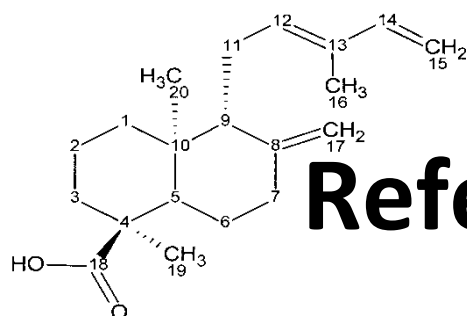
7 PERSPECTIVAS

7.1 Em estudos funcionais:

1. Avaliar o grau de participação dos canais de potássio no efeito tocolítico produzido pelo labdano-302 por meio da incubação simultânea de vários bloqueadores desses canais;
2. Verificar qual tipo de PDEs estaria envolvida no efeito tocolítico promovido pelo labdano-302 por meio de inibidores seletivos dessas enzimas;
3. Investigar a participação da PKA e/ou PKC no efeito tocolítico produzido pelo labdano-302 por meio de inibidores seletivos dessas enzimas;

7.2 Em estudos celulares e moleculares:

1. Avaliar se labdano-302 interfere com o ciclo celular em miócitos uterinos de rata, através da técnica de citometria de fluxo;
2. Avaliar se labdano-302 interfere com os níveis intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) em miócitos de útero de rata, através de técnica de imunoensaio;
3. Verificar se labdano-302 interfere com a $[Ca^{2+}]_c$ em miócitos uterinos de rata, através de técnicas fluorimétricas;
4. Avaliar o efeito do labdano-302 nas correntes de Ca^{2+} através dos $Ca_v 1.2$, utilizando a configuração “whole-cell” da técnica de *patch-clamp* em miócitos de útero de rata;
5. Investigar o efeito do labdano-302 nas correntes de K^+ através dos BK_{Ca} , utilizando a configuração “cell-attached” da técnica de *patch-clamp* em miócitos uterinos de rata.



Referências

REFERÊNCIAS

AARONSON, P. I.; SARWAR, U.; GIN, S.; ROCKENBAUCH, U.; CONNOLLY, M.; TILLET, A.; WATSON, S.; LIU, B.; TRIBE, R. M. A role for voltage-gated, but not Ca²⁺-activated, K⁺ channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 815–824, 2006.

ABDELLATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphosphoinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Sciences**, v. 45, p. 757-786, 1989.

ABE, A.; KARAKI, H. Calcium channel blocker-like action of 1,9-dideoxyforskolin in vascular smooth muscle. **Japanese Journal of Pharmacology**, 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. **European Journal of Pharmacology**, 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.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 2nd edition (2007 Revision). **British Journal of Pharmacology**, v. 150 (Suppl. 1), p. S1 – S168, 2007.

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 *Xylopia aromatica* (Annonaceae). **Tetrahedron**, v. 52, n. 12, p. 4215-4224, 1996.

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 *Xylopia cayennensis* Maas. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 11, p. 1055-1058, 2004.

ANDRADE, N. C.; FRANÇA, V. C.; FECHINE, I. M.; TAVARES, J. F.; MAOIR, J. F. A. S.; RIBEIRO, L. A. A.; SILVA, M. S. Diterpenos kaurano e labdano do gênero *Xylopia*. 25^a Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, 2002.

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. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 4, p. C976-C985, 1993.

ARUNLAKSHANA, O.; SCHILD, H. O. Some quantitative uses of drug antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 14, p. 48 - 58, 1959.

BALICK, M.J.; COX, P. A. Plants, People and Culture: the Science of Ethnobotany. Scientific American Library, New York, **Journal of Natural Products**., 60 (4), p. 428-429, 1997.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

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

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

BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signaling. **Natural Reviews**, v. 1, p. 11-21, 2000.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP, P. Calcium – a life and death signal. **Nature**. v. 395, p. 645 – 648, 1998.

BERRIDGE, M. J. Elementary and global aspects of calcium signalling. **Journal of Physiology**, v. 499, p. 291 – 306, 1997.

BERRIDGE, M. J ; DUPONT, G. Spatial and temporal signalling by calcium. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 6, p. 267 – 274, 1995.

BLAUSTEIN, M. P. Sodium/Calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Current Topics in Membranes and Transport**, v. 34, p. 289-330, 1989.

BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Neue ent-atisiren- und ent-kaurensaure-derivate aus Helianthus-arten. **Phytochemistry**, v. 19, n. 5, p. 863, 1980.

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

- BOOTMAN, H.; LIPP, P.; BERRIDGE, M. J. The organization and functions of local Ca^{2+} signals. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 2213 – 2222, 2001.
- BOYLE, J.P.; TOMASIC, M.; KOTLIKOFF, M.I. Delayed rectifier potassium channels in canine and porcine airway smooth muscle cells. **Journal of Physiology**. 447:329-50; 1992.
- BRAINARD, A. M.; KOROVKINA, V. P.; ENGLAND, S. K. Potassium channels and uterine function. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 18, n. 3, p. 332–339, 2007.
- 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/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2009.
- BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 22, p. 162-195, 2005.
- BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141– 2153, 2004.
- CANDIA, S.; GARCIA, M. L.; LATORRE, L. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. **Biophysical Journal**. v. 63, p. 583-590, 1992.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, 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. **General Pharmacology**, v. 21, n. 1, p. 117-122., 1990.
- CAMPBELL A. K. **Intracellular Calcium: Its Universal Role as Regulator**. Chichester, UK: Wiley, 1983.
- CARAFOLI, E. Calcium signaling: a tale for all seasons. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v. 99, p. 1115 - 1122. 2002.
- CATTERALL, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. **Annual Review of Cell & Developmental Biology**, v. 16, p. 521-555, 2000.

CAVALCANTE, F. A. Investigação dos efeitos citotóxico e espasmolítico do lapachol e de seus derivados naturais e sintéticos: relação estrutura-atividade e mecanismo de ação. 2008. **Tese (Doutorado)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

CAVALCANTE, F. A. Mecanismo de ação espasmolítica de solavetivona, sesquiterpeno isolado das partes aéreas de *Solanum jabrense* Agra & Nee (SOLANACEAE). 2001. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)** – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2001.

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

CHIEN, E.K.; ZHANG, Y.; FURUTA, H.; HARA, M. Expression of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel subunits in female rat reproductive tissues: overlapping distribution of messenger ribonucleic acid for weak inwardly rectifying potassium channel subunit 6.1 and sulfonylurea binding regulatory subunit 2. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. 180:1121–6, 1999.

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

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

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 aromática*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 4, p. 532-539, 1995.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**; Ministério da Agricultura; Rio de Janeiro, p. 315, 1984.

CURLEY, M.; CAIRNS, M.T.; FRIEL, A.M.; McMEEL, O.M.; MORRISON, J.J.; SMITH, T.J. Expression of mRNA transcripts for ATP-sensitive potassium channels in human myometrium. **Molecular Human Reproduction**, 8:941–5, 2002.

DAVIES, M.P.; McCURRIE, J.R.; WOOD, D. Comparative effects of K⁺ channel modulating agents on contractions of rat intestinal smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 297, n. 3, p. 249-256, 1996.

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. **The American Journal of Physiology**, v. 267, n. 2, H1135-H1141, 1994.

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

DEVILLIER, P.; COROMPT, E.; 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. **European Journal of Pharmacology**, v. 430, n. 2-3, p. 325-333, 2001.

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.

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. **European Journal of Pharmacology**, v. 215, n. 1, p. 75-81, 1992.

EDWARDS, G.; WESTON, A. H. Potassium channel openers and vascular smooth muscle relaxation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 48, p. 237 - 258, 1990.

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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 15579-15582, 1997.

FARNSWORTH, N.R. Ethnobotany and the Search for New Drugs, Wiley, Chichester, Ciba Foundation Symposium 185, pp. 42-59, 1994.

FLISCHER, F.; MONTARI, C. A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Química Nova**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 56-64, 1995.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; FERREIRA, A. F. R. **Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar**. Universidade Estadual de Campinas, Divisão de Fitoquímica, Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas, 2006.

Disponível em < http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf>
Acessado em 07 de abril de 2009.

FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho–Kaibuchi, K-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 32-39, 2001.

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*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 19, p. 11083-11090, 1990.

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

HARVEY, A. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 11, p. 480–484, 2007

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 294–300, 2000.

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

HEGNAUER, R. Chemotaxonomie der Pflazen. Basileia e Suttgart, Birkhause Verlag, v. 3, p. 116, 1964.

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. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 36, n. 5, 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. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 21, n. 5, 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. **Biochemical Pharmacology**, 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. **General Pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 957-961, 1996.

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

HUGHEST, S. J.; HOLLINGSWORTH, M. Relaxin as a Relaxant of the Isolated Rat Uterus: Comparison with Its Mechanism of Action *In Vivo* **General Pharmacology**. v. 29, n. 5, p. 829-833. 1997.

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

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

JAN L.Y.; JAN Y.N. Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. **Annual Review of Physiology**, 54:537-55; 1992.

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

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

KANNAN, M. S.; JOHNSON, D. E. Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels. **Life Science**, v. 56, n. 25, p. 2229-2238, 1995.

KHAN, R. N. MATHAROO-BALL, B. ARULKUMARAN, S. ASHFORD, M. L. J. Potassium channels in the human myometrium. **Experimental Physiology**, v. 86, n. 2, p. 255-264, 2001.

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

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. **Journal of Biological Chemistry**, 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. **Science**, v. 273, p. 1709–1714, 1996.

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

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

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug Discovery. **Trends in microbiology**, v.15, n. 6, p. 279-289, 2007.

LEDOUX, J; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, n.1, p. 69-78, 2006.

LESAGE, F.; LAZDUNSKI, M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, 279 (5).F793-801, 2000.

LIMA, J. T. Caracterização do envolvimento dos BK_{Ca} no mecanismo de ação espasmolítica de diplotropina em íleo de cobaia e útero de rata e estudo comparativo do seu análogo sintético. 2008. **Tese (Doutorado)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

LIMA, J. T. Ação espasmolítica do 3, 4, 5, 8-tetrametoxi-(6, 7, 2'', 3'')-furanoflavana. Obtida de *Diplotropis ferruginea* Benth. (FABACEAE), envolve ativação de canais de potássio. 2004. **Dissertação (Mestrado)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

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 myocytes. **American Journal of Physiol – Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 2, p. H732-740, 2006.

LINCOLN, T. M.; FISHERSIMPSON, V. A comparison of the effects of forskolin and nitroprusside on cyclic-nucleotides and relaxation in the rat aorta. **Federation Proceedings**, v. 42, n. 4, p. 898-898, 1983.

LINDGREN, S.; ANDERSSON, K. E. Comparison of the effects of milrinone and OPC 3911 with those of isoprenaline, forskolin and dibutyryl-cAMP in rat aorta. **General Pharmacology**, v. 22, n. 4, p. 617-624, 1991.

LIU, Y. C.; LO, Y. K.; WU, S. N. Stimulatory effects of chlorzoxazone, a centrally acting muscle relaxant, on large conductance calcium-activated potassium channels in pituitary GH3 cells. **Brain Research**, v. 959, n. 1, p. 86-97, 2003.

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

MABBERLEY, D.J. – **The Plant-Book**. Cambridge. University Press, New York. P. 858, 1997.

MACÊDO, C. L. Envolvimento dos canais de potássio na ação espasmolítica do ácido labda-8(17),12E,14-trien-18-óico (labdano-302) isolado de *Xylopi* langsdorfiana A. St.-Hil. & Tul. Em óleo isolado de cobaia. 2008. **Dissertação (Mestrado)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

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

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

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

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.

McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plants natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015-2022, 2007.

McFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **The British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1-13, 2002.

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. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 38, n. 2, p. C312-C317, 1995.

MELO, A. C., COTA, B. B., OLIVEIRA, A. B., BRAGA, F. C. *HPLC Quantitation of Kaurane Diterpene in Xylopi*a Species. **Fitoterapia**, 72, p. 40. 2001.

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. **Cardiovascular Research**, v. 44, n. 2, p. 429-435, 1999.

MONTEIRO, A. R. M. Produtos à base de plantas dispensados em ervanárias para o emagrecimento: efeitos terapêuticos, toxicologia e legislação. 2008. **Dissertação (Mestrado em Medicina Legal)** – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal, 2008.

MORGAN, K. The role of calcium in the control of vascular tone as assessed by the Ca²⁺ indicator Aequorin. **Cardiovascular Drugs**, v. 4: p. 1355-1362, 1990.

MORGAN, J. P.; MORGAN, K. G. Vascular smooth muscle: the first recorded Ca²⁺ transients. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 395, p. 75–77, 1982.

MULLER, M. J.; BAER, H. P. Relaxant effects of forskolin in smooth muscle. Role of cyclic AMP. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 322, n. 1, p. 78-82, 1983.

MURRAY M. A.; BERRY J. L.; COOK S. J.; FOSTER R. W.; GREEN K. A.; SMALL R. C. Guinea-pig isolated trachealis: the effects of charybdotoxin on mechanical activity, membrane potential changes and the activity of plasmalemmal K(+) -channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 103, p. 1814-1818, 1991.

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

NEERING, I. R.; MORGAN, K. G. Use of aequorin to study excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscle. **Nature**, v. 288, p. 585–587, 1980.

NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, n. 55, p. 597–606, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 – 2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022–1037, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, n. 3, p. 215– 234, 2000.

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

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). **Vascular Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 338-344, 2006.

OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F. ; ALMEIDA, F. R. C. ; MEDEIROS, I. A. Involvement of calcium activated large conductance potassium channel BK_{Ca} in vasorelaxant effect of labdane-302. In: XXXVI Congresso brasileiro de farmacologia, 2004, Águas de lindóia-SP. XXXV **Congresso Brasileiro de Farmacologia**. São paulo-SP: SBFTE, 2004. v. UNICO. p. 268-269.

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. **Journal of Ethnopharmacology**, v 111, p. 630-635, 2007.

PAULSON, O.B.; NEWMAN, E.A. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? **Science**. 237(4817):896-8; 1987.

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

PEREZ, G. J.; BONEV, A. D.; PATLAK, J. B.; NELSON, M. T. Functional coupling of ryanodine receptors to K_{Ca} channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries, **The Journal of General Physiology**, v. 113, p. 229–238, 1999.

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

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

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

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Mechanisms involved in kaempferol-induced relaxation in rat uterine smooth muscle. **Life Sciences**, v. 67, p. 251–259, 2000.

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)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

RIBEIRO, L. A. A.; TAVARES, J. F.; ANDRADE, N. C. ; SILVA, M. S.; SILVA, Bagnólia Araújo da . O Ácido (8)17,12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano302), diterpeno tipo labdano isolado de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 197-203, 2007a.

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

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

SAMUELSSON, G. Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy, 5th **Swedish Pharmaceutical Press**, Stockholm, 2004.

SANBORN, B. M. Relationship of Ion Channel Activity to Control of Myometrial Calcium. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 7, p. 4–11, 2000.

SANDERS, K. M. Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1438-1449, 2001.

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

SATAKE, N.; ZHOU, Q.; MORIKAWA, M.; INOUE, M.; SHIBATA, S. Potentiating effect of nicorandil, an antianginal agent, on relaxation induced by isoproterenol in isolated rat aorta: involvement of cyclic GMP-inhibitable cyclic AMP phosphodiesterase. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 25, n. 3, p. 489-494, 1995.

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

SCHUSTER, S.; MARHL, M.; HÖFER, T. Modelling of simple and complex calcium oscillations. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 1333 – 1355, 2002.

SHIKADA, K.; TANAKA, S. K⁺ channel openers produce epithelium-dependent relaxation of the guinea-pig trachea. **European Journal of Pharmacology**, v. 282, n. 1-3, p. 193-197, 1995.

SHMIGOL, A.; EISNER, D. A.; WRAY, S. Properties of voltage-activated [Ca²⁺] transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. **Journal of Physiology Lond**, v. 511, p. 803–811, 1998.

SILVA, J. A. C.; SILVA, M. F. – Estudos florísticos no município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil-I. Famílias Annonaceae e Gnetaceae. **Acta Amazônica**, v. 36, n. 1, p. 53-58, 2006.

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. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 277, n. 4, p. C739-C745, 1999.

SILVA, E. G.; OKUYAMA, P.; PAIVA, T. B. Role of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in the membrane potential and contractility of uterus from spontaneously hypertensive rats. **Pathophysiology**, v. 3, n. 4, p. 259-265, 1996.

SILVA, E. G.; FREDIANI-NETO, E.; FERREIRA, A.T.; PAIVA, A.C.M.; PAIVA, T.B. Role of Ca²⁺-dependent K-channel in the membrane potential and contractility of aorta from spontaneously hypertension rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, n. 3, p. 1022-1028, 1994.

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

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Infarma**, v.16, nº 13-14, 2005.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiology Reviews**, v. 83, p. 1325-1358, 2003.

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

SOMLYO, A. P.; WU, X.; LALKER, L. A.; SOMLYO, A. V. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 134, p. 201– 234, 1999.

SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 159 p. 129–145, 1968.

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

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

STANDEN NB. Properties of cloned K_{ATP} channels mimic those of β-cells. **Journal of Physiology**. 498:1; 1997.

SUN, Y. -D. & BENISHIN, C. G. – K⁺ channel openers relax longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 271, p. 453-459, 1994.

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

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

TANIZAWA, M.; WATANABE, T.; KUME, H.; YAMAKI, K.; MIYAMOTO, K.; TAKAGI, K. Phosphodiesterase IV inhibitors synergistically potentiate relaxation induced by forskolin in guinea-pig trachea. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 25, n. 2, p. 114-119, 1998.

TATSADJIEU, N. L.; YAOUBA, A.; NUKENINE, E. N.; NGASSOUM, M. B.; MBOFUNG, C. M. F. Comparative study of the simultaneous action of three essential oils on *Aspergillus flavus* and *Sitophilus zeamais* Motsch. **Food Control**, v. 21, Issue 2, p. 186-190, 2010.

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 *Xylopia langsdorffiana*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 6, p. 960-962, 2006.

TERAMOTO, N.; NAKASHIMA, T.; ITO, Y. Properties and pharmacological modification of ATP-sensitive K⁺ channels in cat thacheal myocytes. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 3, p. 625-635, 2000.

TERAMOTO, N.; BRADING, A. F.; ITO, Y. Glibenclamide-sensitive K⁺ channels underlying levcromakalim-induced relaxation in pig urethra. **European Journal of Pharmacology**, v. 365, n. 2-3, p. 291-300, 1999.

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

TOTSUKAWA, G.; YAMAKITA, Y.; YAMASHIRO, S.; HARTSHORNE, D. J.; SASAKI, Y.; MATSUMURA, F. Distinct Roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in Spatial Regulation of MLC Phosphorylation for Assembly of Stress Fibers and Focal Adhesions in 3T3 Fibroblasts. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, p. 797 – 806. 2000.

TRAVASSOS, R. A.; MACEDO, C. L.; CORREIA, A. C. C.; PESSÔA, H. L. F.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. – Involvement of K⁺ channels on tocolytic effect and investigation of hemolytic activity of labdane-302. In: **41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, Ribeirão Preto – SP. 2009.

TRUSS, M. C.; UCKERT, S.; STIEF, C. G.; KUCZYK, M.; SCHULZ-KNAPPE, P.; FORSSMANN, W. G.; JONAS, U. Effects of various phosphodiesterase-inhibitors, forskolin, and sodium nitroprusside on porcine detrusor smooth muscle tonic responses to muscarinergic stimulation and cyclic nucleotide levels in vitro. **Neurourological Urodynamics**, v. 15, n. 1, p. 59-70, 1996.

TSAL, M. L.; CUMMINGS, K. C.; WEBB, R. C.; CARUSO, R. L. Acute Inhibition of Spontaneous Uterine Contractions by an Estrogenic Polychlorinated Biphenyl Is Associated with Disruption of Gap Junctional Communication **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 152, p. 18–29. 1998.

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

URUNO, T.; TAKAYANAGI, I.; KUBOTA, K.; TAKAGI, K. Comparison of actions of papaverine, aspaminol and isoprenaline on isolated rat uterus. **Japanese Journal of Pharmacology**, 24, 219-226, 1974.

UYAMA, Y.; IMAIZUMI, Y.; WATANABE, M. Cyclopiazonic acid, an inhibitor of Ca^{2+} -ATPase in sarcoplasmic reticulum, increases excitability in ileal smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 2, p. 565-572, 1993.

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

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

VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, 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 Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 182, n. 3, p. 620-624, 2000.

VIEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

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

VUORELA, P.; LEINONEN, M.; SAIKKU, P.; TAMMELA, P.; RAUHA, J. P.; WENNBERG, T.; VUORELA, H. Natural products in the process of finding new drug candidates. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1375-1389, 2004.

WADE, G. R.; SIMS, S. M. Muscarinic stimulation of tracheal smooth muscle cell activates large-conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channel. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 3, p. C658-C665, 1993.

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

WALDRON, G. J.; COLE, W. C. Activation of vascular smooth muscle K⁺ channels by endothelium-derived relaxing factors. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 26, n. 2, p. 180-184, 1999.

WANG, G; TANG, W; BIDIGARE, R. R. Terpenoids as therapeutic drugs and pharmaceutical agents, **Natural Products**, p. 197-227, 2005.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, p.201-206, 2003.

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. **Pharmacology Reviews**, v. 57, p. 463–472, 2005.

WELLMAN, G. C.; QUAYLE, J. M.; STANDEN, N. B. ATP-sensitive K⁺ channel activation by calcitonin gene-related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle. **Journal of Physiology**, v. 507 (Pt 1), p. 117-129, 1998.

WINKLHOFFER, M.; MATTHIAS, K.; SEIFERT, G.; STOCKER, M.; SEWING, S.; HERGET, T.; STEINHAUSER, C.; SAALER-REINHARDT, S. Analysis of phosphorylation-dependent modulation of Kv1.1 potassium channels. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 6, p. 829-842, 2003.

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

WRAY, S.; KUPITTAYANANT, S.; SHMIGOL, A.; SMITH, R. D.; BURDYGA, T. V. The physiological basis of uterine contractility: a short review. **Experimental Physiology**, v. 86, p. 239–246, 2001.

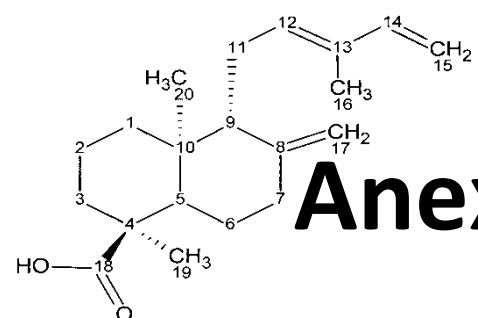
WRAY, S. Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. **American Journal of Physiology**, v. 264, p. C1-C18, 1993.

XIA, X.M.; FAKLER, B.; RIVARD, A.; WAYMAN, G.; JOHNSON-PAIS, T.; KEEN, J.E. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. **Nature**, 395:503–7, 1998.

YAMAKAGE, M.; HIRSHMAN, C.A.; CROXTON, T.L. Sodium nitroprusside stimulates Ca²⁺-activated K⁺ channels in porcine tracheal smooth muscle cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 14, n. 3, p. L338-L345, 1996.

YUAN, A.; SANTI, C. M.; WEI, A.; WANG, Z. W.; POLLAK, K.; NONET, M.; KACZMAREK, L.; CROWDER, C. M.; SALKOFF, L. The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. **Neuron**, v. 37, p. 765–773, 2003.

YANG, S. K.; PARKINGTON, H. C.; BLAKE, A. D.; KEATING, D. J.; CHEN, C. Somatostatin increases voltage-gated K⁺ currents in GH3 cells through activation of multiple somatostatin receptors. **Endocrinology**, v. 146, n. 11, p. 4975-4984, 2005.



Anexo

ANEXO

ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa Animal – CEPA Nº 0705/09



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL CERTIDÃO

João Pessoa, 29 de maio de 2009
CEPA Nº. 0705/09

Ilmo(a). Sr(a).

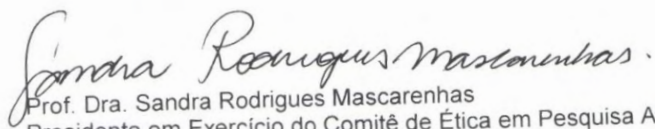
Pesquisadores: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

Departamento/Setor: LTF/CCS-UFPB

Ref.: Projeto de Pesquisa: "Caracterização do Mecanismo de Ação Tocolítica do Ácido 8(17), 12E, 14-Labdatrieno-18-Óico (Labdano-302), isolado de *Xylopi langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul., em Útero isolado de Rata".

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. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

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