

O Labdano Ácido Ent-3-Acetóxi-Labda-8(17),13-Dieno-15-Óico Reduz Pressão Arterial Em Ratos Hipertensos

The Labdane Ent-3-Acetoxy-Labda-8(17), 13-Dien-15-Oic Decreases Blood Pressure In Hypertensive Rats

Janaina A. Simplicio^{1,3}, Marília R. Simão², Sergio R. Ambrosio², Carlos R. Tirapelli³

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP)¹, Ribeirão Preto, SP; Núcleo de Pesquisa em Ciências e Tecnologia – Universidade de Franca (UNIFRAN)², Franca, SP; Departamento de Enfermagem Psiquiátrica e Ciências Humanas – Laboratório de Farmacologia – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (USP)³, Ribeirão Preto, SP – Brasil

Resumo

Fundamento: Diterpenos do tipo labdano induzem uma queda da pressão arterial por meio do relaxamento do músculo liso vascular; todavia, não há estudos que descrevam os efeitos de labdanos em ratos hipertensos.

Objetivo: O presente estudo foi desenvolvido para investigar as ações cardiovasculares do labdano ácido ent-3-acetóxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico (labda-15-óico) na hipertensão renal dois rins-1 clipe (2R-1C).

Métodos: Foram feitos experimentos de reatividade vascular em anéis aórticos isolados de ratos machos 2R-1C e normotensos (2R). A medição de Nitrato/Nitrito (NOx) foi feita nas aortas por meio de ensaio colorimétrico. As medidas de pressão arterial foram feitas em ratos conscientes.

Resultados: O ácido labda-15-óico (0,1 - 300 µmol/l) e a forskolina (0,1 nmol/l - 1 µmol/l) relaxaram as aortas com endotélio intacto e as aortas sem endotélio dos ratos 2R-1C e 2R. O labda-15-óico mostrou-se mais eficaz na indução do relaxamento em aortas com endotélio intacto de 2R pré-contraídas com fenilefrina em comparação àquelas sem endotélio. A forskolina mostrou-se mais potente do que o ácido labda-15-óico na indução do relaxamento vascular nas artérias tanto de ratos 2R-1C quanto de ratos 2R. O aumento dos níveis de NOx induzido pelo ácido labda-15-óico foi menor nas artérias de ratos 2R-1C em comparação a ratos 2R. A administração intravenosa de ácido labda-15-óico (0,3-3 mg/kg) ou forskolina (0,1-1 mg/kg) induziu hipertensão em ratos 2R-1C e 2R conscientes.

Conclusão: Os presentes resultados mostram que o labda-15-óico induz relaxamento vascular e hipotensão em ratos hipertensos. (Arq Bras Cardiol. 2016; 106(6):481-490)

Palavras-chave: Labdano; Relaxamento Vascular; Diterpenos; Forscolina; Hipertensão Renovascular.

Abstract

Background: Labdane-type diterpenes induce lower blood pressure via relaxation of vascular smooth muscle; however, there are no studies describing the effects of labdanes in hypertensive rats.

Objective: The present study was designed to investigate the cardiovascular actions of the labdane-type diterpene ent-3-acetoxy-labda-8(17), 13-dien-15-oic acid (labda-15-oic acid) in two-kidney 1 clip (2K-1C) renal hypertension.

Methods: Vascular reactivity experiments were performed in aortic rings isolated from 2K-1C and normotensive (2K) male Wistar rats. Nitrate/nitrite (NOx) measurement was performed in aortas by colorimetric assay. Blood pressure measurements were performed in conscious rats.

Results: Labda-15-oic acid (0.1-300 µmol/l) and forskolin (0.1 nmol/l - 1 µmol/l) relaxed endothelium-intact and endothelium-denuded aortas from both 2K-1C and 2K rats. Labda-15-oic acid was more effective at inducing relaxation in endothelium-intact aortas from 2K pre-contracted with phenylephrine when compared to the endothelium-denuded ones. Forskolin was more potent than labda-15-oic acid at inducing vascular relaxation in arteries from both 2K and 2K-1C rats. Labda-15-oic acid-induced increase in NOx levels was lower in arteries from 2K-1C rats when compared to 2K rats. Intravenous administration of labda-15-oic acid (0.3-3 mg/kg) or forskolin (0.1-1 mg/kg) induced hypotension in conscious 2K-1C and 2K rats.

Conclusion: The present findings show that labda-15-oic acid induces vascular relaxation and hypotension in hypertensive rats. (Arq Bras Cardiol. 2016; 106(6):481-490)

Keywords: Labdane; Vascular Relaxation; Diterpene; Forskolin; Renovascular Hypertension.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Carlos Renato Tirapelli •

Universidade de São Paulo – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - Avenida Bandeirantes 3900, CEP 14040-902, Ribeirão Preto, SP – Brasil

E-mail: crtirapelli@eerp.usp.br, crtילו@hotmail.com

Artigo recebido em 21/10/15, revisado em 28/10/15, aceito em 23/02/16

DOI: 10.5935/abc.20160058

Introdução

O tratamento de hipertensão arterial com produtos derivados de plantas é bem descrito na literatura.¹⁻⁴ Um grande número de plantas medicinais com atividade anti-hipertensiva foi quimicamente investigado e diterpenos são apontados como seus principais constituintes. Por isso, muitos estudos focam nas propriedades cardiovasculares desses compostos. Por exemplo o diterpeno forskolina do tipo labdano (7 beta-acetoxi-8, 13-epóxi-1 alfa, 6 beta, 9 alfa-tri-hidróxi-labd-14-eno-11-um) diminui a pressão arterial por meio de um mecanismo que envolve o relaxamento do músculo liso vascular.⁵⁻⁸ Na vasculatura, a forskolina ativa a enzima adenilil ciclase, que por sua vez aumenta a produção de AMPc e a ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA).⁹ A extrusão de cálcio da membrana plasmática e hiperpolarização do músculo liso vascular são mecanismos também relacionados às ações vasculares da forskolina.¹⁰ Em humanos, a administração intravenosa de forskolina diminuiu a resistência vascular e reduziu a pressão arterial diastólica (PAD).^{7,8}

Outros diterpenos do tipo labdano, como labdano ácido 8(17), 12E, 14-labda trien-18-óico e labd-8 (17)-en-15 óico também foram descritos como indutores do relaxamento vascular e da hipotensão em ratos normotensos.^{11,12} Descrevemos recentemente que o labdano ácido *ent*-3-acetóxi-labda-8(17), 13-dien-15 óico (labda-15-óico) induziu relaxamento vascular por meio do bloqueio do influxo de Ca²⁺, ativação da via do óxido nítrico endotelial (NO)-GMPc e abertura dos canais para K⁺.¹³ A administração intravenosa de labda-15-óico induziu diminuição na pressão arterial em ratos normotensos; essa resposta foi parcialmente atenuada pelo L-NAME, sugerindo a participação do NO nesta resposta.¹³ É importante notar que doses mais baixas de ácido labda-15-óico (0,3-3 mg/kg) foram necessárias para induzir hipotensão em comparação com outros labdanos previamente testados, como ácido 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-óico (5-30 mg/kg)¹¹ e ácido labd-8 (17)-eno-15-óico (1-10 mg/kg).¹² Com base nesses resultados iniciais com ácido labda-15-óico, temos a hipótese de que este composto induziria relaxamento vascular e hipotensão em ratos hipertensos. No presente estudo, procuramos avaliar as ações cardiovasculares do ácido labda-15-óico em animais hipertensos.

Métodos

Isolamento do ácido labda-15-óico

O isolamento do ácido labda-15-óico foi feito como previamente descrito.¹⁴ Cem gramas de óleo-resina foram cromatografados sobre gel de sílica 60 H (Merck, art. 7736), usando cromatografia líquida sob vácuo 9 (CLV) com quantidades cada vez maiores de acetato de etilo (EtOAc) em n-hexano como eluente. Esse procedimento resultou em seis frações (2000 ml cada), chamadas de F1 (34,7 g; n-hexano), F2 (13,5 g; 20% EtOAc), F3 (11,4 g; 40% EtOAc), F4 (9,7 g; 60% EtOAc), F5 (7,6 g; 80% EtOAc), e F6 (17,8 g; EtOAc) após evaporação do solvente. A fração F4 foi inicialmente cromatografada via CLV sobre gel de sílica 60 H (Merck, art. 7736) conforme descrito acima, para criar frações adicionais

(F4.1 a F4.5). O ácido labda-15-óico (1132,0 mg) foi obtido do F4,3 por meio de cromatografia de média pressão (flash) com uso de gel de sílica 60 (Merck, art. 9385), isocrático n-hexano: EtOAc:CHCl₃ (5:2:3) como fase móvel, e quociente de vazão de 5 ml/min.¹⁵ A pureza do (-) -ácido acetoxicopálico (98%) foi estimada por cromatografia líquida de alta eficiência, análise por espectrometria de massa e dados espectrais de ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 e carbono-13.

Hipertensão renovascular

A hipertensão renovascular foi induzida em ratos conforme previamente descrito. Ratos Wistar macho com peso entre 180 e 200 gramas (35 dias de vida) foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.) e após uma laparotomia mediana, um clipe de prata com diâmetro interno de 0,2 mm foi colocado em volta da artéria renal esquerda. Ratos normotensos 2 rins (2R) foram submetidos apenas à laparotomia. A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida antes e depois de seis semanas da laparotomia mediana em animais não anestesiados, por meio de pletismografia de cauda; os ratos considerados hipertensos foram aqueles cuja PAS estava acima de 160 mmHg. Seis semanas após a cirurgia, os ratos foram sacrificados e as aortas torácicas foram isoladas.¹⁶ Um total de 26 ratos 2R e 28 ratos 2R-1C foram usados neste presente estudo. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal do Campus de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (#09.1.1007.53.0).

Preparação do anel vascular

A aorta torácica foi removida rapidamente, tecidos conectivos aderentes foram removidos, e a aorta foi cortada em anéis (5-6 mm de comprimento). Dois ganchos de aço inoxidável foram passados através do lúmen de cada anel. Um gancho foi conectado a um transdutor de força isométrica (TRI201; Panlab, Espanha) para medir a tensão nos vasos. Os anéis foram colocados em câmara para órgão isolado contendo 5 ml de solução de Krebs, gaseificada com 95% O₂ / 5% CO₂ e mantida a 37°C. A composição da solução Krebs era (mmol/l): NaCl, 118,0; KCl, 4,7; KH₂PO₄, 1,2; MgSO₄, 1,2; NaHCO₃, 15,0; Glicose, 5,5; CaCl₂, 2,5. Os anéis foram esticados até chegarem à tensão basal de 1,5 g, o que foi determinado por experimentos de relação comprimento-tensão; foram então deixadas por 60 min para se equilibrarem. Durante esse tempo, o fluido do banho foi trocado a cada 15-20 min. Em alguns anéis, o endotélio foi removido mecanicamente, enrolando cuidadosamente o lúmen do vaso num fio metálico. A integridade endotelial foi avaliada qualitativamente pelo grau de relaxamento causado pela acetilcolina (1 μmol/l), na presença de uma contração mantida induzida por fenilefrina (0,1 μmol/l). Para estudos de vasos com endotélio intacto, um anel era descartado se o relaxamento com acetilcolina não fosse de 50% ou mais. Para estudos de vasos sem endotélio, um anel era descartado se houvesse qualquer grau de relaxamento. As curvas concentração-resposta ao agonista foram obtidas por meio de um programa de ajuste de regressão não-linear. (Graph Pad Prism 3.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). A potência e a resposta máxima do agonista foram expressas como pD₂ (-logEC₅₀) e Emax (efeito máximo extraído do agonista), respectivamente.

Efeito do ácido labda-15-óico em anéis de aorta contraídos com fenilefrina ou KCl

Uma tensão constante foi induzido por fenilefrina (concentrações de 0,1 $\mu\text{mol/l}$ para anéis com endotélio intacto e 0,03 $\mu\text{mol/l}$ para anéis sem endotélio foram usados para induzir contrações de magnitude similar); O ácido labda-15-óico foi então adicionado de forma gradual (0,1 - 300 $\mu\text{mol/l}$). O efeito do ácido labda-15-óico na contração sustentada induzida por KCl (30 mmol/l) em anéis com endotélio intacto ou sem endotélio também foi examinado. Para comparação, o efeito da forskolina (0,1 nmol/l - 1 $\mu\text{mol/l}$) nas contrações induzidas por fenilefrina e KCl em anéis com endotélio intacto e anéis sem endotélio foi avaliado.

Experimentos de pressão arterial

Experimentos de pressão arterial foram feitos conforme previamente descrito.¹⁷ Um dia antes dos experimentos, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.), e um cateter (um segmento de 4 cm de PE-10 ligado termicamente a um segmento de 13 cm de PE-50) (Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral para registro de pressão arterial e frequência cardíaca. Um segundo cateter foi implantado na veia jugular para administração intravenosa de medicamentos. Ambos os cateteres foram implantados subcutaneamente e exteriorizadas no dorso do animal. Durante o experimento, ratos movendo-se livremente foram mantidos em gaiolas individuais, e a pressão arterial média (PAM) foi registrada por um amplificador HP-7754A (Hewlett Packard, EUA) conectado a uma placa de aquisição de sinal (MP-100, BIOPAC, USA) e processada por um computador. O ácido labda-15-óico (0,3-3 mg/kg) ou a forskolina (0,1-1 mg/kg) foram administrados via injeção de bolus intravenosa. Tanto o ácido labda-15-óico (0,3-3 mg/kg) quanto a forskolina (0,1-1 mg/kg) foram administrados em diferentes animais. Os resultados de pressão arterial foram calculados com base na média da PAM obtida no platô da resposta.

Medida dos níveis de Nitrato/Nitrito (NOx)

Níveis de NOx foram medidos em sobrenadantes de homogenatos da aorta com endotélio intacto de ratos 2R-1C e 2R. Os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/l}$) e então expostos ao ácido labda-15-óico (300 $\mu\text{mol/l}$). o sobrenadante foi centrifugado usando filtros de ultracentrífuga (#UFC5010BK Amicon Ultra-0.5 mL 10 kDa, Millipore, Billerica, MA, EUA).

O nitrato foi medido colorimetricamente seguindo instruções do kit comercializado (#780,001, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína e estão expressos como nmol/mg de proteína. A concentração proteica de todos os experimentos foram determinadas com ensaio de reagente de proteína (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Drogas

O ácido labda-15-óico foi preparado como solução estoque em dimetil sulfoxido (DMSO). As demais drogas foram dissolvidos em água destilada. A concentração do banho de DMSO não excedeu 0,5%, o que não influencia no tônus basal das preparações nem na contração e relaxamento mediado pelo agonista. Para os experimentos in vivo, o ácido labda-15-óico foi diluído em DMSO 10% e depois em salina. A concentração de DMSO na solução final não influencia nos parâmetros cardiovasculares basais, conforme previamente observado.¹⁸

Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados seguiram uma distribuição normal. A análise estatística feita foi por ANOVA de uma via, ou o teste *t* de Student pareado. Comparações post-hoc foram feitas após a análise ANOVA, pelo teste Newman-Keuls de comparação múltipla, conforme indicado no texto e nas tabelas. Para todas as análises, valores *p* abaixo de 0,05 foram considerados significativos. A análise estatística foi conduzida por meio do programa Graph Pad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Resultados

Valores de pressão arterial em ratos 2R-1C e 2R

PAM, PAD e PAS aumentaram significativamente em ratos 2R-1C em comparação com ratos 2R (Tabela 1).

Ação vasorelaxante do ácido labda-15-óico em anéis aórticos de ratos 2R-1C e 2R

O ácido labda-15-óico (Figura 1) reduziu as contrações sustentadas induzidas por fenilefrina e KCl em aortas com endotélio intacto e aortas sem endotélio tanto de ratos 2R-1C quanto de ratos 2R (Figura 2). Os valores de E_{max} (porcentagem de relaxamento) para o efeito relaxante do

Tabela 1 – Valores de pressão arterial (mmHg) em ratos 2R e 2R-1C

	2R		2R-1C	
	Basal	Após 6 semanas	Basal	Após 6 semanas
PAM	104,3 \pm 2,0	100,9 \pm 1,6	105,7 \pm 1,1	161,3 \pm 10,4 ^a
PAD	92,5 \pm 1,8	89,8 \pm 1,3	96,3 \pm 1,1	138,4 \pm 11,6 ^a
PAS	127,9 \pm 2,8	123,2 \pm 2,9	124,6 \pm 1,9	207,0 \pm 9,2 ^a

Valores são médias \pm EPM de *n* = 12 animais para cada grupo. ^aComparado com valores basais respectivos (*p* < 0,05, teste *t* de Student pareado). PAM: pressão arterial média; PAD: pressão arterial diastólica; PAS: pressão arterial sistólica.

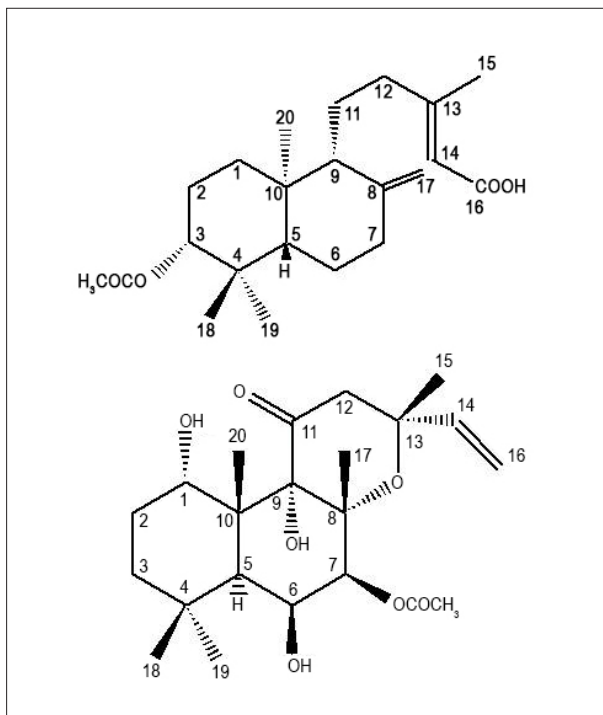


Figura 1 – Estrutura química do ácido *ent*-3-acetóxi-labda-8(17),13-dieno-15-óico (labda-15-óico; superior) e 7 beta-acetoxi-8, 13-epóxi-1 alfa, 6 beta, 9 alfa-tri-hidróxi-labd-14-eno-11-um (forscolina; inferior).

ácido labda-15-óico em anéis com endotélio intacto e anéis sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina não mostraram diferenças significativas nas aortas dos ratos 2R-1C e 2R (Tabela 2). Todavia, diferenças foram encontradas nos valores de pD_2 para o ácido labda-15-óico em anéis com endotélio intacto e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina em aortas de ratos 2R, mas não em ratos 2R-1C. Em artérias pré-contraídas com KCl, não houve diferença entre os valores de E_{max} e os valores de pD_2 para o ácido labda-15-óico em anéis com endotélio intacto e sem endotélio em ratos 2R-1C nem 2R (Tabela 2). Os valores de E_{max} e de pD_2 para o ácido labda-15-óico nos anéis pré-contraídos com KCl não se mostraram diferentes daqueles encontrados em anéis pré-contraídos com fenilefrina para ratos 2R-1C nem 2R.

A forscolina reduziu as contrações sustentadas induzidas por fenilefrina e KCl em aortas com endotélio intacto e sem endotélio de ratos 2R-1C e 2R (Figura 3). Os valores de E_{max} para o efeito relaxante de forscolina em anéis com endotélio intacto e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina não se mostraram significativamente diferentes em aortas de ratos 2R-1C e 2R (Tabela 2). Todavia, diferenças foram encontradas em valores de pD_2 para forscolina em anéis com endotélio intacto e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina em aortas de ratos 2R-1C e 2R. As artérias pré-contraídas com KCl, não mostraram diferença entre os valores de E_{max} ou de pD_2 para forscolina em anéis com endotélio intacto e sem endotélio de ratos 2R-1C e 2R (Tabela 2).

Os valores de E_{max} para forscolina em anéis com endotélio intacto e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina, mas

não com KCl, se mostraram significativamente diferentes daqueles encontrados para ácido labda-15-óico em ratos 2R-1C e 2R. Os valores de pD_2 para forscolina em anéis com endotélio intacto e sem endotélio, pré-contraídos com fenilefrina ou KCl mostraram-se significativamente diferentes daqueles encontrados para o ácido labda-15-óico em ratos 2R-1C e 2R (Tabela 2).

Experimentos de pressão arterial

A figura 4 mostra traçados representativos do efeito do ácido labda-15-óico e da forscolina na pressão arterial de ratos 2R-1C e 2R. A variação máxima da PAM induzida pelo ácido labda-15-óico e pela forscolina na pressão em ratos 2R-1C e 2R conscientes está demonstrada na Figura 5. A administração em bolus de ácido labda-15-óico ou forscolina causou uma diminuição na PAM em ratos 2R-1C e 2R conscientes. Os valores da PAM retornaram a níveis basais após a injeção de ácido labda-15-óico. Por outro lado, valores da PAM não retornaram a níveis basais após a administração de forscolina a 1 mg/kg (Figura 5). O ácido labda-15-óico induziu uma queda mais pronunciada na pressão arterial em 2R em comparação a 2R-1C. Por outro lado, a forscolina mostrou-se mais eficiente na indução de uma diminuição da PAM em ratos 2R-1C, em comparação com ratos 2R (Figura 5). Valores da pressão arterial antes e depois da administração da droga estão descritos na Tabela 3.

Medida dos níveis de NOx

A figura 6 mostra que níveis basais de NOx em aortas de ratos 2R-1C são menores do que aqueles encontrados nas aortas de ratos 2R. O ácido labda-15-óico induziu uma formação de nitrato em aortas com endotélio intacto de ratos 2R-1C e 2R. A formação de nitrato induzida pelo ácido labda-15-óico mostrou-se menor em artérias de ratos 2R-1C, em comparação a ratos 2R (Figura 6).

Discussão

As presentes conclusões indicam que o ácido labda-15-óico mostrou-se mais efetivo na indução do relaxamento vascular, em ratos 2R, em aortas com endotélio intacto pré-contraídas com fenilefrina, em comparação com aortas sem endotélio. Esse resultado está de acordo com descobertas anteriores de nosso laboratório, que mostram que o relaxamento induzido pelo ácido labda-15-óico é parcialmente dependente da via do óxido nítrico endotelial (NO)-GMPc.¹³ Por outro lado, em aortas de ratos 2R-1C, não foram observadas diferenças no relaxamento induzido pelo ácido labda-15-óico entre anéis com endotélio intacto e sem endotélio. O tônus vascular alterado é característica da maioria das formas de hipertensão experimental e humana e está associado a disfunção endotelial com consequente dano à vasodilatação endotélio-dependente e redução da sinalização de NO.¹⁹⁻²¹ Considerando-se que NO derivado do endotélio medeia parcialmente o efeito vasorelaxante do ácido labda-15-óico, a diminuição da potência para a ação relaxante do labdano nas aortas de ratos 2R-1C pode ser causada pela diminuição da biodisponibilidade de NO descrita em estados hipertensivos. Na verdade, essa hipótese ganha força com o fato de que a geração de nitrato,

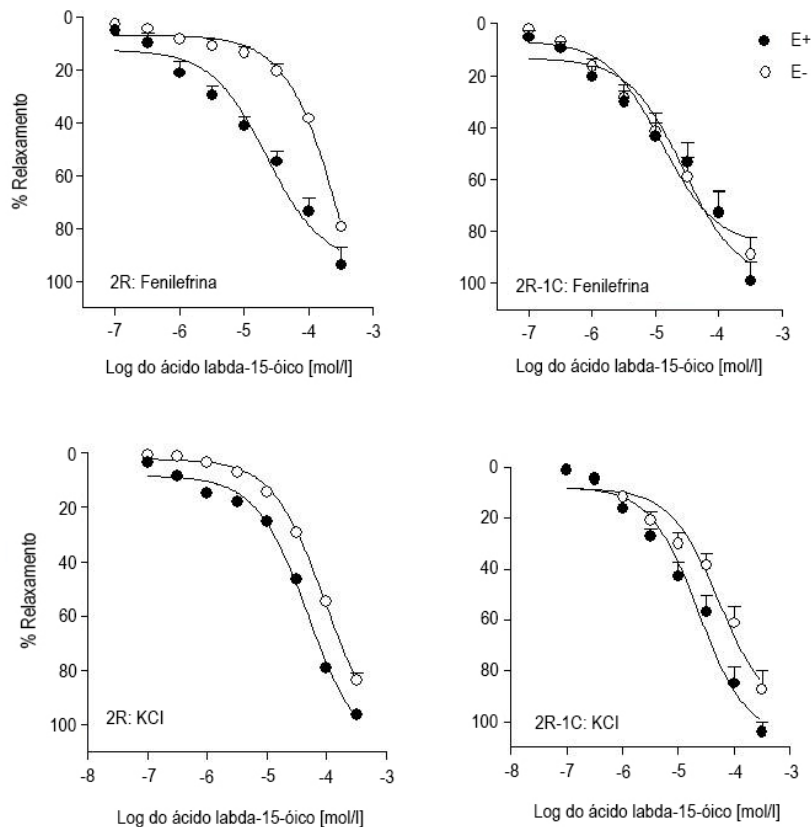


Figura 2 – Respostas de relaxamento induzidas pelo ácido labda-15-óico em anéis aórticos de ratos. O relaxamento induzido pelo labdano foi estudado em anéis aórticos com endotélio intacto (E+) e sem endotélio (E-) de ratos, contraídos com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/l}$) ou KCl (30 mmol/l). Tensão constante foi induzida pela fenilefrina ou pelo KCl e, então, o ácido labda-15-óico (0,1-300 $\mu\text{mol/l}$) foi adicionado cumulativamente.

Tabela 2 – Valores de E_{max} (% relaxamento) e pD_2 para ácido labda-15-óico e forskolina em aórtas com endotélio intacto (E+) e sem endotélio (E-) de ratos 2R e 2R-1C

Agente pré-contrátil	2R		2R-1C		
	E+ (E_{max})	E- (E_{max})	E+ (E_{max})	E- (E_{max})	
Ácido labda-15-óico	Fenilefrina	93,7 \pm 6,8 (7)	79,2 \pm 1,8 (6)	99,0 \pm 7,4 (7)	88,8 \pm 6,6 (6)
	KCl	96,4 \pm 4,4 (7)	83,6 \pm 6,6 (6)	103,9 \pm 3,8 (7)	87,3 \pm 7,4 (8)
Forskolina	Fenilefrina	110,7 \pm 5,3 (7) ^a	104,0 \pm 5,62 ^a (6)	118,8 \pm 5,2 (6) ^a	107,7 \pm 8,0 (6) ^a
	KCl	92,6 \pm 3,9 (6)	87,8 \pm 3,9 (5)	105,9 \pm 3,3 (6)	93,2 \pm 7,1 (6)
Ácido labda-15-óico		E+ (pD_2)	E- (pD_2)	E+ (pD_2)	E- (pD_2)
	Fenilefrina	4,8 \pm 0,06 (7)	4,1 \pm 0,04 (6) ^b	4,8 \pm 0,11 (7)	4,9 \pm 0,08(6)
Forskolina	KCl	4,6 \pm 0,08 (7)	4,3 \pm 0,06 (6)	4,8 \pm 0,10 (7)	4,5 \pm 0,08 (8)
	Fenilefrina	7,5 \pm 0,21 (7) ^c	6,9 \pm 0,17 (6) ^{b,c}	8,0 \pm 0,10 (6) ^c	7,3 \pm 0,14 (6) ^{b,c}
	KCl	7,0 \pm 0,16 (6) ^c	7,0 \pm 0,15 (5) ^c	7,3 \pm 0,20 (6) ^c	7,0 \pm 0,12 (6) ^c

Números entre parênteses indicam o número de preparações isoladas. Valores são médias \pm EPM. ^a Comparado com ácido labda-15-óico em aórtas pré-contraiadas com fenilefrina de ratos 2R e 2R-1C, ^b Comparado com o grupo respectivo em aórtas E+ de ratos 2R e 2R-1C, ^c Comparado com ácido labda-15-óico em aórtas pré-contraiadas com fenilefrina ou KCl de ratos 2R e 2R-1C ($p < 0,05$, ANOVA seguido de teste Newman-Keuls de comparação múltipla).

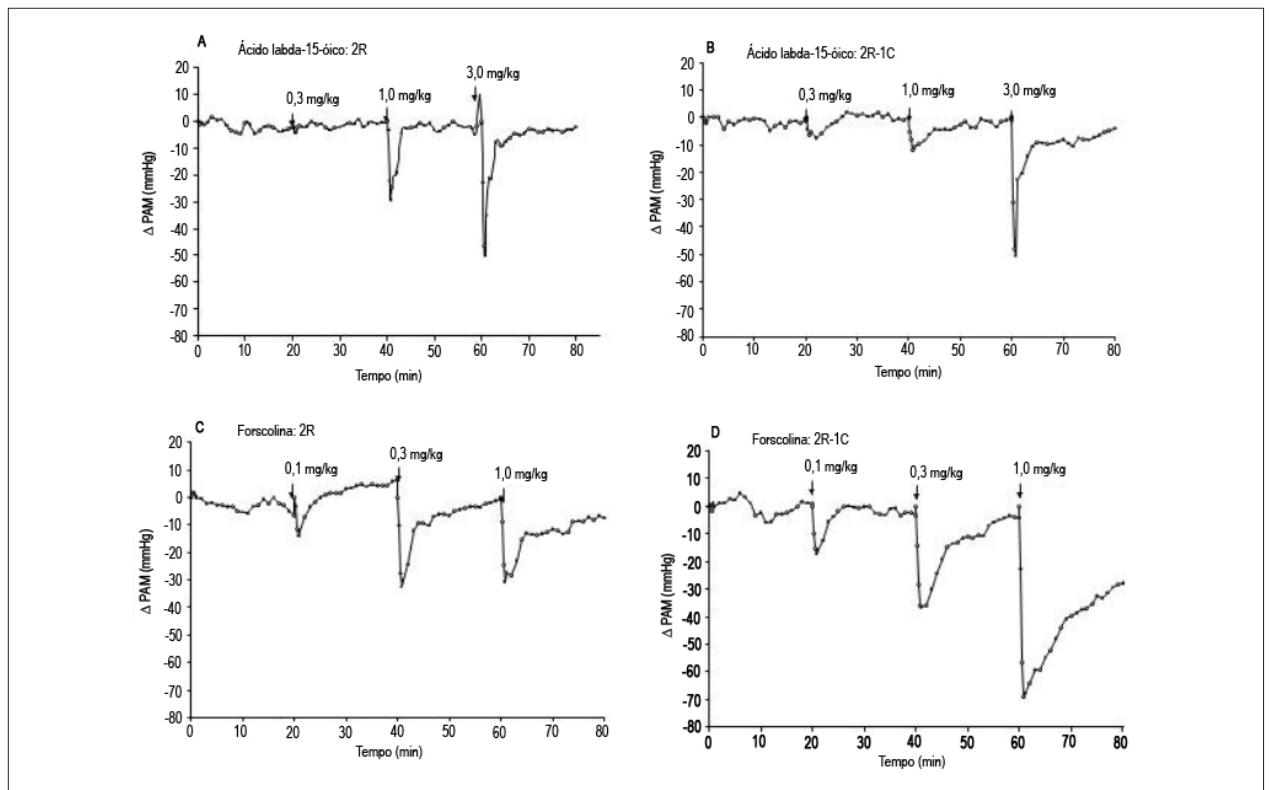


Figura 3 – Respostas de relaxamento induzidas por forskolina em anéis aórticos de ratos. O relaxamento foi induzido pelo labdano em anéis aórticos com endotélio intacto (E+) e sem endotélio (E-) de ratos, contraídos com fenilefrina (0,1 μmol/l) ou KCl (30 mmol/l). Tensão constante foi induzida pela fenilefrina ou KCl e, então, forskolina (0,1 nmol/l - 1 μmol/l) foi adicionada cumulativamente. PAM: pressão arterial média.

induzida pelo ácido labda-15-óico, nas artérias de 2R-1C foi mais baixa do que aquela encontrada nas artérias de ratos 2R. Também é importante notar que encontramos menor conteúdo de NOx basal nas artérias de 2R-1C em comparação a aortas de ratos 2R, corroborando ainda mais observações anteriores que mostram disponibilidade reduzida de NO basal em hipertensão renovascular.²²⁻²⁴

A ativação de canais para K⁺ leva a hiperpolarização de células do músculo liso vascular, diminuição da atividade dos canais para Ca²⁺ dependentes de voltagem e vasodilatação.²⁵ A ativação dos canais para K⁺ dependentes de voltagem e sensíveis ao ATP, assim como de canais para K⁺ ativados por Ca²⁺ de alta e baixa condutância, tiveram participação na resposta vasorelaxante induzida pelo ácido labda-15-óico.¹³ Está bem estabelecido que a vasodilatação dependente do endotélio e a hiperpolarização das células do músculo liso mostram-se comprometidas em segmentos aórticos de ratos hipertensivos 2R-1C.²⁶ A função anormal dos canais para K⁺ ativados por Ca²⁺ de alta condutância, e dos canais para K⁺ sensíveis ao ATP presentes no músculo liso vascular tem uma participação no relaxamento comprometido das aortas dos ratos 2R-1C,^{27,28} e também pode contribuir para a redução da vasodilatação dependente do endotélio induzida pelo ácido labda-15-óico nas aortas de ratos 2R-1C.

No presente estudo não foram encontradas diferenças na ação inibitória demonstrada pelo ácido labda-15-óico nas artérias pré-contraídas com KCl em ratos 2R e 2R-1C. A contração induzida por KCl no músculo liso é mediada pela despolarização da membrana celular e aumento do influxo de Ca²⁺ através dos canais para Ca²⁺ operados por voltagem.^{29,30} Dessa forma, podemos sugerir que o ácido labda-15-óico bloqueia o influxo de Ca²⁺ extracelular por meio de interferência com canais operados por voltagem em ratos 2R e 2R-1C.

A forskolina relaxou aortas com endotélio intacto e sem endotélio, pré-contraídas com fenilefrina (mas não com KCl) mais do que o ácido labda-15-óico em ratos 2R e 2R-1C. Além disso, a forskolina mostrou-se mais potente do que o ácido labda-15-óico na indução de relaxamento vascular em artérias pré-contraídas com fenilefrina ou KCl em ratos 2R-1C e 2R. Possíveis explicações para esses efeitos estão relacionadas à estrutura química dos labdanos e/ou de seus mecanismos de ação. Analisando a estrutura química do ácido labda-15-óico e da forskolina (Figura 1), observamos que apesar desses dois compostos serem classificados como diterpenos do tipo labdano, há notável presença de um grande número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (grupo hidrofílico), ressaltando os radicais hidroxila em C-1, C-6 e C-9 esqueleto da forskolina

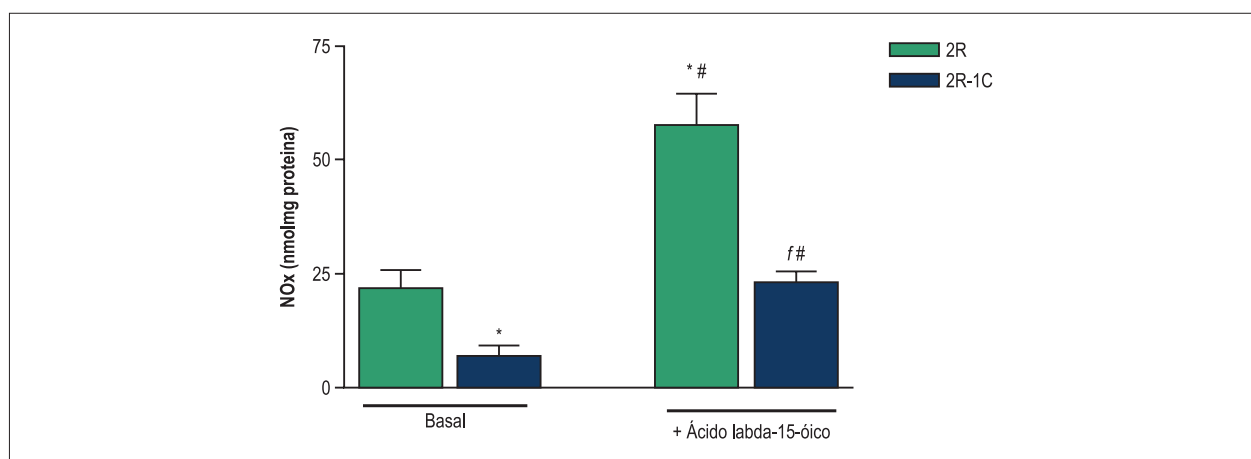


Figura 4 – Traçados representativos da ação hipotensiva demonstrada pelo ácido labda-15-óico (0,3 – 3 mg/kg) e pela forskolina (0,1 – 1 mg/kg) em ratos 2R-1C e 2R conscientes. Os traçados representam o valor médio da diminuição máxima da pressão arterial média de 5-6 animais.

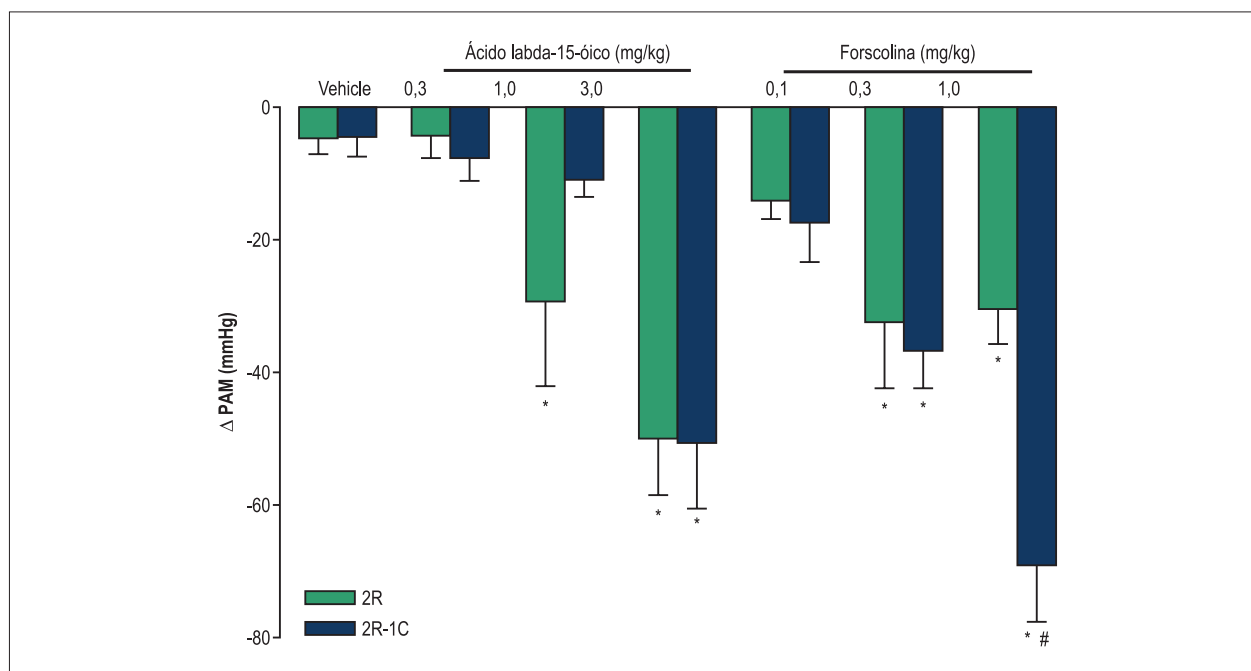


Figura 5 – Efeitos do ácido labda-15-óico (0,3–3 mg/kg) e da forskolina (0,1–1 mg/kg) na pressão arterial média (PAM). Variação máxima na PAM (mmHg) induzida por injeção intravenosa dos labdanos foi avaliada em ratos 2R e 2R-1C conscientes. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (EPM) de 5-6 experimentos. *Comparado com veículo, #Comparado com ratos 2R ($p < 0,05$, ANOVA seguido de teste Newman-Keuls de comparação múltipla).

em comparação com a estrutura química do ácido labda-15-óico, que contém apenas dois grupos hidrofílicos em C-3 e C-16. Além disso, também é possível observar que esses compostos naturais diferem uns dos outros em suas configurações invertidas dos carbonos C-5, C-9 e C-10. Estudos prévios mostraram que diferenças químicas nos diterpenos alteram suas propriedades cardiovasculares,^{17,31} e podem ser fonte da discrepância entre os efeitos do ácido labda-15-óico e da forskolina aqui descritos.

Labdanos exercem seus efeitos cardiovasculares agindo em vários locais,^{11,12,32} e por isso diversas vias intracelulares fazem o papel da mediação do relaxamento vascular induzido por esses compostos.³³ O aumento nos níveis de AMPc, devido à ativação da adenilil ciclase e ativação subsequente de PKA é o principal mecanismo responsável pelo relaxamento vascular induzido pelo labdano forskolina.⁹ Entretanto, a forskolina também aumenta a produção endotelial de NO via ativação de eNOS.³⁴ Por outro lado, os mecanismos responsáveis

Tabela 3 – Valores de pressão arterial (mmHg) em ratos 2R e 2R-1C antes e depois da administração do medicamento (ácido labda-15-óico ou forskolina) e seus respectivos valores Δ PAM and % Δ PAM

	PAM (mmHg)			
	Antes	Depois	Δ PAM	% Δ PAM
Ácido labda-1-5-óico 2R				
Veículo	103,5 ± 6,7 (5)	98,9 ± 7,0	4,6 ± 2,4	4,4 ± 2,3
Ácido labda-15-óico (0,3 mg/kg)	100,5 ± 5,5 (5)	96,3 ± 8,4	4,2 ± 3,3	4,8 ± 3,8
Ácido labda-15-óico (1 mg/kg)	99,8 ± 6,2 (5)	70,6 ± 15,6	29,2 ± 12,7	30,3 ± 13,6
Ácido labda-15-óico (3 mg/kg)	98,5 ± 6,4 (5)	48,6 ± 12,4 ^a	49,9 ± 8,5 ^b	53,6 ± 10,9 ^b
Ácido labda-1-5-óico 2R-1C				
Veículo	163,7 ± 15,2 (6)	159,3 ± 16,2	4,4 ± 3,0	3,0 ± 2,3
Ácido labda-15-óico (0,3 mg/kg)	161,6 ± 15,8 (6)	154,0 ± 16,5	7,6 ± 3,3	5,2 ± 2,5
Ácido labda-15-óico (1 mg/kg)	160,0 ± 15,6 (6)	148,0 ± 15,7	12,0 ± 3,6	7,9 ± 2,7
Ácido labda-15-óico (3 mg/kg)	160,2 ± 15,8 (6)	109,7 ± 19,2 ^a	50,5 ± 9,9 ^b	33,8 ± 8,4 ^b
Forscolina 2R				
Veículo	113,9 ± 3,0 (5)	107,5 ± 4,3	6,4 ± 1,7	5,7 ± 1,5
Forscolina (0,1 mg/kg)	104,9 ± 4,5 (5)	90,9 ± 5,2 ^a	14,0 ± 2,7	13,4 ± 2,8
Forscolina (0,3 mg/kg)	108,1 ± 5,0 (5)	75,8 ± 10,8 ^a	32,3 ± 10,0 ^b	29,9 ± 9,6 ^b
Forscolina (1 mg/kg)	107,4 ± 4,0 (5)	77,0 ± 3,1 ^a	30,4 ± 5,2 ^b	27,9 ± 3,8 ^b
Forscolina 2R-1C				
Veículo	169,1 ± 12,8 (5)	163,3 ± 15,1	5,8 ± 4,6	3,7 ± 2,5
Forscolina (0,1 mg/kg)	170,4 ± 16,6 (5)	153,2 ± 12,9 ^a	17,2 ± 6,1	9,4 ± 3,1
Forscolina (0,3 mg/kg)	167,6 ± 16,3 (5)	130,9 ± 12,4 ^a	36,7 ± 5,7 ^b	21,7 ± 2,5 ^b
Forscolina (1 mg/kg)	166,0 ± 16,9 (5)	97,1 ± 16,0 ^a	68,9 ± 8,5 ^b	42,4 ± 6,2 ^b

Números entre parênteses indicam o número de animais. Valores são a média ± EPM. ^aDiferença significativa em comparação com a linha de base, antes da infusão da droga ($p < 0,05$, teste *t* de Student pareado). ^bComparado com veículo ($p < 0,05$, ANOVA seguido de teste Newman-Keuls de comparação múltipla). PAM: pressão arterial média.

pela ação vasorelaxante do ácido labda-15-óico não estão relacionados com a ativação da adenilil ciclase e envolvem o bloqueio do influxo de Ca^{2+} extracelular, o aumento da produção endotelial de NO e a abertura dos canais para K^+ .¹³ As diferenças nos mecanismos responsáveis pela respostas vasculares desses dois labdanos também podem ser responsáveis pelas diferentes respostas cardiovasculares demonstradas pelo ácido labda-15-óico e pela forskolina.

Aprimoramentos no tratamento farmacológico da hipertensão contribuem para uma redução na incidência de doenças cardiovasculares.³⁵ Diterpenos do tipo labdano também podem ser considerados fonte promissora de novos protótipos para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos cardiovasculares. A ação hipotensora de diterpenos do tipo labdano está relacionada a sua ação miorelaxante.^{5,6,11,12} Recentemente, descrevemos que o ácido labda-15-óico induz relaxamento vascular e hipotensão em ratos normotensos.¹³ Considerando-se que o ácido labda-15-óico relaxou aortas nos ratos 2R-1C, levantamos a hipótese de que o labdano poderia exercer uma ação anti-hipertensiva in vivo. No presente estudo a administração intravenosa de ácido labda-15-óico induziu uma hipotensão de curta duração em ratos 2R e 2R-1C,

demonstrando ainda mais que o ácido labda-15-óico exerce efeito anti-hipertensivo in vivo. O ácido labda-15-óico induziu uma redução menos pronunciada na pressão arterial em comparação à forskolina, fortalecendo a idéia de que diferenças químicas alteram a ação hipotensora demonstrada por diterpenos do tipo labdano. Também é importante notar que o ácido labda-15-óico causa hipotensão por meio da vasodilatação periférica, mediada em parte por NO,¹³ ao passo que os efeitos da forskolina são mediados principalmente pela ativação da adenilil ciclase e aumento nos níveis de AMPc.⁵⁻⁹ Essa observação é relevante já que, conforme mencionado anteriormente, a disfunção endotelial com prejuízos na vasodilatação dependente do endotélio e a redução da sinalização mediada pelo NO é característica da hipertensão.¹⁹⁻²¹ Essa característica do estado hipertensivo pode explicar, pelo menos em parte, o efeito reduzido do ácido labda-15-óico em comparação à forskolina.

Algumas limitações do presente estudo devem ser consideradas. O fato de o ácido labda-15-óico ter reduzido a pressão arterial em um modelo animal de hipertensão renovascular, não é garantia de que esse labdano também será efetivo em outros modelos animais de hipertensão ou na hipertensão humana. Outro ponto a ser considerado é que o

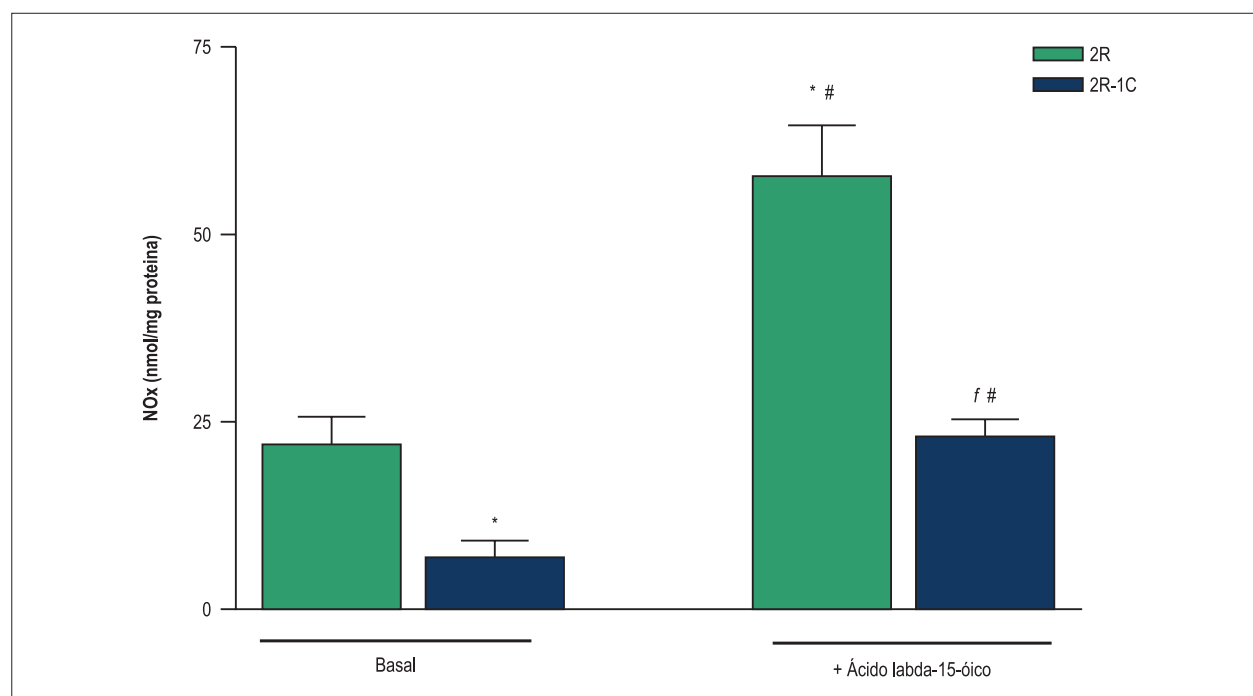


Figura 6 – Efeito do ácido labda-15-óico sobre os níveis de nitrato em anéis aórticos com endotélio intacto de ratos 2R e 2R-1C. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (EPM) de 6-8 preparações independentes. *Comparado com valores basais para ratos 2R, #Comparado com valores basais para ratos 2R-1C, †Comparado com estimulação com ácido labda-15-óico em ratos 2R-1C ($p < 0,05$, ANOVA seguido de teste Newman-Keuls de comparação múltipla).

efeito vasorelaxante do labdano deve também ser testado em vasos de resistência, uma vez que estes são mais importantes na regulação da pressão arterial. Finalmente, nossas descobertas mostram os efeitos do ácido labda-15-óico após injeção intravenosa do composto, mas não temos informações sobre a biodisponibilidade e os efeitos cardiovasculares desse composto após administração oral.

Conclusões

Diterpenos provavelmente cumprem o pré-requisito farmacológico de uma classe de compostos, e podem ter uso terapêutico em doenças cardiovasculares. Usando uma combinação de abordagens in vivo e in vitro, a presente investigação mostra pela primeira vez que o ácido labda-15-óico induz relaxamento vascular em artérias de ratos hipertensos 2R-1C. Administração de labdano in vivo induziu uma queda na pressão arterial de ratos hipertensos. Os estudos experimentais iniciais sobre os efeitos cardiovasculares dos labdanos são importantes e necessários, considerando-se tal informação um pré-requisito para qualquer uso racional e seguro desses compostos no tratamento de hipertensão.

Agradecimentos

Agradecemos os Drs Evelin C. Carnio e Marcelo E. Batalhão pela medição de pressão arterial. Este trabalho foi financiado

pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2010/01009-3 and 2011/13630-7). J.A.S. é apoiado por uma bolsa de mestrado da CAPES.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Simplicio JA, Tirapelli CR; Obtenção de dados: Simplicio JA, Simão MR; Análise e interpretação dos dados: Simplicio JA, Simão MR, Ambrosio SR, Tirapelli CR; Análise estatística: Simplicio JÁ; Obtenção de financiamento: Tirapelli CR; Redação do manuscrito: Simplicio JÁ; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Ambrosio SR, Tirapelli CR.

Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP.

Vinculação acadêmica

Este estudo é vinculado ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP).

Referências

1. Alonso A, Martínez-González MA. Olive oil consumption and reduced incidence of hypertension: the SUN study. *Lipids*. 2004;**39**(12):1233-8.
2. Herrera-Arellano A, Flores-Romero S, Chávez-Soto MA, Tortoriello J. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine* 2004; 11(5):375-82.
3. Herrera-Arellano A, Miranda-Sánchez J, Avila-Castro P, Herrera-Alvarez S, Jiménez-Ferrer JE, Zamilpa A, et al. Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. *Planta Med*. 2007;73(1):6-12.
4. McKay DL, Diane L, Oliver Chen CY, Saltzman E, Blumberg JB. *Hibiscus sabdariffa* L. tea (tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *J Nutr*. 2010;140(2):298-303.
5. Lindner E, Dohadwalla AN, Bhattacharya BK. Positive inotropic and blood pressure lowering activity of a diterpene derivative isolated from *Coleus forskoli*: Forskolin. *Arzneimittelforschung*. 1978;28(2):284-9.
6. Dubey MP, Srimal RC, Nityanand S, Dhawan BN. Pharmacological studies on coleonol, a hypotensive diterpene from *Coleus forskohlii*. *J. Ethnopharmacol*. 1981;3(1):1-13.
7. Kramer W, Thormann J, Kindler M, Schlepper M. Effects of forskolin on left ventricular function in dilated cardiomyopathy. *Arzneimittelforschung*. 1987;37(3):364-7.
8. Schlepper M, Thormann J, Mitrovic V. Cardiovascular effects of forskolin and phosphodiesterase-III inhibitors. *Basic Res Cardiol*. 1989;84 Suppl 1:197-212.
9. Lincoln TM, Fisher-Simpson V. A comparison of the effects of forskolin and nitroprusside on cyclic nucleotides and relaxation in the rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 1984;101(1-2):17-27.
10. Den Hertog A, Pielkenrood J, Van den Akker JT. The effect of forskolin on smooth muscle cells of guinea-pig taenia caeci. *Eur J Pharmacol*. 1984;106(1):181-4.
11. de Oliveira AP, Furtado FF, da Silva MS, Tavares JF, Mafra RA, Araújo DA, et al. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). *Vascul Pharmacol*. 2006;44(5):338-44.
12. Lahlou S, de Barros Correia CA, Vasconcelos dos Santos M, David JM, David JP, Duarte GP, et al. Mechanisms underlying the cardiovascular effects of a labdenic diterpene isolated from *Moldenhawera nutans* in normotensive rats. *Vascul Pharmacol*. 2007;46(1):60-6.
13. Simplicio JA, Pernomian L, Simão MR, Carnio EC, Batalhão ME, Ambrosio SR, et al. Mechanisms underlying the vascular and hypotensive actions of the labdane ent-3-acetoxy-labda-8(17),13-dien-15-oic acid. *Eur. J. Pharmacol*. 2014;726:66-76.
14. Souza AB, de Souza MG, Moreira MA, Moreira MR, Furtado NA, Martins CH, et al. Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. *Molecules*. 2011;16(11):9611-9.
15. Still WC, Kahn M, Mitra A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J Org Chem*. 1978;43(14):2923-5.
16. Callera GE, Varanda WA, Bendhack LM. Ca²⁺ influx is increased in 2-kidney, 1-clip hypertensive rat aorta. *Hypertension*. 2001;38(3 Pt 2):592-6.
17. Hipólito UV, Rocha JT, Palazzin NB, Rodrigues GJ, Crestani CC, Corrêa FM, et al. The semi-synthetic kaurane ent-16 α -methoxykauran-19-oic acid induces vascular relaxation and hypotension in rats. *Eur J Pharmacol*. 2011; 660(2-3):402-10.
18. Tirapelli CR, Legros E, Brochu I, Honoré JC, Lanchote VL, Uyemura SA, et al. Chronic ethanol intake modulates vascular levels of endothelin-1 receptor and enhances the pressor response to endothelin-1 in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol*. 2008;154(5):971-81.
19. Puddu P, Puddu GM, Zaca F, Muscari A. *Endothelial dysfunction in hypertension*. *Acta Cardiol*. 2000;55(4):221-32.
20. Schiffrin EL. *A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension*. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001;38(Suppl 2):S3-6.
21. Taddei S, Salvetti A. *Endothelial dysfunction in essential hypertension: clinical implications*. *J Hypertens*. 2002;20(9):1671-4.
22. Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, Stahl RA, et al. Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int*. 1999;55(1):252-60.
23. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med*. 2002;346(25):1954-62.
24. Jung O, Schreiber JG, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation*. 2004;109(14):1795-801.
25. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1995;268(4 Pt 1):C799-822.
26. Callera GE, Varanda WA, Bendhack LM. *Impaired relaxation to Ach in 2K-1C hypertensive rat aortas involves changes in membrane hyperpolarization instead of an abnormal contribution of endothelial factors*. *Gen Pharmacol*. 2000;34(6):379-89.
27. Callera GE, Yogi A, Tostes RC, Rossoni LV, Bendhack LM. *Ca²⁺-activated K⁺ channels underlying the impaired acetylcholine-induced vasodilation in 2K-1C hypertensive rats*. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;309(3):1036-42.
28. Callera GE, Yeh E, Tostes RC, Caperuto LC, Carvalho CR, Bendhack LM. *Changes in the vascular beta-adrenoceptor-activated signalling pathway in 2Kidney-1Clip hypertensive rats*. *Br J Pharmacol*. 2004;141(7):1151-8.
29. Hudgins PM, Weiss GB. Differential effects of calcium removal upon vascular smooth muscle contraction induced by norepinephrine, histamine and potassium. *J Pharm Exp Ther*. 1968;159(1):91-7.
30. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*. 1994;372(6503):231-6. Erratum in: *Nature*. 1994;372(6508):812.
31. Tirapelli CR, Ambrosio SR, Coutinho ST, De Oliveira DC, Da Costa FB, De Oliveira AM. Pharmacological comparison of the vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid and pimaradienoic acid. *J Pharm Pharmacol*. 2005;57(8):997-1004.
32. El Bardai S, Wibo M, Hamaide M.C, Lyoussi B, Quetin-Leclercq J, Morel N. Characterisation of marrubienol, a diterpene extracted from *Marrubium vulgare*, as an L-type calcium channel blocker. *Br J Pharmacol*. 2003;140(7):1211-6.
33. Tirapelli CR, Ambrosio SR, de Oliveira AM, Tostes RC. Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: a therapeutic promise for the treatment of hypertension. *Fitoterapia*. 2010;81(7):690-702.
34. Anjos Neto M, Lunardi CN, Rodrigues GJ, Bendhack LM. Vasodilatation induced by forskolin involves cyclic GMP production. *J Biophysical Chem*. 2011;2(4):373-9.
35. Campbell NR, Brant R, Johansen H, Walker RL, Wielgosz A, Onysko J, et al; Canadian Hypertension Education Program Outcomes Research Task Force. Increases in antihypertensive prescriptions and reductions in cardiovascular events in Canada. *Hypertension*. 2009;53(2):128-34.