

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO NITRATO DE ACETATO DE  
4 - NITROOXIBUTILA (NHPR<sub>1</sub>) SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE  
RATOS NORMOTENSOS**

**CAMILA DE CASTRO BARBOSA**

João Pessoa – PB

2019

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO NITRATO DE ACETATO DE 4 -  
NITROOXIBUTILA (NHPR<sub>1</sub>) SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE  
RATOS NORMOTENSOS

Dissertação apresentada ao  
programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade  
Federal da Paraíba como  
requisito final para obtenção do  
título de mestre.

**Orientador: Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga**

**João Pessoa – PB**

**201**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

B238a Barbosa, Camila de Castro.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO NITRATO DE ACETATO  
DE 4 - NITROOXIBUTILA (NHPR1) SOBRE O SISTEMA  
CARDIOVASCULAR DE RATOS NORMOTENSOS / Camila de Castro  
Barbosa. - João Pessoa, 2019.  
71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Hipertensão. 2. Óxido Nítrico. 3. Nitrato Orgânico.  
4. Resposta Vasorrelaxante. I. Título

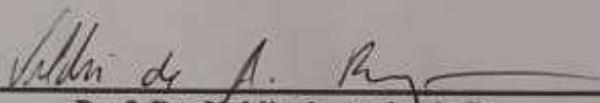
UFPB/BC

**CAMILA DE CASTRO BARBOSA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO NITRATO DE ACETATO DE 4 -  
NITROOXIBUTILA (NHPR<sub>1</sub>) SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE  
RATOS NORMOTENSOS**

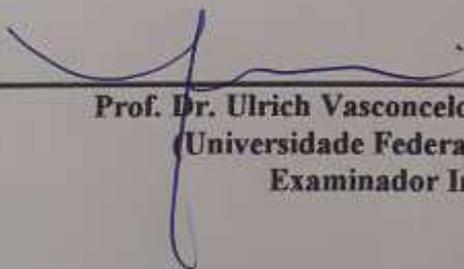
Dissertação de mestrado aprovada em: 26 de novembro de 2019

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Orientador**



---

**Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador Interno**



---

**Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador Externo**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me proporcionado força e persistência durante esse processo.

À minha mãe, dona Lia, minha irmã, Cibele, e minhas sobrinhas, Isis e Laís, vocês são meu combustível diário.

À minha família por todo amor e carinho, em especial meus avós maternos, Maria da Luz (*in memoriam*) e Seu José (*in memoriam*) e minhas tias Wilma, Sonia, Diana, Suzana, obrigada por todo apoio e incentivo de sempre.

A minha prima Livia Limeira, obrigada por dividir comigo minhas aflições, essa caminhada foi mais leve com você ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga, por ter aceito me orientar e pela confiança.

À Profa. Dra. Maria do Socorro França Silva, por toda contribuição, e paciência.

À minha família EJC, por serem espelho de Deus em minha vida.

À nossa pequena turma de mestrado sempre presente, Geisi, Nívea, Yasmim, Ivynna e Roxane, passar por essa etapa com vocês foi mais fácil.

Aos amigos do Laboratório de Hipertensão e Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA), técnicos e alunos, Clênia, Matheus, Sara, Anderson, Giovana, Micaelle, Mickael, Edmilson, Francineide, Airla, Patrícia, Alynne, Danilo, Mickael, pela ajuda em todas as etapas desse trabalho e pela amizade.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela atenção prestada durante o mestrado.

Ao CNPq/CAPES pelo aporte financeiro.

À cada um dos animais utilizados neste estudo, que contribuíram com suas vidas para que este trabalho pudesse ser realizado.

À Universidade Federal da Paraíba, pelo suporte estrutural e financeiro.

À todos que se fizeram presente nesses dois anos, que contribuíram

indireta ou diretamente para este trabalho, minha gratidão.

## RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) está relacionada à disfunção endotelial atribuída principalmente pela redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) na parede vascular e aumento do estresse oxidativo, resultando em aumento crônico e anormal da resistência vascular periférica. Sendo assim, caracterizada por níveis elevados da pressão arterial sanguínea, resultando numa alteração do tônus vascular, em que o NO é o principal fator relaxante derivado do endotélio (EDRF). O óxido nítrico desempenha um papel chave no controle e regulação da pressão arterial sanguínea por meio de sua influência sobre a resistência vascular periférica e sobre o tônus vascular. Problemas relacionados com a biodisponibilidade do NO são fatores primordiais para o desenvolvimento, progressão e manutenção da HAS. Há décadas, o uso de compostos que aumentam a biodisponibilidade de NO representa uma estratégia terapêutica no tratamento de distúrbios cardiovasculares. Com isso, surge o objetivo do presente estudo de avaliar o efeito do nitrato de acetato 4 – nitrooxibutílica (NHPR<sub>1</sub>) sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. A partir da predição biológica, o NHPR<sub>1</sub> apresentou efeito vasodilatador onde o mecanismo doador de NO (Pa 0,849) foi identificado ao utilizar a linha de corte Pa > 0,7 Pi = 0,000. Nos testes *ex vivo*, em anéis de artéria mesentérica cranial isolada, pré-contraídas com FEN (1 μM), o NHPR<sub>1</sub> foi capaz de induzir efeito vasorrelaxante tanto em anéis com endotélio funcional (E<sub>máx</sub> = 100,0 ± 6,116, n=10) como em anéis onde o endotélio foi removido (E<sub>máx</sub> = 100,0 ± 11,47, n=7). Após uma contração eletromecânica com KCl (60 mM), o NHPR<sub>1</sub> não apresentou resposta vasorrelaxante alterada (E<sub>máx</sub> = 132,7 ± 7,103, n=7). Para avaliar a participação da via NO/GCs foi utilizado o ODQ (10 μM), um inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel, o qual atenuou a resposta vasorrelaxante ao NHPR<sub>1</sub> (E<sub>máx</sub> = 99,24 ± 7,338, n= 8). Ao realizar o bloqueio não seletivo dos canais para potássio com TEA (3 mM), a resposta vasorrelaxante do NHPR<sub>1</sub> não foi alterada (E<sub>máx</sub> = 118,1 ± 4,828, n=13). No teste de tolerância, o nitrato apresentou alteração na sua resposta induzida, no qual observou a ocorrência de deslocamento da curva para a direita, sugerindo que há o desenvolvimento da tolerância na resposta vasorrelaxante do NHPR<sub>1</sub>. Na avaliação da toxicidade, a administração oral de NHPR<sub>1</sub> (300 e 2000 mg / kg) não promoveu alterações no peso corporal e no peso dos órgãos, bem como no consumo de água e alimentos em comparação com o grupo controle. Na administração aguda do NHPR<sub>1</sub> (1, 5, 10, 20, 50 mg/Kg, i.v.) induziu hipotensão nos animais normotensos (-4,06 ± 1,01 ; -6,18 ± 1,25; -15,39 ± 0,65; -11,71, ± 3,04; -17,19 ± 1,99 mmHg, respectivamente) e taquicardia (6,48 ± 3,64; 62,61 ± 12,88 ; 48,21 ± 9,08 ; 76,31 ± 13,44 ; 103,75 ± 12,13 bpm) de maneira dose – dependente. Deste modo, a resposta vasorrelaxante promovida pelo NHPR<sub>1</sub> possivelmente ocorreu devido seu efeito vasodilatador que envolve a liberação de NO e posterior ativação da via NO-GCs-PKG. Este mecanismo de ação pode estar contribuindo para a hipotensão e bradicardia observadas em animais normotensos.

**Palavras – chave:** Hipertensão, óxido nítrico, nitrato orgânico, resposta vasorrelaxante.

## ABSTRACT

Systemic arterial hypertension (SAH) is related to endothelial dysfunction attributed mainly by the reduction of nitric oxide (NO) bioavailability in the vascular wall and increased oxidative stress, resulting in chronic and abnormal increase in peripheral vascular resistance. Thus, it is characterized by high blood pressure levels, resulting in a change in vascular tone, where NO is the main endothelium-derived relaxing factor (EDRF). Nitric oxide plays a key role in the control and regulation of blood pressure through its influence on peripheral vascular resistance and vascular tone. Problems related to NO bioavailability are prime factors for the development, progression and maintenance of hypertension. The use of compounds that increase the bioavailability of NO has been a therapeutic strategy for the treatment of cardiovascular disorders for decades. Thus, the objective of the present study is to evaluate the effect of 4 - nitrooxybutyl acetate nitrate (NHPR1) on the cardiovascular system of normotensive rats. From the biological prediction, NHPR1 showed a vasodilating effect where the NO donor mechanism ( $P_a$  0.849) was identified using the cutoff line  $P_a > 0.7$   $P_i = 0.000$ . In ex vivo tests, in isolated cranial mesenteric artery rings pre-contracted with FEN (1 $\mu$ M), NHPR1 was able to induce vasorelaxant effect in both functional endothelial rings ( $E_{max} = 100.0 \pm 6.116$ ,  $n = 10$ ). in rings where the endothelium was removed ( $E_{max} = 100.0 \pm 11.47$ ,  $n = 7$ ). After an electromechanical contraction with KCl (60 mM), NHPR1 showed no altered vasorelaxant response ( $E_{max} = 132.7 \pm 7.103$ ,  $n = 7$ ). To assess the participation of the NO / GCs pathway was used ODQ (10  $\mu$ M), a selective inhibitor of the soluble guanylate cyclase enzyme, which attenuated the vasorelaxant response to NHPR1 ( $E_{max} = 99.24 \pm 7.338$ ,  $n = 8$ ). When performing non-selective blockade of potassium channels with ASD (3 mM), the vasorelaxant response of NHPR1 was not altered ( $E_{max} = 118.1 \pm 4.828$ ,  $n = 13$ ). In the tolerance test, nitrate showed alteration in its induced response, which observed the occurrence of shift of the curve to the right, suggesting that there is the development of tolerance in the vasorelaxant response of NHPR1. In the evaluation of toxicity, oral administration of NHPR1 (300 and 2000 mg / kg) did not promote changes in body weight and organ weight, as well as food and water consumption compared to the control group. Acute administration of NHPR1 (1, 5, 10, 20, 50 mg / kg, iv) induced hypotension in normotensive animals ( $-4.06 \pm 1.01$ ;  $-6.18 \pm 1.25$ ;  $-15.39 \pm 0.65$ ,  $-11.71$ ,  $\pm 3.04$ ,  $-17.19 \pm 1.99$  mmHg, respectively) and bradycardia ( $6.48 \pm 3.64$ ;  $62.61 \pm 12.88$ ;  $48.21 \pm 9$ ,  $08$ ;  $76.31 \pm 13.44$ ;  $103.75 \pm 12.13$  bmp) in a dose - dependent manner. Thus, the vasorelaxant response promoted by NHPR1 possibly occurred due to its vasodilating effect involving NO release and subsequent activation of the NO-GCs-PKG pathway. This mechanism of action may be contributing to the hypotension and bradycardia observed in normotensive animals.

**Keywords:** Hypertension, nitric oxide, organic nitrate, vasorelaxant response.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática dos fatores relaxantes e dos fatores contraturantes liberados pelo endotélio vascular.....	7
Figura 2 - Representação da fórmula estrutural do NHPR <sub>1</sub> .....	10
Figura 3 - Representação da síntese do NHPR <sub>1</sub> .....	16
Figura 4 - Aparato do banho de órgãos do LACONCHA (UFPB) para o desenvolvimento dos protocolos experimentais <i>ex vivo</i> .....	18
Figura 5 - Representação da verificação da viabilidade da artéria mesentérica cranial isolada e a presença do endotélio funcional.....	19
Figura 6 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do NHPR <sub>1</sub> ( $10^{-12}$ – $3 \times 10^{-3}$ M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos pré-contraídos com FEN (1 $\mu$ M) em anéis com endotélio funcional e sem endotélio funcional.....	20
Figura 7 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do NHPR <sub>1</sub> ( $10^{-12}$ – $3 \times 10^{-3}$ M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos pré-contraídos com KCl (60 M) em anéis com endotélio funcional e sem endotélio funcional.....	21
Figura 8 - Esquema representativo do protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NHPR <sub>1</sub> ( $10^{-12}$ – $3 \times 10^{-3}$ M) em anéis mesentéricos pré-contraídos com FEN 1 $\mu$ M e incubados com TEA 3 mM.....	22
Figura 9 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do NHPR <sub>1</sub> ( $10^{-12}$ – $3 \times 10^{-3}$ M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos pré-contraídos com FEN (1 $\mu$ M) e incubados com ODQ (10 $\mu$ M).....	23
Figura 10 - Esquema representativo do protocolo de tolerância.....	24
Figura 11 - Efeito da administração aguda do NHPR <sub>1</sub> (1,0 – 50,0 mg/kg) sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos não anestesiados.....	34
Figura 12 - Avaliação da administração aguda do NHPR <sub>1</sub> (1,0 – 50,0 mg/kg) sobre a frequência cardíaca (FC).....	35
Figura 13 - Efeito vasorrelaxante do NHPR <sub>1</sub> em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos pré-contraídos com FEN.....	36
Figura 14 - Efeito vasorrelaxante do NHPR <sub>1</sub> em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos pré- contraídas com KCl (60mM).....	37

Figura 15 - Efeito vasorrelaxante do NHPR <sub>1</sub> , em anéis de artéria mesentérica cranial isolada com um inibidor de sGC, ODQ (10 μ M).....	38
Figura 16 - Efeito vasorrelaxante do NHPR <sub>1</sub> em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos com bloqueador não seletivo para canais de K <sup>+</sup> , TEA (3mM).....	39
Figura 17 - Efeito da indução da tolerância do NHPR <sub>1</sub> .....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução fisiológica Tyrode.....	15
Tabela 2 – Atividade biológica prevista pelo PASS.....	28
Tabela 3 - Absorção do NHPR <sub>1</sub> comparado a NTG segundo predição do ADMET.....	29
Tabela 4 - Distribuição do NHPR <sub>1</sub> comparado a NTG segundo predição do ADMET..	30
Tabela 5 - Excreção do NHPR <sub>1</sub> comparado a NTG segundo predição do ADMET.....	31
Tabela 6 - Toxicidade do NHPR <sub>1</sub> comparado a NTG segundo predição do ADMET....	32
Tabela 7 - Teste de toxicidade pré-clínica aguda para NHPR <sub>1</sub> em ratos.....	33

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
2.1 Hipertensão arterial .....	4
2.2 Óxido nítrico .....	6
2.3 Doadores de NO .....	8
2.4 Nitratos orgânicos .....	9
2.5 Nitrato de acetato de 4-nitrooxibutila (NHPR <sub>1</sub> ) .....	10
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	12
3.1 Objetivo geral .....	12
3.2 Objetivos específicos .....	12
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	14
4.2 Drogas utilizadas .....	14
4.2.1 Soluções nutritivas .....	15
4.3. Obtenção e preparo do NHPR <sub>1</sub> .....	15
4.4. Abordagens <i>in silico</i> .....	16
4.4.1. Previsão das atividades biológicas do NHPR <sub>1</sub> pelo PASS .....	16
4.5. Abordagens <i>ex vivo</i> .....	17
4.5.1. Preparação de anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos .....	17
4.5.2. Verificação da presença do endotélio funcional .....	18
4.5.3. Avaliação dos efeitos do NHPR <sub>1</sub> sobre tecido vascular pré-contraído com FEN .	19
4.5.4 Avaliação do efeito induzido pelo NHPR <sub>1</sub> em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contraídos com KCl .....	20
4.5.5. Avaliação da participação dos canais para K <sup>+</sup> no efeito vascular induzido pelo NHPR <sub>1</sub> .....	21
4.5.6. Avaliação da participação da enzima ciclase de guanilil solúvel (GCs) no efeito induzido por NHPR <sub>1</sub> em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato normotenso .....	22
4.5.7. Avaliação da indução da tolerância do NHPR <sub>1</sub> em artéria mesentérica .....	23
4.6 Abordagens <i>in vivo</i> .....	24
4.6.1 Implantação dos cateteres vasculares .....	24
4.6.2. Avaliação da administração aguda do NHPR <sub>1</sub> (1,0 – 50,0 mg/kg) sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos .....	25

4.6.3	Teste de toxicidade pré-clínica aguda para NHPR <sub>1</sub> .....	25
4.7	Análise estatística .....	26
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
5.1	Abordagens <i>in silico</i> .....	28
5.1.1	Atividade biológica prevista pelo PASS .....	28
5.1.2.	Predição para parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade do NHPR <sub>1</sub> .....	29
5.2	Abordagens <i>in vivo</i> .....	32
5.2.1	Teste de toxicidade pré-clínica aguda para NHPR <sub>1</sub> .....	32
5.3.1.	Avaliação da administração aguda do NHPR <sub>1</sub> (1,0 – 50,0 mg/kg) sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos. ....	34
5.3	Abordagens <i>ex vivo</i> .....	35
5.3.1	Efeito do NHPR <sub>1</sub> sobre artéria mesentérica cranial isolada de ratos normotensos pré-contráida com FEN .....	35
5.3.2	Efeito do NHPR <sub>1</sub> em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos normotensos pré-contráidos com KCl (60mM).....	36
5.2.3	Avaliação da participação da via do NO/sGC no efeito induzido pelo NHPR <sub>1</sub> ....	37
5.2.4	Avaliação da participação dos canais para K <sup>+</sup> no efeito vascular induzido .....	38
5.2.5.	Avaliação da capacidade do NHPR <sub>1</sub> em induzir tolerância em artéria mesentérica isolada de ratos normotensos.....	39
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>57</b>

# **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é a causa predominante das doenças cardiovasculares e a principal causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (GLOBAL HEALTH METRICS, 2017). É caracterizada por altos níveis de pressão arterial sanguínea, segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia são valores de pressão arterial sistólica (PAS) maiores ou igual a 140 mmHg e/ou valores maiores ou igual a 90 mmHg da pressão arterial diastólica (PAD), resultando numa alteração do tônus vascular, ocasionando vasoconstrição (CHOBANIAN, 2011). A hipertensão arterial está relacionada à disfunção endotelial atribuída principalmente pela redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) na parede vascular e aumento do estresse oxidativo, resultando em aumento crônico e anormal da resistência vascular periférica (GRIENDLING, 2018; KANG et al., 2015; PEREIRA et al., 2011).

O endotélio controla o tônus da musculatura lisa vascular pela produção de mediadores que podem produzir vasodilatação ou vasoconstrição. Os principais fatores relaxantes derivados do endotélio são o NO, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina. Entre os fatores contráteis, os principais são a prostaglandina H (PGH<sub>2</sub>), a tromboxana A<sub>2</sub>, a angiotensina II (Ang II), a endotelina-1 (ET-1) e o ânion superóxido, dentre outras espécies reativas de oxigênio. Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio preciso entre a liberação desses fatores, sendo a produção dos fatores relaxantes mais importantes, contendo o efeito dos agentes contráteis. No entanto, em diversas condições patológicas, como na hipertensão arterial, esse equilíbrio é alterado com uma consequente atenuação dos efeitos vasodilatadores do endotélio (RIBEIRO, 1992; CARVALHO et al., 2001).

A disfunção endotelial agrava as doenças cardiovasculares, como a HAS. Um dos tratamentos utilizados para a melhora do quadro hipertensivo é o uso de doadores de NO, especialmente os nitratos orgânicos. Apesar de seu amplo uso, este grupo de medicamentos pode desenvolver o processo de tolerância farmacológica, fazendo com que haja a perda do efeito vasodilatador durante seu uso contínuo e/ou a necessidade de doses maiores para que se tenha a manutenção do efeito. Portanto, a busca por novos doadores de NO que sejam mais eficazes e desenvolvam o mínimo possível de efeitos colaterais e sejam menos tolerantes é de extrema importância (CSONT; FERDINANDY,

2005; DAIBER et al., 2009; PARKER et al., 1991; DAIBER et al., 2017). Diante desse contexto, o presente estudo tem como finalidade investigar os efeitos cardiovasculares de um novo doador de NO, o nitrato de acetato de 4-nitrooxibutila (NHPR<sub>1</sub>).

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Hipertensão arterial

A HAS é caracterizada por pressão arterial elevada e persistente nas artérias sistêmicas. A pressão arterial (PA) é conceituada como a pressão exercida pelo sangue sobre os vasos arteriais e é determinada pelo produto de duas variáveis: o débito cardíaco (DC), sendo o volume de sangue bombeado pelo coração em um dado intervalo de tempo, podendo ser influenciado por aspectos como o volume diastólico final, contratilidade miocárdica e frequência cardíaca, e a resistência vascular periférica total (RVPT) que é a resistência que os vasos exercem à passagem do sangue em seu interior, correspondendo ao resultado de modificações tensionais no músculo liso vascular (LUFT, 2001; CRIBBS, 2006; GUYENET, 2006; OHNO; KANNO; TAKENAKA, 2016).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Hipertensão, a HAS é diagnosticada por meio da medida casual, quando os valores de sua medida são altos e se mantêm inalterados, mas dependendo dos níveis pressóricos, é preciso o resultado de três aferições em três visitas, em condições ideais. Para tal, o critério utilizado para definir a HAS são valores da pressão arterial sistólica (PAS) maiores ou igual a 140 mmHg e/ou valores maiores ou igual a 90 mmHg da pressão arterial diastólica (PAD) (Sociedade Brasileira de Cardiologia; Sociedade Brasileira de Hipertensão; Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2010; WHO, 2013).

No Brasil, a HAS atinge 32,5% (36 milhões) de indivíduos adultos, sendo 60% dos idosos, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por doença cardiovascular (DCV). Complicações cardíacas e renais tem impacto elevado na perda da produtividade do trabalho e da renda familiar, estimada em US\$ 4,18 bilhões entre 2006 e 2015 (ABEGUNDE et al., 2007; SCALA; MAGALHÃES; MACHADO, 2015).

A HAS pode ser amplamente caracterizada como primária ou secundária, dependendo do mecanismo envolvido na patogênese (POULTER, PRABHAKARAN, CAULFIELD, 2015). A hipertensão primária ou essencial representa a maioria dos casos (90 a 95%) e geralmente ocorre em indivíduos de idade média ou avançada como resultado da interação entre fatores genéticos e ambientais não específicos, ou seja, apesar dos esforços, os mecanismos envolvidos na sua patogênese permanecem desconhecidos. Neste tipo de hipertensão, a progressão de um fenótipo normotenso para um fenótipo hipertenso entre indivíduos geneticamente predispostos pode ser influenciada por uma

combinação de fatores ambientais, comportamentais e dietéticos (LEWANDOWSKI, 2003, KHOR; CAI, 2017).

Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela hipertensão arterial são complexos e podem atuar sobre uma base genética. A hipertensão primária envolve vários tipos de genes. Algumas variantes alélicas de vários genes estão associadas a um risco aumentado de desenvolver hipertensão primária e estão ligadas, em quase todos os casos, a uma história familiar positiva. Essa predisposição genética, juntamente com uma série de fatores ambientais, como alto consumo de sódio, má qualidade do sono ou apneia do sono, consumo excessivo de álcool e alto estresse mental, contribui para o desenvolvimento da hipertensão. Além disso, a probabilidade de desenvolver hipertensão aumenta com o envelhecimento, devido ao enrijecimento progressivo da vasculatura arterial causada, entre outros fatores, pelo desenvolvimento lento de alterações no colágeno vascular e aumento da aterosclerose. Fatores imunológicos também podem desempenhar um papel importante, especialmente no contexto de doenças infecciosas ou reumatológicas, como artrite reumatóide (CAMPAGNOLE-SANTOS, 2001; GANGWISCH, 2014; PALAGINI, 2013; MIKAEL, 2017. SINDLER, 2011).

A hipertensão denominada secundária é caracterizada pela presença de um fator desencadeante identificável que esteja atuando na elevação dos níveis pressóricos, tais como desordens renais e/ou endócrinas. Diferente da hipertensão primária, representa entre 5 a 10 % dos casos (LEWANDOWSKI, 2003; KHOR; CAI, 2017).

A manutenção e regulação da PA é um mecanismo complexo que envolve ações integradas de vários sistemas como o neural, renal, endócrino e o cardiovascular. A teoria do mosaico da hipertensão descreve sua fisiopatologia multifacetada. No controle da PA em curto prazo destaca-se o barreflexo, considerado o principal modo de ajuste rápido da PA. Os barreflexos são terminações nervosas, localizadas na camada adventícia da aorta e bifurcação da carotídea. Estes mecanorreceptores são sensíveis às alterações tensionais na parede dos vasos. Quando tensionados, ativam fibras aferentes que se projetam em direção ao sistema nervoso central, integrando sinais recebidos e modulando a resposta rápida às alterações de PA (GUYENETE, 2006).

Em longo prazo, a manutenção da PA pode ser promovida pelo sistema renina angiotensina-aldosterona (SRAA). Este sistema consiste em uma cascata enzimática, catalisada pela renina e a enzima conversora da angiotensina (ECA), gerando angiotensina II, o peptídeo chave do SRAA, pois promove resposta pressora rápida pela ação vasoconstritora, aumentando a neurotransmissão noradrenérgica periférica e

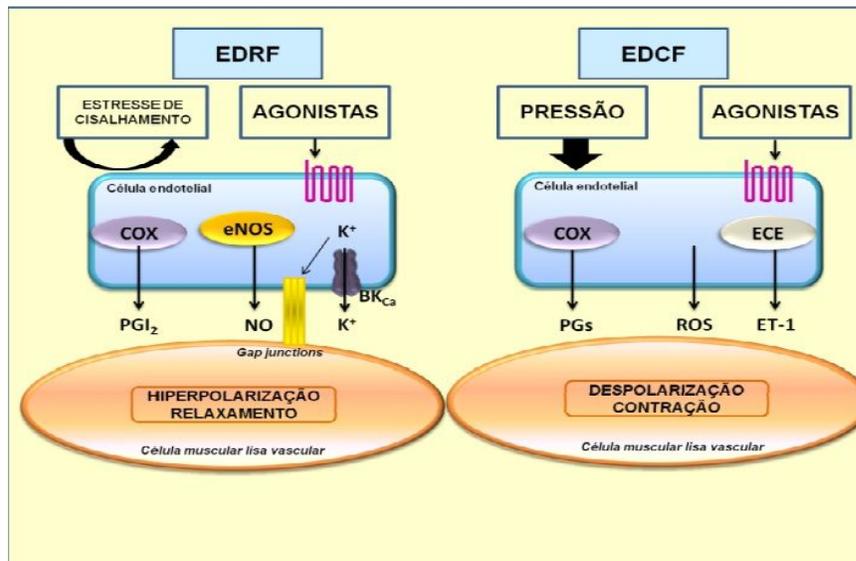
alterações na função renal. Algumas terapias farmacológicas contra doenças cardiovasculares apresentam melhora da disfunção endotelial. Os inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) melhoram a função endotelial nas artérias subcutâneas, epicárdicas e periféricas, além da circulação renal. Melhoraram a resposta vascular seletiva à bradicinina, um efeito provavelmente mediado pelo fator hiperpolarizante (PEACH, 1977; GRIENGLING et al., 1993; CODY, 1997; ICHIKI et al., 2012; GHIADONI et al., 2012).

Embora exista um grande número de medicamentos utilizados para pacientes hipertensos, com diferentes mecanismos de ação, como diuréticos, inibidores adrenérgicos, bloqueadores de canais de  $Ca^{2+}$ , inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), antagonistas do receptor de angiotensina II (AT1), inibidores diretos da renina e vasodilatadores diretos, ainda assim, 37% dos pacientes permanecem hipertensos (BYRD et al., 2011; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012; MÜNZEL et al., 2011). Portanto, faz-se necessária a busca por novos fármacos, incluindo novos doadores de NO com diferentes maneiras de liberação para o tratamento de doenças cardiovasculares.

## **2.2 Óxido nítrico**

A hipertensão arterial está comumente relacionada com aumento do tônus arteriolar sistêmico (RIBEIRO, 1992). O endotélio desempenha um duplo papel no controle do tônus vascular, se utilizando de fatores relaxantes e contracturantes (Figura 1). A localização desses dilatadores e constritores fornece um mecanismo de controle local que regula o tônus vascular (ANDERSON et al., 1994). Atualmente, sabe-se que o endotélio é responsável pela síntese de diversas substâncias com propriedades vasoativas, sendo que o óxido nítrico é o mais bem estudado e caracterizado sendo sintetizado a partir da oxidação do radical guanidino da L-arginina pela ação da sintase de óxido nítrico (NOS), gerando L-citrulina e óxido nítrico. A liberação do NO, por sua vez, acarreta relaxamento do músculo liso vascular (GIRARDI, GIRARDI, 2006; RAPPAPORT, 1983).

Representação esquemática dos fatores relaxantes e dos fatores contraturantes, liberados pelo endotélio vascular – Figura 1.



Fonte: Adaptada de Félétou e Vanhoute (2009).

Formado enzimaticamente a partir da L- arginina na presença de sintase de NO (NOS), o NO é gerado constitutivamente nas células endoteliais por meio do estresse e de cisalhamento de substâncias transportadas pelo sangue. O NO também é gerado constitutivamente em células neuronais e serve como um neurotransmissor e neuromodulador em terminações nervosas não-adrenérgicas e não colinérgicas. Além disso, o NO pode ser formado por indução enzimática em muitos tecidos na presença de citocinas (ACHIKE et al., 2003).

As isoformas da NOS são geradas em um grande número de tipos de células diferentes. Todas as três isoformas ( eNOS – NOS endotelial , iNOS – NOS indutível e nNOS – NOS neuronal) usam o aminoácido L-arginina e o oxigênio molecular junto com vários cofatores, incluindo NADPH e tetraidrobiopterina (BH4) (MONCADA et al., 1991; FORSTERMANN, 2012). A produção contínua de NO é realizada por duas NOS constitutivamente expressas – nNOS e eNOS. Como exemplo, a eNOS é constitutivamente expressa no endotélio vascular, no qual desempenha um papel fundamental na regulação do tônus vascular e na manutenção da integridade endotelial. A atividade da eNOS é regulada principalmente pelo cálcio intracelular (Ca<sup>2+</sup>). Níveis aumentados de cálcio intracelular ativam a calmodulina, que se liga à eNOS e facilita o fluxo de elétrons do NADPH para o domínio da redutase da eNOS. Uma terceira isoforma, a iNOS, foi inicialmente descoberta em macrófagos, mas também encontrada em vários outros tipos de células, incluindo células neuronais, hepatócitos e células epiteliais das vias aéreas (GIRALDEZ et al., 1997; OESTERGAARD, 2007).

A biodisponibilidade do NO e a regulação do tônus vascular, em particular, têm um impacto central na fisiologia vascular e na patogênese da doença cardiovascular, e, dos fatores de risco (DAIBER et al., 2017). Os mecanismos de disfunção endotelial são multifatoriais. E essa condição é atribuída à diminuição da biodisponibilidade vascular do NO, em parte devido ao aumento do estresse oxidativo dentro da vasculatura (MUNZEL et al., 2010).

Com as evidências que sugerem que o estresse oxidativo e a deficiência de NO têm um papel importante no desenvolvimento ou progressão de doenças cardiovasculares e suas complicações. Portanto, novas estratégias para aumentar a sinalização do NO ou reduzir o estresse oxidativo são sugeridas como tendo potencial terapêutico no tratamento de doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão (LUNDBERG et al., 2015).

### **2.3 Doadores de NO**

Doadores de NO são capazes de restaurar níveis fisiológicos de NO, interferindo assim na modulação dos mecanismos celulares do NO. Esses agentes terapêuticos agem na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (WANG, 2002; MILLER; MEGSON, 2007), liberando o NO e mimetizando sua função endógena, através da reprodução da resposta ou da sua substituição em situações de deficiência (FEELISCH, 1998; QUEIROZ et al., 2014). Os fármacos doadores de NO são moléculas que liberam NO *in vivo* ou *in vitro*, como o nitroprussiato de sódio (SNP), os diazeniodiolatos (dietilamino NONOato; DEA/NO), os nitrosotióis (S- nitrosoglutationa; GSNO) e as oximas (trans- cinamaldeído oxima; E- CAOx) (MILLER; MEGSON, 2007; SCATENA et al., 2010).

A redução da biodisponibilidade do NO endógeno está relacionada a um número de ações prejudiciais intimamente relacionadas às doenças no sistema cardiovascular, levando à vasoconstrição, aumento da proliferação das células do músculo liso, bem como o aumento da atividade e a aderência das plaquetas e células inflamatórias em locais de lesão endotelial (MEY, VANHOUTE, 1982). Com o endotélio deteriorado, o fluxo sanguíneo é interrompido e os vasos se tornam ocluídos com placas de ateroma, trombose ou embolia, levando por fim a infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e isquemia periférica (MILLER; MEGSON, 2007). Para o tratamento das doenças cardiovasculares associadas à deficiência de NO, foram desenvolvidos fármacos, como os doadores de NO,

capazes de interferir na modulação dos mecanismos celulares do NO com diferentes resultados (SCATENA et al., 2010).

Em relação as desordens cardiovasculares, os nitrovasodilatadores orgânicos têm sido utilizados por muitos anos na prática clínica para induzir a vasodilatação das veias e artérias através do relaxamento das células do músculo liso vascular mediante a liberação do NO, como por exemplo a nitroglicerina (NTG) e o nitroprussiato (NPS). Entretanto, o uso desses compostos é limitado devido ocorrer o fenômeno da tolerância, desenvolvida após o uso deste medicamento a longo prazo, o que prejudica o tratamento crônico da hipertensão (MÜNZEL et al., 2011; NAPOLI; IGNARRO, 2003; MENDES-JÚNIOR et al., 2015). Tendo em vista as limitações os doadores de NO utilizados atualmente, tem-se aumentado o interesse na síntese e caracterização de novos nitratos orgânicos.

## **2.4 Nitratos orgânicos**

Os nitratos orgânicos são ésteres de ácido nítrico de álcoois poli-hídricos ( $\text{RONO}_2$ ), e representam a mais antiga classe de doadores de NO aplicadas clinicamente (CSONT; FERDINANDY, 2005) os quais exibem efeitos terapêuticos benéficos no tratamento de distúrbios cardiovasculares, sendo a mais antiga classe de doadores de NO aplicada. Acredita-se que os nitratos orgânicos exercem seus efeitos biológicos por meio da liberação de NO, requerendo uma bioconversão enzimática para ser disponibilizado (CSONT; FERDINANDY, 2005; SCATENA et al., 2010).

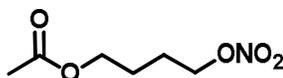
A principal limitação da aplicação clínica dos nitratos orgânicos está relacionada ao desenvolvimento de tolerância (CSONT; FERDINANDY, 2005; DAIBER et al., 2009). Trata-se de um fenômeno complexo, definido como a perda de efeito ou necessidade de aumentar a dose para manter o efeito terapêutico do nitrato orgânico, a qual pode limitar a eficácia na terapia crônica (MÜNZEL; GORI, 2013; MÜNZEL; STEVEN; DAIBER, 2014). A tolerância a nitratos pode envolver: pseudotolerância, caracterizada por ativação neuro-hormonal e expansão do volume intravascular (KLESCHYOV et al., 2003; PARKER et al., 1991); tolerância vascular, que são processos vasculares intrínsecos, os quais podem envolver dessensibilização da ciclase de guanilil solúvel (CGs) (RAPOPORT et al., 1987) ou aumento da atividade das fosfodiesterases (PDE) (MÜNZEL; DAIBER; MÜLSCH, 2005).

Com isto, a investigação de novos compostos com capacidade de liberar NO e que não levam à tolerância farmacológica, se torna relevante para o tratamento das doenças cardiovasculares, a exemplo da hipertensão arterial.

## 2.5 Nitrato de acetato de 4-nitrooxibutila (NHPR<sub>1</sub>)

O NHPR<sub>1</sub> tem sua fórmula molecular C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub> e massa molar de 177,16 g/mol. Sua fórmula estrutural a seguir (Figura 2):

Fórmula estrutural do NHPR<sub>1</sub> – Figura 2.



Fonte: Barbosa (2019).

Sua síntese foi realizada no Departamento de Química da UFPB pelo professor Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho realizada a partir da solução de acetato de 4-clorobutil em acetonitrila e tratada com uma solução de nitrato de prata. A mistura é aquecida sob condições de refluxo por 12 horas. Observa a formação de precipitado, onde o mesmo é filtrado e a solução evaporada, o excesso de solvente é rotaevaporado. A mistura é então dissolvida em diclorometano, levada com água com NaCl em seguida seca com MgSO<sub>4</sub> anidro, e posteriormente, a fase orgânica é evaporada formando um líquido amarelado que representa o produto.

## **OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos farmacológicos do nitrato de acetato de 4-nitrooxibutíla (NHPR<sub>1</sub>) sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos, por meio de abordagens *in silico*, *ex vivo* e *in vivo*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

##### **Abordagens *in silico*:**

- Fornecer um perfil estimado dos mecanismos de ação do nitrato orgânico NHPR<sub>1</sub> e relacioná-los aos efeitos farmacológicos identificados.
- Identificar possíveis propriedades farmacocinéticas e de toxicidade induzidos pela substância NHPR<sub>1</sub>;

##### **Abordagens *ex vivo*:**

Avaliar os efeitos do NHPR<sub>1</sub> em artéria mesentérica cranial isolada de ratos normotensos, avaliando os seguintes parâmetros:

- Participação do endotélio;
- Participação no NO na resposta;
- Participação da via NO – sGC;
- Participação nos canais para K<sup>+</sup> no efeito induzido pelo nitrato;
- Desenvolvimento de tolerância ao nitrato.

##### **Abordagens *in vivo*:**

- Verificar os efeitos da administração aguda do NHPR<sub>1</sub> sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos normotensos;
- Determinar a toxicidade pré-clínica aguda do NHPR<sub>1</sub> e avaliar as alterações sobre o sistema nervoso central e autônomo.

## **METODOLOGIA**

## 4.METODOLOGIA

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Ratus norvegicus*) machos e fêmeas albinos, pesando entre 250-300g, com idade entre 12 e 14 semanas e provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia (IPerFarm/UFPB). Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno e submetidos a um rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada à base de ração tipo *pellets* (Labinar, Purina, Paulinea, SP, Brazil) e acesso à água *ad libitum*, disponível em garrafas de polietileno com bicos de aço inoxidável, encaixadas na parte superior da grade metálica da gaiola. Além disso, os animais foram mantidos em salas à temperatura ( $21 \pm 1$  °C) controladas e constantes, submetidos à um ciclo claro-escuro de 12 h.

Todos os procedimentos realizados foram previamente submetidos à análise do Conselho de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UFPB e aprovados sob a certidão CEUA nº 7116051018 (Apêndice I).

### 4.2 Drogas utilizadas

Para a síntese da molécula teste, foram utilizadas as seguintes substâncias: acetato de 4-clorobutil, acetonitrila, cloreto de sódio e sulfato de magnésio. O nitrato orgânico sintetizado foi emulsificado em cremophor. Para a realização dos protocolos experimentais, foram utilizadas: cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN), ACh, cloreto de potássio (KCl), hidroxocobalamina (HDX), tetraetilamônio (TEA), heparina, cloridrato de cetamina, xilazina, dissolvidos em água destilada; e oxadiazólo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ), dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração deste solvente orgânico na cuba foi de até 0,3%. As soluções foram mantidas de 0 a 4°C e somente retiradas no momento do experimento. Todas as substâncias citadas foram obtidas da *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>.

#### 4.2.1 Soluções nutritivas

Nos protocolos foram utilizadas soluções nutritivas (pH = 7,4) aeradas com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e mantidas a 37° C. Para o preparo da solução nutritiva de Tyrode foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O), cloreto de magnésio hexa-hidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), fosfato de sódio mono-hidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) e fosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), todos foram obtidos da Sigma-Aldrich® e suas respectivas concentrações descritas na tabela 1.

Composição da solução fisiológica Tyrode – Tabela 1.

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl <sub>2</sub>	2,0
MgCl <sub>2</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5,6

Fonte: Barbosa (2019).

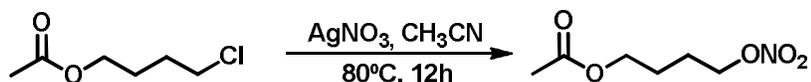
#### 4.3. Obtenção e preparo do NHPR<sub>1</sub>

O nitrato utilizado no presente estudo foi o nitrato de acetato de 4 - nitrooxibutila (NHPR<sub>1</sub>) obtido por síntese orgânica e cedido pelo laboratório do Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, pertencente ao Departamento de Química da UFPB.

A substância foi sintetizada em um balão volumétrico de 100 mL, onde foi adicionado uma solução de acetato de 4-clorobutil (3,5g, 0.0235 mols) em acetonitrila (10 mL) foi tratada em pequenas porções com uma solução de nitrato de prata (5,6g, 0.033 mols). A mistura foi aquecida sob condições de refluxo por 12 horas. Observou-se a formação de precipitado, no qual o mesmo foi filtrado e a solução foi evaporada, o excesso de solvente foi rota-evaporado. O resíduo foi dissolvido em diclorometano,

levado com água (3 x 25 mL) e com NaCl saturado (3 x 25 mL), em seguida seco com MgSO<sub>4</sub> anidro, e posteriormente a fase orgânica foi evaporada resultando em um líquido amarelado, o produto NHPR<sub>1</sub> (Figura 3). O rendimento obtido foi de 68%.

Representação da Síntese do NHPR<sub>1</sub> – Figura 3.



Fonte: Barbosa (2019).

Para a utilização nos protocolos experimentais *ex vivo*, foi realizado o preparo de uma solução estoque 10<sup>-1</sup> M, emulsificada em cremofor e posteriormente diluída em água Mili-Q. A partir da solução mãe, foram realizadas soluções trabalho em diluições em série nas concentrações 10<sup>-3</sup> M, 10<sup>-5</sup> M, 10<sup>-7</sup> M, 10<sup>-9</sup> M. Para os experimentos *in vivo*, o NHPR<sub>1</sub> foi emulsificado em cremophor e diluído em solução salina estéril (NaCl 0,9%) em concentrações diferentes de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental.

#### 4.4. Abordagens *in silico*

##### 4.4.1. Previsão das atividades biológicas do NHPR<sub>1</sub> pelo PASS

O *software* PASS (do inglês, *Prediction of Activity Spectra of Substances*) é desenvolvido para análise das relações estrutura-atividade (SAR) em diversos conjuntos de compostos químicos com muitos tipos diferentes de atividades biológicas (LAGUNIN et al., 2000). A partir da estrutura química do composto NHPR<sub>1</sub>, foi construída sua estrutura *in silico* por meio da linguagem SMILE (do inglês, *simplified molecular input line entry specification*). Os SMILES de cada composto foram padronizados por meio do uso do *software* Standardizer [JChem 18.3.0.119, 2018; ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>)] com os seguintes comandos: adicionar átomos de hidrogênio; aromatizar e limpeza 2D. As estruturas otimizadas, foram salvas no formato .sdf e em seguida foram adicionadas ao *software* (PASS) para análise dos resultados de predição de atividade biológica.

O PASS é desenvolvido para análise das relações estrutura-atividade (SAR) e os resultados são obtidos a partir de um conjunto de treinamento que envolve

aproximadamente 20.000 compostos e 4.000 atividades biológicas (LAGUNIN et al. 2000). Os resultados da previsão são apresentados como uma lista de atividades com relações de Pa (probabilidade da presença) e Pi (probabilidade da ausência) para cada atividade particular, que variam de 0.000 a 1.000. Os tipos de atividade são considerados possíveis quando  $P_a > P_i$ . Apenas as atividades com valores de  $P_a > P_i$  foram consideradas nos espectros de atividades preditas.

#### 4.4.2 Predição de ADMET

Os *softwares* utilizados nesta pesquisa foram o pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm>), no qual o pkCSM (Predição Propriedades de Farmacocinética e Toxicidade de Moléculas Pequenas Usando Assinaturas Baseadas em Gráfico) é um método para prever e otimizar propriedades farmacocinéticas e propriedades de toxicidade, utilizando a abordagem de assinaturas baseadas em gráficos. O pkCSM adaptou o conceito de varredura de corte para desenvolver um modelo preditivo das propriedades do ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção, Toxicidade) para o desenvolvimento de drogas, utilizando o SMILE do composto de estudo. Foram avaliados o NHPR<sub>1</sub> e o fármaco controle (nitroglicerina), focando nos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (PIRES et al., 2015).

### 4.5. Abordagens *ex vivo*

#### 4.5.1. Preparação de anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos

Os animais foram anestesiados com uma solução contendo cetamina (75 mg/kg i.p.) e xilazina (10 mg/kg i.p.) em seguida, eutanasiados por decapitação com auxílio de uma guilhotina. A seguir, foi realizada a secção dos vasos cervicais onde, por meio de uma incisão no abdômen, a artéria mesentérica cranial foi identificada, removida e imediatamente transferida para a solução de Tyrode. O vaso foi dissecado e seccionado em anéis (1-2 mm de comprimento). Dependendo do protocolo, os anéis tiveram o seu endotélio removido por atrito mecânico entre as paredes internas do vaso e uma haste de metal. Cada anel foi imerso em cubas (10 mL) contendo solução de Tyrode, a 37° C, gaseificada com uma mistura de 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub> (carbogênio), mantendo o pH

relativamente constante entre 7,2 e 7,4. Em seguida, os anéis foram suspensos verticalmente por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (PowerLab™, ADInstruments, MA, EUA) (Figura 4) e submetidos à tensão basal de aproximadamente 0,75 g, durante 60 minutos para estabilização (ALTURA; ALTURA, 1970). Durante este período, a solução do banho foi trocada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos, e a linha de base ajustada quando necessário. Mudanças na tensão isométrica foram captadas pelo sistema de aquisição CVMS (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA).

Banho de órgãos do LACONCHA – UFPB – Figura 4.

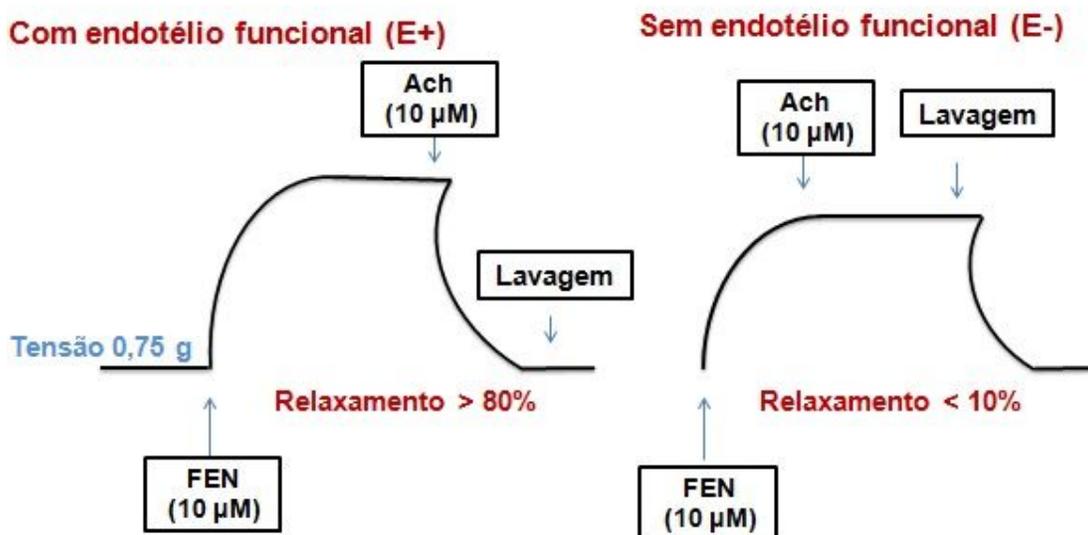


Fonte: Barbosa (2019).

#### 4.5.2. Verificação da presença do endotélio funcional

Após o período de estabilização, foi induzida uma contração com fenilefrina (FEN) na concentração de 1  $\mu\text{M}$ . A integridade do endotélio foi verificada pelo relaxamento dos anéis pré-contraídos após adição de 10  $\mu\text{M}$  de acetilcolina (ACh), um agonista dos receptores muscarínicos, à cuba durante a fase tônica da primeira contração induzida por FEN. A retirada do endotélio dos anéis foi confirmada pela ausência ou relaxamento inferior a 10% induzido por ACh, foram considerados sem endotélio funcional (E-). Já os anéis íntegros e dotados de endotélio apresentando relaxamento superior a 80% sobre a pré-contração com FEN (em relação à força máxima da contração inicial), foram considerados, portanto, com endotélio funcional (E+). Anéis com relaxamento inferior a 80% e superior a 10% foram descartados. O líquido da cuba foi trocado para a retirada de todas as substâncias e em seguida foram realizados os protocolos experimentais.

Representação esquemática do protocolo de verificação da viabilidade da artéria e presença de endotélio funcional – Figura 5.



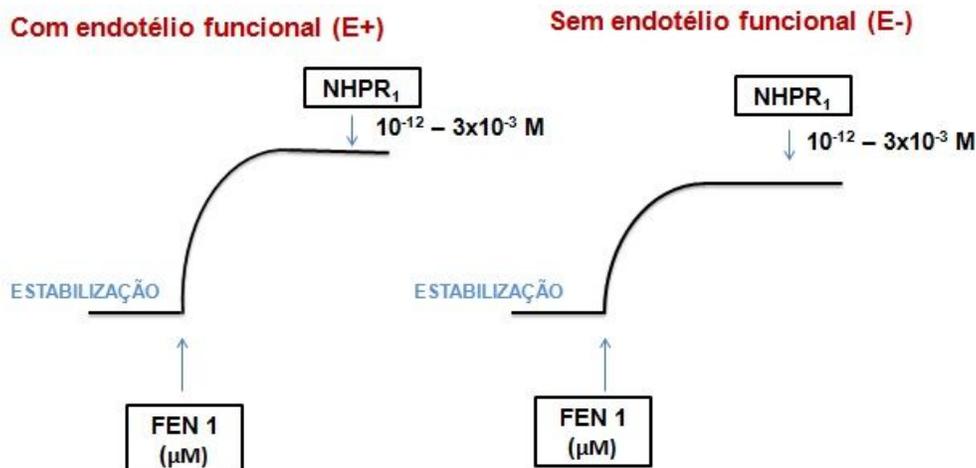
Esquema representativo do protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NHPR<sub>1</sub> ( $10^{-12}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis mesentéricos com endotélio funcional e sem endotélio funcional. Fonte: Barbosa (2019).

#### 4.5.3. Avaliação dos efeitos do NHPR<sub>1</sub> sobre tecido vascular pré-contraído com FEN

Após um período de estabilização de 60 minutos, para confirmação da viabilidade do órgão e posterior verificação do endotélio funcional, foi induzida uma contração com FEN (10 µM), agonista  $\alpha 1$ -adrenérgico seletivo. Logo após a obtenção do platô, no componente tônico desta contração, concentrações crescentes do NHPR<sub>1</sub> ( $10^{-12}$  -  $10^{-3}$  M), de maneira cumulativa, foram aplicadas para a obtenção de uma curva concentração-resposta, tanto em anéis com endotélio funcional quanto em anéis sem endotélio. O relaxamento foi expresso como porcentagem de relaxamento em relação à contração produzida pela FEN. Após a obtenção das curvas concentração-resposta, o efeito relaxante da droga foi avaliado e a potência, dada pelos valores de pD<sub>2</sub> (logaritmo negativo de base 10 da CE<sub>50</sub>) e a eficácia da droga, dada pelos valores do efeito máximo

(Emáx), foram calculadas para as curvas individuais na presença e na ausência do endotélio funcional.

Representação esquemática do protocolo experimental avaliação dos efeitos do NHPR<sub>1</sub> sobre tecido vascular pré-contraído com FEN – Figura 6.

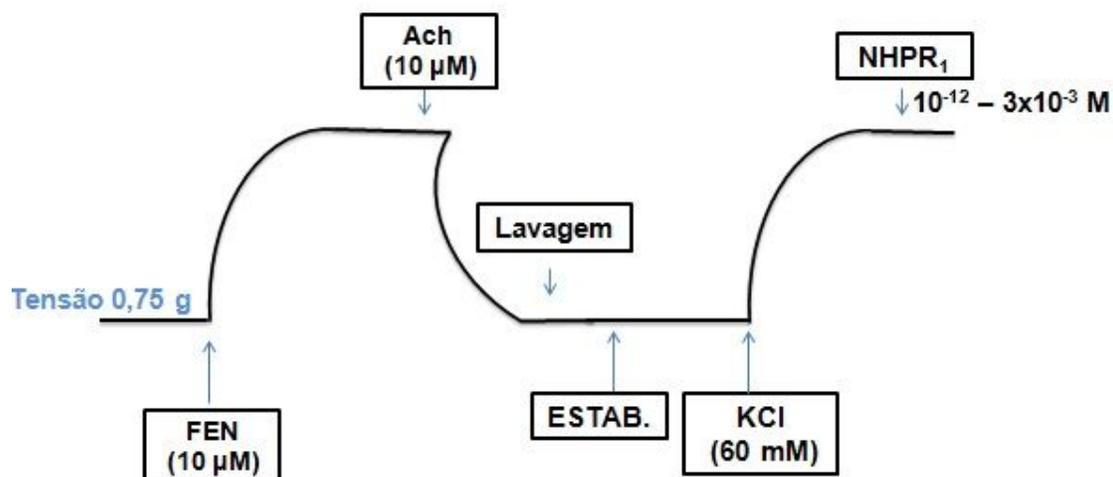


Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do NHPR<sub>1</sub> (10<sup>-12</sup> – 3x10<sup>-3</sup> M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos pré-contraídos com FEN (1µ M) em anéis com endotélio funcional e sem endotélio funcional. Fonte: Barbosa (2019).

#### 4.5.4 Avaliação do efeito induzido pelo NHPR<sub>1</sub> em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contraídos com KCl

Após a verificação da presença do endotélio funcional, a solução da cuba foi trocada pela solução de KCl 60 mM, agente despolarizante da membrana plasmática. O princípio deste protocolo baseou-se no bloqueio ao efluxo de íons K<sup>+</sup> capaz de gerar despolarização e induzir contração por aumento do influxo de cálcio extracelular através de canais para cálcio sensíveis a voltagem (CaV) tipo L e T. Além disso, esta condição experimental ativa canais de potencial receptor transiente (TRPs) e inibe a atividade da fosfatase da cadeia leve de miosina por ativação da RhoA cinase (ROCK), aumentando a sensibilidade ao Ca<sup>2+</sup> e mantendo o tônus do músculo liso vascular (VAN HOVE et al. 2009). Na fase tônica da contração induzida por KCl (60 mM), foi adicionado à cuba o NHPR<sub>1</sub>, e seu efeito foi registrado e comparado com o obtido nos anéis sem endotélio vascular (KRAVTSOV et al., 2003).

Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do NHPR<sub>1</sub> sobre tecidos pré - contraídos com KCl – Figura 7.

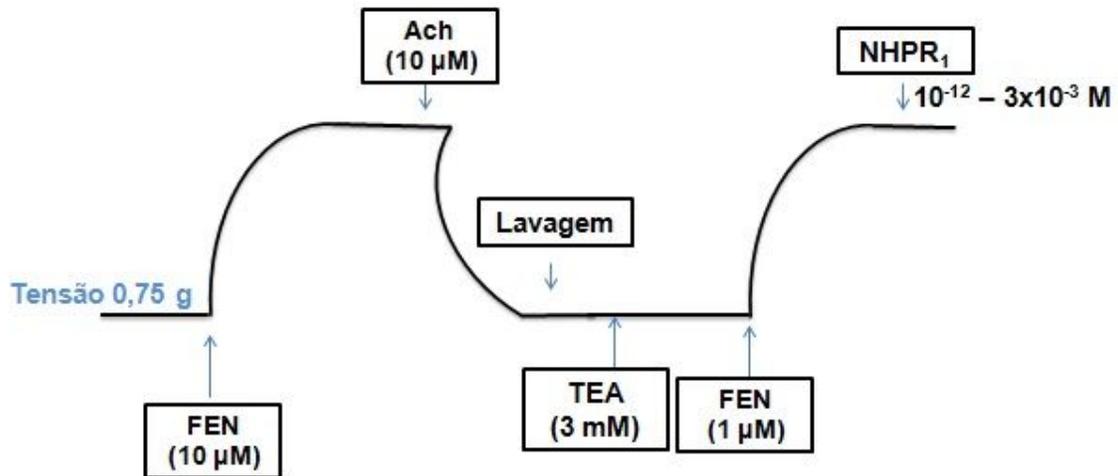


Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do NHPR<sub>1</sub> (10<sup>-12</sup> – 3x10<sup>-3</sup> M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos pré-contraídos com KCl (60 M) em anéis com endotélio funcional e sem endotélio funcional. Fonte: Barbosa (2019).

#### 4.5.5. Avaliação da participação dos canais para K<sup>+</sup> no efeito vascular induzido pelo NHPR<sub>1</sub>

Após a verificação do endotélio funcional e confirmação de sua remoção, as preparações dos anéis foram incubadas com tetraetilamônio (TEA) durante 30 minutos na concentração de 3 mM, que bloqueia não seletivamente os canais para K<sup>+</sup>, inibindo o efluxo deste íon por estes canais (WANG et al., 2008). Decorridos 30 minutos na presença do bloqueador, as preparações foram induzidas a uma nova contração tônica com FEN (10 µM) e posteriormente foi obtida uma curva concentração-resposta para o NHPR<sub>1</sub> (10<sup>-8</sup> -10<sup>-3</sup> M) na presença do TEA. A potência e a eficácia do efeito vasorrelaxante do derivado do NHPR<sub>1</sub> foram avaliadas por comparação dos valores de pD<sub>2</sub> e E<sub>max</sub>, respectivamente, na ausência e na presença de TEA (3 mM).

Esquema representativo do protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NHPR<sub>1</sub> em anéis mesentéricos pré-contráídos com FEN e incubados com TEA - Figura 8.

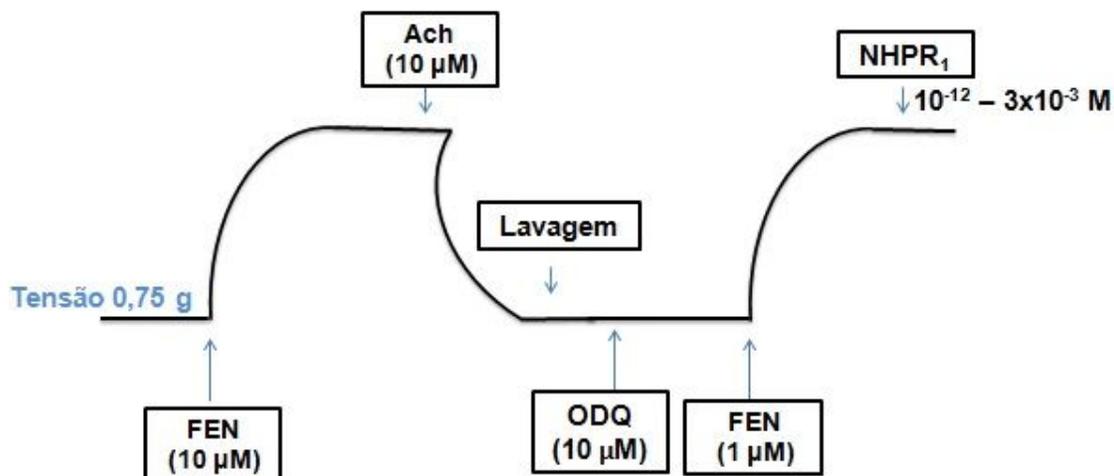


Esquema representativo do protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NHPR<sub>1</sub> (10<sup>-12</sup> – 3 x 10<sup>-3</sup> M) em anéis mesentéricos pré-contráídos com FEN 1 µM e incubados com TEA 3 mM.  
Fonte: Barbosa (2019).

#### 4.5.6. Avaliação da participação da enzima ciclase de guanilil solúvel (GCs) no efeito induzido por NHPR<sub>1</sub> em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato normotenso

Com o objetivo de investigar a participação da via NO/CGs/PKG na resposta a ser desenvolvida pelo NHPR<sub>1</sub>, foi utilizado o ODQ (10 µM), um inibidor da enzima ciclase de guanilil solúvel. As preparações de anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato, sem endotélio funcional foram incubadas no banho por 30 minutos com ODQ (10 µM) (GARTHWAITE et al., 1995). Após este período, uma contração tônica com FEN (10 µM) foi obtida, seguida da adição de concentrações crescentes e cumulativas do NHPR<sub>1</sub> (10<sup>-8</sup> -10<sup>-3</sup> M) ao banho para a obtenção de uma curva concentração-resposta. Os valores obtidos foram expressos como porcentagem de relaxamento em relação à contração produzida pela FEN. As respostas obtidas após a adição do ODQ foram comparadas com as obtidas na ausência das substâncias em anéis sem endotélio funcional (controle).

Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do NHPR<sub>1</sub> em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos pré-contraídos com FEN e incubados com ODQ – Figura 9.

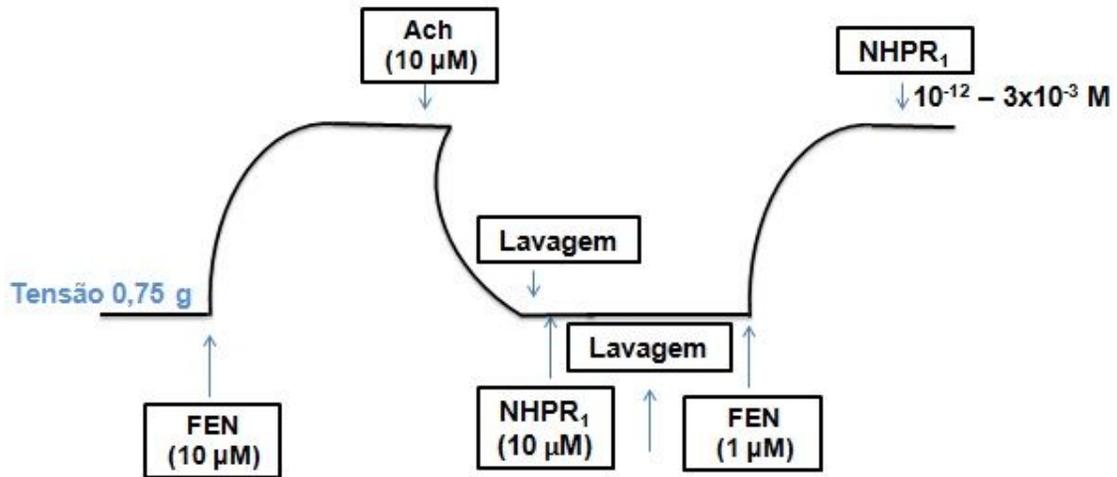


Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do NHPR<sub>1</sub> ( $10^{-12}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos pré-contraídos com FEN ( $1 \mu$  M) e incubados com ODQ ( $10 \mu$  M). Fonte: Barbosa (2019).

#### 4.5.7. Avaliação da indução da tolerância do NHPR<sub>1</sub> em artéria mesentérica

Os anéis da artéria mesentérica sem endotélio funcional foram pré-incubados com NHPR<sub>1</sub> ( $1 \text{ mM}$ ) por  $30 \text{ min}$ ; então a solução fisiológica foi sucessivamente trocada dez vezes para a remoção completa dos medicamentos usados anteriormente. Um novo período de estabilização ( $60 \text{ min}$ ) foi então realizado com a troca da solução nutritiva a cada  $15 \text{ min}$ . No final do período de estabilização de uma nova contração foi induzida com FEN ( $10 \mu\text{M}$ ), e depois de patamar foi alcançado, NHPR<sub>1</sub> ( $10^{-12}$  -  $10^{-3} \text{ M}$ ) foi adicionado ao banho em concentrações crescentes e cumulativas, protocolo descrito por Zhuge e colaboradores (2017).

Esquema representativo do protocolo de tolerância – Figura 10.



Esquema representativo do protocolo de tolerância. Fonte: Barbosa (2019).

## 4.6 Abordagens *in vivo*

### 4.6.1 Implantação dos cateteres vasculares

Um dia antes do experimento *in vivo*, foi realizada a implantação dos cateteres vasculares (canulação). Para tanto, os ratos normotensos Wistar foram anestesiados com cetamina (75 mg/kg i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) e, em seguida, foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica. Uma pequena incisão na região inguinal foi realizada, separando a musculatura para localização do feixe vasculonervoso femoral. Dessa forma, artéria e veia femoral foram identificadas, dissecadas e expostas. A extremidade PE-10 do cateter arterial foi introduzida em direção à aorta abdominal, via artéria femoral, para registro dos parâmetros cardiovasculares e a outra extremidade PE-10 do cateter venoso foi introduzido em direção à veia cava caudal, por meio da veia femoral, para administração das drogas. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical dorsal do animal e fixados com linha de sutura. Após a cirurgia, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais mantidas sob condições de temperatura, luminosidade e níveis de ruído controlados e receberam água e ração *ad libitum*, durante 24 horas para sua recuperação.

#### 4.6.2. Avaliação da administração aguda do NHPR<sub>1</sub> (1,0 – 50,0 mg/kg) sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos

Após 24 horas da recuperação do processo cirúrgico e dos efeitos anestésicos, a pressão arterial e a frequência cardíaca foram registradas em ratos conscientes e com livre movimentação. O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (Modelo BRPL2, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, EUA) acoplado a um amplificador e este conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, Unit 13, 22 Lexington Drive, Bela Vista, New South Wales, Austrália). O software de aquisição e análise utilizado foi o LabChart 5.0. No cateter venoso de cada animal foram administradas as seguintes doses do NHPR<sub>1</sub>: 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; e 50,0 mg/kg, de maneira randômica. O intervalo entre as doses foi de 15 minutos. Os valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram registrados imediatamente antes (PAM e FC basal – linha de base) e imediatamente após a administração.

As variações dos parâmetros cardiovasculares foram calculadas fazendo-se a diferença entre o valor da variável após a administração da droga e antes da injeção da droga, conforme as fórmulas abaixo:

$$\Delta PAM = PAM_{\text{após a administração da droga}} - PAM_{\text{basal}}$$

$$\Delta FC = FC_{\text{após a administração da droga}} - FC_{\text{basal}}$$

#### 4.6.3 Teste de toxicidade pré-clínica aguda para NHPR<sub>1</sub>

O teste de toxicidade foi realizado de acordo com “*Guideline for testing of chemicals*” nº 423 da OECD (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico) (OECD, 2001). Ratas fêmeas (n = 3 / grupo) foram tratadas com doses únicas de 300 ou 2000 mg / kg por administração oral de NHPR<sub>1</sub>, enquanto o grupo controle recebeu apenas veículo [5% (v / v) Cremophor em solução salina]. Quando não existe

qualquer informação sobre a substância a ser testada, por razões de proteção dos animais, recomenda-se a utilização de uma dose inicial de 300 mg/kg.

Para as alterações comportamentais e sinais de toxicidade, os sinais característicos da atividade do sistema nervoso central (SNC) ou do sistema nervoso autônomo (SNA) foram cuidadosamente observados a cada 15 minutos (0, 15, 30 e 60 minutos), após 4 horas e diariamente para os 14 dias seguintes (ALMEIDA et al., 1999) (ANEXO 2). No dia 14, os animais foram sacrificados e os órgãos (fígado, coração, baço, rins e pulmão) foram colhidos, pesados e examinados macroscopicamente. Além disso, diariamente foram observados parâmetros como o consumo de água, a ingestão de alimentos e a evolução ponderal semanal. Após o décimo quarto dia, os animais sobreviventes e os animais do grupo controle foram eutanasiados e os órgãos foram retirados para exames macroscópicos e, caso fossem observadas alterações macroscópicas, foram realizados exames histopatológicos nos órgãos alterados.

#### **4.7 Análise estatística**

Os resultados dos experimentos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças das médias dos grupos analisados foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As comparações estatísticas foram realizadas por meio da análise de variância com dois fatores (ANOVA *two-way*) com pós-teste de Bonferroni para os resultados *ex vivo*; e por meio da análise de variância de um fator (ANOVA *one-way*) com pós-teste de Tukey para os resultados *in vivo*. As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism® versão 6.

## **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Abordagens *in silico*

#### 5.1.1 Atividade biológica prevista pelo PASS

As análises geradas indicaram uma predição que a substância NHPR<sub>1</sub> apresentou como principal efeito farmacológico a função vasodilatadora (Pa = 0,932/ Pi = 0,001), seguida de efeito antianginoso (Pa = 0,938/ Pi = 0,002). Em relação aos mecanismos de ação detectados para o NHPR<sub>1</sub>, a inibição da enzima fosfodiesterase GMPC (PDE-GMPc; Pa = 0,942/ Pi = 0,001) destacou-se por apresentar Pa > 0,9. O mecanismo doador de NO (Pa = 0,849) foi identificado ao utilizar a linha de corte Pa > 0,7 e foi o único a apresentar valor de Pi igual a 0,000, como podemos observar na Tabela 2. Todos os resultados para efeito biológico, mecanismo de ação e regulação da expressão gênica gerados pelo programa PASS com valor de corte de Pa > 0,7 foram consideradas nos espectros de atividades preditas.

Atividade biológica prevista pelo PASS – Tabela 2.

ATIVIDADE	PA (PROBABILIDADE DA PRESENÇA)	PI (PROBABILIDADE DA AUSÊNCIA)
VASODILATADORA	0,932	0,001
ANTIANGINOSA	0,938	0,002
INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE (PDE)	0,942	0,001
MECANISMO DOADOR DE NO	0,849	0,000

Fonte: Barbosa (2019).

### 5.1.2. Predição para parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade do NHPR<sub>1</sub>

As principais predições analisadas de acordo com os parâmetros (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) foram apresentadas nas Tabelas 3-6. Ao avaliar a absorção do NHPR<sub>1</sub> em relação a NTG a partir de valores de referência para a interpretação do pkCSM (PIRES et al., 2015), observou-se que o nitrato teste apresenta maior permeabilidade da Caco 2 (0,606 log Papp; log/cm/s) e maior absorção pela via de administração tópica (-2,403 log Kp) quando comparado à NTG (-0,219 log Papp; log/cm/s) e (-2,629 log Kp). Além disso, o nitrato teste apresentou uma maior absorção intestinal (96,191%) comparado à NTG (66,308%) (Tabela 3).

Absorção do NHPR<sub>1</sub> comparado a NTG segundo predição do ADMET – Tabela 3.

COMPONENTE	PERMEABILIDADE CACO 2 *	ABSORÇÃO INTESTINAL HUMANA	ABSORÇÃO NA PELE	GLICOPROTEÍNA P - SUBSTRATO
NHPR <sub>1</sub>	0,606 log PAPP; log/CM/S	96,191 %	-2,403 LOG KP	NÃO
NTG	-0,219 log PAPP log/CM/S	66,308%	- 2,629 log KP	NÃO
VALORES DE REFERÊNCIA	> 0,90	>30%	> 2,5	NÃO

\* Caco 2 é uma linhagem de cultura celular de adenocarcinoma colorretal epitelial humano. Fonte: Barbosa (2019).

Analisando a distribuição do NHPR<sub>1</sub> comparada a NTG como apresentada na Tabela 4, a partir de valores de referência para a interpretação do pkCSM (PIRES et al., 2015), o NHPR<sub>1</sub> apresentou maior volume de distribuição (-0,501 log L/ Kg), maior permeabilidade à barreira cerebral (-0,652 logBB) e ao sistema nervoso central (-3,007 LogPs), quando comparado com a NTG (-0,894 log L/ Kg; -1,708 log BB; e -3,261LogPs, respectivamente).

Distribuição do NHPR<sub>1</sub> comparado a NTG segundo predição do ADMET – Tabela 4.

COMPONENTE	VOLUME DE DISTRIBUIÇÃO	PERMEABILIDADE DA HEMATOENCEFÁLICA	PERMEABILIDADE NO SNC
NHPR <sub>1</sub>	-0,501 log L/ Kg	-0,652 logBB	-3,007 LogPs
NTG	-0,894 log L/ Kg	-1,708 log BB	-3,261LogPs
VALORES DE REFERÊNCIA	L /Kg > 0,45 Alto volume de distribuição	Log BB > 0,3 Facilmente atravessa a barreira hematoencefálica	Log Ps > -2 Penetrante
	L /Kg < - 0,15 Baixo volume de distribuição	LogBB < -1 Mal distribuídas no cérebro	Log Ps < -3 Incapaz de penetrar

Fonte: Barbosa (2019).

Ao analisar o metabolismo do NHPR<sub>1</sub>, observou-se que a NTG e o nitrato, provavelmente não são inibidores do citocromo P450. Sobre a excreção do NHPR<sub>1</sub>, como demonstrado na Tabela 5, observa-se que o NHPR<sub>1</sub> apresenta taxa de excreção menor que a NTG (0,914 log ml/min/kg *versus* 1,092 log ml/min/kg, respectivamente).

Excreção do NHPR<sub>1</sub> comparado a NTG segundo predição do ADMET – Tabela 5.

COMPONENTE	TOTAL
NHPR <sub>1</sub>	0,914 log ml/min/kg
NTG	1,092 log ml/min/kg

Fonte: Barbosa (2019).

Ao avaliar a toxicidade do NHPR<sub>1</sub> em relação a NTG. Observa-se na Tabela 6, a partir de valores de referência para a interpretação do pkCSM (PIRES et al, 2015), que a dose máxima tolerada NHPR<sub>1</sub> é maior que a da NTG (0,702 log mg/Kg/dia *versus* 0,276 log mg/Kg/dia, respectivamente). Considerando a potência tóxica do composto, o NHPR<sub>1</sub> apresentou que a dose letal capaz de matar 50 % dos animais é de 2,671(mol/kg) quando comparada a NTG (2,928 mol/kg), sugerindo que a NTG precisa de uma dose maior para matar os animais, sendo assim considerada mais segura que o NHPR<sub>1</sub>. No entanto, tanto a análise de hepatotoxicidade quanto a sensibilidade na pele, prediz resultados negativos.

Toxicidade do NHPR<sub>1</sub> comparado a NTG segundo predição do ADMET – Tabela 6.

COMPONENTE	TOLERÂNCIA MÁXIMA – DOSE HUMANA	DOSE AGUDA EM RATOS (LD <sub>50</sub> )	HEPATOTOXICIDADE	SENSIBILIDADE NA PELE
NHPR <sub>1</sub>	0,702 (log mg/Kg/dia)	2,671 (mol/kg)	NÃO	NÃO
NTG	0,276 (log mg/Kg/dia)	2,928 (mol/kg)	NÃO	NÃO
VALORES DE REFERÊNCIA	≥ 0,477	Não	NÃO	NÃO

Fonte: Barbosa (2019).

## 5.2 Abordagens *in vivo*

### 5.2.1 Teste de toxicidade pré-clínica aguda para NHPR<sub>1</sub>

A administração oral de NHPR<sub>1</sub> nas doses de 300 ou 2000 mg/kg não promoveu alterações no peso corporal e no peso isolado do fígado, coração, rins e pulmão dos animais, bem como não alterou o consumo de água e alimentos em comparação com o grupo controle, tratado com cremofor, como verificado na Tabela 7.

Teste de toxicidade pré-clínica aguda para NHPR<sub>1</sub> em ratos – Tabela 7.

PARÂMETRO	TRATAMENTO			
	Cremonophor (300mg/ kg)	Cremonophor (2000mg/kg)	NHPR <sub>1</sub> (300mg/ kg)	NHPR <sub>1</sub> (2000mg/kg)
<b>Peso corporal (g)</b>				
Inicial	213,3 ± 25,5	204 ± 12,2	193,3 ± 12,8	183,3 ± 5,7
Final	232 ± 19,3	218,6 ± 14,0	202,6 ± 13,6	198,7 ± 4,2
<b>Pesos de órgão/ peso corpóreo (mg/g)</b>				
Fígado	35,6 ± 1,2	31,4 ± 2	36,2 ± 1,2	35,9 ± 1,3
Coração	4,0 ± 0,1	4,2 ± 0,3	4,3 ± 0,2	4,6 ± 0,4
Rins	7,0 ± 0,4	7,8 ± 0,9	7,5 ± 0,7	8,15 ± 1,3
Pulmão	7,0 ± 0,7	7,6 ± 2,3	7,6 ± 0,5	7,2 ± 0,8
<b>Ingestão de água (mL / rato / dia)</b>				
	39,9 ± 11,4	49,6 ± 13,1	32,0 ± 12,1	45,1 ± 21,2
<b>Ingestão de alimentos (g / rato / dia)</b>				
	15,3 ± 1,4	16,6 ± 2,1	15,0 ± 1,6	13, 4 ± 2,4

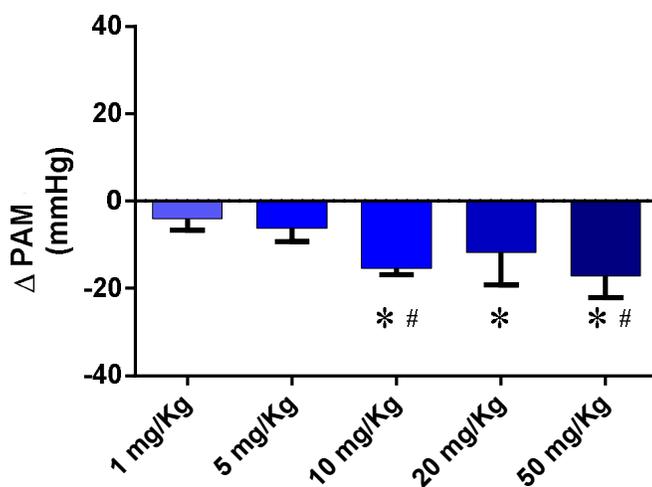
Os dados são mostrados como média ± SEM. n = 3 por grupo. \* p<0,05 comparado ao controle (veículo; Cremonofor 5%). Para avaliação dos órgãos, os valores foram expressos como índice de órgãos correspondente à divisão do peso do órgão (mg) pelo peso corporal do animal (g).

Fonte: Barbosa (2019).

5.3.1. Avaliação da administração aguda do NHPR<sub>1</sub> (1,0 – 50,0 mg/kg) sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos.

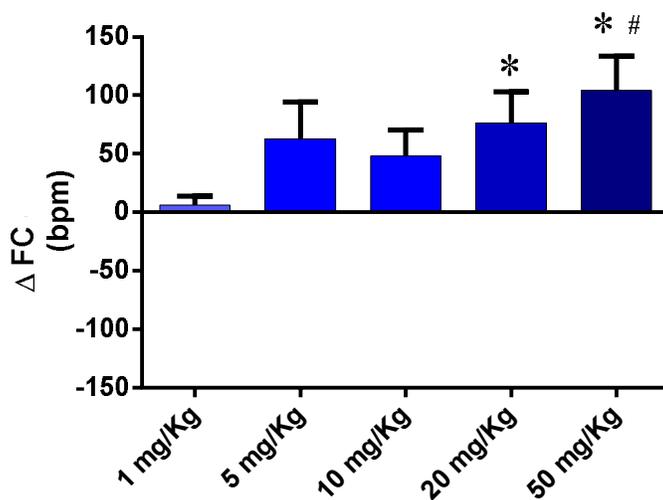
Após um período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares, ratos normotensos foram submetidos à administração aguda de diferentes doses do NHPR<sub>1</sub> por via intravenosa (1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 50mg/kg), administradas aleatoriamente. Pôde-se observar que o NHPR<sub>1</sub> foi capaz de promover hipotensão ( $\Delta$ PA:  $-4,06 \pm 1,01$ ;  $-6,18 \pm 1,25$ ;  $-15,39 \pm 0,65$ ;  $-11,71, \pm 3,04$ ;  $-17,19 \pm 1,99$  mmHg) e taquicardia ( $\Delta$ FC:  $6,48 \pm 3,64$ ;  $62,61 \pm 12,88$ ;  $48,21 \pm 9,08$ ;  $76,31 \pm 13,44$ ;  $103,75 \pm 12,13$  bmp) de maneira dose-dependente, como demonstrado nas Figuras 1 e 2.

Efeito da administração aguda do NHPR<sub>1</sub> (1,0 – 50,0 mg/kg) sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos não anestesiados – Figura 11.



As barras verticais representam a média ± e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova *One Way* seguida do pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  versus a dose 1mg/Kg; #  $p < 0,05$  versus a dose 5 mg/Kg. Fonte: Barbosa (2019).

Avaliação da administração aguda do NHPR<sub>1</sub> (1,0 – 50,0 mg/kg) sobre a frequência cardíaca (FC) – Figura 12.



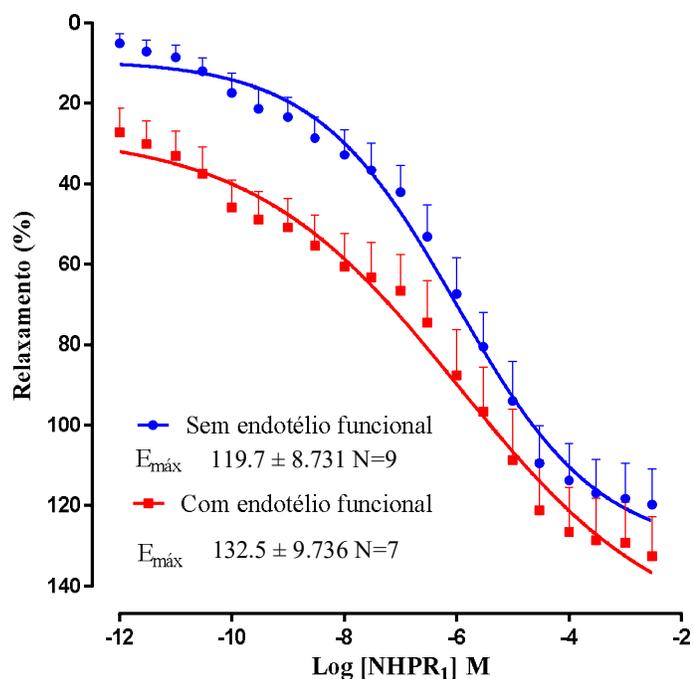
As barras verticais representam a média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova *One Way* seguida do pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  versus a dose 1mg/Kg; #  $p < 0,05$  versus a dose 5 mg/Kg. Fonte : Barbosa (2019).

### 5.3 Abordagens *ex vivo*

#### 5.3.1 Efeito do NHPR<sub>1</sub> sobre artéria mesentérica cranial isolada de ratos normotensos pré-contráida com FEN

Foi obtida uma curva concentração-resposta para o NHPR<sub>1</sub> ( $10^{-12}$  M a  $3 \times 10^{-3}$ M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos normotensos pré-contráidos com FEN, e pôde ser observado que o NHPR<sub>1</sub> promoveu efeito vasorrelaxante dependente de concentração em anéis com endotélio funcional ( $E_{\text{máx}} = 133,7 \pm 9,333$  n = 7). A ausência do endotélio não alterou o efeito induzido pelo composto ( $E_{\text{máx}} = 119,7 \pm 8,731$ , n = 9). Este resultado indica que o efeito vasorrelaxante induzido pelo NHPR<sub>1</sub> é independente de endotélio funcional. Baseado nessa informação, apenas anéis sem endotélio funcional foram utilizados nos estudos posteriores.

Efeito vasorrelaxante do  $\text{NHPR}_1$  em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos pré-contraídos com FEN – Figura 13.

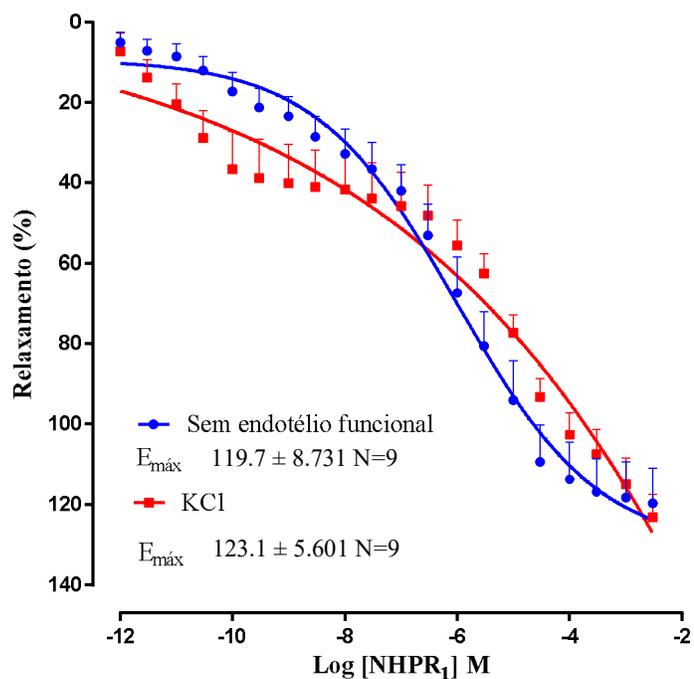


Curva concentração – resposta do efeito induzido pelo  $\text{NHPR}_1$  ( $10^{-12}$  -  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis de artéria mesentérica de ratos pré-contraídas com FEN ( $1 \mu\text{M}$ ). Anéis com endotélio funcional (■) Anéis sem endotélio funcional (●). Fonte: Barbosa (2019).

5.3.2 Efeito do  $\text{NHPR}_1$  em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos normotensos pré-contraídos com KCl (60mM)

Concentrações crescentes e cumulativas do  $\text{NHPR}_1$  promoveram vasorrelaxamento sobre a pré-contração induzida por KCl (60 mM) de maneira semelhante na ausência ( $E_{\text{máx}} = 119,7 \pm 8,731$ ,  $n = 9$ ) e na presença ( $E_{\text{máx}} = 123,1 \pm 5,601$ ,  $n = 9$ ) do endotélio funcional (Gráfico 4).

Efeito vasorrelaxante do  $\text{NHPR}_1$  em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos pré- contraídas com KCl (60mM) – Figura 14.

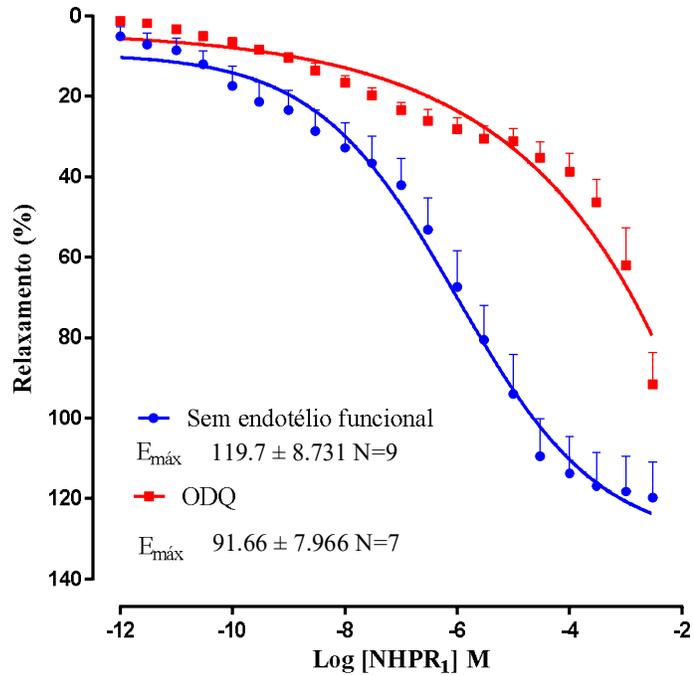


Curva concentração – resposta do efeito induzido pelo  $\text{NHPR}_1$  ( $10^{12}$  -  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, sem endotélio funcional, pré-contraídas com FEN ( $1 \mu\text{M}$ ), na presença do KCL (60 mM) (■) na ausência (●). Fonte: Barbosa (2019).

### 5.2.3 Avaliação da participação da via do NO/sGC no efeito induzido pelo $\text{NHPR}_1$

O efeito relaxante induzido pelas concentrações cumulativas do  $\text{NHPR}_1$  foi atenuado na presença do ODQ ( $10 \mu\text{M}$ ) com redução no  $E_{\text{máx}}$  ( $E_{\text{máx}} = 91,66 \pm 7,966 \text{ n} = 7$  versus  $E_{\text{máx}} = 119,7 \pm 8,731, \text{ n} = 9$ ), como demonstrado no gráfico 5.

Efeito vasorrelaxante do  $\text{NHPR}_1$ , em anéis de artéria mesentérica cranial isolada com um inibidor de sGC, ODQ (10  $\mu\text{M}$ ) – Figura 15.

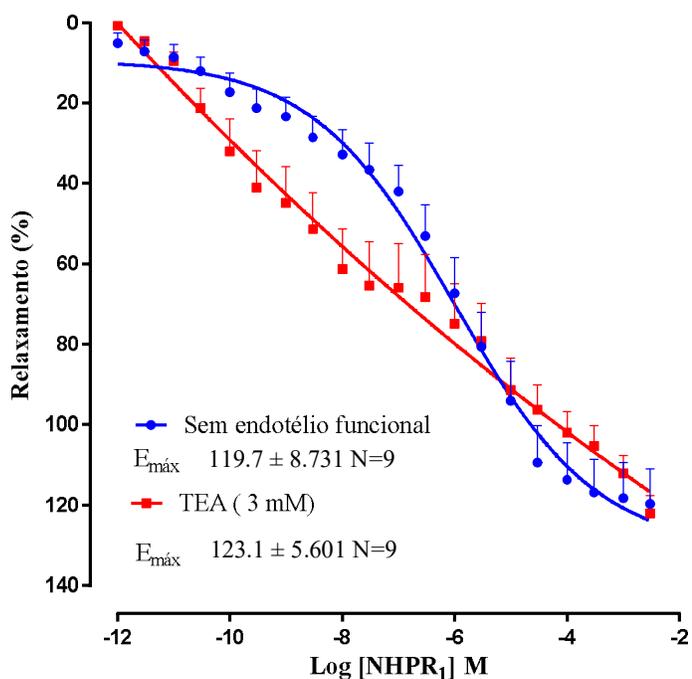


Curva concentração – resposta do efeito induzido pelo  $\text{NHPR}_1$  ( $10^{12}$  -  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, sem endotélio funcional, pré contraídas com FEN (1  $\mu\text{M}$ ), na presença de ODQ (10  $\mu\text{M}$ ) (■) e na ausência de ODQ (●). \*  $p < 0,05$ . Fonte: Barbosa (2019).

#### 5.2.4 Avaliação da participação dos canais para $\text{K}^+$ no efeito vascular induzido

Na presença de 3 mM de TEA, um bloqueador inespecífico para canais para potássio, não foi verificada diferença estatística significativa na eficácia da resposta entre os anéis incubados com o bloqueador ( $E_{\text{máx}} = 123,1 \pm 5,601$ ,  $n = 9$ ) e sem o bloqueador ( $E_{\text{máx}} = 119,7 \pm 8,731$ ,  $n = 9$ ), como é observado no gráfico 6.

Efeito vasorrelaxante do  $\text{NHPR}_1$  em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos com bloqueador não seletivo para canais de  $\text{K}^+$ , TEA (3mM) – Figura 16.

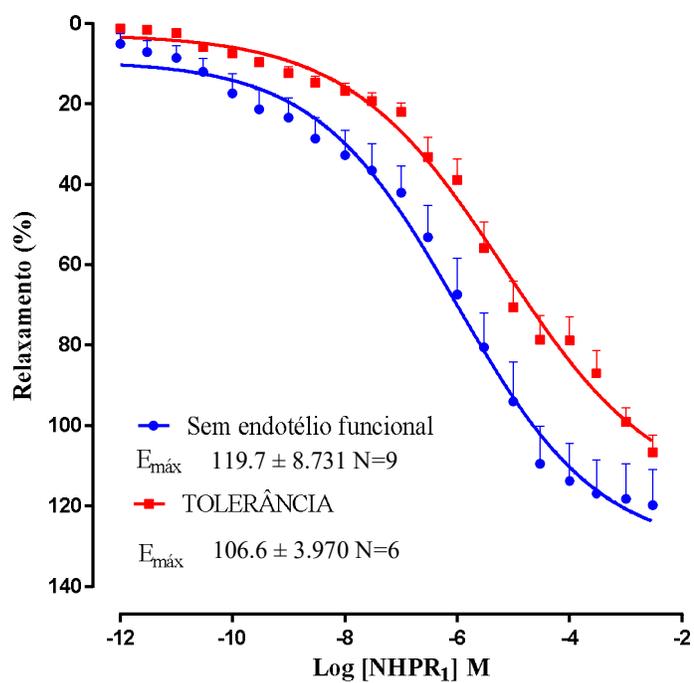


Curva concentração – resposta do efeito induzido pelo  $\text{NHPR}_1$  ( $10^{12}$  -  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, sem endotélio funcional, pré contraídas com FEN ( $1 \mu\text{M}$ ), na presença de TEA (3 mM) (■) e na ausência de TEA (3mM) (●). \*  $p < 0,05$ . Fonte: Barbosa (2019).

5.2.5. Avaliação da capacidade do  $\text{NHPR}_1$  em induzir tolerância em artéria mesentérica isolada de ratos normotensos.

A adição de  $\text{NHPR}_1$  em concentrações cumulativas e crescentes induziu um efeito relaxante em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos normotensos ( $E_{\text{máx}} = 119,7 \pm 8,731$ ,  $n = 9$ ). Em anéis pré – expostos ao  $\text{NHPR}_1$  (1 mM) durante 30 minutos, o efeito relaxante ( $E_{\text{máx}} = 106,6 \pm 3,970$ ,  $n = 6$ ) foi observado, como apresenta o gráfico 7, porém significativamente atenuado com redução dos valores do efeito máximo.

Efeito da indução da tolerância do NHPR<sub>1</sub> – Figura 17.



Curva concentração – resposta do efeito induzido pelo NHPR<sub>1</sub> ( $10^{12}$  -  $3 \times 10^{-3}$  M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, sem endotélio funcional, pré contraídas com FEN (1  $\mu$ M), na presença de NHPR<sub>1</sub> (10  $\mu$  M) (■) e na ausência de NHPR<sub>1</sub> (●). \*  $p < 0,05$ . Fonte : Barbosa (2019).

## **DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram que o NHPR<sub>1</sub> possui baixa toxicidade aguda, promove hipotensão e taquicardia em ratos normotensos, além de induzir vasorrelaxamento em artérias mesentéricas isoladas de ratos com envolvimento da via sGC – PKG.

O NO possui grande importância para o funcionamento normal em diversas partes do corpo, entre elas o sistema cardiovascular (BIAN et al., 2018). Logo, uma redução na biodisponibilidade do NO endógeno está relacionado ao surgimento e manutenção de doenças que acometem esse sistema. Diante dessa problemática, a substituição ou o aumento do NO endógeno por fármacos administrados exogenamente proporcionou a base para um vasto campo de novas terapêuticas na medicina cardiovascular (IGNARRO et al., 2002). Embora exista a identificação de várias substâncias doadoras de NO, apenas dois tipos de fármacos são utilizados como doadores de NO, os nitratos inorgânicos, como o NPS, e os nitratos orgânicos, como NTG.

O NPS tem utilização limitada devido à elevada toxicidade causada pela liberação do cianeto presente em sua estrutura (IGNARRO et al., 2002). A NTG, por sua vez, é utilizada há mais de um século como droga antianginosa e apesar da sua potente vasodilatação e hipotensão, provoca efeitos colaterais como cefaleia e tolerância, os quais limitam seu uso (LIMA et. al., 2014). Diante disso, utilizou-se um nitrato orgânico inédito para o qual foram avaliados seus efeitos no sistema cardiovascular de ratos normotensos.

Inicialmente, foi realizada a caracterização da molécula por testes *in silico* para identificar os prováveis efeitos biológicos gerados pelo nitrato, sendo este trabalho, o primeiro estudo *in silico* realizado com a molécula NHPR<sub>1</sub>.

Neste sentido, analisando os resultados preditos obtidos pelo software PASS, foi possível sugerir que o NHPR<sub>1</sub> deve possuir duas principais atividades biológicas, o efeito vasodilatador e o efeito antianginoso. O mecanismo de ação “doador de NO” foi identificado para o NHPR<sub>1</sub> com valor de (Pa) 0,78. Quando valor de Pa > 0,7, é provável que o composto revele a atividade identificada também em experimentos *ex vivo* ou *in vivo*.

No ensaio *in silico* ADMET, ao avaliar a previsão da absorção do NHPR<sub>1</sub> em relação a NTG, a partir de valores de referência para a interpretação do pkCSM (PIRES et al., 2015), observou-se que o NHPR<sub>1</sub> deve apresentar maior permeabilidade da

linhagem Caco 2 e maior absorção pela via de administração tópica quando comparado a NTG. A linhagem celular Caco 2 é composta por células de adenocarcinoma colorretal epitelial humano e é amplamente utilizada em modelos *in vitro* para prever a absorção de medicamentos administrados por via oral. Já a permeabilidade tópica é considerada significativa para a eficácia de muitos produtos de interesse para o desenvolvimento da administração transdérmica de medicamentos (PIRES et al., 2015). O nitrato teste apresentou uma maior absorção intestinal comparado à NTG.

Na avaliação dos valores do ADMET sobre a distribuição, o volume de distribuição e a permeabilidade tanto cerebral como no SNC, também foi previsto valores maiores do NHPR<sub>1</sub>. Nos resultados sobre metabolismo, tanto na nitroglicerina como NHPR<sub>1</sub> foram considerados como não sendo inibidores do citocromo P 450. Sendo este componente uma enzima de desintoxicação importante no corpo, encontrada principalmente no fígado, que oxida para facilitar sua excreção. Inibidores desta enzima podem afetar o metabolismo dos medicamentos, por isso é importante avaliar a capacidade de compostos para inibir o citocromo P 450 (PIRES et al., 2015). Nos valores de excreção, o valor total da excreção obteve número menor comparado ao nitrato. Na toxicidade o valor da dose máxima tolerada em humanos foi bem maior do NHPR<sub>1</sub>, todos os resultados comparando com a NTG.

A validação inicial da atividade biológica da molécula pode ser realizada por meio de experimentação *in vitro* e/ou *ex vivo*. Por meio dos ensaios *in vitro* é possível observar a atividade da substância sob diferentes condições controladas. Os experimentos *ex vivo* consideram estruturas biológicas mais complexas que os ensaios *in vitro*, também em condições experimentais controladas (ANDRADE et al., 2016; SLIWOSKI et al., 2014). Alguns estudos corroboram essa afirmativa, analisando ensaios *in silico*, *in vitro*, *in vivo* (KUMARAN et al., 2003; SINGH, GUPTA; PURI, 2003; LEITE et al., 2014), tornando assim resultados consistentes aos do presente estudo, uma vez que são validados pelos ensaios *in vivo* e *ex vivo*.

No desenvolvimento de novas drogas com potencial terapêutico, os estudos de toxicidade animal são necessários para estabelecer os potenciais efeitos tóxicos e indesejáveis desses novos compostos (SUNDARAM et al., 2018). Assim, os testes de toxicidade não clínica aguda são realizados no intuito de identificar possíveis riscos à saúde antes dessas drogas serem utilizadas pelo homem (WILLS; ASHA, 2012).

Segundo o guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos da ANVISA

(2013), recomenda-se o uso de métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um menor número de animais, tais como os preconizados nos guias da OECD *guideline (Organisation for Economic Cooperation and Development)*. O guia da OECD têm protocolos claramente definidos que são respeitados na utilização de ensaios necessários para avaliar a toxicidade aguda e a genotoxicidade de compostos químicos (OECD, 2001; DOAK et al., 2012). O guia 423 inicial foi aprovado como uma segunda alternativa para o teste de toxicidade aguda convencional, no qual foram estabelecidos os valores da DL<sub>50</sub> para a classificação de substâncias químicas, bem como para os testes em um só sexo (geralmente do sexo feminino) seria agora considerado suficiente (caso não haja indícios de toxicidade no dois gêneros) (OECD, 2001).

Por meio dos ensaios toxicológicos realizados e considerando os parâmetros comportamentais avaliados, não foi observado a morte dos animais tratados com o NHPR<sub>1</sub> em ambas as doses (300 mg/kg e 2000 mg/kg). Assim, a DL<sub>50</sub> do NHPR<sub>1</sub> está enquadrada na categoria 5 do guia 423 da OECD que é aproximadamente 5000 mg/kg. O tratamento com NHPR<sub>1</sub> nestas duas doses não promoveu alterações no peso corporal, nos pesos dos órgãos, assim como no consumo de água e ração em comparação com o grupo controle (Tabela 5). Diante destes resultados, é possível inferir baixo grau de toxicidade do NHPR<sub>1</sub>, corroborando os dados *in silico*.

Assim sendo, foi realizada a validação do seu efeito vasodilatador previsto nos experimentos *in silico*, por meio de experimentação *in vivo*. A substância NHPR<sub>1</sub> foi administrada em diferentes doses (1; 5; 10; 20; 50 mg/kg), de forma randômica, via endovenosa, por meio de cateter implantado na veia femoral dos ratos. Foi verificado que nos ratos normotensos, o NHPR<sub>1</sub> teve um efeito hipotensor a partir da dose de 10 mg/kg, aumentando também a FC, como observado no gráfico 1 e 2. Relatos anteriores (PAULO et al., 2018) demonstram que os nitratos orgânicos induzem o relaxamento do músculo liso vascular e esse efeito é responsável pela promoção da hipotensão em ratos (MUNHOZ et al., 2012; PAULO et al., 2012, FRANÇA-SILVA et al., 2012). A taquicardia reflexa também é uma resposta esperada para compostos que reduzem a pressão arterial por vasodilatação, devido à ativação do barreflexo tais como nitroprussiato de sódio (NPS) e a NTG (CAPUTI et al, 1980; NEEDLEMAN, 1976).

Com base no fato de que as alterações do tônus da musculatura vascular lisa desempenham um importante papel na manutenção da PA, foi investigada a atividade do NHPR<sub>1</sub> utilizando uma abordagem *ex vivo*, para este fim, foram utilizadas anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos normotensos, com o objetivo de melhor compreender

a natureza do efeito hipotensor, observada nos experimentos *in vivo*. Nos experimentos *ex vivo* foi evidenciado que o NHPR<sub>1</sub> promoveu efeito vasorrelaxante dependente de concentração complementando com os resultados *in vivo* e *in silico*.

A ação farmacológica de compostos vasodilatadores é principalmente mediada por um efeito direto, sobre o músculo liso vascular, ou um efeito indireto, via liberação de fatores relaxantes derivado do endotélio vascular (GURNEY et al., 1994). A partir destas considerações sobre o endotélio, passou-se a avaliar a influência do mesmo na resposta vasorrelaxante induzida pelo NHPR<sub>1</sub>. Para tanto, foram realizados experimentos, nos quais o endotélio foi mecanicamente removido. Em seguida, a resposta obtida foi comparada à resposta relaxante do nitrato em estudo na presença do endotélio vascular. O efeito vasorrelaxante do NHPR<sub>1</sub> mostrou-se equipotente, com valores de eficácia nos anéis mesentéricos na presença e na ausência de endotélio vascular. Este efeito evidencia que a vasodilatação promovida pelo nitrato orgânico ocorre de maneira independente dos fatores relaxantes derivado de endotélio.

França – Silva, 2012 encontrou resultados semelhantes para o composto NDBP. A independência do endotélio para promover relaxamento é comum aos nitratos orgânicos, visto que são moléculas capazes de liberar NO em meio fisiológico, e este atua diretamente nas células musculares lisas vasculares mimetizando o NO produzido endogenamente. Esta é uma importante propriedade do NHPR<sub>1</sub> frente a outros nitratos, uma vez que é bem descrito na literatura que NTG e mononitrato de isorssobida (ISMN) ISMN demonstram menor vasorrelaxamento na presença do endotélio funcional quando comparado a vasos com endotélio removido (MUNHOZ et al., 2012).

Na presença de outro agente contracturante, foi utilizado o KCl (60mM). Como resultado observado no gráfico 4, não houve diferença significativa a resposta vasorrelaxante induzida pelo NHPR<sub>1</sub>, indicativo dos canais de cálcio parece estar envolvidos no efeito induzido pelo composto, uma vez que esses canais são pontos em comum das vias de contração induzida pela FEN (acoplamento farmacomecânico) como induzida por KCl (despolarização).

Como os nitratos orgânicos, são compostos que liberam NO, foi analisado o efeito do NHPR<sub>1</sub> em canais de K<sup>+</sup>, visto que o NO pode atuar na musculatura lisa vascular de duas formas, seja abrindo os canais para K<sup>+</sup>, ou ativando a via da sGC – PKG. Nossos resultados mostraram que utilizando um bloqueador inespecífico para canais para K<sup>+</sup> (TEA) não houve diminuição do relaxamento promovido pelo NHPR<sub>1</sub> (gráfico 6),

demonstrando c que o mecanismo de vasorrelaxamento desse composto não é dependente dos canais para  $K^+$ . Entretanto, quando foi utilizado um bloqueador da via sGC-PKG, (ODQ), houve diferença estatística confirmando a participação da ciclase de guanilil solúvel no efeito vasorrelaxante do  $NHPR_1$  (Gráfico 5). Estudos com a sGC purificada demonstram que o ODQ liga-se competitivamente no mesmo local de ligação que o NO, oxidando o  $Fe^{2+}$  do grupo heme e promovendo inibição reversível da enzima (GARTHWAITE et al., 1995).

Esses resultados corroboram os relatos de França-Silva (2012) e Katsuki (1977), os quais concluíram que os nitratos orgânicos causam vasodilatação via enzima ciclase de guanilil, mediada pelo NO, demonstrando que o NO é a molécula efetora comum aos nitrovasodilatadores.

A nitroglicerina e outros nitratos orgânicos utilizados na clínica induzem tolerância, efeito caracterizado pela redução na biotransformação dos nitratos em meios fisiológicos (BENNET et al, 1988). Por exemplo, o nitrato nicorandil tem sido associado à função endotelial melhorada e à inibição de eventos da artéria coronária, ao mesmo tempo em que é desprovido de tolerância clínica (SEKIYA et al., 2005). O nitrato de mononitrato de aminoetil mostrou uma potência quase semelhante em comparação com o NTG; no entanto, induziu severa tolerância *in vivo* (SCHUHMACHER et al., 2009). Assim sendo, viu se a importância de avaliar a capacidade do  $NHPR_1$  de induzir tolerância nas artérias mesentéricas. A exposição prévia a uma alta concentração de  $NHPR_1$  por 30 min alterou o efeito induzido por  $NHPR_1$  (Gráfico 7). Esses dados indicam que o  $NHPR_1$  induz tolerância em contraste com NDHP descrito por Zhuge et al. (2017) e o NDBP descrito por Porpino et al. (2016). No entanto, esse resultado se apresenta em abordagem *ex vivo*, estudos posteriores serão necessários para avaliar diferentes mecanismos fisiológicos.

Os resultados obtidos até o presente momento evidenciam o  $NHPR_1$  como sendo um composto com baixa toxicidade que possui efeitos vasodilatadores promissores e hipotensores em animais normotensos do  $NHPR_1$ . Induzindo assim o vasorrelaxamento das artérias mesentéricas de ratos provavelmente pela liberação do NO do seu composto, ativando a via NO/GCs. Esse composto possui um indicativo de desenvolvimento de tolerância nas abordagens utilizadas, sendo necessárias outras abordagens para comprovação posterior do efeito.



# CONCLUSÃO

## 7. CONCLUSÃO

O conjunto de resultados obtidos nesse trabalho permite concluir que o NHPR<sub>1</sub>:

- Promove efeito hipotensor e taquicárdico, quando administrados por via endovenosa, em animais normotensos;
- Induz vasorrelaxamento em artéria cranial mesentérica isolada de ratos normotensos mediante ativação da via sGC - PKG;
- Parece promover tolerância vascular em artéria mesentérica cranial isolada de ratos;
- Possui toxicidade mínima.

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

ABEGUNDE, D. O.; MATHERS, C. D.; ADAM, T.; ORTEGON, M.; STRONG, K. The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. *The Lancet*, v. 370, n. 9603, p. 1929-1938, 2007.

ACHIKE, F.I.; KWAN, C.Y. Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signalling pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 2013.

ADARAMOYE, O. A.; MEDEIROS, I. A. Endothelium-independent vasodilation induced by kolaviron, a biflavonoid complex from *Garcinia kola* seeds, in rat superior mesenteric arteries. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 45, n. 1, p. 39-53, 2009.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS – JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ALTURA, BM AND BT ALTURA. Differential Effects of Substrate Depletion on Drug-Induced Contractions of Rabbit Aorta. **American Journal of Physiology-Legacy Content** 219(6):1698–1705. 1970.

ANDRADE, E. L., A. F.; BENTO, J.; CAVALLI, S. K.; OLIVEIRA, C. S.; FREITAS, R.; MARCON, R. C.; SCHWANKE, J. M.; SIQUEIRA, AND J. B.; CALIXTO. 2016. “Non-Clinical Studies Required for New Drug Development - Part I: Early in Silico and in Vitro Studies, New Target Discovery and Validation, Proof of Principles and Robustness of Animal Studies.” **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 49(11):e5644.

ANDERSON, T.J.; MEREDITH, I.T.; GANZ, P.; SELWYN, A.P.; YEUNG, A.C. Nitric oxide and nitrovasodilators: similarities, differences and potential interactions. **Journal of the American College of Cardiology**, v.24, 1994.

BALARINI, C.M.; LEAL, M.A.; GOMES, I.B.S; PEREIRA, T.M.C.; GAVA, A.L.; MEYRELLES, S.S.; VASQUEZ, E.C. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. **Journal of translational medicine**, v. 11, 2013.

BIAN, K., DOURSOUT, M.F.,MURAD, F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular disease. **J. Clin. Hypertens (Greenwich)**, 2018.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 12. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 1821, 2012.

BYRD, J. B.; ZENG, C.; TAVEL, H. M.; MAGID, D. J.; O’CONNOR, P. J.; MARGOLIS, K. L.; SELBY, J. V.; HO, P. M. (2011) Combination therapy as initial treatment for newly diagnosed hypertension. **American Heart Journal**, v. 162, p. 340-346, 2011.

- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 30-40, 2001.
- CARVALHO, M.H.C.; NIGRO, D.; LEMOS, V.S.; TOSTES, R.C.A.; FORTES, Z.B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, vol. 8 . 2001.
- CAPUTI, A. P. ; ROSSI, F.; CARNEY, K. ; BREZENOFF, H.E. Modulatory effect of Brain acetylcholine on Reflex- Induced Bradycardia and Tachycardia in Conscious Rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. V.215. P .309-316. 1980.
- CHOBANIAN, A.V. Mixed messages on blood pressure goals. **Hypertension**, v. 57, p. 1039–1040, 2011.
- CLEMENTI,E.; BROWN,G.C.; FEELISCH, M.; MONCADA, S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide. Crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America. 1998.
- CODY, R.J. The sympathetic nervous system and the rennin-angiotensin-aldosterone system in cardiovascular disease. **The American Journal of cardiology**, v.80,n.9B, 1997.
- CRIBBS, L. L. T-type Ca<sup>2+</sup> channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. **Cell Calcium**, v.40, n.20, p. 221-230, 2006.
- CSONT, T.; FERDINANDY, P. Cardioprotective effects of glyceryl trinitrate: beyond vascular nitrate tolerance. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 105, p.57-68, 2005.
- DAIBER, A.; STEVEN, S.; WEBER, A.; SHUVAEV,V.V.; MUZYKANTOV, V.R.; LAHER, I., LI, H., LAMAS, S., MUNZEL, T. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, 2017.
- DAIBER, A.; WENZEL, P.; OELZE, M.; SCHUHMACHER, S.; JANSEN, T.; MÜNZEL, T. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) -maker of and marker for nitrate tolerance in response to nitroglycerin treatment. **Chemical Biological Interactions**, v. 178, p. 40-47, 2009
- FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 358, p.113-122, 1998.
- FOROUZANFAR, M. H. et al. Global burden of hypertension and systolic blood pressure of at least 110 to 115 mmHg, 1990 – 2015. **JAMA** , 2017.
- FORSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, 2012.
- FRANÇA-SILVA, M. S., MONTEIRO, M. M., QUEIROZ, T. M., SANTOS, A. F., ATHAYDE-FILHO, P. F., & BRAGA, V. A. The new nitric oxide donor 2-nitrate-1, 3-dibuthoxypropan alters autonomic function in spontaneously hypertensive rats. **Autonomic Neuroscience**, 171(1-2), 28-35. 2012.

FURCHGOTT, R.F. The discovery of endothelium-dependent relaxation. **Circulation**, 1993.

GANGWISCH, J. E. A review of evidence for the link between sleep duration and hypertension. *Am. J. Hypertens.* **27**, 1235–1242, 2014.

Ganitkevich V, Y. a and G. Isenberg. 1991. “Depolarization-Mediated Intracellular Calcium Transients in Isolated Smooth Muscle Cells of Guinea-Pig Urinary Bladder.” **The Journal of Physiology** 435(1):187–205.

GARTHWAITE, J., CHARLES, S. L., CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature** (London), v. 336, p. 385-388, 1988.

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E. ; BOULTON, C. L.; NIELSEN, E.B.; SCHIMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitized guanylyl cyclase by 1H[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin – 1 – one. **Molecular Pharmacology**, v.48,n.2,p184-188,1995.

GHIADONI, L., FRANCESCO F., MASSIMO S., CARLO C., ALMERINA B., MASSIMO P., ANTONIO DI MONACO, LUCA DE SIATI, MASSIMO V., GIUSEPPE A., VINCENZO G., MARIA L. M., STEFANO T., GAETANO A. L., AND FRANCESCO C., 2012. “Assessment of Flow-Mediated Dilation Reproducibility.” *Journal of Hypertension* 30(7):1399–1405.

GIRALDEZ, R.R.; PANDA, A.; XIA, Y.; SANDERS, S.P.; ZWEIER J.L. Decreased nitric-oxide synthase activity causes impaired endothelium-dependent relaxation in the postischemic heart. *Journal Biological chemistry*, 1997.

GIRARDI, J. M.; GIRARDI, F. A.; PETERS, V. M. Endotélio vascular e efeitos das estatinas. **HU Revista**, v. 32, n. 1, p. 21-25, 2006

Global Health Metrics .Risk Factor Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. 2017.

GRIENDLING, K.K.; FITZGERALD, G.A. Oxidative Stress and Cardiovascular Injury Part I: basic Mechanisms and In Vivo Monitoring of ROS, **Circulation**, v. 108, 2003.

GRIENDLING, K. K.; MURPHY, T.J.; ALEXANDER, R.W. Molecular biology of the rennin-angiotensin system. **Circulation**, v.87, n.6, p.1816-1828,1993.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Neuroscience**, v. 7, p. 335-346, 2006.

ICHIKI T.; MYAZAKI, R.; KAMIHARAGUCHI A.; HASMIOTO, T.; MATSUURA H.; KITAMOTO, S.; TOKONOU, T.; SUNAGAWA, K. Resveratrol attenuates angiotensin II-induced senescence of vascular smooth muscle cells. *Regulatory Peptides*, v.177,2012.

IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C.; LOSCALZO, J. Nitric Oxide Donors and Cardiovascular Agents Modulating the Bioactivity of Nitric Oxide. An Overview. **Circulation Research**, v. 90, p.21-28, 2002.

JACKSON, W. F. Ions channels and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, p. 173-178, 2000.

KANG, N.; LEE, J.H.; LEE, W.W.; KO, J.Y.; KIM, E. A. ; KIM, J.S.; HEU, M.S. ; KIM, G.H.; JEON, Y.J. Gallic acid isolated from *Spirogyra* sp. improves cardiovascular disease through a vasorelaxant and antihypertensive effect, **Environ. Toxicol. Pharmacol.** V. 39 .2015.

KATSUKI, S.; ARNOLD, W.; MITTAL, C.; MURAD, F. Estimulação da guanilato ciclase por nitroprussiato de sódio, nitroglicerina e óxido nítrico em várias preparações teciduais e comparação com os efeitos da azida de sódio e hidroxilamina. **Revista de pesquisa de nucleotídeos.** 23-35. 1977.

KHOR, S.; CAI, D. Hypothalamic and inflammatory basis of Hypertension. **Clinical Science**, v. 131, p.211-223, 2017.

KRAVTSOV, G. M.; BRUCE, I. C.; WONG, T. M.; KWAN, C. A new view of K<sup>+</sup>-induced contraction in rat aorta: the role of Ca<sup>2+</sup> binding. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 446, v. 5, p. 529-540, 2003.

KLAND, D. T.; WEBER, M. A. Global burden of cardiovascular disease and stroke: hypertension at the core. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, p. 569-571, 2015.

KUMARAN, A.M. ; SOUZA, P.D.; AGARWAL, A. ; BOKKOLLA, R.M.; BALASUBRAMANIAM, M. Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. **Phytotherapy Research**, v.17, p. 527, 2003.

LANGTON, P. D.; NELSON, M. T.; HUANG, Y.; STANDEN, N. B. Block of calcium-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 260, n. 3, p. H927-H934, 1991.

LEITE, M. C. A.; BEZERRA, A. P .B.; SOUSA, J. P.; LIMA, E. O.; Investigation the antifungal activity and mechanism(s) geraniol against *Candida albicans* strains. **Medical Micology.** P.62, 2014.

LEWANDOWSKI, J. Renovascular hypertension: is it only the top of the iceberg? **Polski Merkuriusz Lekarski**, v. 15, n. 88, p. 371-375, 2003.

LIMA, R. G.; SILVA, B. R.; da SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Ruthenium Complexes as NO Donors for Vascular Relaxation Induction. **Molecules**, v. 19, p. 9628-9654, 2014.

LUFT, F. C. Twins in cardiovascular genetic research. **Hypertension**, 37, 350–356,2001.

LUNDBERG, J.O.; GLADWIN, M.T.; WEITZBER, E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. **Nature Review Drug Discovery**, 14, 2015.

MACCARRON, J. G.; BRADLEY, K. N.; MCMILLAN, D.; MUIR, T.C. Sarcolemma agonist-induced interactions between insP3 and ryanodine receptors in Ca<sup>2+</sup> oscillations and waves in smooth muscle. **Biochemical Society Transactions**, v.31,p929-924,2003.

- MENDES-JUNIOR, L.; GUIMARÃES, D.; GADELHA, D.; DINIZ, T.; BRANDÃO, M. C.; ATHAYDE-FILHO, P.; LEMOS, V.; FRANÇA-SILVA, M.; BRAGA, V. The new nitric oxide donor cyclohexane nitrate induces vasorelaxation, hypotension, and antihypertensive effects via NO/cGMP/PKG pathway. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 243, 2015.
- MEY J . G. ; VANHOUTTE, P. M. Heterogenous behaviour of the canine arterial and venous wall: importance of the endothelium. **Circulation Research**. v 51. 1982.
- MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 305-321, 2007.
- MIKAEL, L.R.; PAIVA, A.M.G. ; GOMES, M.M.; SOUSA, A. L.L.; JARDIM, P.C.B.V.; VITORINO, P.V.O.; EUZEBIO, M.B.;SOUSA, W.M.; BARROSO, W.K.S.Vascular aging and arterial stiffness. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2017.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** vol, 43, 1991.
- MUNZEL, T.; GORI,T.; BRUNO, R.M.; TADDEI, S. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? **European Heart Journal**, 2010.
- MÜNDEL, T.; DAIBER, A.; ANDGORI, T. Nitrate therapy: new aspects concerning molecular action and tolerance. **Circulation**, v. 123, p. 2132-214, 2011.
- NAPOLI, C.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide-releasing drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 43, p. 97-123, 2003.
- NATHAN, C.F.; HIBBS, J.B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Current Opinion Immunology**, vol 3, 1991.
- NEEDLEMAN, P. Organic Nitrate Metabolism. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. V.16. p. 81. 1976.
- OECD**. Test No 423: Acute oral toxicity-acute toxic class method, 2001.
- OHNO, Y.; KANNO, Y.; TAKENAKA, T. Central blood pressure and chronic kidney disease. **World Journal of Nephrology**, v. 6, n. 5, p. 90-100, 2016.
- OSTERGAARD,L.; STANKEVICIUS,E.;ANDERSEN,M.R.; ESKILDEN-HELMOND,Y.;LEDET,T.;MULVANY,M.J.;SIMONSEN,U,Diminished NO release in chronic hypoxic human endothelial cells. **American Journal Physiology, Heart Circulatory Physiology**, 2007.
- PALAGINI, L. et al. Sleep loss and hypertension: a systematic review. **Curr. Pharm. Des.** **19**, 2409–2419, 2013.
- PARKER, J.D.; FARREL, B.; FENTON, T.; CHANIM,M.; PARKER, J.O. Counterregulatory responses to continuous and intermittent therapy with nitroglycerin. **Circulation**. V. 84, 1991.
- PAULO, L.L.; CRUZ, J. C. ; Zhengbing Zhuge , Z. ; CARVALHO – GALVÃO, A. ; BRANDÃO, M. C.R.; DINIZ, T. F. ; HAWORTH, M. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; LEMOS, V. S. ; LUNDENBERG J. O. ; MONTENEGRO, M. F. ; BRAGA, V.

A. CARLSTROM, M. The novel organic mononitrate NDHP attenuates hypertension and endothelial dysfunction in hypertensive rats. *Redox Biology*. V. 15, P. 182-191. 2018.

PEACH, M. J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiological Reviews*, v.57,n.2,p.313-353,1977.

PEREIRA, A.C.; PAULO, M.; ARAUJO, A.V.; RODRIGUES, G.J.; BENDHACK, L.M. Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from ruthenium compounds, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol 44. 2011.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting SmallMolecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 4066-4072,2015.

PORPINO, S. K. P.; ZOLLBRECHT, C.; PELELI, M.; MONTENEGRO, M. F.; BRANDÃO, M. C. R.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; FRANÇA-SILVA, M. S.; LARSSON, E.; LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; PERSSON, E. G.; BRAGA, V. A.; CARLSTRÖM, M. Nitric oxide generation by the organic nitrate NDBP attenuates oxidative stress and angiotensin II-mediated hypertension. *British Journal of Pharmacology*, p. 2290–2302, 2016.

QUEIROZ, T. M.; MENDES-JÚNIOR, L. G.; GUIMARÃES, D. D.; FRANÇA-SILVA, M. S.; NALIVAICO, E.; BRAGA, V. A. Cardiorespiratory effects induced by 2-nitrate-1,3-dibuthoxypropan are reduced by nitric oxide scavenger in rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, v. 181, p. 31-36, 2014.

RAPAPORT, R.M.; DRAZAIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*, v.306, p 174 - 176, 1983.

SCALA, L. C.; MAGALHÃES, L. B.; MACHADO, A. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. In: MOREIRA, S. M.; PAOLA, A. V.; Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Livro Texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia*. 2ª. ed. São Paulo: Manole; 2015. p. 780-785.

SCATENA, R.;BOTTONI, P.;PONTOGLIO, A.;GIARDINA, B. Pharmacological modulation of nitric oxide release: new pharmacological perspectives, potential benefits and risks. *Current Medicinal Chemistry*, v. 17, , p. 61-73, 2010.

SCHUMACHER, S. ; SCHULZ, E. ; OELZE, H. ; KÖNIG, UM.; ROEGLER, C.; LANGE, K.; SYDOW, G.; KAWAMOTO, T. ; WENZEL, P.; MÜNZEL, T.; LEHMANN, J.; DAIBER, UMA. A new class of organic nitrates: Investigations on bioactivation, tolerance and cross – tolerance phenome. *Br J Pharmacol*. 2009.

SEKIYA, M., SATO, M., FUNADA, J., OHTANI, T., AKUTSU, H., & WATANABE, K. Effects of the long-term administration of nicorandil on vascular endothelial function and the progression of arteriosclerosis. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 2005.

SINDLER, A. L. et al. Nitrite supplementation reverses vascular endothelial dysfunction and large elastic artery stiffness with aging. **Aging Cell** **10**, 429–437, 2011.

SINGH, C. ; GUPTA, N.; PURI, S. K. Geraniol-derivad 1,2,4 – Trioxanes with potente *in vivo* antimalarial activity. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**. V.13, 2003.

Sliwoski, Gregory, Sandeepkumar Kothiwale, Jens Meiler, Edward W. Lowe, and Jr. 2014. “Computational Methods in Drug Discovery.”

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, Rio de Janeiro, v. 95, 2010.

STEPPAN, J., Barodka, V., Berkowitz, D. E. & Nyhan, D. Vascular stiffness and increased pulse pressure in the aging cardiovascular system. **Cardiol. Res. Pract.** 263585, 2011.

VANHEEL B.; VAN DE VOORDE J.; EDHF and residual NO : different factors. **Cardiovascular Research**, v.46, p 370 -375, 2000.

VAN HOVE, C. E.; VAN DER DONCKT, C.; HERMAN, A. G.; BULT, H.; FRANSEN, P. Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 920-930, 2009.

ZHUGE, Z.; PAULO, L.L.; JAHANDIDEH, A.; BRANDAO, M.C.R.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; LUNDBERG, J.O.; BRAGA, V.A.; CARLSTROM, M.; MONTENEGRO, M. Síntese e caracterização de um novo nitrato orgânico NDHP: papel da formação de óxido nítrico mediado por xantina oxidoreductase. **Redox. Biol.** 2017.

WANG, P. G.; XIAN, M.; TANG, X.; WU, X.; WEN, Z.; CAI, T.; JANCZUK, A. J. Nitric Oxide Donors: Chemical Activities and Biological Applications. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 1091-1134, 2002.

WANG, SP.; ZANG, WJ.; KONG, SS.; YU, XJ.; SUN, L.; ZHAO, XF.; WANG, SX.; ZHENG, XH. Vasorelaxant effect of isopropyl 3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoate, a novel metabolite from *Salvia miltiorrhiza*, on isolated rat mesenteric artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 579, p. 283-288, 2008

## **ANEXOS**

### **ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO NITRATO DE ACETATO DE 4 -NITROOXIBUTILA (NHPR1) SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS NORMOTENSOS", protocolada sob o CEUA nº 1539220818 no ~~processo~~, sob a responsabilidade de **Valdir de Andrade Braga** e equipe; ~~Camila de Castro Barbosa; Camila de Castro Barbosa; Camila de Castro Barbosa~~ - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 05/10/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF EFFECTS INDUCED BY 4-(NITROOXY)BUTYL ACETATE NITRATE ON THE CARDIOVASCULAR PARAMETERS OF NORMOTENSIVE RATS", utilizing 47 Heterogenic rats (47 males), protocol number CEUA 1539220818 (in ~~process~~), under the responsibility of **Valdir de Andrade Braga** and team; ~~Camila de Castro Barbosa; Camila de Castro Barbosa; Camila de Castro Barbosa~~ - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 10/05/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 01/2018 a 12/2019 Área: Biotecnologia

Origem: Unidade de Produção Animal (UPA/FarM)

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 12 a 14 semanas N: 47

Linhagem: Rattus Norvegicus - Wistar

Peso: 250 a 300 g

Local do experimento: O projeto será desenvolvido no Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA), localizado no prédio do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), cujo coordenador é o Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga. O laboratório dispõe de toda a infra-estrutura necessária para o desenvolvimento desta pesquisa, tais como: ferramentas farmacológicas, equipamentos e instrumentos apropriados.

João Pessoa, 17 de outubro de 2019

Prof. Dra. Isliana Gisela Albuquerque Gonçalves  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

## ANEXO B – PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO SNC

Quantificação dos efeitos

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	(0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	0 min	15 min	30 min	60 min	4 h
<b>1 – SNC</b>					
<b>a – Estimulante</b>					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
<b>b – Depressora</b>					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
<b>c – Outros comportamentos</b>					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
<b>2 - SN AUTÔNOMO</b>					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força para agarrar					
<b>3 – MORTE</b>					