

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA – CBIOTEC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EDMILSON DE SOUZA RAMOS NETO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UM NOVO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO, 2-
NITRATO-1,3-DI(DODECANÓXI)PROPANO (NDDDP), SOBRE O SISTEMA
VASCULAR DE RATOS**

JOÃO PESSOA - PB

2020

EDMILSON DE SOUZA RAMOS NETO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UM NOVO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO, 2-NITRATO-1,3-DI(DODECANÓXI)PROPANO (NDDDP), SOBRE O SISTEMA VASCULAR DE RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

JOÃO PESSOA - PB

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R175a Ramos Neto, Edmilson de Souza.

Avaliação dos efeitos de um novo doador de óxido nítrico, 2-nitrato-1,3-di(dodecanóxi)propano (NDDDP), sobre o sistema vascular de ratos / Edmilson de Souza Ramos Neto. - João Pessoa, 2020.

80 f. : il.

Tese (Doutorado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Nitrato orgânico. 2. NDDDP. 3. Óxido nítrico. 4. Artéria mesentérica. 5. Vasorrelaxamento. I. Título

UFPB/BC

EDMILSON DE SOUZA RAMOS NETO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE UM NOVO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO, 2-NITRATO-1,3-DI(DODECANÓXI)PROPANO (NDDDP), SOBRE O SISTEMA VASCULAR DE RATOS

Aprovado em 13 / FEVEREIRO / 2020

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes
Universidade Federal da Paraíba
Presidente



Prof. Dr. Josiane de Campos Cruz
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora interna



Prof. Dr. Samuel Paulo Cibulski
Universidade Federal da Paraíba
Examinador interno



Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves
Universidade Federal da Paraíba
Examinador externo



Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino
Universidade Federal de Goiás
Examinador externo

DEDICATÓRIA

A todos que contribuíram com esta conquista. Em especial a minha esposa e a minha mãe.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua infinita graça e amor me conduziu até aqui. Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Ao meu orientador, professor Dr. Valdir de Andrade Braga, que mesmo diante da limitação temporal não se furtou em me conceder a oportunidade para a realização deste sonho. Agradeço a paciência, apoio, incentivo e a confiança.

Ao professor Petrônio Filgueiras de Athayde Filho e a professora Maria Cláudia Rodrigues Brandão, pela cooperação ao longo deste trabalho.

Aos professores Enéas e Demétrius pela compreensão, paciência e disponibilidade.

Aos professores da banca de qualificação e defesa pelas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pelo partilhar do saber.

Ao professor Manoel Adrião Gomes Filho e a professora Aurea Wischral pelo suporte e apoio no início desta jornada.

A professora Maria do Socorro França Silva pelas produtivas discussões e contribuições.

A servidora Francis Mary Nogueira de Lima pela presteza, cordialidade e disponibilidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ – PB) pelo fomento à pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial. Especialmente a Airla Laana, Patrícia Rocha, Francisco Júnior, Lucas Rannier, Camila Castro, Ivynna Vidal, Roxane Lima, Alynne Carvalho, Apollo Dinatto, Clara Rittmeyer, Juliana Teles, Atalia Flor, Mickael Sousa, Danilo Duarte, Matheus Monteiro, Sara Madeiro e Clênia Cavalcanti pelo suporte e ajuda.

A Thyago Queiroz pela amizade, solicitude e disposição em ajudar.

A minha esposa por todo apoio, incentivo, companheirismo, compreensão e amor ao longo desta jornada.

A minha mãe pelos conselhos, ensinamentos, apoio e amor.

A minha família por compreender meus momentos de ausência, pelo suporte e apoio. Vocês são especiais para mim.

Aos meus amigos Robério Ricardo Cunha, Francisca Borges Cunha, Robério Davi, Betânia Borges, Joel Pereira, Márcia Rodrigues, Fernanda Monteiro, Bento e Geralda. Obrigado pelos ensinamentos e pelas orações. Vocês são bênçãos em minha vida.

A Hermano Almeida Pina, Ana Luiza Nogueira, Hélio Santa Cruz Almeida Neto e Karla Cardins pelo suporte no início dessa jornada. Obrigado pela acolhida, atenção e carinho.

Aos meus amigos, colegas e alunos do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande pelo apoio, incentivo e compreensão. Especialmente a Gláucia Faheina, Bruna Dantas, Maria Emília e José Justino Filho.

Aos meus amigos e alunos da Universidade Federal do Ceará Campus de Sobral pela compreensão e apoio. Especialmente a Aline, Anne, Keila, Eva Cristino, Alex Grangeiro, Gerardo Cristino, Vicente Pinto, Juvenal Linhares, Carla Thiciane, Eládio Pessoa, Daniel Hardy, Nonato, Joana Paula.

RESUMO

Os nitratos desempenham um papel fundamental na clínica médica há aproximadamente 130 anos, sendo bastante utilizados no tratamento de desordens cardiovasculares. Apesar de ter o seu uso bastante consolidado no tratamento destas doenças, a busca por novos nitratos orgânicos têm sido alvo de alguns grupos de pesquisa. O objetivo deste estudo foi caracterizar os efeitos farmacológicos de um novo nitrato orgânico, o 2-nitrato-1,3-di(dodecanóxi)propano (NDDDP), sintetizado a partir da glicerina, sobre a função vascular de ratos normotensos através de estudos *in vitro*. Em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, pré-contráídos com fenilefrina (FEN) 1 μM , o NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) induziu vasorrelaxamento dependente de concentração, na presença e ausência de endotélio funcional. Todos os experimentos seguintes foram executados na ausência do endotélio. O efeito do NDDDP foi reduzido após contração mediada por solução despolarizante de KCl (60 mM) quando comparado ao seu efeito frente a FEN. A resposta vasodilatadora do composto também foi atenuada na presença de hidroxicobalamina – HDX (30 μM), um sequestrador extracelular de NO, e do 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona – ODQ (10 μM), um inibidor da ciclase de guanilil solúvel (sGC). Além disso, o efeito relaxante induzido pelo NDDDP foi reduzido por um bloqueador não seletivo dos canais para K^+ , tetraetilamônio – TEA (3 mM) e por bloqueadores seletivos para os canais de K^+ como: a) TEA (1 mM, BK_{Ca}); b) 4 – Aminopirina – 4-AP (1 mM, K_{v}); e c) Cloreto de Bário – BaCl_2 (30 μM , K_{IR}). Entretanto, o efeito não foi alterado na presença de glibenclamida – GLIB (10 μM , K_{ATP}). Após a incubação durante 30 minutos com NDDDP (10^{-4} e 3×10^{-5} M), o vasorrelaxamento foi reduzido. Os dados sugerem que a ação vasodilatadora do NDDDP ocorre por meio da geração de NO, com consequente ativação da sGC, e da ativação dos canais para potássio do tipo BK_{Ca} , K_{v} e K_{IR} .

Palavras-chave: Nitrato orgânico. NDDDP. Óxido nítrico. Artéria mesentérica. Vasorrelaxamento

ABSTRACT

Nitrates have played a key role in medical practice for approximately 130 years and are widely used in the treatment of cardiovascular disorders. Although its use is well established in the treatment of these diseases, the search for new organic nitrates has been the target of some research groups. The aim of this study was to characterize the pharmacological effects of a new organic nitrate, 2-nitrate-1,3-di (dodecanoxy) propane (NDDDP), synthesized from glycerin, on the vascular function of normotensive rats through in vitro studies. In isolated cranial mesenteric artery rings of rats pre-contracted with 1 μ M phenylephrine (FEN), NDDDP (10^{-12} - 10^{-3} M) induced concentration-dependent vasorelaxation in the presence and absence of functional endothelium. All subsequent experiments were performed in the absence of the endothelium. The effect of NDDDP was reduced after contraction mediated by depolarizing KCl solution (60 mM) when compared to its effect by FEN contraction. The vasodilator response of the compound was also attenuated in the presence of hydroxycobalamin – HDX (30 μ M), an extracellular NO scavenger, and 1H- [1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one - ODQ (10 μ M), a soluble guanylyl cyclase (sGC) inhibitor. In addition, the NDDDP-induced relaxing effect was reduced by a non-selective K⁺ channel blocker, tetraethylammonium - TEA (3 mM) and by selective K⁺ channel blockers such as: a) TEA (1 mM, BK_{Ca}); b) 4 - Aminopyrin - 4-AP (1 mM, K_v); and c) Barium Chloride – BaCl₂ (30 μ M, K_{IR}). However, the effect was not altered in the presence of glibenclamide - GLIB (10 μ M, K_{ATP}). After incubation for 30 minutes with NDDDP (10^{-4} and 3×10^{-5} M), vasorelaxation was reduced. The data suggest that the NDDDP vasodilator action occurs through NO generation, with consequent activation of sGC, and activation of the BK_{Ca}, K_v and K_{IR} channels.

Key words: Organic nitrate. NDDDP. Nitric oxide. Mesenteric artery. Vasorelaxation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de relaxamento da célula muscular lisa vascular via produção de NO.	25
Figura 2 – Fórmula estrutural do NDDDP.	33
Figura 3 – Rota sintética para síntese da molécula em estudo.	35
Figura 4 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) 200 MHz do NDDDP.....	36
Figura 5 – Espectro de IV (ATR) do NDDDP.	36
Figura 6 – Representação esquemática da cuba pra órgãos isolados.	40
Figura 7 – Representação da viabilidade vascular e integridade do endotélio. A) Presença de endotélio funcional. B) Ausência do endotélio funcional.	41
Figura 8 – Representação do protocolo experimental para avaliação do efeito do NDDDP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, pré-contraídos com FEN (1 μM). A) Presença de endotélio funcional. B) Ausência do endotélio funcional.	42
Figura 9 – Representação do protocolo experimental para avaliação do efeito do NDDDP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos na ausência do endotélio funcional, pré-contraídos com solução despolarizante de KCl 60 mM.....	43
Figura 10 – Representação do protocolo experimental para avaliação do efeito do NDDDP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, pré-contraídos com FEN (1 μM), na presença da HDX (30 μM), ODQ (10 μM), TEA (3 mM), TEA (1 mM), 4-AP (1 mM), GLIB (10 μM) e BaCl_2 (30 μM).	44
Figura 11 – Representação esquemática do mecanismo de relaxamento da célula muscular lisa vascular provocado pelo NDDDP . BK_{Ca} : canais para potássio de alta condutância. Ca_v : canal de cálcio operado por voltagem. GMPc : monofosfato de guanosina cíclico. GTP: trifosfato de guanosina. K_{IR} : canais para potássio retificadores de influxo. K_v : canais para potássio dependente de voltagem. NDDDP: 2-nitrato-1,3-di(dodecanóxi)propano. NO: óxido nítrico. PKG: proteína cinase dependente de guanina. sGC: ciclase de guanilil solúvel.	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Composição da solução de Tyrode para artéria mesentérica superior de ratos.38

Quadro 2 – Composição da solução de Tyrode com KCl 60 mM para artéria mesentérica superior de ratos.38

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, na presença (vermelho) ou ausência (azul) do endotélio, pré-contráídos com FEN (1 μ M) (n = 8/8 animais para ambos os grupos). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0.05.47
- Gráfico 2** – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, pré-contráídos com FEN (1 μ M) (azul) ou pré-contráídos com KCl (60 mM) (vermelho) (n = 8/8 animais para ambos os grupos). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0.05.....49
- Gráfico 3** – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, pré-contráídos com FEN (1 μ M) na ausência (azul) e na presença de HDX (30 μ M) (vermelho) (n = 8/8 animais e 6/6 animais, respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0.05.50
- Gráfico 4** – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, com endotélio removido, pré-contráídos com FEN (1 μ M) na ausência (azul) e na presença de ODQ (10 μ M) (vermelho) (n = 8/8 animais e 6/6 animais, respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0.05. 51
- Gráfico 5** – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, com endotélio removido, pré-contráídos com FEN (1 μ M) na ausência (azul) e na presença de TEA (3 mM) (vermelho) (n = 8/8 animais para ambos os grupos). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0.05.....52
- Gráfico 6** – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, com endotélio removido, pré-contráídos com FEN (1 μ M) na ausência (azul) e na presença de TEA (1 mM) (verde) (n = 8/8 animais para ambos os grupos). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0.05..... 53
- Gráfico 7** – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, com endotélio removido, pré-contráídos com FEN (1 μ M) na ausência (azul) e na presença de 4 - AP (1 mM) (vinho) (n = 8/8 animais e 6/6 animais, respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0.05..... 53

Gráfico 8 – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, com endotélio removido, pré-contraídos com FEN (1 μ M) na ausência (azul) e na presença de BaCl₂ (30 μ M) (roxo) (n = 8/8 animais e 6/6 animais, respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0.05..... 54

Gráfico 9 – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, com endotélio removido, pré-contraídos com FEN (1 μ M) na ausência (azul) e na presença de GLIB (10 μ M) (laranja) (n = 8/8 animais e 6/6 animais, respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0.05. 55

Gráfico 10 – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, com endotélio removido, pré-contraídos com FEN (1 μ M) antes (azul) e após o tratamento com A) 3×10^{-5} M de NDDDP (verde) e B) 10^{-4} M de NDDDP (vinho) (n = 8/8 animais, 6/6 animais, e 6/6 animais, respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0.05.56

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

4 –AP	4-Aminopiridina
AC	Adenilciclase
ACh	Acetilolína
ALDH	Aldeído desidrogenase
ALDH-2	ALDH tipo 2 ou mitocondrial
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BK _{Ca}	Canais para K ⁺ sensíveis ao Ca ²⁺ de alta condutância
CaM	Calmodulina
Ca _v	Canais para Ca ²⁺ sensíveis à voltagem
Ca _v 1.2	Canais para Ca ²⁺ sensíveis à voltagem do tipo L 1.2
CDCI ₃	Clorofórmio deuterado
COX	Ciclooxigenase
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
E+	Com endotélio funcional
E-	Sem endotélio funcional
EC ₅₀	Concentração responsável por 50% do E _{máx}
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
E _{máx}	Efeito máximo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
e.p.m.	Erro padrão da média
ET-1	Endotelina 1

FEN	Fenilefrina
GLIB	Glibenclamida
GTN	Nitroglicerina
HDX	Hidroxicobalamina
HEX	Nitrato de ciclohexanol
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP ₃	1,4,5 – trifosfato de inositol
IP ₃ R	Receptor para IP ₃
ISDN	Dinitrato de isossorbida
ISMN	Mononitrato de isossorbida
IV	Espectroscopia na região do infravermelho
K _{ATP}	Canais para K ⁺ sensíveis ao ATP
K _{Ca}	Canais para K ⁺ sensíveis ao Ca ²⁺
KCl 60 mM	Solução de Tyrode com 60 mM de KCl
K _v	Canais para K ⁺ sensíveis à voltagem
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógenos
MLC	Cadeia leve da miosina
MLCK	Cinase da cadeia leve de miosina
MLCP	Fosfatase da cadeia leve de miosina
mtALDH	ALDH mitocondrial
n	número de experimentos realizados
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotamina e adenina
NDBP	2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano
NDHP	1,3-bis(hexiloxi)propano-2-ila
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NPS	Nitroprussiato de sódio

NTG	Nitroglicerina
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
pD ₂	Logaritmo negativo da EC ₅₀
PDEs	Fosfodiesterases
PETN	Pentaeritril tetranitrato
PGI ₂	Prostaciclina
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PLCβ	Fosfolipase C-β
PKG	Proteína cinase dependente de GMPc
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
ROCKS	Cinases dependentes do complexo RhoA-GTP
ROS	Espécies reativas de oxigênio
sGC	Ciclase de guanilil solúvel
SERCA	Bomba de Ca ²⁺ do retículo endoplasmático
SNP	Nitroprussiato de sódio
TEA	Tetraetilamônio
TRP	Potencial receptor transiente
T _x A ₂	Tromboxano A ₂

Observação: Abreviaturas e símbolos que porventura não constem neste trabalho, estão descritos no texto ou são convenções adotadas internacionalmente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Perspectiva histórica do uso de nitratos	19
2.2. História do óxido nítrico	21
2.3. Óxido nítrico: características e mecanismos de ação	23
2.4. Doadores de óxido nítrico	26
2.5. Nitratos orgânicos	27
3. HIPÓTESE	30
4. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivo Geral	31
4.2. Objetivos Específicos	31
5. JUSTIFICATIVA	32
6. MATERIAL E MÉTODOS	33
6.1. Substância teste - nitrato orgânico	33
6.2. Animais	37
6.3. Substâncias utilizadas	37
6.4. Avaliação dos efeitos do NDDDP em artéria mesentérica isolada de ratos normotensos	39
6.4.1. Preparação de anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos ..	39
6.4.2. Verificação da presença do endotélio funcional	40
6.4.3. Avaliação dos efeitos do NDDDP sobre o tecido vascular pré-contraído com FEN	41
6.4.4. Avaliação do efeito induzido pelo NDDDP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contraídos com KCl	42
6.4.5. Investigação da participação do NO no efeito vascular induzido pelo NDDDP	43
6.4.6. Avaliação da participação da via NO/GMPc no efeito induzido pelo NDDDP em anéis da artéria mesentérica cranial isolada de rato	44

6.4.7.	Avaliação da participação dos canais de K ⁺ no efeito vascular induzido pelo NDDDP	45
6.4.8.	Avaliação da participação dos subtipos de canais de potássio no efeito induzido pelo NDDDP	45
6.4.9.	Avaliação da atividade vasorrelaxante do NDDDP sobre tecido vascular previamente exposto ao composto	46
6.5.	Análise Estatística	46
7.	RESULTADOS	47
7.1.	Efeitos do NDDDP sobre os anéis de artéria mesentérica cranial superior isolada de ratos	47
7.1.1.	Avaliação do efeito vasodilatador do NDDDP em anéis arteriais com e sem endotélio funcional.....	47
7.1.2.	Efeitos do NDDDP sobre a contração induzida por um agente contracturante eletroquímico	48
7.1.3.	Participação do NO na resposta vasodilatadora do NDDDP	49
7.1.4.	Participação da enzima Guanilil Ciclase Solúvel (sGC) na resposta vasorrelaxante do NDDDP	50
7.1.5.	Participação dos canais para K ⁺ na resposta vasodilatadora do NDDDP	51
7.1.5.1.	Efeito do bloqueio dos canais de K ⁺ pelo TEA na resposta vasodilatadora do NDDDP	51
7.1.5.2.	Efeito de diferentes bloqueadores de canais para K ⁺ na resposta vasodilatadora do NDDDP	52
7.1.6.	Investigação do desenvolvimento de tolerância vascular pelo NDDDP	55
8.	Discussão	57
9.	Conclusão.....	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO: PATENTE	80

1. INTRODUÇÃO

Os nitratos desempenham um papel fundamental na clínica médica há aproximadamente 130 anos, sendo bastante utilizados no tratamento de desordens cardiovasculares (BERLIN, 1987; DIVAKARAN; LOSCALZO, 2017).

As doenças cardiovasculares apresentam patologia complexa e possuem, dentre suas diversas causas, um componente caracterizado por falhas das funções vasculares. A disfunção do relaxamento dependente do endotélio ocasiona uma elevação crônica e anormal da resistência vascular, predispondo ao surgimento de quadros hipertensivos (KANG et al., 2015). É importante ressaltar que a hipertensão está relacionada à disfunção endotelial, atribuída à redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) na parede vascular e à elevação do estresse oxidativo, acarretando em aumento crônico e anormal da resistência vascular (KANG et al., 2015; MENDES-JÚNIOR et al., 2015; PAULO et al., 2018).

O óxido nítrico (NO) corresponde ao principal fator de relaxamento derivado do endotélio e participa na regulação de vários processos fisiológicos como a homeostase vascular, transmissão neural, proliferação de células musculares lisas, agregação plaquetária e inflamação. Tal característica deve-se ao fato de ser um gás lábil que possui habilidade de se difundir livremente entre as membranas celulares (DIAS et al., 2011; KUMAR; SINGH; BHARDWAJ, 2017; MILLER; MEGSON, 2007; MÜNZEL; STEVEN; DAIBER, 2014).

A ação biológica do NO na musculatura vascular lisa é dada pela ativação da ciclase de guanilil solúvel (sGC) que leva ao aumento intracelular do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), o qual por sua vez ativa a proteína quinase G (PKG), mediando assim a vasodilatação. Além disto, o NO pode ativar diretamente os canais de potássio, incluindo os canais de potássio dependente de cálcio, cuja ação promove o relaxamento vascular (FÉLÉTOU, 2009; FRANÇA-SILVA et al., 2012a; MENDES-JÚNIOR et al., 2015; PAULO et al., 2018).

Após a descoberta e a demonstração da importância do NO endógeno na modulação da homeostase vascular, emergiu a ideia de que os nitratos poderiam ser utilizados como doadores de NO para compensar a função endotelial comprometida, algo característico nos pacientes com hipertensão arterial (MÜNZEL; STEVEN; DAIBER, 2014).

Os nitratos orgânicos correspondem à classe mais antiga de doadores de NO utilizados em condutas terapêuticas. Estes compostos são usados na prática clínica para o tratamento de angina, infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva crônica, edema pulmonar, hipertensão arterial, entre outras desordens decorrentes da deficiência da liberação de NO (DAIBER et al., 2008; LUNDBERG; GLADWIN; WEITZBERG, 2015; MILLER; MEGSON, 2007).

Considerando o potencial clínico dos doadores de NO, é necessário que sejam empregados esforços no desenvolvimento de novos compostos que inibam ou minimizem os efeitos indesejados relacionados às patologias cardiovasculares e que favoreçam uma melhor resposta terapêutica. Deste modo, o Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) do Centro de Biotecnologia (CBIotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) em parceria com o Laboratório de Pesquisas em Bioenergia e Síntese Orgânica (LPBS), do departamento de Química da UFPB, liderados pelos professores Valdir de Andrade Braga e Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, respectivamente, tem concentrado esforços, há aproximadamente uma década, na elaboração e caracterização de novos nitratos com vistas ao tratamento de patologias de ordem cardiovascular, com destaque para a hipertensão arterial.

Diante do exposto, o presente trabalho buscou caracterizar e elucidar os possíveis mecanismos de ação de um novo nitrato, o 2-nitrato-1,3-di(dodecanóxi)propano (NDDDP), em artéria mesentérica cranial isolada de rato normotenso.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Perspectiva histórica do uso de nitratos

A importância do uso de nitratos na prática médica data mais de um século. O principal agente utilizado neste manejo clínico corresponde à nitroglicerina (NTG). A NTG foi descoberta em 1847 pelo italiano Ascanio Sobrero em parceria com o francês Theophile-Jules Pelouze na cidade de Turin. Este composto foi obtido a partir da nitração de glicerol por meio de uma mistura de ácidos nítrico e sulfúrico. Sobrero observou que o composto recém-sintetizado era capaz de produzir intensa cefaleia por várias horas quando aplicado em pequena quantidade na língua (BERLIN, 1987; DIVAKARAN; LOSCALZO, 2017; MARSH; MARSH, 2000).

Previamente à descoberta da NTG, o químico francês Antoine Balard sintetizou o nitrito de amila em 1844. Em 1859 Frederick Guthrie, um químico inglês, ao investigar as ações do nitrito de amila observou o efeito deste sobre artérias do pescoço seguido de aumento da atividade cardíaca. Apesar destes achados, Frederik não havia percebido o efeito vasodilatador do nitrito de amila (DIVAKARAN; LOSCALZO, 2017; MARSH; MARSH, 2000).

A primeira investigação significativa dos efeitos do nitrito de amila foi conduzida por Benjamin Ward Richardson, cujos achados foram apresentados em conferências da Associação Britânica para o Avanço da Ciência entre 1863 e 1865 (FYE, 1986). Richardson observou o efeito dilatador do nitrito de amila em capilares de pé sapo (MARSH; MARSH, 2000).

A análise dos efeitos do nitrito de amila sugeridos nos estudos de Richardson foi realizada em humanos por Thomas Lauder Brunton em 1867 ao descrever a efetividade clínica deste composto em pacientes com *angina pectoris*. Na época, diversos tratamentos, incluindo sangramento terapêutico, estavam sendo usados para tratar angina, porém sem obter êxito. Neste estudo foi descrito o rubor facial como um sinal da dilatação arteriolar, e concomitante alívio da dor peitoral destes pacientes quando tratados com o nitrito de amila. Em 1903 o fisiologista francês Charles-Émile François-Franck postulava que o nitrito de amila era um vasodilatador coronariano (BERLIN, 1987; FYE, 1986; DIVAKARAN; LOSCALZO, 2017).

Em 1879, William Murrell descreveu os efeitos da administração lingual de gotas de solução de nitroglicerina a 1% em álcool em paciente com quadro clínico de *angina pectoris*. Os episódios dolorosos tiveram a frequência consideravelmente reduzida e quando ocorriam eram em menor intensidade (MURRELL, 1879). No ano de 1914, Brunton, que inicialmente pensava que a hipertensão ocasionava a angina, reconheceu que a ação dilatadora do nitrito de amila e da NTG sobre os vasos coronários esclareceria prontamente o alívio na *angina pectoris*, mesmo nos casos em que a pressão arterial fosse normal (FYE, 1986; DIVAKARAN; LOSCALZO, 2017).

Estudo seguinte realizado por Thomas Lewis em 1933 continuava a apontar o potencial dilatador dos nitratos sobre as artérias coronárias, com consequente incremento do suprimento de oxigênio ao miocárdio. Contudo, já havia críticas sobre a base de conhecimento estabelecida por Brunton, uma vez que os dados já indicavam que a *angina pectoris* não era decorrente apenas pela elevação aguda da pressão arterial, mas também por hipóxia miocárdica associada à coronariopatia em que a dor seria resultado de um desequilíbrio entre a demanda de oxigênio miocárdica e a oferta real (BERLIN, 1987). Mais adiante, Gorlin et al. (1959) indicaram que além do efeito dilatador primário sobre os vasos venosos de capacitância, os nitratos poderiam atuar, em menor grau, na área arteriolar, com consequente redução da demanda de oxigênio no miocárdio.

Durante a década de 1940 surge um novo nitrato orgânico, o dinitrato de isossorbida. Estudos conduzidos por Goldberg e Porjé indicaram que este composto fora capaz de reduzir a pressão sanguínea e promover a dilatação das artérias coronárias. Além disso, os testes clínicos em quadros hipertensivos mostraram resposta favorável. O efeito sobre a *angina pectoris* também foi promissor (GOLDBERG, 1948; BERLIN, 1987).

Além do dinitrato de isossorbida, outros nitratos como o tetranitrato de eritrol, hexanitrato de manitol e o tetranitrato de pentaeritrina foram introduzidos após 1940. Contudo, apenas o dinitrato de isossorbida e um de seus metabólitos ativos, o mononitrato-5 de isossorbida, ganharam considerável importância terapêutica (BRON et al., 1995).

Passados vários anos, é fato que a busca por novos nitratos para o manejo clínico de pacientes com alterações cardiovasculares continua sendo alvo de

estudos. Há aproximadamente uma década, o Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) em parceria com o Laboratório de Pesquisas em Bioenergia e Síntese Orgânica (LPBS) tem caracterizado e demonstrado a ação de alguns nitratos orgânicos, derivados da glicerina, com vistas ao tratamento de hipertensão arterial, como demonstrado nos estudos de França-Silva et al. (2012a), França-Silva et al. (2012b), Mendes-Júnior et al. (2015), Porpino et al. (2016), Zhugue et al. (2017) e Paulo et al. (2018). Os resultados obtidos por estes estudos têm mostrado respostas promissoras, sugerindo a ampliação do leque terapêutico no tratamento de patologias vasculares ao mesmo tempo em que pode favorecer o fomento do empreendedorismo da indústria farmacêutica.

2.2. História do Óxido Nítrico

O estabelecimento do uso de nitratos, especialmente a NTG, para o alívio da dor anginal ocorreu no final do século XIX. Entretanto, a descoberta dos mecanismos de ação se iniciou após 80 anos deste marco (MARSH; MARSH, 2000). Neste contexto, ganha destaque a descoberta do óxido nítrico.

Inicialmente, estudo experimental em ratos mostrou que os níveis teciduais de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) encontrava-se aumentado no miométrio em estado de contração sustentada. Observou-se que a NTG favorecia o relaxamento dos músculos despolarizados sem elevar significativamente os níveis de AMPC. Deste modo, foi sugerido que as mudanças nos níveis totais de AMPC do tecido não eram causados pela NTG. Entretanto, foi demonstrado que a NTG aumentou os níveis de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) no músculo despolarizado (DIAMOND; HOLMES, 1975). Posteriormente, estudo conduzido por Diamond e Blisard (1976) mostrou que uma dose de 200 μ M de NTG produziu relaxamento consistente de artérias femorais caninas pré-contraídas com fenilefrina (FEN) ao mesmo tempo em que elevou significativamente os níveis de GMPc.

Em 1977, Katsuki e Murrad mostraram que os ativadores da guanilil ciclase, nitrito de sódio, NTG e nitroprussiato de sódio aumentaram os níveis de GMPc e relaxaram o músculo liso traqueal de bovinos. Até então, o efeito do GMPc na atividade mecânica do músculo liso ainda não estava claro. Entretanto, sequencialmente, este mesmo grupo observou que o NO, gerado a partir do nitrito

de sódio (NaNO_2) na presença do de sulfato de ferro II (FeSO_4) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) ou obtido comercialmente, ativava significativamente a enzima guanilato ciclase do músculo pulmonar e traqueal. Deste modo, foi proposto que diversos nitrocompostos e substâncias capazes de gerar NO em incubações estimulavam a atividade da guanilato ciclase mediante mecanismo semelhante, porém indefinido (ARNOLD et al., 1977).

Mesmo que o mecanismo preciso de ativação desta enzima por estes agentes ainda fosse obscuro, à época, foi postulado que esta ativação poderia ser decorrente da formação de NO ou outro material reativo, visto que o NO também potencializou a atividade da guanilato ciclase (KATSUKI et al., 1977).

Estudo conduzido por Furchgott e Zawadski (1980), em protocolo experimental com anéis arteriais de aorta torácica de coelhos, apontou a importância do endotélio no relaxamento dos vasos sanguíneos induzidos por acetilcolina. Foi observada a perda de relaxamento produzido pela acetilcolina (ACh) quando havia o atrito não intencional da superfície íntima de anéis de aorta torácica de coelhos contra superfícies estranhas durante a preparação experimental. No momento em que ocorria a prevenção deste atrito durante a preparação dos tecidos, estes sempre relaxavam em resposta a ACh. Também foi sugerido que a ACh, ao estimular os receptores muscarínicos presentes nas células endoteliais, estimulava também a liberação de substâncias que induzia o relaxamento do músculo liso vascular. Além disso, foi proposto posteriormente por este mesmo grupo de pesquisadores, que o relaxamento do músculo liso vascular produzido pela bradicinina e outras moléculas que atuam sobre endotélio era mediado por uma substância que foi denominada de fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) (CHERRY et al., 1982). Apesar disto, o vínculo com o NO neste processo ainda não estava claro (MARSH; MARSH, 2000).

No final da década de 1980 Louis Ignarro e Salvador Moncada apontaram que o EDRF é o NO. Após inúmeros experimentos Ignarro e colaboradores sugeriram que o EDRF liberado a partir dos vasos sanguíneos possuía propriedades química e biológica semelhantes ao NO (IGNARRO et al., 1987a; IGNARRO et al., 1987b). Moncada e colaboradores, em estudo de cultura de células, concluíram que o NO liberado das células endoteliais não diferia do EDRF em termos de atividade biológica, estabilidade e suscetibilidade à substâncias inibidoras e potencializadoras. Portanto, foi sugerido que o EDRF e o NO eram idênticos (MONCADA et al., 1987).

2.3. Óxido Nítrico: características e mecanismos de ação

Em seu estado puro e sob condições normais de temperatura e pressão, o NO é um gás e apresenta solubilidade moderada em água, e, desta forma, quando presente em sistemas biológicos tende a se concentrar em ambientes lipofílicos. Por se tratar de um radical livre, apresenta uma alta reatividade (meia vida de 3 a 10 segundos), especialmente frente a outras moléculas paramagnéticas como o oxigênio molecular (O_2) e o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (BARRETO; CORREIA., 2005; BONAVENTURA et al., 2006; HARRISON; BATES, 1993; KUMAR; SINGH; BHARDWAJ, 2017).

Descrito como uma molécula ubíqua, o NO tem a capacidade de se difundir livremente pelas membranas celulares. Diferentemente de outras moléculas sinalizadoras, sua biossíntese é ativamente modulada para fornecer níveis adequados, uma vez que não pode ser regulada por processos de reabsorção, armazenamento e liberação (KUMAR; SINGH; BHARDWAJ, 2017).

Sabe-se que o NO é uma substância humoral lábil liberada a partir do endotélio vascular que possui um papel preponderante na modulação de vários processos fisiológicos como a manutenção da pressão sanguínea do sistema cardiovascular, estimulação do sistema imunológico, regulação da transmissão neural cerebral, agregação plaquetária, adesão de leucócitos, angiogênese e trombose, desenvolvimento de aterosclerose, secreção de insulina, tônus das vias aéreas, aprendizagem e memória, função sexual masculina, citotoxicidade e citoproteção, inflamação e gastroproteção (DIAS et al., 2011; KUMAR; SINGH; BHARDWAJ, 2017; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1989).

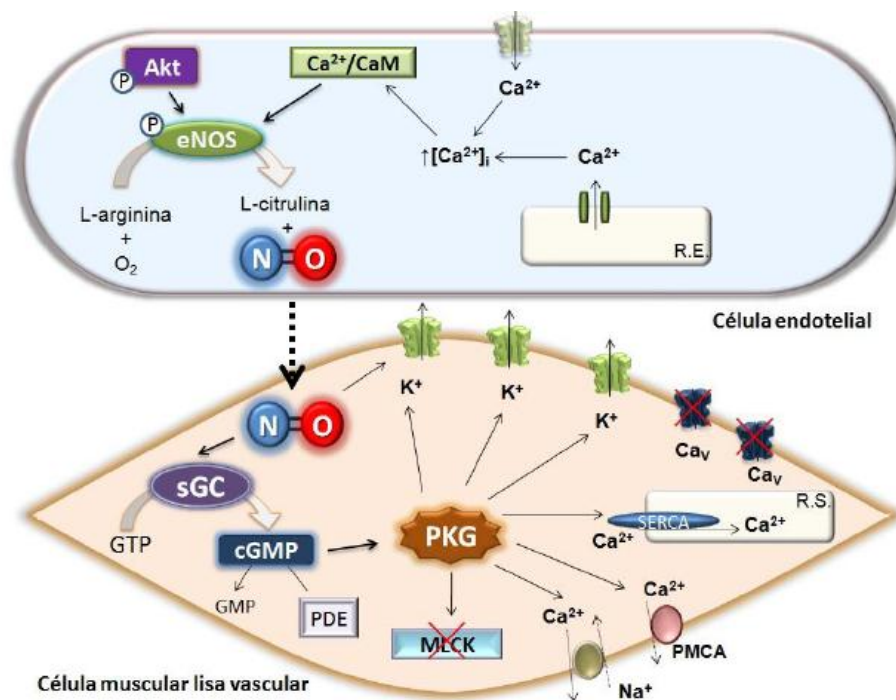
A síntese do NO no organismo é mediada por três isoformas diferentes da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que são: NOS induzível (iNOS), NOS neuronal (nNOS) e a NOS endotelial (eNOS). A iNOS é expressa em diversos tipos celulares em virtude de estímulos pró-inflamatórios e citocinas, A nNOS é expressa nos neurônios, podendo estar presente em outros tipos celulares como os cardiomiócitos. Já a eNOS é expressa nas células endoteliais, porém, pode ser encontrada em cardiomiócitos, plaquetas e alguns neurônios cerebrais (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; MACHADO et al., 2013; SERAFIM, et al., 2012). Nas células endoteliais, a eNOS catalisa a oxidação do radical guanidino da L-

arginina gerando L-citrulina e NO. A liberação do NO acarreta, por sua vez, relaxamento do musculo liso vascular. Além disto, há o envolvimento da ACh que ativa os receptores muscarínicos na membrana da célula endotelial e estimula a proteína G e a fosfolipase C, formando o trifosfato de inositol. Esse segundo mensageiro libera cálcio do retículo endoplasmático, com consequente reação com a calmodulina (CaM). Após a formação do complexo cálcio-calmodulina, a eNOS é estimulada, formando NO a partir da L-arginina (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; MACHADO, 2013; RAMESHRAD et al., 2016).

Ao se difundir para a célula muscular lisa, o NO ativa a guanilil ciclase e aumenta a concentração de GMPc, gerando redução da concentração de cálcio na célula muscular lisa e relaxamento vascular. De modo concomitante, a via da prostaciclina (PGI_2), sintetizada pela ciclooxygenase (COX), ativa a adenilciclase (AC) e aumenta a concentração de AMPc, o que leva à redução da concentração de cálcio intracelular nas células dos músculos lisos vasculares (GIRARDI; GIRARDI; PETERS, 2006; RAMESHRAD et al., 2016). Uma vez sintetizado, o GMPc age em inúmeros alvos como: fosfodiesterases (PDEs), canais iônicos, proteínas cinases dependentes de GMPc (PKG) e proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (FRANÇA SILVA et al., 2012a; MACHADO, 2013).

O efeito vasorrelaxante promovido pela PKG relaciona-se aos seguintes mecanismos: 1) inativação da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK); 2) ativação da bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA), acelerando a recaptção deste íon para os estoques intracelulares; 3) ativação da bomba de Ca^{2+} da membrana plasmática (PMCA), contribuindo para o efluxo deste íon; 4) ativação do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que permuta o Ca^{2+} intracelular por Na^+ extracelular; e 5) abertura dos canais para K^+ da membrana celular, produzindo hiperpolarização nas células musculares lisas com fechamento dos canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem. Estes eventos resultam na diminuição do cálcio intracelular e consequente relaxamento vascular (FRANÇA-SILVA et al., 2012a; MACHADO, 2013; MENDES-JÚNIOR et al., 2015) (Figura 1).

Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de relaxamento da célula muscular lisa vascular via produção de NO.



Fonte: MACHADO, 2013.

As ações periféricas desempenhadas pelo NO, determinantes na regulação da pressão arterial e do tônus vascular, revelam o papel fundamental desta molécula sinalizadora no sistema cardiovascular. Desta maneira, a diminuição da liberação de NO ocasionada por comprometimento no mecanismo de síntese e/ou sua excessiva degradação por estresse oxidativo, possui um papel importante no desenvolvimento da disfunção endotelial. Esta, por sua vez, é caracterizada pela diminuição da vasodilatação dependente do endotélio e pela redução da capacidade das células endoteliais em suprimir a inflamação, trombose e estresse oxidativo, sendo, deste modo, elemento central no desenvolvimento de múltiplas doenças cardiovasculares como a hipertensão e insuficiência cardíaca (PEPINE, 2009; RAMESHRAD et al., 2016; SCATENA et al., 2010; SU, 2015; VERAS et al., 2013).

Diante disto, terapias que focam no aumento dos níveis de NO apresentam grande aplicabilidade no tratamento de doenças cardiovasculares (MENDES-JÚNIOR et al., 2015; PAULO et al., 2018). Nesse sentido, uma nova abordagem

terapêutica com o desenvolvimento de substâncias que são doadoras de NO que sejam capazes de mimetizar o seu papel fisiológico no organismo torna-se relevante.

2.4. Doadores de óxido nítrico

Como abordado previamente, a disfunção endotelial acarreta em diminuição dos níveis de NO, interferindo nos processos biológicos mediados por esta molécula sinalizadora. Tal condição predispõe ao surgimento de várias doenças, dentre as quais se inserem as cardiovasculares, como a hipertensão arterial. Deste modo, a substituição ou o aumento do NO endógeno por doadores de NO exógeno fornece uma base para o vasto campo da terapia farmacológica na medicina vascular (FEELISCH, 1998; IGNARRO; NAPOLI; LOSCALZO, 2002; LUNARDI; DA SILVA; BENDHACK, 2009).

Os doadores de NO são substâncias que mimetizam o papel do NO endógeno quando aplicados em sistemas biológicos. Portanto, o NO é o princípio farmacológico de uma série de medicamentos denominados coletivamente de nitrovasodilatadores, que são usados clinicamente para controlar a crise hipertensiva, proteger os pacientes de ataques de *angina pectoris* e diminuir a sobrecarga cardíaca durante a insuficiência cardíaca aguda (BATES et al., 1991; FEELISCH, 1998; LUNARDI; DA SILVA; BENDHACK, 2009; QUEIROZ et al., 2014).

Dentre os doadores de óxido nítrico orgânicos e inorgânicos, já foram reconhecidos mais de 105 compostos a exemplo do nitroprussiato de sódio (NPS), nitroglicerina (NTG), dinitrato de isossorbida, 5-mononitrato de isossorbida, os diazeniodiolatos (dietilaminoNONOato; DEA/NO), os nitrosotióis (S-nitrosoglutathione; GSNO), os S-nitrosotióis e as oximas (*trans*-cinamaldeídooxima; E-CAOX) (KIELBIK et al., 2013; MARVASI et al., 2015; MILLER; MEGSON, 2007; QUEIROZ et al., 2014; SCATENA et al., 2010).

Embora a maioria dos doadores de NO de alguma forma produzam atividade que simula uma resposta endógena de NO quando aplicados em sistemas biológicos, as vias que conduzem à formação de NO diferem significativamente entre classes de compostos individuais, assim como suas reatividades químicas. Alguns compostos requerem catálise enzimática, enquanto outros produzem NO não enzimaticamente. Alguns doadores de NO necessitam de interação com tióis para

liberar NO, alguns precisam sofrer redução, outros oxidação. As questões são ainda mais complicadas pela susceptibilidade específica do composto a alterações no pH, oxigênio, luz e temperatura (o que é importante não apenas para as condições do experimento real, mas também para a preparação de soluções estoque), e pela formação de diferentes produtos que surgem durante a decomposição ou metabolismo. Em alguns casos, os metabólitos cujas ações biológicas podem ser pouco caracterizadas ou mesmo desconhecidas, são produzidos em quantidades superiores às do NO (FEELISCH, 1998).

Apesar das inúmeras substâncias doadoras de NO descobertas, duas classes de fármacos apresentam relevância clínica como doadores de NO: os nitratos orgânicos, como o NTG e os nitratos inorgânicos, a exemplo do nitroprussiato de sódio (NPS) (MILLER; MEGSON, 2007; QUEIROZ et al., 2014). Além dos efeitos benéficos no sistema cardiovascular, estes compostos possuem algumas restrições em suas aplicações clínicas em virtude de efeitos colaterais indesejáveis. O NTG tem a ação atenuada durante o tratamento contínuo e promove tolerância a outros nitratos, um fenômeno denominado de tolerância cruzada. Por outro lado, o NPS possui uso limitado devido ao desenvolvimento de tolerância e a alta toxicidade gerada pela liberação de cianeto (DE LIMA et al., 2014; IGNARRO; NAPOLI; LOSCALZO, 2002; KOSMICKI, 2009; LAURSEN et al., 1996; QUEIROZ et al., 2014; ZHUGE et al., 2017)

Com o uso prolongado, as ações dos nitratos orgânicos tornam-se pouco perceptíveis. Até o momento, a única forma confiável para evitar esta limitação é incorporar um intervalo livre de nitrato no regime terapêutico, o que pode ser débil em algumas formas de *angina pectoris* (MILLER; MEGSON, 2007; SCATENA et al., 2010). Sendo assim, há um amplo interesse na síntese e caracterização de novos nitratos orgânicos, uma vez que os doadores de NO clinicamente mais utilizados apresentam tal barreira.

2.5. Nitratos Orgânicos

Os nitratos orgânicos são ésteres de ácido nítrico de álcoois mono ou poliidroxilados, representando a classe mais antiga de doadores de NO que foram aplicados clinicamente. Alguns dos representantes desta classe são a NTG, dinitrato

de isossorbida, mononitrato-5 de isossorbida, e tetranitrato de pentaeritritol (PORPINO; TRAVASSOS, 2016; WANG et al., 2002). Em geral, eles podem ser obtidos pela reação de esterificação dos álcoois correspondentes com ácido nítrico ou pela substituição do haleto de alquila com nitrato de prata (BAKER; HEGGS, 1955; WANG et al., 2002). Todos estes compostos apresentam estrutura molecular semelhante, tendo a ligação éster nitrato ($R-O-NO_2$) como característica essencial. Este grupo químico proporciona propriedades singulares a esta classe de compostos, com base na liberação de NO (PORPINO; TRAVASSOS, 2016; SCATENA et al., 2010).

Tem sido sugerido que múltiplas vias contribuem para a formação de NO a partir de nitratos orgânicos *in vivo*. No entanto, o mecanismo metabólico ainda é pouco compreendido. Diferentes sistemas enzimáticos foram propostos, como o complexo citocromo P450, a glutathione S-transferase, xantina oxidase e outras atividades dependentes de glutathione e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Já pela via não enzimática, sugere-se o envolvimento de moléculas endógenas contendo grupamentos sulfidrilas, em que a redução se dá via espécies do tipo tiol, que se recombina formando dissulfetos (BARRETO; CORREIA, 2005; BRYAN; BIAN; MURAD, 2009; FEELISCH, 1998).

A principal ação farmacológica dessas moléculas é ativar principalmente a guanilil ciclase, mediante a liberação de NO, que aumenta o nível celular do GMPc, ativa a PKG, a qual fosforila e ativa a fosfatase da cadeia leve da miosina. No músculo liso, a liberação de NO provoca uma redução da fosforilação da cadeia leve da miosina, uma redução da concentração de Ca^{2+} intracelular e, portanto, relaxamento muscular (SCATENA et al., 2010).

Os nitratos clássicos são usados na clínica desde a introdução da NTG para o tratamento da *angina pectoris* em meados de 1870. Além deste uso, existem outras aplicações clínicas dos nitratos orgânicos para o tratamento do infarto agudo do miocárdio, falha cardíaca congestiva, hipertensão e fissuras anais (BARRETO; CORREIA, 2005; BRYAN; BIAN; MURAD, 2009; THATCHER; BENNETT; REYNOLDS, 2005).

Apesar do seu amplo leque terapêutico, os nitratos orgânicos apresentam algumas limitações. Os potenciais efeitos colaterais dos nitratos orgânicos

dependem da abrupta vasodilatação sistêmica (cefaleia, hipotensão) e o início da tolerância ao nitrato durante a administração crônica (PORPINO; TRAVASSOS, 2016; SCATENA et al., 2010).

Os mecanismos da tolerância aos nitratos permanecem imprecisos. Alguns estudos sugeriram que este problema parece resultar de eventos a nível sistêmico, como ativação neuro-hormonal e expansão do volume intravascular ou alterações vasculares, como inibição da biotransformação de nitrato, dessensibilização da ciclase de guanilil solúvel (sGC) e PKG, aumento da atividade PDE e desacoplamento da NOS (PORPINO; TRAVASSOS, 2016; MÜNZEL; DAIBER; GORI, 2011; WANG et al., 2002).

Neste contexto, ponderando o papel destes compostos na terapêutica das doenças cardiovasculares e a necessidade de solucionar os efeitos indesejáveis, a descoberta e a síntese de novos nitratos orgânicos tornam-se importante para o tratamento das desordens cardiovasculares. Esses novos compostos devem ser capazes de liberar NO para os sistemas biológicos, possuir cinética de liberação adequada, desenvolver melhores propriedades farmacológicas e serem de fácil preparo, representando um desafio para toda a comunidade acadêmica envolvida no estudo do desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças cardiovasculares, a exemplo da hipertensão arterial.

3. HIPÓTESE

O 2-nitrato-1,3-di(dodecanóxi)propano (NDDDP) atua como doador de óxido nítrico (NO) nos vasos sanguíneos periféricos, contribuindo para aumentar a biodisponibilidade do NO e melhorar a função endotelial.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Caracterizar os efeitos farmacológicos do NDDDP sobre a função vascular de ratos normotensos, esclarecendo os possíveis mecanismos de ação envolvidos na resposta apresentada pelo composto, utilizando estudos *in vitro*.

4.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do NDDDP em artéria mesentérica cranial isolada de ratos normotensos;

Avaliar o envolvimento do endotélio vascular no efeito induzido pelo composto;

Avaliar a participação do NO no efeito induzido pelo composto;

Avaliar a participação da via NO/GMPc/PKG no efeito induzido pelo composto;

Avaliar o envolvimento dos canais para K^+ no efeito induzido pelo composto;

Avaliar o desenvolvimento de tolerância pelo composto em estudo.

5. JUSTIFICATIVA

Há aproximadamente uma década, o LACONCHA e o LPBS têm realizado estudos de caracterização dos efeitos farmacológicos de novos nitratos orgânicos, abordando os possíveis efeitos benéficos no tratamento de desordens cardiovasculares, com destaque para a hipertensão arterial. Deste modo, alguns nitratos já tiveram suas ações caracterizadas ao longo deste tempo.

Dentro do escopo dos nitratos estudados estão o 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP), o nitrato de ciclohexanol (HEX) e o 1,3-bis(hexiloxi)propano-2-ila (NDHP).

Os mecanismos de ação do NDBP foram descritos por França-Silva et al. (2012a). França-Silva et al. (2012b) também descreveram a ação do NDBP sobre a função autonômica de ratos espontaneamente hipertensos. Os efeitos do NDBP também foram verificados sobre o sistema cardiovascular de ratos (QUEIROZ, et al., 2014) e sobre a progressão da hipertensão arterial mediada pela angiotensina II (PORPINO et al., 2016).

A caracterização dos efeitos induzidos pelo HEX, bem como sua ação anti-hipertensiva foi demonstrada por Mendes-Júnior et al. (2015). Já os efeitos e ação anti-hipertensiva do NDHP foi descrita por Paulo et al. (2018). É importante ressaltar que previamente aos achados de Paulo e colaboradores, Zhugue et al. (2017) demonstraram a formação de NO a partir do NDHP mediada pela ação enzimática da xantina oxiredutase.

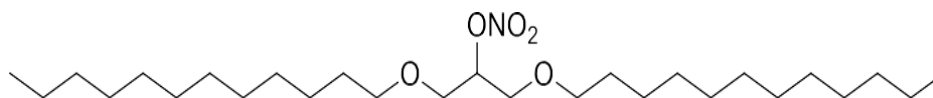
Uma vez que estes agentes já tiverem seus efeitos descritos, faz-se necessária a continuação de uma das linhas de pesquisa do LACONCHA que é o desenvolvimento e a caracterização de novos nitratos orgânicos obtidos a partir da glicerina como potenciais doadores de NO, com perspectiva de uso para o tratamento da hipertensão arterial. Deste modo, buscou-se analisar os efeitos do NDDDP.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Substância teste – nitrato orgânico

O 2-nitrato-1,3-di(dodecanóxi)propano (NDDDP) foi obtido por síntese orgânica em parceria com o Laboratório de Pesquisas em Bioenergia e Síntese Orgânica (LPBS), pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O NDDDP ($C_{27}H_{55}NO_5$) apresenta aspecto físico amarelado e viscoso, massa molar de 473,41 g/mol, rendimento de 67,7% e a seguinte análise elementar: C, 68.45%; H, 11.70%; N, 2.96%; O, 16.89% (Figura 2).

Figura 2 – Fórmula estrutural do NDDDP.



Fonte: BRANDÃO, 2017.

A síntese do novo nitrato orgânico, 2-nitrato-1,3-di(dodecanóxi)propano (NDDDP), foi realizada de acordo com procedimentos descritos na literatura e otimizados por este grupo de pesquisa, em cinco etapas como apresentado no (Figura 3).

O 1,3-dicloropropan-2-ol (3) foi obtido a partir da reação da glicerina (1) com o $HCl_{(g)}$. Uma amostra de 200g de glicerina foi seca em estufa a $120^{\circ}C$ por 12h para eliminar totalmente a umidade. Em seguida, uma alíquota de 100 g de glicerina seca (80,5 mL, 0,98 mol) foi transferida para um balão de 250 mL de três bocas. O sistema foi aquecido a $100 - 110^{\circ}C$ e acoplado a um sistema tubular protegido contra umidade, através do qual foi borbulhado o cloreto de hidrogênio ($HCl_{(g)}$), gerado pelo gotejamento de ácido sulfúrico concentrado sobre uma massa pastosa de cloreto de sódio e ácido clorídrico (12 N). Para este procedimento foram utilizados 100 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%), 100g de cloreto de sódio e

168 mL de ácido clorídrico (36,5%, 200g, 2 mol). A reação foi encerrada quando não mais foi observada a absorção de gás pela glicerina. Verificou-se um aumento de 25% no volume do material contido no balão reacional. Para purificação do composto (3) realizou-se destilação fracionada. O 1,3-dicloropropan-2-ol foi obtido com 70% de rendimento.

Na segunda etapa foi preparado o alcóxido de sódio (4) em balão contendo 1 mol do álcool correspondente ao qual foi adicionado 2 mol de sódio metálico finamente cortado. A mistura foi mantida sob agitação até total consumo do sódio adicionado. O alcóxido obtido apresentou elevada reatividade química e foi utilizado logo após a sua preparação, não passando por processo de purificação.

A síntese do oxialcool (5) foi realizada utilizando um balão de fundo redondo contendo o composto (4) obtido, ao qual foi acrescentado, gota a gota, 1 mol de (3). O sistema foi mantido sob agitação constante por 6h. O composto (5) foi purificado por destilação fracionada, sendo obtido com 83% de rendimento. A pureza foi verificada por placa cromatográfica e a caracterização em espectro de RMN ^1H .

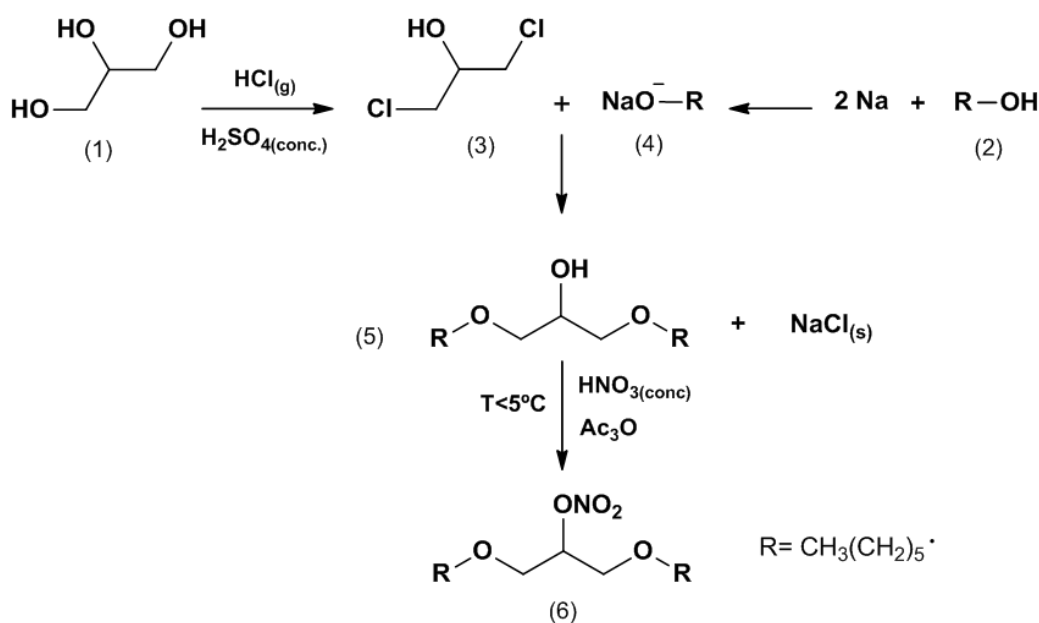
Para obtenção do nitrato requerido (6), utilizou-se um balão de 100 mL de fundo redondo onde foi acrescida uma alíquota de 0,5 mol do composto (5) e 0,6 mol de anidrido acético. O sistema foi colocado em banho de gelo com salmoura para controle de temperatura. Em seguida acrescentou-se ácido nítrico fumegante lentamente (pois a reação é extremamente exotérmica) para a obtenção do nitrato NDDDP (6). Após a adição completa do ácido nítrico, o sistema foi mantido sob agitação constante por 30 minutos e a temperatura foi controlada a temperatura inferior a 5°C. A reação foi interrompida com 100 mL de água destilada gelada e imediatamente neutralizada com bicarbonato de sódio. Ocorreu formação de duas fases no sistema. A mistura foi transferida para funil de separação. A fase aquosa foi separada da fase orgânica. Utilizou-se diclometano para extração do composto (6) da fase orgânica e sulfato de sódio anidro para secagem. A mistura foi filtrada e o diclometano foi posteriormente retirado por rotaevaporação. O composto (6) foi armazenado em frasco tipo âmbar. O composto (6) foi analisado logo após a síntese e 30 dias após, quando foi encaminhado para os testes de atividade biológica, não apresentando alterações em sua molécula.

A estrutura do composto final (6) e dos produtos intermediários foram confirmadas pelas análises espectroscópicas de IV e RMN- ^1H . Tais técnicas foram

suficientes para confirmar a formação do NDDDP (6), pois, este tipo de molécula apresenta inúmeros sinais bem característicos. No espectro de RMN-¹H do NDDDP foi observado um quinteto correspondente ao hidrogênio metínico (H-14) desblindado por efeito do grupo nitrato (-ONO₂) em 5,2 a 5,3 ppm e singlete de elevada intensidade, típico de longas cadeias carbônicas alifáticas, correspondente aos 36 hidrogênios metilênicos (Figura 4). O espectro de IV confirmou a presença do grupo nitrato, pelos picos característicos, em 1633 cm⁻¹, correspondente a deformação axial assimétrica da ligação N–O, em 1276 cm⁻¹, seu desdobramento simétrico e em 852 cm⁻¹ o pico de deformação axial do sistema π da ligação N=O (Figura 5).

Para os experimentos o NDDDP foi dissolvido em uma mistura de água destilada e cremophor e diluído em concentrações desejadas com água destilada.

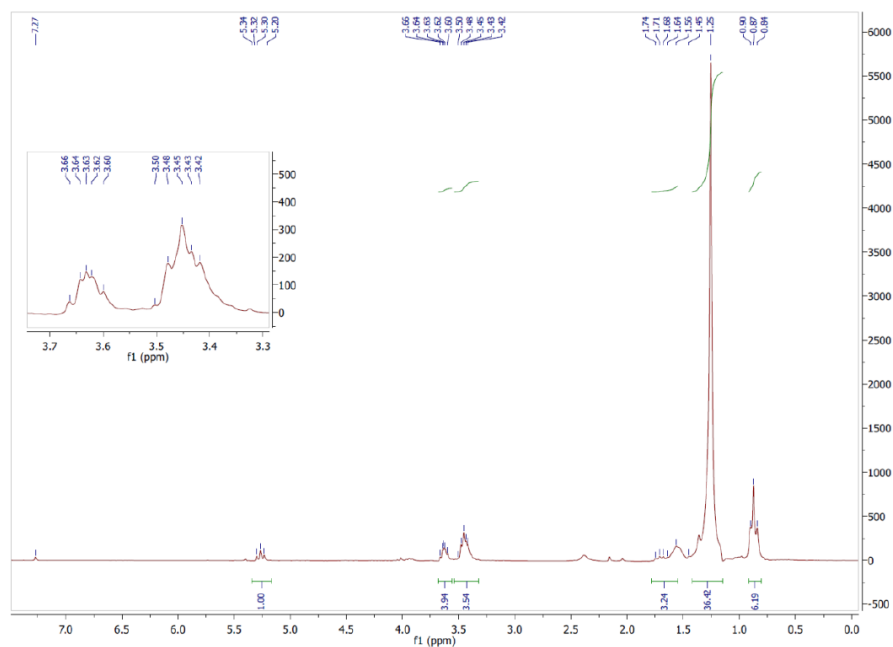
Figura 3 – Rota sintética para a síntese da molécula em estudo.



Sendo $\text{R} = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11} \cdot$

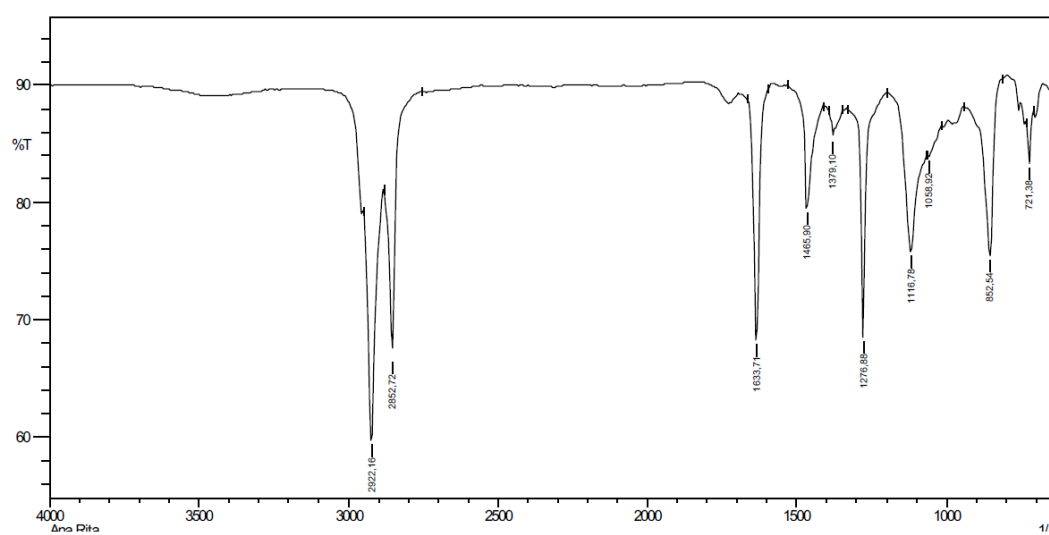
Fonte: BRANDÃO, 2017.

Figura 4 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) do NDDDP.



Fonte: BRANDÃO, 2017.

Figura 5 – Espectro de IV (ATR) do NDDDP.



Fonte: BRANDÃO, 2017.

6.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Ratus norvegicus*) machos albinos, pesando entre 250-300g, com idade entre 12 e 14 semanas e provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia (IPeFarm/UFPB). Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno e submetidos a 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 que possuem ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) controladas e constantes, sendo também submetidos, diariamente, a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo a fase clara das 6:00 às 18:00 horas.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas e princípios éticos de experimentação em animais de laboratório estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após serem aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB (CEUA nº 9898210918).

6.3. Substâncias utilizadas

Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas e ferramentas farmacológicas: Cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN); cloridrato de acetilcolina (ACh); hidroxibalamina (HDX); 1 H-[1,2,4] oxadiazólo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ); glibenclamida (GLIB); 4-Aminopiridina (4-AP) e cloreto de bário (BaCl_2), todas obtidas da Sigma-Aldrich®. Todas as substâncias foram dissolvidas em água destilada, exceto a GLIB e o ODQ que foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em água destilada, de modo a serem obtidas as concentrações desejadas.

Nos protocolos foram utilizadas soluções nutritivas (pH = 7,4) aeradas com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) e mantidas a 37° C. Para o preparo da solução nutritiva de Tyrode foram utilizados os seguintes sais (Quadro 1): cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$),

bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato de sódio mono-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e fosfato de sódio (NaH_2PO_4), todos obtidos da Sigma-Aldrich®. Em outra série de experimentos foi utilizada a solução de tampão fosfato salino, conhecida como PBS, composta de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de potássio (KH_2PO_4) e fosfato dissódico (Na_2HPO_4), todos obtidos da Sigma-Aldrich®.

Quadro 1 – Composição da solução de Tyrode para artéria mesentérica cranial de ratos.

Sais	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,05
NaHCO_3	10,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,42
Glicose	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

Na solução de Tyrode com 60 mM de KCl foi realizada uma substituição equimolar do Na^+ pelo K^+ , ajustando isosmoticamente a solução, de acordo com os dados abaixo (Quadro 2):

Quadro 2 – Composição da solução de Tyrode com KCl 60 mM para artéria mesentérica superior de ratos.

Sais	Concentração (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,05
NaHCO_3	10,0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,42
Glicose	5,6

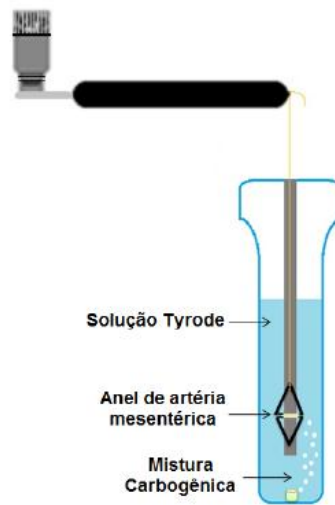
Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

6.4. Avaliação dos efeitos do NDDDP em artéria mesentérica cranial isolada de ratos normotensos

6.4.1. Preparação de anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos

Os animais foram eutanasiados por decapitação, com o auxílio de uma guilhotina, seguido de secção dos vasos cervicais. 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 O₂ e 5 % de CO₂ (carbogênio), para manter o pH relativamente constante entre 7,2 e 7,4. Posteriormente, os anéis foram suspensos verticalmente por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (PowerLab™, AD Instruments, MA, EUA) (Figura 6) e submetidos à tensão basal de aproximadamente 0,75 g, durante 60 minutos para estabilização (FRANÇA-SILVA et al., 2012a). 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).

Figura 6 – Representação esquemática da cuba pra órgãos isolados.

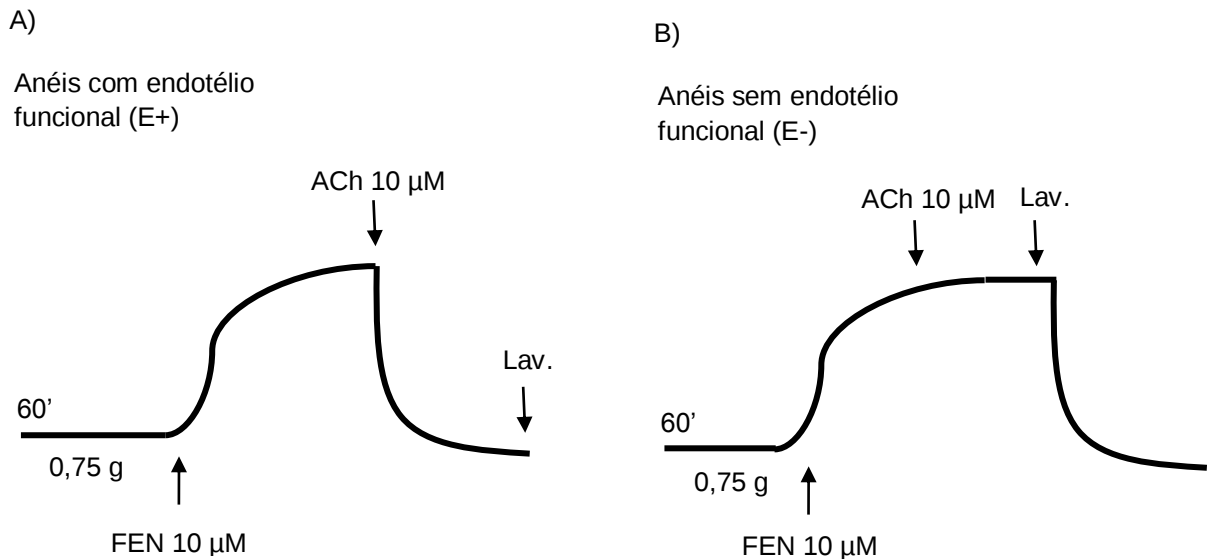


Fonte: MACHADO, 2013.

6.4.2. Verificação da presença do endotélio funcional

Após o período de estabilização, foi induzida uma contração com FEN na concentração de 10 μM . A integridade do endotélio foi verificada através do relaxamento dos anéis pré-contraídos após adição de 10 μM de 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, sendo então considerados sem endotélio funcional (E-). Já os anéis íntegros e dotados de endotélio deveriam apresentar relaxamento igual ou superior a 80 % sobre a pré-contração com FEN (em relação à força máxima da contração inicial), sendo considerados, portanto, com endotélio funcional (E+). Anéis com relaxamento inferior a 80% e superior a 10% foram descartados (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980) (Figura 7). As soluções nutritivas presentes na cuba foram trocadas para a retirada de todas as substâncias e em seguida foram realizados os demais protocolos experimentais.

Figura 7 – Representação da viabilidade vascular e integridade do endotélio. A) Presença de endotélio funcional. B) Ausência do endotélio funcional.

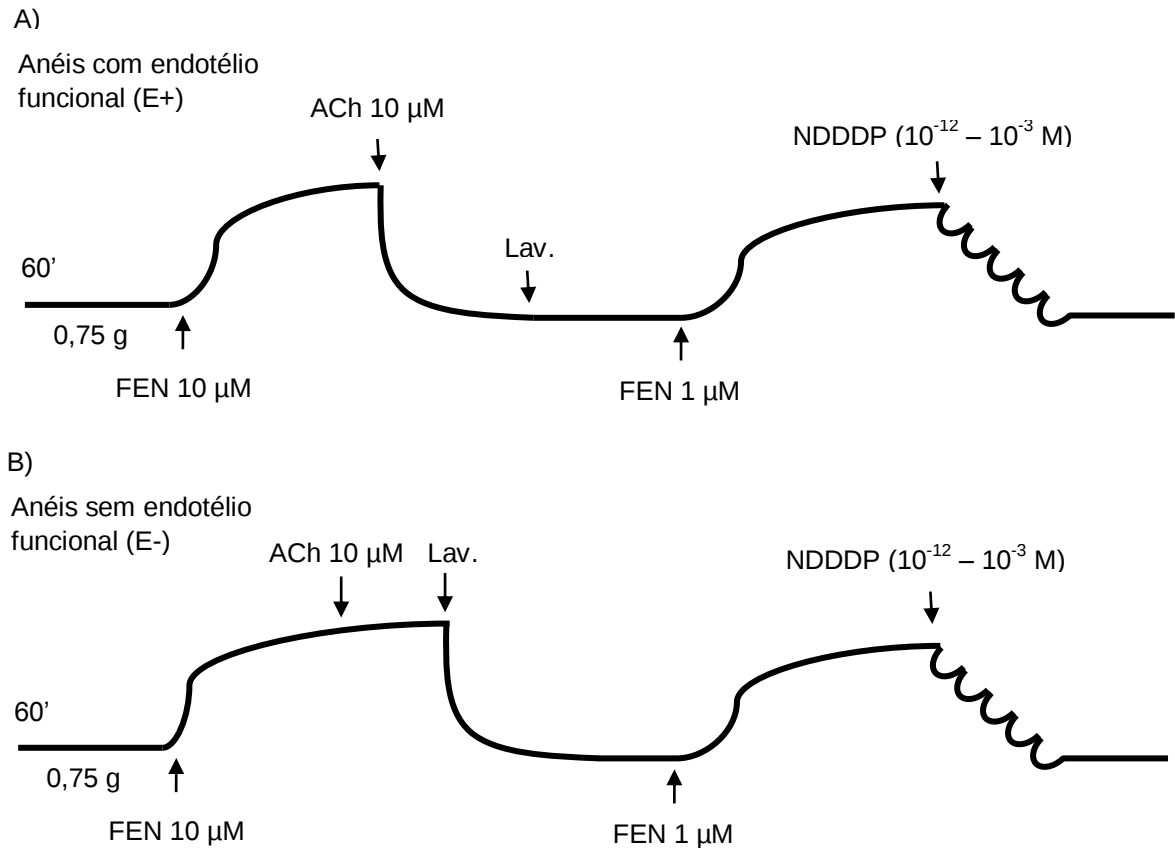


Fonte: RAMOS NETO, 2020.

6.4.3. Avaliação dos efeitos do NDDDP sobre tecido vascular pré-contraído com FEN

Após um período de estabilização de 60 minutos, confirmação da viabilidade do órgão e posterior verificação do endotélio funcional, foi induzida uma contração com FEN (1 µM), agonista $\alpha 1$ -adrenérgico seletivo. Logo após a obtenção do platô, no componente tônico desta contração, concentrações crescentes do NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M), de maneira cumulativa, foram aplicadas para a obtenção de uma curva concentração-resposta, tanto em anéis E+ e E-. O relaxamento foi expresso como porcentagem de relaxamento em relação à contração produzida pela FEN. Após a obtenção das curvas concentração-resposta, foi avaliado o efeito relaxante da droga e calculadas a potência, dada pelos valores de pD_2 (logaritmo negativo de base 10 da CE_{50}), e a eficácia da droga, dada pelos valores do efeito máximo ($E_{máx}$) das curvas individuais na presença e na ausência do endotélio funcional (Figura 8).

Figura 8 – Representação do protocolo experimental para avaliação do efeito do NDDDP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, pré-contráídos com FEN (1 μ M). A) Presença de endotélio funcional. B) Ausência do endotélio funcional.



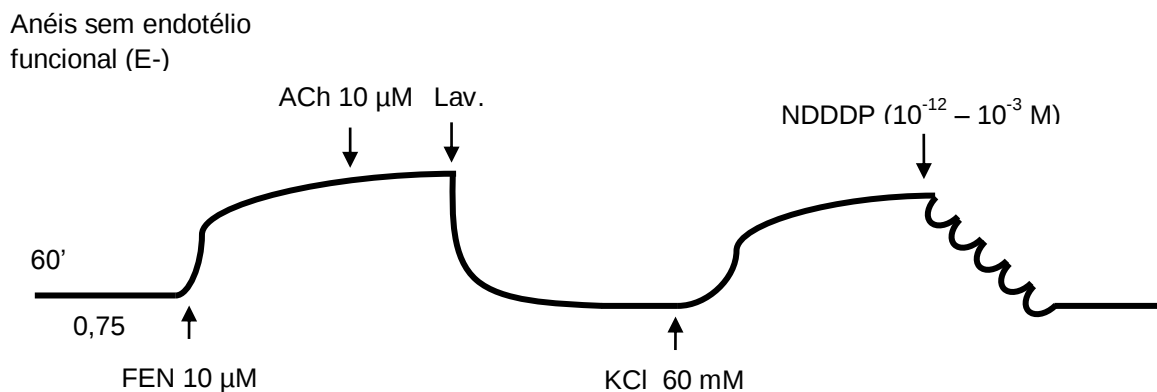
Fonte: RAMOS NETO, 2020.

6.4.4. Avaliação do efeito induzido pelo NDDDP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato pré-contráídos 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. Esta solução permaneceu até o final do experimento. O princípio deste protocolo baseia-se no bloqueio ao efluxo de íons K^+ , capaz de gerar despolarização e induzir contração por aumento do influxo de cálcio extracelular através de canais para cálcio sensíveis a voltagem (Ca_v) 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 (ROCKS),

aumentando a sensibilidade ao Ca^{2+} e mantendo o tônus do músculo liso vascular (VAN HOVE et al. 2009; KRAVTSOV et al., 2003). Na fase tônica da contração induzida por KCl 60 mM foi adicionado à cuba o NDDDP. O efeito deste composto foi registrado e comparado com o obtido nos anéis sem endotélio vascular (Figura 9).

Figura 9 – Representação do protocolo experimental para avaliação do efeito do NDDDP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos na ausência do endotélio funcional, pré-contraídos com solução despolarizante de KCl 60 mM.

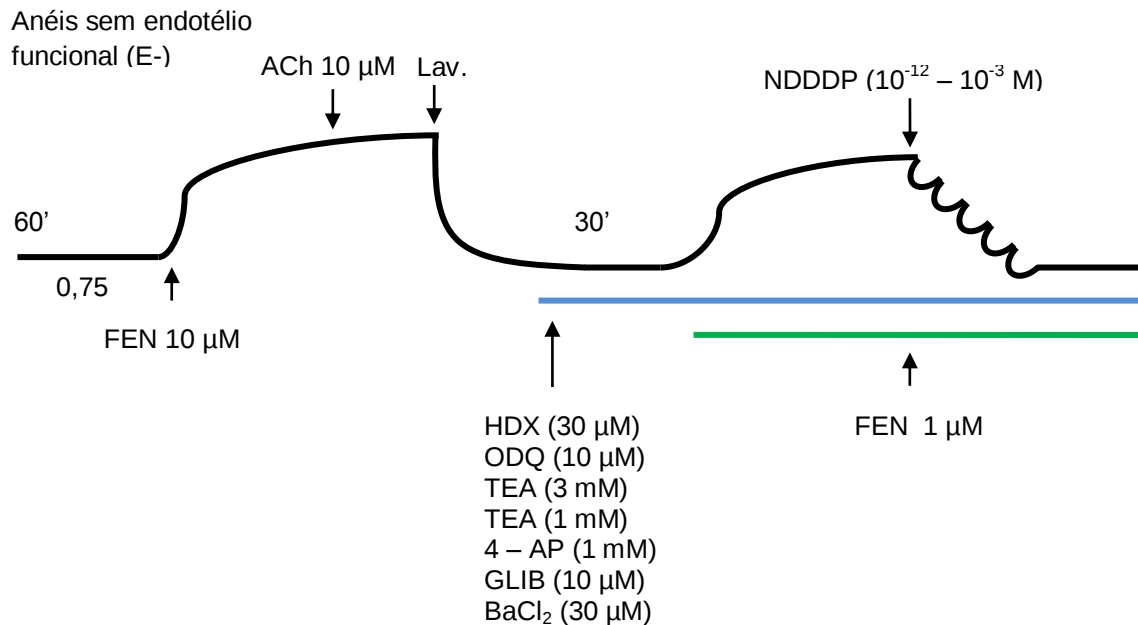


Fonte: RAMOS NETO, 2020.

6.4.5. Investigação da participação do NO no efeito vascular induzido pelo NDDDP

Com o objetivo de investigar se a resposta do NDDDP envolve a participação do NO, foi utilizado um sequestrador de NO radicalar extracelular, a hidroxicobalamina (HDX 30 µM) (ELLIS, et al., 2001). Após o período de estabilização e verificação da remoção do endotélio funcional, a HDX (30 µM) foi adicionada aos anéis incubados durante 30 minutos. Em seguida, foi induzida uma nova contração de FEN (1 µM) e durante o platô da contração, foram adicionadas concentrações crescentes do NDDDP ($10^{-12} - 10^{-3}$ M), de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta. A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento em relação à contração produzida pela FEN. A eficácia do vasorrelaxamento do NDDDP foi avaliada por meio do valor do $E_{\text{máx}}$. (Figura 10).

Figura 10 – Representação do protocolo experimental para avaliação do efeito do NDDDP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, pré-contráídos com FEN (1 μ M), na presença da HDX (30 μ M), ODQ (10 μ M), TEA (3 mM), TEA (1mM), 4-AP (1 mM), GLIB (10 μ M) e BaCl₂ (30 μ M).



Fonte: RAMOS NETO, 2020.

6.4.6. Avaliação da participação da via do NO/GMPc no efeito induzido pelo NDDDP em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato

No intuito de investigar a participação da via NO/sGC/PKG na resposta desenvolvida pelo NDDDP, foi utilizado o ODQ (10 μ M), um inibidor da enzima sGC. As preparações de anéis de artéria mesentérica cranial isolada de rato, E-, foram incubadas no banho por 30 minutos com ODQ (10 μ M) (GARTHWAITE, CHARLES e CHESS-WILLIAMMS, 1988). Após este período, uma contração tônica com FEN (1 μ M) foi obtida, seguida da adição de concentrações crescentes e cumulativas do NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) 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 E- (controle) (Figura 10).

6.4.7. Avaliação da participação dos canais de K^+ no efeito vascular induzido pelo NDDDP

Após a verificação do endotélio funcional e confirmação de sua remoção, as preparações dos anéis foram incubadas com tetraetilamônio (TEA) na concentração de 3 mM, concentração que bloqueia não seletivamente os canais para K^+ , 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 (1 μ M) e posteriormente foi obtida uma curva concentração-resposta para o NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) na presença do TEA. A potência e a eficácia do efeito vasorrelaxante derivado do NDDDP foram avaliadas por comparação dos valores de pD_2 e $E_{máx}$, respectivamente, na ausência e na presença de TEA (3 mM) (Figura 10).

6.4.8. Verificação da participação dos subtipos de canais para potássio no efeito induzido pelo NDDDP.

Nesta série de experimentos, foi realizada a investigação de qual subtipo de canal de K^+ estaria envolvido no efeito vascular induzido pelo NDDDP. Para tanto, anéis E- foram incubados separadamente com: TEA (1 mM), que nesta concentração se torna um bloqueador seletivo dos canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de alta condutância (BK_{Ca}) (JACKSON, 2000); Glibenclamida (GLIB) (1 μ M), um bloqueador seletivo para canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (JACKSON, 2000); 4 – Aminopirirdina (4-AP) (1 mM), um bloqueador seletivo para canais de K^+ sensíveis a voltagem (K_v) (LANGTON et al., 1991) e Cloreto de Bário ($BaCl_2$) (30 μ M), bloqueador dos canais K_{IR} (ADARAMOYE; MEDEIROS, 2009). Decorridos 30 minutos de incubação com os bloqueadores dos subtipos de canais para K^+ , foi induzida uma nova contração tônica com FEN (1 μ M) e, em seguida, obteve-se uma curva concentração-resposta para o NDDDP com concentrações crescentes e cumulativas (10^{-12} – 10^{-3} M). As respostas obtidas após a adição dos bloqueadores foram comparadas com as obtidas na ausência dos mesmos (controle) (Figura 10).

6.4.9. Avaliação da atividade vasorrelaxante do NDDDP sobre tecido vascular previamente exposto ao composto

O protocolo de avaliação da tolerância induzida pelo NDDDP foi realizado de acordo com França-Silva (2012c). Após um período de estabilização por 60 minutos seguida da verificação do endotélio funcional, o NDDDP (10^{-4} M e 3×10^{-5} M, concentrações capazes de gerar um efeito máximo e submáximo de 100% de relaxamento, respectivamente) foi adicionado ao banho e incubado por 30 minutos. Em seguida, os anéis foram lavados e submetidos a um segundo momento de estabilização, idêntico ao realizado previamente. Logo após, induziu-se uma contração com FEN (1 μ M) e concentrações crescentes do NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) foram aplicadas de forma cumulativa para obtenção de uma curva concentração resposta. O relaxamento provocado pelo NDDDP em anéis pré-incubados com o composto foi comparado com o relaxamento dos anéis que não sofreram exposição prévia ao mesmo.

6.5. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. As análises estatísticas foram feitas através do teste *t* Student não-pareado, para análise de diferença entre as médias, e ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni. As curvas foram obtidas por regressão não-linear, por meio da qual se obteve também a CE_{50} . O valor de $E_{Máx}$ correspondeu a média percentual de relaxamento máximo do NDDDP para cada condição estudada. Os dados foram analisados com a utilização do software GraphPad Prisma 6.0, San Diego, CA, EUA e o nível de significância foi de $p < 0.05$.

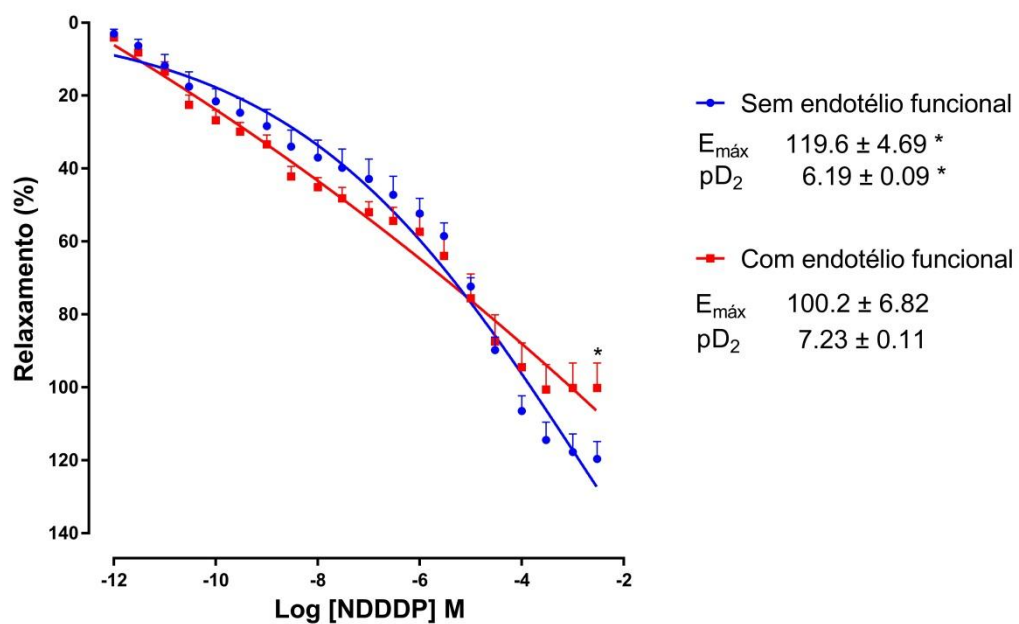
7. RESULTADOS

7.1. EFEITOS DO NDDDP SOBRE ANÉIS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA CRANIAL ISOLADA DE RATOS

7.1.1. Avaliação do efeito vasodilatador do NDDDP em anéis arteriais com e sem endotélio funcional

O NDDDP promoveu vasorrelaxamento em anéis com endotélio intacto ($E_{\text{máx}} = 100 \pm 6.82\%$; $pD_2 = 7.23 \pm 0.11\%$; $n = 8/8$ animais) pré-contráídos com FEN ($1 \mu\text{M}$), de maneira dependente de concentração (10^{-12} a 10^{-3} M). A remoção mecânica do endotélio alterou a potência e o percentual da resposta máxima de modo significativo do composto ($E_{\text{máx}} = 119.6 \pm 4.69\%$; $pD_2 = 6.19 \pm 0.09 \%$; $n = 8/8$ animais, $p < 0.05$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, na presença (vermelho) ou ausência (azul) do endotélio, pré-contráídos com FEN ($1 \mu\text{M}$) ($n = 8/8$ animais para ambos os grupos). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0.05$.



Fonte: RAMOS NETO, 2020.

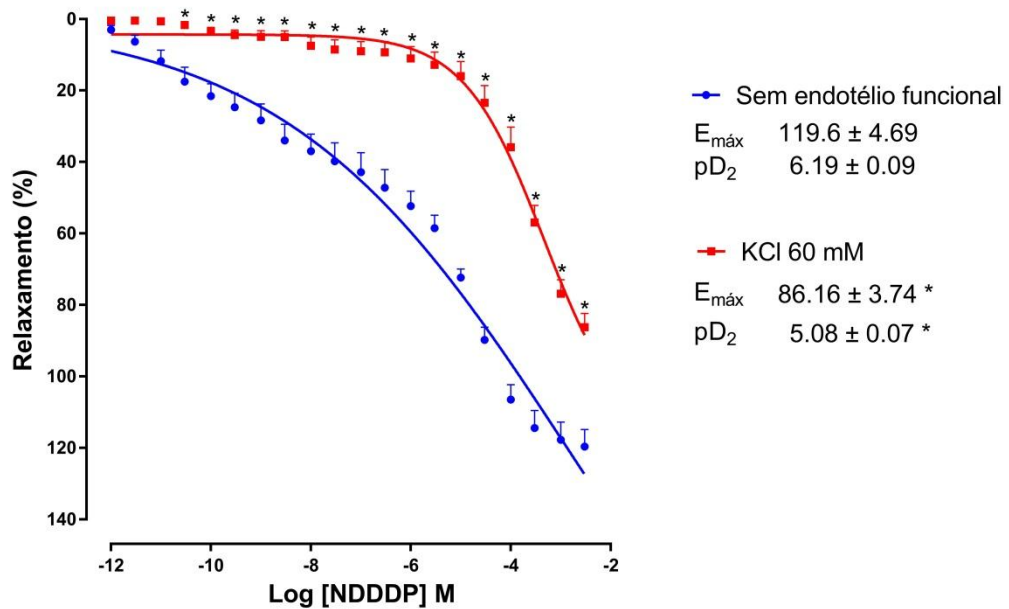
Após a adição da última concentração do NDDDP e de contínuas lavagens, os anéis responderam a uma nova estimulação por FEN (10 μ M), com a magnitude de contração similar à observada na investigação da viabilidade do tecido. O tempo de estabilização da resposta observada entre as concentrações do composto foi de aproximadamente 5 minutos, com a duração do vasorrelaxamento total de aproximadamente 100 minutos.

Em todos os experimentos seguintes foram usados anéis desprovidos de endotélio vascular para analisar o mecanismo de ação relacionado ao efeito vasorrelaxante do NDDDP.

7.1.2. Efeito do NDDDP sobre a contração induzida por um agente contracturante eletroquímico

Em anéis mesentéricos ao pré-contraídos com uma solução despolarizante de KCl 60mM, a resposta vasorrelaxante provocada pela adição cumulativa do NDDDP foi atenuada significativamente ($E_{\text{máx}} = 86.16 \pm 3.74\%$, $p < 0.05$; $pD_2 = 5.08 \pm 0.07\%$, $p < 0.05$; $n = 8/8$ animais), quando comparada ao efeito do nitrato orgânico sobre anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com FEN ($E_{\text{máx}} = 119.6 \pm 4.69\%$; $pD_2 = 6.19 \pm 0.09 \%$; $n = 8/8$ animais) (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, pré-contraídos com FEN ($1 \mu\text{M}$) (azul) ou pré-contraídos com KCl (60 mM) (vermelho) ($n = 8/8$ animais para ambos os grupos). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0.05$.

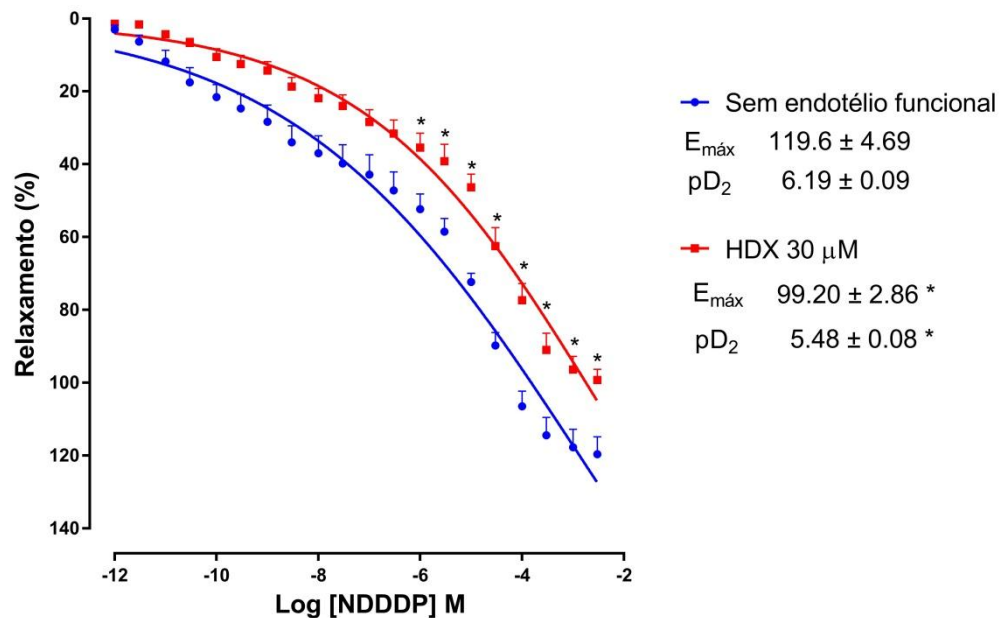


Fonte: RAMOS NETO, 2020.

7.1.3. Participação do NO na resposta vasodilatadora do NDDDP

A resposta relaxante do NDDDP foi minimizada, de modo significativo, após os anéis mesentéricos terem sido pré-incubados com um sequestrador extracelular de NO, a HDX ($E_{\text{máx}} = 99.20 \pm 2.86\%$, $p < 0.05$; $pD_2 = 5.48 \pm 0.08\%$, $p < 0.05$; $n = 6/6$ animais) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, pré-contraídos com FEN (1 μ M) na ausência (azul) e na presença de HDX (30 μ M) (vermelho) (n = 8/8 animais e 6/6 animais, respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0.05.

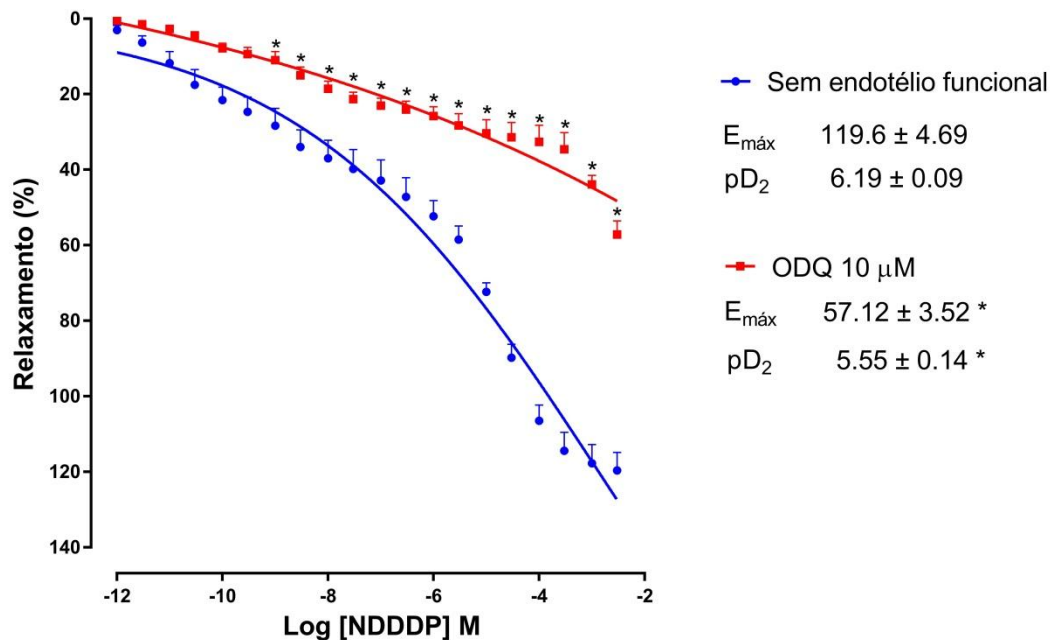


Fonte: RAMOS NETO, 2020.

7.1.4. Participação da enzima Guanilil Ciclase solúvel (sGC) na resposta vasorrelaxante do NDDDP

A resposta vasorrelaxante do NDDDP foi amplamente reduzida quando os anéis mesentéricos foram pré-incubados com ODQ (10 μ M), um inibidor da sGC, ($E_{\text{máx}}$ = $57.12 \pm 3.52\%$, $p < 0.05$; pD_2 = $5.55 \pm 0.14\%$, $p < 0.05$; n = 6/6 animais), com deslocamento da curva para a direita e considerável redução do efeito máximo, quando comparado ao grupo controle ($E_{\text{máx}}$ = $119.6 \pm 4.69\%$; pD_2 = $6.19 \pm 0.09\%$; n = 8/8 animais) (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, com endotélio removido, pré-contráidos com FEN (1 μ M) na ausência (azul) e na presença de ODQ (10 μ M) (vermelho) (n = 8/8 animais e 6/6 animais, respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0.05.



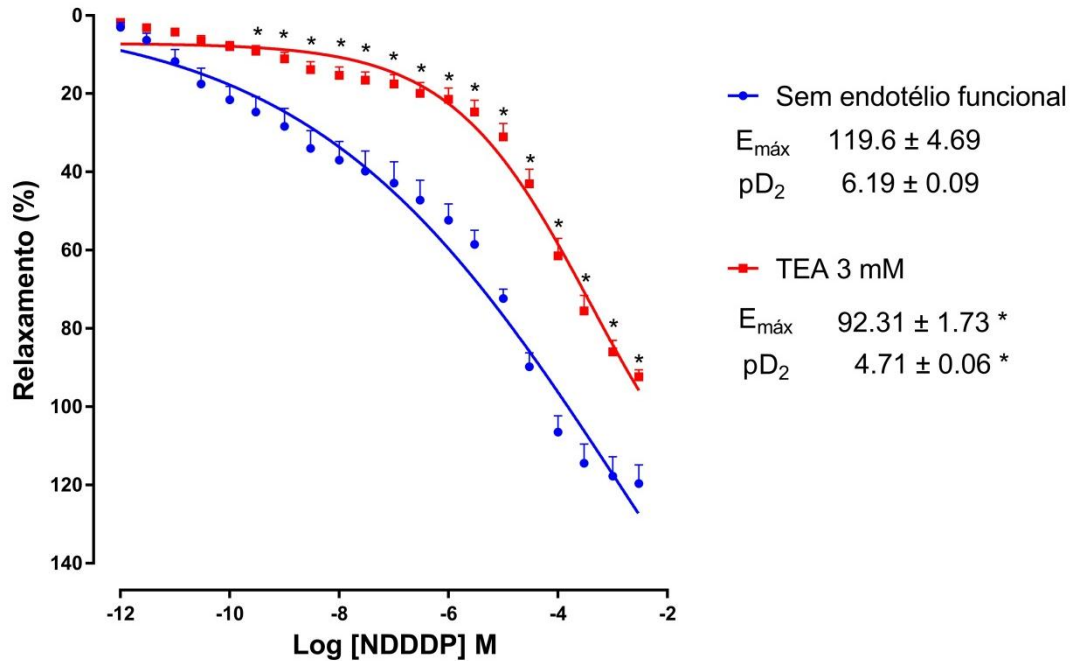
Fonte: RAMOS NETO, 2020.

7.1.5. Participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora do NDDDP

7.1.5.1. Efeito do bloqueio dos canais de K^+ pelo TEA na resposta vasodilatadora do NDDDP

Na presença de TEA (3 mM), concentração que bloqueia não seletivamente os canais de potássio, o efeito vasorrelaxante induzido pelo NDDDP foi significativamente atenuado ($E_{máx} = 92.31 \pm 1.73\%$, $p < 0.05$; $pD_2 = 4.71 \pm 0.06\%$, $p < 0.05$; n = 6/6 animais) (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, com endotélio removido, pré-contraindidos com FEN (1 μ M) na ausência (azul) e na presença de TEA (3 mM) (vermelho) (n = 8/8 animais para ambos os grupos). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0.05.



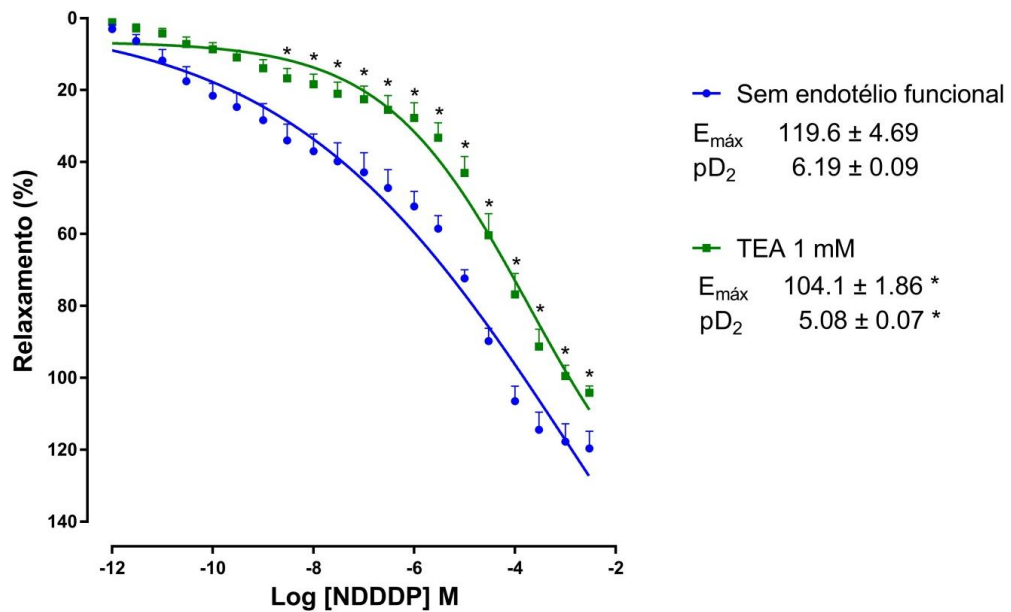
Fonte: RAMOS NETO, 2020.

7.1.5.2. Efeito de diferentes bloqueadores de canais para K^+ na resposta vasodilatadora do NDDDP

A resposta vasorrelaxante induzida pelas concentrações crescentes da substância foi significativamente atenuada quando os anéis arteriais foram pré-incubados com TEA (1 mM), concentração seletiva para o bloqueio dos canais para potássio de grande condutância, ($E_{máx} = 104.1 \pm 1.86\%$, $p < 0.05$; $pD_2 = 5.08 \pm 0.07\%$, $p < 0.05$; n = 6/6 animais) (Gráfico 6).

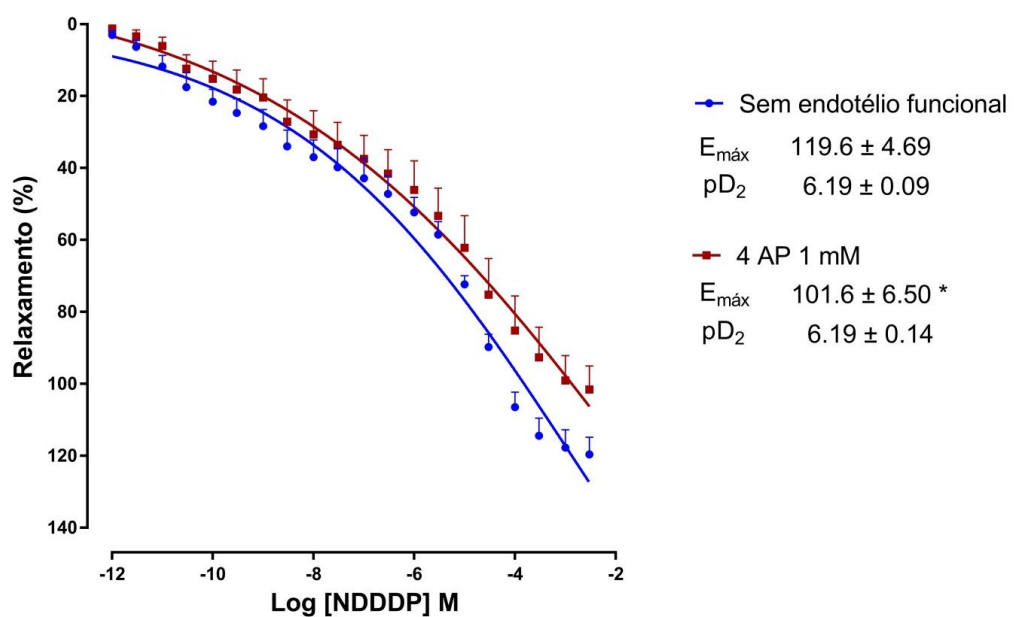
Quando os anéis foram incubados com 4-AP (1 mM), um bloqueador seletivo para os canais de potássio sensíveis a voltagem, a curva dose-reposta apresentou diferença na eficácia ($E_{máx} = 101.6 \pm 6.50\%$, $p < 0.05$; n = 6/6 animais), mas sem alteração na potência do composto ($pD_2 = 6.19 \pm 0.14\%$, $p = 0.97$; n = 6/6 animais) (Gráfico 7). Resposta semelhante foi observada quando do bloqueio específico para os canais de potássio retificadores de influxo com $BaCl_2$ (30 μ M) ($E_{máx} = 92.22 \pm 8.86\%$, $p < 0.05$; $pD_2 = 6.03 \pm 0.11\%$, $p = 0.30$; n = 6/6 animais) (Gráficos 8).

Gráfico 6 – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, com endotélio removido, pré-contráídos com FEN (1 μ M) na ausência (azul) e na presença de TEA (1 mM) (verde) (n = 8/8 animais para ambos os grupos). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0.05.



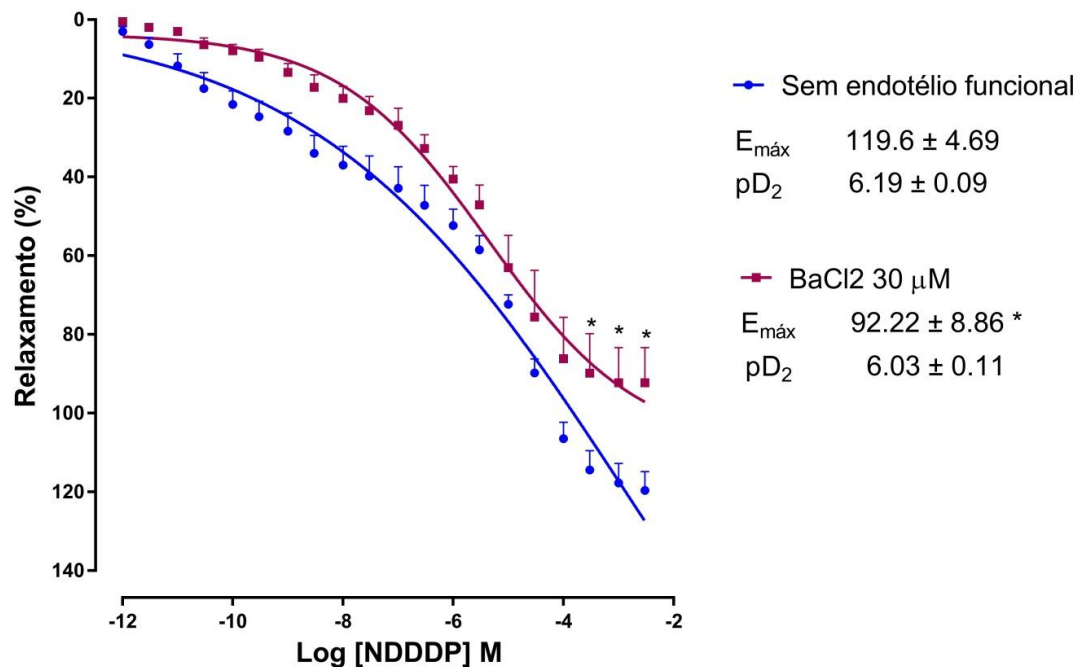
Fonte: RAMOS NETO, 2020.

Gráfico 7 – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, com endotélio removido, pré-contráídos com FEN (1 μ M) na ausência (azul) e na presença de 4 - AP (1mM) (vinho) (n = 8/8 animais e 6/6 animais, respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0.05.



Fonte: RAMOS NETO, 2020.

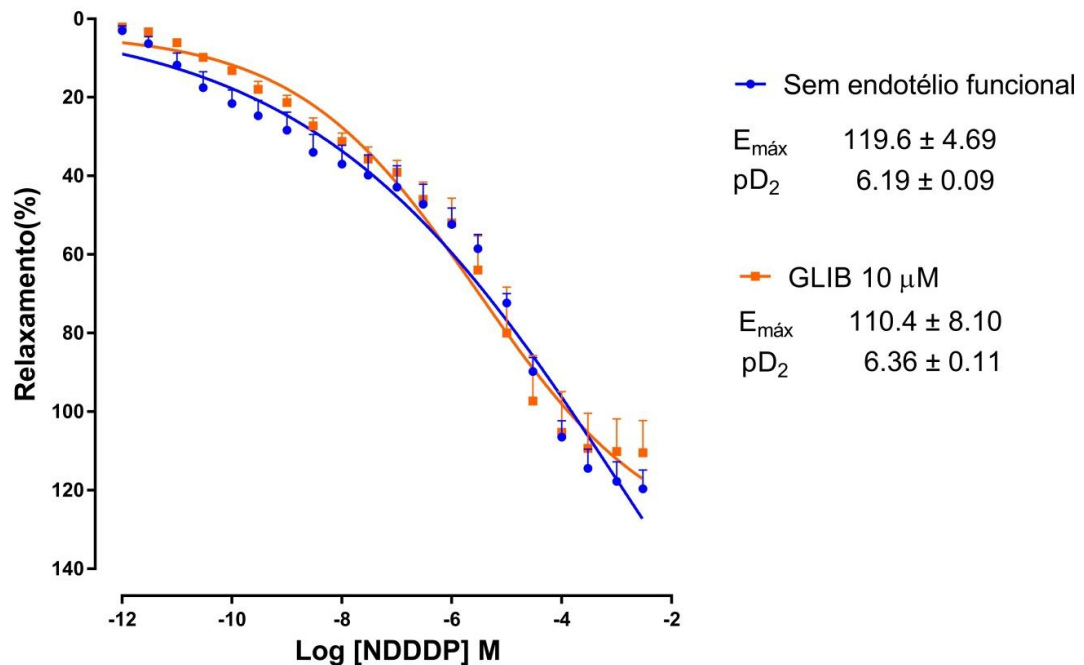
Gráfico 8 – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, com endotélio removido, pré-contráidos com FEN ($1 \mu\text{M}$) na ausência (azul) e na presença de BaCl_2 ($30 \mu\text{M}$) (roxo) ($n = 8/8$ animais e $6/6$ animais, respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0.05$.



Fonte: RAMOS NETO, 2020.

Na presença do bloqueio específico para os canais de potássio sensíveis ao ATP com GLIB ($1 \mu\text{M}$) não houve alteração na resposta vasorrelaxante produzida pelo NDDDP em comparação ao grupo controle ($E_{\text{máx}} = 110.4 \pm 8.10\%$, $p = 0.31$; $pD_2 = 6.36 \pm 0.11\%$, $p = 0.26$; $n = 6/6$ animais) (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, com endotélio removido, pré-contráidos com FEN ($1 \mu\text{M}$) na ausência (azul) e na presença de GLIB ($10 \mu\text{M}$) (laranja) ($n = 8/8$ animais e $6/6$ animais, respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0.05$.

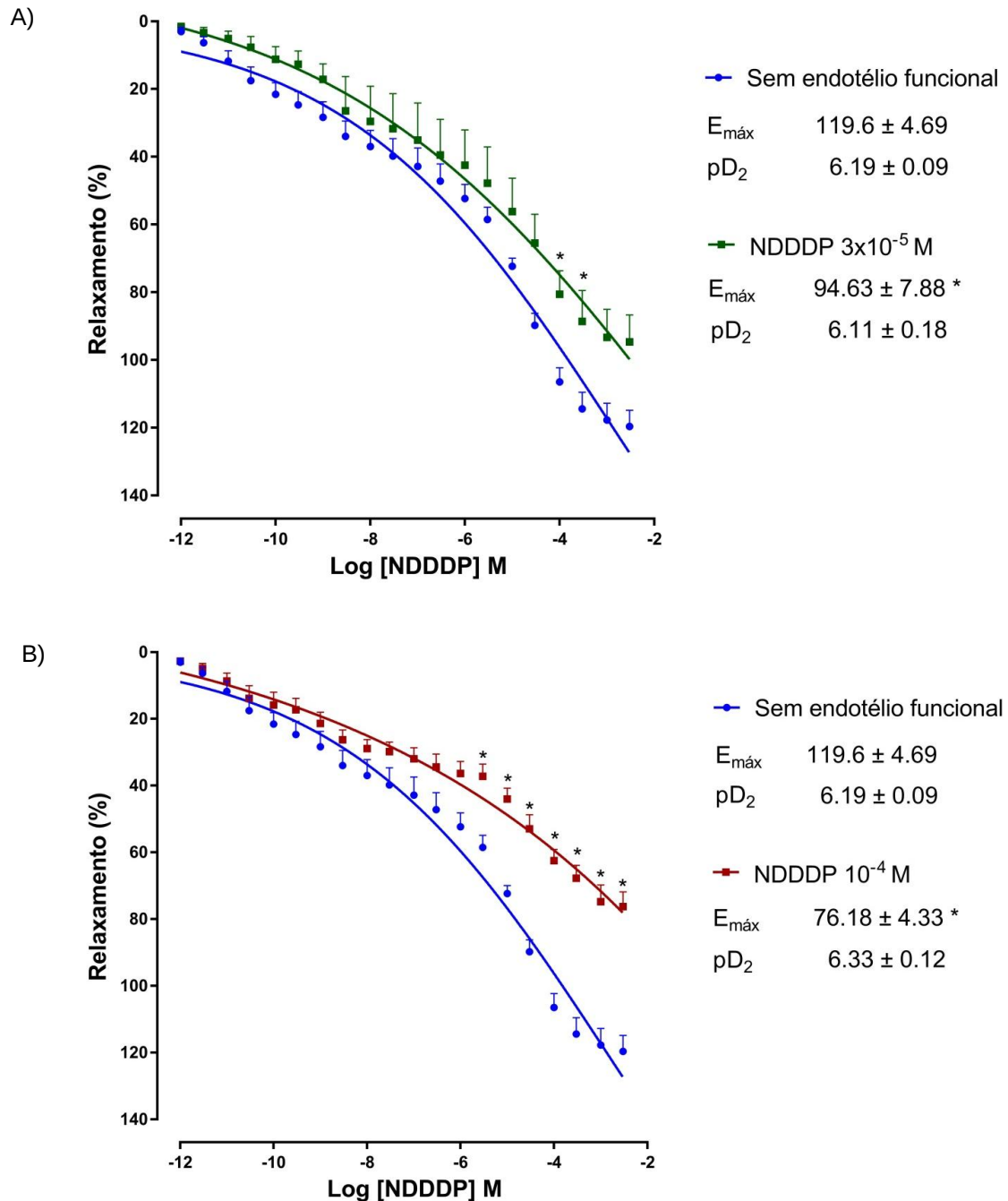


Fonte: RAMOS NETO, 2020.

7.1.6. Investigação do desenvolvimento de tolerância vascular pelo NDDDP

A exposição prévia dos anéis arteriais com 10^{-4} M e 3×10^{-5} M de NDDDP alterou a resposta vasorrelaxante provocada pela adição cumulativa do composto quando comparado ao grupo controle (3×10^{-5} M - $E_{\text{máx}} = 94.63 \pm 7.88\%$, $p < 0.05$; $pD_2 = 6.11 \pm 0.18\%$, $p = 0.67$; $n = 6/6$ animais; $10 \mu\text{M}$ - $E_{\text{máx}} = 76.18 \pm 4.33\%$, $p < 0.05$; $pD_2 = 6.33 \pm 0.12\%$, $p = 0.37$; $n = 6/6$ animais) (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Curvas concentração-reposta para o efeito relaxante induzido pelo NDDDP (10^{-12} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos, com endotélio removido, pré-contráídos com FEN ($1 \mu\text{M}$) antes (azul) e após o tratamento com A) 3×10^{-5} M de NDDDP (verde) e B) 10^{-4} M de NDDDP (vinho) ($n = 8/8$ animais, $6/6$ animais, e $6/6$ animais, respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0.05$.



Fonte: RAMOS NETO, 2020.

8. DISCUSSÃO

O papel exercido pelo NO em diversas vias biológicas, a exemplo da regulação do tônus do músculo liso vascular e consequente modulação da pressão arterial, já está bem descrito. Além disso, é evidente a importância que os doadores de NO, como os nitratos orgânicos, ganharam diante de seus potenciais efeitos terapêuticos. Deste modo, dado o envolvimento do NO em diversas vias biorregulatórias, têm sido despertado o interesse na busca de novos nitratos orgânicos (FEELISCH, 1998).

Através do presente trabalho foi possível observar que o nitrato orgânico NDDDP é capaz de promover o vasorrelaxamento de anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos por meio da liberação de NO e a subsequente ativação da via NO/GMPc/PKG e de canais para K^+ .

O endotélio vascular é um importante modulador da homeostase vascular local, uma vez que além de regular a permeabilidade vascular, também regula o calibre dos vasos sanguíneos conforme as demandas hemodinâmicas e hormonais, conservado assim, a fluidez do sangue (BRUTSAERT, 2003; FÉLÉTOU, VANHOUTTE, 2006, ALUSTAU, 2010). As células endoteliais exercem estas funções pela expressão, ativação e liberação de substâncias ativas, bem como por estímulos físico-químicos, como alterações na pressão, estresse por cisalhamento e pH (FÉLÉTOU, VANHOUTTE, 2006, ALUSTAU, 2010).

As substâncias relaxantes sintetizadas e liberadas pelas células endoteliais estão envolvidas no processo de relaxamento das células musculares lisas. Dentre estas substâncias está o NO, o principal vasodilatador produzido pelo endotélio. Outras substâncias relaxantes derivadas do endotélio são: adenosina, EDHF e PGI_2 (FURCHGOTT, VANHOUTTE, 1989; LÜSCHER, VANHOTTE, 1986; VANHOTTE, FÉLÉTOU, TADDEI, 2005).

O relaxamento vascular também pode ser induzido por NO exógeno, obtido a partir dos doadores de NO (FRANÇA-SILVA et al., 2012a). O efeito farmacológico de agentes vasodilatadores pode ser mediado através de um mecanismo direto, sobre o músculo liso vascular, ou indireto por meio da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio vascular ou inibição de fatores vasoconstrictores endógenos (GURNEY et al., 1994).

Com base nessas considerações, se buscou analisar a participação do endotélio vascular na ação vasorrelaxante produzida pelo NDDDP. Para tanto, foram executados experimentos em que o endotélio foi removido mecanicamente. Logo após, comparou-se a resposta obtida à resposta relaxante deste nitrato orgânico na presença do endotélio vascular. O NDDDP induziu vasorrelaxamento tanto na presença como na ausência do endotélio vascular funcional. Apesar de apresentar uma maior potência, o efeito vasorrelaxante do NDDDP foi maior nos anéis arteriais E-. Diante desta observação, os experimentos subsequentes foram realizados na ausência do endotélio vascular.

É interessante perceber que os anéis desprovidos de endotélio vascular mostraram relaxamento superior aos dos que estavam com endotélio íntegro. Estudos realizados previamente por França-Silva et al. (2012a), Mendes-Júnior et al. (2015) e Paulo et al. (2018), ao avaliarem a resposta vascular dos compostos doadores de NO (NDBP, HEX e NDHP, respectivamente), observaram resultados semelhantes.

Mendes-Júnior et al. (2015) sugere que a presença do endotélio modula negativamente o efeito relaxante do doador de NO nos vasos e que produtos secundários do metabolismo do composto podem induzir mecanismos de sinalização nas células endoteliais que atenuam o efeito vasorrelaxante produzido. Não se pode descartar a hipótese de que as substâncias vasoconstrictoras liberadas a partir do endotélio possam interferir no efeito relaxante produzido pelo composto ou até mesmo que o composto possa propiciar alterações enzimáticas que favoreçam o aumento na formação de elementos vasoconstrictores. Bonaventura et al. (2009) demonstrou que um doador de NO, denominado de $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bdq})\text{NO}^+]^{3+}$ (TERPY), induziu o desacoplamento da eNOS, o aumento da formação do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e de tromboxano A_2 (TxA_2). Tais eventos reduzem a capacidade vasorrelaxante do NO em vasos arteriais.

Com os dados obtidos no presente estudo, não é possível afirmar a participação do NDDDP nos eventos descritos anteriormente. Deste modo, faz-se necessária a condução de experimentos adicionais na perspectiva de esclarecer os eventos de modulação que o endotélio vascular pode exercer sobre o efeito vasorrelaxante.

Ao término da curva concentração-resposta do NDDDP, foi verificada a resposta dos anéis arteriais à FEN como um teste preliminar de toxicidade do nitrato orgânico. Os dados indicam que o NDDDP não provoca toxicidade no tecido visto que o agente gerador da contração obteve respostas idênticas as iniciais.

A contração do músculo liso vascular é dependente do aumento nos níveis de cálcio intracelular em decorrência da abertura dos canais para este íon presentes na membrana plasmática, e em virtude da liberação do mesmo a partir do retículo sarcoplasmático. No citosol, o Ca^{2+} se liga a CaM, ativando a MLCK que fosforila a cadeia leve da miosina, a qual interage com os filamentos de actina para exercer contração do músculo liso. A concentração do Ca^{2+} intracelular pode sofrer influência de FEN e estímulos eletroquímicos (KARAKI et al., 1997; ALUSTAU, 2010; MACHADO, 2013).

A contração induzida pela FEN em células do músculo liso é dada pela ativação de receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, acoplados à proteína $G_q/11$, que ao serem estimulados ativam a fosfolipase C- β (PLC β). Esta enzima, por sua vez, catalisa quebra do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP $_2$) em 1,4,5-trifosfato de inositol (IP $_3$) e diacilglicerol (DAG). O IP $_3$ excita os receptores para IP $_3$, localizados no retículo sarcoplasmático, promovendo a liberação de Ca^{2+} para o citosol. O DAG conjuntamente com o aumento dos níveis de Ca^{2+} favorece a ativação da proteína cinase C (PKC). Esta proteína fosforila vários sítios, a exemplo dos canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem tipo L, presentes na membrana celular. A abertura destes canais permite o influxo dos íons de Ca^{2+} do ambiente extracelular para o meio intracelular, provocando a contração das células musculares lisas (MACHADO, 2013; ZHUGE, 2017).

Outro modo de gerar vasoconstrição é por meio de estímulo eletroquímico pela elevação de K^+ extracelular. Isto provoca a despolarização da membrana, por impedir o efluxo destes íons, e ocasiona abertura dos canais de Ca_v , com consequente contração muscular por influxo destes íons (INTERAMINESE et al., 2007; WANG et al., 2008; ALUSTAU, 2010; MACHADO, 2013).

Estudos indicam que tanto as contrações mediadas por receptor quanto as induzidas por modificações do potencial de membrana envolvem a ativação da ROCKS, a qual leva a inibição da fosfatase da cadeia leve de miosina (MCLP). Uma vez inibida, a MCLP é incapaz de remover o fosfato da cadeia leve da miosina

(MLC), o que contribui para manutenção da contração (KARAKI et al., 1997; SAKAMOTO et al., 2003; WANG et al., 2006; ALUSTAU, 2010; MACHADO, 2013).

Diante do exposto, foram realizados experimentos em que os anéis mesentéricos foram pré-contraídos pela solução de Tyrode modificada com 60 mM de KCl. Na presença desta solução despolarizante, o vasorrelaxamento do NDDDP foi reduzido significativamente, com redução da eficácia e potência, quando comparado aos anéis pré-contraídos com FEN. Este resultado é semelhante a outros estudos com nitratos orgânicos que indicaram que o efeito vasorrelaxante é bem mais eficaz em pré-contrações induzidas por FEN do que em contrações induzidas por soluções despolarizantes (ALUSTAU, 2010; FRANÇA-SILVA et al., 2012a; MACHADO, 2013; MENDES-JÚNIOR et al., 2015). Adicionalmente, este resultado também sugere que o efeito vasorrelaxante do NDDDP é dependente do efluxo de íons de K^+ .

O relaxamento vascular produzido por nitratos orgânicos, como o NDDDP, é decorrente da liberação de NO do grupo nitroso do composto por meio de ação enzimática ou não enzimática (BONAVENTURA et al., 2007; ALUSTAU, 2010; MACHADO et al., 2014). Sendo assim, buscou-se analisar a participação do NO na resposta relaxante provocada pela substância em estudo.

A depender da origem, o óxido nítrico pode existir em 3 estados redox diferentes: na forma radicalar ($NO^\bullet$); na forma reduzida como íon nitroxil (NO^-) e na forma oxidada como cátion nitrosônio (NO^+) (BONAVENTURA et al., 2006; IRVINE et al., 2007).

Com a finalidade de investigar a participação do $NO^\bullet$, foi utilizada a HDX, um sequestrador extracelular seletivo para esta forma de NO. A HDX funciona por meio da ligação do seu átomo de cobalto ao NO, transformando-se em nitrosocobalamina e inativando este radical (ALUSTAU, 2010). Após o uso deste sequestrador de $NO^\bullet$, foi observado que o vasorrelaxamento produzido pela adição cumulativa do NDDDP sofreu significativa redução, indicando que a resposta relaxante envolve a liberação de NO da sua estrutura. Resultado semelhante foi observado por França-Silva et al. (2012a) ao avaliar o efeito do NDBP na presença de HDX. Já Mendes-Júnior et al. (2015) observou a participação do NO no efeito do HEX a partir da ação de um sequestrador intracelular de NO, o 2-(4-fenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-óxido (PTIO). Ademais, Paulo et al. (2018), demonstrou que o NO tem um papel

fundamental no efeito produzido pelo NDHP em experimentos realizados com uso simultâneo de HDX e PTIO, uma vez que, nesta condição experimental, o efeito vasodilatador do nitrato estudado foi atenuado significativamente.

O NO exerce ação biológica sobre células musculares vasculares lisas por meio da ativação da enzima sGC, levando ao aumento intracelular dos níveis de GMPc. Este aumento favorece a ação da PKG, a qual é responsável por fosforilar várias proteínas envolvidas no processo de vasorrelaxamento. Uma vez fosforiladas, estas proteínas provocam a abertura de canais para K^+ na membrana plasmática, inativação da MLCK e diminuição dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . (TAKAHASHI et al., 2008; FRANÇA-SILVA et al., 2012a; MENDES-JÚNIOR et al., 2015; PAULO et al., 2018). De acordo com Dierks e Burstyn (1996), o $NO\cdot$ é a única forma capaz de ativar a GCs e promover relaxamento.

Para analisar a participação da via NO/sGC, foram realizados experimentos na presença do ODQ, um inibidor seletivo da sGC (MACHADO et al., 2014; FRANÇA-SILVA et al., 2012; MENDES-JÚNIOR et al., 2015; PAULO et al., 2018). A ação inibitória do ODQ é proveniente de alterações no estado de oxidação do ferro do grupo heme da sGC, reduzindo substancialmente o efeito do NO, sem afetar o domínio catalítico da enzima (ZHAO et al., 2000; BONAVENTURA et al., 2007). Após a pré-incubação dos anéis mesentéricos com este inibidor, o vasorrelaxamento do NDDDP foi consideravelmente reduzido, dada a redução do efeito máximo, sugerindo que o efeito relaxante do NDDDP é mediado pela ativação da sGC. Este resultado é semelhante aos encontrados por França-Silva et al. (2012a), Mendes-Júnior et al. (2015) e Paulo et al. (2018) que verificaram a participação da sGC no efeito vasodilatador dos nitratos orgânicos NDBP, HEX e NDHP, respectivamente.

Já é bem demonstrado que a via NO/sGC/PKG está relacionada ao relaxamento vascular por atuar na funcionalidade dos canais para K^+ (ARCHER et al., 1994). Contudo, as evidências sugerem que a ação do NO pode ocorrer por um mecanismo independente do GMPc, através da ativação direta de canais para K^+ , para promover vasorrelaxamento. (BONAVENTURA et al., 2007; FRANÇA-SILVA et al., 2012a; MENDES-JÚNIOR, 2015; PAULO et al., 2018). Os canais para K^+ contribuem para a regulação do potencial de membrana das células do músculo liso, sendo relevantes na homeostasia do tônus vascular. A abertura destes canais promove hiperpolarização da membrana devido ao efluxo dos íons de K^+ . Este efeito

é seguido pelo fechamento para os canais de Ca^{2+} dependente de voltagem, o que reduz a entrada destes íons e resulta em vasodilatação. Por outro lado, a inibição dos canais para K^+ leva à despolarização da membrana com consequente vasoconstrição (KO et al., 2008; MACHADO, 2013; MENDES-JÚNIOR et al., 2015).

Com base neste papel dos canais para K^+ na regulação do tônus vascular, buscou-se investigar a participação destes canais na resposta vasodilatadora induzida pelo NDDDP. Para tanto, foi utilizado o tetraetilamônio (TEA) (3 mM), que nesta concentração comporta-se como um bloqueador não seletivo para os canais de K^+ (WANG et. al, 2008; FRANÇA-SILVA et al., 2012a; MACHADO et al., 2014; MENDES-JÚNIOR et al., 2015; PAULO et al., 2018). Nesta condição experimental, o efeito relaxante promovido pelo NDDDP foi significativamente reduzido, indicando a participação dos canais para K^+ na resposta vasodilatadora produzida por esta substância em estudo. Efeitos semelhantes foram observados por outros estudos que analisaram o efeito vasodilatador produzido por nitratos orgânicos em artéria mesentérica cranial isolada de rato (FRANÇA SILVA et al., 2012a; MACHADO, 2013; MENDES JÚNIOR et al., 2015; PAULO et al., 2018).

Até o momento, quatro tipos de canais para K^+ são amplamente identificados nas células do músculo liso vascular: canais de K^+ dependentes de voltagem (K_v), canais de K^+ ativados por Ca^{2+} (BK_{Ca}), canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e os canais de K^+ retificadores de influxo (K_{IR}) (HADDY et al., 2005; JACKSON, 2005; KO et al., 2008). Sendo assim, avaliou-se quais destes tipos de canais para K^+ estariam envolvidos na resposta vasorrelaxante do NDDDP.

Foi reportado que o aumento da atividade dos canais BK_{Ca} após a ativação da PKG produz hiperpolarização da membrana reduzindo a entrada de Ca^{2+} nas células do músculo liso vascular através de canais de voltagem dependentes de Ca^{2+} (FEIL et al., 2003; TAKAHASHI et al., 2008). Para analisar a participação dos canais BK_{Ca} no efeito vasorrelaxante induzido pelo NDDDP, os anéis mesentéricos foram submetidos a uma incubação prévia ao TEA (1 mM), que nesta concentração é um inibidor seletivo para este tipo de canal (LANGTON et al., 1991; SILVA et al., 2011). Nesta condição, a resposta vasodilatadora induzida pelo composto foi significativamente atenuada, sugerindo a participação desta via no efeito produzido pelo NDDDP.

Efeitos semelhantes foram observados em outros estudos com nitratos orgânicos em artéria mesentérica isolada de rato (ALUSTAU, 2010; FRANÇA SILVA et al., 2012a; MACHADO et al., 2014; PAULO et al., 2018). Entretanto diverge daqueles encontrados por Mendes Júnior et al. (2015), uma vez que nesse estudo o nitrato orgânico estudado, o HEX, não apresentou redução do efeito dilatador nos anéis arteriais pré-incubados com TEA (1 mM).

O óxido nítrico promove a abertura dos canais de K_v nas células do músculo liso de artéria pulmonar, induzindo hiperpolarização da membrana e diminuição dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , sinalizando o provável mecanismo pelo qual o NO causa vasorrelaxamento (SHIMODA, SYLVESTER; SHAM, 1998). Na presença da 4-AP, um bloqueador dos canais para K_v (SILVA et al., 2011; FRANÇA-SILVA et al., 2012a; MENDES JÚNIOR et al., 2015, PAULO et al., 2018), a resposta vasodilatadora provocada pelo NDDDP foi significativamente alterada, sugerindo, assim, que estes canais participam da resposta vasorrelaxante proporcionada pela substância nos anéis arteriais mesentéricos isolados de ratos. Estes dados corroboram os estudos anteriores que analisaram a participação destes tipos de canais no efeito vasorrelaxante de nitratos orgânicos (FRANÇA SILVA et. al, 2012a; PAULO et al., 2018). Por outro lado, diferem dos resultados indicados por Machado et al. (2014) e Mendes-Junior et al. (2015) que não observaram a participação dos canais K_v na resposta vasorrelaxante induzida pelos nitratos orgânicos estudados.

Ainda em relação aos canais de K_v , os resultados do presente estudo apontaram que a potência do nitrato não foi alterada na presença da 4-AP, diferentemente do que fora observado nos canais BK_{Ca} . Além disso, apesar de significativa, a resposta vasodilatadora do composto sobre os canais K_v foi menor em relação aos BK_{Ca} , sugerindo uma maior participação destes últimos na resposta relaxante. De acordo com Berg (2002), a atividade dos canais K_v pode estimular a secreção de fatores relaxantes derivados do endotélio e influenciar, consequentemente, a tensão vascular. Destaca-se aqui que os anéis E- do presente estudo, do ponto de vista conceitual, não estavam completamente desprovidos de camada endotelial. Deste modo, não é de se descartar a hipótese da influência endotelial ainda que de modo residual.

Além dos canais K_v , foi descrito que o NO hiperpolariza a membrana mediante a ativação dos canais K_{ATP} em artérias coronárias de humanos,

provocando vasorrelaxamento. (FRANÇA SILVA et al., 2012a; FAROUQUE et al., 2004). Também foi demonstrada a participação do NO na hiperpolarização de artérias mesentéricas de coelhos a partir dos canais K_{ATP} (MURPHY, BRAYDEN, 1995) e em artéria mesentérica cranial isolada de ratos (FRANÇA-SILVA et al., 2012a; MENDES-JÚNIOR et al., 2015; PAULO et al., 2018).

Sendo assim, com o intuito de avaliar se o efeito relaxante vascular produzido pelo NDDDP envolvia a participação destes canais, os anéis mesentéricos isolados de rato foram incubados previamente com GLIB, um inibidor seletivo para os canais K_{ATP} . Contudo, a resposta vasodilatadora induzida pela substância em estudo não foi alterada, sugerindo que não há envolvimento desta via no efeito do nitrato em estudo. Estes dados corroboram os dados encontrados por Paulo et al. (2018), que observou a não participação desta via no efeito vasodilatador produzido pelo NDHP. No entanto, divergem dos encontrados por França- Silva et al. (2012a), Mendes Júnior et al. (2015) que verificaram participação destes canais no efeito vasorrelaxante do nitrato NDBP e HEX, respectivamente, sobre artéria mesentérica isolada de ratos.

Os canais K_{IR} são abundantes em células musculares lisas de vasos de resistência de pequeno diâmetro (QUAYLE; DART; STADEN, 1996). Todavia, a função exata destes canais nestas células ainda não está totalmente elucidada (JACKSON 2000). Uma das hipóteses é de que a ativação destes canais pode ocorrer em resposta a aumentos moderados na concentração extracelular de K^+ (entre 10 a 15 mM) pode ocasionar vasodilatação. O suporte para esta hipótese é baseado na inibição da vasodilatação a partir da inibição por íons de Ba^{2+} (KNOT; ZIMMERMANN; NELSON, 1996; KO et al., 2008).

Após a realização de um protocolo experimental na presença de $BaCl_2$, o vasorrelaxamento promovido pela adição das concentrações cumulativas do NDDDP apresentou redução significativa, sugerindo a participação destes canais no efeito do composto em estudo. Tais dados diferem dos apresentados por Paulo et al. (2018) que não verificou participação desta via no efeito vasodilator do nitrato orgânico utilizado em seu estudo. Os estudos prévios conduzidos por colaboradores do LACONCHA, não investigaram a participação destes canais no efeito vasodilatador induzido pelos nitratos orgânicos estudados (FRANÇA-SILVA et al., 2012a; MENDES-JÚNIOR et al., 2015).

Apesar do uso no tratamento de doenças cardiovasculares, o uso de nitratos orgânicos é limitado pelo desenvolvimento de tolerância vascular. Os mecanismos relacionados a este fenômeno ainda permanecem incompletos e são, possivelmente, de origem multifatorial. Este evento pode estar relacionado à redução da bioconversão do nitrato orgânico, ao aumento na produção do O^{2-} , a redução da atividade da sGC e da PKG, e aumento da expressão e atividade das PDEs (JABS et al., 2015; DINIZ et al., 2017; AN et al., 2019).

Algumas abordagens foram utilizadas para verificar a tolerância de nitratos orgânicos. Em modelos *in vitro*, os anéis arteriais mesentéricos são incubados com altas concentrações do composto e, então, são utilizadas medidas funcionais ou bioquímicas (DAIBER et al., 2004; ALUSTAU, 2010; FRANÇA-SILVA et al., 2012a; PAULO et al., 2018).

Com base no protocolo descrito por França-Silva (2012c), foi investigado se o NDDDP provoca tolerância vascular após os anéis arteriais mesentéricos serem incubados por 30 minutos com as concentrações de 10^{-4} M e 3×10^{-5} M. Nesta condição experimental, observou-se alterações significativas em relação aos anéis que não passaram por este tratamento. Tais resultados sugerem que as concentrações do NDDDP utilizadas neste estudo favorecem o surgimento deste fenômeno após exposição prolongada a este nitrato.

Estes resultados divergem daqueles encontrados por França-Silva (2012c), Mendes-Júnior et al. (2015) e Paulo et al. (2018) quando da análise de tolerância dos nitratos orgânicos utilizados em seus respectivos estudos. Entretanto, estudos prévios sobre a NTG e o tetranitrato de pentaeritritol (PETN) mostraram que estas substâncias induzem tolerância vascular de artérias mesentérica, femoral e aórtica, tendo como principal causa a elevação nos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio que inibem a ação da enzima aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDHm), envolvida na biotransformação dos mesmos. A depleção dos grupos sulfidrilas também é apontada como origem da tolerância produzida por estes nitratos (DAIBER et al., 2004; IRVINE et al., 2011; AN et al., 2019). Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo não permite realizar tal inferência, sendo necessária a realização de estudos posteriores para avaliar a participação destes mecanismos no efeito induzido de tolerância.

É válido lembrar que mesmo apresentando tolerância, não é sugestiva a limitação de um eventual uso clínico do NDDDP, visto que a NTG, apesar de apresentar tolerância, continua sendo utilizado na clínica atualmente para tratamento de isquemia miocárdica (TADAMURA et al., 2003; GAYET et al., 2011).

Uma vez que o presente estudo analisou a caracterização dos efeitos induzidos pelo composto, são necessárias algumas considerações sobre as características deste com vista à sua prospecção biotecnológica.

Estudos *in silico* conduzido por Brandão (2017), colaboradora do presente grupo de pesquisa, mostrou que o NDDDP é uma substância que apresenta: alta lipofilicidade, dada o tamanho de sua cadeia carbônica; grande possibilidade de facilidade quanto ao aspecto de distribuição e boas chances de apresentar atividade biológica. Além disso, foi sugerido que o composto não provoca inibição das isoformas da enzima citocromo P-450 oxidase, o que favorece a metabolização com facilidade pelo fígado e a excreção na forma biotransformada. Quanto à toxicidade o NDDDP não apresenta características mutagênica, tumorigênica e irritante.

Por se tratar de um composto com alta lipofilicidade é sugerido que a sua forma de administração seja feita por outras vias que não a oral, como sublingual, injetável ou transdérmica (OMAR; ARTIME; WEBB, 2012). Neste sentido, o uso de um sistema de liberação controlada de droga pode ser viável.

Nos últimos anos, as técnicas de administração de fármacos receberam ampla atenção, especialmente os sistemas de liberação controlada, os quais permitem a liberação do agente bioativo em uma quantidade desejada e no exato local para executar a sua ação com eficiência (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012; KHAN et al., 2018). Tal sistema objetiva manter a concentração da droga no sangue ou nos tecidos-alvo em níveis desejados por um longo período de tempo para diminuir a frequência de administração e também minimizar possíveis efeitos colaterais (TRIKERIOTIS; GHANOTAKIS, 2007; UKMAR et al., 2011).

Além disso, o sistema de liberação controlada de drogas pode favorecer a melhora na farmacocinética de compostos facilmente degradáveis, que geralmente apresentam meia vida curtas *in vivo* (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012). Como se sabe, quando introduzidos na corrente sanguínea, os nitratos orgânicos aumentam rapidamente os seus níveis, o que explica o sua rápida resposta. Porém, eles também são rapidamente eliminados do plasma (OMAR; ARTIME; WEBB, 2012).

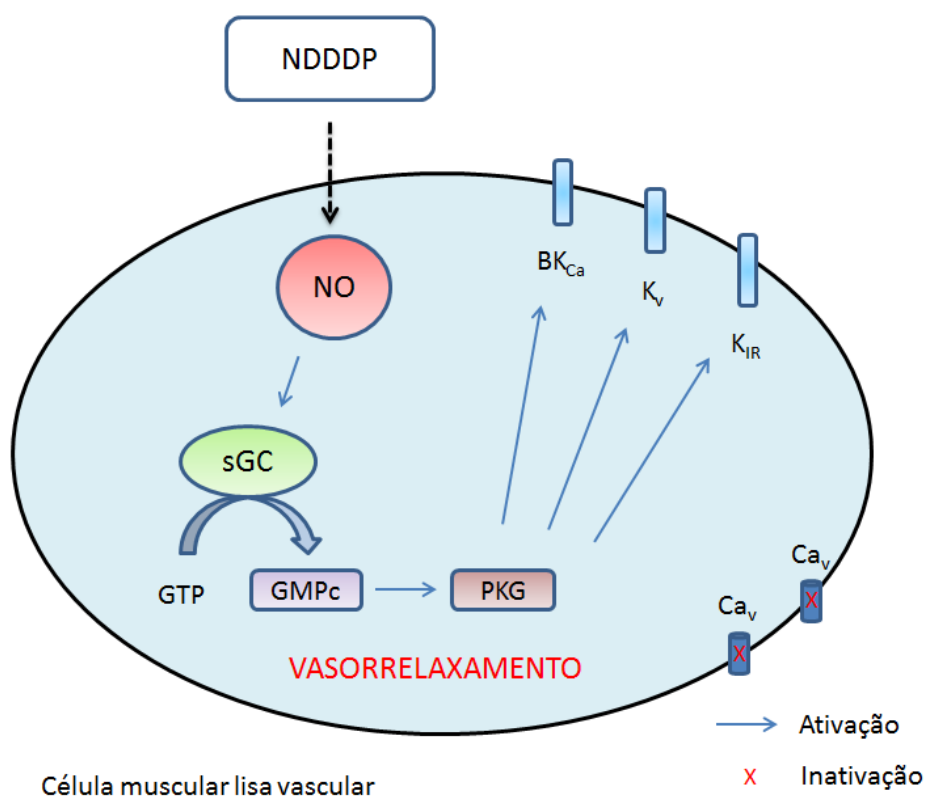
A liberação controlada de drogas além de propor uma administração medicamentosa mais eficaz e conveniente que a forma convencional, aumenta o ciclo de vida do produto, reduz os custos com saúde e, principalmente, aumenta a adesão do paciente a conduta terapêutica (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012).

Portanto, faz-se necessária a continuidade de pesquisas que busquem verificar a toxicidade *in vivo* e descrever a ação do NDDDP sobre modelos experimentais que simulem desordens cardiovasculares, como a hipertensão, com vistas a permitir a inserção de um novo e eficaz produto de favorável aceitabilidade no mercado.

9. CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo sugerem que o NDDDP é um novo doador de óxido nítrico que induz vasorrelaxamento em artéria mesentérica cranial isolada de rato normotenso, com e sem endotélio funcional, através da ativação da via NO/GMPc/PKG e de canais específicos para íons K^+ (BK_{Ca} , K_v e K_{IR}) (Figura 11). Diferentemente dos outros nitratos analisados pelos colaboradores do grupo de pesquisa, o composto promoveu ativação de canais K_{IR} . O composto foi capaz de induzir tolerância em anéis de artéria mesentérica cranial isolada de ratos.

Figura 11 – Representação esquemática do mecanismo de relaxamento da célula muscular lisa vascular provocado pelo NDDDP. BK_{Ca} : canais para potássio de alta condutância. Ca_v : canal de cálcio operado por voltagem. GMPc: monofosfato de guanosina cíclico. GTP: trifosfato de guanosina. K_{IR} : canais para potássio retificadores de influxo. K_v : canais para potássio dependente de voltagem. NDDDP: 2-nitrato-1,3-di(dodecanóxi)propano. NO: óxido nítrico. PKG: proteína cinase dependente de guanina. sGC: ciclase de guanilil solúvel.



Fonte: RAMOS NETO, 2020.

REFERÊNCIAS

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, fev. 2009.

ALUSTAU, M. C. **Envolvimento da via óxido nítrico na resposta vasodilatadora induzida pelo nitrato tetra-hidrofurfurílico (NTHF) em artéria mesentérica superior de rato**. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

AN, Y. M.; LI, Y. J.; ZHANG, C. L.; CONG, X.; GAO, Y. S.; WU, L. L.; DOU, D. Decreased PKG transcription mediated by PI3K/Akt/FoxO1 pathway is involved in the development of nitroglycerin tolerance. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 508, n. 4, p. 1195–1201, jan., 2019.

ARCHER, S. L.; HUANG, J. M. C.; HAMPL, V.; NELSON, D. P.; SHULTZ, P. J.; WEIR, E. K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 16, p. 7583–7587, ago., 1994.

ARNOLD, W. P.; MITTAL, C. K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 8, p. 3203–3207, ago. 1977.

BAKER, J. W.; HEGGS, T. G. Hydrolytic decomposition of esters of nitric acid. Part V. The effects of structural changes in aryl nitrates on the SN and E_c reactions. **Journal of the Chemical Society**, p. 616, 1955.

BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046–1054, 2005.

BATES, J. N.; BAKER, M. T.; GUERRA JR, R.; HARRISON, D. G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. **Biochemical pharmacology**, v. 42, p. 157–165, 1991.

BERLIN, R. Historical Aspects of Nitrate Therapy. **Drugs**, v. 33, supl. 4, p. 1-4, 1987. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2165/00003495-198700334-00003>

BODE-BÖGER, S. M.; KOJDA, G. Organic nitrates in cardiovascular disease. **Cellular and molecular biology**, v. 51, n. 3, p. 307–320, 5 set. 2005.

BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, R. S.; LUNARDI, C. N.; VERCESI, J. A.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex. **Nitric oxide: biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 15, n. 4, p. 387–394, dez., 2006.

BONAVENTURA, D.; DE LIMA, R. G.; VERCESI, J. A.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 215–222, mar., 2007.

BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C. N.; RODRIGUES, G. J.; NETO, M. A.; VERCESI, J. A.; DE LIMA, R. G.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 103, n. 10, p. 1366–1374, out., 2009.

BRANDÃO, M.C.R. **Novos nitratos orgânicos derivados de biomassas como potenciais fármacos cardiovasculares**. 2017. 101 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

BRON, J.; STERK, G. J.; VAN DER WERF, J. F.; TIMMERMAN, H. Synthesis and pharmacology of a series of new organic nitrate esters. **Pharmacy world & science: PWS**, v. 17, n. 4, p. 120–125, 28 jul., 1995.

BRUTSAERT, D. L. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. **Physiological reviews**, v. 83, n. 1, p. 59–115, jan., 2003.

BRYAN, N. S.; BIAN, K.; MURAD, F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. **Frontiers in bioscience**, v. 14, p. 1–18, 1 jan., 2009.

BYLUND, D. B. Subtypes of alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors. **European Neuropsychopharmacology**, 1992. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0924-977x\(92\)90079-n](http://dx.doi.org/10.1016/0924-977x(92)90079-n)

CHERRY, P. D.; FURCHGOTT, R. F.; ZAWADSKI, J. V.; JOTHIANANDAN, D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, p. 2106–2110, mar., 1982.

CRIBBS, L. L. T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: multiple functions. **Cell calcium**, v. 40, n. 2, p. 221–230, ago., 2006.

DAIBER, A.; OELZE, M.; COLDEWEY, M.; BACHSCHMID, M.; WENZEL, P.; SYDOW, K.; WENDT, M.; KLESCHYIV, A. L.; STALLEICKEN, D.; ULRICH, V.; MÜLSCH, A.; MÜNDEL, T. Oxidative Stress and Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Activity: A Comparison of Pentaerythritol Tetranitrate with Other Organic Nitrates. **Molecular Pharmacology**, v.66, n. 6, p. 1372–1382, ago., 2004.

DAIBER, A.; WENZEL, P.; OELZE, M.; MÜNZEL, T. New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. **Clinical research in cardiology: official journal of the German Cardiac Society**, v. 97, n. 1, p. 12–20, jan., 2008.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological reviews**, v. 74, n. 2, p. 323–364, abr., 1994

DE LIMA, R. G.; SILVA, B. R.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Ruthenium complexes as NO donors for vascular relaxation induction. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9628–9654, jul., 2014.

DIAMOND, J.; HOLMES, T. G. Effects of potassium chloride and smooth muscle relaxants on tension and cyclic nucleotide levels in rat myometrium. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 53, n. 6, p. 1099–1107, dez., 1975.

DIAMOND, J.; BLISARD, K. S. Effects of stimulant and relaxant drugs on tension and cyclic nucleotide levels in canine femoral artery. **Molecular pharmacology**, v. 12, n. 4, p. 668–692, jul., 1976.

DIAS, R. G.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, M. H. Nitric Oxide and the Cardiovascular System: Cell Activation, Vascular Reactivity and Genetic Variant. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, n. 1, p. 68-75, 2011.

DIERKS, E. A.; BURSTYN, J. N. Nitric oxide (NO), the only nitrogen monoxide redox form capable of activating soluble guanylyl cyclase. **Biochemical pharmacology**, v. 51, n. 12, p. 1593–1600, 28 jun., 1996.

DINIZ, M. C.; OLIVON, V. C.; TAVARES, L. D.; SIMPLÍNCIO, J. A.; GONZAGA, N. A.; DE SOUZA, D. G.; BENDHACK, L. M.; TIRAPELLI, C. R.; BONAVENTURA, D. Mechanisms underlying sodium nitroprusside-induced tolerance in the mouse aorta: Role of ROS and cyclooxygenase-derived prostanoids. **Life sciences**, v. 176, p. 26–34, mai., 2017.

DIVAKARAN, S.; LOSCALZO, J. The Role of Nitroglycerin and Other Nitrogen Oxides in Cardiovascular Therapeutics. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 19, p. 2393–2410, 7 nov. 2017.

FAROUQUE, H. M. O.; WORTHLEY, S. G.; MEREDITH, I. Effect of ATP-Sensitive Potassium Channel Inhibition on Coronary Metabolic Vasodilation in Humans. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, fev., 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1161/01.atv.0000125701.18648.48>

FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 358, n. 1, p. 113–122, jul., 1998.

FEIL, R.; LOHMANN, S. M.; JONGE, H.; WALTER, U.; HOFMANN, F. Cyclic GMP-Dependent Protein Kinases and the Cardiovascular System. **Circulation Research**, mai., 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1161/01.res.0000100390.68771.cc>

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder

(The Wiggers Award Lecture). **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00292.2006>

FÉLÉTOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? **British journal of pharmacology**, v. 156, n. 4, p. 545–562, fev., 2009.

FRANÇA-SILVA, M. S.; LUCIANO, M. N.; RIBEIRO, T. P.; SILVA, J. S. F.; SANTOS, A. F.; FRANÇA, K. C.; NAKAO, L. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BRAGA, V. A. The 2-nitrate-1,3-dibuthoxypropan, a new nitric oxide donor, induces vasorelaxation in mesenteric arteries of the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 690, p. 170-175, 14 jul, 2012a.

FRANÇA-SILVA, M. S.; MONTEIRO, M. M. O.; 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: basic & clinical**, v. 171, n. 1-2, p. 28–35, nov., 2012b.

FRANÇA-SILVA, M. S. **Avaliação dos efeitos do 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP) sobre o sistema cardiovascular**. 2012. 158 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012c.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, nov., 1980.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **The FASEB Journal**, 1989. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1096/fasebj.3.9.2545495>

FURTADO, F.F. **Efeitos cardiovasculares induzidos por um novo doador de óxido nítrico, o nitrato tetra-hidrofurfurílico (NTHF), em ratos**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

FYE, W. B. T. Lauder Brunton and amyl nitrite: a Victorian vasodilator. **Circulation**, 1986. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.74.2.222>

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**, v. 336, n. 6197, p. 385–388, nov., 1988.

GAYET, J.-L.; PAGANELLI, F.; COHEN-SOLAL, A. Update on the medical treatment of stable angina. **Archives of cardiovascular diseases**, v. 104, n. 10, p. 536–544, 2011.

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.

GOLDBERG, L. Pharmacological properties of sorbide dinitrate. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 15, n. 2, p. 173–187, abr., 1948.

GOLDBLATT, H. Studies on experimental hypertension: i. the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **The Journal of experimental medicine**, v. 59, n. 3, p. 347–379, 1934.

GORLIN, R.; BRACHFELD, N.; MACLEOD, C.; BOOP, P. Effect of Nitroglycerin on the Coronary Circulation in Patients with Coronary Artery Disease or Increased Left Ventricular Work. **Circulation**, v. 19, mai., 1959. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.19.5.705>

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 242–251, abr., 1994.

HADDY, F. J.; VANHOUTTE, P. M.; FELETOU, M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 290, n. 3, p. 546–52, mar., 2006.

HARRISON, D. G.; BATES, J. N. Thenitrovasodilators. New ideas about old drugs. **Circulation**, v. 87, p. 1461-1467, 1993.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1987a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265>

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circulation research**, v. 61, n. 6, p. 866–879, dez. 1987b.

IGNARRO, L. J.; N APOLI, C.; LOSCALZO, J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. **Circulation research**, v. 90, n. 1, p. 21–28, jan., 2002.

IRVINE, J. C.; FAVALORO, J. L.; WIDDOP, R. E. KEMP-HARPER, B. K. Nitroxyl Anion Donor, Angeli's Salt, Does Not Develop Tolerance in Rat Isolated Aortae. **Hypertension**, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1161/01.hyp.0000259328.04159.90>

IRVINE, J. C.; KEMP-HARPER, B. K.; WIDDOP, R. E. Chronic Administration of the HNO Donor Angeli's Salt Does Not Lead to Tolerance, Cross-Tolerance, or Endothelial Dysfunction: Comparison with GTN and DEA/NO. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2010.3269>

JABS, A.; OELZE, M.; MIKHED, Y.; STAMM, P.; KRÖLLER-SCHÖN, S.; WELSCHOF, P.; JANSEN, T.; HAUSDING, M.; KOPP, M.; STEVEN, S.; SCHULZ, E.; STASCH, J. P.; MÜNZEL, T.; DAIBER, A. Effect of soluble guanylyl cyclase activator and stimulator therapy on nitroglycerin-induced nitrate tolerance in rats. **Vascular pharmacology**, v. 71, p. 181–191, ago., 2015.

JACKSON, W. F. Ion Channels and Vascular Tone. **Hypertension**, v. 35, n. 1, p. 173–178, 2000.

JACKSON, W. F. Potassium channels in the peripheral microcirculation. **Microcirculation**, v. 12, n. 1, p. 113–127, jan., 2005.

KANG, N.; LEE, J. H.; LEE, 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. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 764–772, mar., 2015.

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

KATSUKI, S.; ARNOLD, W.; MITTAL, C.; MURAD, F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **Journal of cyclic nucleotide research**, v. 3, n. 1, p. 23–35, fev., 1977.

KHAN, S. B.; ALAMRY, K. A.; ALYAHYAWI, N. A.; ASIRI, A. M. Controlled release of organic-inorganic nanohybrid: cefadroxil intercalated Zn-Al-layered double hydroxide. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 3203–3222, mai., 2018.

KNOT, H. J.; ZIMMERMANN, P. A.; NELSON, M. T. Extracellular K^+ -induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K^+ channels. **The Journal of Physiology**, 1996. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021318>

KO, E. A.; HAN, J.; JUNG, I. D.; PARK, W. S. Physiological roles of K channels in vascular smooth muscle cells. **Journal of Smooth Muscle Research**, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1540/jsmr.44.65>

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

KIELBIK, M.; KLINK, M.; BRZEZINSKA, M.; SZULC, I.; SULOWSKA, Z. Nitric oxide donors: spermine/NO and diethylenetriamine/NO induce ovarian cancer cell death and affect STAT3 and AKT signaling proteins. **Nitric oxide: biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 35, p. 93–109, nov., 2013.

KOSMICKI, M. Long-Term Use of Short- and Long-Acting Nitrates in Stable Angina Pectoris. **Current clinical pharmacology**, v. 4, n. 2, p. 132–141, 2009.

KUMAR, S.; SINGH, R. K.; BHARDWAJ, T. R. Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 85, p. 182–201, jan., 2017.

LANGTON, P. D.; NELSON, M. T.; HUANG, Y.; STANDEN, B. Block of calcium-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions. **The American journal of physiology**, v. 260, n. 3, pt 2, p. 927–34, mar., 1991.

LAURSEN, J. B.; MÜLSCH, A.; BOESGAARD, S.; MORDVINTCEV, P.; TRAUTNER, S.; GRUHN, N.; NIELSEN-KUDSK, J. E.; BUSSE, R.; ALDERSHVILE, J. In Vivo Nitrate Tolerance Is Not Associated With Reduced Bioconversion of Nitroglycerin to Nitric Oxide. **Circulation**, v. 94, n. 9, p. 2241–2247, 1996.

LUNARDI, C. N.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ...[et al.]**, v. 42, n. 1, p. 87–93, jan., 2009.

LUNDBERG, J. O.; GLADWIN, M. T.; WEITZBERG, E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 14, n. 9, p. 623–641, set. 2015.

LÜSCHER, T. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, 1986. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1161/01.hyp.8.4.344>

MACHADO, N. T. **Efeitos cardiovasculares de um novo doador de óxido nítrico, 12-nitrato-cis-9-octadecanoato de etila (NCOE), em ratos**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

MACHADO, N. T.; MACIEL, P. M. P.; ALUSTAU, M. C.; QUEIROZ, T. M.; FURTADO, F. F.; ASSIS, V. L.; VERAS, R. C.; ARAÚJO, I. G. A.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; MEDEIROS, I. A. Nitric oxide as a target for the hypotensive and vasorelaxing effects induced by (Z)-ethyl 12-nitrooxy-octadec-9-enoate in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2014.06.012>

MARSH, N.; MARSH, A. A Short History Of Nitroglycerine And Nitric Oxide In Pharmacology And Physiology. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1681.2000.03240.x>

MARVASI, M.; DURIE, I. A.; MCLAMORE, E. S.; VANEGAS, D. C.; CHATURVERDI, P. Salmonella enterica biofilm-mediated dispersal by nitric oxide donors in association with cellulose nanocrystal hydrogels. **AMB Express**, v. 5, p. 28, 23 mai., 2015.

MENDES-JÚNIOR, L. G.; GUIMARÃES, D. D.; GADELHA, D. D. A.; DINIZ, T. F.; BRANDÃO, M. C. R.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; LEMOS, V. S.; FRANÇA-SILVA, M. S.; BRAGA, V. A. 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, ago., 2015.

MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British journal of pharmacology**, v. 151, n. 3, p. 305–321, jun., 2007.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. **Biochemical Society transactions**, v. 17, n. 4, p. 642–644, ago., 1989.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **The FASEB Journal**, 1995. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1096/fasebj.9.13.7557022>

MOURA, I. H.; VIEIRA, E. E. S.; SILVA, G. R. F.; CARVALHO, R. B. N.; SILVA, A. R. V. Prevalência de hipertensão arterial e seus fatores de risco em adolescentes. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 28, n. 1, p. 81–86, 2015.

MÜNZEL, T.; DAIBER, A.; GORI, T. Nitrate therapy: new aspects concerning molecular action and tolerance. **Circulation**, v. 123, n. 19, p. 2132–2144, mai., 2011.

MÜNZEL, T.; STEVEN, S.; DAIBER, A. Organic nitrates: update on mechanisms underlying vasodilation, tolerance and endothelial dysfunction. **Vascular pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 105–113, dez., 2014.

MURPHY, M. E.; BRAYDEN, J. E. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. **The Journal of physiology**, v. 486 (Pt 1), p. 47–58, jul., 1995.

MURRELL, W. Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. **The Lancet**, 1879. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)42404-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(02)42404-x)

OMAR, S. A.; ARTIME, E.; WEBB, A. J. A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites. **Nitric oxide: biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 26, n. 4, p. 229–240, mai., 2012.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: A Boon to Drug Delivery, Therapeutics, Diagnostics and Imaging. **Nanomedicine in Cancer**, v.8, p. 147-166, mai., 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1201/b22358-3>

PAULO, L. L.; CAMPOS, J. C.; ZHUGE, Z.; CARVALHO-GALVÃO, A.; BRANDÃO, M. C. R.; DINIZ, T. F.; HAWORTH, S. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; LEMOS, V. S.; LUNDBERG, J. O.; MONTENEGRO, M. F.; BRAGA, V. A.; CARLSTRÖM, M. The novel organic mononitrate NDHP attenuates hypertension and endothelial dysfunction in hypertensive rats. **Redox biology**, v. 15, p. 182–191, mai., 2018.

PEPINE, C. J. The impact of nitric oxide in cardiovascular medicine: untapped potential utility. **The American journal of medicine**, v. 122, n. 5 Suppl, p. 10–5, mai., 2009.

PORPINO, S.; TRAVASSOS, R. Developing New Organic Nitrates for Treating Hypertension: A Review. **Journal of hypertension**, v. 5, n. 3, 2016.

QUAYLE, J. M.; DART, C.; STANDEN, N. B. The properties and distribution of inward rectifier potassium currents in pig coronary arterial smooth muscle. **The Journal of physiology**, v. 494 (Pt 3), p. 715–726, ago., 1996.

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 & clinical**, v. 181, p. 31–36, abr., 2014.

RAMESHRAD, M.; BABAEI, H; AZARMI, Y.; FOULADI, D. F. Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies. **Life sciences**, v. 145, p. 190–204, jan., 2016.

SAKAMOTO, K.; HORI, M.; IZUMI, M.; OKA, T.; KOHAMA, K.; OZAKI, H.; KARAKI, H. Inhibition of high K⁺-induced contraction by the ROCKs inhibitor Y-27632 in vascular smooth muscle: possible involvement of ROCKs in a signal transduction pathway. **Journal of pharmacological sciences**, v. 92, n. 1, p. 56–69, mai., 2003.

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, n. 1, p. 61–73, 2010.

SCHAFFENBURG, C. A. Device to control constriction of main renal artery for production of hypertension in small animals. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine** , v. 101, p. 676–677, ago., 1959.

SERAFIM, R. A. M.; PRIMI, M. C.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I. Nitric oxide: state of the art in drug design. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 3, p. 386–405, 2012.

SHIMODA, L. A.; SYLVESTER, J. T.; SHAM, J. S. K. Inhibition of voltage-gated K current in rat intrapulmonary arterial myocytes by endothelin-1. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.1998.274.5.l842>

SILVA, D. F.; ARAÚJO, I. G. A.; ALBUQUERQUE, J. G. F.; PORTO, D. L.; DIAS, K. L. G.; CAVALCANTE, K. V. M.; VERAS, R. C.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ARAÚJO, D. A. M.; CRUZ, J. S.; CORREIA, N. A.; MEDEIROS, I. A. Rotundifolone-Induced Relaxation is Mediated by BKCa Channel Activation and Cav Channel Inactivation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00749.x>

SILVA, E. C.; MARTINS, M. S. A. S.; GUIMARÃES, L. V.; SEGRI, N. J.; LOPES, M. A. L.; EPINOSA, M. M. Hypertension prevalence and associated factors in men and women living in cities of the Legal Amazon. **Brazilian journal of epidemiology**, v. 19, n. 1, p. 38–51, mar., 2016.

SU, J. B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. **World journal of cardiology**, v. 7, n. 11, p. 719–741, nov., 2015.

TADAMURA, E.; MAMEDE, M.; KUBO, S.; et al. The effect of nitroglycerin on myocardial blood flow in various segments characterized by rest-redistribution thallium SPECT. **Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 44, n. 5, p. 745–751, 2003.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; TANAKA, H.; SHIGENOBU, K. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympatic neurogenic contraction of rat mesenteric. **British Journal of Pharmacology**, v.128, p. 1602-1608, 1999.

THATCHER, G. R. J.; BENNETT, B. M.; REYNOLDS, J. N. Nitric oxide mimetic molecules as therapeutic agents in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer research**, v. 2, n. 2, p. 171–182, abr., 2005.

TRIKERIOTIS, M.; GHANOTAKIS, D. F. Intercalation of hydrophilic and hydrophobic antibiotics in layered double hydroxides. **International journal of pharmaceutics**, v. 332, n. 1-2, p. 176–184, mar., 2007.

UKMAR, T; MAVER, U.; PLANINŠEK, O.; KAUČIČ, V.; GABERŠČEK, M.; GODEC, A. Understanding controlled drug release from mesoporous silicates: theory and experiment. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 155, n. 3, p. 409–417, nov., 2011.

VANHOUTTE, P. M.; FELETOU, M.; TADDEI, S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. **British journal of pharmacology**, v. 144, n. 4, p. 449–458, fev., 2005.

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.

VERAS, R. C.; RODRIGUES, K. G.; ALUSTAU, M. C.; ARAÚJO, I. G. A.; DE BARROS, A. L. B.; ALVES, R. J.; NAKAO, L. S.; BRAGA, V. A.; SILVA, D. F.; MEDEIROS, I. A. Participation of nitric oxide pathway in the relaxation response induced by E-cinnamaldehydeoxime in superior mesenteric artery isolated from rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 58–66, jul., 2013.

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, n. 4, p. 1091–1134, abr., 2002.

WANG, Y.; YOSHIOKA, K.; AZAM, M. A.; TAKUWA, N.; SAKURADA, S.; KAYABA, Y.; SUGIMOTO, N.; INOKI, I.; KIMURA, T.; KUWAKI, T.; TAKUWA, Y. Class II phosphoinositide 3-kinase alpha-isoform regulates Rho, myosin phosphatase and contraction in vascular smooth muscle. **Biochemical Journal**, v. 394, n. Pt 3, p. 581–592, mar., 2006.

WANG, S. P.; ZANG, W. J.; KONG, S. S.; YU, X. J.; SUN, L.; ZHAO, X. F.; WANG, S. X.; ZHENG, X. H. 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, n. 1-3, p. 283–288, jan., 2008.

WON, K. J.; JUNG, S. H.; JUNG, S. H.; LEE, K. P.; LEE, H. M.; LEE, D. Y.; PARK, E. S.; KIM, J.; KIM, B. DJ-1/park7 modulates vasorelaxation and blood pressure via epigenetic modification of endothelial nitric oxide synthase. **Cardiovascular research**, v. 101, n. 3, p. 473–481, mar., 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A global brief on Hypertension: Silent killer, global public health crisis**. 2013.

ZHAO, Y.; BRANDISH, P. E.; DI VALENTIN, M.; SCHELVIS, J. P.; BABCOCK, G. T.; MARLETTA, M. A. Inhibition of Soluble Guanylate Cyclase by ODQ. **Biochemistry**, n.39, p. 10848-10854, jun., 2000.

ZHUGE, Z; PAULO, L. L.; JAHANDIDEH, A.; BRANDÃO, M. C. R.; ATAHYDE-FILHO, P. F.; LUNDBERG, J. O.; BRAGA, V. A.; CARLSTRÖM, M.; MONTENEGRO, M. F. Synthesis and characterization of a novel organic nitrate NDHP: Role of xanthine oxidoreductase-mediated nitric oxide formation. **Redox biology**, v. 13, p.163–169, out., 2017.

ANEXO: PATENTE**PATENTE**

Número do depósito: BR 10 2019 027953 2

Título: Agente vasorrelaxante cardiovascular terapêutico derivado da glicerina

Data do depósito: 27/12/2019



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2019 027953 2