

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITOS DO NOVO NITRATO ORGÂNICO 4-CLOROBENZOATO DE 4-
NITROOXIBUTILA SOBRE A FUNÇÃO VASCULAR DA ARTÉRIA
MESENTÉRICA SUPERIOR DE RATOS**

CLARA RITTMeyer RUIZ

JOÃO PESSOA – PB

2024

CLARA RITTMAYER RUIZ

**EFEITOS DO NOVO NITRATO ORGÂNICO 4-CLOROBENZOATO DE 4-
NITROOXIBUTILA SOBRE A FUNÇÃO VASCULAR DA ARTÉRIA
MESENTÉRICA SUPERIOR DE RATOS**

Dissertação submetida ao exame de defesa do Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Prof^a Dr^a Camille de Moura Balarini

Orientadora

Prof. Dr. Francisco Antônio de Oliveira Júnior

Co-orientador

JOÃO PESSOA – PB

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R934e Ruiz, Clara Rittmeyer.

Efeitos do novo nitrato orgânico 4-clorobenzoato de 4-nitrooxibutílica sobre a função vascular da artéria mesentérica superior de ratos / Clara Rittmeyer Ruiz. - João Pessoa, 2024.

84 f. : il.

Orientação: Camille de Moura Balarini.

Coorientação: Francisco Antônio de Oliveira Júnior.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBiotec.

1. Produtos naturais - Nitrato orgânico. 2. Óxido nítrico. 3. Artéria mesentérica superior. 4. Farmacologia. I. Balarini, Camille de Moura. II. Oliveira Júnior, Francisco Antônio de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



Ata da Sessão de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Associada Universidade Federal da Paraíba, realizada em 26 de abril de 2024.

Na data de vinte e seis de abril de dois mil e vinte e quatro às 14h00 (horário local), foi realizada, por meio da Plataforma Virtual Google Meet, a defesa pública da Dissertação de Mestrado da discente **Clara Rittmeyer Ruiz**. O trabalho tem como título **“Efeitos do novo nitrato orgânico 4-clorobenzoato de 4-nitrooxibutílica sobre a função vascular da artéria mesentérica superior de ratos normotensos.”** A banca examinadora foi constituída pela orientadora Profa. Dra. Camille de Moura Balarini, na qualidade de presidente da banca, pelo Coorientador Dr. Francisco Antônio de Oliveira Júnior (UFPB), pelo 1ª examinadora (examinadora externa) Profa. Dra. Alice Valença Araújo (UFPE) e pela 2ª examinadora (examinadora interna) Profa. Dra. Josiane de Campos Cruz (UFPB). Após a apresentação pública do trabalho, iniciou-se a arguição da candidata por cada membro da banca examinadora, tendo a candidata o mesmo tempo para responder a cada questionamento. Na sequência, a banca examinadora se reuniu em caráter sigiloso e considerou a candidata **APROVADA**. De acordo com o Artigo 98 §1 §2 da Resolução 35/2019 do CONSEPE, a discente terá até 60 (sessenta) dias, a partir da presente data, para fazer as correções solicitadas pela banca examinadora e entregar as cópias corrigidas da dissertação à Biblioteca Central da UFPB e à secretaria deste programa, contendo obrigatoriamente a ficha catalográfica fornecida pela Biblioteca Central da UFPB.

Documento assinado digitalmente
 **CAMILLE DE MOURA BALARINI**
Data: 29/04/2024 19:06:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Camille de Moura Balarini

Documento assinado digitalmente
 **FRANCISCO ANTONIO DE OLIVEIRA JUNIOR**
Data: 29/04/2024 13:53:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Francisco Antônio de Oliveira Júnior

Documento assinado digitalmente
 **ALICE VALENÇA ARAUJO**
Data: 26/04/2024 16:38:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Alice Valença Araújo

Documento assinado digitalmente
 **JOSIANE DE CAMPOS CRUZ**
Data: 29/04/2024 11:00:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Josiane de Campos Cruz

Dedico meu trabalho a toda comunidade acadêmica, pois só é possível fazer ciência de forma plural.

Agradecimentos

A minha orientadora Camille Balarini e meu co-orientador Francisco Junior, que me inseriram no mundo da ciência e me acolheram constantemente nos altos e baixos da minha jornada acadêmica.

A minha mãe acadêmica Maria Regina de Freitas, que me inseriu no mundo da fisiologia. Sempre me apoiando e me ensinando sobre a universidade e a vida.

Ao Laboratório de Fisiologia Humana – CCS, e a todos os professores e técnicos que fazem parte desse lugar que considero uma segunda casa.

Ao Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial, e seus integrantes que fizeram parte do meu cotidiano desde a iniciação científica. Especialmente aos técnicos Clênia, Sara e Matheus que proporcionaram o suporte necessário durante os experimentos.

Ao professor Petrônio e ao Químico Dr. Helivaldo, do departamento de química – UFPB, por proporcionaram a parceria e síntese da substância-teste 4ClBN utilizada durante toda a pesquisa.

Aos meus companheiros de pós-graduação que se tornaram amigos de vida: Clênia, Emmily, Layane, Juliana, Renata, Geovane, Emille, Giovanna, Atalia e Ericka. Vocês trouxeram certezas nos momentos de dúvida e tornaram meus dias mais leves.

Ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas e a Universidade Federal da Paraíba, que me proporcionaram uma formação de qualidade e diversas oportunidades.

Aos discentes que fizeram parte da minha trajetória, que inúmeras vezes me deram forças para continuar no meio acadêmico.

A FAPESQ, agência de fomento a pesquisa do estado da Paraíba, pelo apoio financeiro.

A minha mãe Maria Cristina, que me criou, educou, e sempre foi o maior exemplo de professora que eu tive em minha vida.

Ao meu pai Alexandre, que sempre me apoiou e buscou me entender, estimulando o que havia de melhor em mim.

Aos meus familiares: meus avós Carlos, Luiz (in memorian), Jacira e Noêmia; meus tios João Paulo, Ana Cristina, Fernanda e Fernando; minha prima-irmã Silvia. Mesmo com a distância sempre fizeram parte da minha vida.

Aos meus amigos: Helena, Ana Elisa, Ramon, Brenda, Ricardo, Ana Carla, Bella, Mayk. Que constantemente me lembram do que é importante na vida.

A minha psicóloga Isabella, que contribuiu para diversas mudanças na minha vida por meio do essencial: a mente.

Obrigada a todos que contribuíram para a construção desse trabalho.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós
ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos
sempre”. **Paulo Freire.**

Resumo |

A função vascular normal depende do equilíbrio entre a produção endotelial de fatores vasodilatadores e constritores. A disfunção endotelial pode ser caracterizada pela redução da biodisponibilidade de vasodilatadores como o óxido nítrico (NO). Os nitratos orgânicos são fármacos doadores de NO e potentes vasodilatadores. Dessa forma, este trabalho tem por objetivo investigar o mecanismo de ação de um novo nitrato orgânico o 4-clorobenzoato de 4- nitrooxibutíla (4CIBN), sobre a função vascular da artéria mesentérica superior de ratos wistar (*Rattus norvegicus*). Para tanto, os protocolos experimentais realizados foram conduzidos utilizando o banho de órgãos. Anéis de artéria mesentérica superior foram isolados utilizando a solução nutritiva Tyrode aerada com mistura carbogênica numa temperatura de 37°C. Após uma estabilização de uma hora foi verificada a viabilidade dos anéis e realizado teste de endotélio. Em seguida, foi feita a pré-contracção com fenilefrina (FEN) e realizada uma curva concentração-resposta utilizando o 4CIBN para avaliação do efeito vasorrelaxante. O 4CIBN foi capaz de evocar uma resposta vasorrelaxante em anéis com endotélio ($Emáx=103,1\pm 3,9$; $pD_2=6,68\pm 0,09$) e sem endotélio ($Emáx=114,7\pm 4,2$; $pD_2=6,64\pm 0,08$). A partir disso todos os protocolos foram realizados com anéis sem endotélio funcional. A potência foi reduzida em anéis pré-contráídos com KCl 60 mM ($pD_2=5,18\pm 0,03$; $p<0.05$ vs FEN). A potência foi reduzida na presença do L-NAME (inibidor da NOS, 100 μ M) ($pD_2=5,52\pm 0,02$, $p<0.05$ vs FEN; $Emáx=109,0\pm 0,95$). A potência e eficácia foram reduzidas na presença do HDX (sequestrador de NO radicalar, 100 μ M) ($Emáx=74,05\pm 6,22$ e $pD_2=4,08\pm 0,06$; $p<0.05$ vs FEN) e do ODQ (inibidor da GCs, 10 μ M) ($Emáx=96,84\pm 10,86$ e $pD_2=3,69\pm 0,06$; $p<0.05$ vs FEN). Ao incubar os anéis com KCl 20 mM e TEA 3 mM a potência foi reduzida ($5,35\pm 0,05$ e $5,03\pm 0,04$, respectivamente $p<0.05$ vs FEN). Ao investigar os subtipos de canais de potássio envolvidos no vasorrelaxamento induzido pelo 4CIBN, observou-se a redução da potência ao realizar protocolos experimentais bloqueando canais do tipo Kir ($5,79\pm 0,08$; $p<0.05$ vs FEN), Kv ($5,06\pm 0,04$; $p<0.05$ vs FEN), Bkca ($5,06\pm 0,12$; $p<0.05$ vs FEN) e K_{ATP} ($6,30\pm 0,07$; $p<0.05$ vs FEN). Por fim, foi realizado o ensaio de tolerância farmacológica *ex vivo* e observou-se redução na potência ($5,19\pm 0,07$; $p<0.05$ vs FEN) do 4CIBN em anéis pré-expostos ao composto. Assim, sugerimos que a resposta vasorrelaxante induzida por 4CIBN é eficaz na presença e ausência de endotélio, é efetivada pelo mecanismo de doação do NO e ativação da via NO/GCs e tem participação de canais de potássio do tipo Kir, Kv, BKca e Katp. Além disso, a molécula induziu tolerância farmacológica *ex vivo*.

Abstract |

Normal vascular function depends on the balance between the endothelial production of vasodilating and constricting factors. The endothelial dysfunction can be characterized by reduced bioavailability of vasodilators such as nitric oxide (NO). Organic nitrates are NO-donating drugs and potent vasodilators. Therefore, this work aims to investigate the mechanism of action of a new organic nitrate, 4-nitrooxybutyl 4-chlorobenzoate (4CIBN), on the vascular function of the superior mesenteric artery of Wistar rats (*Rattus norvegicus*). To this end, the experimental protocols carried out were conducted using the organ bath. Superior mesenteric artery rings were isolated using aerated Tyrode nutrient solution with a carbogenic mixture at a temperature of 37°C. After one hour of stabilization, the viability of the rings was checked and the endothelium test was performed. Next, pre-contraction was performed using phenylephrine (PE) and a concentration-response curve was performed using 4CIBN to evaluate the vasorelaxant effect. 4CIBN was able to evoke a vasorelaxant response in rings with endothelium ($E_{max}=103.1\pm 3.9$; $pD_2=6.68\pm 0.09$) and without endothelium ($E_{max}=114.7\pm 4.2$; $pD_2=6.64\pm 0.08$). From then on, all protocols were performed with rings without functional endothelium. Potency was reduced in rings pre-contracted with 60 mM KCl ($pD_2=5.18\pm 0.03$; $p<0.05$ vs FEN). Potency was reduced in the presence of L-NAME (NOS inhibitor, 100 μ M) ($pD_2=5.52\pm 0.02$, $p<0.05$ vs FEN; $E_{max}=109.0\pm 0.95$). The potency and efficacy were reduced in the presence of HDX (radical NO scavenger, 100 μ M) ($E_{max}=74.05\pm 6.22$ and $pD_2=4.08\pm 0.06$; $p<0.05$ vs FEN) and ODQ (GCs inhibitor, 10 μ M) ($E_{max}=96.84\pm 10.86$ and $pD_2=3.69\pm 0.06$; $p<0.05$ vs FEN). When incubating the rings with 20 mM KCl and 3 mM TEA the potency was reduced (5.35 ± 0.05 and 5.03 ± 0.04 , respectively $p<0.05$ vs FEN). When investigating the subtypes of potassium channels involved in vasorelaxation induced by 4CIBN, a reduction in potency was observed when carrying out experimental protocols blocking Kir (5.79 ± 0.08 ; $p<0.05$ vs FEN), Kv (5.06 ± 0.04 ; $p<0.05$ vs FEN), Bkca (5.06 ± 0.12 ; $p<0.05$ vs FEN) and KATP (6.30 ± 0.07 ; $p<0.05$ vs FEN). Finally, an ex vivo pharmacological tolerance test was carried out and a reduction in the potency (5.19 ± 0.07 ; $p<0.05$ vs FEN) of 4CIBN was observed in rings pre-exposed to the compound. Thus, we suggest that the vasorelaxant response induced by 4CIBN is effective in the presence and absence of endothelium, is effected by the mechanism of NO donation and activation of the NO/GCs pathway and has the participation of Kir, Kv, BKca and Katp type potassium channels. Furthermore, the molecule induced pharmacological tolerance ex vivo.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 4CIBN:** 4-clorobenzoato de 4-nitrooxibutíla
- ACh:** Cloridrato de Acetilcolina (acetilcolina)
- ALDH:** Aldeído desidrogenase
- AUC (Δ AUC):** Area Under the Curve (area sob a curva)
- Ca²⁺:** íon cálcio
- Cav:** Canais para Ca²⁺ sensíveis à voltagem
- CBiotec:** Centro de Biotecnologia
- CEUA:** Comissão de Ética no Uso de Animais
- CMLV:** Células musculares lisas vasculares
- CONCEA:** Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CYP450:** Citocromo P450
- DAG:** diacilglicerol
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- EC50:** potência de um fármaco ou concentração em que o fármaco produz 50% do seu efeito máximo
- Emáx:** efeito máximo de um fármaco
- EPM:** erro padrão da média
- EROS:** Espécies reativas de oxigênio
- FEN:** Cloridrato de Fenilefrina (fenilefrina).
- GCs:** Guanilil ciclase solúvel
- GMPc:** Guanosina monofosfato cíclica
- GTP:** Guanosina trifosfato
- HDX:** hidroxocobalamina
- IPerFarm:** Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
- K⁺:** íon potássio
- LACONCHA:** Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial
- mM:** milimolar
- Na⁺:** íon sódio
- NDBP:** 2- nitrato-1,3-dibutoxiopropano
- NDHP:** 1,3-bis (hexiloxi) propan-2-il nitrato
- NDOP:** 2-nitrato-1,3-dioctanoxipropano
- NO:** óxido nítrico
- NOS:** óxido nítrico sintase

NTG: nitroglicerina

O₂: oxigênio

ODQ: 1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-quinoxalin-1-ona

pD₂: logaritmo negativo do valor de EC₅₀

PKG: proteína cinase dependente de GMPc

TEA: tetraetilamônio

UPA: Unidade de Produção de Animais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo sobre o endotélio saudável vs endotélio disfuncional.....	27
Figura 2A: Estrutura química do Benzoato de 4-nitrooxibutila (BBN).....	29
Figura 2B: Estrutura química do 4-clorobenzoato de 4-nitrooxibutila (4C1NB).....	29
Figura 3: Reação de obtenção do nitrato 4-clorobenzoato de 4-nitrooxibutila.....	33
Figura 4: Equipamentos utilizados para realização do protocolo experimental da reatividade vascular.....	37
Figura 5: Esquema do teste de endotélio – Ao aplicar Ach após contração tônica com Fen, o vaso E+ irá relaxar até valores próximos à tensão basal. Caso não relaxe, o vaso é considerado E-.....	38
Figura 6: Esquema da curva concentração-resposta ao 4C1NB.....	39
Figura 7: Esquema do protocolo experimental para avaliação da modulação do cálcio na curva concentração-resposta ao 4C1NB.....	40
Figura 8: Esquema da curva concentração-resposta ao 4C1NB com incubação usando L-NAME.....	41
Figura 9: Esquema da curva concentração-resposta utilizando a pré-incubação das substâncias HDX e ODQ (protocolos realizados separadamente).....	44
Figura 10A: Esquema do protocolo experimental utilizando KCl 20mM acerca da participação de canais de K^+ no vasorrelaxamento induzido por 4C1NB.....	43
Figura 10B: Esquema do protocolo experimental utilizando TEA 3mM acerca da participação de canais de K^+ no vasorrelaxamento induzido por 4C1NB.....	43
Figura 11: Esquema dos protocolos experimentais utilizando diferentes bloqueadores específicos para canais de potássio.....	44
Figura 12: Esquema do protocolo experimental de tolerância farmacológica ex vivo utilizando pré-incubação com 4C1NB.....	45
Figura 13: Síntese de todos os protocolos experimentais realizados na investigação do mecanismo de ação vasorrelaxante do 4C1NB.....	45
Figura 14: Síntese do mecanismo de ação vasorrelaxante do 4C1NB.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Efeito vasorrelaxante induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior na ausência e presença de endotélio pré-contraídos com FEN (10 μ M).....**48**
- Gráfico 2:** Vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 60 mM).....**49**
- Gráfico 3:** Participação da NOS no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).....**51**
- Gráfico 4:** Doação de NO e vasorrelaxamento induzidos por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).....**52**
- Gráfico 5:** Participação da GCs no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).....**53**
- Gráfico 6:** Comparação entre a doação de NO e participação da GCs no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).
.....**54**
- Gráfico 7:** Representação gráfica da diferença entre as áreas abaixo da curva (Δ AUC) dos grupos controle (FEN) vs sequestro NO (HDX) ou bloqueio GCs (ODQ).
.....**54**
- Gráfico 8:** Participação de canais de potássio no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).
.....**56**
- Gráfico 9:** Participação de canais de potássio no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).
.....**57**
- Gráfico 10:** Análise da participação do canal Kir no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica

superior de ratos normotensos pré-contraído com FEN (10 μ M).	58
Gráfico 11: Análise da participação do canal Kv no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M)).	58
Gráfico 12: Participação do canal BKca no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).	60
Gráfico 13: Participação do canal Katp no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).	61
Gráfico 14: Comparação da participação dos subtipos de canal de potássio no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).	62
Gráfico 15: Representação gráfica da diferença entre as áreas abaixo da curva (Δ AUC) dos grupos controle (FEN) vs FEN + BaCl ₂ , FEN + 4-AP, FEN + TEA e FEN + GLIB.	63
Gráfico 16: Análise da indução de tolerância em anéis pré-expostos ao 4CIBN submetidos à curva de relaxamento concentração-resposta.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: ferramentas farmacológicas a serem utilizadas.....	34
Tabela 2: Concentrações das substâncias na solução de Tyrode normal.....	35
Tabela 3: Concentrações das substâncias utilizadas no Tyrode 20 mM.....	35
Tabela 4: Concentrações das substâncias utilizadas no Tyrode 60 mM.....	36
Tabela 5: Valores de efeito máximo ($E_{máx}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos E+ vs E-.....	49
Tabela 6: Valores de efeito máximo ($E_{máx}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos FEN vs KCl 60 mM.....	50
Tabela 7: Valores de efeito máximo ($E_{máx}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs bloqueio NOS (FEN+L-NAME).....	50
Tabela 8: Valores de efeito máximo ($E_{máx}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs NO sequestrado (FEN+HDX).....	52
Tabela 9: Valores de efeito máximo ($E_{máx}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs bloqueio GCs (FEN+ODQ).....	53
Tabela 10: Valores de efeito máximo ($E_{máx}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs bloqueio K+ (FEN+KCl 20 mM).....	56
Tabela 11: Valores de efeito máximo ($E_{máx}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas concentração-resposta dos grupos controle (FEN) vs bloqueio K+ (FEN+TEA 3mM).....	57
Tabela 12: Valores de efeito máximo ($E_{máx}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs bloqueio Kir (FEN+BaCl ₂).....	58
Tabela 13: Valores de efeito máximo ($E_{máx}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas concentração-resposta dos grupos controle (FEN) vs bloqueio Kv (FEN+4-AP).	59

Tabela 14: Valores de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentraçã-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs bloqueio BKca (FEN+TEA 1mM).....	60
Tabela 15: Valores de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentraçã-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs bloqueio Katp (FEN+GLIB).....	61
Tabela 16: Valores de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentraçã-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs Pré-4CIBN (4CIBN 100 μ M + FEN).....	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Fisiologia vascular e regulação da hemodinâmica.....	23
2.2 Óxido nítrico e seu papel no sistema cardiovascular	25
2.3 Nitratos orgânicos como fármacos vasodilatadores.....	27
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Geral.....	31
3.2 Específicos	31
4 METODOLOGIA	33
4.1 Local e animais	33
4.2 Substância teste: 4-clorobenzoato de 4-nitrooxibutila.....	33
4.3 Ferramentas farmacológicas	34
4.4 Soluções nutritivas	35
4.5 Protocolos experimentais <i>ex vivo</i>	36
4.5.1 Artéria mesentérica superior de rato isolada	36
4.5.2 Verificação da viabilidade vascular e teste de endotélio.....	37
4.5.3 Avaliação do efeito vasorrelaxante induzido por 4CIBN sobre artéria mesentérica pré-contraída com FEN	39
4.5.4 Avaliação da resposta vasorrelaxante induzida por 4CIBN em vasos pré- contraídos com KCl 60 mM.....	39
4.5.5 Avaliação da participação da NOS no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por 4CIBN.....	40
4.5.6 Avaliação da doação do óxido nítrico e ativação da via NO/GCs/GMPc no vasorrelaxamento induzido por 4CIBN	41
4.5.7 Avaliação da participação de canais de potássio no vasorrelaxamento induzido por 4CIBN.....	42
4.5.8 Avaliação da participação de subtipos de canais de potássio no vasorrelaxamento induzido por 4CIBN	43
4.5.9 Avaliação da capacidade do 4CIBN em induzir tolerância farmacológica <i>ex vivo</i>	44
4.6 Análises estatísticas	46
5 RESULTADOS.....	48

5.1 O 4CIBN induziu vasorrelaxamento concentração-dependente na presença e ausência de endotélio em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com FEN	48
5.2 A potência do 4CIBN foi reduzida em anéis de artéria mesentérica submetidos à contração via acoplamento eletromecânico utilizando KCl 60 mM.....	49
5.3 A inibição da NOS em anéis de artéria mesentérica com endotélio gerou redução na potência do efeito vasorrelaxante induzido por 4CIBN	50
5.4 O vasorrelaxamento induzido por 4CIBN envolve a doação de óxido nítrico e ativação da via NO/GCs/GMPc em anéis de artéria mesentérica sem endotélio	51
5.5 O mecanismo de ação do 4CIBN envolve os canais de potássio como alvos efetores da resposta vasorrelaxante.....	55
5.6 Os canais de potássio dos subtipos voltagem-dependente (Kv), retificador de entrada (Kir), sensível ao cálcio de larga condutância (BKca) e sensível ao ATP (Katp) participam do mecanismo vasorrelaxante induzido por 4CIBN.....	57
5.7 A pré-exposição ao 4CIBN em anéis de artéria mesentérica atenuou a potência do seu efeito vasorrelaxante.....	63
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	76

Introdução |

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são um conjunto de condições patológicas que acometem a estrutura e função do coração e vasos sanguíneos (WHO, 2021), sendo líderes na causa de morte mundial (OPAS, 2021). Essas doenças podem ser crônicas e aumentam sua prevalência conforme o avançar da idade, sendo responsáveis pela incapacitação, redução da sobrevida e prejuízo no bem-estar do indivíduo (BRASIL, 2021; OLIVEIRA et al, 2022).

A patogênese das DCVs é complexa, envolvendo desde alterações morfológicas e/ou funcionais em nível local até a disfunção sistêmica. É sabido que, fisiologicamente, a manutenção dos parâmetros hemodinâmicos depende da integridade e regulação da função cardíaca e vascular. A regulação do tônus vascular é realizada via controle neural, humoral e local, e dentre as principais moléculas mediadoras, o óxido nítrico (NO) produzido pelo endotélio se destaca como agente vasodilatador (GIBBONS, 1997).

A síntese de NO depende de uma família de enzimas, denominadas óxido nítrico-sintases (NOS) que convertem o aminoácido L-arginina e o oxigênio em L-citrulina e óxido nítrico (MONCADA; HIGGS, 1993). Nas células endoteliais vários estímulos podem levar à ativação da NOS endotelial (eNOS), como a bradicinina, a força de cisalhamento, e a acetilcolina (YETIK-ANAK, CATRAVAS, 2006).

A disfunção endotelial ocorre quando há um desbalanço entre a produção de fatores vasocontracturantes e vasorrelaxantes derivados do endotélio, fenômeno observado em doenças como a hipertensão arterial e aterosclerose. O desacoplamento da NOS leva a uma produção ineficiente de NO, ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido (O_2^-), e assim, ao aumento da resistência vascular (CYR et al, 2020).

Os nitratos orgânicos, a exemplo da nitroglicerina (NTG) e dinitrato de isosorbida (ISDN), são fármacos antigos que possuem a capacidade de doar NO de forma espontânea ou utilizando enzimas bioativadoras encontradas nas células. São drogas eficazes pois aumentam a biodisponibilidade de NO rapidamente, aliviando sintomas e reduzindo a gravidade de quadros como crises hipertensivas e isquemia miocárdica (*angina pectoris*). Apesar de sua eficácia, os nitratos orgânicos induzem tolerância farmacológica em pouco tempo de uso, dificultando a continuidade do tratamento com esses fármacos, principalmente das doenças crônicas (DAIBER, 2008;

THUM et al, 2007).

A hipótese desse estudo é que, um novo nitrato orgânico, o 4-clorobenzoato de 4-nitrooxibutíla, induz efeito vasorrelaxante nos anéis de artéria mesentérica superior de ratos Wistar, apresentando maior potência e eficácia farmacológica devido à adição de cloro em sua molécula. Para avaliar essa hipótese foram realizados protocolos *ex vivo* que buscaram elucidar seu mecanismo de ação.

***Revisão
bibliográfica |***

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fisiologia vascular e regulação da hemodinâmica

O sistema cardiovascular é composto pelo coração e vasos sanguíneos constituindo um circuito fechado com sangue circulante em seu interior, promovendo a oferta de oxigênio e nutrientes para tecidos e recolhendo dióxido de carbono e metabólitos para excreção (GUYTON & HALL, 2017).

As artérias são calibrosas e possuem propriedades viscoelásticas que permitem a distensão e retração, acomodando o volume de sangue recebido da ejeção ventricular e mantendo o fluxo para os territórios vasculares seguintes (DOBRIN, 1978). Esses vasos são compostos por três camadas: a túnica íntima – composta pelo endotélio e algumas fibras elásticas, túnica média – camada de células musculares lisas e fibras elásticas, e a túnica adventícia – tecido conjuntivo frouxo rico em colágeno (SHADWICK, 1999).

O endotélio, presente na camada íntima, é um epitélio simples e pavimentoso que reveste o lúmen do vaso tendo contato com o sangue e possui a importante função de manter a hemostasia, participando dos mecanismos locais da regulação do tônus vascular por meio da produção de substâncias parácrinas e autócrinas que agem sobre as próprias células endoteliais, células musculares lisas, plaquetas e leucócitos (GALLEY, WEBSTER, 2004).

Dentre essas substâncias produzidas pelo endotélio, o óxido nítrico (NO) é um importante mediador que gera o relaxamento do músculo liso vascular, enquanto as endotelinas (ET), e alguns eicosanoides como a prostaglandina H₂, são mediadores contracturantes (DEANFIELD et al, 2007; GODO, SHIMOWAKA, 2017). As células musculares lisas, presentes na túnica média, recebem esses mediadores derivados do endotélio e respondem gerando a vasodilatação ou vasoconstrição.

Ainda sobre características dos vasos sanguíneos, algumas artérias, e especialmente as arteríolas, proporcionam resistência ao fluxo sanguíneo no estado de repouso e participam como órgãos efetores importantes na adaptação do fluxo quando há alteração das demandas locais e sistêmicas (CHRISTENSEN, MULVANY, 2001).

A circulação mesentérica, que se origina das artérias mesentéricas superior e inferior, possui vasos muito responsivos a estímulos vasoconstitores e vasodilatadores (locais, hormonais e neurais) gerando efeitos como o ajuste do fluxo sanguíneo para os

órgãos do trato gastrointestinal, a resistência vascular periférica, e a regulação da pressão arterial (ROSENBLUM, BOYLE, SCHWARTZ, 1997).

As artérias mesentéricas possuem receptores adrenérgicos Alfa 1 na musculatura lisa vascular, que podem ser ativados pela noradrenalina, adrenalina e agentes farmacológicos como a fenilefrina (BROZOVICH et al, 2016). Ao ativar esse receptor há alteração conformacional da proteína Gq e deslocamento da subunidade alfa ligada à GTP. Em seguida, ativação da enzima amplificadora fosfolipase C beta (PLC β) pela subunidade alfa da Gq. Essa enzima realiza hidrólise de fosfolípídeos de membrana – PIP₂ (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) gerando a formação de trisfosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG).

Posteriormente, a proteína cinase C (PKC) é ativada pelo DAG que fosforila e abre de canais de cálcio da membrana plasmática. Há também abertura de canais de cálcio do retículo sarcoplasmático por IP₃. Essas ações aumentam a concentração de cálcio mioplasmática. Há ligação do cálcio à calmodulina e ativação da cinase de cadeia leve da miosina (MLCK), iniciando o ciclo de pontes cruzadas e geração da contração (ALLEN, WALSH, 1994).

O vasorrelaxamento pode ocorrer mediante a redução dos agentes contráteis ou por meio dos mediadores vasorrelaxantes como NO. Esse processo envolve: a redução de cálcio no mioplasma por meio da ativação das bombas de cálcio do retículo (SERCA) e da membrana sarcoplasmática (PMCA); simultânea abertura de canais de potássio de membrana, contribuindo para hiperpolarizar a membrana; ativação do trocador de sódio e cálcio (NXC); inativação da MLCK devido a redução da concentração de cálcio mioplasmática e ação da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP) (WEBB, 2003).

Dessa forma, a capacidade do endotélio e da musculatura lisa de receber estímulos e responder adequadamente a eles é a chave para manutenção da pressão e do fluxo sanguíneo adequado aos tecidos. Diante dos diversos mediadores envolvidos na regulação do tônus vascular, o óxido nítrico produzido no endotélio é a principal molécula sinalizadora local do processo de vasodilatação.

2.2 Óxido nítrico e seu papel no sistema cardiovascular

O óxido nítrico (NO) é uma molécula pequena e lipossolúvel, composta por um átomo de nitrogênio e um de oxigênio, dessa forma, se difunde rapidamente através da membrana plasmática celular. Essas características corroboram para o entendimento da função do NO enquanto uma molécula sinalizadora, produzida por vários tipos celulares no organismo humano, incluindo neurônios e macrófagos (MACMICKING et al, 1997; GARTHWAITE et al, 1995;).

As células endoteliais foram objeto de estudo na investigação do papel biológico do NO. Durante a década de 1980, pesquisadores buscavam entender a molécula sinalizadora envolvida no vasorrelaxamento, inicialmente nomeada como Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio (EDRF) por Furchgott e sua equipe, que demonstraram a dependência do endotélio no relaxamento induzido por acetilcolina em anéis de aorta torácica de coelho (FURCHGOTT; ZAWADZIK, 1980).

Murad, Ignarro e colaboradores contribuíram para identificar a natureza química do EDRF, observando que a nitroglicerina promovia vasodilatação pelo aumento da disponibilidade de NO. Realizaram uma série de outros estudos que contribuíram para a constatação que o NO era o EDRF, a molécula sintetizada no endotélio responsável por promover o vasorrelaxamento (KATSUKI et al, 1977; IGNARRO et al, 1987).

Diversos outros grupos de pesquisa seguiram estudando a síntese e efeitos do NO sobre a vasculatura nos anos seguintes, e em 1992 foi nomeada “a molécula do ano” (KOSHLAND, 1992). Em 1998, Furchgott, Murad e Ignarro foram laureados pelo prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina. Essa forte produção acadêmica na época gerou avanço nos estudos envolvendo as doenças cardiovasculares, o câncer e outras patologias em que a sinalização de NO está envolvida.

As óxido nítrico sintases (NOS) são uma família de metaloenzimas que são capazes de produzir o NO a partir da oxidação de L-arginina na presença de importantes co-fatores como o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), tetraidrobiopterina (BH₄), cálcio e calmodulina (GROVES, WANG, 2000). Nas células endoteliais, vários estímulos podem levar à ativação da isoforma NOS endotelial (eNOS). A força de cisalhamento, por exemplo, é capaz de ativar mecanorreceptores do tipo PIEZO, que desencadeiam uma cascata de eventos culminando na ativação da proteína quinase B (AKT) e fosforilação da NOS ativando-a (LUNDBERG, WEITZBERG, 2022).

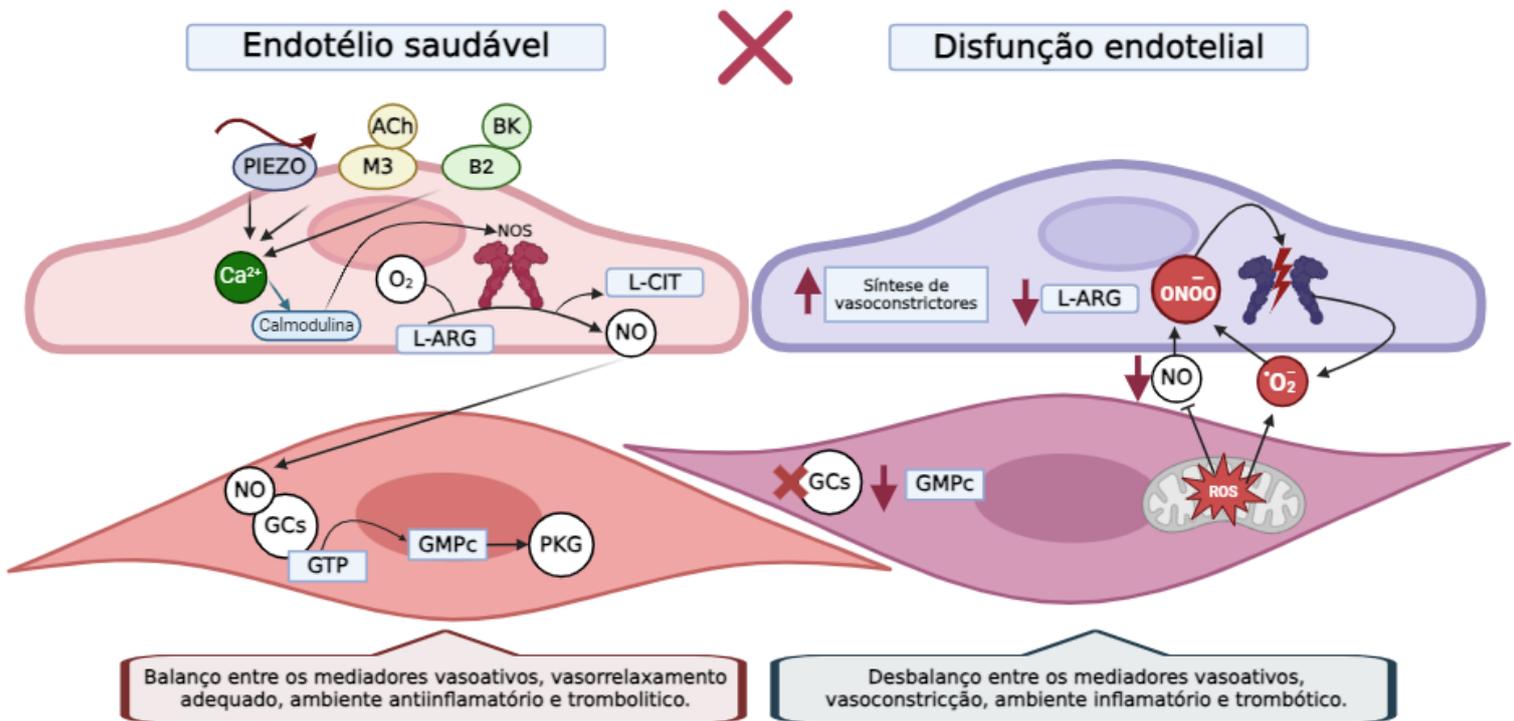
Embora o receptor muscarínico esteja presente nas células endoteliais, não há inervação vascular parassimpática para a maioria dos territórios. Apesar disso, a cascata sinalizadora colinérgica é capaz de ocorrer caso o receptor seja estimulado farmacologicamente. A Acetilcolina (ACh) liga-se ao seu receptor muscarínico M3, levando à ativação da PLC β , formação de IP3 e DAG, que irão ativar a PKC promovendo abertura de canais e aumento da concentração de cálcio intracelular (SATERNOS et al, 2017).

O cálcio irá se ligar a calmodulina, sendo o complexo cálcio-calmodulina responsável por ativar a NOS. Por ser um gás, o NO se difunde rapidamente para as células musculares lisas adjacentes, e irá atuar na ciclase de guanilil solúvel (sCG) encontrada no citoplasma (LOWEINSTEIN, 1994). A concentração de monofosfato de guanilil cíclico (GMPc) aumenta e a proteína quinase G (PKG) é ativada.

A proteína cinase G irá fosforilar vários alvos na célula: a enzima fosfatase da cadeia leve de miosina, que irá inativar a quinase de cadeia leve de miosina; a bomba SERCA, que irá aumentar sua atividade; a bomba PMCA, o canal de cálcio voltagem dependente (Cav) e o trocador NCX presentes na membrana sarcoplasmática, promovendo a saída do cálcio da célula (BRUCKDORFER, 2005). Esses eventos irão reduzir a concentração de cálcio do sarcoplasma e levar ao relaxamento do miócito, promovendo vasodilatação.

No contexto das doenças cardiovasculares, a disfunção endotelial é um processo complexo que resulta no desbalanço da produção de mediadores vasorrelaxantes e vasoconstrictores levando, dentre outros problemas, à falhas no ajuste do tônus vascular (figura 1). Existem muitos fatores que estão envolvidos no desenvolvimento da disfunção endotelial, dentre eles o desacoplamento da NOS (XU et al, 2021).

A NOS torna-se desacoplada devido à redução dos seus co-fatores e a um ambiente vascular pró-inflamatório. Dessa forma, haverá produção de outras espécies reativas de oxigênio (EROS) como o ânion superóxido (O_2^-) e do peroxinitrito ($ONOO^-$) e redução da biodisponibilidade de NO (INCALZA et al, 2018; VANHOUTTE, 2009).

Figura 1: Esquema representativo sobre o endotélio saudável vs endotélio disfuncional.

O endotélio possui uma infinidade de receptores que são capazes de detectar estímulos e ativar vias que culminam na produção de mediadores vasoativos. No contexto da vasodilatação estímulos como o aumento da força de cisalhamento, substâncias autácóides como a bradicinina, ou até mesmo a sinalização colinérgica, geram o aumento intracelular de cálcio e ativação da proteína calmodulina. A calmodulina juntamente com outros co-fatores é capaz de ativar a enzima NOS que irá converter L-arginina + O_2 em L-citrulina + NO. O NO consegue se difundir rapidamente para as CMLVs, ativando a GCs e aumentando a disponibilidade de GMPc – processo que leva ao vasorrelaxamento. Por outro lado, quando o ambiente vascular torna-se pró-inflamatório, lesionado, a redução de co-fatores e o aumento de outras EROS leva ao desacoplamento da NOS, contribuindo para maior produção de espécies como o ânion superóxido e redução da biodisponibilidade de NO, resultando em mais dano para o vaso e a perda da regulação do tônus. Adaptado de PARK KH, PARK WJ, 2015.

2.3 Nitratos orgânicos como fármacos vasodilatadores

Tendo em vista que o aumento da resistência vascular periférica e o aumento da pressão arterial são fatores que levam à disfunção cardiovascular, o uso de substâncias vasodilatadoras tem sido tratamento farmacológico recorrente na clínica, no intuito de estabelecer o retorno aos parâmetros hemodinâmicos normais e prevenir agravos (SOUZA, 1994). Dentre essas substâncias, destacam-se os nitratos orgânicos, que tem seu mecanismo de ação baseado na doação de óxido nítrico, favorecendo o processo de relaxamento da musculatura lisa vascular, tendo como representantes a nitroglicerina (NTG), mononitrato de isossorbida e dinitrato de isossorbida (WANG et al, 2002).

A nitroglicerina, o primeiro fármaco da classe de nitratos orgânicos utilizado para tratamento da hipertensão, foi descoberto em 1847 pelo químico Ascanio Sobrero.

Porém, foi apenas em 1867 que os nitratos começaram a ser testados como possíveis medicamentos, por meio dos experimentos de Bruton, utilizando nitrito de amila, e Murrel que testou a nitroglicerina para tratar angina *pectoris* (MARSH, 2000; MURREL, 1879).

Após o experimento de Murrel, a história dos nitratos orgânicos conversou com a descoberta do NO como uma molécula vasodilatadora endógena produzida pelo endotélio, conforme discutido no tópico anterior. Experimentos como o de Murad, citado anteriormente, utilizando a nitroglicerina, contribuíram para esclarecer as vias envolvidas no endotélio e no músculo liso que levam ao relaxamento da vasculatura. O que torna claro que a investigação farmacológica pode levar não apenas ao desenvolvimento de tratamentos novos, mas também, a descobertas que contribuem para explicar fenômenos fisiológicos.

Nitratos orgânicos são considerados pró-farmacos quando, no organismo, sofrem um processo denominado bioativação, que leva à produção de óxido nítrico por meio da ação das enzimas xantina-oxidoreductase, glutathione-s-transferase, citocromo p450, ALDH2 ou ainda de forma espontânea ao entrar em contato com o meio interno (MUNZEL, STEVEN, DAIBER, 2014).

O NO produzido a partir dos nitratos orgânicos podem contribuir para o vasorrelaxamento atuando sobre a GCs ativando a cascata de sinalização clássica de aumento do GMPc e ativação da PKG ou o NO pode agir diretamente promovendo a abertura de canais como: canais de potássio ativados por potássio (BKca), canais e potássio dependentes de voltagem (Kv), e canais de potássio sensíveis ao ATP (Katp) (DOGAN et al, 2019).

Apesar de muito eficazes, os nitratos orgânicos usados na clínica induzem em curto prazo a redução do seu efeito em consequência de sucessivas administrações, processo esse denominado por tolerância farmacológica. A causa está relacionada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, resultante da ação do nitrato na mitocôndria, podendo levar ao desenvolvimento ou piora da disfunção endotelial e a redução da resposta vasorrelaxante a essas drogas (KLEMENSKA, BERESEWICZ, 2009).

Dessa forma, diversos grupos de pesquisa têm se dedicado a estudar novas possibilidades, incluindo nosso laboratório o LACONCHA, que até o momento tem testado novos nitratos na perspectiva de compreender melhor as vias de relaxamento da musculatura lisa vascular, e também, se aproximar da clínica propondo novas

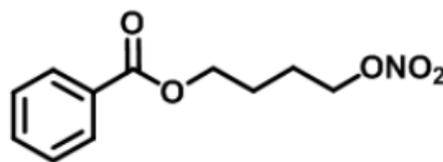
alternativas de nitratos orgânicos que possam ser utilizados num cenário terapêutico futuro (FRANÇA-SILVA, 2010; MENDES-JÚNIOR, 2016; PAULO, 2019).

O 4CIBN, nitrato utilizado para realização dos nossos protocolos experimentais, é uma nova substância que foi sintetizada utilizando como base o BBN (Benzoato de 4-nitrooxibutila), utilizado em protocolos experimentais de uma pesquisa anterior (ROCHA, 2021). A estrutura química de ambos (figura 2) segue a fórmula tradicional dos nitratos orgânicos (R-ONO₂), e a principal diferença entre ambas as moléculas foi a adição de cloro (Cl) presente na molécula do 4-clorobenzoato de 4-nitrooxibutila.

O Cl têm sido estudado na química medicinal e farmacologia como uma substância capaz de aumentar a potência dos fármacos quando é adicionada em cadeias carbônicas, a exemplo dos anéis aromáticos (CHIODI, ISHIHARA, 2023). Substâncias da família dos halogênios são utilizadas em fármacos para melhorar a afinidade de ligação do fármaco ao seu alvo, pois essas substâncias são capazes de elevar a carga eletrostática positiva e atrair um nucleófilo – espécie química capaz de doar um par de elétrons para formar uma ligação (HASSEL, 1970).

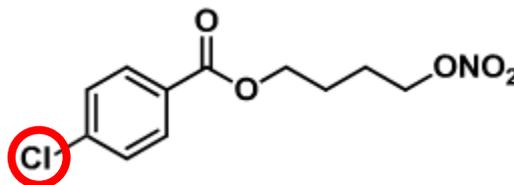
Diante disso, espera-se que essa nova molécula (4CIBN) possa apresentar uma melhor performance vasorrelaxante, demonstrando uma maior eficácia farmacológica e que não seja capaz de induzir tolerância.

Figura 2A: Estrutura química do Benzoato de 4-nitrooxibutila (BBN)



Fonte: ROCHA, 2021.

Figura 2B: Estrutura química do 4-clorobenzoato de 4-nitrooxibutila (4CIBN)



Autoria: Helivaldo Diógenes, 2022.

Objetivos |

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos do 4-clorobenzoato de 4-nitrooxibutila sobre a artéria mesentérica superior de ratos.

3.2 Específicos

➤ Avaliar a atividade vasorrelaxante do 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato;

- Estudar o mecanismo de ação do 4CIBN sobre a artéria, envolvendo:
- A participação do endotélio na resposta ao 4CIBN;
 - A capacidade do 4CIBN em gerar vasorrelaxamento na contração induzida por KCl;
 - A participação da eNOS, do óxido nítrico e da via do NO-GMPc;
 - A participação de canais de K⁺ no mecanismo de ação do 4CIBN;
- A capacidade do 4CIBN em induzir tolerância farmacológica *ex vivo*.

Metodologia |

4 METODOLOGIA

4.1 Local e animais

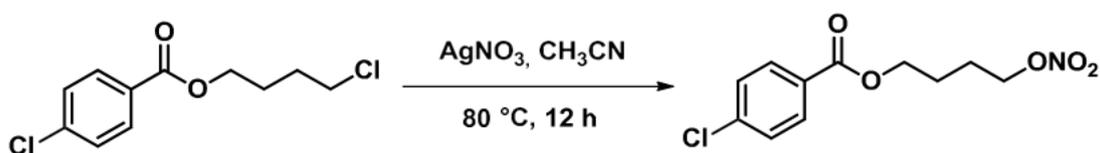
Neste estudo foram utilizados ratos de laboratório da espécie *Rattus norvegicus* linhagem Wistar (n=50), pesando entre 250 e 300g, provenientes do Biotério do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos - IPeFarM da UFPB. Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno em condições monitoradas de temperatura equivalente a $21 \pm 1^\circ \text{C}$, obedecendo o ciclo claro/escuro de 12 horas (fase clara das 6:00 às 18:00 horas), com livre acesso a dieta de ração tipo pellets (Purina®) e água disponibilizada em garrafas de polietileno.

Todos os procedimentos experimentais propostos foram realizados no Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) do Centro de Biotecnologia da UFPB, o qual disponibilizou todos os materiais necessários para o desenvolvimento da pesquisa. Quanto aos procedimentos éticos, todos os experimentos realizados constam no projeto previamente submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFPB) e aprovado sob n° de protocolo: 8636221222.

4.2 Substância teste: 4-clorobenzoato de 4-nitrooxibutíla

A substância teste utilizada foi o novo nitrato orgânico, 4-clorobenzoato de 4-nitrooxibutíla, sintetizado pelo Dr. Helivaldo Diogenes da Silva Sousa, sob orientação do Prof. Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho - Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e Naturais - UFPB. A síntese da substância foi realizada a partir de uma molécula intermediária, o 4-clorobenzoato de 4-clorobutíla (figura 3).

Figura 3: Reação de obtenção do nitrato 4-clorobenzoato de 4-nitrooxibutíla.



Autoria: Helivaldo Diógenes, 2022.

Nome: 4-clorobenzoato de 4-nitrooxibutíla

Fórmula Química: $C_{11}H_{12}ClNO_5$

Massa Molecular: 273,67 g/mol

Aparência: Líquido amarelado

Anteriormente aos protocolos experimentais o 4CIBN foi misturado a um agente emulsificante, o cremophor, seguindo a proporção 1:1. Em seguida foi adicionada água destilada para obtenção de uma solução mãe (10^{-1} M). Foram realizadas sucessivas diluições originando soluções de trabalho nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} e 10^{-9} M.

4.3 Ferramentas farmacológicas

As drogas que foram utilizadas durante os protocolos de reatividade vascular incluem: cloridrato de acetilcolina (ACh), cloridrato de fenilefrina (FEN), L-NAME, hidroxocobalamina (HDX), ODQ (1 H- [1,2,4] oxadiazólo [4,3-a] quinoxalin-1-one), 4-aminopiridina (4- AP), cloreto de bário ($BaCl_2$), cloreto de tetraetilamônio (TEA) e glibenclamida (GLIB) (Sigma-Aldrich, EUA). Esses fármacos foram diluídos utilizando água destilada, com exceção do ODQ e GLIB que são solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) à 100%.

Tabela 1: ferramentas farmacológicas a serem utilizadas.

FÁRMACO	CLASSE
ACh	Agonista colinérgico
FEN	Agonista adrenérgico
ODQ	Inibidor da guanilil ciclase solúvel
L-NAME	Inibidor da NOS
HDX	Sequestrador de NO radicalar
TEA	Bloqueador não seletivo para canais de K^+
$BaCl_2$	Bloqueador seletivo para canais K_{ir}
GLIB	Bloqueador seletivo para canais K_{ATP}
4-AP	Bloqueador seletivo para canais K_v

4.4 Soluções nutritivas

Para manutenção da integridade do vaso utilizado no protocolo de reatividade vascular, foi utilizada uma solução nutritiva denominada Tyrode, que possui como função mimetizar as condições do meio interno fornecendo glicose e eletrólitos ao órgão. O Tyrode é continuamente aerado com uma mistura carbogênia (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantido na temperatura de 37°C e pH 7,4.

Os solutos utilizados para compor o Tyrode foram: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl₂), cloreto de magnésio (MgCl₂), fosfato de sódio (NaH₂PO₄), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e glicose (C₆H₁₂O₂) (Sigma-Aldrich, EUA).

Tabela 2: Concentrações das substâncias na solução de tyrode normal (adaptado: TANAKA e cols, 1999).

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

Além disso, foram utilizadas soluções Tyrode enriquecidas com KCl no intuito de avaliar a participação de canais de potássio no mecanismo vasorrelaxante e o vasorrelaxamento após contração via acoplamento eletromecânico (nas concentrações de 20 mM e 60 mM, respectivamente), conforme será descrito em detalhes no próximo tópico a respeito dos protocolos experimentais utilizando o banho de órgãos.

Tabela 3: Concentrações das substâncias utilizadas no Tyrode 20 mM. (adaptado: TANAKA e cols, 1999).

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	142,3
KCl	20,0
CaCl ₂	2,0

MgCl ₂	1,05
NaH ₂ PO ₄	0,42
NaHCO ₃	10,0
C ₆ H ₁₂ O ₂	5,6

Tabela 4: Concentrações das substâncias utilizadas no Tyrode 60 mM.
(adaptado: TANAKA e cols, 1999).

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaH ₂ PO ₄	0,42
NaHCO ₃	10,0
C ₆ H ₁₂ O ₂	5,6

4.5 Protocolos experimentais *ex vivo*

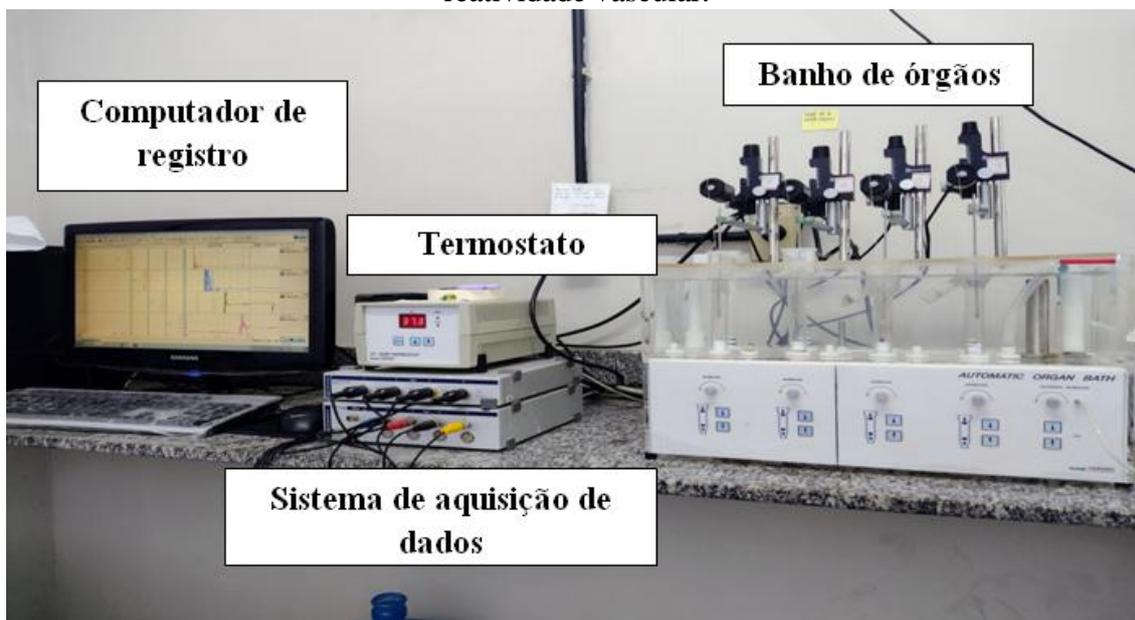
4.5.1 Artéria mesentérica superior de rato isolada

Para realização do protocolo experimental da reatividade vascular o animal foi eutanasiado utilizando guilhotina. Em seguida, foi realizada uma incisão no abdômen para acessar a cavidade peritoneal, permitindo a visualização das alças intestinais. O intestino foi retirado e lateralizado para visualização da aorta abdominal e ramificação da artéria mesentérica superior. O vaso foi pinçado e retirado com auxílio de tesoura cirúrgica oftalmológica.

A artéria foi transferida para a solução Tyrode em uma placa de Petri onde os tecidos perivasculares foram cuidadosamente dissecados. Em seguida, o vaso foi seccionado em quatro anéis com comprimento entre 1-2 mm. Os anéis foram adicionados em hastes de aço inoxidável em formato de triângulo, atravessando o lúmen do vaso. Essas hastes contendo os anéis de mesentérica foram introduzidas em cubas contendo 10 ml da solução tyrode e mistura carbogênica mantidos à 37°C no banho-maria. Fios de algodão permitiram, na extremidade inferior, a suspensão das hastes no interior das cubas e, na extremidade superior, a fixação ao transdutor de força.

O equipamento utilizado para realização de todos os protocolos de reatividade vascular foi o banho de órgãos compacto (76-00xx series, Panlab,S.L. Havard Apparatus Spain) que é composto por quatro cubas. Cada cuba possui um micromanipulador que permite a ligação do vaso ao transdutor de força que leva informações para um computador utilizando o sistema de aquisição de dados PowerLab (software versão 4.2, ADInstruments, Massachusetts, EUA).

Figura 4: Equipamentos utilizados para realização do protocolo experimental da reatividade vascular.



Autoria própria, 2024.

4.5.2 Verificação da viabilidade vascular e teste de endotélio

Os experimentos realizados foram todos baseados em protocolos pré-estabelecidos do LACONCHA, utilizados em pesquisas anteriores (FRANÇA-SILVA, 2010; MENDES-JÚNIOR, 2016; PAULO, 2019; ROCHA, 2021).

Os anéis foram submetidos a uma estabilização com duração de 60 minutos, em que o Tyrode foi trocado a cada 15 minutos para retirada de metabólitos. Os anéis foram mantidos em uma tensão basal de 0,75 gramas que foi ajustada por meio do micromanipulador.

O teste da viabilidade dos anéis foi realizado após a primeira estabilização. Foram adicionados 10 μM do agonista alfa adrenérgico FEN (10 μL de uma solução de trabalho à 10^{-2} M) nas cubas e avaliada a contração desenvolvida pelos anéis,

realizando a subtração do valor da tensão pós FEN e tensão basal (delta de contração). Foi considerado anel viável aquele que o valor do delta foi superior a 0,3 gramas.

Em seguida, realizou-se o teste de endotélio, objetivando determinar a presença ou ausência de endotélio funcional nos anéis de mesentérica. Foram adicionados 10 μ M de Ach (10 μ L de uma solução de trabalho à 10^{-2} M) nas cubas.

Os anéis que apresentaram delta de relaxamento igual ou superior à 80% da pré-contratação com FEN foram considerados com endotélio funcional (E+). Os anéis que apresentarem relaxamento inferior à 10% foram considerados sem endotélio funcional (E-) (figura 5). Anéis que apresentaram percentual de relaxamento no intervalo entre 10% e 80% foram excluídos ou o endotélio foi removido e os anéis foram reavaliados, e, caso estivessem adequados eram mantidos.

O cálculo realizado para determinação do percentual de relaxamento foi obtido seguindo a fórmula:

$$\text{Percentual de relaxamento (\%)} = ((\text{ACh} - \text{est} / \text{FEN} - \text{est}) \times 100) - 100$$

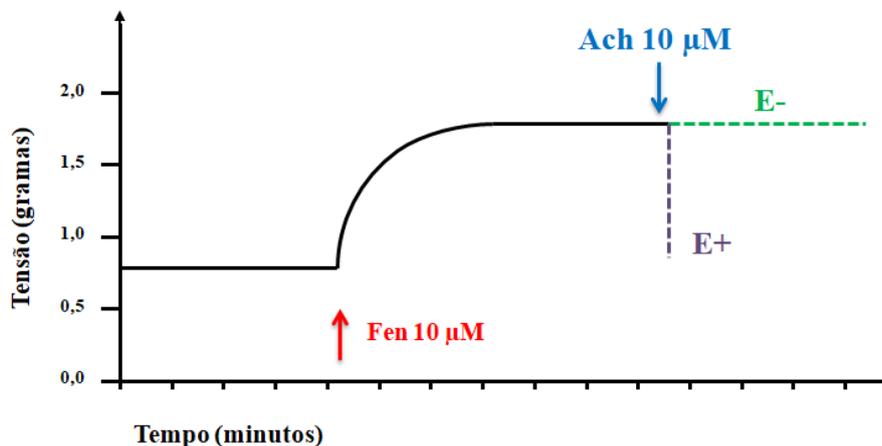
ACh: valor da tensão após relaxamento máximo induzido por acetilcolina;

FEN: valor da tensão após contração máxima induzida por fenilefrina;

est: valor da tensão após término do período de estabilização;

Após o teste de endotélio a solução nutritiva foi trocada três vezes e os anéis passaram por uma nova estabilização com duração de quinze à trinta minutos na tensão basal de 0,75 gramas.

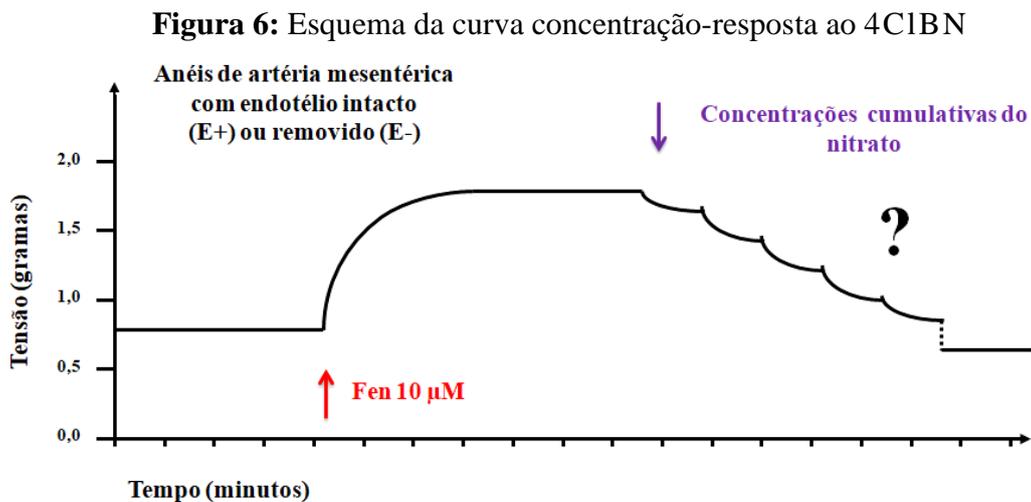
Figura 5: Esquema do teste de endotélio – Ao aplicar Ach após contração tônica com Fen, o vaso E+ irá relaxar até valores próximos à tensão basal. Caso não relaxe, o vaso é considerado E-.



Autoria própria, 2023.

4.5.3 Avaliação do efeito vasorrelaxante induzido por 4CIBN sobre artéria mesentérica pré-contraída com FEN

Após nova estabilização, os anéis foram pré-contraídos via acoplamento farmacomecânico utilizando FEN (10 μM) e ao formar o platô da contração tônica foram adicionadas concentrações cumulativas crescentes do 4CIBN às cubas (1×10^{-12} à 3×10^{-3} M) totalizando 20 (vinte) diferentes concentrações do nitrato (figura 6). Ao realizar a aplicação do nitrato na cuba aguardou-se entre 3 e 5 minutos para desenvolvimento do efeito vasorrelaxante. O valor de tensão foi registrado ao final desse período e em seguida partiu-se para a aplicação da próxima concentração. Foram obtidas curvas contração-resposta dos anéis com endotélio intacto (E+) e endotélio removido (E-). O vasorrelaxamento foi expresso em percentagem reversa à contração máxima induzida por FEN. Foram calculados o pD2 (-log da CE 50) e Emáx (efeito máximo).



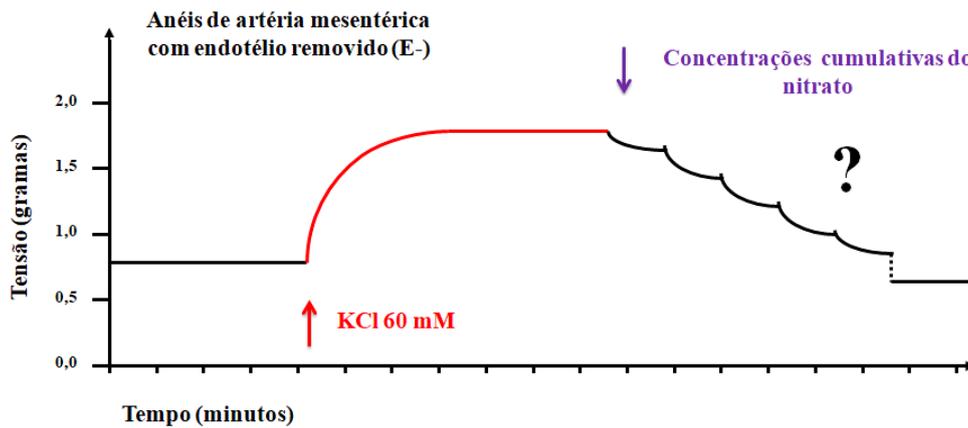
Autoria própria, 2023.

4.5.4 Avaliação da resposta vasorrelaxante induzida por 4CIBN em vasos pré-contraídos com KCl 60 mM

Para avaliar o mecanismo de vasorrelaxamento induzido por 4CIBN frente à contração decorrente do acoplamento eletromecânico, utilizou-se uma solução de Tyrode enriquecida com KCl 60mM (ROCHA, 2021). Essa solução gera despolarização da membrana sarcoplasmática por retenção de potássio no interior da célula muscular

lisa e consequente abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes (tipo L ou T). Dessa forma, a contração inicia-se rapidamente em decorrência do influxo de cálcio proveniente do meio extracelular (OLIVEIRA, 2006). Após a contração tônica a curva de relaxamento concentração-resposta foi realizada (figura 7) e os resultados foram comparados ao grupo controle pré-contraído com FEN.

Figura 7: Esquema do protocolo experimental para avaliação da modulação do cálcio na curva concentração-resposta ao 4C1BN

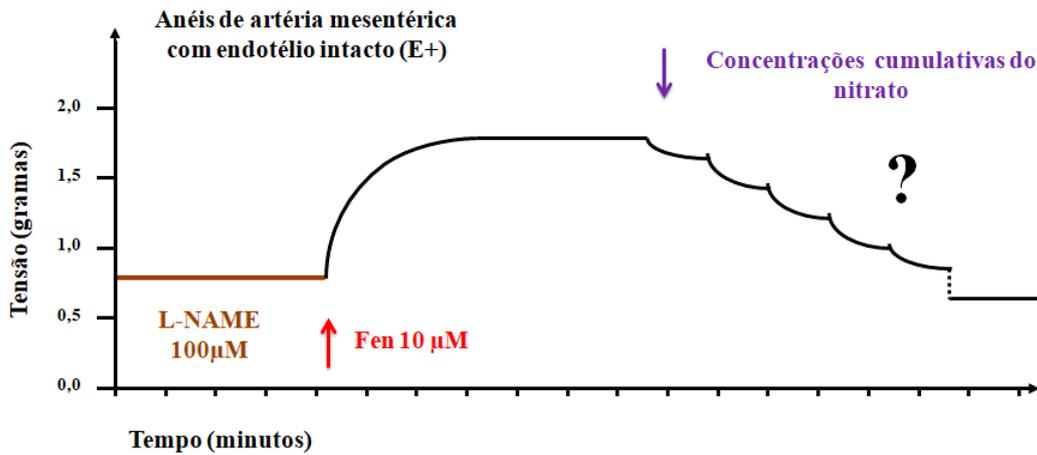


Autoria própria, 2023.

4.5.5 Avaliação da participação da NOS no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por 4C1BN

Para avaliar qualquer eventual participação da síntese de NO a partir da enzima NO sintase (NOS) no mecanismo vasorrelaxante induzido por 4C1BN, os anéis de artéria mesentérica com endotélio intacto foram pré-incubados com um inibidor não-seletivo da NOS, o L-NAME, na concentração de 100 μ M (REES et al, 1990). Após 30 minutos de incubação foi adicionado FEN nas cubas para indução da contração, e em seguida foi realizada a curva concentração-resposta ao 4C1BN (figura 8).

Figura 8: Esquema da curva concentração-resposta ao 4C1BN com incubação usando L-NAME



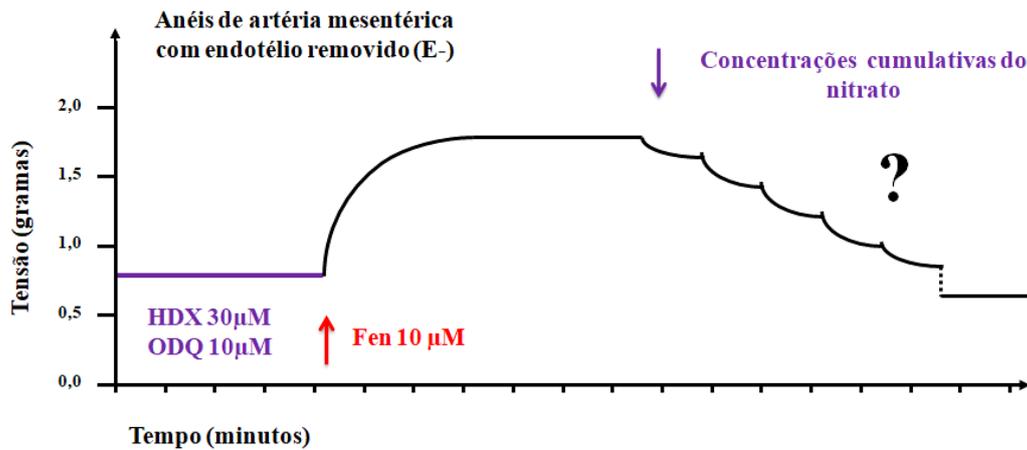
Autoria própria, 2023.

4.5.6 Avaliação da doação do óxido nítrico e ativação da via NO/GCs/GMPc no vasorrelaxamento induzido por 4C1BN

Para averiguar se o 4C1BN era capaz de doar NO foi utilizada a hidroxicobalamina na concentração de 30 µM. A HDX é um sequestrador extracelular de NO radicalar, sendo assim o NO se liga à cobalamina oxidada e não interage com os alvos na célula muscular lisa (KRUSZYNA et al, 1998). Após trinta minutos de incubação da HDX nos anéis de artéria mesentérica E-, foi realizada contração com FEN e em seguida a curva concentração-resposta ao 4C1BN (figura 9).

Posteriormente, buscou-se investigar a participação da ativação da GCs no vasorrelaxamento induzido por 4C1BN, e para isso utilizou-se o ODQ – um inibidor seletivo da enzima em questão (GARTHWAITE et al, 1995). ODQ é capaz de gerar uma oxidação irreversível do grupo heme da GCs, não permitindo a ativação enzimática proporcionada pelo NO (SCHRAMMEL et al, 1996). Assim, os anéis E- foram incubados com ODQ na concentração de 10 µM durante trinta minutos e em seguida realizou-se a contração dos anéis e a curva concentração-resposta (figura 9).

Figura 9: Esquema da curva concentração-resposta utilizando a pré-incubação das substâncias HDX e ODQ (protocolos realizados separadamente).



Autoria própria, 2023.

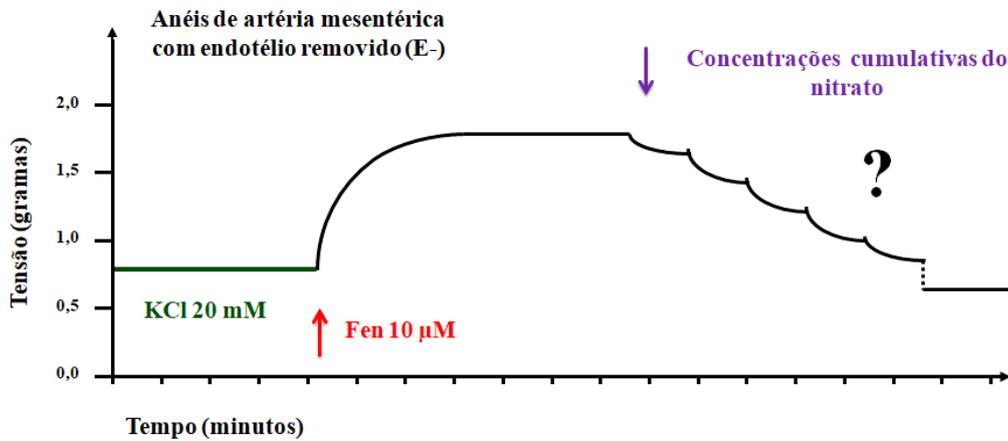
4.5.7 Avaliação da participação de canais de potássio no vasorrelaxamento induzido por 4CIBN

No intuito de averiguar a possível participação de canais para potássio no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por 4CIBN, foram realizados dois protocolos, separadamente, utilizando anéis E-.

Primeiramente foi realizado um ensaio utilizando solução de Tyrode com KCl na concentração de 20mM. A solução convencional foi trocada pela KCl 20mM e após 30 minutos foi conduzida a contração com FEN e curva de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN (figura 10A). O Tyrode KCl 20 mM bloqueia parcialmente a saída de potássio da célula, tornando mais difícil a hiperpolarização da membrana mediada pelos canais de K^+ (CLARK, FUCHS, 1997).

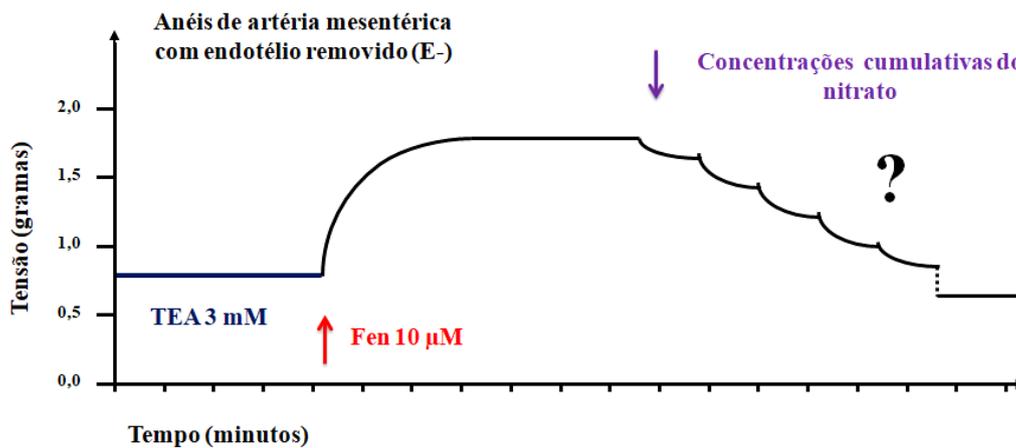
O posterior ensaio foi realizado utilizando o TEA na concentração de 3 mM – bloqueador inespecífico dos canais de K^+ (WANG et al, 2008). Nesse caso, essa ferramenta farmacológica tem a capacidade de fechar canais de potássio, impedindo a utilização desses no mecanismo de vasorrelaxamento. A incubação foi realizada durante 30 minutos e em seguida os anéis foram contraídos e submetidos a curva de relaxamento (figura 10B).

Figura 10A: Esquema do protocolo experimental utilizando KCl 20mM acerca da participação de canais de K^+ no vasorrelaxamento induzido por 4CIBN.



Autoria própria, 2023.

Figura 10B: Esquema do protocolo experimental utilizando TEA 3mM acerca da participação de canais de K^+ no vasorrelaxamento induzido por 4CIBN



Autoria própria, 2023.

4.5.8 Avaliação da participação de subtipos de canais de potássio no vasorrelaxamento induzido por 4CIBN

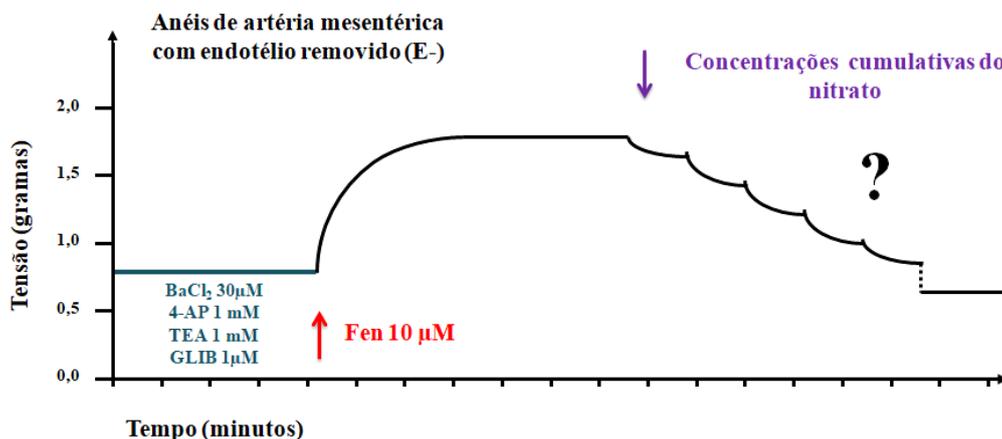
Após a constatação da participação dos canais de potássio no mecanismo vasorrelaxante induzido pelo 4CIBN buscou-se compreender quais subtipos desses canais poderiam estar envolvidos nessa resposta.

O músculo liso vascular possui algumas isoformas de canais para K^+ , dentre elas os canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), canais de potássio retificadores de

entrada (Kir), canais de potássio voltagem-dependentes (Kv) e os canais de potássio sensíveis ao cálcio de larga condutância (BKca) (JACKSON, 2016).

Para avaliar a abertura e utilização de cada um desses canais como mecanismo vasodilatador do 4CIBN, foram realizados quatro diferentes ensaios com bloqueadores específicos. A glibenclamida 1 μM - bloqueador de K_{ATP} (PRADHAN, 2015), BaCl_2 30 μM - bloqueador de Kir (ADARAMOYE, MEDEIROS, 2009) , 4-AP 1 mM - bloqueador de Kv (WYNNE, 2011) e TEA 1mM - bloqueador de BKca (YE, 2004), foram aplicados cada um em diferentes cubas e permaneceram em contato com os anéis em incubação durante 30 minutos, para posteriormente ser realizada a contração com FEN e a curva de relaxamento concentração-resposta (figura 11).

Figura 11: Esquema dos protocolos experimentais utilizando diferentes bloqueadores específicos para canais de potássio

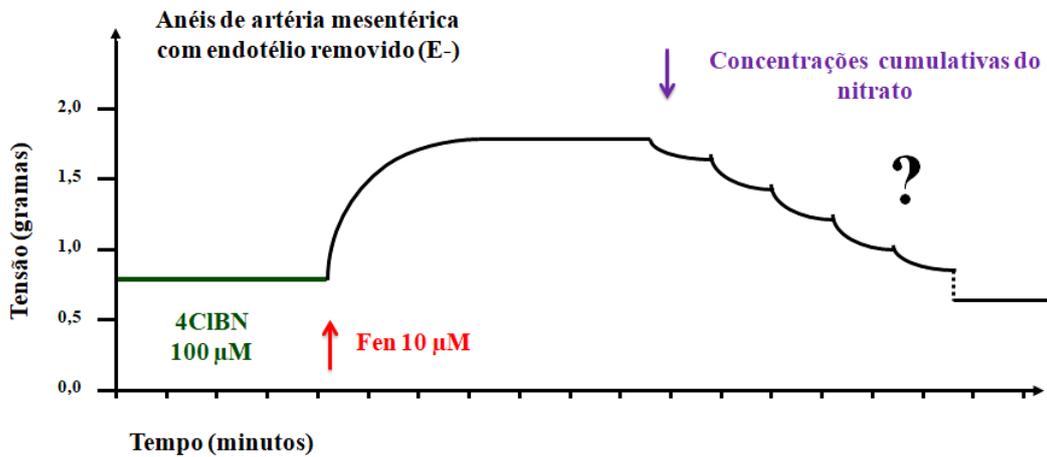


Autoria própria, 2023.

4.5.9 Avaliação da capacidade do 4CIBN em induzir tolerância farmacológica *ex vivo*

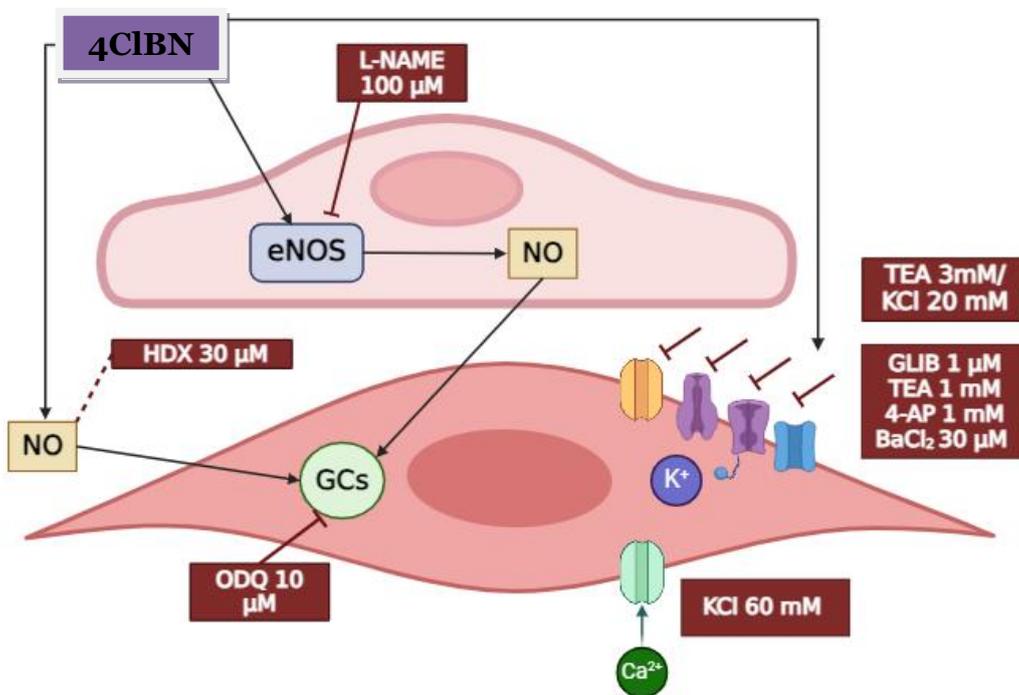
Por fim, buscou-se investigar se a exposição prévia ao 4CIBN seria capaz de reduzir sua potência ou a eficácia, atenuando seu efeito vasorrelaxante nos anéis de artéria mesentérica. Para tanto, foi realizado um ensaio em que os anéis E- foram incubados com o 4CIBN numa concentração de 100 μM durante 30 minutos (DAIBER, 2004). Após esse período os anéis foram lavados com a solução Tyrode, retornaram à tensão basal e foram submetidos à contração com FEN e subsequente curva de relaxamento (figura 12).

Figura 12: Esquema do protocolo experimental de tolerância farmacológica ex vivo utilizando pré-incubação com 4CIBN



Autoria própria, 2023.

Figura 13: Síntese de todos os protocolos experimentais realizados na investigação do mecanismo de ação vasorrelaxante do 4CIBN.



Autoria própria, 2023.

4.6 Análises estatísticas

As curvas dose-resposta de relaxamento foram criadas utilizando a regressão não-linear e em seguida foram calculados os valores de efeito máximo ($E_{máx}$) e potência farmacológica (pD_2). Para comparação destes dados foi utilizado o Teste T de Student não pareado. A comparação entre as curvas foi conduzida utilizando o teste estatístico ANOVA two-way e post-hoc de Bonferroni. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). A análise da AUC foi realizada calculando o delta entre os grupos e realizando teste T de Student não pareado ou ANOVA one way. O índice de significância estatística adotado foi o valor de $p < 0.05$. O programa utilizado para conduzir as análises foi o GraphPad Prism 6.0® (La Jolla, California, USA).

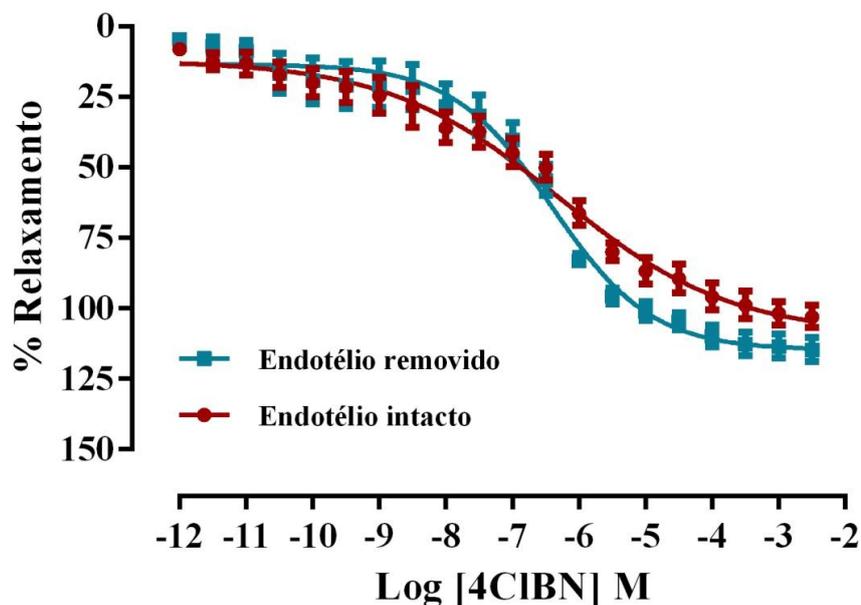
Resultados |

5 RESULTADOS

5.1 O 4C1BN induziu vasorrelaxamento concentração-dependente na presença e ausência de endotélio em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com FEN

Ao adicionar cumulativamente diferentes concentrações de 4C1BN nas cubas observou-se que os anéis de artéria mesentérica com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-) apresentaram perfil similar de vasorrelaxamento (gráfico 1). Ficou evidenciado que o percentual de relaxamento está condicionado ao aumento das concentrações de 4C1BN. Pode-se inferir que o mecanismo de relaxamento promovido pelo 4C1BN sobre as CMLV é possível sem influência determinante de mediadores derivados do endotélio.

Gráfico 1: Efeito vasorrelaxante induzido por concentrações cumulativas de 4C1BN em anéis de artéria mesentérica superior na ausência e presença de endotélio pré-contraídos com FEN (10 μ M).



As curvas concentração-resposta dos grupos endotélio removido (E-) e endotélio intacto (E+) foram realizadas calculando o percentual de relaxamento dos anéis a cada concentração de 4C1BN. Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados pelo teste ANOVA *two-way* seguido do post-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações.

Tabela 5: Valores de efeito máximo ($Emáx$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos E+ vs E-.

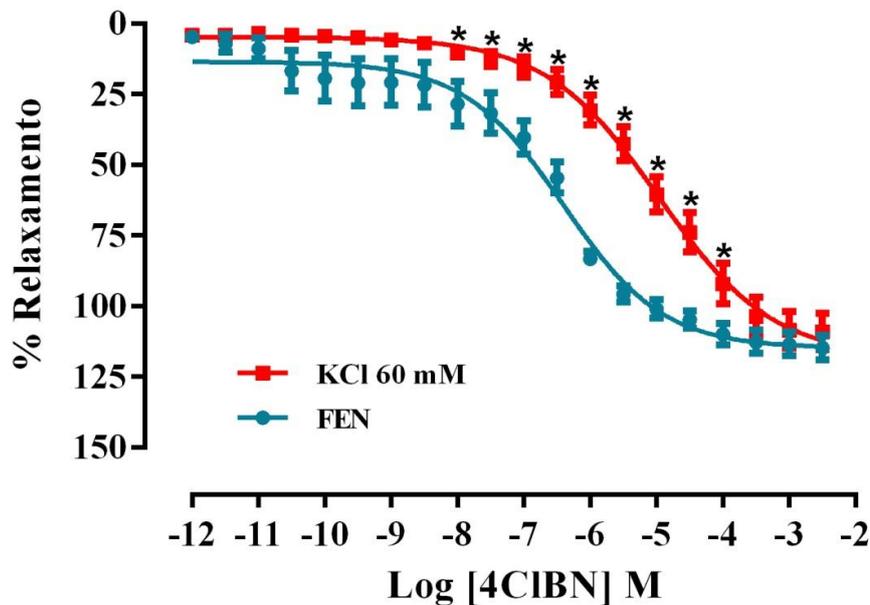
Endotélio intacto (n=7)		Endotélio removido (n=7)	
$Emáx \pm EPM$	$pD_2 \pm EPM$	$Emáx \pm SEM$	$pD_2 \pm EPM$
103,1±3,9	6,68±0,09	114,7±4,2	6,64 ±0,08

Os dados foram expressos como média \pm EPM e comparados pelo teste *t-student*.

5.2 A potência do 4CIBN foi reduzida em anéis de artéria mesentérica submetidos à contração via acoplamento eletromecânico utilizando KCl 60 mM

Este ensaio foi realizado no intuito de avaliar o vasorrelaxamento induzido por 4CIBN utilizando anéis de mesentérica E- pré-contraídos com Tyrode KCl (60mM). Os anéis foram contraídos via acoplamento eletromecânico, em que há despolarização da membrana devido à significativa retenção de K^+ e consequente abertura de canais voltagem-dependentes de Ca^{2+} . Observou-se houve um deslocamento da curva à direita, caracterizando a redução da potência do 4CIBN (tabela 6) ao comparar com o grupo controle pré-contraído com FEN (gráfico 2).

Gráfico 2: Vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 60 mM).



As curvas concentração-resposta dos grupos FEN e KCl 60 mM foram realizadas calculando o percentual de relaxamento dos anéis a cada concentração de 4CIBN. Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados pelo teste ANOVA *two-way* seguido do post-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações. * $p < 0,05$ vs. FEN.

Tabela 6: Valores de efeito máximo (Emáx) e potência (pD₂) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos FEN vs KCl 60 mM.

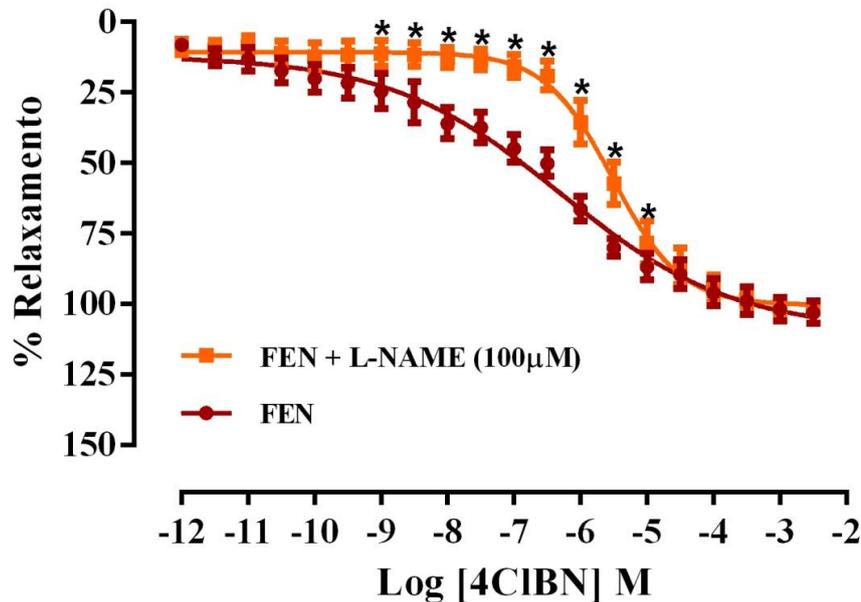
Endotélio removido+FEN (n=7)		Endotélio removido+KCl 60Mm (n=7)	
Emáx ± SEM	pD ₂ ± SEM	Emáx ± SEM	pD ₂ ± SEM
114,7±4,2	6,64 ±0,08	109,1±6,36	5,18±0,03*

Os dados foram expressos como média ± EPM e comparados pelo teste *t-student*. *p<0,05 vs FEN.

5.3 A inibição da NOS em anéis de artéria mesentérica com endotélio gerou redução na potência do efeito vasorrelaxante induzido por 4CIBN

Para avaliar a participação da NOS, a curva de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN foi realizada utilizando anéis E+ com NOS inibida utilizando o L-NAME (100 µM) (um inibidor não-seletivo da NOS). Observou-se o deslocamento da curva à direita (gráfico 3) e a redução da potência (tabela 7), porém não houve alteração na eficácia do 4CIBN, sugerindo que o mecanismo de ação pode envolver a produção de NO proveniente da NOS, mas de forma não exclusiva.

Gráfico 3: Participação da NOS no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).



As curvas concentração-resposta dos grupos FEN e FEN + L-NAME foram realizadas calculando o percentual de relaxamento dos anéis a cada concentração de 4CIBN. Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados pelo teste ANOVA *two-way* seguido do post-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações. * $p < 0,05$ vs FEN.

Tabela 7: Valores de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs bloqueio NOS (FEN+L-NAME).

Endotélio intacto + FEN (n=7)		Endotélio intacto + L-NAME (n=7)	
$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$
103,1 \pm 3,9	6,68 \pm 0,09	109,0 \pm 0,95	5,52 \pm 0.02*

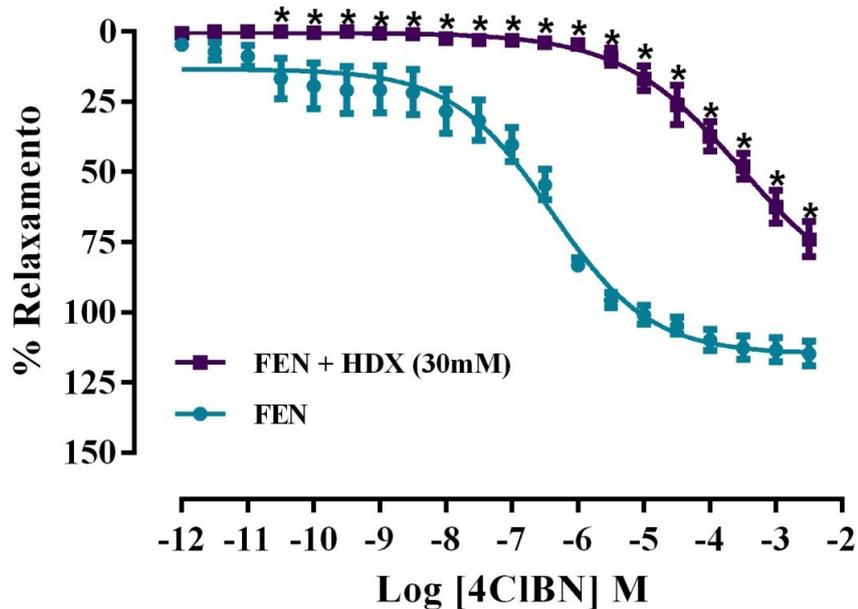
Os dados foram expressos como média \pm EPM e comparados pelo teste *t-student*. * $p < 0,05$ vs FEN.

5.4 O vasorrelaxamento induzido por 4CIBN envolve a doação de óxido nítrico e ativação da via NO/GCs/GMPc em anéis de artéria mesentérica sem endotélio

Ao realizar a curva de relaxamento concentração-resposta utilizando anéis E-incubados previamente com HDX (30 μ M), um sequestrador extracelular de NO \cdot , foi possível observar que o vasorrelaxamento foi significativamente atenuado (gráfico 4),

apresentando redução significativa da potência e efeito máximo induzido por 4CIBN (tabela 8).

Gráfico 4: Doação de NO e vasorrelaxamento induzidos por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).



As curvas concentração-resposta dos grupos FEN e FEN + HDX foram realizadas calculando o percentual de relaxamento dos anéis a cada concentração de 4CIBN. Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados pelo teste ANOVA *two-way* seguido do post-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações. * $p < 0,05$ vs FEN.

Tabela 8: Valores de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs NO sequestrado (FEN+HDX).

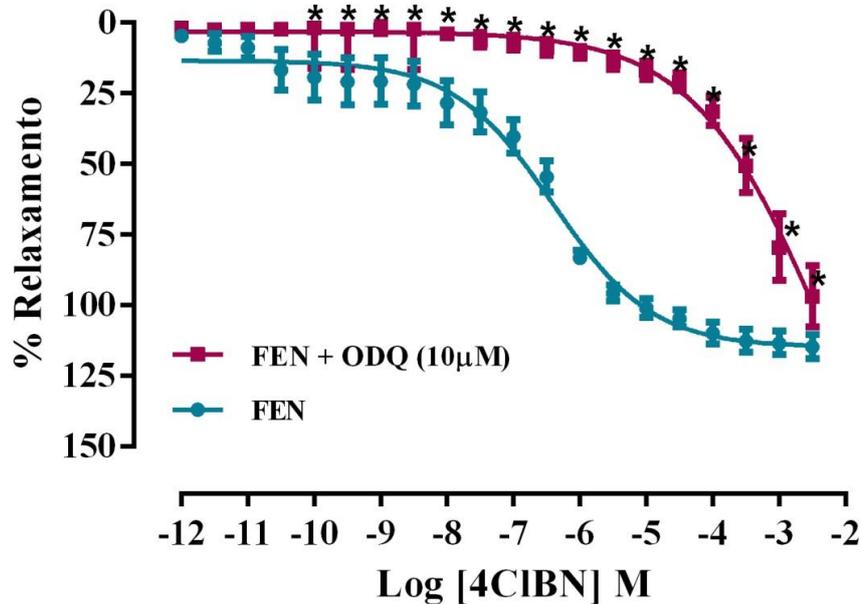
Endotélio removido (n=7)		Endotélio removido + HDX (30 μ M) (n=7)	
$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$
114,7 \pm 4,2	6,64 \pm 0,08	74,05 \pm 6,22*	4,08 \pm 0,06*

Os dados foram expressos como média \pm EPM e comparados pelo teste *t-student*. * $p < 0,05$ vs FEN.

Sabendo que a doação de NO faz parte do mecanismo de vasorrelaxamento induzido pelo 4CIBN, buscou-se investigar por quais vias ou proteínas-alvo o NO estaria efetivando sua resposta na célula muscular lisa. Assim, a curva de relaxamento concentração-resposta foi realizada utilizando anéis E- previamente incubados com

ODQ (10 μ M), um bloqueador da GCs. Foi possível observar grande deslocamento à direita (gráfico 5), e redução da potência (tabela 9).

Gráfico 5: Participação da GCs no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contráidos com FEN (10 μ M).



As curvas concentração-resposta dos grupos FEN e FEN + ODQ foram realizadas calculando o percentual de relaxamento dos anéis a cada concentração de 4CIBN. Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados pelo teste ANOVA *two-way* seguido do post-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações. * $p < 0,05$ vs FEN.

Tabela 9: Valores de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs bloqueio GCs (FEN+ODQ).

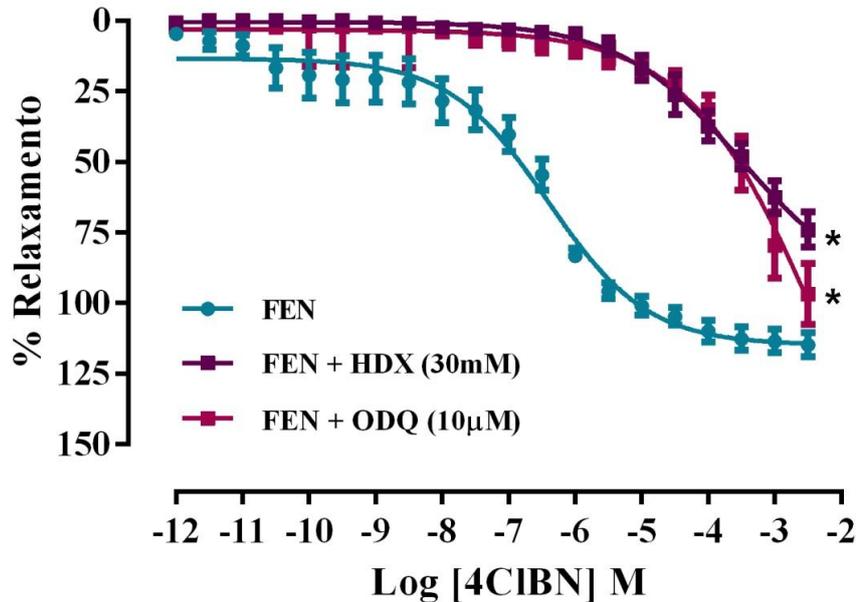
Endotélio removido (n=7)		Endotélio removido + ODQ (10 μ M) (n=7)	
$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$
114,7 \pm 4,2	6,64 \pm 0,08	96,84 \pm 10,86	3,69 \pm 0,06*

Os dados foram expressos como média \pm EPM e comparados pelo teste *t-student*. * $p < 0,05$ vs FEN.

Ao comparar as curvas e realizar a análise de AUC, observou-se que a atenuação do vasorrelaxamento foi semelhante entre os anéis incubados com ODQ versus anéis incubados com HDX, não havendo diferença estatística ao comparar esses grupos. Esse resultado corrobora com a ideia de que o 4CIBN estaria doando NO na sua forma

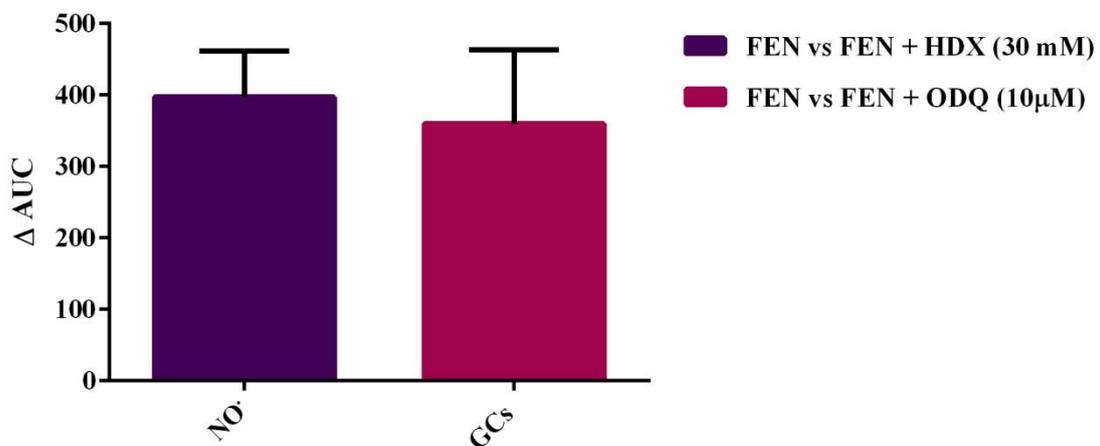
radicalar e ativando a guanilil ciclase solúvel para induzir o vasorrelaxamento na célula muscular lisa.

Gráfico 6: Comparação entre a doação de NO e participação da GCs no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).



As curvas concentração-resposta dos grupos FEN (N=7), FEN + HDX (N=7) e FEN + ODQ (N=7) foram realizadas calculando o percentual de relaxamento dos anéis a cada concentração de 4CIBN. Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados pelo teste ANOVA *two-way* seguido do post-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações. * $p < 0,05$ vs FEN.

Gráfico 7: Representação gráfica da diferença entre as áreas abaixo da curva (Δ AUC) dos grupos controle (FEN) vs sequestro NO (HDX) ou bloqueio GCs (ODQ).



A análise foi conduzida calculando o ΔAUC utilizando o grupo controle FEN (N=7) vs grupos FEN + HDX (N=7) e FEN + ODQ (N=7). A comparação estatística foi realizada utilizando o teste *t-student*. Não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$).

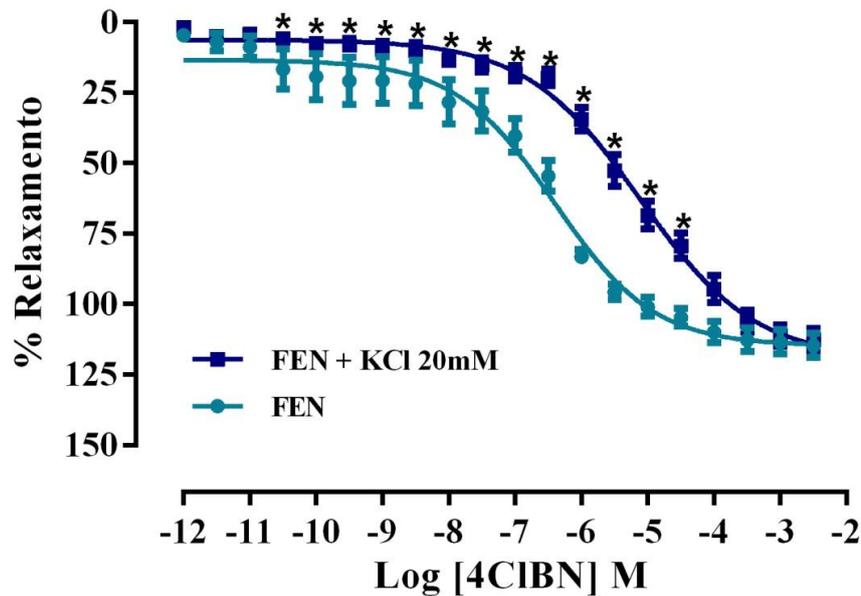
5.5 O mecanismo de ação do 4CIBN envolve os canais de potássio como alvos efetores da resposta vasorrelaxante

Buscando compreender outros possíveis alvos envolvidos no vasorrelaxamento induzido por 4CIBN, foi realizada uma curva de relaxamento concentração-resposta utilizando solução Tyrode enriquecida com KCl (20 mM).

Com o aumento da concentração de K^+ no meio extracelular há redução da saída desse cátion por seus respectivos canais, comprometendo o mecanismo de relaxamento mediado por hiperpolarização da membrana sarcoplasmática. A potência do 4CIBN foi significativamente reduzida (gráfico 6, tabela 10), sugerindo a participação dos canais de potássio no mecanismo de ação do composto.

A fim de corroborar com esse achado, foi realizado outro ensaio utilizando TEA na concentração 3mM – um bloqueador não-seletivo de canais de potássio. Nessa condição experimental, observou-se novamente que a potência do 4CIBN significativamente reduzida (gráfico 7, tabela 11). Esses achados reforçam a possibilidade da participação dos canais de K^+ na resposta vasorrelaxante.

Gráfico 8: Participação de canais de potássio no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).



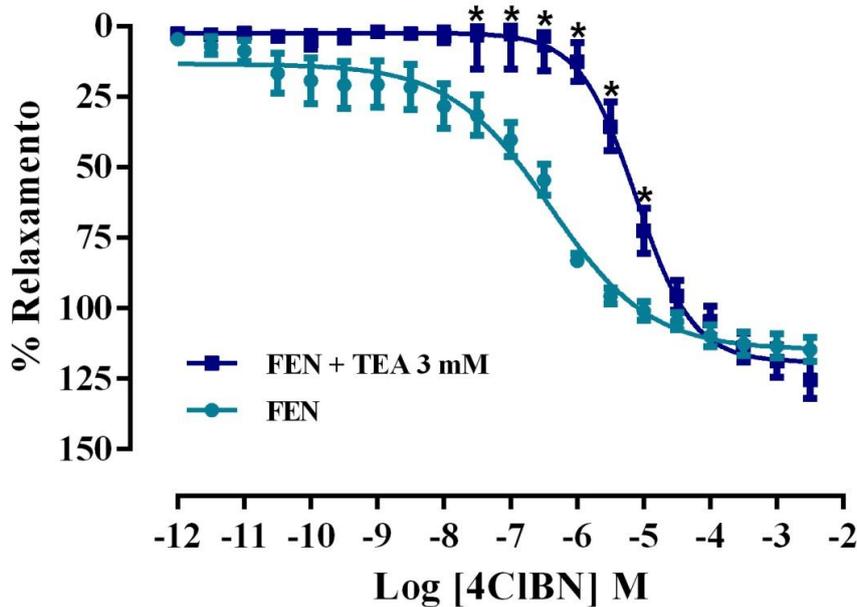
As curvas concentração-resposta dos grupos FEN e FEN + KCl 20mM foram realizadas calculando o percentual de relaxamento dos anéis a cada concentração de 4CIBN. Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados pelo teste ANOVA *two-way* seguido do post-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações. * $p < 0,05$ vs FEN.

Tabela 10: Valores de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs bloqueio K+ (FEN+KCl 20 mM).

Endotélio removido (n=7)		Endotélio removido + KCl 20 mM (n=7)	
$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$
114,7 \pm 4,2	6,64 \pm 0,08	112,7 \pm 3,98	5,35 \pm 0,05*

Os dados foram expressos como média \pm EPM e comparados pelo teste *t-student*. * $p < 0,05$ vs FEN.

Gráfico 9: Participação de canais de potássio no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).



As curvas concentração-resposta dos grupos FEN e FEN + TEA 3mM foram realizadas calculando o percentual de relaxamento dos anéis a cada concentração de 4CIBN. Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados pelo teste ANOVA *two-way* seguido do post-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações. * $p < 0,05$ vs FEN.

Tabela 11: Valores de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas concentração-resposta dos grupos controle (FEN) vs bloqueio K^+ (FEN+TEA 3mM).

Endotélio removido (n=7)		Endotélio removido + TEA 3 Mm (n=4)	
$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$
114,7 \pm 4,2	6,64 \pm 0,08	125,5 \pm 6,5	5,03 \pm 0,04*

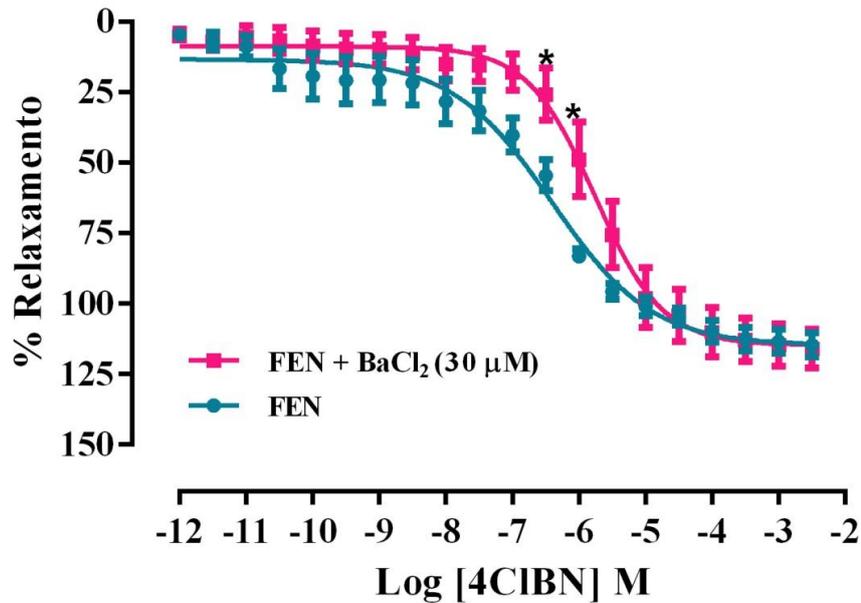
Os dados foram expressos como média \pm EPM e comparados pelo teste *t-student*. * $p < 0,05$ vs FEN.

5.6 Os canais de potássio dos subtipos voltagem-dependente (K_v), retificador de entrada (K_{ir}), sensível ao cálcio de larga condutância (BK_{ca}) e sensível ao ATP (K_{atp}) participam do mecanismo vasorrelaxante induzido por 4CIBN

Após constatar a participação dos canais de K^+ no vasorrelaxamento induzido pelo 4CIBN, buscou-se avaliar quais subtipos de canais de potássio poderiam estar de fato participando desse mecanismo. Assim, foi realizado ensaio utilizando o cloreto de bário ($BaCl_2$), um bloqueador seletivo dos canais K_{ir} . Ao realizar a curva de

relaxamento concentração-resposta foi observada redução da potência do 4CIBN em comparação ao controle (gráfico 8, tabela 12), sugerindo a participação desse subtipo de canal no mecanismo de ação do composto.

Gráfico 10: Análise da participação do canal Kir no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraído com FEN (10 μ M).



As curvas concentração-resposta dos grupos FEN e FEN + BaCl₂ foram realizadas calculando o percentual de relaxamento dos anéis a cada concentração de 4CIBN. Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados pelo teste ANOVA *two-way* seguido do post-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações. * $p < 0,05$ vs FEN.

Tabela 12: Valores de efeito máximo (Emáx) e potência (pD₂) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs bloqueio Kir (FEN+BaCl₂).

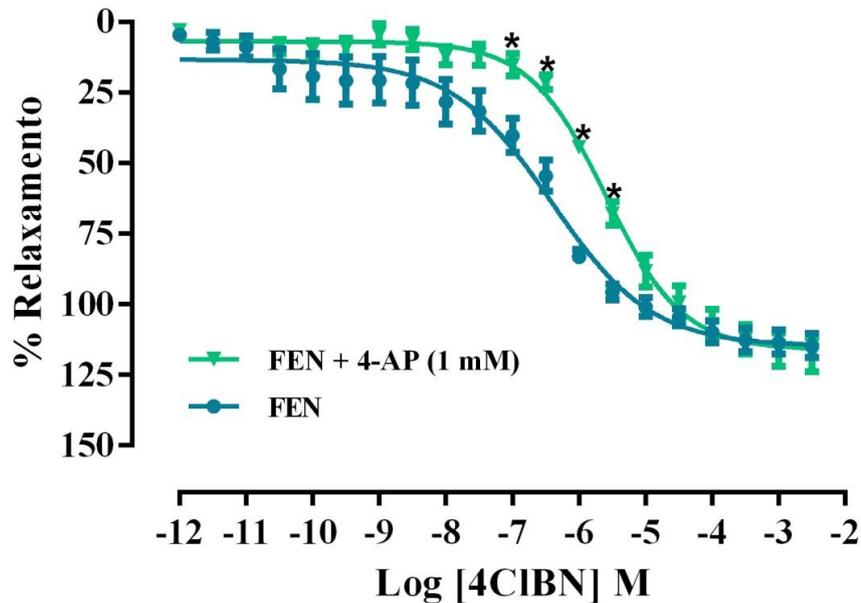
Endotélio removido (n=7)		Endotélio removido + BaCl ₂ 30 μ M (n=6)	
Emáx \pm SEM	pD ₂ \pm SEM	Emáx \pm SEM	pD ₂ \pm SEM
114,7 \pm 4,2	6,64 \pm 0,08	116,15 \pm 6,8	5,79 \pm 0,08*

Os dados foram expressos como média \pm EPM e comparados pelo teste *t-student*. * $p < 0,05$ vs FEN.

Ao dar seguimento na investigação sobre os tipos de canais de K⁺ envolvidos no vasorrelaxamento induzido pelo 4CIBN, foi realizado ensaio utilizando a 4-aminopiridina (4-AP), um bloqueador seletivo dos canais Kv. Nessa condição experimental foi observada redução significativa da potência do 4CIBN (gráfico 9,

tabela 13) em comparação ao controle, sugerindo a participação desse subtipo de canal no mecanismo de ação do composto.

Gráfico 11: Análise da participação do canal Kv no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).



As curvas concentração-resposta dos grupos FEN e FEN + 4-AP foram realizadas calculando o percentual de relaxamento dos anéis a cada concentração de 4CIBN. Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados pelo teste ANOVA *two-way* seguido do post-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações. * $p < 0,05$ vs FEN.

Tabela 13: Valores de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas concentração-resposta dos grupos controle (FEN) vs bloqueio Kv (FEN+4-AP).

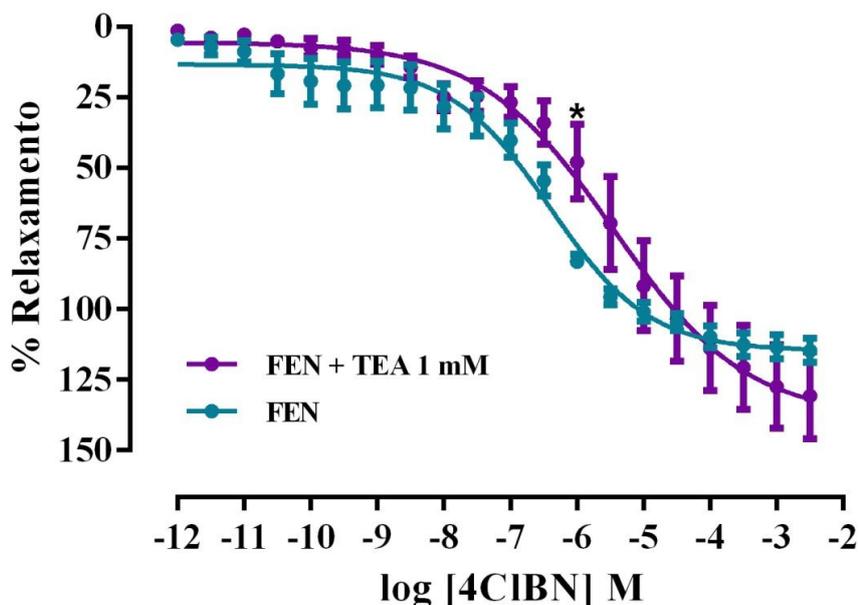
Endotélio removido (n=7)		Endotélio removido + 4-AP 1 Mm (n=6)	
$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$
114,7 \pm 4,2	6,64 \pm 0,08	117,9 \pm 6,06	5,06 \pm 0,04*

Os dados foram expressos como média \pm EPM e comparados pelo teste *t-student*. * $p < 0,05$ vs FEN.

Posteriormente, foi realizado ensaio utilizando o TEA na concentração de 1 mM, que é capaz de gerar um bloqueio seletivo dos canais BKca. Ao realizar a curva de relaxamento concentração-resposta foi observada redução significativa da potência do

4CIBN (gráfico 10, tabela 14) em comparação ao controle, sugerindo a participação desse subtipo de canal no mecanismo de ação do composto.

Gráfico 12: Participação do canal BKca no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).



As curvas concentração-resposta dos grupos FEN e FEN + TEA 1mM foram realizadas calculando o percentual de relaxamento dos anéis a cada concentração de 4CIBN. Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados pelo teste ANOVA *two-way* seguido do post-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações. * $p < 0,05$ vs FEN.

Tabela 14: Valores de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs bloqueio BKca (FEN+TEA 1mM).

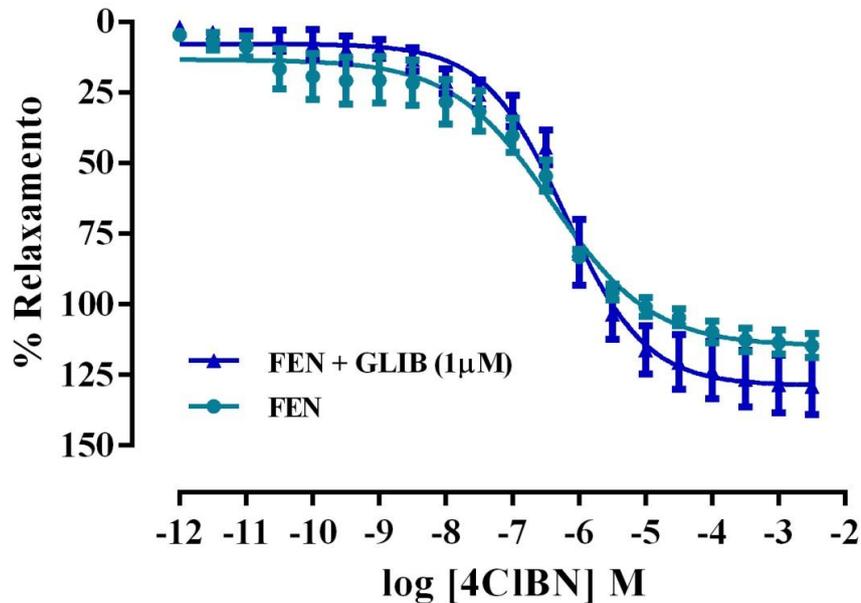
Endotélio removido (n=7)		Endotélio removido + TEA 1 mM (n=5)	
$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$
114,7 \pm 4,2	6,64 \pm 0,08	130,74 \pm 15,4	5,06 \pm 0,12*

Os dados foram expressos como média \pm EPM e comparados pelo teste *t-student*. * $p < 0,05$ vs FEN.

Para finalizar a investigação sobre subtipos de canais de K^+ , foi realizado ensaio utilizando a glibenclamida (GLIB), um inibidor seletivo dos canais K_{atp} . Ao realizar a curva de relaxamento concentração-resposta foi observada potência reduzida

significativamente (tabela 15) do 4CIBN em comparação ao controle, sugerindo a participação desse subtipo de canal no mecanismo de ação do composto.

Gráfico 13: Participação do canal Katp no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contráidos com FEN (10 μ M).



As curvas concentração-resposta dos grupos FEN e FEN + GLIB foram realizadas calculando o percentual de relaxamento dos anéis a cada concentração de 4CIBN. Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados pelo teste ANOVA *two-way* seguido do post-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações.

Tabela 15: Valores de efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs bloqueio Katp (FEN+GLIB).

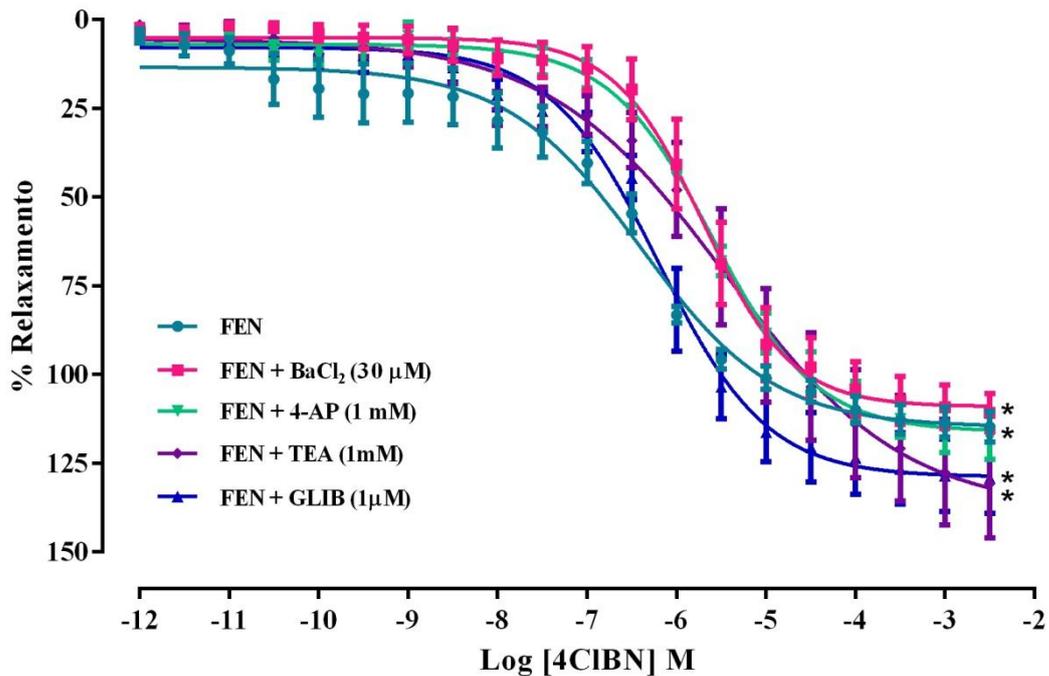
Endotélio removido (n=7)		Endotélio removido + GLIB 1 μ M (n=5)	
$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{m\acute{a}x} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$
114,7 \pm 4,2	6,64 \pm 0,08	129,16 \pm 10,10	6,30 \pm 0,07*

Os dados foram expressos como média \pm EPM e comparados pelo teste *t-student*. * $p < 0,05$ vs FEN.

Em conjunto, ao comparar as curvas obtidas na presença dos bloqueadores de canais de potássio e realizar a análise de AUC observou-se que a atenuação do vasorrelaxamento foi semelhante entre os quatro grupos com os canais de potássio específicos bloqueados, não havendo diferença estatística ao comparar esses grupos.

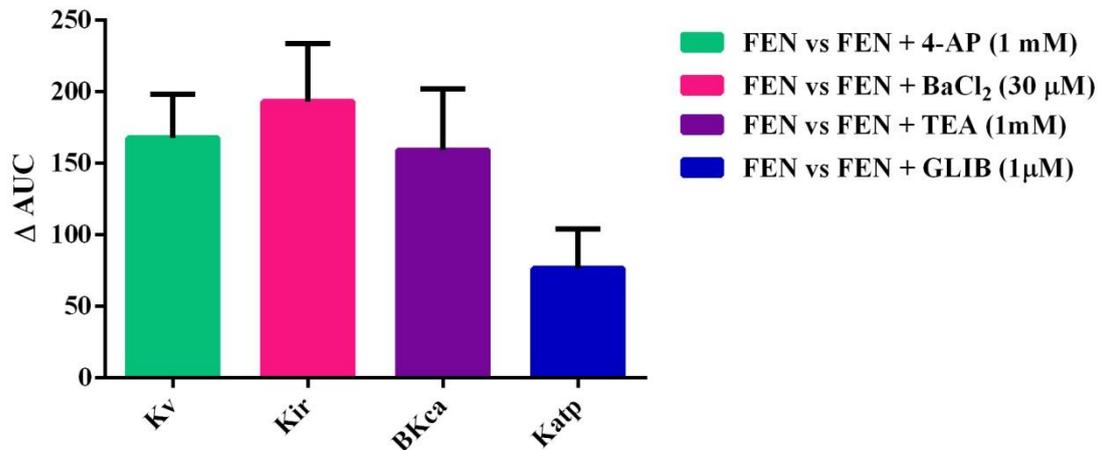
Dessa forma, observou-se que o 4CIBN possivelmente utiliza canais de potássio de forma mais inespecífica, gerando hiperpolarização e vasorrelaxamento.

Gráfico 14: Comparação da participação dos subtipos de canal de potássio no mecanismo de vasorrelaxamento induzido por concentrações cumulativas de 4CIBN em anéis de artéria mesentérica superior de ratos normotensos pré-contraídos com FEN (10 μ M).



As curvas concentração-resposta dos grupos FEN (N=7), FEN + BaCl₂ (N=5), FEN + 4-AP (N=5), FEN + TEA (N=5) e FEN + GLIB (N=5) foram realizadas calculando o percentual de relaxamento dos anéis a cada concentração de 4CIBN. Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados pelo teste ANOVA *two-way* seguido do post-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações. * $p < 0,05$ vs FEN.

Gráfico 15: Representação gráfica da diferença entre as áreas abaixo da curva (ΔAUC) dos grupos controle (FEN) vs FEN + BaCl₂, FEN + 4-AP, FEN + TEA e FEN + GLIB.

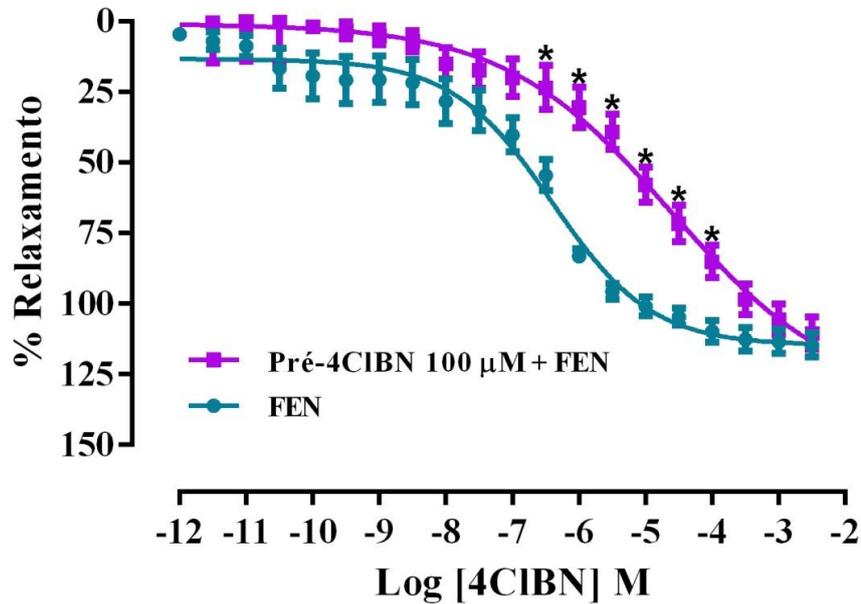


A análise foi conduzida calculando o ΔAUC utilizando o grupo controle FEN (N=5) vs grupos FEN + BaCl₂ (N=5), FEN + 4-AP(N=5), FEN + TEA (N=4) e FEN + GLIB (N=4). A comparação estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA One-way. Não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$).

5.7 A pré-exposição ao 4CIBN em anéis de artéria mesentérica atenuou a potência do seu efeito vasorrelaxante

Para avaliar se o 4CIBN seria capaz de induzir tolerância farmacológica ainda utilizando a metodologia *ex vivo*, foi realizado um protocolo de pré-exposição dos anéis de mesentérica ao composto. Os anéis permaneceram em incubação com o 4CIBN na concentração de 100 μM durante meia hora, e após lavagem com a solução Tyrode foi realizada a curva de relaxamento concentração-resposta. Observou-se a redução significativa da potência (gráfico 12, tabela 16) do 4CIBN nos anéis pré-expostos, porém o efeito máximo foi mantido.

Gráfico 16: Análise da indução de tolerância em anéis pré-expostos ao 4CIBN submetidos à curva de relaxamento concentração-resposta.



As curvas concentração-resposta dos grupos FEN e 4CIBN 100 µM + FEN foram realizadas calculando o percentual de relaxamento dos anéis a cada concentração de 4CIBN. Os dados foram expressos como média ± EPM e analisados pelo teste ANOVA *two-way* seguido do post-hoc de Bonferroni para múltiplas comparações. * $p < 0,05$ vs FEN.

Tabela 16: Valores de efeito máximo ($E_{máx}$) e potência (pD_2) calculados a partir das curvas de relaxamento concentração-resposta ao 4CIBN dos grupos controle (FEN) vs Pré-4CIBN (4CIBN 100 µM + FEN).

Endotélio removido (n=7)		Endotélio removido + 4CIBN 100 µM (n=6)	
$E_{máx} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$	$E_{máx} \pm SEM$	$pD_2 \pm SEM$
114,7±4,2	6,64 ±0,08	110,65±5,73	5,19±0,07*

Os dados foram expressos como média ± EPM e comparados pelo teste *t-student*. * $p < 0,05$ vs FEN.

Discussão |

6 DISCUSSÃO

Os nitratos orgânicos constituem uma classe de fármacos vasodilatadores de relevância clínica, reconhecidos por serem eficazes em situações patológicas agudas como as emergências hipertensivas, hipertensão pulmonar, angina *pectoris* e insuficiência cardíaca (FRANÇA-SILVA et al, 2014). Apesar da relevância desses fármacos no contexto da cardiologia, há uma limitação em seu uso devido à tolerância farmacológica, que reduz a eficácia hemodinâmica e anti-isquêmica (OLIVEIRA et al, 2017). Assim, faz-se necessário o desenvolvimento e o estudo de novas moléculas que possam oferecer uma boa janela terapêutica, eficácia, e baixa tolerância.

O presente estudo avaliou os efeitos e mecanismos de ação de um novo nitrato orgânico, o 4-clorobenzoato de 4-nitrooxibutíla realizando ensaios *ex vivo* com artéria mesentérica superior de ratos Wistar normotensos. O 4CIBN foi capaz de promover uma resposta vasorrelaxante de forma eficaz observada em anéis de artéria mesentérica (E+ ou E-) pré-contraídos com fenilefrina. O relaxamento se caracteriza por ser dependente de concentração, ou seja, quanto maior a concentração do 4CIBN, maior a resposta vasorrelaxante obtida com esse nitrato.

Os nitratos orgânicos são fármacos que possuem como efeito clássico o relaxamento do músculo liso vascular independente da presença do endotélio (PORPINO et al, 2016). Apesar disso, o mecanismo de ação dos nitratos orgânicos pode diferir devido às características moleculares distintas desses fármacos, levando ao entendimento da maior potência ou eficácia entre esses compostos (DIVAKARAN, LOSCALZO, 2017).

O 4CIBN é um nitrato que foi sintetizado a partir da estrutura molecular do BBN, utilizado no estudo de Rocha (2021), sendo a principal diferença entre as duas moléculas a presença do Cl adicionado ao anel aromático. Um estudo *in silico* demonstrou que a adição do Cl em moléculas de fármacos já conhecidos melhorou a performance farmacocinética (melhor absorção), com baixo efeito tóxico e melhora na afinidade do complexo fármaco-receptor, melhorando também a potência farmacológica (JOSHI, SRIVASTAVA, 2023). Embora nosso estudo não tenha avaliado a farmacocinética da droga, nossa hipótese era que o 4CIBN apresentasse melhor potência.

O presente estudo possibilitou a comparação entre o 4CIBN e o BBN, utilizando a metodologia *ex vivo*, realizando a curva de relaxamento concentração-resposta em

anéis sem endotélio de artéria mesentérica de ratos. Ao comparar os dados obtidos no estudo de Rocha (2021) com o atual trabalho, não foi observada diferença estatística significativa entre a potência nem eficácia das duas moléculas: 4CIBN ($E_{max}=114,7$; $pD_2=6,6$) BBN ($E_{max}=111,1$; $pD_2=6,6$) $p=0,48$ (E_{max}), $p=0,77$ (pD_2). Sendo assim, podemos sugerir que a adição do Cl não foi capaz de alterar/modificar potência e eficácia nesse confronto de estrutura.

Avaliou-se o mecanismo de vasorrelaxamento induzido por 4CIBN após a contração induzida pela solução despolarizante de Tyrode enriquecida com KCl (60mM) e foi observada atenuação na potência. O acoplamento eletromecânico é uma das formas de induzir contração no músculo liso vascular por meio da despolarização da membrana e consequente abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem, que proporcionam a entrada desse íon na célula e posterior ativação da calmodulina, da MLCK e a geração de força e tensão (JOHANSSON, 1971).

Ao gerar a despolarização em decorrência da alteração do gradiente de concentração iônico do meio é possível gerar, de forma experimental, uma contração rápida frente abertura de canais Cav. Essa condição permite a ativação da via da sensibilização ao cálcio utilizando a Rho-quinase (ROCK) que promove a manutenção da contração pela inibição da fosfatase de miosina (SOMLYO A, SOMLYO A, 2000).

Foi observado que a capacidade do 4CIBN em gerar vasorrelaxamento nessa condição foi reduzida (porém não abolida, pois foi mantido o efeito máximo). Isso nos sugere que possivelmente o mecanismo de vasorrelaxamento envolve diferentes alvos que não necessariamente sejam o fechamento dos Cav ou a inativação da ROCK, ou que até permitam essas ações, porém são necessárias concentrações superiores do composto para atingir a CE_{50} .

Esse resultado foi distinto em comparação à molécula-irmã BBN, que não apresentou atenuação na curva concentração-resposta frente à pré-contração utilizando KCl 60mM. Rocha investigou acerca dos canais Cav no intuito de averiguar se esses canais estariam envolvidos com o mecanismo vasorrelaxante e essa hipótese foi confirmada.

Nitratos orgânicos como o BBN, assim como fármacos vasodilatadores de outras classes como o nicorandil, possuem como alvo os canais de cálcio voltagem-dependentes de membrana. Esses compostos são capazes de bloquear esses canais, gerando vasorrelaxamento pela redução da entrada de cálcio na CMLV.

Os protocolos experimentais que utilizam a pré-contracção com KCl 60mM não são capazes de trazer respostas categóricas a respeito da modulação do cálcio mioplasmático promovida por substâncias vasodilatadoras. Para tanto, seria necessário avaliar outros alvos como a atividade da SERCA, da PMCA, trocador NCX e entre outros. Porém, permitem uma análise inespecífica e ampla, sugerindo a atuação ou não dos canais do tipo Cav no mecanismo de ação.

Nitratos orgânicos são potenciais doadores de NO, liberando essa molécula ao sofrer processos de bioativação enzimática, ou até de forma espontânea, nas CMLVs (MÜNZEL et al, 2014). Fisiologicamente, as células endoteliais ao serem estimuladas mecanicamente pela força de cisalhamento, ou por moléculas sinalizadoras, têm seus respectivos receptores de membrana ativados levando ao aumento da concentração de cálcio intracelular, ligação do cálcio à calmodulina e ativação da NOS culminando na produção de NO (SILVA et al, 2021). Além da eNOS, podemos encontrar também a isoforma nNOS no vaso, principalmente nas CMLV, que irá contribuir também para produção de NO necessária para regulação do tônus vascular (BOUGHLEB, 2022).

Em nosso modelo experimental, ao inibir as isoformas da NOS utilizando o L-NAME a potência do 4CIBN foi reduzida, mas seu efeito máximo foi preservado. Importante ressaltar que os nitratos orgânicos aumentam significativamente a biodisponibilidade de NO e geralmente não utilizam do endotélio para alcançar esse efeito (IGNARRO, 1989).

Estudos prévios utilizando diferentes nitratos orgânicos demonstraram a doação de NO independente da participação da NOS. Bernardino-Paula (2020) ao realizar a curva de relaxamento concentração-resposta ao 2-nitrato-1,3-di(octanoxi)propano (NDOP) em anéis E+ de aorta de camundongo incubados com L-NAME não observou nenhuma alteração na potência ou efeito máximo do composto testado. Zhuge (2017) e Cavalcanti (2022) realizaram o mesmo ensaio com diferentes nitratos (NDHP e NDIBP, respectivamente) utilizando anéis de artéria mesentérica de ratos e também não identificaram a não alteração do EC₅₀ e Emax frente a inibição da NOS.

A redução da potência do 4CIBN ao bloquear a NOS é um resultado inesperado diante do mecanismo apresentado pela maioria dos demais nitratos orgânicos. Apesar disso, observando de maneira mais ampla, outros doadores de NO utilizam a NOS para promover a liberação de NO. Bonaventura (2008) realizou ensaio utilizando nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta de rato incubadas com L-NAME e foi observada a atenuação do vasorrelaxamento de forma significativa. Diante desses

achados, sugerimos que o 4CIBN pode estar melhorando a biodisponibilidade de NO via utilização da NOS, mas que a presença da NOS não é inteiramente necessária para atingir o efeito máximo do composto.

A respeito da doação direta de NO promovida pelo 4CIBN, observou-se que a potência e o efeito máximo foram atenuados significativamente quando os anéis de mesentérica foram incubados com o sequestrador HDX, porém a resposta vasorrelaxante não foi abolida. A HDX é capaz de ligar-se ao NO radicalar presente no meio extracelular, de forma que não sequestra o NO formado no interior da CMLV ou já ligado à outra proteína (KRUSZYNA et al, 1998). Na concentração mais elevada do 4CIBN foi possível obter 70% do relaxamento dos anéis, indicando possivelmente uma produção tão elevada de NO que superou a capacidade de sequestro da HDX na concentração que foi usada nesse protocolo experimental.

Para aprofundar o mecanismo de ação do 4CIBN e ratificar a participação do NO nesse efeito vasorrelaxante, foi investigada a participação da guanilil ciclase (GCs) no mecanismo de vasorrelaxamento. Sabe-se que a GCs é um dos principais alvos da cascata de sinalização promovida pelo NO em diversos órgãos e também é uma das principais vias dos nitratos orgânicos na promoção de vasorrelaxamento (DAIBER et al, 2010).

A GCs é uma enzima que se encontra no citoplasma e é capaz de converter o GTP em GMPc, que por sua vez irá atuar em alvos como a proteína cinase G, uma das principais proteínas efetoras na resposta de relaxamento do músculo liso (SANDER et al, 2019). A inibição farmacológica da GCs com ODQ promoveu uma redução da potência do 4CIBN, atenuando o efeito vasorrelaxante induzido pelo 4CIBN.

Apesar de o vasorrelaxamento ter sido comprometido nos ensaios utilizando HDX e ODQ, a resposta não foi inteiramente abolida na presença dessas ferramentas farmacológicas. Isso nos sugere que, possivelmente a via NO-GCs-GMPc-PKG seja um dos principais mecanismos de ação do 4CIBN, porém, em concentrações mais elevadas, a molécula pode estar atuando diretamente em outros alvos, ou mais possivelmente, o próprio NO doado pode estar atuando sobre outras proteínas-alvo.

De forma majoritária, o efeito vasorrelaxante dos nitratos orgânicos é baseado na ativação da via da GCs e PKG, como é possível observar nos estudos de França (2012) e Bernardino (2020) que observaram o efeito vasorrelaxante praticamente abolido dos nitratos testados (NDPB e NDOP, respectivamente) ao realizar incubação com ODQ. O BBN (ROCHA, 2021) apresentou resposta vasorrelaxante semelhante ao 4CIBN frente

a inibição da GCs, em que observamos que ainda há um vasorrelaxamento considerável nas concentrações mais elevadas.

O NO pode agir diretamente em outras proteínas-alvo, como por exemplo, canais de membrana. Esse processo denomina-se S-nitrosilação, no qual o NO liga-se a porções específicas de proteínas-alvo alterando sua conformação, podendo abrir ou fechar canais, ativar ou inativar enzimas (SUN et al, 2006). Essa poderia ser uma possível justificativa para explicar o fato de a resposta vasorrelaxante não ter sido extinguida em concentrações mais altas do 4CIBN mesmo com a inibição de GCs.

Dentre os diversos canais iônicos de membrana, os canais de potássio encontram-se em grande quantidade e em diferentes isoformas. Eles promovem a manutenção do potencial de repouso da membrana celular e são importantes proteínas-alvo na geração de diversas respostas fisiológicas. Eles podem ser modulados por diferentes estímulos e a partir do momento que são abertos eles geram efluxo de potássio e hiperpolarização, tornando mais difícil a abertura de canais voltagem-dependentes de cálcio do tipo L ou T. A consequência desse evento é o relaxamento da CMLV (BRAYDEN, 1996).

Nos dois ensaios realizados para avaliar a participação desses canais a potência do 4CIBN foi reduzida, mas não seu efeito máximo, sugerindo que os canais de potássio podem estar contribuindo para o mecanismo de vasorrelaxamento. Conforme discutido anteriormente, além da participação da via NO-GCs-GMPc, a nitrosilação direta de canais é uma possibilidade para explicar a abertura dos canais de potássio (BROILLET, 1999).

É importante ressaltar que a resposta vasorrelaxante diante do bloqueio inespecífico de canais de K⁺ não apresentou o efeito máximo prejudicado. Diferente dos ensaios utilizando a HDX e o ODQ. Dessa forma, é possível inferir que a via NO-GCs-GMPc ainda pode ser considerada a protagonista no que se diz respeito ao mecanismo de ação de 4CIBN.

Deve-se levar em consideração que o aumento intracelular do GMPc e possível ativação da PKG implica na modificação de outros alvos além dos canais iônicos de membrana. Por exemplo: a SERCA pode ser mais ativada, a fosfatase de miosina também. Outros mecanismos podem gerar a redução da força e tensão na CMLV. Esses alvos não foram estudados nos protocolos experimentais realizados, mas são relevantes e podem estar presentes nesse mecanismo.

No músculo liso vascular existem alguns subtipos de canais para K^+ que estão fisiologicamente relacionados com a regulação do tônus vascular. Em síntese citamos, segundo BRAYDEN, 1996:

1. K_v – são ativados por despolarização na membrana, e irão contribuir para o retorno ao potencial de repouso;
2. BK_{ca} – ativados por despolarização e Ca^{2+} , promovem a regulação intrínseca do tônus vascular por *feedback* negativo;
3. K_{atp} – pode ser ativado por agentes farmacológicos ou pela PKA, promove hiperemia reativa e pode contribuir para o potencial de repouso.
4. K_{ir} – são estimulados por hiperpolarização ou aumento extracelular de K^+ , contribuem com a manutenção do potencial de repouso além do vasorrelaxamento em algumas regiões.

O 4CIBN apresentou sua potência reduzida em todos os ensaios de investigação específica dos subtipos de canais de K^+ , indicando a participação de cada um dos quatro citados anteriormente no seu mecanismo de vasorrelaxamento.

Ao observar a curva concentração-resposta fica evidente, devido ao deslocamento à direita, a participação dos canais K_v , K_{ir} e BK_{ca} . Já o canal K_{atp} apresentou o valor de pD_2 atenuado ao realizar o teste estatístico, mas ao realizar a análise ponto a ponto da curva não foi perceptível a diferença em relação ao controle em comparação aos efeitos observados ao bloquear os demais canais.

O canal do tipo K_v possui várias isoformas que estão densamente presentes em CMLV, inclusive na artéria mesentérica. Já foi descrito que esse tipo de canal pode ser aberto, além da alteração da voltagem, por meio do próprio NO ou GMPc (JACKSON, 2017). Canais do tipo BK_{ca} não somente são altamente expressos no músculo liso vascular, como têm sido considerados um dos principais alvos da via GMPc-PKG (WU, MARX, 2010).

Esses dados corroboram com o vasorrelaxamento promovido por 4CIBN ter sido atenuado ao sequestrar o NO doado, inibir a GCs e bloquear especificamente esses dois subtipos de canais de potássio. Isso pode indicar que a participação desses canais pode estar relacionada com a ação do próprio NO ou da via NO-GCs-GMPc.

Apesar de ser encontrado em pouca quantidade no músculo liso de artérias mesentéricas, o canal do tipo K_{ir} demonstra a capacidade de amplificar correntes de

efluxo de K^+ , e conseqüentemente gerar a hiperpolarização e dilatação de artérias (SMITH et al.,2008).

Em nosso estudo esse tipo de canal demonstrou contribuir de forma significativa no processo de vasorrelaxamento induzido por um nitrato orgânico. Há possibilidade de esse canal estar sendo aberto por ação do NO ou da via GCs-GMPc (conforme discutido anteriormente), porém pode estar havendo uma espécie de relação entre a abertura de outros tipos de canais de K^+ e essa alteração na condutância ao íon estar colaborando para a abertura do Kir.

Por fim, avaliamos a capacidade do 4CIBN em induzir tolerância farmacológica ao pré-expor anéis de mesentérica ao nitrato antes de realizar a curva de relaxamento concentração-resposta. Foi observada redução significativa da potência do 4CIBN nos anéis pré-expostos, indicando que a resposta vasorrelaxante foi prejudicada e conseqüentemente uma possível tolerância. Resultado esse divergente do observado na molécula-irmã BBN, que não induziu tolerância *ex vivo*.

A tolerância farmacológica induzida por nitratos orgânicos, como a nitroglicerina e o mononitrato de isossorbida, ocorre principalmente por conta de alterações a nível mitocondrial, em que o aumento da biodisponibilidade do NO acaba prejudicando de forma paradoxal a produção do mesmo, havendo desacoplamento da cadeia respiratória e aumento da produção de ROS como O_2^- , levando ao dano celular oxidativo e conseqüente prejuízo da função (GORI et al, 2007).

O ensaio *ex vivo* por si só não é suficiente para afirmar que o 4CIBN seria capaz de evocar a tolerância farmacológica envolvendo mecanismos mais complexos, dessa forma é necessária a realização de experimentos *in vivo* para confirmar esses efeitos. Porém, é possível afirmar que a adição de Cl na molécula do BBN pode ter ocasionado alguma mudança significativa na farmacodinâmica que corroborou para essa atenuação da resposta vasorrelaxante diante da pré-exposição à molécula.

Conclusão |

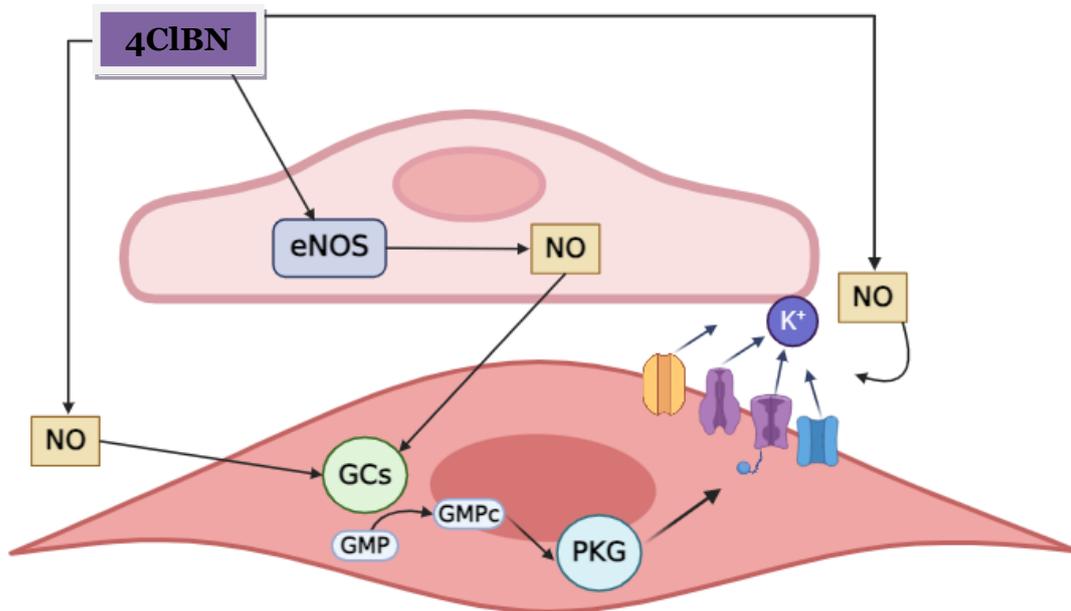
7 CONCLUSÃO

O 4CIBN foi capaz de evocar uma resposta vasorrelaxante concentração-dependente em vasos com ou sem endotélio íntegro.

O mecanismo de ação sugerido envolve a doação de NO radicalar e ativação da via NO-GCs-GMPc. Além disso, foi evidenciada a participação de canais de potássio dos subtipos Kir, Kv, BKca e Katp das CMLV, contribuindo para o vasorrelaxamento induzido pela substância.

Apesar disso, o 4CIBN induziu tolerância farmacológica no modelo *ex vivo* em anéis pré-expostos ao composto. Dessa forma, o novo nitrato não apresentou vantagem farmacológica em relação à molécula antecessora (BBN), indicando que a adição de Cloro não proporcionou os benefícios farmacodinâmicos esperados.

Figura 14: Síntese do mecanismo de ação vasorrelaxante do 4CIBN.



Created in BioRender.com 

Autoria própria, 2024.

Referências |

REFERÊNCIAS

ADARAMOYE, Oluwatosin A.; MEDEIROS, Isac A. Endothelium-independent vasodilation induced by kolaviron, a biflavonoid complex from *Garcinia kola* seeds, in rat superior mesenteric arteries. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 45, n. 1, p. 39-53, 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.1540/jsmr.45.39>>.

AHMAD, A., DEMPSEY, S. K., DANEVA, Z., AZAM, M., LI, N., LI, P. L., RITTER, J. K. Role of nitric oxide in the cardiovascular and renal systems. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 2605, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.3390/ijms19092605>>.

ALLEN, Bruce G.; WALSH, Michael P. The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. **Trends in biochemical sciences**, v. 19, n. 9, p. 362-368, 1994. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90112-0)>.

BARRETO, R.L.; CORREIA, C.R.D.; MUSCARÁ, M.N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química nova**, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600020>>.

BARROSO, W.K.S. et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial–2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, p. 516-658, 2021. Disponível em: < <http://departamentos.cardiol.br/sbc-dha/profissional/pdf/Diretriz-HAS-2020.pdf>>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Boletim temático da biblioteca do Ministério da Saúde – saúde do coração. **Secretaria Executiva do Ministério da Saúde**. v.2, n.9, 2022. Disponível em: < <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/>>.

BERNARDINO-PAULA, Ricardo et al. The new organic nitrate 2-nitrate-1, 3-diocthanoxypropan (NDOP) induces nitric oxide production and vasorelaxation via activation of inward-rectifier potassium channels (KIR). **Nitric Oxide**, v. 104, p. 61-69, 2020. Doi: < <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.10.001>>.

BOUGHALEB, Hasnae et al. Biological Assessment of the NO-Dependent Endothelial Function. **Molecules**, v. 27, n. 22, p. 7921, 2022. Disponível em: < <https://doi.org/10.3390/molecules27227921>>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria GM/MS nº 3.008, de 4 de novembro de 2021. Disponível em: < https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saps/ecv/legislacao/copy_of_portaria-gm-ms-no-3-008-de-4-de-novembro-de-2021/view>.

BRAYDEN, Joseph E. Potassium channels in vascular smooth muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 23, n. 12, p. 1069-1076, 1996. Doi: < doi.org/10.1111/j.1440-1681.1996.tb01172.x>.

BROILLET, M.-C. S-nitrosylation of proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 55, p. 1036-1042, 1999.

BROZOVICH, FV. et al. Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the

basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders. **Pharmacological reviews**, v. 68, n. 2, p. 476-532, 2016. Doi:<<http://dx.doi.org/10.1124/pr.115.010652>>.

BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Molecular aspects of medicine**, v. 26, n. 1-2, p. 3-31, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.09.002>>.

CAVALCANTI, Airlla Laana et al. Cardiovascular characterization of the novel organic mononitrate NDIBP in rats. **Nitric Oxide**, v. 119, p. 50-60, 2022. Doi:<<https://doi.org/10.1016/j.niox.2021.12.007>>.

CHIODI, Debora; ISHIHARA, Yoshihiro. “Magic Chloro”: Profound Effects of the Chlorine Atom in Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 66, n. 8, p. 5305-5331, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c02015>>.

CHRISTENSEN, KL; MULVANY, MJ. Location of resistance arteries. **Journal of vascular research**, v. 38, n. 1, p. 1-12, 2001. doi:<<https://doi.org/10.1159/000051024>>.

CLARK, SG; FUCHS, LC. Role of nitric oxide and Ca⁺⁺-dependent K⁺ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, n. 3, p. 1473-1479, 1997.

CYR, A. R. et al. Nitric oxide and endothelial dysfunction. **Critical care clinics**, v. 36, n. 2, p. 307-321, 2020. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009>>.

DA SILVA, Gabriela Maria et al. Nitric oxide as a central molecule in hypertension: Focus on the vasorelaxant activity of new nitric oxide donors. **Biology**, v. 10, n. 10, p. 1041, 2021. doi <https://doi.org/10.3390/biology10101041>

DAIBER, Andreas et al. 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, 2004. Disponível em:<<https://doi.org/10.1124/mol.104.002600>>.

DAIBER, Andreas et al. New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. **Clinical Research in Cardiology**, v. 97, n. 1, p. 12-20, 2008. Doi:<[10.1007/s00392-007-0588-7](https://doi.org/10.1007/s00392-007-0588-7)>.

DAIBER, A., MÜNDEL, T. Organic nitrate therapy, nitrate tolerance, and nitrate-induced endothelial dysfunction: emphasis on redox biology and oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, v. 23, n. 11, p. 899-942, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/ars.2015.6376>>.

DEANFIELD, JE.; HALCOX, JP.; RABELINK, Ton J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, v. 115, n. 10, p. 1285-1295, 2007. Disponível em:<<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859>>.

DIVAKARAN, Sanjay; LOSCALZO, Joseph. 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, 2017. doi: [10.1016/j.jacc.2017.09.1064](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.09.1064)

DOBRIN, PB. Mechanical properties of arteries. **Physiological reviews**, v. 58, n. 2, p. 397-460, 1978. Doi:<<https://doi.org/10.1152/physrev.1978.58.2.397>>.

DOGAN, M. F., YILDIZ, O., ARSLAN, S. O., ULUSOY, K. G. Potassium channels in vascular smooth muscle: a pathophysiological and pharmacological perspective. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 33, n. 5, p. 504-523, 2019. Disponível em:< <https://doi.org/10.1111/fcp.12461>>.

FURCHGOTT, R. F., ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. v.288, n.5789, p.373-376, 1980. Disponível em:< <https://doi.org/10.1038/288373a0>>.

FRANÇA-SILVA, Maria S. et al. Organic nitrates: past, present and future. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 15314-15323, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules190915314>

FRANÇA-SILVA, Maria S. et al. 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, n. 1-3, p. 170-175, 2012. Doi:<<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.06.043>>.

GALLEY, HF; WEBSTER, NR. Physiology of the endothelium. **British journal of anaesthesia**, v. 93, n. 1, p. 105-113, 2004. Doi:<[10.1093/bja/ae163](https://doi.org/10.1093/bja/ae163)>.

GARTHWAITE, J. et al. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo [4, 3-a] quinoxalin-1-one. **Molecular pharmacology**, v. 48, n. 2, p. 184-188, 1995.

GARTHWAITE, J., BOULTON, C. L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annual review of physiology**, v. 57, n. 1, p. 683-706, 1995. Disponível em:<<https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.003343>>.

GIBBONS, GH. Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: a new therapeutic target. **The American journal of cardiology**, v. 79, n. 5, p. 3-8, 1997. Doi:< [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(97\)00122-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(97)00122-7)>.

GODO, S; SHIMOKAWA, H. Endothelial functions. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 37, n. 9, p. e108-e114, 2017. Disponível em:<<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309813>>.

GROVES, JT.; WANG, CCY. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. **Current opinion in chemical biology**, v. 4, n. 6, p. 687-695, 2000. Doi:<[https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00146-0)>.

HASSEL, Odd. Structural aspects of interatomic charge-transfer bonding. **Science**, v. 170, n. 3957, p. 497-502, 1970. Disponível em:<<https://doi.org/10.1126/science.170.3957.497>>.

IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WOOD, K.S., BYRNS, R.E., CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 84, p. 9265–9269, 1987. Disponível em: < <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265>>.

INCALZA, Maria Angela et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular pharmacology**, v. 100, p. 1-19, 2018. Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005>>.

JACKSON, William F. Potassium channels in regulation of vascular smooth muscle contraction and growth. **Advances in Pharmacology**, v. 78, p. 89-144, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016%2Fbs.apha.2016.07.001>>.

JACKSON, William F. KV channels and the regulation of vascular smooth muscle tone. **Microcirculation**, v. 25, n. 1, p. e12421, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/micc.12421>

JOHANSSON, B. Electromechanical and mechano-electrical coupling in vascular smooth muscle. **Journal of Vascular Research**, v. 8, n. 3-5, p. 129-143, 1971. Doi: <https://doi.org/10.1159/000157888>.

JOSHI, S; SRIVASTAVA, R. Effect of “magic chlorine” in drug discovery: an in silico approach. **RSC advances**, v. 13, n. 49, p. 34922-34934, 2023. Disponível em:< [10.1039/d3ra06638j](https://doi.org/10.1039/d3ra06638j)>.

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. **J.Cyclic Nucleotide Res.** v. 3, p. 23–35, 1977. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14978/>>.

KOSHLAND, D. Molecule of the year. **Science.** v.258, n.5090, p.1861-1861, 1992. Disponível em: < <https://doi.org/10.1126/science.1470903>>.

KLEMENSKA, E., BERESEWICZ, A. Bioactivation of organic nitrates and the mechanism of nitrate tolerance. **Cardiology journal**, v. 16, n. 1, p. 11-19, 2009. Disponível em: < https://journals.viamedica.pl/cardiology_journal/article/view/21531>.

KRUSZYNA, H. et al. Spectroscopic studies of nitric oxide (NO) interactions with cobalamins: reaction of NO with superoxocobalamin (III) likely accounts for cobalamin reversal of the biological effects of NO. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 285, n. 2, p. 665-671, 1998.

LAVIE, C. J., OZEMEK, C., CARBONE, S., KATZMARZYK, P. T., BLAIR, S. N. Sedentary behavior, exercise, and cardiovascular health. **Circulation research**, v. 124, n. 5, p. 799-815, 2019. Disponível em:< <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312669>>.

LOWENSTEIN, C. J., DINERMAN, J. L., SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic

messenger. **Annals of internal medicine**, v.120, n.3, p.227-237, 1994. Disponível em: < <https://doi.org/10.7326/0003-4819-120-3-199402010-00009>>.

LUNDBERG, JO; WEITZBERG, E. Nitric oxide signaling in health and disease. **Cell**, v. 185, n. 16, p. 2853-2878, 2022. Doi:< <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.010>>.

MACMICKING, J., XIE, Q., NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual review of immunology**, v. 15, n. 1, p. 323-350, 1997. Disponível em:< <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323>>.

MARSH, N., MARSH, A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 4, p. 313-319, 2000. Disponível em:< <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2000.03240.x>>.

MENDES-JUNIOR, L. G. **O papel da via NO-sGC-cGMP e dos canais para potássio no efeito vasorrelaxante do nitrato de ciclohexanol, um novo doador de óxido nítrico com atividades hipotensora e antihipertensiva em ratos**. 116 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016. Disponível em:< <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/14252>>.

MILLER, M. R., MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British journal of pharmacology**, v. 151, n. 3, p. 305-321, 2007. Disponível em:< [/doi/epdf/10.1038/sj.bjp.0707224](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707224)>.

MILLS, K. T., STEFANESCU, A., HE, J. The global epidemiology of hypertension. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, n. 4, p. 223-237, 2020. Disponível em:< <https://dx.doi.org/10.1038%2Fs41581-019-0244-2>>.

MONCADA, S., HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England journal of medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, 1993. Disponível em:< www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm199312303292706>.

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, 2014. Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.vph.2014.09.002>>.

MURREL, W. Nitro-glycerin as a remedy for angina pectoris. **The lancet**. v.113, n. 2890, p. 80-81, 1879. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)46032-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)46032-1)>.

NILSON, EAF. et al. Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2018. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 44, p. e32, 2020. Doi:<<https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.32>>.

OLIVEIRA, A.P. et al. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). **Vascular pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 338-344, 2006. Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.01.009>>.

OLIVEIRA, G.M.M. et al. Estatística Cardiovascular–Brasil 2021. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 118, p. 115-373, 2022. Disponível em<<https://www.scielo.br/j/abc/a/xf6bJDQFs7gyH4cWqVtrkDq/?lang=pt>>.

OLIVEIRA, Catarina et al. NO and HNO donors, nitrones, and nitroxides: Past, present, and future. **Medicinal research reviews**, v. 38, n. 4, p. 1159-1187, 2018. doi: 10.1002/med.21461

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. **Doenças Cardiovasculares continuam sendo principal causa de morte nas Américas**. Portal OPAS/OMS. 29 set 2021. Disponível em:< <https://www.paho.org/pt/topicos/doencas-cardiovasculares>>.

PARK, KH; PARK, WJ. Endothelial dysfunction: clinical implications in cardiovascular disease and therapeutic approaches. **Journal of Korean medical science**, v. 30, n. 9, p. 1213-1225, 2015. Disponível em:< <https://doi.org/10.3346/jkms.2015.30.9.1213>>.

PAULO, L. L. **Efeitos hipotensor e anti-hipertensivo do nitrato orgânico 1,3-bis (hexiloxi) propano-2-ila (NDHP) sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos e hipertensos**. 166 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019. Disponível em:<<https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/20838>>.

SMITH, P.D. et al. KIR channels function as electrical amplifiers in rat vascular smooth muscle. **The Journal of physiology**, v. 586, n. 4, p. 1147-1160, 2008. Disponível em: doi/epdf/10.1113/jphysiol.2007.145474.

PRADHAN, Isha et al. High salt diet modulates vascular response in A 2A AR^{+/+} and A 2A AR^{-/-} mice: role of sEH, PPAR γ , and K ATP channels. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 404, p. 87-96, 2015. Disponível em:< <https://doi.org/10.1007/s11010-015-2368-4>>.

REES, DD. et al. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **British journal of pharmacology**, v. 101, n. 3, p. 746, 1990. Doi:<<https://doi.org/10.1111%2Fj.1476-5381.1990.tb14151.x>>.

ROCHA, P. K. R. **Efeito hipotensor e anti-hipertensivo do nitrato orgânico benzoato de 4-nitrooxibutila em ratos**. 122 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021. Disponível em:<repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/21778/1/PatriciaKeythLinsRocha_Tese.pdf>.

ROSENBLUM, J. D.; BOYLE, C. M.; SCHWARTZ, L. B. The mesenteric circulation: anatomy and physiology. **Surgical Clinics**, v. 77, n. 2, p. 289-306, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(05\)70549-1](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(05)70549-1)

SATERNOS, H. C., ALMARGHALANI, D. A., GIBSON, H. M., MEQDAD, M. A., ANTYPAS, R. B., LINGIREDDY, A., ABOUALAIWI, W. A. Distribution and

function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system. **Physiological genomics**, v. 50, n. 1, p. 1-9, 2018. Disponível em:< <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00062.2017>>.

SANDNER, Peter et al. Soluble guanylate cyclase stimulators and activators. **Reactive oxygen species: Network pharmacology and therapeutic applications**, p. 355-394, 2021. Doi:< https://doi.org/10.1007/164_2019_249>.

SOMLYO, Andrew P.; SOMLYO, Avril V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **The Journal of physiology**, v. 522, n. 2, p. 177-185, 2000. Disponível em:< <https://doi.org/10.1111%2Fj.1469-7793.2000.t01-2-00177.x>>.

SCHRAMMEL, A. et al. Characterization of 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo [4, 3-a] quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Molecular pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 1-5, 1996.

SHADWICK, RE. Mechanical design in arteries. **Journal of Experimental Biology**, v. 202, n. 23, p. 3305-3313, 1999. Doi:<<https://doi.org/10.1242/jeb.202.23.3305>>.

SHAHOU, J. S., SANVICTORES, T., AEDDULA, N. R. Physiology, arterial pressure regulation. **StatPearls Publishing, Treasure Island**, 2019. PMID:30860744. Disponível em:< <https://europepmc.org/article/NBK/nbk538509#free-full-text>>.

SILVA, M. S. F. **Avaliação dos efeitos induzidos pelo 2-Nitrato-1, 3-Dibutoxipropano (NDBP) sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos - abordagens in vivo e in vitro**. 91 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010. Disponível em:< <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/6848>>.

SOUZA, C. A. M. Vasodilatadores. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 44, n. 1, p. 91-94, 1994. Disponível em:< <https://www.bjan-sba.org/article/5e498bc70aec5119028b47c9/pdf/rba-44-1-91.pdf>>.

SUN, J; STEENBERGEN, C; MURPHY, E. S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1693-1705, 2006. Disponível em:< <https://doi.org/10.1089%2Fars.2006.8.1693>>.

TANAKA, Y., MOCHIZUKI, H., TANAKA, K., Shigenobu, Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric artery, **Br. J. Pharmacol.** 128 (1999) 1602–1608. Disponível em:<<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702954>>.

GORI, T. et al. Nitroglycerine causes mitochondrial reactive oxygen species production: in vitro mechanistic insights. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 23, n. 12, p. 990-992, 2007. Disponível em:< [https://doi.org/10.1016%2Fs0828-282x\(07\)70862-0](https://doi.org/10.1016%2Fs0828-282x(07)70862-0)>.

THUM, Thomas et al. Differential effects of organic nitrates on endothelial progenitor cells are determined by oxidative stress. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 27, n. 4, p. 748-754, 2007. Doi:<<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000258787.18982.73>>.

VANHOUTTE, Paul M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta physiologica**, v. 196, n. 2, p. 193-222, 2009. Disponível em:< [10.1111/j.1748-1716.2009.01964.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01964.x)>.

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, 2002. Disponível em:< <https://doi.org/10.1021/cr000040l>>.

WANG, SP. et al. 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, 2008. Disponível em:<>.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in physiology education**, v. 27, n. 4, p. 201-206, 2003. Disponível em:<<https://doi.org/10.1152/advan.00025.2003>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics 2023**. IBSN. 978-92-4-007432-3, p.119, 2023. Disponível em:<<https://who.int/publications/i/item/9789240074323>>.

WU, R. S.; MARX, S. O. The BK potassium channel in the vascular smooth muscle and kidney: α - and β -subunits. **Kidney international**, v. 78, n. 10, p. 963-974, 2010.

YE, Chun-Ling et al. An increase in opening of BK \sim C \sim a channels in smooth muscle cells in streptozotocin-induced diabetic mice. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 6, p. 744-750, 2004.

YETIK-ANACAK, G., CATRAVAS, J. D. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. **Vascular pharmacology**, v. 45, n. 5, p. 268-276, 2006. Disponível em<<https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.08.002>>.

PORPINO, S. K. P. et al. Developing new organic nitrates for treating hypertension: A review. **J Hypertens**, v. 5, n. 232, p. 2167-1095.1000232, 2016. Disponível em:<[10.4172/2167-1095.1000232](https://doi.org/10.4172/2167-1095.1000232)>.

XU, Suowen et al. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies. **Pharmacological Reviews**, v. 73, n. 3, p. 924-967, 2021. Doi:< <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000096>>.