

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

LAYANE DA SILVA LIMA

**EFEITO VASORRELAXANTE E MECANISMO DE AÇÃO DO 4-
METILBENZOATO DE 4-NITROOXIBUTILA EM RATOS**

**JOÃO PESSOA/PB
2024**

LAYANE DA SILVA LIMA

EFEITO VASORRELAXANTE E MECANISMO DE AÇÃO DO 4-
METILBENZOATO DE 4-NITROOXIBUTILA EM RATOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba.

Orientadora: Dr^a Maria do Socorro de França Falcão

Coorientador: Dr. Lucas Rannier R. A. Carvalho

JOÃO PESSOA/PB
2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732e Lima, Layane da Silva.

Efeito vasorrelaxante e mecanismo de ação do 4-metilbenzoato de 4-nitrooxibutílica em ratos / Layane da Silva Lima. - João Pessoa, 2024.

79 f. : il.

Orientação: Maria do Socorro de França Falcão.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/Cbiotec.

1. Fisiologia. 2. Fisiologia cardiovascular. 3. Nitratos orgânicos. 4. Óxido nítrico. I. Falcão, Maria do Socorro de França. II. Título.

UFPB/BC

CDU 612(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 11 de junho de 2024.

Na data de onze de junho de dois mil e vinte e quatro às 14h30 (horário local), foi realizada, por meio da Plataforma Virtual Google Meet, a defesa pública da Dissertação de Mestrado do(a) discente **Layane da Silva Lima**. O trabalho tem como título “Efeito vasorrelaxante e mecanismo de ação do 4-metilbenzoato de 4-nitrooxibutila em ratos.” A banca examinadora foi constituída pelo(a) orientador(a) Prof.^a Dr.^a Maria do Socorro de França Falcão, pelo 1º examinador (examinador externo) Prof. Dr. Ian Porto do Amaral Gurgel (UFPB) e pelo 2º examinador (examinador interno) Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz (UFPE). Após a apresentação pública do trabalho, iniciou-se a arguição do(a) candidato(a) por cada membro da banca examinadora, tendo o(a) candidato(a) o mesmo tempo para responder a cada questionamento. Na sequência, a banca examinadora se reuniu em caráter sigiloso e considerou o(a) candidato(a) **APROVADO(A)**. De acordo com o Artigo 98 §1 §2 da Resolução 35/2019 do CONSELHO, o(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
gov.br MARIA DO SOCORRO DE FRANÇA FALCAO
Data: 11/06/2024 17:07:45-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Maria do Socorro de França Falcão

Documento assinado digitalmente
gov.br IAN PORTO GURGEL DO AMARAL
Data: 21/06/2024 08:54:34-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. Ian Porto do Amaral Gurgel

Documento assinado digitalmente
gov.br THYAGO MOREIRA DE QUEIROZ
Data: 11/06/2024 19:10:34-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz

Aos meus pais por nunca terem
medido forças para concretização
dos meus estudos do ensino
fundamental à pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo ao Criador. Não tenho dúvidas que o lado espiritual, somado a minha fé, foi o que me manteve firme, corajosa e com sabedoria para escrever esta dissertação.

Para eu ter consigo chegar até à pós graduação, foi preciso muito esforço dos meus pais, que investiram sem cessar nos meus estudos desde o ensino fundamental, então aqui deixo registrado minha gratidão a meus pais Leonardo e Maria Risoneide. Também agradeço ao meu tio Jadismar pela acolhida no seu lar e por me ouvir em todos meus desabafos, obrigada por sempre acreditar em mim. Em nome dele, estendo meu obrigada a todos meus familiares, que sempre estão na torcida para que eu alcance voos mais altos.

Agradeço ao meu parceiro Breno Nóbrega, bem como toda sua família, por me ajudarem e pela compreensão da minha ausência durante o mestrado em momentos festivos. Fica aqui meu obrigada.

Em âmbito institucional, à Universidade Federal da Paraíba, ao Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciência Fisiológicas, bem como todos que fazem parte do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA), pela oportunidade de contribuir com ciência e pesquisa.

Em especial agradeço a minha orientadora Dr^a Maria do Socorro, que no meio ao caos, aceitou o desafio se tornar minha nova orientadora nos últimos 6 meses restantes de mestrado. Com certeza sua orientação e experiência acadêmica fizeram total diferença no resultado final deste trabalho. Junto a isso, agradeço a Lucas Rannier por ter aceitado ser meu coorientador, seu conhecimento contribuiu demais no trabalho.

Por ter sido meu primeiro contato com pesquisas experimentais, minha colega de mestrado Clara Ruiz foi meu suporte. Incansavelmente esteve comigo na execução dos protocolos. Por ter uma pesquisa semelhante a minha, tivemos juntas na “bancada”, tendo momentos de discussão e aprofundamento no nosso tema. Fica registrado aqui minha gratidão.

Ainda no requisito ‘colegas de mestrado’, agradeço a Renata Torres e Juliana Teles que sempre esteve à disposição caso eu precisasse. Obrigada pelo apoio, ensinamentos e cuidado que tiveram comigo.

Agradeço a todos que me ajudaram na pesquisa, em especial a técnica do laboratório Clênia Cavalcanti, que na medida do possível, sempre esteve solícita para me ajudar. Também agradeço a mestranda Emilly, que nas vezes que pensei que não daria conta, ela me mostrava o contrário.

Deixo meu obrigada ao departamento de química, em nome do professor Helivaldo, que sintetizou a substância que foi testada nessa pesquisa. Também já deixo mencionado aqui meu agradecimento a banca de defesa, professor Dr. Thyago Queiroz e Dr. Ian Amaral por ter aceitado avaliar e contribuir com o nosso trabalho.

A todos que me ajudaram direto e indiretamente na pesquisa, muito obrigada.

“Minha sorte foi ter coragem”
(Autor desconhecido)

RESUMO

Os nitratos orgânicos são conhecidos por serem doadores de óxido nítrico e potentes vasodilatadores. Diante disso, objetivou-se investigar o mecanismo de ação de um novo nitrato orgânico, o 4-metilbenzoato de 4-nitrooxibutila (NIB7) sobre a função vascular da artéria mesentérica superior de ratos. Foi utilizada a abordagem *ex vivo* utilizando o equipamento banho de órgãos compacto. Anéis de artéria mesentérica foram isolados utilizando a solução nutritiva Tyrode aerada com mistura carbogênica. Depois da estabilização, foi verificada viabilidade dos anéis e realizado teste de endotélio. Logo após isso foi feita a contração com fenilefrina (FEN) bem como com KCl 60 mM e realizada uma curva concentração-resposta do NIB7 para avaliação do efeito vasorrelaxante. Foram obtidas curvas concentração-resposta do composto na presença do L-NAME, bloqueador não seletivo da NOS; HDX, um sequestrador de NO; ODQ, inibidor da guanilil ciclase solúvel (GCs); KCl 20mM, modulador do efluxo de potássio; TEA 3mM, bloqueador inespecífico de canais de potássio; e bloqueadores de canais específicos de K⁺, canais operados por voltagem (4-AP 1mM), sensíveis ao cálcio (TEA 1mM), ao ATP (GLIB 1μM); e retificadores de entrada (BaCl₂). Por último, os anéis foram pré-expostas a uma alta concentração de NIB7 (100μM) para avaliar o desenvolvimento de tolerância vascular. As curvas foram obtidas por regressão não-linear pelas quais foi obtido o pD₂ e Emáx. Foi realizado o teste “t” student não-pareado para análise da diferença das médias e ANOVA “two way” seguida de pós-teste de Bonferroni para análise da curva concentração-resposta. Foram consideradas diferenças significativas quando p<0,05. O NIB7 apresentou atividade vasorrelaxante independente do endotélio funcional (pD₂= 6,32 ± 0,11). O vasorrelaxamento foi atenuado em anéis contraídos com KCl 60mM (pD₂ = 5,0 ± 0,09 *p<0,05). Na presença do sequestrador de NO, a potência do NIB7 foi atenuada (pD₂ = 5,11 ± 0,08 *p<0,05). Ao bloquear a GCs o vasorrelaxamento também foi atenuado (pD₂= 3,81 ± 0,10 *p< 0,05). Ao incubar os anéis com KCl 20 mM e TEA 3 mM a potência foi atenuada (pD₂ = 5,52 ± 0,05 e 5,320 ± 0,05, respectivamente, *p<0.05). Ao investigar os canais específicos para potássio, foi visto que na presença dos bloqueadores específicos não houve atenuação da resposta. No ensaio de tolerância farmacológica *ex vivo* observou-se atenuação da potência (pD₂= 5,09 ± 0,10 *p<0,05). Com isso, foi visto que o NIB7 é um doador de NO, cujo efeito independe do endotélio. Sugere o envolvimento da via NO-GCs-PKG, com participação dos canais de potássio. Por fim, o composto induziu tolerância farmacológica vascular na concentração utilizada.

Palavras-chave: Nitratos orgânicos; Óxido nítrico; Fisiologia cardiovascular.

ABSTRACT

Organic nitrates are known to be nitric oxide donors and potent vasodilators. Therefore, the objective was to investigate the mechanism of action of a new organic nitrate, 4-nitrooxybutyl 4-methylbenzoate (NIB7) on the vascular function of the superior mesenteric artery of rats. The *ex vivo* approach using compact organ bath equipment was used. Mesenteric artery rings were isolated using aerated Tyrode nutrient solution with carbogenic mixture. After stabilization, the viability of the rings was checked and the endothelium test was performed. Immediately after this, contraction was performed with phenylephrine (FEN) as well as KCl 60 mM and a concentration-response curve of NIB7 was performed to evaluate the vasorelaxant effect. Concentration-response curves of the compound were obtained in the presence of L-NAME, a non-selective NOS blocker; HDX, a NO scavenger; ODC, soluble guanylyl cyclase (GCs) inhibitor; KCl 20mM, potassium efflux modulator; TEA 3mM, nonspecific potassium channel blocker; and blockers of specific K⁺ channels, voltage-operated channels (4-AP 1mM), sensitive to calcium (TEA 1mM), ATP (GLIB 1μM); and input rectifiers (BaCl₂). Lastly, the rings were pre-exposed to a high concentration of NIB7 (100μM) to assess the development of vascular tolerance. The curves were obtained by non-linear regression through which pD₂ and Emax were obtained. The unpaired student "t" test was performed to analyze the difference in means and "two-way" ANOVA followed by the Bonferroni post-test to analyze the concentration-response curve. Differences were considered significant when p<0.05. The NIB7 showed vasorelaxant activity independent of functional endothelium (pD₂= 6,32 ± 0,11). Vasorelaxation was attenuated in rings contracted with KCl 60mM (pD₂ = 5,0 ± 0,09 *p<0,05). In the presence of NO scavenger, the potency of NIB7 was attenuated (pD₂ = 5,11 ± 0,08 *p<0,05). By blocking GCs, vasorelaxation was also attenuated (pD₂= 3,81 ± 0,10 *p<0,05). When incubating the rings with 20 mM KCl and 3 mM TEA, the potency was attenuated (pD₂ = 5,52 ± 0,05 e 5,320 ± 0,05, respectively, *p<0.05). When investigating specific potassium channels, it was seen that in the presence of specific blockers there was no attenuation of the response. In the *ex vivo* pharmacological tolerance test, attenuation of potency was observed (pD₂= 5,09 ± 0,10 *p<0,05). With this, it was seen that NIB7 is an NO donor, whose effect is independent of the endothelium. It suggests the involvement of the NO-GCs-PKG pathway, with the participation of potassium channels. Finally, the compound induced vascular pharmacological tolerance at the concentration used.

Keywords: Organic nitrates; Nitric oxide; Cardiovascular physiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das camadas da artéria.....	21
Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de síntese e ação do óxido nítrico no vaso.....	25
Figura 3: Fórmula estrutural do BBN (molécula intermediária).....	29
Figura 4: Fórmula estrutural do NIB7.....	30
Figura 5: Preparação do 4-metilbenzoato de 4-nitrooxibutíla.....	32
Figura 6: Banho de órgãos e sistema de aquisição de dados do LACONCHA – local de realização da pesquisa.....	34
Figura 7: Protocolo de verificação da viabilidade do tecido vascular e avaliação da integridade do endotélio vascular.....	35
Figura 8: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) em artéria mesentérica pré-contraída com FEN.....	36
Figura 9: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com solução despolarizante de Tyrode 60mM.....	36
Figura 10: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com L-NAME 100 Mm.....	37
Figura 11: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com HDX 30 μ M.....	38
Figura 12: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com ODQ 10 μ M.....	39
Figura 13: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e com solução de Tyrode 20mM.....	40
Figura 14: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com TEA 3mM.....	41
Figura 15: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com GLIB 1 μ M.....	42
Figura 16: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com BaCl ₂ 30 μ M.....	43
Figura 17: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com 4-AP.....	44
Figura 18: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com TEA 1mM.....	45

Figura 19: Protocolo de verificação de tolerância vascular pela pré-exposição ao NIB7 (100 μ M) em artéria mesentérica pré-contraída com FEN.....46

Figura 20: A: Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos, pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M) na presença (n=7) e ausência do endotélio funcional (n=10). Não houve diferença estatística entre os grupos (avaliado por ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 observado nas curvas concentração resposta ao NIB7 em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio removido vs. endotélio intacto (avaliado por test t de Student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m.....48

Figura 21: A: Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina 10 μ M (n=10) e com KCL 60mM (n=7). Houve diferença estatística entre os grupos com deslocamento da curva à direita (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 na curva concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo KCL 60mM (avaliado por test t de Student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0.05$; controle vs. incubação KCL 60mM, n=7.....50

Figura 22: A: Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina (10 μ M) na presença (n=7) e ausência do L-NAME (n=7). Não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 na curva concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo L-NAME (avaliado por test t de Student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m.....51

Figura 23: A: Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina (10 μ M) na ausência (n=10) e presença do HDX (n=7). Houve diferença estatística entre os grupos com deslocamento da curva à direita (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 na curva concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo HDX (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; controle vs. incubação HDX, n=7.....52

Figura 24: A: Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina (10 μ M) na ausência (n=10) e presença do ODQ (n=7). Houve diferença estatística entre os grupos com deslocamento da curva à direita (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo ODQ (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; controle vs. incubação ODQ, n=7.....53

Figura 25: A: Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina (10 μ M) na ausência (n=10) e presença do KCl 20mM (n=7). Houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. Grupo KCl 20mM (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; controle vs. KCl 20mM, n=7.....55

Figura 26: A: Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina ($10\mu\text{M}$) na ausência ($n=10$) e presença do TEA 3mM ($n=7$). Houve diferença estatística entre os grupos com deslocamento da curva à direita (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo TEA 3mM (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; controle vs. incubação TEA 3mM, $n=7$56

Figura 27: A: Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina ($10\mu\text{M}$) na ausência ($n=10$) e presença do GLIB $1\mu\text{M}$ ($n=5$). Não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo GLIB $1\mu\text{M}$ (avaliado por test t de student).....58

Figura 28: A: Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina ($10\mu\text{M}$) na ausência ($n=10$) e presença do BaCl_2 $30\mu\text{M}$ ($n=5$). Não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo BaCl_2 $30\mu\text{M}$ (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; controle vs. do BaCl_2 $30\mu\text{M}$, $n=5$59

Figura 29: A: Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina ($10\mu\text{M}$) na ausência ($n=10$) e presença do TEA 1mM ($n=5$). Não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo TEA 1mM (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m.....61

Figura 30: A: Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina ($10\mu\text{M}$) na ausência ($n=10$) e presença do 4-AP 1mM ($n=5$). Não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores do pD_2 e Efeito máximo do NIB7 nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo 4-AP 1mM (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m.....62

Figura 31: A: Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina ($10\mu\text{M}$) na ausência e presença da pré-incubação do NIB7 ($100\mu\text{M}$). Houve deslocamento da curva à direita (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores do pD_2 e Efeito máximo do NIB7 nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo NIB7 ($100\mu\text{M}$) (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; controle vs. NIB7 ($100\mu\text{M}$), $n=6$63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Fármacos utilizados e sua classe.....	32
Quadro 2: Composição da solução nutritiva de Tyrode.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACh:** Acetilcolina
- ANG I:** Angiotensina I
- ANG II:** Angiotensina II
- 4-AP:** 4- aminoperidina
- BBN:** Benzoato de 4-nitrooxibutíla
- BH₄:** Tetraidrobiopterina
- BK_{Ca}:** Canais de potássio sensíveis ao cálcio de alta condutância
- Ca²⁺:** Íon cálcio
- CaCl₂:** Cloreto de cálcio
- Ca_v:** Canais para Ca²⁺ sensíveis à voltagem
- CBiotec:** Centro de Biotecnologia
- CCLM:** Quinase da cadeia leve da miosina
- CE₅₀:** Concentração em molar que o fármaco produz 50% do efeito máximo
- CEUA:** Comitê de Ética no Uso de Animais
- CH₃:** Grupo Metila
- C₆H₁₂O₆:** Glicose
- CMLV:** Célula do músculo liso vascular
- CO₂:** Dióxido de carbono
- DAG:** Diacilglicerol
- DC:** Débito cardíaco
- DCV:** Doenças cardiovasculares
- EDHF:** Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
- E_{máx}:** Efeito máximo
- eNOS:** Endotelial NOS
- EPM:** Erro padrão da média
- EROS:** Espécies reativas de oxigênio
- FC:** Frequência cardíaca
- FEN:** Cloridrato de L (-) fenilefrina
- FMN:** Mononucleótido flavina

GCs: Guanilil ciclase solúvel

GMPc: Guanosina monofosfato cíclica

GPCRs: Receptores acoplados à proteína G

GTP: Guanosina trifosfato

HDX: Hidroxocobalamina

HEX: Ciclohexanol

IP₃: Receptores de trifosfato de inositol

ISDN: Dinitrato de isossorbida

ISMN: Mononitrato de isossorbida

K⁺: Íon potássio

K_{ATP}: Canais de potássio sensíveis ao ATP

KCl: Cloreto de potássio

K_v: Canais de potássio sensíveis à voltagem

LACONCHA: Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial

L- Arg: L- arginina

L- cit: L- citrulina

MgCl₂: Cloreto de magnésio

N₂: Nitrogênio molecular

Na⁺: Íon sódio

NDPB: 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano

NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NaHCO₃: Bicarbonato de sódio

NIB7: 4-metilbenzoato de 4-nitrooxibutíla

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

NTG: Nitroglicerina

O₂: Oxigênio

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

PA: Pressão Arterial

pD₂: Logaritmo negativo na base 10 da CE₅₀ de um agonista (- Log CE₅₀)

PLC: Fosfolipase C

PKG: Proteína cinase G

SRAA: Sistema Renina Angiotensina e Angiotensinogênio

RyR: Receptor de rianodina

SERCA: Ca²⁺ - ATPase do retículo endosarcoplasmático

TEA: Tetraetilamônio

UPA: Unidade de Produção de Animais

ZnCl₂: Cloreto de zinco

μM: Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1 SISTEMA CARDIOVASCULAR E REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL.....	19
3.2 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DOS VASOS SANGUÍNEOS.....	20
3.2.1 Contração do músculo liso vascular.....	22
3.3 ÓXIDO NÍTRICO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL.....	23
3.4 DOADORES DE NO E NITRATOS ORGÂNICOS.....	27
3.5 SUBSTÂNCIA TESTE.....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 ANIMAIS E LOCAL DA PESQUISA.....	31
4.4 SUBSTÂNCIA TESTE.....	31
4.3 FÁRMACOS.....	32
4.4 SOLUÇÕES NUTRITIVAS.....	32
4.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS EX VIVO.....	33
4.5.1 Artéria mesentérica superior de rato.....	33
4.5.2 Verificação da viabilidade vascular e teste de endotélio.....	34
4.5.3 Avaliação do efeito do NIB7 sobre o vaso pré-contraído com FEN.....	35
4.5.4 Avaliação do novo nitrato sobre o vaso pré-contraído com KCl 60mM.....	36
4.5.5 Investigação da participação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) no efeito vascular induzido pelo NIB7.....	37
4.5.6 Investigação da participação do NO no efeito vascular induzido pelo NIB7.....	37
4.5.7 Avaliação da participação da via NO/GMPc no efeito vascular induzido pelo NIB7.....	38
4.5.8 Avaliação da participação de canais de K ⁺ no efeito do NIB7.....	39
4.5.9 Avaliação da participação de subtipos de canais para K ⁺ no efeito do NIB7.....	41
4.5.9.1 Avaliação do canal K _{ATP} no vasorrelaxamento pelo NIB7.....	41
4.5.9.2 Avaliação do canal K _{IR} no vasorrelaxamento pelo NIB7.....	42
4.5.9.3 Avaliação do canal K _v no vasorrelaxamento pelo NIB7.....	43
4.5.9.4 Avaliação do canal BK _{Ca} no vasorrelaxamento pelo NIB7.....	44
4.6 Avaliação da habilidade do NIB7 em desenvolver tolerância vascular.....	45

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5 RESULTADOS.....	47
5.1 NIB7 promove vasorrelaxamento na presença e ausência de endotélio.....	47
5.2 Ativação da atividade do NIB7 sobre o tecido vascular pré contraído com solução despolarizante.....	49
5.3 NIB7 promove vasorrelaxamento independente da eNOS.....	50
5.4 O vasorrelaxamento induzido pelo NIB7 pode ser mediado pela liberação de óxido nítrico (NO).....	51
5.5 A GCs medeia o vasorrelaxamento induzido pelo NIB7.....	53
5.6 Os canais para K ⁺ estão envolvidos com o vasorrelaxamento induzido pelo NIB7.....	54
5.7 Participação dos subtipos de canais para potássio no efeito vasorrelaxante induzido pelo NIB7.....	57
5.7.1 O bloqueio isolado do canal K _{ATP} não atenuou o efeito do NIB7.....	57
5.7.2 O bloqueio isolado do canal K _{IR} não atenuou a potência do NIB7.....	58
5.7.3 O bloqueio isolado dos canais BK _{ca} não atenuou o efeito do NIB7.....	60
5.7.4 O bloqueio isolado dos canais K _v não atenuou o efeito do NIB7...61	
5.8 A incubação prévia com alta concentração do composto atenuou o efeito do NIB7.....	63
6 DISCUSSÃO.....	64
7 CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO I – PARECER CEUA.....	77

1 INTRODUÇÃO

Os nitratos orgânicos são a classe mais antiga de medicamentos usados na terapêutica cardiovascular (MILLER, MEGSON, 2007; WANG et al., 2002). Descritos há mais de um século, a NTG foi utilizada pela primeira vez, em 1879, para o tratamento da angina pectoris (OELZE, SCHUHMACHER, DAIBER, 2010; PAULO et al., 2012).

Os nitratos orgânicos possuem efeitos vasorrelaxantes por serem doadores de óxido nítrico (NO), uma molécula sinalizadora no sistema cardiovascular, envolvido no processo de vasorrelaxamento através de sua influência nos ajustes da resistência vascular sistêmica e tônus vascular (BONAVENTURA et al., 2007)

Contudo, o uso na clínica é limitado pelo desenvolvimento de tolerância farmacológica por esses compostos (LIMA et al., 2014; MUNZEL, DAIBER, 2014). Com isso, tendo em vista o potencial clínico dos doadores de NO, é necessário pesquisas que visem o desenvolvimento de novas substâncias nitrovasodilatadoras que superem essa limitação.

O grupo de pesquisa do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) tem grande histórico de pesquisa quanto ao desenvolvimento de novos nitratos como possíveis alternativas para desordens cardiovasculares, como o 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDPB), estudado por França-Silva e colaboradores (2012) ciclohexanol (HEX), por Mendes-Junior e colaboradores (2015).

O laboratório continua os estudos a fim de investigar novos nitratos orgânicos. Neste trabalho, a equipe se propôs a investigar um novo composto, o 4-metilbenzoato de 4-nitrooxibutila (NIB7), sob a artéria mesentérica de ratos, com a finalidade de avaliar os mecanismos de ação e características da substância.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito vasorrelaxante do NIB7 em ratos.

2.2 ESPECÍFICOS

Experimentos ex vivo

Investigar os mecanismos de ação do NIB7 sobre o tecido vascular, observando:

- A participação do endotélio na resposta vascular ao nitrato;
- A participação da via do NO-GMPc e canais de K⁺;
- A capacidade do novo nitrato em induzir tolerância farmacológica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SISTEMA CARDIOVASCULAR E REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

O Sistema Cardiovascular é composto pelo coração, vasos sanguíneos e sangue. Tem como função primordial a garantia da perfusão tecidual, isso por garantir o transporte de oxigênio, nutrientes, produtos do metabolismo celular, de hormônios até as células-alvos, bem como participação na regulação da temperatura corporal (SANTOS *et al.*, 2022).

Para garantia destas funções, é necessário a manutenção adequada da pressão arterial (PA), que é força que o sangue exerce contra a parede das artérias. A PA tem como determinantes o débito cardíaco e a resistência vascular periférica. Quanto ao débito cardíaco, este depende do produto da frequência cardíaca e do volume sistólico. Já a resistência periférica é influenciada pelo raio do vaso e grau de viscosidade do sangue (MAGDER, 2018).

A regulação da PA é fundamental para a perfusão adequada dos tecidos em condições variadas. O controle e manutenção da PA envolve diferentes mecanismos que funcionam de maneira integrada, em uma complexa interação para operar resultados a curto ao longo prazo (COWLEY, 2006; KATO, 2015)

A regulação da PA em curto prazo envolve mecanismos neurais que abrangem a ativação de receptores, como os barorreceptores, cuja aferências se projetam para o sistema nervoso central via nervos vagos e glossofaríngeos. Os barorreceptores são mecanorreceptores que estão localizados no seio carotídeo e no arco aórtico. Estes detectam alterações no estiramento da parede arterial causadas pelas alterações de PA (MIN *et al.*, 2019). Quando ocorre aumento da PA, o estiramento da parede das artérias faz com que sejam enviados estímulos elétricos que vão se projetar até o núcleo do trato solitário (NTS), que como resposta irá desencadear no aumento do tônus vagal sobre o coração, bem como acarretar a diminuição do tônus simpático ao coração e vasos, induzindo a redução da PA (KAWADA, SUGIMACHI, 2016).

Contrária a situação anterior, quando a PA diminui, o barorreflexo reduz a frequência de disparos, reduzindo a estimulação do NTS, que por consequência, reduz a atividade do tônus vagal e aumenta o tônus simpático, favorecendo o aumento da PA (PILOWSKY *et al.*, 2002).

A curto e médio prazo, tem-se fatores locais que participam nos ajustes do fluxo sanguíneo que são produzidos pelo endotélio vascular. Entre os fatores vasoconstritores tem a endotelina e a angiotensina II; e entre os fatores vasodilatadores, tem as prostaciclina, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e o óxido nítrico (SU, 2015), que serão detalhados nos próximos capítulos.

Em relação a regulação a longo prazo, a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) possui um papel destaque. Sumariamente, segundo a visão clássica do SRAA, a renina converte o angiotensinogênio (sintetizado no fígado) em Angiotensina I (Ang I), que é posteriormente clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) para formar a angiotensina-II (Ang II) (DE MELLO, FROHLICH, 2011).

A maioria das ações da Ang II nos sistemas cardiovascular e renal é mediada pelo receptor AT1 promovendo vasoconstrição, retenção de sódio e água, liberação de aldosterona, ativação do sistema nervoso simpático e liberação de vasopressina, contração de músculo liso vascular (FERRARIO, MULLICK, 2017) com conseqüente aumento da pressão arterial.

O descontrole da PA, tornando-a em níveis elevados, é o maior fator de risco para doenças cardiovasculares (FORSTERMANN, 2010). Com isso, o surgimento de algum distúrbio ou desarranjo nos mecanismos de controle, contribuem para o surgimento dessas doenças.

3.2 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DOS VASOS SANGUÍNEOS

O sistema vascular é formado por um emaranhado de vasos sanguíneos que possibilita o transporte de sangue do coração aos tecidos, bem como garantem a volta deste para o coração. Os tipos de vasos são as artérias, as arteríolas, os capilares, as vênulas e as veias, cada tipo com características e estruturas específicas para desempenhar sua função do sistema cardiovascular (BERNARDES, 2012; ZHAO *et al.*, 2015).

As artérias transportam o sangue distalmente com relação ao coração. Tais artérias dão origem a ramos menores, as arteríolas, que regulam o fluxo sanguíneo tecidual, enquanto os capilares possibilitam a troca de substâncias entre o sangue e o interstício. Já as vênulas e as veias têm função de

reservatório e tornam possível o retorno do sangue ao coração (LOH et al, 2018)

As artérias são estruturas complexas compostas por uma túnica externa, a qual é formada por tecido conjuntivo; a camada intermediária, formada pelo músculo liso e uma certa quantidade de tecido conjuntivo elástico; e uma túnica íntima, a qual é constituída de células endoteliais (ZHAO et al., 2015; WONG et al, 2017).

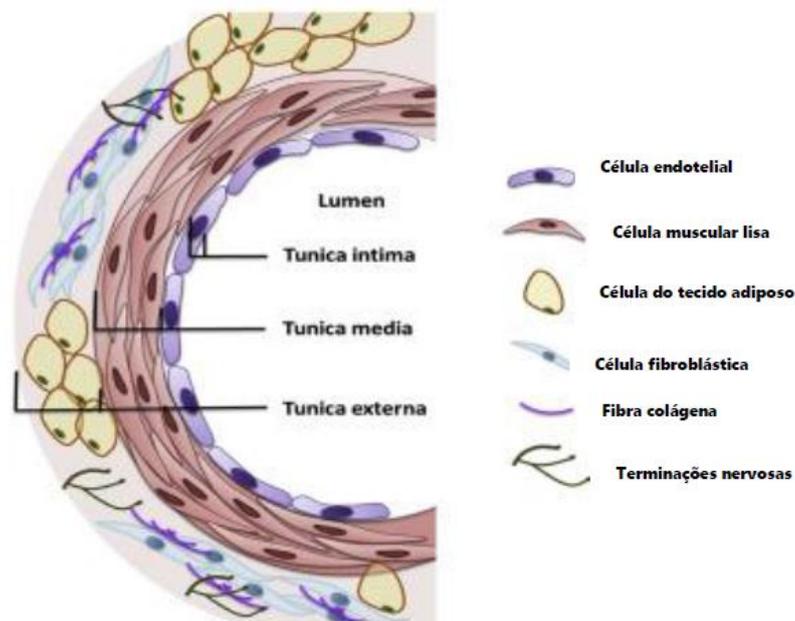


Figura 1: Representação das camadas da artéria. Fonte: adaptado, ZHAO et al., 2015.

O endotélio consiste em uma camada de células única que cobre a superfície interna dos vasos sanguíneos. Ele pode responder a sinais químicos e físicos locais, o que levam à produção de diversos vasoconstritores e vasodilatadores capazes de regular o tônus vascular, além de outros eventos (GIANNITSI *et al.*, 2019; POPYHOVA *et al.*, 2020).

Os principais fatores relaxantes derivados do endotélio são o óxido nítrico (NO), o fator hiperpolarizante derivado de endotélio (EDHF) e a prostaciclina. Já em relação aos agentes contráteis, os principais

vasoconstritores são a prostaglandina H₂, a angiotensina II (Ang II), a endotelina-1 (ET-1) (SU, 2015).

O adequado funcionamento vascular depende do equilíbrio dos fatores derivados do endotélio. Qualquer alteração que modifique e afete a homeostase do endotélio, causará a disfunção endotelial. Com o equilíbrio rompido, acontece uma tendência à vasoconstrição, diminuição de fatores relaxantes, como a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), levando ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MISHRA et al., 2016).

3.2.1 Contração do músculo liso vascular

A contração do músculo liso vascular depende do aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular. A elevação citosólica de Ca²⁺ pode ser decorrente do influxo através de canais voltagem-dependentes ou ligante-dependentes presentes na membrana plasmática. A liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático pode se dar por meio da ativação de receptores de trifosfato de inositol (IP₃) ou rianodina (RyR), que são ativados por cálcio (LOH et al., 2018; SHAH et al., 2022).

O aumento do Ca²⁺ citosólico resulta na ligação de quatro íons Ca²⁺ nos quatro domínios de ligação na proteína calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina (Ca²⁺-CAM), e por consequência, ativa a quinase da cadeia leve da miosina (CCLM), que fosforila a cadeia leve da miosina. A fosforilação promove alteração conformacional da cabeça da miosina. A miosina, então, liga-se ao sítio ativo presente na actina, formando as pontes cruzadas. Enquanto a miosina estiver no estado fosforilado, o ciclo de pontes cruzadas continua. O ciclo cessa quando há redução do Ca²⁺ citoplasmático (SATO, 2021).

Vale salientar que a contração pode ser potencializada por outros mecanismos de acoplamento. Como exemplo da fenilefrina, agonista contrátil que se ligam à receptores acoplados à proteína G (GPCRs) presentes na membrana da célula do músculo liso vascular (CMLV) (BASTIN, HEXIMER, 2011).

A interação agonista-receptor ativa a subunidade acoplada na proteína G do tipo Gq/11, que por sua vez, ativa a fosfolipase C (PLC), levando à síntese IP₃ e diacilglicerol (DAG). O IP₃ interage com seus receptores na

membrana do retículo sarcoplasmático e o Ca^{2+} liberado se liga nos receptores de rianodina (RyR), corroborando com o aumento do cálcio, devolvendo a cascata da contração, como já explicado anteriormente (LIU, KHALIL, 2018; WEBB, 2003) (KUO, EHRLICH, 2015).

O DAG ativa a proteína cinase C (PKC), que fosforila proteínas ligadas ao canal de Ca^{2+} , favorecendo a entrada de Ca^{2+} do meio extracelular para o interior da célula do músculo liso vascular, e com o aumento da concentração, forma o complexo $\text{Ca}^{2+}\text{-CaM}$, e desenvolvendo a contração (HOUSE et al., 2008; BASTIN; HEXIMER, 2011).

Havendo a redução dos níveis de Ca^{2+} , há inibição da CCLM, que deixa de fosforilar a miosina. Ainda, a enzima fosfatase da cadeia leva da miosina (FCLM) desfosforila a miosina, permitindo seu desligamento da molécula de actina.

Assim como os hormônios e neurotransmissores possuem capacidade regulatória sobre a atividade contrátil das células do músculo liso vascular, há mecanismos que estão envolvidos no relaxamento vascular, como o óxido nítrico advindo do endotélio, que será detalhado no próximo capítulo.

3.3 ÓXIDO NÍTRICO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

O NO é um gás lipossolúvel e que pode passar livremente através das membranas da célula. Uma das primeiras funções fisiológicas descobertas para o NO foi a sua capacidade de atuar como vasodilatador no sistema cardiovascular (ANDRABI et al., 2023), seu papel na regulação do tônus vascular foi observado há quase quatro décadas (FURCHGOTT, ZAWADZKI, 1980).

O NO endógeno é gerado enzimaticamente por uma família distinta de enzimas conhecidas como sintases do óxido nítrico ou NO sintases (NOS) (LUNDBERG, WEITZBERG, 2022). Estas apresentam três isoformas, a NOS neuronal (nNOS) encontrada em neurônios; a NOS endotelial (eNOS), nas células endoteliais; e a NOS induzível (iNOS), cuja expressão é estimulada em células do sistema imunológico (FORSTERMANN, SESSA, 2012).

No endotélio, a síntese de NO ocorre a partir de estímulos que podem ser químicos ou físicos. Os estímulos químicos são originados de interação de agonistas com receptores específicos presentes nas células endoteliais. Já o

estímulo físico é feito pela força que o sangue exerce sobre a parede das artérias, denominada força de cisalhamento (FORSTERMANN; SESSA, 2012; LUNDBERG, WEITZBERG, 2022).

A ocupação dos receptores por agonistas resulta no aumento da concentração de cálcio intracelular que se liga a calmodulina (CaM) formando o complexo Ca^{2+} - calmodulina. Assim, ativa a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (WANG et al, 2016; LUNDBERG, WEITZBERG, 2022). A eNOS converte L-arginina em NO e L-citrulina, utilizando oxigênio molecular e vários cofatores como fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzida (NADPH), flavina adenina dinucleótido (FAD), mononucleótido flavina (FMN) e tetra-hidrobiopterina (BH_4) (GIROUD et al, 2010; FORSTERMANN; SESSA, 2012) (Figura 1).

A partir do endotélio, o NO consegue se difundir para a célula muscular lisa, onde estimula a guanilato ciclase solúvel (GCs) que leva à produção de GMP cíclico (GMPc) a partir do trifosfato de guanosina (GTP) (FORSTERMANN et al, 1986). O GMPc é um segundo mensageiro responsável por ativar a proteína quinase G (PKG), que na musculatura lisa atinge diversos alvos responsáveis por promoverem o vasorrelaxamento (FARAH, MICHEL, BALLIGAND, 2018).

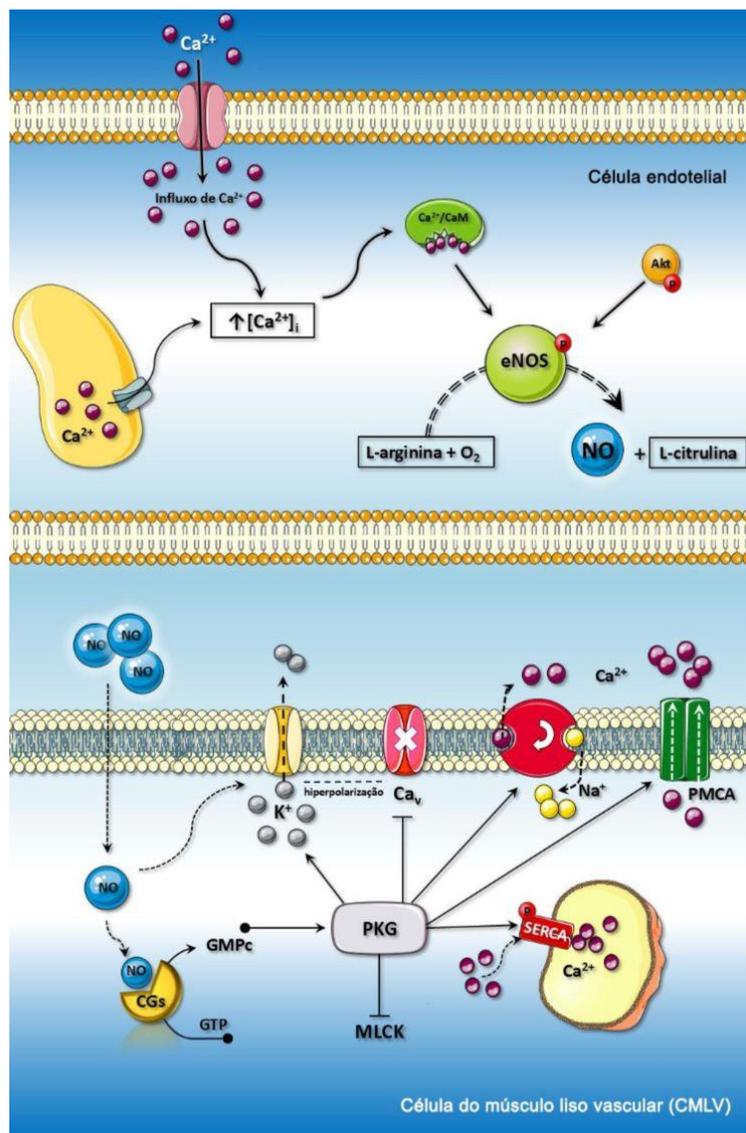


Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de síntese e ação do óxido nítrico no vaso. CaM: calmodulina. Ca_v: canal para cálcio voltagem dependente. CGs: ciclase de guanilil solúvel. eNOS: óxido nítrico sintase endotelial. GMPc: monofosfato de guanosina cíclico. GTP: trifosfato de ganosina. MLCK: cinase de cadeia leve de miosina. NO: óxido nítrico. PKG: proteína cinase dependente de guanosina. SERCA: bomba de cálcio do retículo endossarcoplasmático. PMCA: Ca²⁺-ATPase da membrana plasmática. **Fonte:** Bernadino-Paula, 2020.

Detalhadamente, a ação da PKG atua na bomba de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático (SERCA), acelerando a recaptação de Ca²⁺ (KELVIN, NELSON, 2015). Com o baixo nível de cálcio é ativada a fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP), resultando na quebra das pontes cruzadas de actina-miosina (LEE et al, 1997).

A PKG também atua nos canais para K^+ da membrana plasmática, promovendo sua ativação, e por consequência, sua abertura. As células da musculatura lisa vascular expressam canais para K^+ que contribuem para a regulação do tônus miogênico bem como a determinação do potencial de membrana (JACKSON, 2017). Na microcirculação, assim como em outros músculos vasculares, há quatro diferentes classes para os canais de K^+ , sendo eles: canais para K^+ voltagem dependentes, canais para K^+ sensíveis ao ATP, canais para K^+ sensíveis ao cálcio, e canais para K^+ retificadores de entrada (KUANG et al, 2015).

Os canais de potássio dependente da voltagem (K_v) aumentam a sua atividade em estados de despolarização da membrana e são importantes reguladores do potencial de membrana em resposta a estímulos despolarizantes. Em relação ao canal de potássio dependente do Ca^{2+} (K_{ca}), estes são ativados por aumentos no Ca^{2+} intracelular, regulando o potencial de membrana (KUANG et al, 2015).

Já os canais de potássio dependentes do ATP (K_{ATP}), estão relacionados às alterações do metabolismo celular e constituem canais alvo de uma grande variedade de estímulos vasodilatadores. E os canais de potássio retificadores de entrada (K_{ir}) regulam o potencial de membrana das células musculares vasculares de vários tipos de artérias e operam quando aumentam as concentrações de K^+ , H^+ e adenosina (KO et al, 2007).

Com a ativação desses canais, promovendo sua abertura, haverá o aumento do efluxo de íons K^+ , o que gera a hiperpolarização da membrana, resultando no fechamento de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, diminuindo, assim, a entrada de Ca^{2+} , gerando o processo de vasodilatação. Outro alvo da PKG é na maquinaria contrátil, isso porque ocorre a inativação da cinase da cadeia leve de miosina, corroborando para a vasodilatação (SURKS et al, 1998; SATIN, SCHRODER, CRUMP, 2011).

Havendo comprometimento no relaxamento dependente do endotélio pode resultar em um aumento na síntese de substâncias contraturantes, resultando em um aumento anormal da resistência vascular periférica (KONUKOGLU, UZUN, 2016; KNAPP et al, 2019).

Assim, a disfunção endotelial decorre principalmente do desequilíbrio entre a produção de NO pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A

instalação de um estado inflamatório crônico em pacientes com doenças cardiovasculares reduz a expressão de eNOS, enquanto o aumento do estresse oxidativo acelera a degradação do NO (MONICA, BIAN, MURAD, 2016; NUMATA, TAKIMOTO, 2022).

Contudo, a disfunção endotelial não se resume apenas à diminuição da biodisponibilidade de NO pela eNOS, mas sim uma combinação de fatores, que inclui a redução de disponibilidade de L-arginina, função enzimática desregulada e uma alta taxa de degradação do NO (JANASZAK-JASIECKA et al, 2023).

3.4 DOADORES DE NO E NITRATOS ORGÂNICOS

Diante da problemática da disfunção endotelial e menor biodisponibilidade de NO, drogas que aumentam a disponibilidade de NO podem ter efeitos benéficos no organismo. Os agentes terapêuticos que aumentam os níveis de NO, liberando-o nos sistemas biológicos são conhecidos como doadores de óxido nítrico e já são utilizados há mais de 150 anos (LUNDBERG; GLADWIN; WEITZBERG, 2015).

Dentre os doadores de óxido nítrico, já foram identificadas mais de 105 substâncias, dentre elas, os nitratos inorgânicos e orgânicos, como exemplo do nitroprussiato de sódio (NPS), a nitroglicerina (NTG), o dinitrato de isossorbida e o 5-mononitrato de isossorbida. Na sua função, as substâncias liberam o NO tanto em *in vivo* quanto *in vitro* (BATES et.al, 1991).

Dentre os doadores de NO, os nitratos orgânicos são os mais comumente utilizados nas doenças cardiovasculares, justamente porque os doadores de NO atuam em nível vascular, aumentando a capacitância venosa e a vasodilatação coronariana (SCATENA et al., 2010; QUEIROZ et al., 2014). Além de possuir propriedades antioxidantes capazes de modular respostas inflamatórias (PITSIKAS, 2018).

O efeito *in vivo* dos nitratos orgânicos é bem descrito, esses compostos são utilizados clinicamente para o tratamento de várias doenças, incluindo trombose e estenose, tratamento para angina, infarto agudo do miocárdio, crises hipertensivas, entre outros. Contudo, logo após a introdução clínica dos nitratos orgânicos no final do século 19 foi visto que os efeitos hemodinâmicos e clínicos invariavelmente diminuem com a terapia contínua, sendo observado

uma redução progressiva da potência e eficácia, evento conhecido como tolerância (LIMA et al., 2014).

O primeiro relato sobre o fenômeno da tolerância aos nitratos foi feito pelo médico Stewart, no ano de 1888. Após um paciente realizar o tratamento crônico com NTG, foi necessário de uma dose 20 vezes maior de NTG quando comparado a dose inicial para induzir os efeitos antianginosos, evidenciando assim à tolerância (STEWART, 1888 *apud* DAIBER, MUNZEL, 2015).

Os mecanismos que desencadeiam o fenômeno da tolerância ainda permanecem incertos e parecem diferir entre os compostos, acreditando que este processo seja por diversas causas (MOLLACE et al, 2014). Contudo, estudos já discutem algumas causas, como dessensibilização da guanilato ciclase solúvel (MOLINA et al, 1987; JABS et al, 2015); aumento da atividade da fosfodiesterase (KIM et al, 2001); aumento da sensibilidade aos vasoconstritores (HEITZER et al, 1998; OELZE et al, 2013); indução do estresse oxidativo pela biotransformação dos nitratos (DAIBER et al, 2004; SAYED et al, 2008).

Frente ao fenômeno da tolerância que acomete os nitratos orgânicos disponíveis usados na clínica e necessidade de desenvolver novas opções farmacológicas com melhor eficiência a longo prazo, diferentes grupos de pesquisa têm como objetivo comum o desenvolvimento de novos compostos com potencial atividade vasodilatadora e efeitos adversos reduzidos para o tratamento de doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial.

3.5 NITRATO ORGÂNICO NIB7

O grupo de pesquisa do Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) da Universidade Federal da Paraíba tem desenvolvido diversos estudos em descoberta do mecanismo de ação de novos nitratos orgânicos e sua função sob sistema cardiovascular.

Dentre o histórico de pesquisa, alguns compostos têm demonstrado ser promissores, como o 2-nitrato-1,3-dibutoxipropano (NDPB), estudado por França-Silva e colaboradores (2012) ciclohexanol (HEX), por Mendes-Junior e colaboradores (2015), bem como os mais recentes publicados, o 1,3-

diisobutoxipropan-2-ila (NDIBP), por Cavalcanti (2021) e Benzoato de 4-nitrooxibutíla (BBN), pesquisado por Rocha (2021).

Este último supracitado (BBN) demonstrou atividade hipotensora e anti-hipertensiva em ratos; mecanismos de vasorrelaxamento envolvendo a via NO/GMPc/PKG; participação dos canais de cálcio voltagem dependente; não apresentou tolerância vascular, bem como não apresentou risco de toxicidade aguda em ratos.

Com isso, tendo em vista essa molécula como promissora e a fim de potencializá-la, foi sintetizada um novo composto a partir dela. Na fórmula estrutural do BBN (Figura 3), foi acrescentado um grupo metil (CH_3), formando assim o novo nitrato orgânico (Figura 4), o 4-metilbenzoato de 4-nitrooxibutíla (NIB7), e assim foi estudado o mecanismo de ação dessa nova substância.

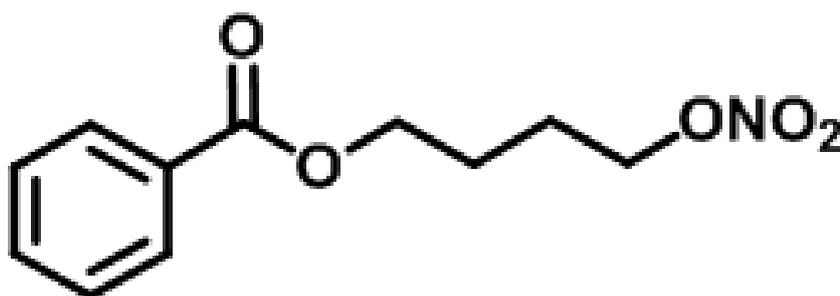


Figura 3: Fórmula estrutural do BBN (molécula intermediária).

O grupo metil (CH_3) é de grande importância na otimização de compostos, tanto na questão farmacodinâmica como na farmacocinética. Este grupo impacta em diversos efeitos biológicos, como o aumento da potência (BARREIRO, KUMMERLE, FRAGA, 2011; AYNEDINOVA et al, 2021). Com evidência dos resultados dos efeitos do grupo metil na química medicinal (SCHONHERR, CERNAK, 2013; PINHEIRO, FRANCO, FRAGA, 2023), foi sintetizado o NIB7 e o seu efeito vascular foi investigado em preparações de artéria mesentérica superior isolada de rato.

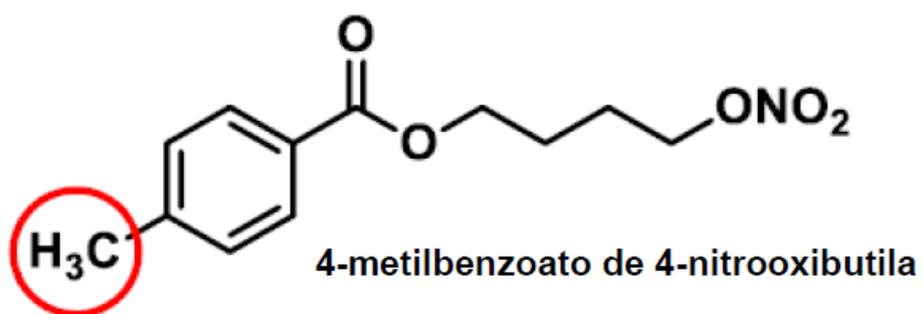


Figura 4: Fórmula estrutural do NIB7.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E LOCAL DA PESQUISA

Os protocolos experimentais realizados nessa pesquisa foram realizados no Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) do Centro de Biotecnologia da UFPB.

Para todos os experimentos, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com peso 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, sob condições de umidade ($60 \pm 10\%$) e temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$) monitoradas, com livre acesso à dieta a base de ração tipo pellets (Purina®) e água disponível em garrafas de polietileno com bicos de aço inoxidável, encaixadas na parte superior da grade metálica da gaiola. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6:00 às 18:00 horas.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comissão de Ética de Uso Animal (Anexo I) da Universidade Federal da Paraíba (parecer CEUA nº 4847071122).

4.2 SUBSTÂNCIA TESTE

A substância teste utilizada foi o novo nitrato orgânico, 4-metilbenzoato de 4-nitrooxibutílica, com fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_5$, com massa molecular 253,25 g/mol. Esse composto foi 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 BBN (ROCHA *et al.*, 2021), onde teve o crescimento o grupo metil (CH_3) devido a sua importância na otimização de compostos.

Assim, uma solução de 4-metilbenzoato de 4-clorobutílica (0,0235 mols) em acetonitrila (10 mL) foi tratada em pequenas porções com uma solução de nitrato de prata (0,033 mols) em acetonitrila (10 mL). A mistura foi refluxada por 12 horas. Um precipitado formado foi filtrado e a solução foi evaporada. A mistura foi dissolvida em diclorometano, lavada com água (3x 25 mL) e com NaCl saturada (3x 25mL), seca no sulfato de sódio e depois a fase orgânica foi

evaporada formando um líquido amarelado. O líquido foi purificado através de uma coluna cromatográfica usando sílica gel como a fase estacionária e uma mistura de hexano/acetato de etila (97:3) como a fase móvel, resultando na obtenção de um óleo levemente incolor. RF: 0,4 hexano:acetato (4:1) (Figura 5).

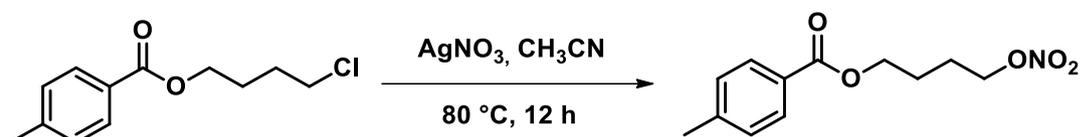


Figura 5: Preparação do 4-metilbenzoato de 4-nitrooxibutila.

4.3 FÁRMACOS

As drogas utilizadas durante os protocolos de reatividade vascular foram cloridrato de acetilcolina (ACh), fenilefrina (FEN), Hidroxicobalamina (HDX), ODQ (1 H- [1,2,4] oxadiazólo [4,3-a] quinoxalin-1-one), 4-aminopiridina (4-AP), cloreto de tetraetilamônio (TEA), glibenclamida (GLIB), Cloreto de Bário (BaCl), L-NAME (N -nitro-L-arginina-metil-éster). As drogas utilizadas estão descritas no quadro 1 com sua) respectiva função.

Quadro 1: Fármacos utilizados e sua classe

FÁRMACO	CLASSE
ACh	Agonista colinérgico
FEN	Agonista adrenérgico
HDX	Sequestrador de óxido nítrico
ODQ	Inibidor da guanilil ciclase solúvel
4-AP	Bloqueador de canal de potássio voltagem dependente
TEA 1mM	Bloqueador de canal de potássio sensível ao cálcio
TEA 3mM	Bloqueador inespecífico de potássio
GLIB	Bloqueador de canal de potássio sensível ao ATP
BACL ₂	Bloqueador de canal de potássio retificador de entrada
L-NAME	Inibidor da Enos

4.4 SOLUÇÕES NUTRITIVAS

Para realização dos protocolos *ex vivo* foram utilizadas soluções nutritivas (Quadro 2) com pH 7,4 e aeradas com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) em temperatura de 37°C, para manter a viabilidade dos tecidos utilizados.

Como o tecido utilizado foi artéria mesentérica de rato, a solução nutritora foi o Tyrode (TANAKA, et al, 1999), composto por 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).

Quadro 2: Composição da solução nutritiva de Tyrode (TANAKA et al, 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

4.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS *EX VIVO*

4.5.1 Artéria mesentérica superior de rato

Os animais foram eutanasiados por decapitação utilizando guilhotina, em seguida foi realizada uma incisão no abdômen e obtenção da artéria mesentérica superior por meio da dissecação.

Após remoção do vaso, este foi transferido para a solução Tyrode em uma placa de petri, onde a artéria foi seccionada em anéis com comprimento entre 2-5 mm. Em seguida foram adicionadas hastes de aço inoxidável em formato de triângulo atravessando o lúmen do vaso. Essas hastes contendo os anéis de artéria mesentérica foram introduzidas em cubas contendo 10 ml da solução Tyrode e mistura carbogênica, mantidos a 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, que é composto por quatro cubas que foram preenchidas com a solução nutritora e conteve o tecido vascular suspenso em seu interior (Figura 5).

Cada cuba possui um micromanipulador que permite a ligação do tecido ao transdutor de força que irá levar informações para um computador utilizando o sistema de aquisição de dados PowerLab (software versão 4.2, ADInstruments, Massachusetts, EUA).

Os anéis foram submetidos a uma tensão basal de 0,75 gramas durante 60 minutos para estabilização. A solução nutritora foi trocada a cada 15 minutos durante esse período (ALTURA, ALTURA, 1970).



Figura 6: Banho de órgãos e sistema de aquisição de dados do LACONCHA (local de realização da pesquisa).

4.5.2 Verificação da viabilidade vascular e teste de endotélio

O teste da viabilidade dos anéis foi realizado após a primeira estabilização (Figura 7). Os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (FEN 10 μ M), um agonista seletivo do receptor adrenérgico alfa 1, e depois foi avaliada a contração desenvolvida pelos anéis, realizando a subtração do valor da tensão pós FEN e tensão basal. Caso o valor fosse superior a 0,3 gramas o anel foi considerado viável.

Em seguida foi realizado o teste de endotélio, com adição de acetilcolina (ACh 10 μ M), agonista dos receptores muscarínicos expressos no endotélio vascular. Os anéis que apresentaram relaxamento igual ou superior à 80% da pré-contração com FEN foram considerados com endotélio funcional (E+). Os

anéis que apresentarem relaxamento inferior à 10% foram considerados sem endotélio funcional (E-) (FURCHGOTT, ZAWADZKI, 1980).

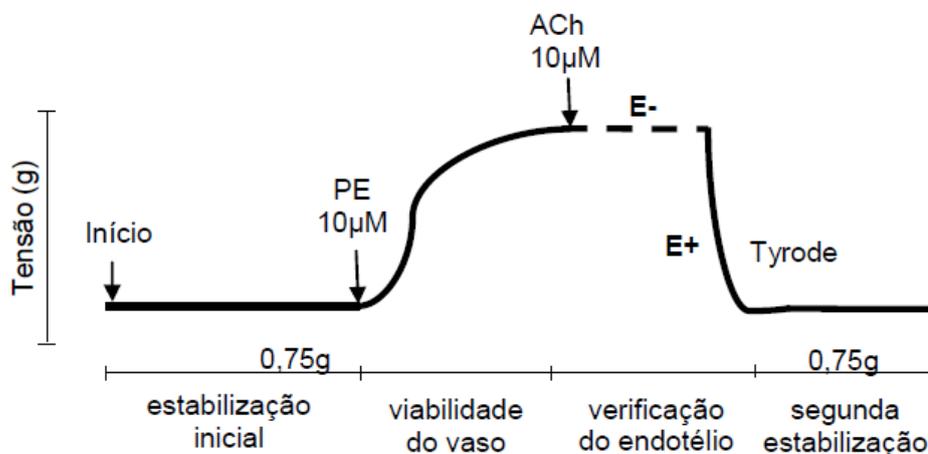


Figura 7: Protocolo de verificação da viabilidade do tecido vascular e avaliação da integridade do endotélio vascular. PE: fenilefrina; Ach: acetilcolina; E+: endotélio preservado. E-: endotélio desnudo. Fonte: adaptado de Rocha, 2021.

4.5.3 Avaliação do efeito do NIB7 sobre o vaso pré-contraído com FEN

Em todos os experimentos *ex vivo*, o NIB7 foi previamente dissolvido em Cremophor® e em seguida diluído em água destilada a fim de obter uma solução mãe de concentração 10^{-1} M. Esta solução foi subsequentemente diluída para obtenção das concentrações desejadas a serem utilizadas nos protocolos.

Após o período de estabilização de 60 minutos, anéis de artéria mesentérica com endotélio intacto e desnudo foram submetidos a uma segunda contração com 10µM de FEN. Em seguida, contrações crescentes do nitrato foram adicionadas separadamente às cubas de forma cumulativa (10^{-12} a 10^{-3} M) (Figura 8). Dessa forma foi obtida uma curva contração-resposta dos anéis com e sem endotélio. O relaxamento foi expresso em percentagem reversa à contração induzida por FEN. Foram calculados o pD_2 (-log da CE_{50}) e $Emax$ (efeito máximo) do NIB7.

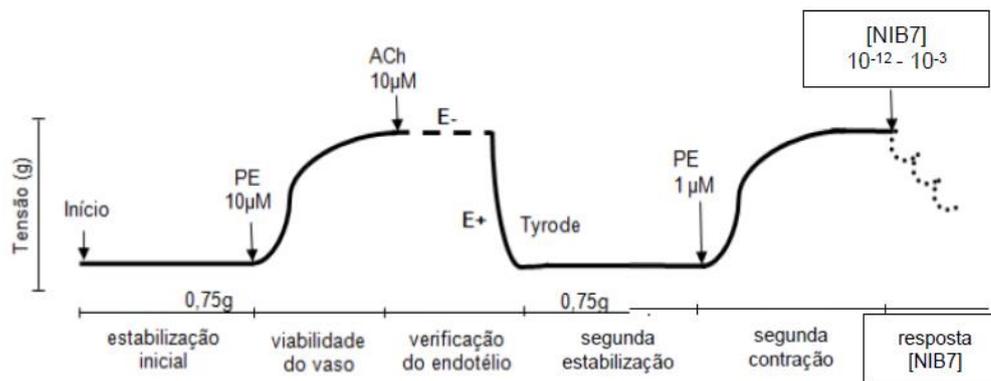


Figura 8: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} – 10^{-3} M) em artéria mesentérica pré-contraída com FEN. PE: fenilefrina; Ach: acetilcolina; E+: endotélio preservado. E-: endotélio desnudo. Fonte: adaptado de Rocha, 2021.

4.5.4 Avaliação do novo nitrato sobre o vaso pré-contraído com KCl 60mM

Após verificar o efeito relaxante do nitrato, foi realizado o protocolo com solução Tyrode despolarizante (KCl 60mM). Essa solução tem por finalidade bloquear o efluxo de potássio pelos miócitos, levando à despolarização, ativação de canais voltagem dependente de cálcio tipos L e T, aumento do influxo de cálcio e contração do miócito (ROCHA, 2021). Ao atingir o platô da contração, foi adicionado o NIB7 de maneira cumulativa (Figura 9). O efeito foi registrado e avaliado por comparação dos grupos na presença e ausência do KCl 60mM.

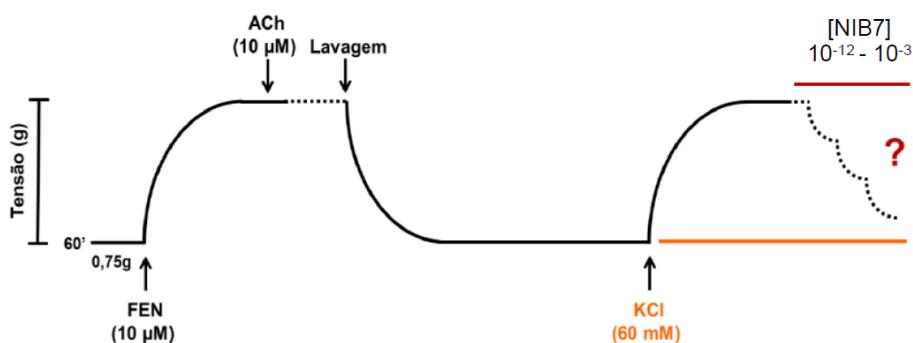


Figura 9: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com solução despolarizante de Tyrode 60mM. FEN: fenilefrina; Ach: acetilcolina. Fonte: adaptado de Cavalcanti, 2022.

4.5.5 Investigação da participação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) no efeito vascular induzido pelo NIB7

Com o objetivo de investigar se a resposta vasorrelaxante do NIB7 dependia da NOS, foi utilizado o inibir L-NAME (100 μ M), que inibe de forma não específica essa enzima (NOS) (REES et al, 1990). Após o período de estabilização, anéis de artéria mesentérica com endotélio intacto foram induzidos a uma segunda contração com FEN e concentrações crescentes e cumulativas de NIB7 (Figura 10). O efeito final foi avaliado pela curva dose-resposta e por comparação dos valores de $E_{m\acute{a}x}$ e pD_2 das curvas na presença e ausência do L-NAME.

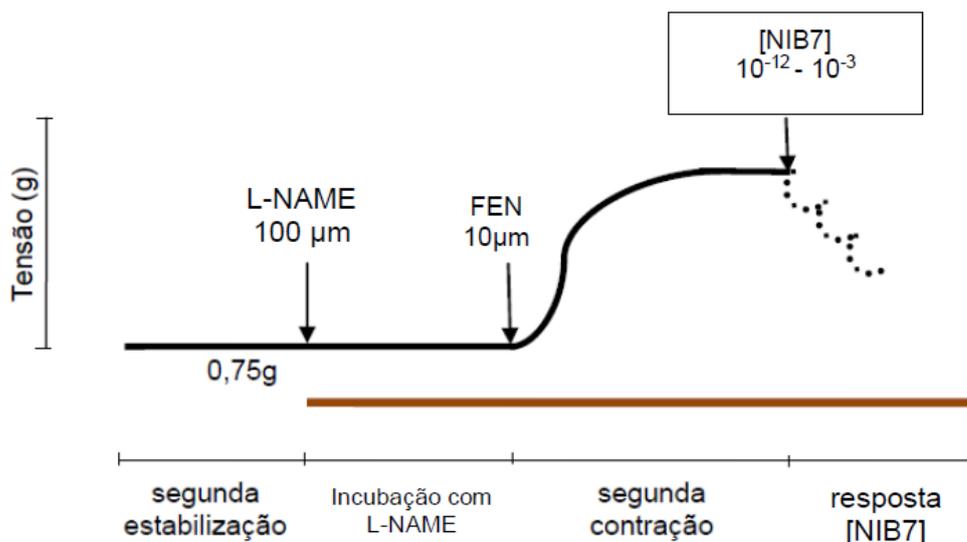


Figura 10: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10⁻¹²-10⁻³ M) em artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com L-NAME 100 μ M (linha marrom). Fonte: adaptado de Rocha, 2021.

4.5.6 Investigação da participação do NO no efeito vascular induzido pelo NIB7

Preparações de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sem endotélio funcional, foram incubadas separadamente com um sequestrador extracelular de NO (KRUSZYNA et al, 1998), a hidroxicobalamina (HDX 30 μ M). Após o período de contração com FEN, foram adicionadas as

concentrações crescentes e cumulativas do NIB7 (Figura 11). O efeito final foi avaliado pela curva dose-resposta e por comparação dos valores de $E_{máx}$ e pD_2 das curvas na presença e ausência do HDX 30 μ M.

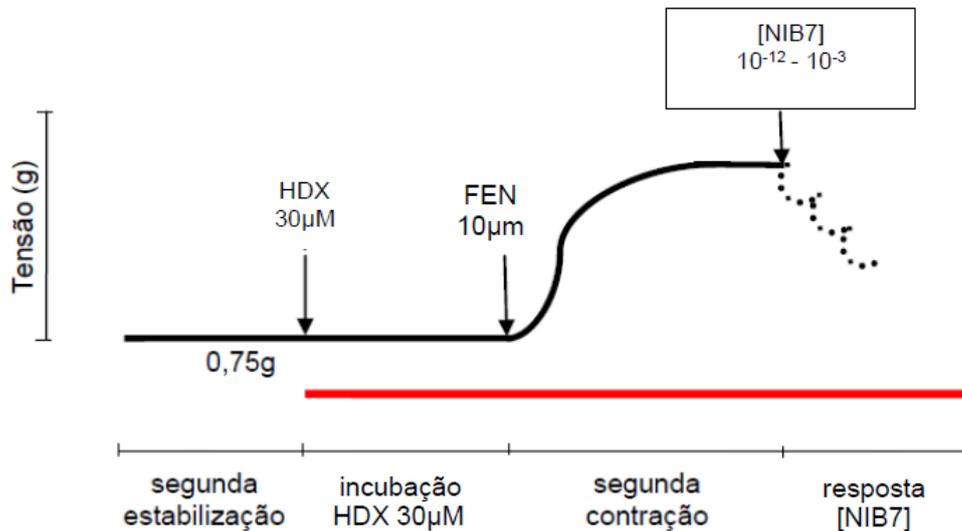


Figura 11: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com HDX 30 μ M (linha vermelha). Fonte: adaptado de Rocha, 2021.

4.5.7 Avaliação da participação da via NO/GMPc no efeito vascular induzido pelo NIB7

Com o objetivo de investigar a participação da via NO/GCs na resposta desenvolvida pelo NIB7, foi utilizado um inibidor da enzima GCs, a substância ODQ (GARTHWAITE et al, 1995). Após a segunda estabilização, os anéis de artéria mesentérica foram incubados por 30 min com ODQ 10 μ M. Posteriormente, foi induzida uma segunda contração com FEN e concentrações crescentes e cumulativas de NIB7 foram adicionadas (Figura 12). O efeito final foi avaliado pela curva dose-resposta e por comparação dos valores de $E_{máx}$ e pD_2 das curvas na presença e ausência do ODQ 10 μ M.

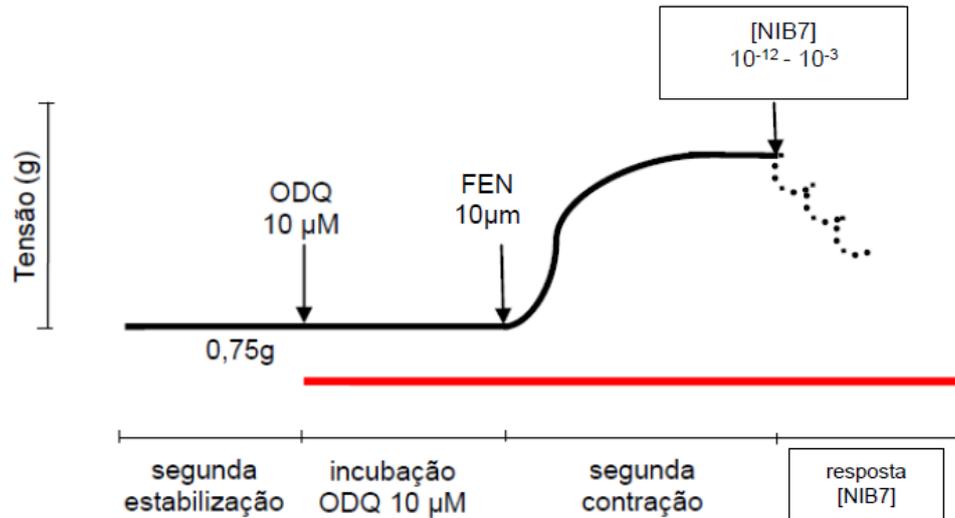


Figura 12: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com ODQ $10\mu\text{M}$ (linha vermelha). Fonte: adaptado de Rocha, 2021.

4.5.8 Avaliação da participação de canais de K^+ no efeito do NIB7

Após a verificação do endotélio funcional, a solução Tyrode das cubas com anéis sem endotélio funcional foi trocada pela solução de Tyrode com KCl 20mM, a qual permaneceu até o final do experimento. Esse procedimento impede parcialmente o efluxo de K^+ (CAMPBELL et al, 1996). Decorridos 30 minutos, foi induzida uma nova contração com FEN, e em seguida, uma curva concentração-resposta pelo NIB7 foi obtida (Figura 13). O efeito final foi avaliado pela curva dose-resposta e por comparação dos valores de $E_{\text{máx}}$ e pD_2 das curvas na presença e ausência do KCl 20mM.

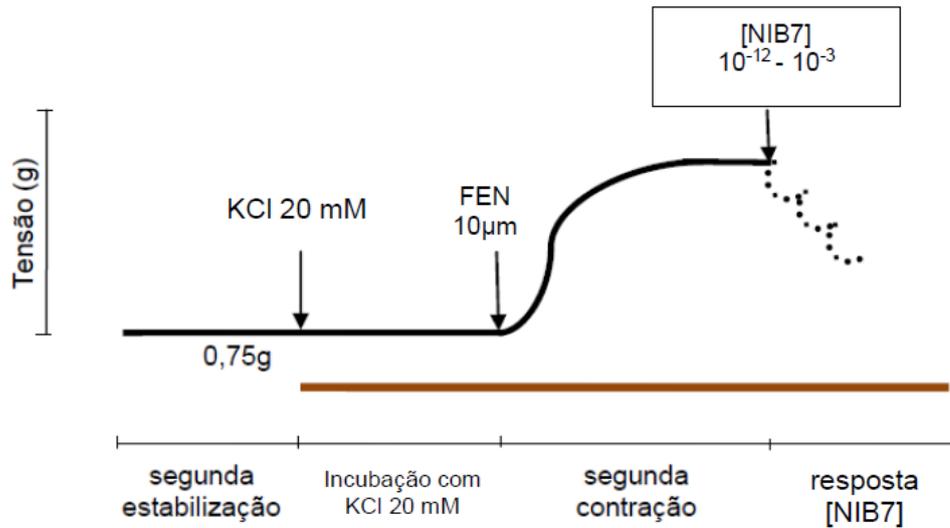


Figura 13: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e com solução de Tyrode 20mM. Fonte: adaptado de Rocha, 2021.

Também foi feito experimento com o TEA 3mM, nesta concentração um bloqueador para canais de K^+ de forma não seletiva (WANG et al, 2008). Após a segunda estabilização, os anéis de artéria mesentérica foram incubados por 30 min com TEA 3mM. Posteriormente, foi induzida uma segunda contração com FEN e concentrações crescentes e cumulativas de NIB7 foram adicionadas ao sistema para a construção da curva concentração resposta (Figura 14). O efeito final foi avaliado pela curva dose-resposta e por comparação dos valores de $E_{máx}$ e pD_2 das curvas na presença e ausência do TEA 3mM.

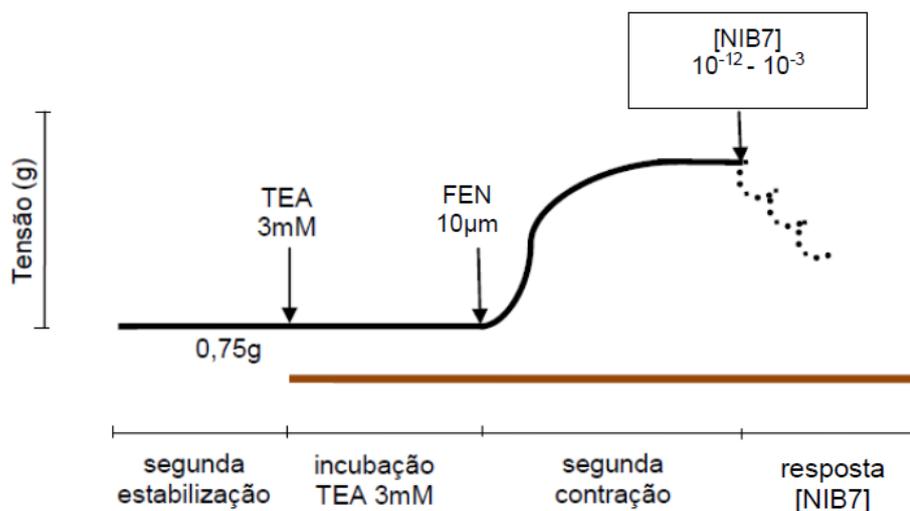


Figura 14: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com TEA 3mM. Fonte: adaptado de Rocha, 2021.

4.5.9 Avaliação da participação de subtipos de canais para K⁺ no efeito do NIB7

4.5.9.1 Avaliação do canal K_{ATP} no vasorrelaxamento pelo NIB7

Com o objetivo de investigar a participação do canal K_{ATP} na resposta desenvolvida pelo NIB7, foi utilizado um inibidor desse canal, a glibenclamida (GLIB) 1µM (PRADHAN, 2015). Após a segunda estabilização, os anéis de artéria mesentérica foram incubados por 30 min com GLIB (1µM). Posteriormente, foi induzida uma segunda contração com FEN e concentrações crescentes e cumulativas de NIB7 foram adicionadas (Figura 15). O efeito final foi avaliado pela curva dose-resposta e por comparação dos valores de $E_{máx}$ e pD_2 das curvas na presença e ausência do GLIB (1µM).

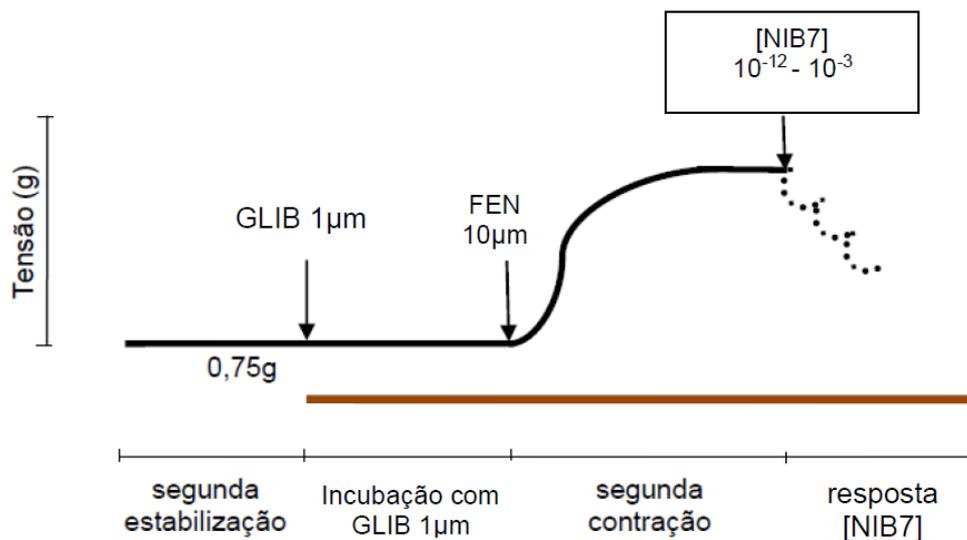


Figura 15: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com GLIB $1\mu\text{M}$. Fonte: adaptado de Rocha, 2021.

4.5.9.2 Avaliação do canal K_{IR} no vasorrelaxamento pelo NIB7

Com o objetivo de investigar a participação do canal K_{IR} na resposta desenvolvida pelo NIB7, foi utilizado um bloqueador desse canal, BaCl_2 ($30\mu\text{M}$) (ADARAMOYE, MEDEIROS, 2009). Após a segunda estabilização, os anéis de artéria mesentérica foram incubados por 30 min com BaCl_2 ($30\mu\text{M}$). Posteriormente, foi induzida uma segunda contração com FEN e concentrações crescentes e cumulativas de NIB7 (Figura 16). O efeito final foi avaliado pela curva dose-resposta e por comparação dos valores de $E_{\text{máx}}$ e pD_2 das curvas na presença e ausência do BaCl_2 ($30\mu\text{M}$).

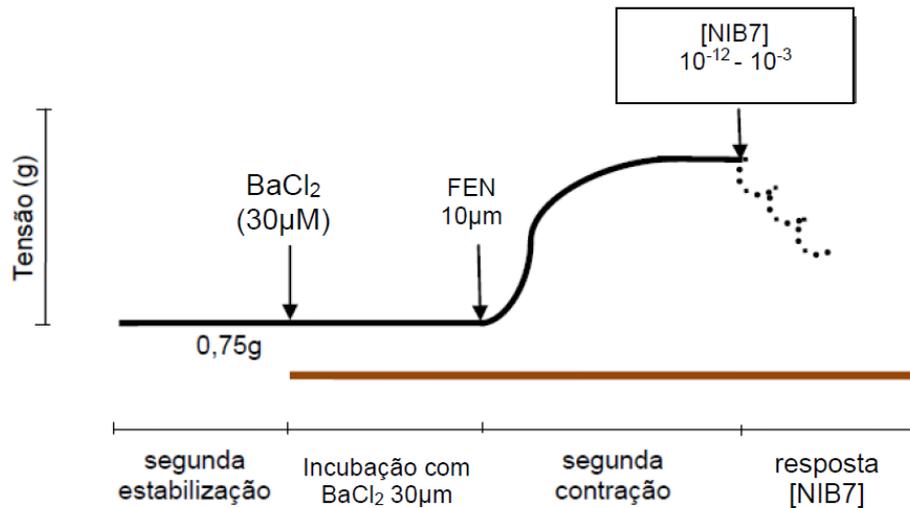


Figura 16: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com BaCl₂ 30µM. Fonte: adaptado de Rocha, 2021.

4.5.9.3 Avaliação do canal K_v no vasorrelaxamento pelo NIB7

Com o objetivo de investigar a participação do canal K_v na resposta desenvolvida pelo NIB7, foi utilizado um bloqueador desse canal, 4-AP 1mM (WYNNE, 2011). Após a segunda estabilização, os anéis de artéria mesentérica foram incubados por 30 min com 4-AP 1mM. Posteriormente, foi induzida uma segunda contração com FEN e concentrações crescentes e cumulativas de NIB7 (Figura 17). O efeito final foi avaliado pela curva dose-resposta e por comparação dos valores de Emáx e pD₂ das curvas na presença e ausência do 4-AP.

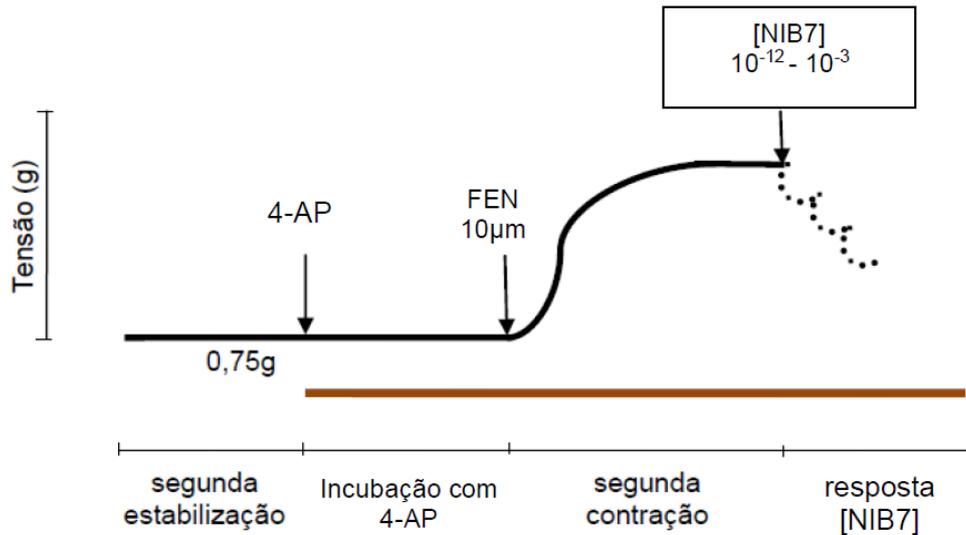


Figura 17: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com 4-AP. Fonte: adaptado de Rocha, 2021.

4.5.9.4 Avaliação do canal BK_{Ca} no vasorrelaxamento pelo NIB7

Com o objetivo de investigar a participação do canal BK_{Ca} na resposta desenvolvida pelo NIB7, foi utilizado um bloqueador desse canal, TEA 1mM (YE, 2004). Após a segunda estabilização, os anéis de artéria mesentérica foram incubados por 30 min com TEA 1mM. Posteriormente, foi induzida uma segunda contração com FEN e concentrações crescentes e cumulativas de NIB7 foram adicionadas (Figura 18). O efeito final foi avaliado pela curva concentração-resposta e por comparação dos valores de $E_{máx}$ e pD_2 das curvas na presença e ausência do TEA 1mM.

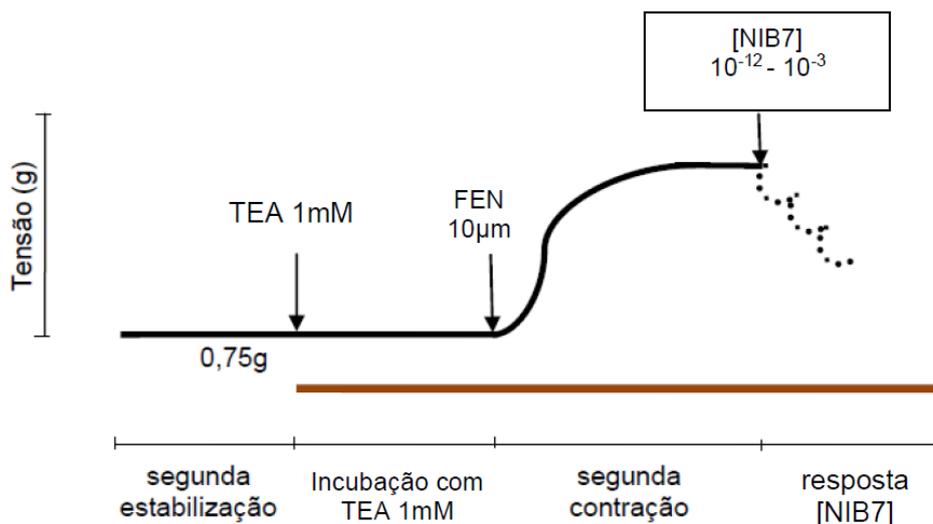


Figura 18: Protocolo de verificação do efeito de concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) artéria mesentérica pré-contraída com FEN e incubada com TEA 1mM. Fonte: adaptado de Rocha, 2021.

4.6 Avaliação da habilidade do NIB7 em desenvolver tolerância vascular

Após segunda estabilização, os anéis com endotélio desnudo foram pré incubados com um alta concentração de NIB7 ($100\mu\text{M}$) durante 30 min (DAIBER, 2004; ROCHA, 2021). As preparações foram submetidas novamente a uma lavagem com trocas da solução Tyrode, passando por nova estabilização e a tensão basal reajustada. Posteriormente, foi induzida uma segunda contração com FEN e concentrações crescentes e cumulativas de NIB7 (Figura 19). O efeito final foi avaliado pela curva concentração-resposta e por comparação dos valores de $E_{\text{máx}}$ e pD_2 das curvas na presença e ausência da exposição prévia do NIB7 nas preparações.

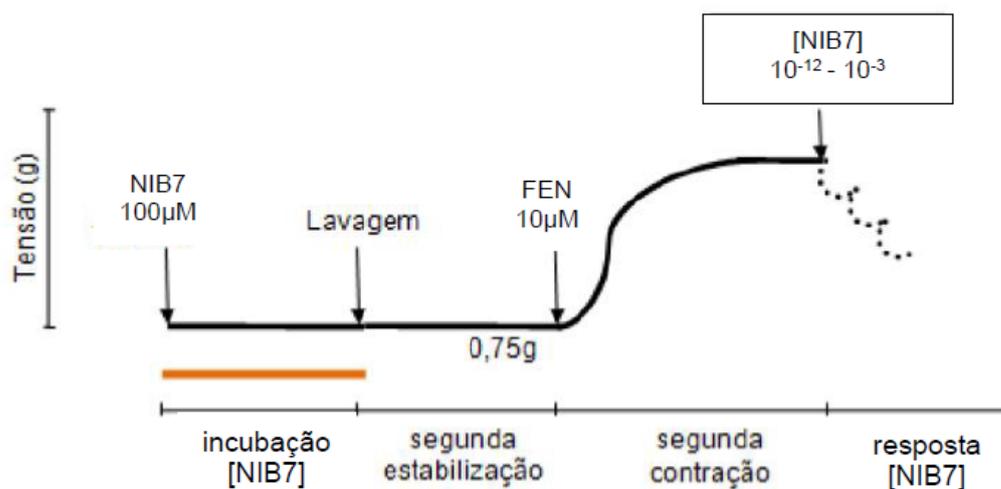


Figura 19: Protocolo de verificação de tolerância vascular pela pré-exposição ao NIB 7 (100µm) em artéria mesentérica pré-contraída com FEN. Fonte: adaptado de Rocha, 2021.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As curvas foram obtidas por regressão não-linear pelas quais foi obtido o pD_2 (-log da CE50 - concentração em molar que o fármaco produz 50% de seu efeito máximo e o efeito máximo (percentual do valor máximo do relaxamento). Foi realizado o teste “t” student não-pareado para análise da diferença das médias e ANOVA “two way” seguida de pós-teste de Bonferroni para comparação do relaxamento da curva concentração-resposta. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$, sendo utilizado o programa GraphPad Prism 5.0® para as análises estatísticas.

5 RESULTADOS

5.1 NIB7 promove vasorrelaxamento na presença e ausência de endotélio

O NIB7 quando adicionado ao banho de maneira cumulativa (10^{-12} – 10^{-3} M) promoveu vasorrelaxamento concentração-dependente em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com FEN ($10\mu\text{M}$), na presença do endotélio. A remoção do endotélio não alterou o efeito vasorrelaxante (Figura 20).

Não houve diferença na potência bem como no efeito máximo induzido pelo NIB7 quando comparados os anéis com endotélio removido e endotélio intacto, respectivamente ($pD_2 = 6,328 \pm 0,11$ $n=10$ vs. $6,166 \pm 0,21$ $n=7$, $p=0,4802$; $E_{\text{máx}} = 107,6 \pm 3,07$ $n=10$ vs. $110,3 \pm 12,76$ $n=7$, $p=0,8127$).

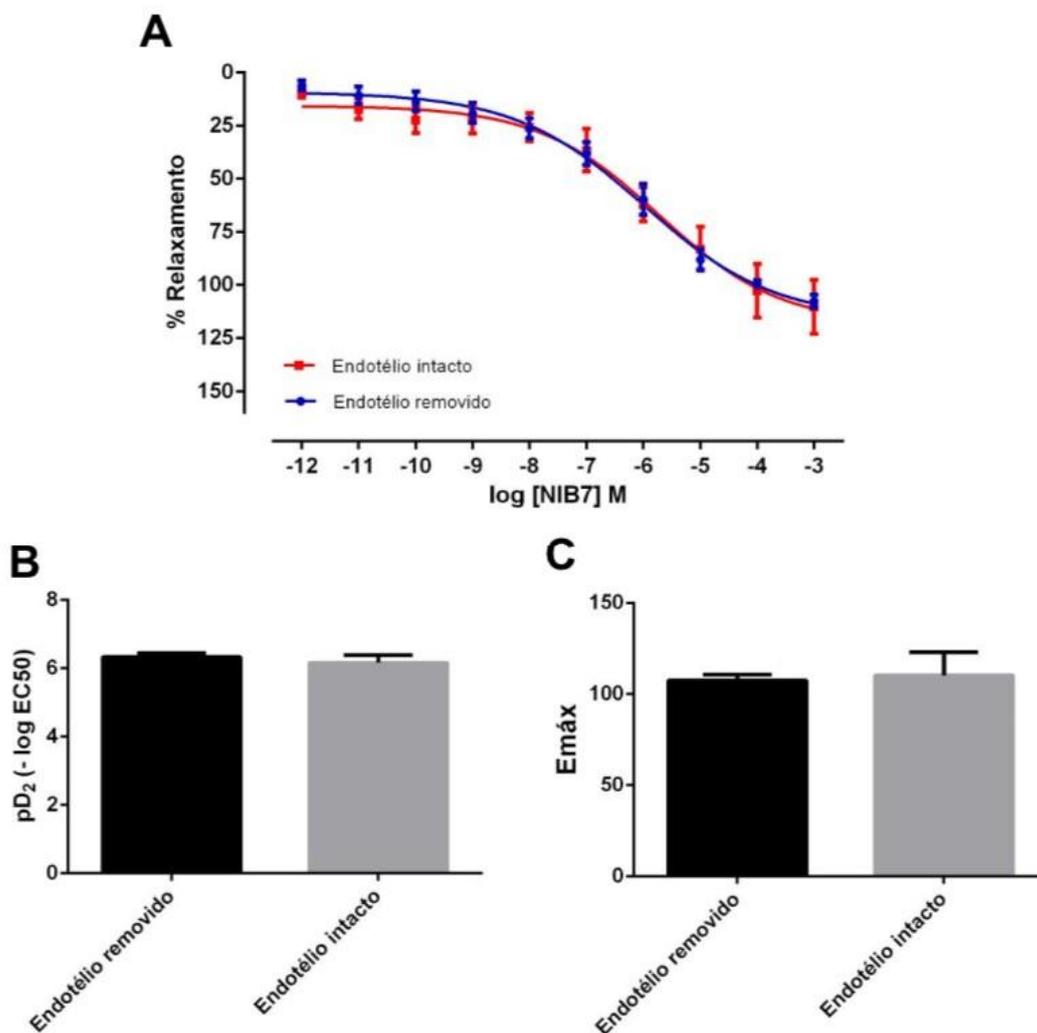


Figura 20: **A:** Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos, pré-contraídos com fenilefrina ($10 \mu\text{M}$) na presença ($n=7$) e ausência do endotélio funcional ($n=10$). Não houve diferença estatística entre os grupos (avaliado por ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 observado nas curvas concentração resposta ao NIB7 em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio removido vs. endotélio intacto (avaliado por test t de Student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m.

5.2 Atividade do NIB7 sobre o tecido vascular pré contraído com solução despolarizante

Em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com solução despolarizante de KCl 60mM, a resposta vasorrelaxante produzida pela adição cumulativa do NIB7 foi atenuada quando comparada ao efeito sobre anéis pré contraídos com FEN (Figura 21).

A potência foi significativamente atenuada quando comparado o controle e o grupo KCl 60mM, respectivamente ($pD_2 = 6,328 \pm 0,11$ n=10 vs. $5,008 \pm 0,09$ n=7, $*p < 0,0001$). Em relação ao efeito máximo, não houve diferença quando comparado o grupo controle e o KCl 60mM ($E_{m\acute{a}x} = 107,6 \pm 3,07$ n=10 vs. $103,6 \pm 1,50$ n=7, $p = 0,3255$).

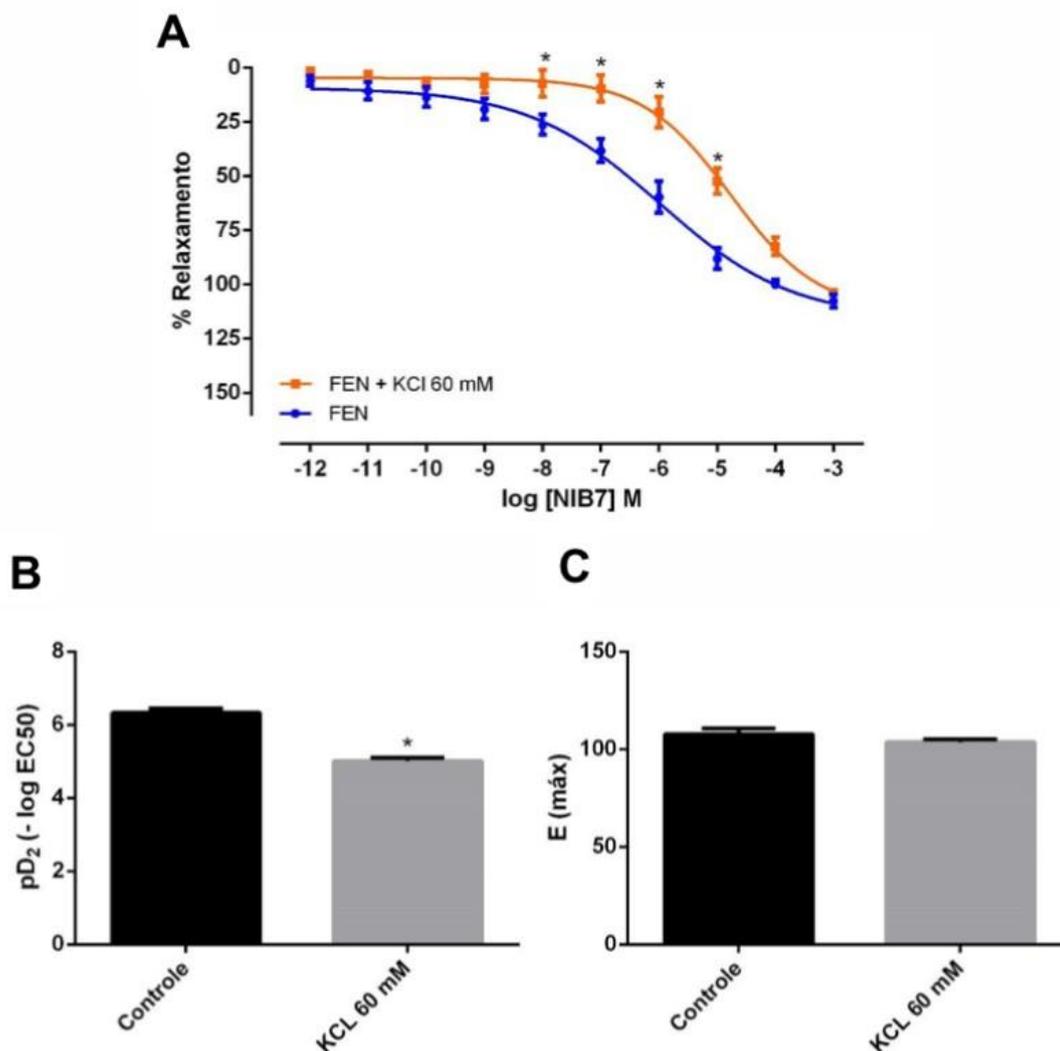


Figura 21: **A:** Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina $10 \mu\text{M}$ ($n=10$) e com KCL 60mM ($n=7$). Houve diferença estatística entre os grupos com deslocamento da curva à direita (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 na curva concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo KCL 60mM (avaliado por test t de Student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. $*p < 0.05$; controle vs. incubação KCL 60mM , $n=7$.

5.3 NIB7 promove vasorrelaxamento independente da eNOS

Quando os anéis da artéria mesentérica com endotélio funcional foram pré-incubados com o inibidor da NOS, a potência e o relaxamento induzido pelo NIB7 não foram alterados quando comparado ao grupo controle e o grupo L-NAME, respectivamente ($pD_2 = 6,036 \pm 0,08$ $n=7$ vs. $6,166 \pm 0,21$ $n=7$, $p = 0,5854$; $E_{\text{máx}} = 105,2 \pm 2,25$ $n=7$ vs. $110,3 \pm 12,76$ $n=7$, $p = 0,7019$). Assim,

pode ser sugerido que o relaxamento induzido pelo NIB7 não depende da participação da eNOS (Figura 22).

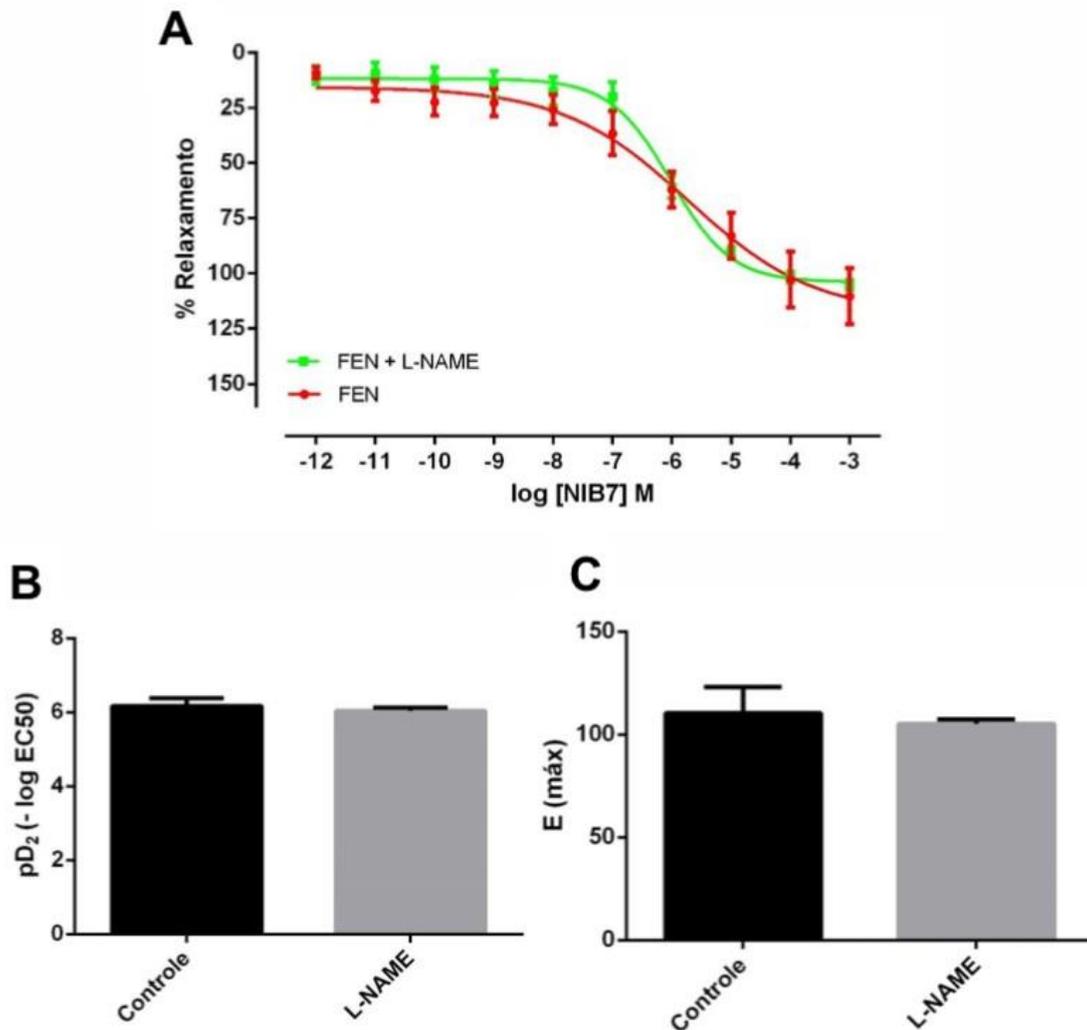


Figura 22: **A:** Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina ($10\mu\text{M}$) na presença ($n=7$) e ausência do L-NAME ($n=7$). Não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 na curva concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo L-NAME (avaliado por test t de Student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m.

5.4 O vasorrelaxamento induzido pelo NIB7 pode ser mediado pela liberação de óxido nítrico (NO)

Na presença de hidroxocobalamina ($30\mu\text{M}$), um sequestrador extracelular de NO, não houve alteração entre o efeito máximo induzido pelo NIB7 quando comparado o grupo controle e o grupo HDX ($E_{\text{máx}} = 107,6 \pm 3,07$

n=10 vs. $105,6 \pm 5,47$ n=7, $p = 0,7374$). Apesar disso, o relaxamento induzido por concentrações crescentes de NIB7 em anéis de artéria foi atenuado, como pode ser visualizado pelos valores de pD_2 , quando comparado o grupo controle com o grupo HDX ($pD_2 = 6,328 \pm 0,11$ n=10 vs. $5,118 \pm 0,08$ n=7, $*p < 0,0001$). Assim, esses dados sugerem que o vasorrelaxamento induzido pelo NIB7 pode ser mediado pela liberação do NO (Figura 23).

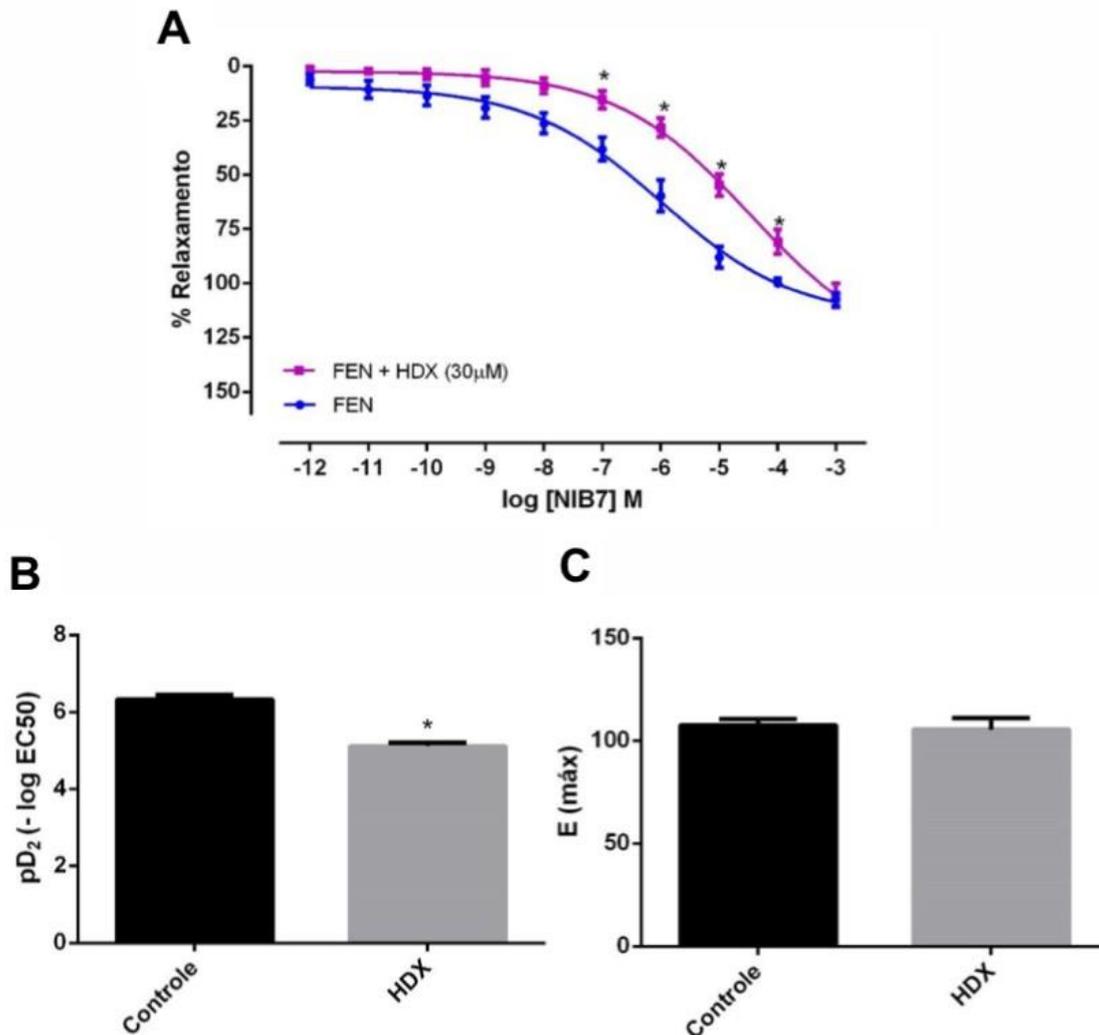


Figura 23: **A:** Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina ($10\mu\text{M}$) na ausência (n=10) e presença do HDX (n=7). Houve diferença estatística entre os grupos com deslocamento da curva à direita (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 na curva concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo HDX (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. $*p < 0,05$; controle vs. incubação HDX, n=7.

5.5 A GCs medeia o vasorrelaxamento induzido pelo NIB7

Em anéis de artéria mesentérica com endotélio desnudo pré-incubados com o inibidor da enzima GCs, ODQ (10 μ M), a curva concentração resposta foi deslocada para a direita (Figura 24). O pD₂ e o efeito máximo foram significativamente atenuados quando comparado o grupo controle e o grupo ODQ, respectivamente (pD₂= 6,328 \pm 0,11 n=10 vs. 3,819 \pm 0,10 n=7, *p<0,0001; Emáx = 107,6 \pm 3,07 n=10 vs. 75,83 \pm 7,50 n=7, *p = 0,0005).

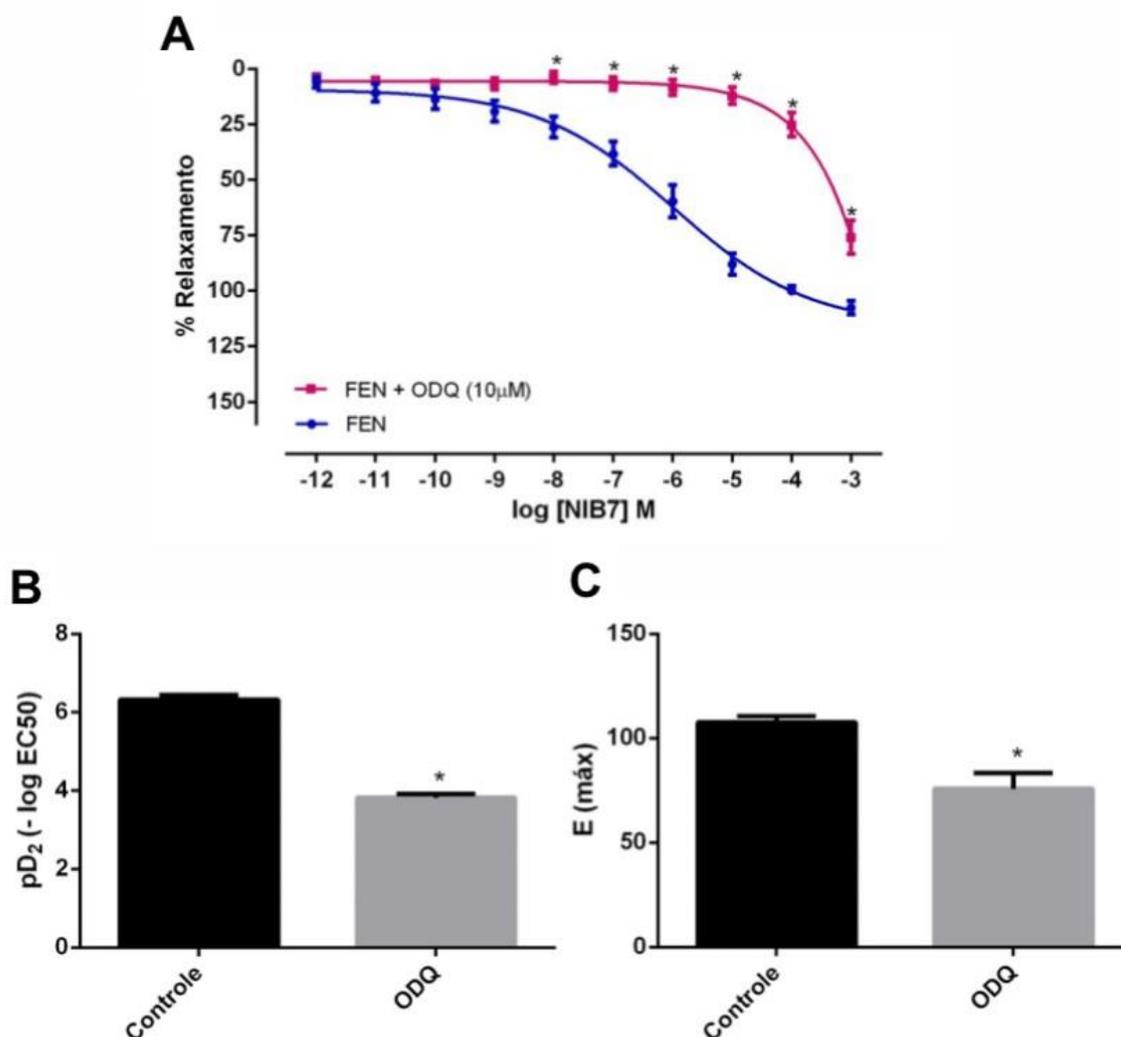


Figura 24: **A:** Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10⁻¹² a 10⁻³ M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina (10 μ M) na ausência (n=10) e presença do ODQ (n=7). Houve diferença estatística entre os grupos com deslocamento da curva à direita (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD₂ do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo ODQ (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. *p< 0,05; controle vs. incubação ODQ, n=7.

5.6 Os canais para K⁺ estão envolvidos com o vasorrelaxamento induzido pelo NIB7

Quando incubados com KCL 20mM, um modulador do efluxo de potássio, os anéis de artéria mesentérica de rato pré-contraídos com FEN e desprovidos de endotélio, apresentaram diferença estatística na curva concentração resposta (Figura 25). Houve redução da potência quando comparado o grupo controle e grupo KCl 20 mM ($pD_2 = 6,328 \pm 0,11$ n=10 vs. $5,525 \pm 0,05$ n=7, $*p < 0,0001$). Houve também diferença em relação ao efeito máximo quando comparado o grupo controle e o grupo KCL 20mM ($E_{m\acute{a}x} = 107,6 \pm 3,07$ n=10 vs. $125,2 \pm 4,55$ n=7, $p= 0,0045$).

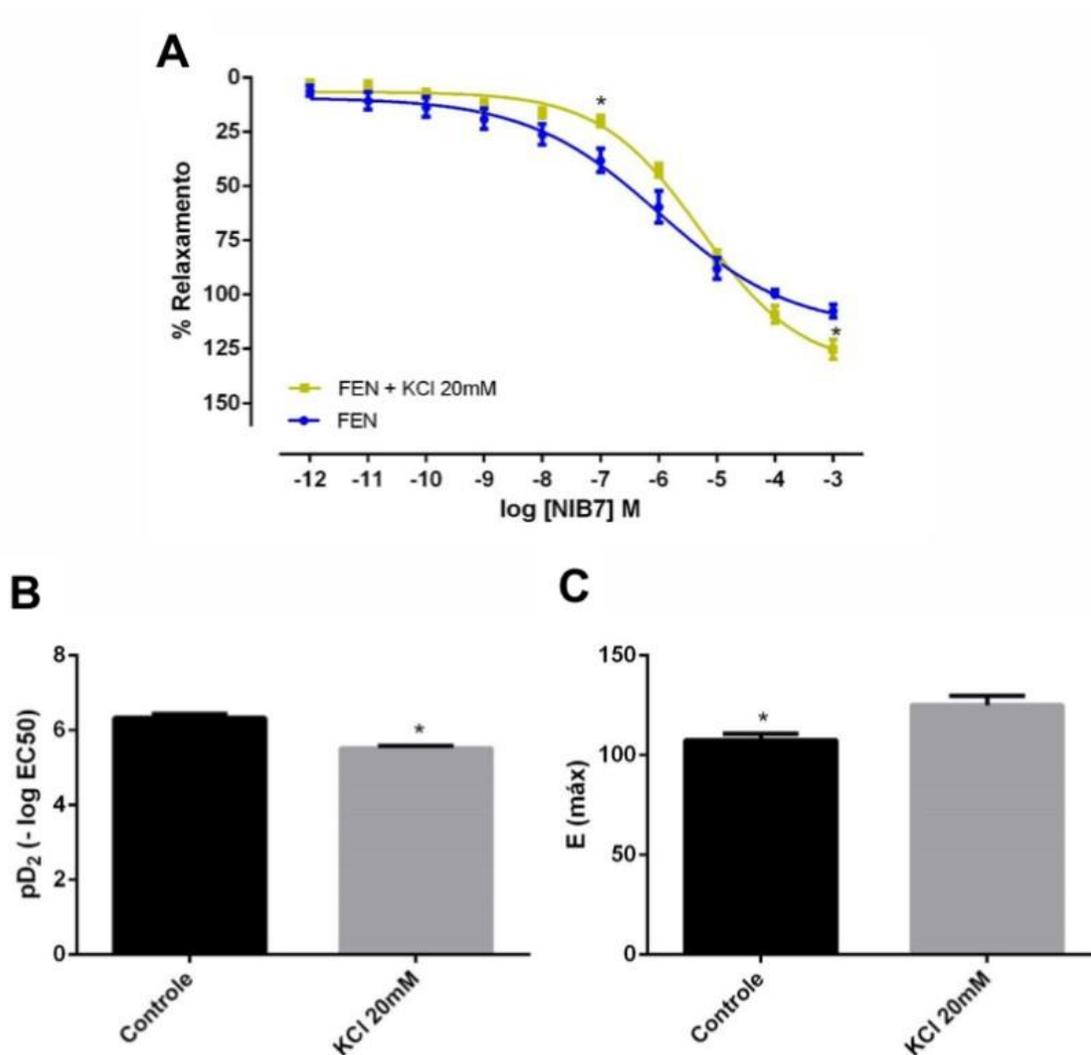


Figura 25: **A:** Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina ($10\mu\text{M}$) na ausência ($n=10$) e presença do KCl 20mM ($n=7$). Houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. Grupo KCl 20mM (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; controle vs. KCl 20mM, $n=7$.

A pré-exposição dos anéis de artéria mesentérica ao TEA (3mM), que nesta concentração específica atua como um bloqueador não seletivo dos canais de K^+ , alterou significativamente a curva concentração-resposta do NIB7 em comparação ao controle (Figura 26), com redução da potência do NIB7 quando comparado o grupo controle, respectivamente ($pD_2 = 5,320 \pm 0,05$ $n=7$ vs. $6,328 \pm 0,11$ $n=10$, * $p < 0,0001$). Não houve diferença estatística em relação ao efeito máximo quando comparado ao grupo controle ($E_{\text{máx}} = 112,0 \pm 2,89$ $n=6$ vs. $107,6 \pm 3,07$ $n=10$, $p = 0,3445$).

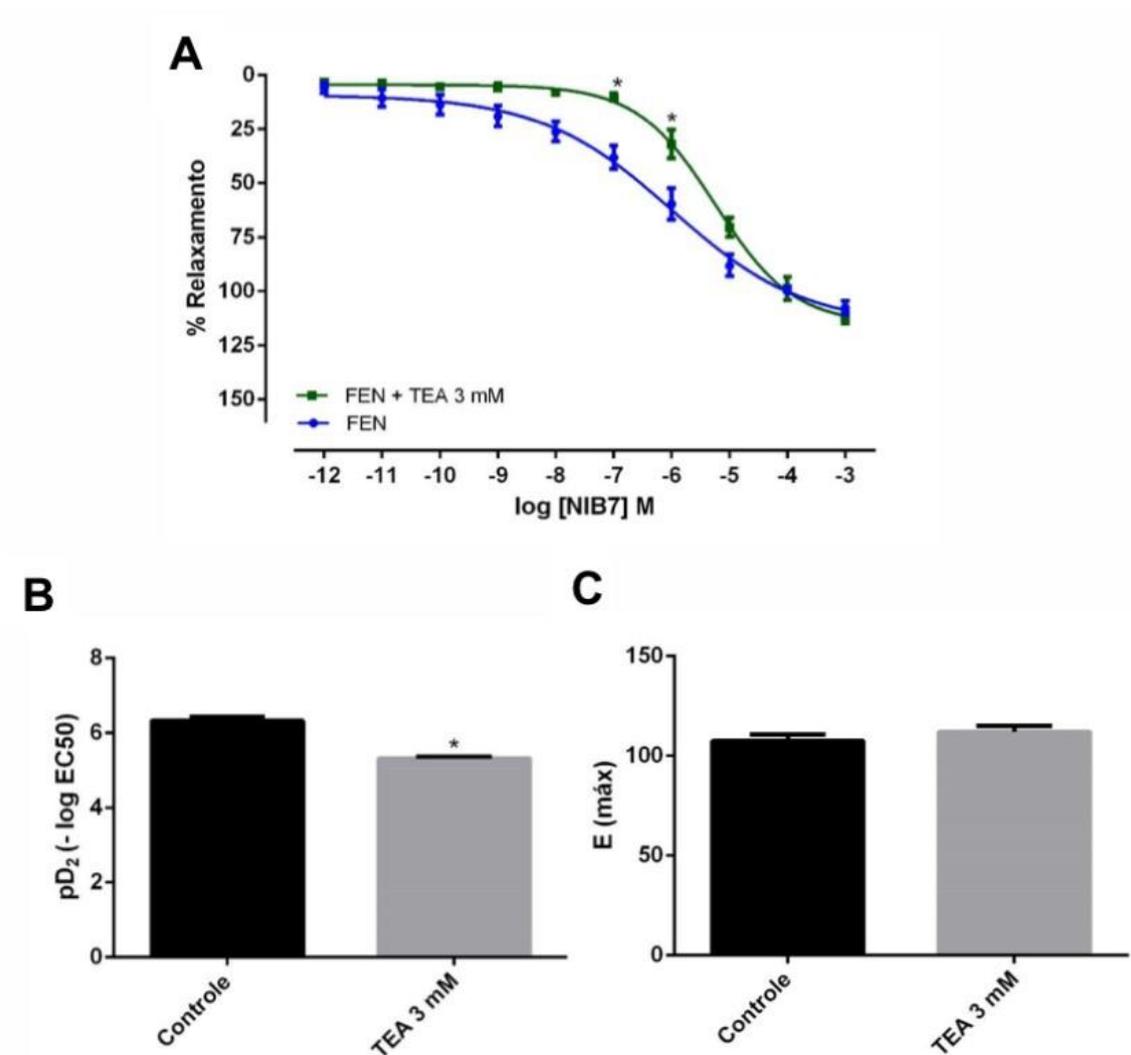


Figura 26: **A:** Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina ($10\mu\text{M}$) na ausência ($n=10$) e presença do TEA 3mM ($n=7$). Houve diferença estatística entre os grupos com deslocamento da curva à direita (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo TEA 3mM (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; controle vs. incubação TEA 3mM, $n=7$.

5.7 Participação dos subtipos de canais para potássio no efeito vasorrelaxante induzido pelo NIB7

5.7.1 O bloqueio isolado do canal K_{ATP} não atenuou o efeito do NIB7

Na presença de $1\mu\text{M}$ de GLIB, um bloqueador de canais de K_{ATP} , a curva concentração-resposta para o NIB (10^{-12} - 10^{-3} M) foi sobreposta em comparação com o controle, não apresentando diferença estatística (Figura 27). Não houve, pois, diferença entre os valores de pD_2 e $E_{m\acute{a}x}$ quando comparados o grupo controle e o grupo GLIB ($1\mu\text{M}$), respectivamente ($pD_2= 6,328 \pm 0,11$ $n=10$ vs. $6,245 \pm 0,08$ $n=5$, $p= 0,6412$; $E_{m\acute{a}x}= 107,6 \pm 3,07$ $n=10$ vs. $105,4 \pm 2,10$ $n=5$, $p=0,6507$).

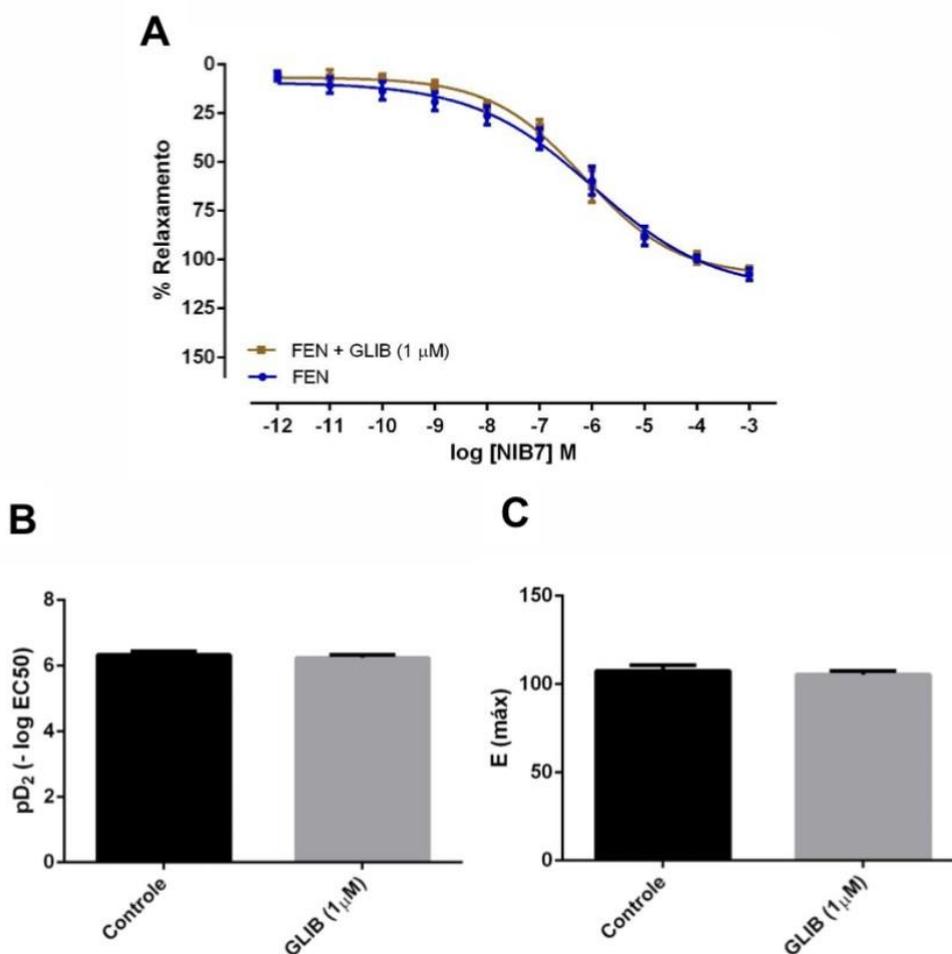


Figura 27: **A:** Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina ($10 \mu\text{M}$) na ausência ($n=10$) e presença do GLIB $1 \mu\text{M}$ ($n=5$). Não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo GLIB $1 \mu\text{M}$ (avaliado por test t de student).

5.7.2 O bloqueio isolado do canal K_{IR} não atenuou a potência do NIB7

Na presença de $30 \mu\text{M}$ de Cloreto de Bário (BaCl_2), um bloqueador de canais de K_{IR} , não houve diferença na potência quando comparados o grupo controle e o grupo BaCl_2 ($30 \mu\text{M}$), respectivamente ($pD_2 = 6,328 \pm 0,11$ $n=10$ vs. $6,131 \pm 0,18$ $n=5$, $p = 0,3536$). Em relação ao efeito máximo, houve diferença quando comparado o grupo e controle vs. grupo BaCl_2 ($E_{\text{máx}} = 107,6 \pm 3,07$ $n=10$ vs. $142,0 \pm 14,37$ $n=5$, $p = 0,0069$) (Figura 28).

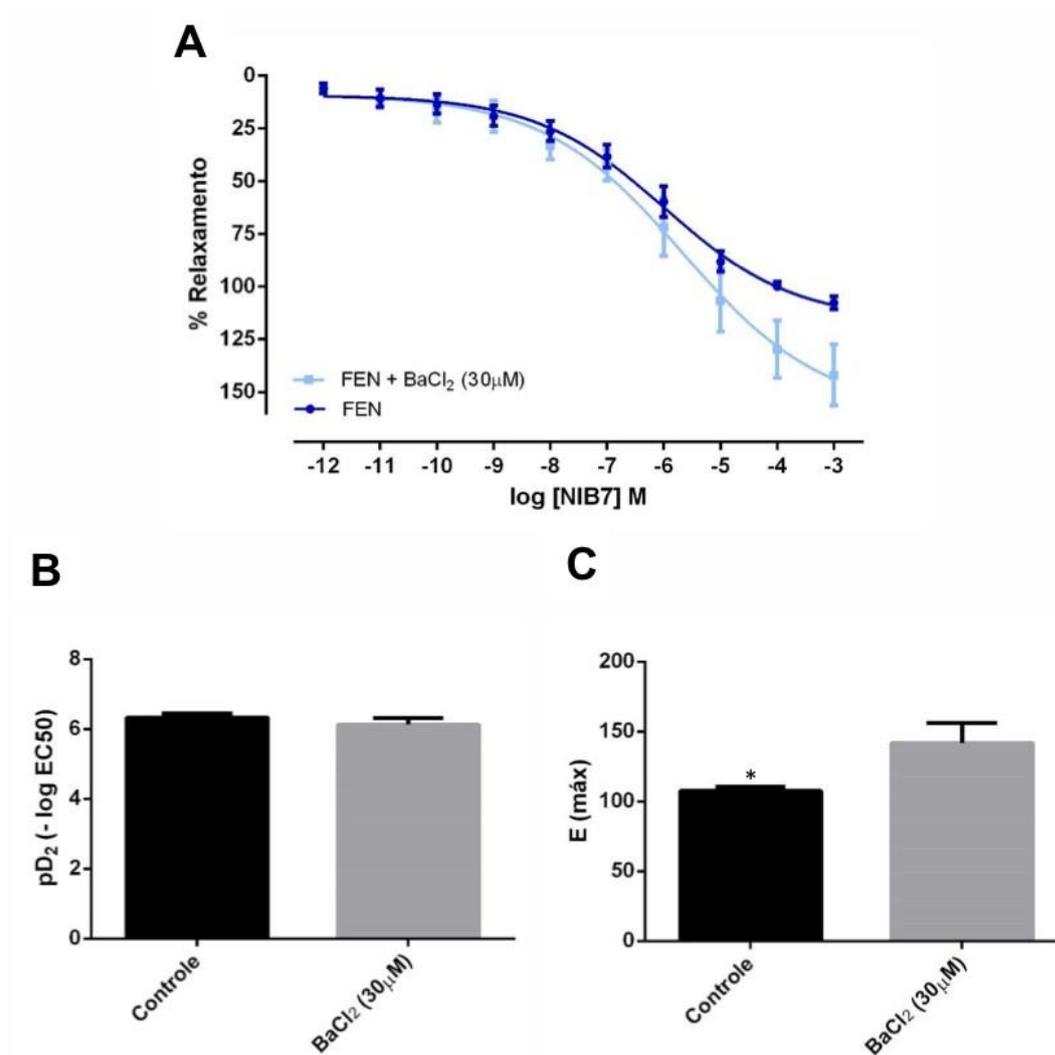


Figura 28: **A:** Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina ($10\mu\text{M}$) na ausência ($n=10$) e presença do BaCl_2 $30\mu\text{M}$ ($n=5$). Não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo do NIB7 nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo BaCl_2 $30\mu\text{M}$ (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; controle vs. do BaCl_2 $30\mu\text{M}$, $n=5$.

5.7.3 O bloqueio isolado dos canais BK_{Ca} não atenuou o efeito do NIB7

Após o bloqueio dos canais BK_{Ca} com 1mM de tetraetilamônio (TEA), a resposta vasorrelaxante induzida por concentrações crescentes de NIB7 (10^{-12} - 10^{-3} M) não foi alterada em comparação com o grupo controle (Figura 29). Não houve diferença na potência, bem como no efeito máximo, quando comparados o controle e o grupo TEA 1mM, respectivamente ($pD_2 = 6,328 \pm 0,11$ n=10 vs. $6,333 \pm 0,06$ n=5, $p = 0,9771$; $E_{máx} = 107,6 \pm 3,07$ n=10 vs. $109,4 \pm 2,99$ n=5, $p = 0,7069$).

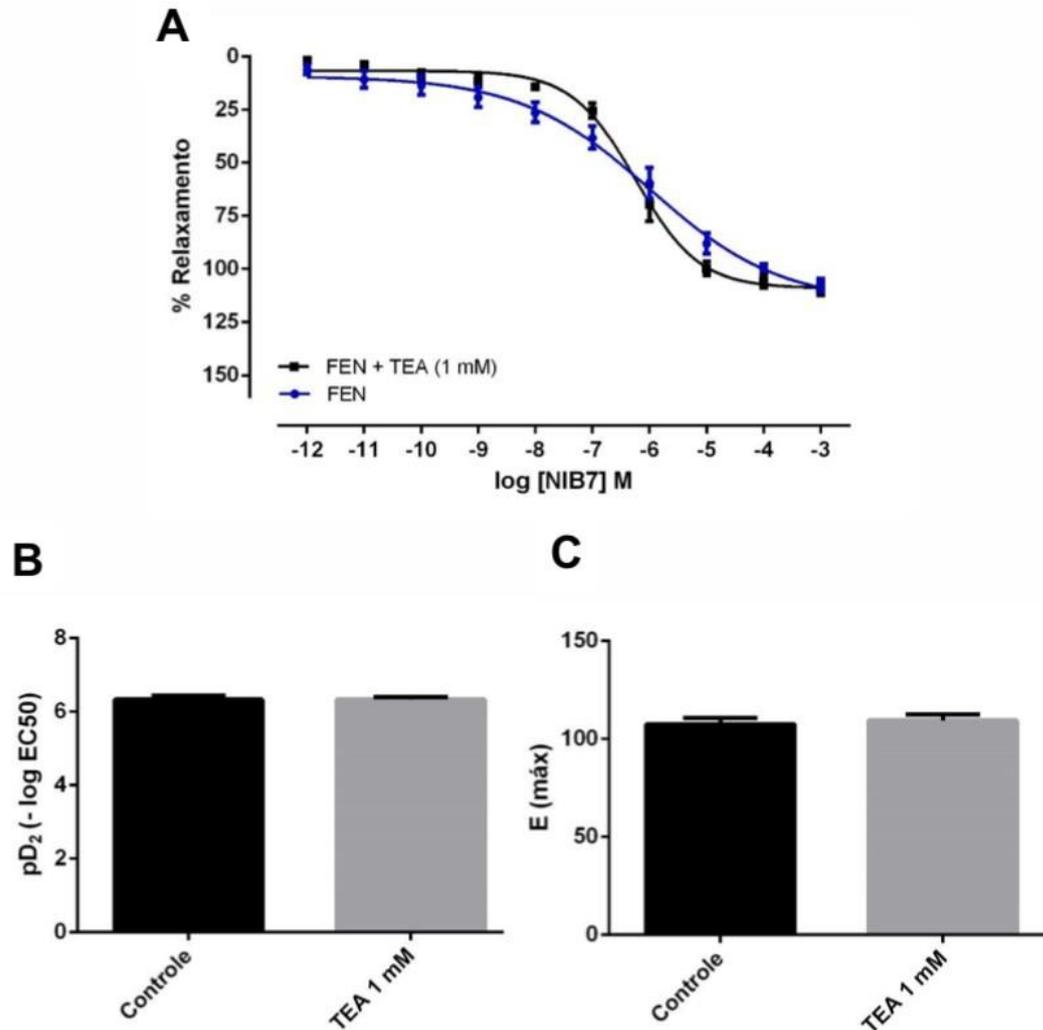


Figura 29: **A:** Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina ($10\mu\text{M}$) na ausência ($n=10$) e presença do TEA 1mM ($n=5$). Não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores de pD_2 do NIB7 e Efeito máximo nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo TEA 1mM (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m.

5.7.4 O bloqueio isolado dos canais K_v não atenuou o efeito do NIB7

Após o bloqueio dos canais K_v com 4-AP (1mM), a resposta vasorrelaxante induzida por concentrações crescentes do NIB7 não foi alterada quando comparada com o grupo controle (Figura 30). Não houve diferença nos valores de pD_2 e $E_{máx}$ quando comparado o grupo controle e o grupo 4-AP, respectivamente ($pD_2= 6,328 \pm 0,11$ $n=10$ vs. $6,166 \pm 0,14$ $n=5$, $p=0,4102$; $E_{máx}= 107,6 \pm 3,07$ $n=10$ vs. $119,1 \pm 8,61$ $n=5$, $p=0,1395$).

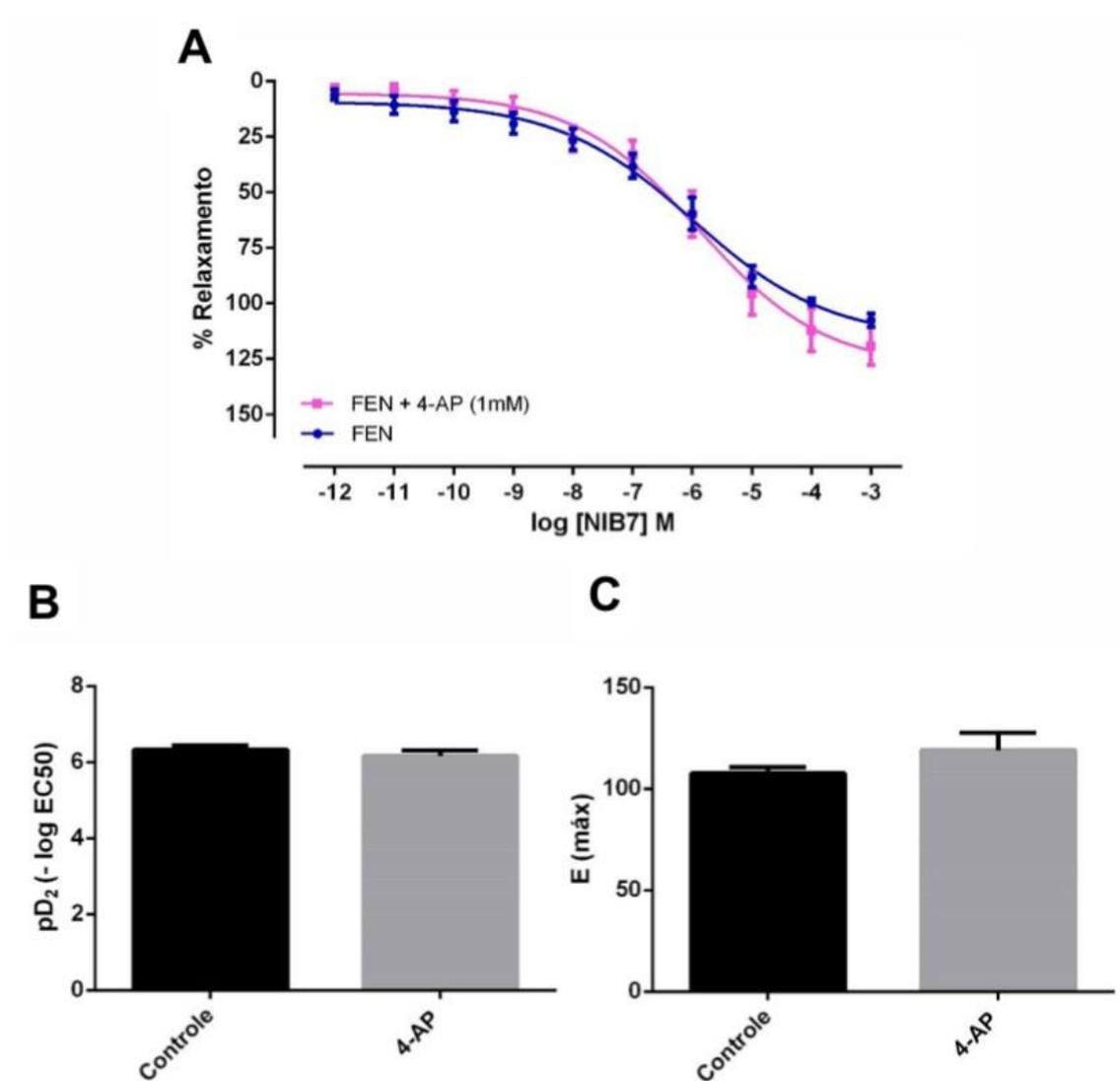


Figura 30: A: Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina ($10\mu\text{M}$) na ausência ($n=10$) e presença do 4-AP 1mM ($n=5$) Não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores do pD_2 e Efeito máximo do NIB7 nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo 4-AP 1mM (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m

5.8 A incubação prévia com alta concentração do composto atenuou o efeito do NIB7

A pré-incubação com 100 μ M do NIB7 foi capaz de atenuar a resposta vasorrelaxante do NIB7 quando comparado com o controle (Figura 31), como pode ser observado pelos valores de pD_2 quando comparados o grupo controle e o grupo NIB (100 μ M), respectivamente ($pD_2= 6,328 \pm 0,11$ n=10 vs. $5,095 \pm 0,10$ n=6, * $p < 0,0001$). Contudo, não houve diferença no $E_{m\acute{a}x}$ dos grupos controle vs. NIB (100 μ M) ($E_{m\acute{a}x}= 107,6 \pm 3,07$ n=10 vs. $123,8 \pm 10,69$ n=6, $p=0,0944$).

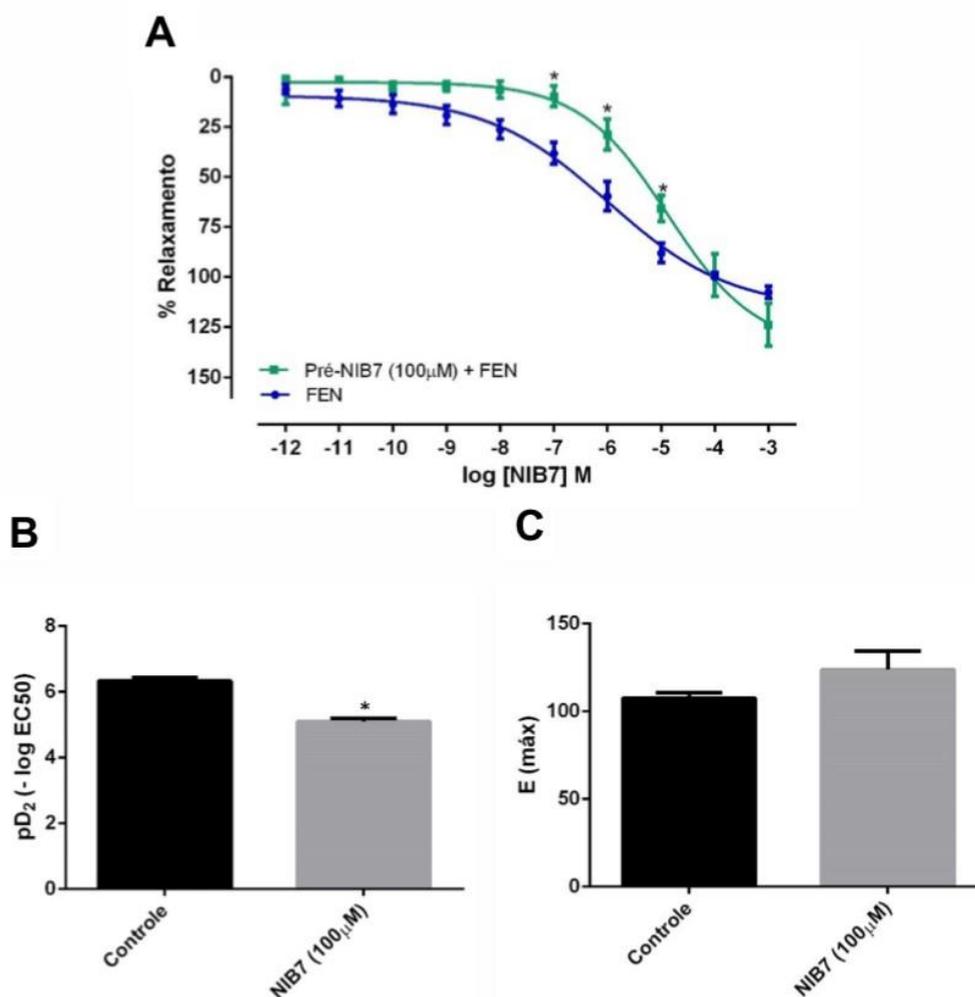


Figura 31: **A:** Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante do NIB7 (10^{-12} a 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica de ratos, pré contraídos com fenilefrina (10 μ M) na ausência e presença da pré-incubação do NIB7 (100 μ M). Houve deslocamento da curva à direita (ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni). **B e C:** Valores do pD_2 e Efeito máximo do NIB7 nas curvas concentração-resposta de anéis de artéria mesentérica com grupo controle vs. grupo NIB7 (100 μ M) (avaliado por test t de student). Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$; controle vs. NIB7 (100 μ M), n=6.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o efeito relaxante do NIB7 utilizando abordagem *ex vivo* em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato. Foram observados, como principais resultados, que o NIB7 apresentou atividade vasorrelaxante independente de endotélio vascular; e esse efeito envolve a liberação direta de NO; e posterior ativação da via sGC-GMPc-PKG; o relaxamento do NIB7 também envolve a participação de canais de potássio, apesar de não haver evidenciada predominância de um ou mais canais específicos. A exposição prévia ao NIB7 atenuou o relaxamento sugerindo uma possível tolerância ao seu efeito vasodilatador.

O tônus vascular é resultado do equilíbrio entre a contração e relaxamento dos vasos sanguíneos. Esse adequado funcionamento se dá pelo balanço entre a produção de agentes vasoconstritores e vasodilatadores (KIM et al, 2011). Por essa razão, o endotélio vascular é um dos maiores reguladores vasculares, por promover esse balanço nas respostas hemodinâmicas (VANHOUTTE et al, 2009).

Assim, foi investigado se o vasorrelaxamento promovido pelo NIB7 dependia do endotélio. O resultado mostrou que o efeito vasorrelaxante do NIB7 ocorre de forma semelhante no endotélio intacto e desnudo. Essa independência do endotélio funcional mostra-se como um fator relevante, tendo em vista que no cenário das doenças cardiovasculares, como por exemplo a hipertensão, o endotélio encontra-se disfuncional. Por isso substâncias que tenham sua ação melhorando a função vascular independente do endotélio tornam-se estratégias interessantes.

No ensaio feito com L-NAME, o qual bloqueia a NOS, o resultado evidenciou que não houve alteração na curva de relaxamento do composto, bem como sem alteração no efeito máximo e pD_2 . Confirmando que o relaxamento não depende da eNOS. Após esse experimento, todos os protocolos subsequentes foram realizados utilizando anéis mesentéricos desprovidos de endotélio vascular.

O NO é uma molécula gasosa que tem se mostrado um mediador biológico envolvido em vários processos fisiológicos, desempenhando papel importante no sistema cardiovascular. É conhecida por promover a

vasodilatação, assim sendo reconhecida como uma molécula sinalizadora derivada do endotélio vascular (SCATENA et al, 2010).

Assim, como forma de confirmar a participação do NO na resposta induzida pelo NIB7, os anéis de artéria mesentérica foram incubados com HDX, um sequestrador extracelular de NO. O HDX apresenta cobalamina oxidada que inativa o NO radicalar por meio da formação do complexo [Cb (III) – NO]. No estudo, houve atenuação da curva concentração-resposta do NIB7, sugerindo que possivelmente o NIB7 atua liberando NO para promover o vasorrelaxamento.

Desde 1977 que Murad demonstrou que os nitrovasodilatadores e o próprio NO ativam a enzima GCs para induzir a conversão do GTP em GMPc e induzir o vasorrelaxamento do músculo liso vascular. E vários autores já evidenciaram que o bloqueio da GCs atenua o relaxamento promovido pelos doadores de NO (FRANÇA-SILVA et al., 2012; COSTA et al., 2020).

Para fim de investigar essa via, foi utilizado o ODQ, que atua como bloqueador da GCs uma vez que este provoca mudanças no estado de oxidação da molécula de heme, sem causar efeitos adversos sobre a atividade catalítica da enzima (ZHAO et al, 1999). Logo, foi observado no estudo que o tratamento prévio com ODQ atenuou a curva concentração-resposta induzida pelo NIB7, sugerindo que o vasorrelaxamento provocado pelo NIB7 depende em grande parte da via GCs. Esse resultado mostra semelhança com os resultados encontrados em estudos citados anteriormente.

Contudo, estudos com outros nitratos orgânicos, como o NDOP (BERNADINO-PAULA et al, 2016) e NDBP (FRANÇA-SILVA et al, 2012), ao utilizar o ODQ foi visto que o efeito foi praticamente abolido. Neste trabalho percebe-se que o efeito foi atenuado, podendo está envolvido a ação direta do NIB7 em outros alvos, como os canais para K^+ , de modo independente da GCs.

A contração do músculo liso tem como regulador primário o cálcio. Isso significa que a regulação da resposta contrátil do músculo liso depende do aumento do Ca^{2+} , cujo aumento pode ocorrer por influxo e a partir dos estoques intracelulares. Quando ocorre a elevação do Ca^{2+} , ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK), causando fosforilação da miosina, que gera o ligamento ao filamento de actina, gerando contração (BLAUSTEIN, HAMLIN, 2010).

As contrações induzidas por FEN, nas células do músculo liso, ocorrem por meio da ativação dos receptores α_1 - adrenérgicos, que são acoplados a proteína $G_{q/11}$. Assim, a interação agonista-receptor ativa a proteína G, que ativa a fosfolipase C (PLC) a sintetizar diacilglicerol (DAG). O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), que aumenta a mobilização de Ca^{2+} através de canais da membrana, promovendo a contração (BLAUSTEIN, HAMLIN, 2010).

Outra maneira de induzir a vasoconstrição é por aumento das concentrações extracelulares de K^+ , que vai impedir o efluxo desses íons, causando a despolarização da membrana, gerando a abertura dos canais voltagem dependente (Ca_v) (GANITKEVICH, ISENBERG, 1991).

Assim, levando em consideração que o NIB7 promoveu vasorrelaxamento diante de uma contração por acoplamento farmacomecânico estimulada pela FEN, resolveu-se investigar se o NIB7 seria capaz de desenvolver o mesmo efeito diante de uma solução despolarizante. Foram realizados experimentos em que os anéis mesentéricos contraídos com uma solução de Tyrode modificada com 60 mM de KCl, considerada como um estímulo eletroquímico (acoplamento eletromecânico).

Diante dessas condições contráteis, quando analisado a curva concentração-resposta do NIB7 em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré contraídos com solução despolarizante, o KCL 60 mM, foi visto que houve atenuação quando comparado ao grupo pré-contraído com FEN. Este resultado sugere que a via comum (ativação dos Ca_v) entre a solução despolarizante com 60mM de KCl e da FEN não está totalmente implicada no efeito vasodilatador do nitrato orgânico em estudo.

Esse resultado sugeriu uma indicação de que o vasorrelaxamento induzido pelo NIB7 envolveria a ativação de canais de K^+ (MACHADO, 2013; CAVALCANTI et al, 2021), diferentemente do BNN, a molécula intermediária, o qual evidenciou que o mecanismo de relaxamento envolve os canais de cálcio (ROCHA, 2021).

Vários autores discutem que as substâncias vasorrelaxantes cujos efeitos são mediados pela abertura de canais para K^+ , como o caso dos nitratos orgânicos, apresentam uma diminuição na sua resposta diante de contrações induzidas por soluções com alta concentração de K^+ , tendo em vista que nesse tipo de contração ocorre a redução do gradiente eletroquímico

necessário para o efluxo de K^+ através da membrana, fazendo com que a ativação desses canais seja insuficiente para promover um relaxamento (JACKSON, 2005 e 2017).

Com isso, foi realizado protocolos para investigar a participação dos canais de potássio no vasorrelaxamento pelo NIB7. Primeiramente realizou-se o protocolo com KCl 20 mM, cujo resultado apresentou diferença na curva concentração-resposta e a potência foi reduzida no grupo KCl 20 mM quando comparado ao grupo controle. Também feito o experimento utilizando o TEA 3mM, que nesta concentração atua como um bloqueador não seletivo para os canais para K^+ . Na análise dos anéis mesentéricos incubados com TEA (3 mM) foi observada uma diminuição na potência do NIB7, sugerindo que alguns destes canais podem estar envolvidos no efeito vasorrelaxante induzido pelo composto. Nessas condições experimentais, sugeriu-se a participação dos canais K^+ na resposta vasorrelaxante promovida pelo nitrato em estudo.

A fim de investigar os canais específicos de potássio, foram realizados protocolos para os canais de K_{ir} , K_{ATP} , K_v , BK_{Ca} . Quando bloqueados cada canal específico e comparado ao grupo controle, nenhum subtipo de canal demonstrou influência significativa no relaxamento induzido pelo composto.

Esse resultado diferiu dos outros nitratos orgânicos pesquisados no grupo, visto que, ao bloquear canais específicos de forma isolada não foi observada redução na potência ou efeito máximo. Para avaliar a influência de mais de um tipo de canal de potássio envolvido no mecanismo de relaxamento pelo NIB7 seria necessário desenvolver novos ensaios utilizando mais de um tipo de bloqueador simultaneamente.

Apesar dos nitratos orgânicos serem utilizados como estratégia para restaurar a biodisponibilidade do NO na terapêutica de doenças cardiovasculares, seus efeitos colaterais e o desenvolvimento de tolerância impedem a continuidade do tratamento nos pacientes (MÜNDEL; DAIBER, 2011; MÜNDEL et al., 2014).

A capacidade da NTG em induzir tolerância já foi comprovada e bem documentada (MAYER; BERETTA, 2008; MUNDEL et al., 2005, 2011, 2014; PAULO et al., 2017) e, indo de acordo com os estudos, o pré-tratamento das artérias mesentéricas com o NIB7 parece induzir tolerância ao vasorrelaxamento *ex vivo* nas abordagens experimentais utilizadas. Contudo,

de acordo com o exposto da literatura, a investigação dos fenômenos da tolerância é complexa, mais estudos são necessários para esclarecer melhor esse efeito e também o quão significativo é a atenuação da curva concentração-resposta do ponto de vista fisiológico.

Por fim, foi analisado o pD_2 do composto em estudo com o da molécula mãe para analisar se o efeito foi potencializado com a adição do grupo metila. Quando comparado o pD_2 do BBN ($6,683 \pm 0,09$ $n = 8$) com o NIB7 ($6,328 \pm 0,11$ $n=10$) apresentou diferença estatística ($p=0,0295$) com o BBN com melhor potência. Ao se analisar o efeito máximo, foi visto que não houve diferença estatística entre o grupo BBN e o NIB7 ($p>0,05$), respectivamente ($E_{m\acute{a}x}= 111,1 \pm 3\%$ $n=8$ vs. $107,6 \pm 3,07$ $n=10$).

Ainda, o BBN não apresentou o desenvolvimento de tolerância. Já o NIB7, em protocolos ex vivo, foi visto a atenuação do efeito quando pré incubado previamente com o composto. Com isso, ver-se que o novo composto com o grupo metila (NIB7) não foi capaz de potencializar o efeito. Contudo, com os resultados obtidos do mecanismo de ação do NIB7 sugere ser investigado em novos protocolos para poder analisar melhor seus efeitos.

CONCLUSÃO

A partir dos dados encontrados, conclui-se que o NIB7 é capaz de promover vasorrelaxamento em artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos e esse efeito envolve, pelo menos em parte, a liberação de NO com ativação da via NO/GPMc/PKG, bem como de canais para K⁺ localizados nas células musculares lisas vasculares. A exposição prévia a alta concentração do NIB7 atenua o vasorrelaxamento observado *ex vivo*, demonstrando a necessidade de uma maior investigação sobre a habilidade do composto em induzir tolerância.

REFERÊNCIAS

- MAGDER, S. The meaning of blood pressure. **Crit Care**, v.22, n.1, 2018.
- ADARAMOYE, O.A.; MEDEIROS, I.A. Endothelium-independent vasodilation induced by kolaviron, a biflavonoid complex from *Garcinia kola* seeds, in rat superior mesenteric arteries. **Journal of Smooth Muscle Research**, v.45, n.1, 2009.
- ALTURA, B., ALTURA, B. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **Am. J. Physiol**, 1970.
- ANDRABI, S.M., SHARMA N.S., KARAN, A. et al. Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications. **Adv Sci (Weinh)**, v.10, n.30, 2023.
- BARREIRO, E.J., KUMMERLE, A.E., FRAGA C.A.M. The Methylation Effect in Medicinal Chemistry. **Chem. Rev.** 2011, 111, 5215–5246.
- BASTIN, G.; HEXIMER, S.P. Intracellular regulation of heterotrimeric G-protein signaling modulates vascular smooth muscle cell contraction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.510, p.182–189, 2011.
- BATES, J. N.; BAKER, M. T.; GUERRA, J. R. R.; HARRISON, D. G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, 1991.
- BERNADINO-PAULA, Ricardo. **Efeitos do 2-nitrato-1,3-Di (octanoxi)propano (NDOP) em aorta de camundongo C57BL/6**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba, 2016.
- BERNARDES, M. J. C. **Efeito hipotensor de *Aspidosperma subincanum* Mart. em ratos e o seu mecanismo de vasodilatação em artérias isoladas**. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, 2012.
- BESTETTI, R. B.; RESTINI, C. B. A.; COUTO, L. B. Evolução do conhecimento anatomofisiológico do sistema cardiovascular: dos egípcios a Harvey. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.103, n. 6, p. 538-545, 2014.
- BONAVENTURA, D.; LIMA, R.G.; VERCESI, J.A.; SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 215–222, 2007.
- CAMPBELL, W.B., GEBREMEDHIN, D., PRATT, P.F., HARDER, D.R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circ Res**, v.78, n.3, 1996.
- CAVALCANTI, Airla laana de Medeiros. **Estudo in silico e caracterização dos efeitos cardiovasculares do mononitrato orgânico 1,3diisobutoxiopropan-2-ila (ndibp) em ratos normotensos e hipertensos**.

2021. Tese (Doutorado em produtos naturais e sintéticos bioativos – Universidade Federal da Paraíba, 2021.

COWLEY, A.W. The genetic dissection of essential hypertension. **Nat. Rev. Genet**, 2006.

CHRISTENSEN, K.L., MULVANY M.J. Mesenteric Arcade Arteries Contribute Substantially to Vascular Resistance in Conscious Rats. **J Vasc Res**, 1993.

CHRISTENSEN, K.L., MULVANY M.J. Location of Resistance Arteries. **J Vasc Res**, 2001.

DAIBER, A., OELZE, M., COLDEWEY, M., BACHSCHMID, M., et al. Estresse oxidativo e atividade do aldeído desidrogenase mitocondrial: uma comparação de tetranitrato de pentaeritritol com outros nitratos orgânicos. **Mol Pharmacol**, v. 66, 2004.

DE MELLO, W. C.; FROHLICH, E. D. On the local cardiac renin angiotensin system. Basic and clinical implications. **Peptides**, v. 32, p. 1774- 1779, 2011.

FERRARIO, C. M.; MULLICK, A. E. Renin angiotensin aldosterone inhibition in the treatment of cardiovascular disease. **Pharmacological Research**, v. 125, n. (Pt A), p. 57-71, 2017.

FARAH, C.; MICHEL, L.Y.M.; BALLIGAND, J.L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, p. 292–316, 2018.

FRANÇA-SILVA, M. S.; LUCIANO, M. N.; RIBEIRO, T. P.; 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, p. 170-175, 2012

FURCHGOTT, R.F, ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 1980.

FÖRSTERMANN U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflugers Arch. Eur. J.Physiol**, 2010.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v.33, p. 829-837, 2012.

GARTHWAITE, J., SOUTHAM, E., BOULTON, C.L., et al. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, **Mol. Pharmacol**, 1995.

GANITKEVICH Y., ISENBERG V.G. Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder., **J. Physiol**. 1991.

GEDDES, L. A. Retrospectroscope. Discovery of the circulation of blood. **Engineering in Medicine and Biololy Magazine**, v.27, p.107-113, 2008.

GIANNITSI et al. Endothelial dysfunction and heart failure: A review of the existing bibliography with emphasis on flow mediated dilation. **JRSM Cardiovascular Disease**, v.8, p. 1–7, 2019.

GUYTON, A. C., HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 13^o ed. Rio De Janeiro: Editora Elsevier Ltda, 2017.

HEITZER, T., JUST, H., BROCKHOFF, C., et al. O tratamento a longo prazo com nitroglicerina está associado à supersensibilidade a vasoconstritores em homens com doença arterial coronariana estável: prevenção por tratamento concomitante com captopril. **J Am Coll Cardiol**, 1998.

HOUSE et al. The non-excitabile smooth muscle: Calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. **Pflügers Archive**, v.456, n.5, p.769–785, 2008.

JABS, A., OELZE., M., MIKHED, Y., et al. Effect of soluble guanylyl cyclase activator and stimulator therapy on nitroglycerin-induced nitrate tolerance in rats. **Vascul Pharmacol**, 2015.

JACKSON, W.F. Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. **Advances in Pharmacology**, v. 78, p. 89–144, 2017.

JANASZAK-JASIECKA, A., PŁOSKA, A., WIEROŃSKA, J.M., et al. Endothelial dysfunction due to eNOS uncoupling: molecular mechanisms as potential therapeutic targets. **Cell Mol Biol Lett**, v. 28, n.1, 2023.

KAWADA, T., SUGIMACHI, M. Open-loop static and dynamic characteristics of the arterial baroreflex system in rabbits and rats. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 66, n.1, 2016.

KIM, D., RYBALKIN, S.D., PI, X., et al. Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. **Circulation**, 2001.

KIM, H. Y.; OH, H.; LI, X.; CHO, K. W.; KANGA, D. G.; LEE, H. S. Ethanol extract of seeds of *Oenothera odorata* induces vasorelaxation via endothelium dependent NOcGMP signaling through activation of Akt-eNOS-sGC pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, 2011.

KO, A.; HAN, J.; JUNG, I. D.; PARK, W. S. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, n. 2, p. 65- 81, 2007.

KONUKOGLU, D.; UZUN, H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. In: Islam M.S. (eds) Hypertension: from basic research to clinical practice. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 956. Springer, 2016.

KRUSZYNA H., MAGYAR, J.S., ROCHELLE, L.G., 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. **J Pharmacol Exp Ther**, v.285, n.2, 1998.

KUANG, Q., PURHONEN, P., HEBERT, H. Structure of potassium channels. **Cell Mol Life Sci**, v. 72, n.19, 2015.

KUO, I. Y.; EHRLICH, B. E. Signaling in Muscle Contraction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.7, n.2, p.a006-023, 2015.

LEE, S., LI, L., KITAZAWA, T. O GMP cíclico causa dessensibilização ao Ca²⁺ no músculo liso vascular, ativando a fosfatase da cadeia leve da miosina. **J Biol Química**, v. 272, n.8, 1997.

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

LIU, Z; KHALIL, R. A. Os mecanismos em evolução da contração do músculo liso vascular destacam os principais alvos nas doenças vasculares. **Farmacologia Bioquímica**, v. 153, p 91-122, 2018.

LOH, Y.C.; TAN, C.S.; CH'NG, Y.S. et al. Overview of the Microenvironment of Vasculature in Vascular Tone Regulation. **International jornal of molecular sciences**, v.19, n.1, 2018.

LUNDBERG, J. O.; GLADWIN, M. T.; WEITZBERG, E. Strategies to increase nitric oxide signaling in cardiovascular disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, p. 623-641, 2015.

MACHADO, N. T. **Efeitos cardiovasculares de um novo doador de óxido nítrico, 12-nitrato-cis-9-octadecanoato de etila (NCOE), em ratos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

MAYER, B.; BERETTA, M. The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: news, views and troubles. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, p, 2008.

MENDES-JÚNIOR, L. G.; GUIMARÃES, D.D.; GADELHA, D.D.A.; et al. The new nitric oxide donor cyclohexane nitrate induces vasorelaxation, hypotension, and antihypertensive effects via NO/cGMP/PKG pathway. **Frontiers in Physiology**, v. 31, n.6, p. 243, 2015.

MIN, S.; CHANG, R. B.; PRESCOTT, S. L.; BEELER, B.; JOSHI, N. R.; STROCHLIC, D. E.; LIBERLES, S. D. Arterial baroreceptors sense blood pressure through decorated aortic claws. **Cell reports**, v. 29, n. 8, p. 2192-2201. e3, 2019.

MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 305-321, 2007.

MOLINA, C.R., ANDRESEN, J.W., RAPOPORT, R.M, et al. Effect of in vivo nitroglycerin therapy on endothelium-dependent and independent vascular relaxation and cyclic GMP accumulation in rat aorta. **J Cardiovasc Pharmacol**, 1987.

MÓNICA, F.Z., BIAN, K., MURAD, F. The Endothelium-Dependent Nitric Oxide-cGMP Pathway. **Adv Pharmacol**, 2016.

MUNZEL, T.; DAIBER, A.; GORI, T. Nitrate therapy: new aspects concerning molecular action and tolerance. **Circulation**, v. 123, n. 19, 2011.

MUNZEL, 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.

MOLLACE, V., MUSCOLI, C., DAGOSTINO, C., et al. The effect of peroxynitrite decomposition catalyst MnTBAP on aldehyde dehydrogenase-2 nitration by organic nitrates: role in nitrate tolerance. **Pharmacol Res**, v.89, 2014.

NUMATA, G., TAKIMOTO, E. Cyclic GMP and PKG Signaling in Heart Failure. **Front Pharmacol**, 2022.

OELZE, M.; SCHUHMACHER, S.; DAIBER, A. Organic nitrates and nitrate resistance in diabetes: the role of vascular dysfunction and oxidative stress with emphasis on antioxidant properties of pentaerythryl tetranitrate. **Experimental Diabetes Research**, v. 2010, p. 1-13, 2010.

OELZE, M., KNORR, M., KROLLER-SCHON, S., et al. Terapia crônica com isossorbida-5 -mononitrato causa disfunção endotelial, estresse oxidativo e um aumento acentuado na expressão da endotelina-1 vascular. **Eur Heart J**, v. 34, 2013.

PAULO, M.; RODRIGUES, G.J.; SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. A new NO donor failed to release NO and to induce relaxation in the rat basilar artery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 344–350, 2012.

PAULO, M.; GRANDO, M.D.; DA SILVA, R.S.; et al. The nitric oxide donor RuBPY does not induce in vitro cross-tolerance with acetylcholine. **Nitric Oxide**, v. 69, n. 30, 2017.

PILOWSKY, P.M., GOODCHILD, A.K. Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters: 10 years on. **J Hypertens.**, v.20, 2002.

PITSIKAS, N. The role of nitric oxide (NO) donors in anxiety. Lights and shadows. **Nitric Oxide**, v. 77, 2018.

PINHEIRO, P.S.M, FRANCO L.S., FRAGA C.A.M. The Magic Methyl and Its Tricks in Drug Discovery and Development. **Pharmaceuticals**, v.16, 2023.

POPYHOVA et al. The role of diabetes in the onset and development of endothelial dysfunction. **EUROPE PMC**, v. 66, n. 1, p. 47-55, 2020.

PORPINO, S. K. P.; TRAVASSOS, R.A.; GADELHA, D.D.A.; et al. Developing New Organic Nitrates for Treating Hypertension: A Review. **Jornal of Hypertension**, v.5, n.3, 2016.

QUEIROZ, T.M.; MENDES-JÚNIOR, L.G.; GUIMARÃES, D.D. et al. Cardiorespiratory effects induced by 2-nitrate1,3-dibuthoxypropan are reduced by nitric oxide scavenger in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 181, 2014.

ROCHA, Patrícia Keytth Lins. **Efeito hipotensor e anti-hipertensivo do nitrato orgânico benzoato de 4-nitrooxibutila em ratos**. Tese (Doutorado em

Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Universidade Federal da Paraíba, 2021.

LEANDRO DOS SANTOS. **Abordagem interdisciplinar no controle da Hipertensão Arterial Sistêmica**. 1ª edição. Belo Horizonte: Poisson, 2021.

SAYED, N., KIM, D.D., FIORAMONTI, X., et al. A S-nitrosilação induzida pela nitroglicerina e a dessensibilização da guanilil ciclase solúvel contribuem para a tolerância ao nitrat. **Circ Res**, 2008.

SATIN, J.; SCHRODER, E.A.; CRUMP, S.M. L-type calcium channel auto-regulation of transcription. **Cell Calcium**, v. 49, n. 5, p. 306-13, 2011.

SATO, M.A. **Tratado de fisiologia médica**. 1. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

SCATENA, R.; BOTTONI, P.; PONTOGLIO, A.; GIARDINA, B. Pharmacological modulation of nitric oxide release: new pharmacological perspectives, potential benefits and risks. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 1, 2010.

SCHONHERR H., CERNAK, T. Efeitos profundos do metil na descoberta de medicamentos e um apelo para novas reações de metilação do CH. **Angew Chem Int Ed Engl**, v.52, n.47, 2013.

SEALS, D.R.; JABLONSKI, K.L; DONATO, A.J. Aging and Vascular Endothelial Function in Humans. **Clinical Science**, v. 120, n. 9, p. 357–375, 2011.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 7. PORTO ALEGRE: ARTMED, 2017.

SHAH, K.; SEELEY, S.; SCHULZ, C.; FISHER, J.; GURURAJA RAO, S. Calcium channels in the heart: Disease states and drugs. **Cells**, v. 11, n. 6, p. 943, 2022.

SU, J. B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. **World Journal of Cardiology**, v. 7, n. 11, p. 719-741, 2015.

TANAKA, Y., MOCHIZUKI, Y., TANAKA, H., et al. Shigenobu, Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric artery, **Br. J. Pharmacol**, 1999.

THAKALI, K.M.; LAU, Y.; FINK, G.D.; GALLIGAN, J.J.; CHEN, A.F.; WATTS, S.W. Mechanisms of hypertension induced by nitric oxide (NO) deficiency: focus on venous function. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 47, p. 742–750, 2006.

VANHOUTTE, P. M.; SHIMOKAWA, H.; TANG, E. H.; FELETOU, M. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiologica**, v. 196, 2009.

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

WANG, S. P.; ZANG, W. J.; KONG, S. S.; 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, 2008.

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

WYNNE, B.M., LABAZI, H., TOSTES, R.C. et al. Aorta from angiotensin II hipertensive mice exhibit preserved nitroxyl anion mediated relaxation responses. **Pharmacological reserach**, v.65, n.01, 2011.

WONG, B.W.; MARSCH, E.; TREPS, L. et al. Endothelial cell metabolism in health and disease: impact of hypoxia. **The EMBO journal**, v.36, n.15, 2017.

ZHAO, Y.; BRANDISH, P.E.; BALLOU, D.P.; MARLETTA, M.A. A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proceedings of the National. Academy of Sciences*, v.96, n. 26, 1999.

ZHAO et al. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 2, 2015.

ANEXO I – PARECER CEUA



Universidade Federal da Paraíba
**Comissão de Ética no
 Uso de Animais**

CERTIFICADO : EMENDA v10/05/2023

Certificamos que a EMENDA (versão de 10/05/2023) da proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO 4-METILBENZOATO DE 4-CLOROBUTILA SOBRE A FUNÇÃO VASCULAR DE RATOS NORMOTENSOS ", CEUA nº 4847071122 (ID 092645), sob a responsabilidade de **Valdir de Andrade Braga e equipe; Layane da Silva Lima** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) em 17/05/2023.

Pedido apresentado à CEUA: A presente emenda foi elaborada devido à necessidade de correção da linhagem do animal utilizado na pesquisa (*Rattus norvegicus*). Foram solicitados ratos wistar da linhagem Kyoto na primeira proposta. Contudo, por se tratar de um estudo com animais saudáveis, sem utilizar grupos de ratos hipertensos, a nova proposta utilizará a linhagem de *Rattus Norvegicus Wistar* (heterogêneos).

Considerações da CEUA: O protocolo de pesquisa foi aprovado em reunião realizada em 10/03/2023. Em 10/05/2023 o pesquisador, a partir de emenda, solicita alteração da linhagem do animal a ser utilizado na pesquisa (*Rattus norvegicus*). Foram solicitados ratos wistar da linhagem Kyoto na primeira proposta. Contudo, por se tratar de um estudo com animais saudáveis, sem utilizar grupos de ratos hipertensos, a nova proposta utilizará a linhagem de *Rattus Norvegicus Wistar* (heterogêneos). O projeto e formulário foram corrigidos. Não há alteração do número de animais e de protocolo experimental. Sou de parecer favorável à aprovação da emenda. Este é o meu parecer, salvo melhor juízo.

Término previsto: 03/2024

Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM		
Espécie:	Ratos isogênicos	sexo: Machos	idade: 12 a 14 semanas
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar Kyoto	Peso: 250 a 300 g	Quantidade excluída: 0
Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo: Machos	idade: 12 a 14 semanas
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar	Peso: 250 a 300 g	Quantidade solicitada: 40

ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Ratos heterogênicos	Machos	40	0
Ratos isogênicos	Machos	40	0

João Pessoa, 02 de julho de 2024

Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins
 Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal da Paraíba

