

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

NATÁLIA TABOSA MACHADO

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DE UM NOVO DOADOR DE
ÓXIDO NÍTRICO, 12-NITRATO-C/S-9-OCTADECANOATO DE
ETILA (NCOE), EM RATOS**

João Pessoa

2013

NATÁLIA TABOSA MACHADO

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DE UM NOVO DOADOR DE
ÓXIDO NÍTRICO, 12-NITRATO-C/S-9-OCTADECANOATO DE
ETILA (NCOE), EM RATOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal da
Paraíba, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de MESTRE
EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de
concentração: FARMACOLOGIA

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

João Pessoa

2013

M149e Machado, Natália Tabosa.

Efeitos cardiovasculares de um novo doador de óxido nítrico, 12-nitrato-cis-9-octadecanoato de etila (NCOE), em ratos / Natália Tabosa Machado.- João Pessoa, 2013.
105f.

Orientador: Isac Almeida de Medeiros

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

1. Nitrato orgânico. 2. Óxido nítrico. 3. Artéria mesentérica.
4. Vasorrelaxamento.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

NATÁLIA TABOSA MACHADO

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DE UM NOVO DOADOR DE
ÓXIDO NÍTRICO, 12-NITRATO-C/S-9-OCTADECANOATO DE
ETILA (NCOE), EM RATOS**

Aprovada em ____/____/____

Banca examinadora

**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientador**

**Prof^a. Dr^a. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro
(Universidade Federal de Alagoas)
Examinador Externo**

**Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Interno**

Dedicatória



Aos meus pais, Carlos e Bernadete, pelo amor incondicional, dedicação e por serem os grandes incentivadores de todas as minhas conquistas. Foram vocês que me ensinaram a ser uma pessoa correta, digna e me ajudaram a conquistar um grande bem da vida: o conhecimento.

Às minhas irmãs, Daniele e Karla, pela amizade, apoio e por sempre estarem presentes em todos os momentos da minha vida, torcendo sempre pela minha vitória.

Ao meu noivo, Paulo Calzerra, pelo amor, incentivo, companheirismo e compreensão.

Agradecimientos



A **DEUS** e **Nossa Senhora** por estarem sempre ao meu lado, guiando meus passos e me capacitando para enfrentar os obstáculos da vida;

Ao meu orientador, **Prof. Isac Almeida de Medeiros**, pela oportunidade, confiança depositada e ensinamentos que foram imprescindíveis para minha formação. Suas opiniões foram de extrema importância para direcionamento e conclusão deste trabalho;

Ao **Prof. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho** pela substância cedida e cooperação ao longo deste trabalho;

À **Prof^a. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro** e ao **Prof. Reinaldo Nóbrega de Almeida** por terem aceitado participar da banca de defesa do meu mestrado, contribuindo significativamente para o meu trabalho;

À **Priscilla Maria** pelo companheirismo e pela preciosa amizade construída. Durante os dois anos de mestrado foi meu braço direito, sempre disposta a me ajudar com alegria e dedicação. Obrigada por me apoiar não só na parte experimental, mas também por suas palavras de conforto nos momentos difíceis;

A **Abrahão, Carminha, Fabíola, e Thyago**, meus grandes amigos e companheiros. Não sei como agradecer as insubstituíveis ajudas, os grandes ensinamentos e por me aturarem nos momentos mais estressantes e turbulentos. **Abrahão**, obrigada por me escutar e me aconselhar até mesmo quando mais ninguém tinha paciência com minhas preocupações exageradas. **Carminha**, obrigada por sempre estar ao meu lado desde a iniciação científica, me acolhendo e me passar seu rigor científico. Sua presença durante minha vida como pesquisadora foi de fundamental importância. **Fabíola**, obrigada por me escutar e me ensinar, mesmo nos momentos que você estava preocupada com seu doutorado. Além disso, adorei dividir meus dias de experimento com você. **Thyago**, obrigada por sempre atender as minhas solicitações e me dá opiniões sempre pertinentes, sendo elas muito importantes para a realização

desse trabalho. A ajuda de vocês foi essencial para a conclusão desse trabalho. Sou eternamente grata!

À **Tays Amanda e Priscilla Crispiniano** pela amizade, ajuda e disponibilidade oferecida;

À **Prof^ª. Islânia Araújo e ao Prof. Robson Veras** pelo incentivo, ajuda, apoio e atenção durante a realização deste trabalho;

A **Leônidas Mendes**, com quem eu tive o privilégio de dividir inúmeros momentos da minha vida acadêmica. Durante a graduação, quando estávamos nos preparando para a seleção do mestrado, durante as disciplinas do mestrado e execução dos experimentos, sua ajuda foi de grande importância;

À equipe do Laboratório de **Farmacologia Cardiovascular**: Abrahão Filho, Fabíola Furtado, José George, Kívia Sales, Lays Dias, Leônidas Mendes, Marden Mendes, Maria Angélica, Maria do Carmo, Mônica Almeida, Priscilla Maria, Priscilla Crispiniano, Raphael de Souza, Tays Amanda, Thyago Queiroz, Valéria de Assis, Walma Vasconcelos e aos professores Robson Veras e Islânia Araújo por toda a ajuda, pela partilha de conhecimentos e por tornarem a convivência diária no laboratório uma tarefa prazerosa;

À **equipe da cultura de células do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular**: Fabíola Furtado, Valéria de Assis, Walma Vasconcelos, Priscilla Crispiniano e Prof. Robson Veras, pois sem vocês os experimentos com cultura de célula e citômetro de fluxo não teriam sido realizados;

À minha sala da graduação, em especial a **Kívia Sales, Daniele Mendes e Leônidas Mendes**, que dividiram momentos de aprendizado durante nossa vida como alunos;

À minha turma de mestrado, em especial a **Camilla Pinheiro, Heloísa Mara, Débora Ribeiro e Leônidas Mendes** pelo incentivo e momentos compartilhados;

A **José Crispim Duarte** pela amizade, pela força e pela disposição de estar sempre pronto a ajudar, não importando a situação;

As funcionárias **Mônica Rodrigues** e **Dona Maria** com quem tive o prazer de dividir vários inícios de manhãs nos meus dias de experimento. E aos funcionários **Luís Cordeiro** e **Adriano Cordeiro** pelo trabalho realizado no biotério nos dando suporte para trabalhar. Bem como a **Dona Hélia** (PRPG) por sua grande ajuda na Reitoria, sempre solícita para os assuntos burocráticos;

A todos os **professores** do mestrado, pelos ensinamentos transmitidos durante as disciplinas;

À **Coordenação** e aos **funcionários** do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela competência, seriedade e apoio;

Ao **CNPq, CAPES, Cbiotec e UFPB** pelo apoio financeiro e estrutural para o desenvolvimento deste estudo.

**O sonho determina o que você quer e a ação determina o que
você conquista.**

(Aldo Novak)



Resumo



RESUMO

Efeitos cardiovasculares de um novo doador de óxido nítrico, o 12-nitrato-*cis*-9-octadecanoato de etila (NCOE), em ratos

MACHADO, N.T.

Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Dissertação de Mestrado, CCS/UFPB (2013)

Os nitratos orgânicos são classificados como drogas doadoras de óxido nítrico (NO), utilizadas no tratamento de doenças cardiovasculares, mimetizando as ações do NO endógeno. Um nitrato orgânico inédito, o 12-nitrato-*cis*-9-octadecanoato de etila (NCOE), sintetizado a partir do ácido ricinoléico do óleo da mamona, foi estudado com o objetivo de avaliar seus efeitos cardiovasculares, utilizando abordagens *in vivo* e *in vitro*. Em ratos normotensos, o NCOE (10; 20; 30; 40 e 60 mg/kg, i.v.) promoveu hipotensão ($-2,5 \pm 0,9$; $-3,9 \pm 0,7$; $-31,0 \pm 6,6$; $-40,6 \pm 3,9$ e $-50,4 \pm 3,5\%$) e bradicardia ($-5,6 \pm 0,9$; $-8,9 \pm 1,0$; $-57,2 \pm 8,9$; $-70,9 \pm 5,3$ e $-77,9 \pm 2,7\%$) transientes, ambas dependentes de dose. Em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contráídos com fenilefrina (FEN) ($1 \mu\text{M}$), o NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M) induziu vasorrelaxamento, dependente de concentração, na presença ($E_{\text{máx}} = 107,3 \pm 4,43\%$; $\text{pD}_2 = 5,59 \pm 0,06$) e ausência ($E_{\text{máx}} = 118,0 \pm 3,53\%$; $\text{pD}_2 = 5,90 \pm 0,05$) do endotélio, sugerindo que o efeito do NCOE parece ser independente dos fatores liberados pelo endotélio. Todos os experimentos subsequentes foram realizados na ausência do endotélio. O efeito do NCOE foi atenuado após contração induzida por solução despolarizante de 60 mM de KCl ($E_{\text{máx}} = 92,0 \pm 4,1\%$), quando comparado com o efeito do NCOE frente à FEN. A pré-incubação com PTIO (300 μM), sequestrador do NO na forma radicalar ($\text{NO}^\bullet$), atenuou a potência do vasorrelaxamento do NCOE ($\text{pD}_2 = 5,10 \pm 0,05$), sugerindo a participação do $\text{NO}^\bullet$ no efeito deste nitrato. Entretanto, na presença de L-cisteína (3 mM), um sequestrador do NO na forma reduzida (NO^-), o vasorrelaxamento do NCOE foi potencializado ($\text{pD}_2 = 6,34 \pm 0,03$). Efeito semelhante foi observado na presença da N-acetilcisteína (NAC) (3 mM), um sequestrador de radicais livres intracelulares ($\text{pD}_2 = 6,56 \pm 0,05$). O efeito do NCOE não foi alterado na presença do proadifeno (10 μM), um inibidor do citocromo P450 ($\text{pD}_2 = 5,99 \pm 0,07\%$). No entanto, o efeito vasorrelaxante foi reduzido na presença da cianamida (1 mM), inibidor da aldeído desidrogenase mitocondrial (mtALDH) ($E_{\text{máx}} = 94,3 \pm 6,26\%$); e do ODQ 10 μM , inibidor da ciclase de guanilil solúvel (sGC) ($E_{\text{máx}} = 55,2 \pm 3,60\%$), sugerindo o envolvimento destas enzimas no efeito do NCOE. Após pré-incubação com TEA (3 mM), concentração que bloqueia de forma não seletiva os canais para K^+ , o vasorrelaxamento do nitrato foi atenuado ($E_{\text{máx}} = 107,1 \pm 7,09\%$), demonstrando o envolvimento destes canais neste efeito. Ao utilizar a iberiotoxina (100 nM) e a glibenclamida (10 μM), bloqueadores seletivos dos BK_{Ca} e K_{ATP} , respectivamente, o efeito vasodilatador foi diminuído ($E_{\text{máx}} = 106,2 \pm 1,49\%$; $\text{pD}_2 = 5,61 \pm 0,04$, respectivamente); entretanto, o efeito não foi modificado na presença de 4-aminopiridina (1 mM), bloqueador dos K_v ($\text{pD}_2 = 5,70 \pm 0,04\%$). Além disso, NCOE aumentou os níveis de NO em células musculares lisas de aorta, detectado pela fluorescência emitida por DAF-2T. Estes resultados, em conjunto, sugerem que NCOE induz hipotensão e bradicardia transientes, e promove vasorrelaxamento, devido à liberação de $\text{NO}^\bullet$, por meio da metabolização do composto via mtALDH, e consequente ativação da sGC e dos canais K_{ATP} e K_{Ca} .

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

Abstract



ABSTRACT

Cardiovascular effects of a new nitric oxide donor, 12-nitrate-*cis*-9-octadecanoate acetate (NCOE), in rats

MACHADO, N.T.

Graduate and Synthetic Bioactive Natural Products,
Master-Thesis, CCS / UFPB (2013)

The organic nitrates are classified as drugs donors of nitric oxide (NO) that might potentially be useful in the treatment of cardiovascular diseases, principally to mimic endogenous NO. A new-found organic nitrate, the nitrate-12- *cis*- 9- ethyl octadecanoate (NCOE), synthesized from ricinoleic acid from castor oil, was studied in order to evaluate its cardiovascular effects, using *in vivo* and *in vitro* approaches. In normotensive rats, NCOE (10, 20, 30, 40 and 60 mg /kg, iv) induced hypotension (2.5 ± 0.9 , -3.9 ± 0.7 , -31.0 ± 6.6 , -40.6 ± 3.9 and $-50.4 \pm 3.5\%$) and bradycardia (-5.6 ± 0.9 , -8.9 ± 1.0 , -57.2 ± 8.9 ; -70.9 ± 5.3 and $-77.9 \pm 2.7\%$) transients, both dose-dependent effects. In isolated rat superior mesenteric artery rings pre-contracted with phenylephrine (Phe) (1 mM), NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M) induced a concentration-dependent vasorelaxation in presence (MR = $107.3 \pm 4.43\%$; $pD_2 = 5.59 \pm 0.06$) or absence (MR = $118.0 \pm 3.5\%$; $pD_2 = 5.90 \pm 0.05$) of endothelium, suggesting a NCOE effect independent of endothelium-derived factor. All subsequent experiments were performed in the absence of endothelium. The NCOE effect was attenuated after a contraction induced by depolarizing solution with high K^+ (MR = $92.0 \pm 4.1\%$) compared to the nitrate effect on Phe-contractions. The pre-incubation with PTIO (300 mM), a free radical form of NO ($NO^{\bullet}$) scavenger, attenuated the NCOE vasorelaxation potency ($pD_2 = 5.10 \pm 0.05$), suggesting $NO^{\bullet}$ involvement in the nitrate effect. However, in the presence of L-cysteine (3 mM), a reduced form of NO (NO^-) scavenger, NCOE response was potentiated ($pD_2 = 6.34 \pm 0.03$). Similar effect was observed in the presence of N-acetylcysteine (NAC) (3 mM), a free radicals intracellular scavenger ($pD_2 = 6.56 \pm 0.05$). The NCOE effect was not altered in the presence of proadifeno (10 mM), an inhibitor of cytochrome P450 ($pD_2 = 5.99 \pm 0.07\%$). However, the vasodilation was reduced in the presence of cyanamide (1 mM), inhibitor of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (mtALDH) (MR = $94.3 \pm 6.26\%$), and of ODQ (10 μ M), inhibitor of soluble guanylyl cyclase (sGC) (MR = $55.2 \pm 3.60\%$), suggesting these enzymes involvement in NCOE response. After preincubation with TEA (3 mM), a K^+ channels non-selective blocker, the nitrate vasorelaxation was reduced (MR = 107.1 ± 7.09), demonstrating the participation of these channels in nitrate effect. When using iberiotoxin (100 nM) and glibenclamide (10 μ M), K_{ATP} and BK_{Ca} selective blockers, respectively, the vasodilatory effect was reduced (MR = $106.2 \pm 1.49\%$; $pD_2 = 5.61 \pm 0.04$, respectively), although the effect was not modified in the presence of 4-aminopyridine (1 mM), K_v blocker ($pD_2 = 5.70 \pm 0.04\%$). Furthermore, NCOE increased NO levels in rat aorta smooth muscle cells, detected by NO-sensitive dye DAF-2T. These results together suggest that NCOE induces hypotension and bradycardia transients, and promotes vasorelaxation due $NO^{\bullet}$ release through the compound metabolism via mtALDH and consequent sGC, K_{ATP} and BK_{Ca} activation.

Keywords: Organic nitrate. Nitric oxide. Mesenteric artery. Vasorelaxation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do mecanismo de relaxamento da célula muscular lisa vascular via produção de NO.....	31
Figura 2 - Estrutura química de nitratos orgânicos clássicos.....	33
Figura 3 - Reações para obtenção do NCOE.....	36
Figura 4 - Estrutura química do NCOE.....	40
Figura 5 - Representação esquemática dos vasos onde foram implantados os cateteres para o registro dos parâmetros cardiovasculares e administração das drogas.....	45
Figura 6 - Sistema de aquisição de dados para medida de PA e FC em ratos não anestesiados.....	46
Figura 7 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de NCOE sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.....	47
Figura 8 - Representação esquemática da cuba para órgãos isolados.....	48
Figura 9 - Sistema de cubas e aquisição de dados de tensão isométrica para órgão isolado.....	49
Figura 10 - Representação da verificação da viabilidade do órgão e da integridade do endotélio vascular. A) Presença do endotélio e B) Ausência do endotélio funcional.....	50
Figura 11 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada	

de rato, pré-contraídos com FEN (1 μ M). A) Anéis com endotélio intacto; B) Anéis sem endotélio 51

Figura 12 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sobre o tônus intrínseco vascular. A) Anéis com endotélio intacto; B) Anéis sem endotélio.....52

Figura 13 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência do endotélio, pré-contraídos com solução despolarizante de KCl 60 mM.....53

Figura 14 – Representação esquemática do protocolo para investigar o efeito vasorrelaxante de concentrações crescentes do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M), em anéis sem endotélio funcional e pré-contraídos com FEN (1 μ M), na presença de diferentes ferramentas farmacológicas, incubadas individualmente.....54

Figura 15 – Representação esquemática do protocolo para investigar o efeito vasorrelaxante de concentrações crescentes do nitroprussiato (SNP) (10^{-12} – 10^{-7} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio vascular, pré-contraídos com FEN (1 μ M), A) na ausência e B) na presença do cianamida (1 mM).....55

Esquema 16 – Representação esquemática do protocolo para investigar o efeito vasorrelaxante de concentrações crescentes do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio vascular, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na presença do ODQ (10 μ M).....56

Figura 17 – Representação esquemática do protocolo para investigar o efeito vasodilatador de concentrações crescentes do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio vascular, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na presença do TEA (3 mM), iberotoxina (100 nM); 4-AP (1 mM); GLIB (10 μ M).....57

Figura 18 – Registro original representativo, ilustrando o efeito do veículo ou de doses crescentes de NCOE (10; 20; 30; 40 e 60 mg/kg) sobre: A) pressão de pulso (PP) B) pressão arterial média (PAM) e C) frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos não anestesiados.....62

Figura 19 – Registros originais representativos das respostas do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis pré-contraídos com FEN (1 μ M) com o endotélio intacto (A) ou após sua remoção (B).....64

Figura 20 – Representação esquemática do mecanismo de vasorrelaxamento da célula muscular lisa vascular induzido pelo NCOE.....88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Composição da solução de Tyrode para artéria mesentérica superior.....42

Quadro 2 – Composição da solução de Tyrode com 60 mM de KCl.....42

Quadro 3 – Composição da solução de HANK.....43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeitos de NCOE (10, 20, 30, 40 e 60 mg/kg, i.v.) sobre: A) PAM e B) FC em ratos normotensos não anestesiados.....63

Gráfico 2 – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, na presença (●) ou ausência (○) do endotélio, pré-contraídos com FEN (1 μ M).....64

Gráfico 3 – Efeito de NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M) sobre o tônus basal em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto (■) ou endotélio ausente (□).....65

Gráfico 4 – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 μ M) (○) ou pré-contraídos com KCl 60 mM (◇).....66

Gráfico 5 – Curvas concentração-resposta para o efeito vasorrelaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 μ M) na ausência (○) e na presença de PTIO 300 μ M (□).....67

Gráfico 6 – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 μ M) na ausência (○) e na presença de L-Cisteína 3 mM (▲).....68

Gráfico 7 - Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 μ M) na ausência (○) e na presença do NAC 3 mM (◇).....69

Gráfico 8 – Curvas concentração-resposta para o efeito vasorrelaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, com endotélio ausente, pré-contraídos com FEN (1 μ M) na ausência ($\circ$) e na presença de proadifeno 10 μ M ($\blacklozenge$).....70

Gráfico 9 – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 μ M) na ausência ($\circ$) e na presença de cianamida 1 mM ($\blacktriangledown$).....71

Gráfico 10 – Curvas concentração-resposta para o efeito vasorrelaxante induzido pelo SNP (10^{-12} - 10^{-7} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 μ M) na ausência (Δ) e na presença de cianamida 1 mM ($\blacktriangle$).....72

Gráfico 11 – Curvas concentração-resposta para o efeito vasorrelaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, com endotélio ausente, pré-contraídos com FEN (1 μ M) na ausência ($\circ$) e na presença de ODQ 10 μ M ($\blacksquare$).....73

Gráfico 12 – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência ($\circ$) e na presença de A) TEA 3 mM (Δ), B) iberiotoxina 100 nM ($\square$), C) GLIB 10 μ M ($\diamond$) ou D) 4-AP 1 mM (∇).....74

Gráfico 13 - Efeito do NCOE (100 μ M), SNP (10 μ M) e veículo sobre os níveis de NO, expressos em Δ de fluorescência de DAF (%), em células musculares lisas de aorta de rato ($\sim 10^6$ /mL).....75

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS e SIGLAS

4-AP	4-aminopiridina
7-AAD	7-aminoactinomicina D
ACh	Acetilcolina
Akt	Proteína cinase B
ALDH	Aldeído desidrogenase
ALDH-2	ALDH tipo 2 ou mitocondrial
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BK _{Ca}	Canais para K ⁺ sensíveis ao Ca ²⁺ de alta condutância
Ca _v	Canais para Ca ²⁺ sensíveis de voltagem
Ca _v 1.2	Canais de Ca ²⁺ sensíveis à voltagem do tipo L 1.2
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
DAF-DA	Diacetato 3,4-diaminofluoresceína
DAF-2	3,4-diaminofluoresceína
DAF-2T	Triazolo-diaminofluoresceína
DAG	Diacylglicerol
DC	Débito Cardíaco
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC ₅₀	Concentração responsável por 50% do E _{máx}
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
E _{máx}	Efeito máximo
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial
e.p.m.	Erro padrão da média
ET-1	Endotelina-1
FEN	Fenilefrina
FC	Frequência cardíaca
GLIB	Glibenclamida
GTN	Nitroglicerina
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzível

IP ₃	1,4,5-trifosfato de inositol
IP ₃ R	Receptor para IP ₃
ISDN	Dinitrato de isossorbida
ISMN	Mononitrato de isossorbida
K _{ATP}	Canais para K ⁺ sensíveis ao ATP
K _{Ca}	Canais para K ⁺ sensíveis ao Ca ²⁺
KCl 60 mM	Solução de Tyrode com 60 mM de KCl
K _v	Canais para K ⁺ sensíveis à voltagem
MLC	Cadeia leve da miosina
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina
MLCP	Fosfatase da cadeia leve da miosina
mtALDH	ALDH mitocondrial
n	Número de experimentos realizados
NAC	N- acetilcisteína
nNos	Sintase do óxido nítrico neuronal
NOS	Sintase do óxido nítrico
NOS-1	Sintase do óxido nítrico neuronal
NOS-2	Sintase do óxido nítrico induzível
NOS-3	Sintase do óxido nítrico endotelial
NCOE	12-nitrato- <i>cis</i> -9-octadecanoato de etila
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
pD ₂	Logaritmo negativo da EC ₅₀
PDEs	Fosfodiesterases
PETN	Pentaeritritil tetranitrato
PGI ₂	Prostaciclina
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PLCβ	fosfolipase C-β
PKG	Proteína cinase dependente de cGMP
PP	Pressão de pulso
PTIO	2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido sal

de potássio

ROS	Espécies reativas do oxigênio
sCG	Ciclase de guanilil solúvel
SERCA	Bomba de Ca^{2+} do retículo endosarcoplasmático
SFB	Soro fetal bovino
SIN-1	3-morfolino-sidnonimina
SNP	Nitroprussiato de sódio
TEA	Tetraetilamônio
TxA ₂	Tromboxano A ₂
VES	Volume de ejeção sistólico

Obs: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho, que não constam nesta relação, encontram-se descritos no texto ou são convenções adotadas internacionalmente.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR	27
1.2	CONSIDERAÇÕES SOBRE ÓXIDO NÍTRICO	29
1.3	CONSIDERAÇÕES SOBRE OS DOADORES DE NO	32
2	OBJETIVO	38
2.1	OBJETIVO GERAL	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3	MATERIAL	40
3.1	ANIMAIS	40
3.2	OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO NITRATO TESTE	40
3.3	SUBSTÂNCIAS E MEIOS UTILIZADOS	41
3.4	SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS	41
4	MÉTODOS	45
4.1	ENSAIOS FARMACOLÓGICOS IN VIVO	45
4.1.1	Medida direta da PAM e FC em ratos não-anestesiados	45
4.1.2	Efeito induzido pelo NCOE sobre a PAM e FC de ratos normotensos não anestesiados	46
4.2	ENSAIOS FARMACOLÓGICOS IN VITRO	47
4.2.1	Ensaio farmacológico utilizando anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato	47
4.2.1.1	<i>Protocolos experimentais para as preparações com anéis de artéria mesentérica superior de rato</i>	49
4.2.1.2	<i>Avaliação do efeito vasorrelaxante do NCOE em anéis de artéria mesentérica isolada de rato pré-contráidos com FEN</i>	50
4.2.1.3	<i>Investigação do efeito do NCOE em anéis de artéria mesentérica isolada de rato sobre o tônus vascular intrínseco</i>	52

4.2.1.4	<i>Investigação do efeito vasorrelaxante do NCOE em anéis de artéria mesentérica isolada de rato pré-contraídos com solução despolarizante de 60 mM de KCl.....</i>	52
4.2.1.5	<i>Investigação da via de produção do NO na resposta vasorrelaxante induzido pelo NCOE em anéis de artéria mesentérica.....</i>	53
4.2.1.6	<i>Avaliação da participação da mtALDH no vasorrelaxamento induzido pelo SNP.....</i>	54
4.2.1.7	<i>Investigação do envolvimento da via NO-sGC no efeito vasorrelaxante do NCOE.....</i>	56
4.2.1.8	<i>Avaliação da participação para canais para K⁺ na resposta vasorrelaxante induzida por NCOE em anéis de artéria mesentérica.....</i>	56
4.2.2	Dosagem de NO por citometria de fluxo.....	58
4.2.2.1	<i>Cultura de células musculares lisas vasculares de aorta de rato.....</i>	58
4.2.2.2	<i>Viabilidade Celular.....</i>	59
4.2.2.3	<i>Dosagem de NO em miócitos de artéria aorta.....</i>	59
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5	RESULTADOS.....	62
5.1	ESTUDOS FARMACOLÓGICOS COM NCOE IN VIVO.....	62
5.1.1	Efeito induzido pelo NCOE sobre a PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.....	62
5.2	ESTUDOS FARMACOLÓGICOS IN VITRO.....	63
5.2.1	Influência do endotélio no efeito vasorrelaxante induzidos pelo NCOE.....	63
5.2.2	Efeito do NCOE em anéis de artéria mesentérica isolada de rato sobre o tônus intrínseco vascular.....	65
5.2.3	Efeito do NCOE em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com solução despolarizante de 60 mM de KCl.....	66
5.2.4	Investigação da via de produção do NO na resposta vasorrelaxante induzido pelo NCOE.....	66
5.2.4.1	<i>Participação do NO na forma radicalar (NO[•]) no efeito vasorrelaxante induzido pelo NCOE.....</i>	66

5.2.4.2	<i>Avaliação da participação do NO na forma reduzida (NO⁻) na resposta vasorrelaxante induzida pelo NCOE.....</i>	67
5.2.4.3	<i>Participação dos radicais livres intracelulares no vasorrelaxante induzido pelo NCOE.....</i>	68
5.2.4.4	<i>Avaliação da participação do citocromo P450 no vasorrelaxamento induzido pelo NCOE.....</i>	69
5.2.4.5	<i>Avaliação da participação da mtALDH no vasorrelaxamento induzido pelo NCOE.....</i>	70
5.2.5	Avaliação da participação da mtALDH no vasorrelaxamento induzido pelo SNP.....	71
5.2.6	Participação da sGC na resposta vasorrelaxante induzida pelo NCOE.....	72
5.2.7	Participação dos canais para K⁺ na resposta vasorrelaxante induzida pelo NCOE.....	73
5.2.8	Liberação de NO pelo NCOE em cultura de células musculares lisas de aorta de rato.....	74
5	DISCUSSÃO.....	77
6	CONCLUSÃO.....	88
7	PERSPECTIVAS.....	90
	REFERÊNCIAS.....	92

Introdução



1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR

O sistema cardiovascular é constituído basicamente por uma bomba (coração), conectado a uma série de tubos (vasos sanguíneos), preenchidos com plasma e células (sangue). A força gerada pelo coração propela o sangue continuamente para os diversos tecidos do organismo, levando oxigênio e nutrientes para as células e, simultaneamente, removendo resíduos celulares para serem excretados (PUGSLEY; TABRIZCHI, 2000; DEVIHA; ENGARAJAN; HUSSAIN, 2013). Além de fornecer o fluxo de sangue para os tecidos, o sistema cardiovascular é o principal responsável pela regulação, controle e manutenção da pressão arterial (PA), uma das funções fisiológicas mais complexas do sistema biológico (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001).

A PA pode ser definida como a pressão que o sangue exerce contra as paredes dos vasos arteriais. O maior valor de pressão mensurado durante um ciclo cardíaco é a pressão arterial sistólica (PAS), que corresponde à pressão nas artérias durante sístole ventricular esquerda. Já o menor valor de pressão arterial é a pressão arterial diastólica (PAD), que equivale à pressão nas artérias durante a diástole ventricular esquerda. A diferença entre a PAS e PAD é definida como pressão de pulso (PP), que reflete o volume de sangue ejetado pelo ventrículo esquerdo durante cada batimento cardíaco (PORTH, 2010). Como a PA é pulsátil, ela é representada matematicamente por um único valor, a pressão arterial média (PAM), que é estimada somando a PAD mais um terço da PP (DARNE et al., 1999).

A PAM é determinada pelo produto do débito cardíaco (DC) pela resistência vascular periférica total (RVPT), expressa pela equação: $PAM = DC \times RVPT$ (HALL, 1999). Alterações homeostáticas no DC são resultantes de variações na frequência cardíaca (FC), no volume de ejeção sistólica (VES) ou em ambos. A interação dessas variáveis é fornecida pela seguinte equação $DC = VES \times FC$. (COWLEY, 2006). Já a resistência vascular periférica é controlada pelo tônus vascular das pequenas artérias e arteríolas. (JACKSON, 2000).

Além do sistema cardiovascular, outros sistemas também estão envolvidos na regulação da PA, tais como: o renal, neural e endócrino (PAGE, 1987; SANJULIANI, 2002). Estes sistemas regulam e ajustam a PA por meio de sistemas de retroalimentação que operam a curto e longo-prazo (PINTÉROVÁ; KUNEŠ; ZICHA, 2011). O principal mecanismo de controle em curto prazo é desempenhado pelos reflexos que são originados nos barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares, e são caracterizados por promoverem ajustes rápidos de PA (DAMPNEY, 2002; GUYENET, 2006). Já o controle em longo prazo é em grande parte atribuído aos rins, por meio da ação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (HALL, 1999).

O endotélio vascular também desempenha um papel importante no controle da PA, por estar envolvido na produção de potentes mediadores vasoativos (FRÜHBECK, 1999). O endotélio é considerado uma monocamada de células estáticas, que atua como uma barreira semipermeável entre o sangue e a parede dos vasos sanguíneos (SAINANI, 2012). Uma das principais funções das células endoteliais é regular o tônus vascular, que é determinado pelo balanço preciso entre contração e relaxamento dos vasos sanguíneos. Este balanço acontece devido à produção e liberação de fatores vasoconstritores e vasodilatadores pelo endotélio vascular (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989; KIM et al., 2011).

Os fatores vasoconstritores promovem seus efeitos por elevarem a concentração de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), e também por aumentarem sensibilidade dos elementos contráteis ao Ca^{2+} (LEDOUX et al., 2006; MORGADO et al., 2012). Como exemplos de fatores contracturantes liberados pelo endotélio destacam-se: o tromboxano A_2 (TxA_2); as espécies reativas de oxigênio (ROS); a endotelina-1 (ET-1); e a angiotensina II (Ang II) (VANHOUTTE; FÉLÉTOU; TADDEI, 2005; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009; FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2010).

Já os fatores vasodilatadores exercem seus efeitos por diminuir a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nas células musculares lisas vasculares (LEDOUX et al., 2006). Os três principais fatores relaxantes derivados do endotélio vascular são o óxido nítrico

(NO), a prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989; JIN et al., 2011).

1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE ÓXIDO NÍTRICO

Dentre os fatores relaxantes, o NO é uma importante molécula sinalizadora implicada em diversos processos fisiológicos e patológicos (SCATENA et al., 2010), destacando-se suas ações nos sistemas imunológico, nervoso e cardiovascular. O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas. Trata-se de um radical livre, inorgânico, incolor, gasoso, altamente reativo e com uma meia vida relativamente curta (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

O NO endógeno é sintetizado pela ação catalítica de três diferentes isoformas da enzima NO sintase (NOS), que convertem L-arginina e uma molécula de oxigênio em NO e L-citrulina (IGNARRO, 1999; FRANCIS; BUSCH; CORBIN, 2010). As três isoformas da NOS incluem: NOS induzível (iNOS ou NOS2), NOS neuronal (nNOS ou NOS1) e NOS endotelial (eNOS ou NOS3) (FÖRSTERMANN et al., 1994; FÖRSTERMANN; KLEINERT, 1995). A iNOS é expressa em vários tipos de células, em resposta a estímulos pró-inflamatórios e citocinas, e pode produzir grande quantidade de NO. Já a nNOS e a eNOS apresentam expressão constitutiva e produzem baixa quantidade de NO. A nNOS, além de ser expressa em neurônios, pode estar presente em outros tipos de células, como os cardiomiócitos. A eNOS é expressa em células endoteliais, mas também tem sido detectada em cardiomiócitos, plaquetas e certos neurônios do cérebro (GARCIA; INCERP, 2008; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

As células endoteliais liberam NO em condições basais, como também em resposta a estímulos mecânicos ou químicos, que podem agir por mobilização do Ca^{2+} ou pela ação da proteína cinase B (Akt). Uma vez produzido, o NO difunde-se da célula endotelial, passando facilmente através das membranas das células vizinhas, regulando uma série de efeitos no

sistema cardiovascular (MILLER; MEGSON, 2007; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

O NO age, nas células do músculo liso vascular, ativando a enzima ciclase de guanilil solúvel (sGC) (MILLER; MEGSON, 2007). A sGC é um heterodímero constituído por duas subunidades (α e β) e um grupamento heme, localizado entre as duas subunidades (HAMMOND; BALLIGAND, 2012). Quando o NO se liga ao ferro do grupamento heme desencadeia uma alteração conformacional no domínio catalítico das subunidades α e β , e acelera a taxa basal de conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) (TSAI; KASS, 2009). Dados mostram que o heterodímero $\alpha_1\beta_1$ da sGC é a principal isoforma responsável pela síntese de cGMP induzida pelo NO (HAMMOND; BALLIGAND, 2012).

Uma vez produzido, o cGMP atua em diversos alvos, tais como: fosfodiesterases (PDEs), canais catiônicos operados por cGMP e proteínas cinases dependentes de cGMP (PKG) (FRANCIS; BUSCH; CORBIN, 2010). Após ser ativada, a PKG atua fosforilando proteínas-alvo no músculo liso, medeando o relaxamento vascular (KLEMENSKA; BERESEWICZ, 2009).

A vasodilatação promovida pela PKG incluem os seguintes mecanismos: (a) inativação da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK); (b) ativação da bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA), acelerando a recaptação de Ca^{2+} para os estoques intracelulares (CORNWELL et al, 1991); (c) ativação da bomba de Ca^{2+} da membrana plasmática (PMCA), favorecendo o efluxo deste íon; (d) ativação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que troca o Ca^{2+} intracelular pelo Na^+ extracelular; e (e) abertura dos canais para K^+ da membrana plasmática, levando à hiperpolarização nas células musculares lisas com fechamento dos canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem (ARCHER et al., 1994; MURPHY; BRAYDEN, 1995; CARVAJAL et al., 2000; IRVINE; FAVALORO; KEMP-HARPER, 2003; JACKSON, 2005). Todos esses mecanismos resultam na diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e vasorrelaxamento (LINCOLN; DEY; SELLAK, 2001) (Figura 1).

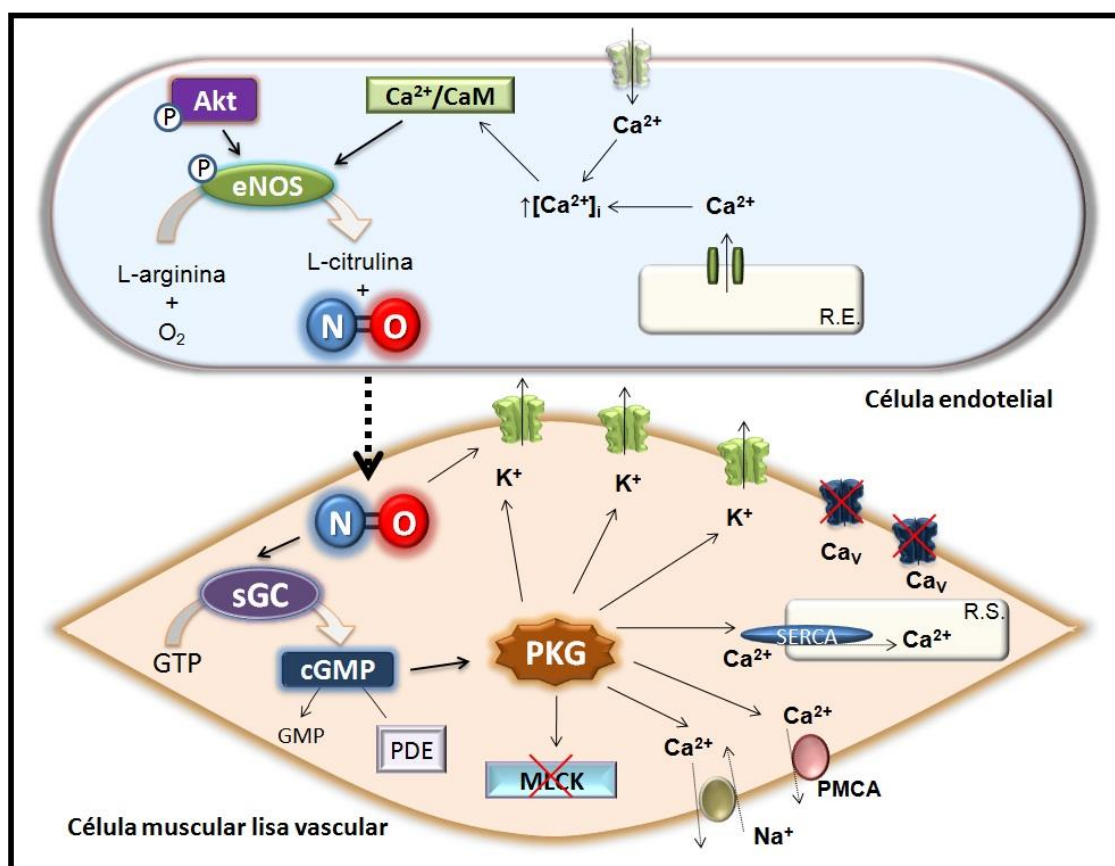


Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de relaxamento da célula muscular lisa vascular via produção de NO
 Fonte: MACHADO, N.T.

Nas células do músculo liso, os canais para K^+ que podem estar envolvidos no efeito vasorrelaxante dependente de cGMP são: canais para potássio sensíveis a voltagem (K_v), canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), canais para potássio sensíveis ao cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) (JACKSON, 2005).

Os K_v abrem-se para permitir o efluxo de K^+ , em resposta à despolarização celular, apresentando importante papel na regulação do potencial de membrana e do tônus muscular (JACKSON, 2000; KO et al., 2008). Os K_{ATP} fecham-se em resposta ao aumento da concentração intracelular de ATP. Entretanto, estes canais também são regulados por outras vias de transdução de sinal (JACKSON, 2000). Já os BK_{Ca} são os canais para potássio sensíveis ao cálcio (K_{Ca}) mais expressos nas células musculares lisas (JACKSON, 2005). Estes canais são ativados por despolarização da membrana e alterações na concentração de Ca^{2+} intracelular (KO et al., 2008).

Estudos prévios indicam que os BK_{Ca} podem ser ativados diretamente pelo NO, de maneira independente do cGMP (BOLOTINA, et al., 1994; MISTRY; GARLAND, 1998; FÉLÉTOU, 2009).

Até recentemente, a maior parte dos efeitos biológicos do NO tinha sido atribuída ao seu estado não carregado, a forma radicalar livre (NO[•]). No entanto, foi sugerido que a forma reduzida do NO, o ânion nitroxil (NO⁻), também tem importância fisiológica. Foi demonstrado que o NO⁻ pode ser sintetizado endogenamente, podendo mediar o vasorrelaxamento por meio da estimulação da sGC e aumento dos níveis de cGMP (IRVINE; FAVALORO; KEMP-HARPER, 2003; ANDREWS et al., 2009).

Além do NO exercer um papel central na regulação do tônus vascular, ele também atua modulando a contractilidade cardíaca, inibindo: a agregação plaquetária, a adesão neutrófilos na superfície endotelial e a proliferação das células musculares lisas vasculares (NASEEM, 2005; MONCADA; HIGGS, 2009). Dessa forma, a diminuição da síntese e/ou biodisponibilidade do NO está associada a várias doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão arterial, aterosclerose, doenças arteriais coronarianas e angina (NASEEM, 2005; BARRETO; CORREIA, 2005; FRANCIS; BUSCH; CORBIN, 2010). Nesse contexto, drogas doadoras de NO que mimetizam o papel desta molécula no organismo, apresentam efeitos benéficos frente às desordens cardiovasculares (MILLER; MEGSON, 2007).

1.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS DOADORES DE NO

Os doadores de NO são uma classe de substâncias quimicamente heterogênea, com um mecanismo de ação molecular comum: a capacidade de liberar o NO quando aplicada aos sistemas biológicos. Essa classe de substância tem sido comumente utilizadas na terapia de doenças cardiovasculares há mais de 150 anos (BELLISARII et al., 2012).

Muitos doadores de NO estão sendo usados em diferentes estudos experimentais. Isto ocorre pelo fato de que essas drogas são ferramentas farmacológicas mais apropriadas para avaliar o papel do NO na fisiologia e

patologia do sistema cardiovascular (BURGAUD; ONGINI; SOLDATO, 2002). Os efeitos induzidos por essa classe de substâncias dependem: da quantidade de NO liberado, do local de liberação e dos mecanismos envolvidos neste processo (SEABRA; DURÁN, 2010). As vias que levam à liberação de NO diferem significativamente entre classes de doadores NO, bem como sua reatividade química (FEELISCH, 1998). Vários compostos liberam NO de forma não enzimática, enquanto outros necessitam de catálise enzimática para liberá-lo (FEELISCH, 1998; FLORYSZAK-WIECZOREK, et al., 2006).

Um doador de NO comumente usado na clínica é o nitroprussiato de sódio (SNP), um composto nitroso inorgânico. Este doador de NO é usado em hospitais por via intravenosa para induzir uma rápida redução da PA em crises hipertensivas (NAPOLI; IGNARRO, 2003; SERAFIM et al., 2012). O SNP não requer uma biotransformação enzimática para liberar o NO (BELLISARII et al., 2012). A disponibilização do NO, a partir do SNP, necessita apenas de irradiação com luz ou redução de um elétron (FEELISCH, 1998). A principal limitação clínica do SNP é a liberação do cianeto (CN^-) incorporado em sua estrutura, que pode causar toxicidade celular pronunciada (BATES et al., 1991; NAPOLI; IGNARRO, 2003; MILLER; MEGSON, 2007).

Atualmente, os doadores de NO mais utilizados na medicina cardiovascular são os nitratos orgânicos, como: trinitrato de glicerina (GTN), dinitrato de isossorbida (ISDN) e mononitrato de isossorbida (ISMN) (Figura 2) (BELLISARII et al., 2012). O GTN, conhecido como nitroglicerina, é o protótipo da classe e o nitrato orgânico mais extensamente estudado até a atualidade (SERAFIM et al., 2012).

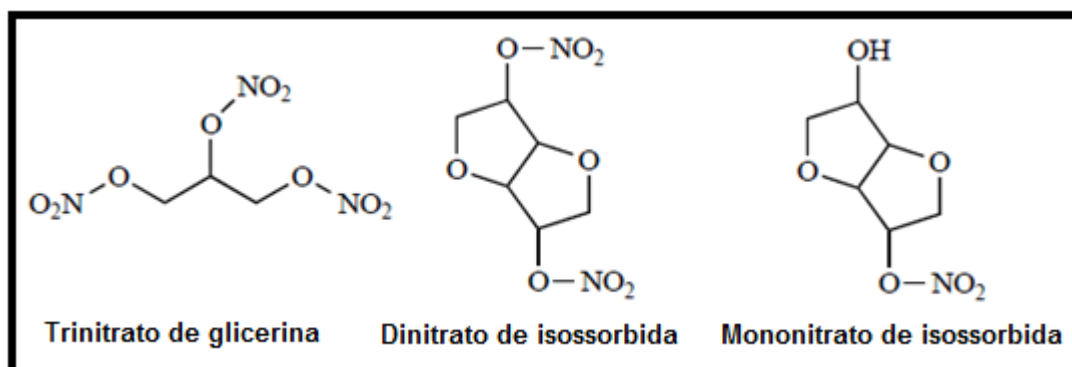


Figura 2 – Estrutura química de nitratos orgânicos clássicos

Fonte: BELLISARII et al., 2012

A característica comum dos nitratos orgânicos é a sua estrutura química (CSONT; FERDINANDY, 2005). A maioria dos nitratos orgânicos são sintetizados a partir de uma reação entre ácido nítrico e o grupo álcool ($R-OH + HNO_3 = RONO_2$). Esta reação resulta na formação de ésteres de ácido nítrico de alcoóis mono- e poli- hídricos ($R-O-NO_2$), onde R representa qualquer resíduo orgânico (CSONT; FERDINANDY, 2005; OMAR; ARTIME; WEBB, 2012).

A liberação de NO pelos nitratos orgânicos pode envolver tanto mecanismos enzimáticos quanto não enzimáticos. O mecanismo não enzimático inclui reações com tióis, que são compostos que apresentam em suas estruturas um grupo sulfidril (SH). Já a bioativação enzimática envolve um número crescente de enzimas, dentre elas estão: a glutathione-S-transferase; xantina oxidoreductase; citocromo P450; e aldeído desidrogenase (ALDH) (FEELISCH, 1998; CSONT; FERDINANDY, 2005). A isoforma mitocondrial da ALDH (ALDH-2 ou mtALDH) é a principal enzima responsável pela bioativação de GTN em 1,2-dinitrato de glicerol (GDN) e NO_2 (CHEN; ZHANG; STAMLER 2002; KLEMENSKA; BERESEWICZ, 2009).

Os nitratos orgânicos são comumente utilizados para o tratamento de doenças cardiovasculares, tais como: angina, doenças coronarianas, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (DAIBER et al., 2012). A eficácia terapêutica na clínica está relacionada com a capacidade destes agentes de promoverem vasodilatação arterial e venosa periférica, resultando na redução da pré-carga, pós-carga cardíaca e do trabalho cardíaco. Estes efeitos culminam na redução da necessidade de oxigênio pelo miocárdio. Adicionalmente, os nitratos induzem dilatação da artéria coronária, levando ao aumento do fornecimento de oxigênio para miocárdio. Dessa forma, os nitratos orgânicos são notavelmente eficazes em restaurar o equilíbrio da oferta/demanda de oxigênio (KLEMENSKA; BERESEWICZ, 2009; OMAR; ARTIME; WEBB, 2012; BELLISARII et al., 2012).

No entanto, o uso crônico de drogas doadoras de NO é limitado devido ao desenvolvimento de tolerância, sendo este um fenômeno multifatorial, caracterizado pela redução do seu efeito vasodilatador, redução do seu efeito

hipotensor e atenuação do efeito anti-isquêmico (KLEMENSKA; BERESEWICZ, 2009; DAIBER et al., 2012).

Duas hipóteses principais têm sido propostas para o desenvolvimento da tolerância aos nitratos orgânicos: tolerância induzida por mecanismos vasculares e/ou por mecanismos neuro-hormonais. Os mecanismos vasculares estão relacionados com a incapacidade das células musculares lisas a responder adequadamente aos nitratos, vários mecanismos estão envolvidos nessa resposta, dentre eles estão: (a) atenuação da bioativação dos nitratos; (b) disfunção endotelial; (c) aumento da atividade da fosfodiesterase (PDE), com a subsequente redução dos níveis intracelulares do cGMP; (d) diminuição da capacidade de resposta da sCG ao NO. Já os mecanismos neuro-hormonais envolvem o aumento dos níveis de catecolaminas, ativação do sistema renina - angiotensina e aumento do volume intravascular (THATCHER et al., 2004).

A descoberta e a síntese de novos nitratos orgânicos incapazes de induzir tolerância, e com melhor propriedades farmacológicas tornam-se bastante relevante para o tratamento das doenças do sistema cardiovascular (BONAVENTURA et al., 2011).

A síntese orgânica é uma ciência em constante evolução e a sua associação com a biologia, a medicina e as ciências ambientais conferiu-a um caráter ainda mais dinâmico e interdisciplinar (CORREIA; OLIVEIRA, 2011). Substâncias de origem sintética têm sido uma importante fonte de obtenção de novos fármacos, por permitir o acesso a substâncias terapeuticamente úteis e com níveis de complexidade variáveis (BARREIRO, 2002).

Estudos de grande importância, com nitratos orgânicos obtidos a partir de rotas sintéticas, vêm sendo realizados há alguns anos no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Dentre eles estão os nitratos orgânicos: nitrato tetra-hidrofurfurílico (NTHF), obtido do bagaço da cana-de-açúcar (ALUSTAU, 2010), e o 2-nitrato-1,3-dibutoxipropano, obtido a partir da glicerina (FRANÇA-SILVA, 2010).

Um inédito nitrato orgânico, o 12-nitrato-*cis*-9-octadecanoato de etila (NCOE), foi obtido a partir do ácido ricinoléico, o principal componente do óleo

de mamona, representando cerca de 90% do total deste óleo. A reação para obtenção do NCOE ocorre em duas etapas: uma reação esterificação do ácido ricinoléico, seguida por uma nitratação do 12-hidroxi-*cis*-octadecanoato de etila (Figura 3).

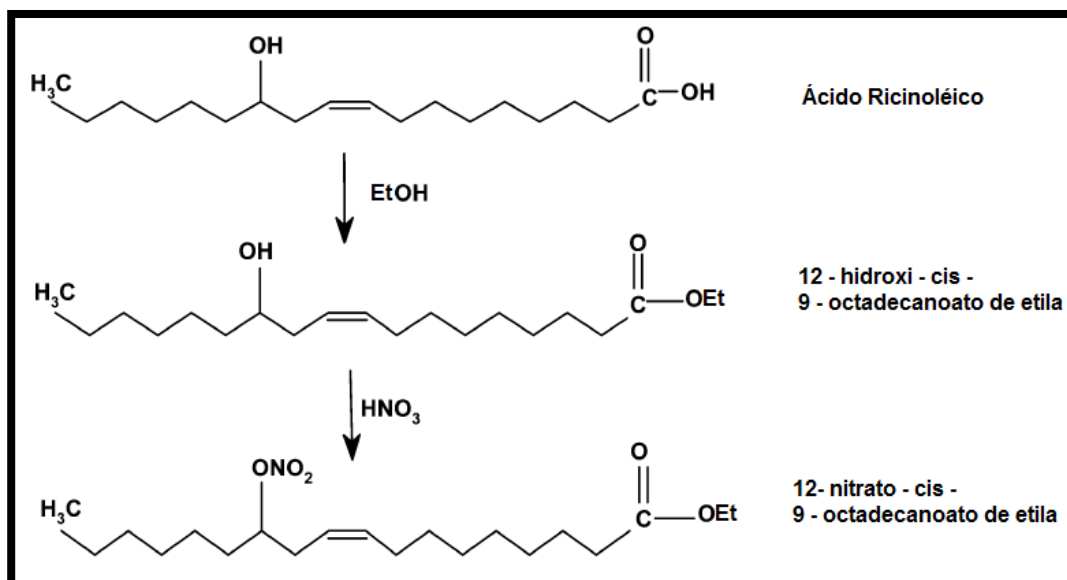


Figura 3 – Reações para obtenção do NCOE
Fonte: SUPPES et al. 2003

Como não existem relatos na literatura sobre a atividade biológica deste nitrato orgânico, o presente estudo teve como finalidade investigar as ações farmacológicas desse composto sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos.

Objetivos



2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho teve como objetivo investigar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo nitrato orgânico, 12-nitrato-*cis*-9-octadecanoato de etila (NCOE), em ratos normotensos, tentando elucidar os mecanismos de ação envolvidos, por meio de abordagens combinadas: *in vivo* e *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Testes *in vivo*

Verificar os efeitos da administração aguda do NCOE sobre a PA e FC em ratos normotensos não anestesiados;

2.2.2 Testes *in vitro*

- Caracterizar o efeito do NCOE em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, avaliando os seguintes parâmetros:
 - a) Envolvimento dos fatores vasoativos liberados pelo endotélio;
 - b) Participação do NO na forma radicalar (NO[•]) e reduzida (NO⁻);
 - c) Participação das enzimas citocromo P450, mtALDH e sGC;
 - d) Envolvimento dos canais para K⁺.
- Avaliar a liberação de NO pelo NCOE em cultura de células musculares lisas de aorta de rato por citometria de fluxo.

Material



3 MATERIAL

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados em todos os experimentos ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 250 – 300 g, os quais foram provenientes do Biotério Professor George Thomas do Centro de Biotecnologia (CBiotec), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Estes animais foram mantidos sob condições controle de temperatura (21 ± 1 °C), em um ciclo claro-escuro de 12 horas (6 – 18 horas) e com livre acesso à água e alimentação (ração Purina®). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal da UFPB, com certidão nº 03042012.

3.2 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO NITRATO TESTE

O nitrato orgânico 12-nitrato-*cis*-9-octadecanoato de etila (NCOE) foi sintetizado e disponibilizado pelo professor Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da UFPB.

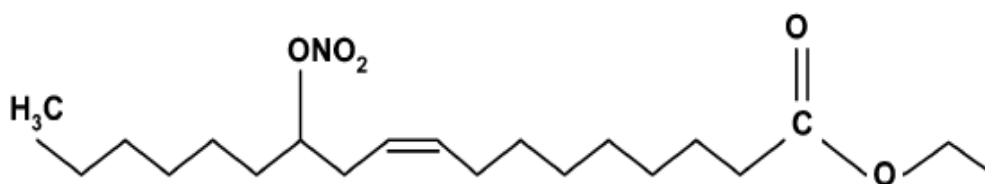


Figura 4 – Estrutura química do 12-nitrato-*cis*-9-octadecanoato de etila (NCOE)

Para a realização dos ensaios farmacológicos *in vitro*, o NCOE foi solubilizado em cremofor e diluído em água destilada ou solução HANK (Quadro 3), nos experimentos com artéria mesentérica e com células musculares lisas de aorta de rato, respectivamente. Para a obtenção das concentrações desejadas para a realização dos protocolos experimentais, concentração de cremofor não ultrapassou 0,03% v/v. Já para os protocolos *in vivo*, o NCOE foi solubilizado em cremofor e

diluído em solução salina. O veículo não promoveu efeito sobre os parâmetros avaliados (dados obtidos em experimentos anteriores em nosso laboratório).

3.3 SUBSTÂNCIAS E MEIOS UTILIZADOS

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes substâncias: sal sódico de heparina, nitroprussiato de sódio (SNP), cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN), cloridrato de acetilcolina (ACh), 2-(4-fenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido sal de potássio (PTIO), L-cisteína, N-acetilcisteína (NAC), proadifeno, cianamida, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ), brometo de tetraetilamônio (TEA), glibenclamida (GLIB), 4-aminopiridina (4-AP), iberiotoxina, 7-aminoactinomicina D (7-AAD), solução penicilina/estreptomicina e anfotericina, diacetato 3,4-diaminofluoresceína (DAF-DA) e solução de tripsina/EDTA, todos foram obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo-SP, Brasil). *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (HIMEDIA®), soro fetal bovino (SFB) (INVITROGEN) e tiopental sódico (Cristália, São Paulo, SP, Brazil).

Todas as substâncias foram dissolvidas em água destilada, exceto o PTIO que foi dissolvido em etanol absoluto, e a GLIB e o ODQ que foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em água destilada, de modo a serem obtidas as concentrações desejadas. A concentração destes solventes orgânicos na cuba foi de até 0,3% e foram desprovidas de efeitos farmacológicos. As soluções foram mantidas de 0 a 4 °C e somente retiradas no momento do experimento.

3.4 SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

Para a preparação das soluções nutritivas foram utilizadas as seguintes substâncias: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl₂), cloreto de magnésio (MgCl₂), glicose (C₆H₁₂O₆), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e fosfato de sódio (NaH₂PO₄). Todos estes sais foram obtidos da VETEC.

Sais	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
Glicose	5,6

Quadro 1 – Composição da solução de Tyrode para artéria mesentérica superior
Fonte: TANAKA et al., 1999

Na solução de Tyrode com 60 mM de KCl, será realizada uma substituição equimolar do Na⁺ pelo K⁺, ajustando isosmoticamente a solução, conforme os quadros abaixo:

Sais	Concentração (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
Glicose	5,6

Quadro 2 – Composição da solução de Tyrode com 60 mM de KCl.
Fonte: adaptada de TANAKA et al., 1999

Sais	Concentração (mM)
NaCl	136,9
KCl	5,4
CaCl ₂	1,3
MgCl ₂	1.0
NaHCO ₃	4,2
NaH ₂ PO ₄	0,3
Glicose	5,0
KH ₂ PO ₄	0,4
MgSO ₄	0,8

Quadro 3 – Composição da solução de HANK

Métodos



4 MÉTODOS

4.1 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS *IN VIVO*

4.1.1 Medida direta da PAM e FC em ratos não anestesiados

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.) e, em seguida, foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica. Uma pequena incisão na região inguinal dos animais foi realizada, separando a musculatura para localização do feixe vasculonervoso, seguido da dissecação e exposição da artéria e veia femorais (Figura 5). Cateteres de polietileno (PE), um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um seguimento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), foram implantados na aorta abdominal e veia cava inferior via artéria e veia femural esquerdas, respectivamente. Após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal.

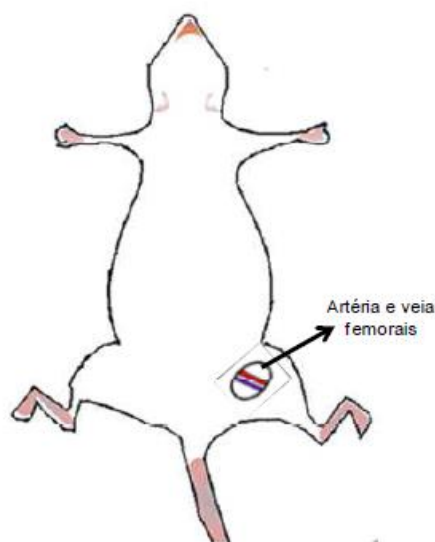


Figura 5 - Representação esquemática dos vasos onde foram implantados os cateteres para o registro dos parâmetros cardiovasculares e administração das drogas. Fonte: QUEIROZ, 2011

Após um período de 24 h, a PAM e FC foram aferidas pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado (BRPL2, World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA), acoplado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, Unit 13, 22 Lexington Drive, BELLA VISTA, NSW, AUSTRALIA) (Figura 6). O software de aquisição e análise de dados foi LabChart versão 5.0. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou a PP, PAM e FC. O cateter venoso foi utilizado para a administração das drogas. Todos os experimentos foram realizados em ratos não anestesiados.



Figura 6 – Sistema de aquisição de dados para medida de PA e FC em ratos não anestesiados
Fonte: QUEIROZ, 2011

4.1.2 Efeito induzido pelo NCOE sobre a PAM e FC de ratos normotensos não anestesiados

Para obtenção de uma curva dose-resposta controle, os animais foram mantidos em aclimatação por um período de, no mínimo, 30 minutos, para estabilização dos parâmetros cardiovasculares. Em seguida, foi administrado SNP (10 µg/kg, i.v.), um doador clássico de NO, para verificar a correta implantação do cateter venoso.

Após o retorno dos parâmetros hemodinâmicos, doses de NCOE (10, 20, 30, 40 e 60 mg/kg i.v.) foram administradas de forma randômica. Cada dose só foi administrada após o retorno da FC e PAM aos valores basais. Os valores de PAM, FC foram computados antes (valores da linha de base) e após a administração do NCOE (Figura 7). As variações foram expressas em porcentagem para cada dose, calculadas por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Resposta PAM (\%)} = \frac{(\text{PAM depois} - \text{PAM antes}) \times 100}{\text{PAM antes}}$$

$$\text{Valores de FC (\%)} = \frac{(\text{FC depois} - \text{FC antes}) \times 100}{\text{FC antes}}$$

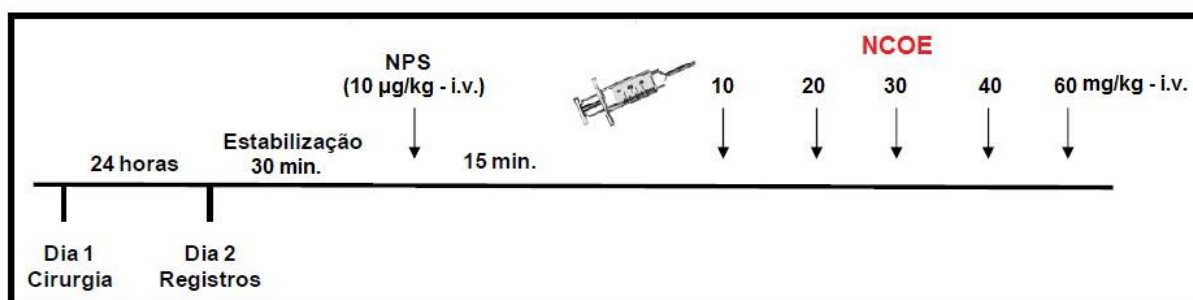


Figura 7 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de NCOE sobre PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados

4.2 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS *IN VITRO*

4.2.1 Ensaios farmacológicos utilizando anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Os animais foram eutanasiados e, por meio de uma incisão no abdômen, a artéria mesentérica superior foi identificada e removida. Após a remoção, a artéria foi imediatamente posta em solução de Tyrode (Quadro 1), para dissecação e secção dos vasos em anéis (1-2 mm de comprimento). A remoção do endotélio foi realizada por atrito mecânico entre as paredes internas do vaso e uma haste de metal (COX et al., 1989). Os anéis livres de tecido conjuntivo e adiposo foram colocados em um sistema de banho para órgãos isolados, em cubas contendo 10 mL de solução de

Tyrode (TANAKA et al., 1999), a 37 °C e gaseificadas com uma mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), para prover um pH relativamente constante entre 7,2 - 7,4 (TEIXEIRA; PRIVIERO; WEBB, 2005). Os anéis foram suspensos por linhas de algodão, fixadas a um transdutor de força (MLT020, ADInstruments, Austrália) (Figura 8).

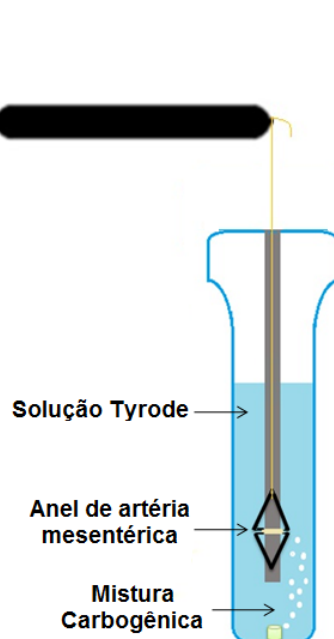


Figura 8 – Representação esquemática da cuba para órgãos isolados
Fonte: MACHADO; ASSIS; FURTADO, 2013

O transdutor, por sua vez, foi acoplado a um sistema de aquisição (ML870/P com LabChart versão 7.0, ADInstruments, Austrália), para o registro das tensões isométricas (Figura 9).

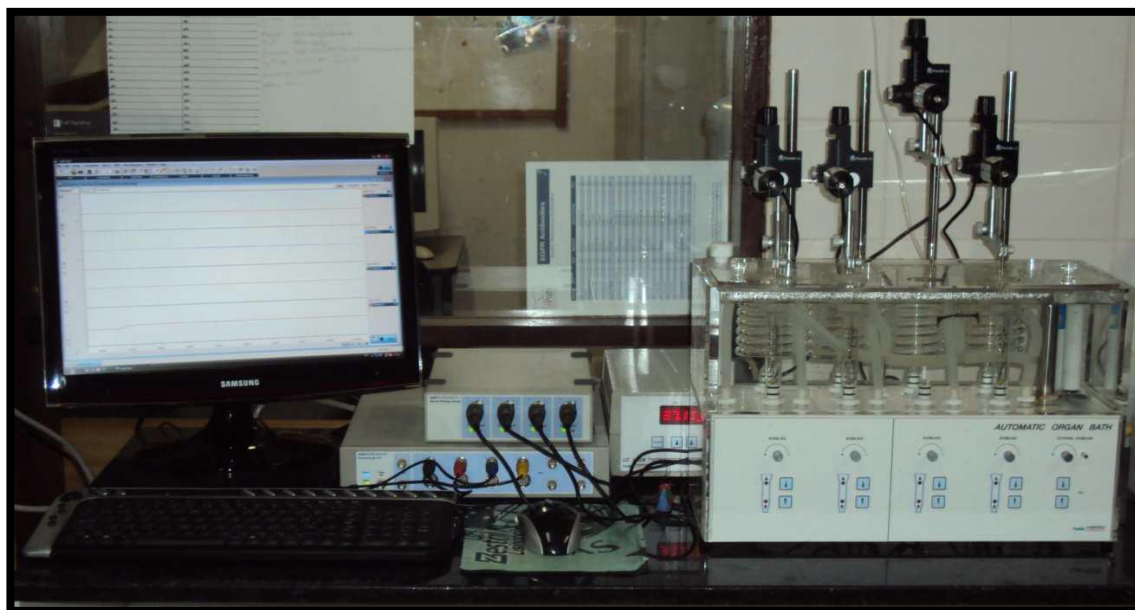


Figura 9 – Sistema de cubas e aquisição de dados de tensão isométrica para órgão isolado
Fonte: QUEIROZ, 2011

Cada anel foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de estabilização de 60 minutos. Durante este tempo, o meio nutritivo (solução Tyrode) foi trocado a cada 15 minutos para prevenir a produção de metabólitos indesejáveis (ALTURA; ALTURA, 1970).

4.2.1.1 Protocolos experimentais para as preparações com anéis de artéria mesentérica superior de rato

Para a realização de todos os protocolos experimentais, após o período de estabilização de 60 minutos, foi obtida uma contração com FEN (10 μ M), um agonista dos receptores α_1 -adrenérgicos (BYLUND, 1992; BÜSCHER et al., 1999), encontrados no músculo liso vascular, com a finalidade de verificar a viabilidade do tecido. No componente tônico desta contração, a ACh (10 μ M), um agonista dos receptores muscarínicos, expressos no endotélio vascular, foi adicionada à cuba com o intuito de avaliar a integridade destas células (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

Os anéis que apresentaram relaxamento superior a 90% sobre a pré-contracção com FEN, foram considerados anéis com endotélio funcional (Figura 10A), já os anéis com relaxamentos inferiores a 10% foram considerados anéis sem endotélio vascular (Figura 10B) (TOLVANEN et al., 1998).

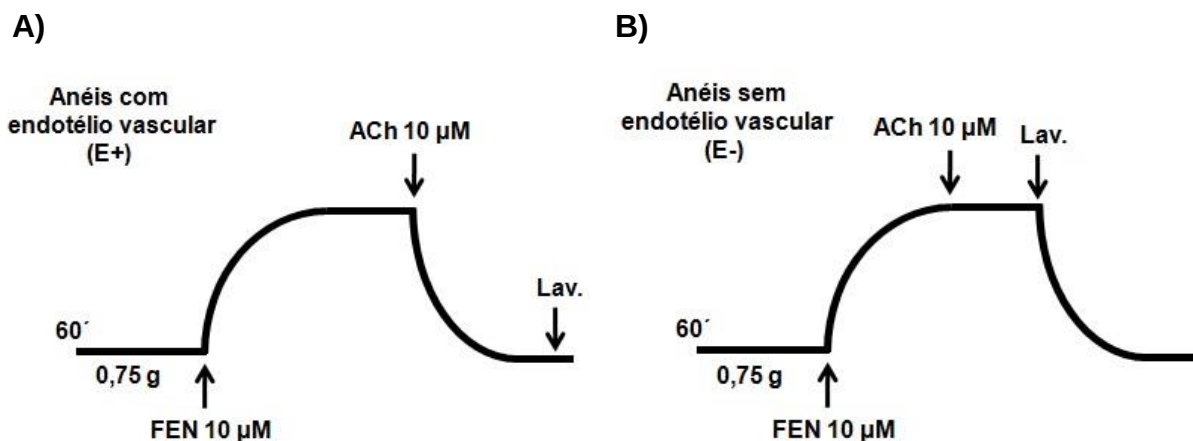
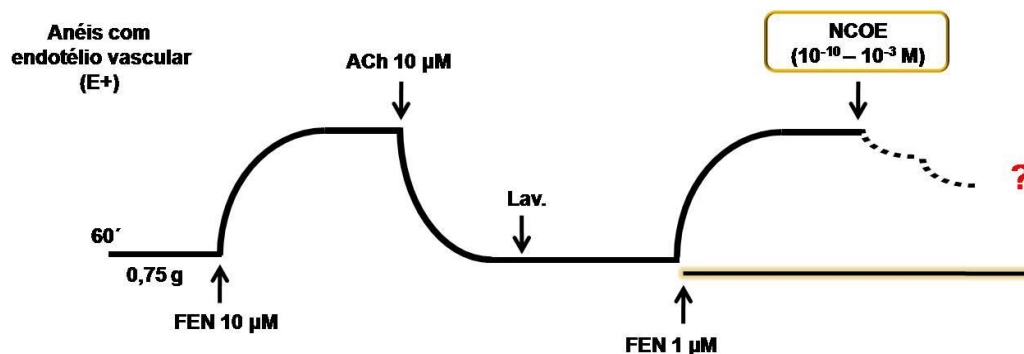


Figura 10 – Representação da verificação da viabilidade do órgão e da integridade do endotélio vascular. A) Presença do endotélio e B) Ausência do endotélio funcional

4.2.1.2 Avaliação do efeito vasorrelaxante do NCOE em anéis de artéria mesentérica pré-contráídos com FEN

Após a verificação da viabilidade do órgão e da presença ou ausência do endotélio (item 4.2.1.1) as preparações foram submetidas a trocas do meio nutritivo até que a tensão do órgão retornasse aos valores de base (0,75 g). O tempo gasto para este processo era de aproximadamente 30 minutos. Logo após este período, foi induzida uma segunda contração com concentração submáxima de (1 µM) FEN. No componente tônico desta segunda contração, concentrações crescentes do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) foram adicionadas à preparação, de maneira cumulativa, para a obtenção de uma curva concentração-resposta. O efeito vasorrelaxante do composto foi avaliado em anéis com o endotélio intacto e anéis desprovidos de endotélio funcional (Figura 11).

A)



B)

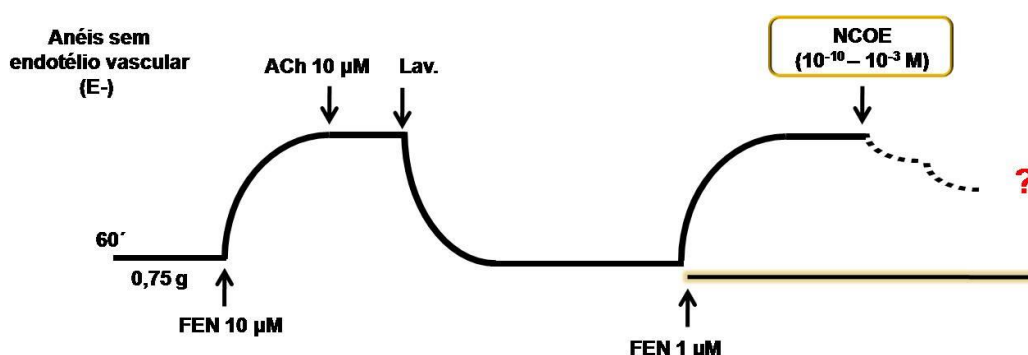


Figura 11 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, pré-contráidos com FEN (1 µM). A) Anéis com endotélio intacto; B) Anéis sem endotélio

A porcentagem de relaxamento induzida pelo NCOE foi calculada pela comparação da resposta antes e após a adição do composto, considerando-se que: a tensão desenvolvida por FEN (1 µM) equivale a 0% de relaxamento; e a tensão de repouso equivale a 100% de relaxamento. A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento em relação à contração produzida pela FEN (1 µM). A eficácia e a potência do vasorrelaxamento induzido pelo composto foi avaliada por meio dos valores de efeito máximo ($E_{máx}$) e de logaritmo negativo da concentração responsável por 50% do $E_{máx}$ (pD_2), respectivamente.

4.2.1.3 Investigação do efeito do NCOE em anéis de artéria mesentérica sobre o tônus vascular intrínseco

Após a verificação da presença ou ausência do endotélio vascular como descrito no item 4.2.1.1, as preparações foram lavadas com solução Tyrode até atingirem o tônus basal. A partir deste ponto, concentrações crescentes de NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) foram adicionadas às preparações tanto na ausência como na presença do endotélio, ambos no tônus basal, com a finalidade de avaliar o efeito de NCOE sobre o tônus muscular espontâneo (Figura 12).

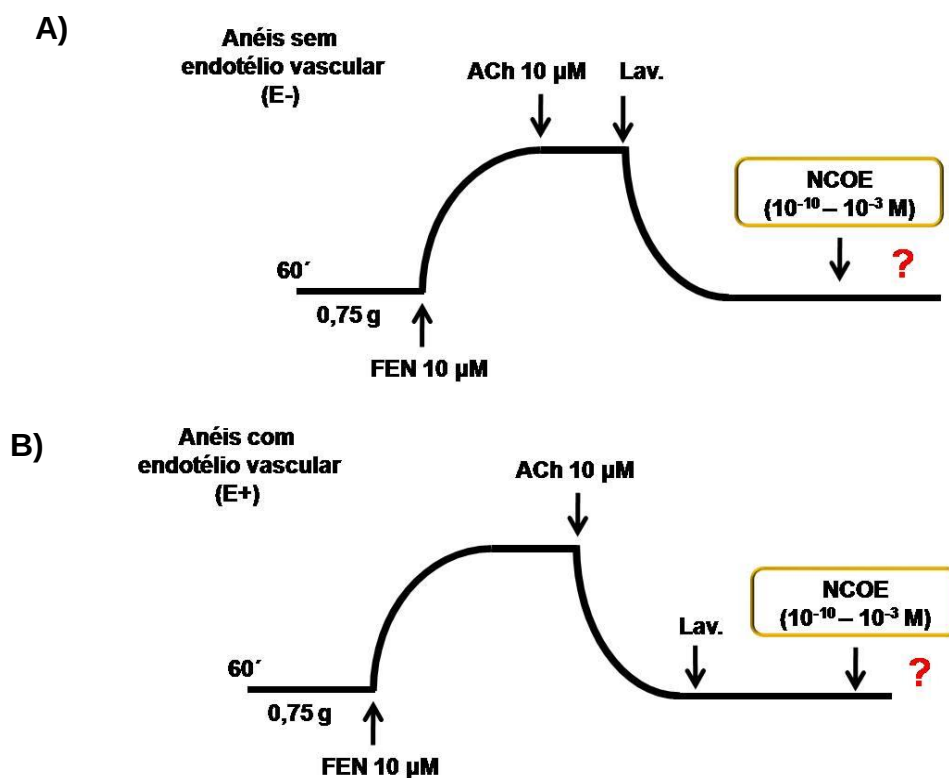


Figura 12 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, sobre o tônus intrínseco vascular. A) Anéis com endotélio intacto; B) Anéis sem endotélio

4.2.1.4 Investigação do efeito vasorrelaxante do NCOE em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com solução despolarizante de 60 mM de KCl

Para investigar a resposta vasorrelaxante do NCOE sobre a contração induzida por um agente despolarizante, foi utilizada uma solução com 60 mM de KCl

(Quadro 2). O Tyrode, modificado com 60 mM de KCl, promove uma despolarização da membrana plasmática, levando à ativação dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v) e, conseqüentemente, à contração do músculo liso vascular (CHEN; REMBOLD, 1995; KRAVTSOV et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006).

Após a verificação da remoção do endotélio funcional (item 4.2.1.1), e um período de estabilização de aproximadamente 30 minutos, a solução de Tyrode normal foi substituída por uma solução de Tyrode com 60 mM de KCl. No componente tônico da contração promovida por este agente, foram adicionadas concentrações crescentes do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M), de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta (Figura 13). A potência e eficácia do vasorrelaxamento do NCOE foram avaliadas por meio dos valores de pD_2 e $E_{\text{máx}}$, respectivamente.

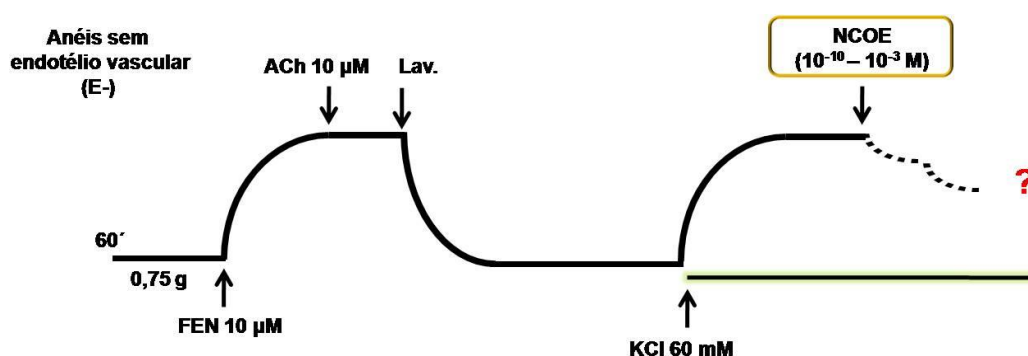


Figura 13 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na ausência de endotélio, pré-contraídos com solução despolarizante de KCl 60 mM

4.2.1.5 Investigação da liberação do NO na resposta vasorrelaxante induzido pelo NCOE em anéis de artéria mesentérica

Com o objetivo de investigar se a resposta vasorrelaxante do NCOE envolve a liberação do NO, foram utilizados diferentes ferramentas farmacológicas, como: PTIO (300 μM), um sequestrador de NO na forma radicalar ($\text{NO}^\bullet$) (CHAUHAN et al., 2002; CHALUPSKY et al., 2004); L-cisteína (3 mM), um tiol que atua como um sequestrador seletivo do NO^- , a forma reduzida do NO (IRVINE; FAVALORO; KEMP-HARPER, 2003; IRVINE et al., 2007; ANDREWS et al., 2009); NAC (3 mM), um tiol

que atua como um sequestrador de radicais livres intracelulares (ZAFARULLAH et al., 2003; PECHÁNOVÁ et al., 2006; AWAD et al., 2010); cianamida (1 mM), um inibidor da enzima mtALDH (CHEN et al., 2007; CHEN; ZHANG; STAMLER, 2002) e proadifeno (10 μ M), um inibidor da enzima citocromo P450 (VETROVSKY et al., 2002; BERANOVA et al., 2005).

Após o período de estabilização e verificação da remoção do endotélio funcional (item 4.2.1.1), as ferramentas farmacológicas foram adicionadas, individualmente, aos anéis e incubadas durante 30 minutos, exceto o NAC, que foi incubado por 120 minutos. Em seguida, foi induzida uma nova contração de FEN (1 μ M) e após 60 minutos, foram adicionadas concentrações crescentes do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M), de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta (Figura 14). A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento em relação à contração produzida pela FEN. A potência e eficácia do vasorrelaxamento do NCOE foram avaliadas por meio dos valores de pD_2 e $E_{máx}$, respectivamente.

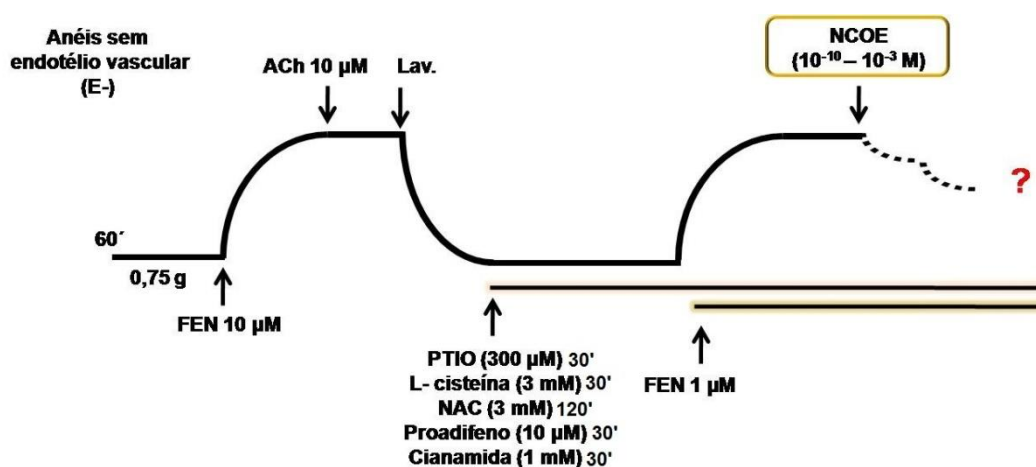


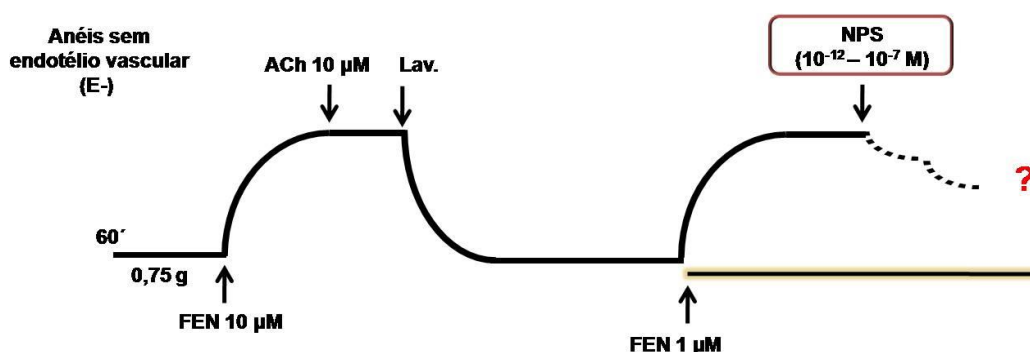
Figura 14 – Representação esquemática do protocolo para investigar o efeito vasorrelaxante de concentrações crescentes do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M), em anéis com endotélio funcional removido e pré-contraídos com FEN (1 μ M), na presença de diferentes ferramentas farmacológicas, incubados individualmente

4.2.1.6 Avaliação da participação da mtALDH no vasorrelaxamento induzido pelo SNP

Com o objetivo de avaliar a participação da enzima mtALDH, no efeito vasorrelaxante do SNP, as preparações foram incubadas na presença e na ausência

do inibidor desta enzima, cianamida (1 mM), durante 30 minutos, após o período de estabilização e verificação da remoção do endotélio funcional (item 4.2.1.1). Decorridos 30 minutos, as preparações foram submetidas a uma segunda contração com FEN (1 μ M) e no componente tônico desta contração adicionou SNP (10^{-12} – 10^{-7} M), cumulativamente (Figura 15). A potência e a eficácia do vasorrelaxante do NCOE foram avaliadas por meio de comparação dos valores de pD_2 e $E_{m\acute{a}x}$, respectivamente, na presença e na ausência da cianamida.

A)



B)

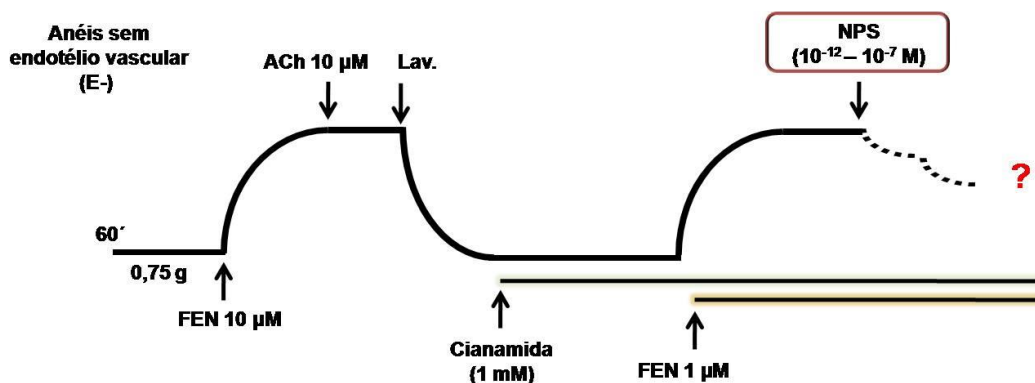
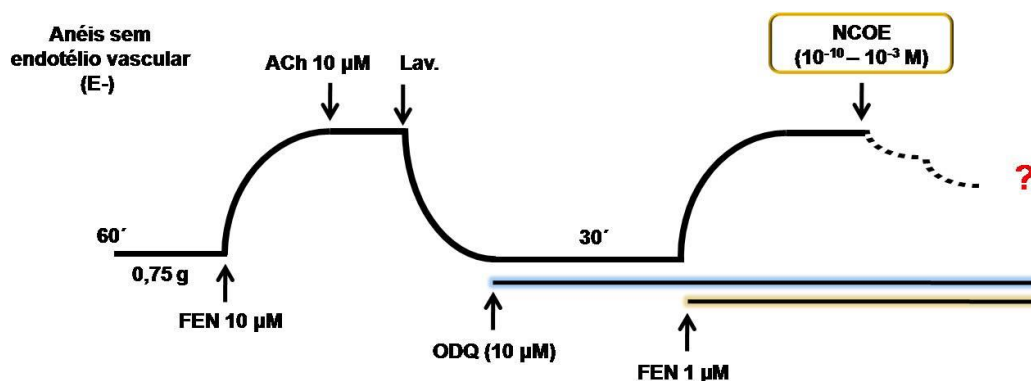


Figura 15 – Representação esquemática do protocolo para investigar o efeito vasorrelaxante de concentrações crescentes do SNP (10^{-12} – 10^{-7} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio vascular, pré-contráídos com FEN (1 μ M), A) na ausência e B) na presença da cianamida (1 mM)

4.2.1.7 Investigação do envolvimento da via NO-sGC no efeito vasorrelaxante do NCOE

Com a finalidade de investigar a participação da via NO-sGC na resposta vasorrelaxante promovida pelo NCOE, foi utilizado o ODQ (10 μ M), um potente inibidor da sGC (GARTHWAITE et al., 1995; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007; FAVALORO; KEMP-HARPER, 2009).

Após o período de estabilização e verificação da remoção do endotélio funcional (item 4.2.1.1), o ODQ foi adicionado aos anéis. Após 30 minutos de incubação, foi induzida uma nova contração de FEN (1 μ M), com duração de 60 minutos, seguida da adição de concentrações crescentes do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M), de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta (Figura 16). A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento em relação à contração produzida pela FEN. A potência e eficácia do vasorrelaxamento do NCOE foram avaliadas por meio dos valores de pD_2 e $E_{m\acute{a}x}$, respectivamente.



Esquema 16 – Representação esquemática do protocolo para investigar o efeito vasorrelaxante de concentrações crescentes do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio vascular, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na presença do ODQ (10 μ M)

4.2.1.8 Avaliação da participação de canais para potássio (K^+) na resposta vasorrelaxante induzida por NCOE em anéis de artéria mesentérica

Para investigar a participação dos canais para K^+ no efeito vasorrelaxante induzido pelo NCOE utilizou-se o TEA (3 mM), que nesta concentração atua como

um bloqueador inespecífico de canais para K^+ (WANG et al., 2008; SILVA et al., 2011). Também foi avaliada a participação dos subtipos de canais para K^+ na resposta vasorrelaxante do NCOE, para isso foram utilizados os seguintes bloqueadores: iberiotoxina (100 nM), um bloqueador seletivo dos canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} de grande condutância (BK_{Ca}) (BYCHKOV et al., 1998); 4-AP (1 mM), bloqueador dos canais para K^+ sensíveis a voltagem (K_V) (OKABE et al., 1987); e GLIB (10 μ M), um bloqueador dos canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (XU; LEE, 1994; FAROUQUE; OMAR; MEREDITH, 2003).

Após o período de estabilização e verificação da remoção do endotélio funcional (item 4.2.1.1), foram adicionados os bloqueadores: TEA (3 mM), iberiotoxina (100 nM), 4-AP (1 mM), GLIB (10 μ M). Após 30 minutos, foi induzida uma nova contração com FEN (1 μ M). Em seguida, foram adicionadas concentrações crescentes do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M), de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta (Figura 17). A potência e eficácia do efeito vasorrelaxante do NCOE foram avaliadas por meio dos valores de pD_2 e $E_{m\acute{a}x}$, respectivamente.

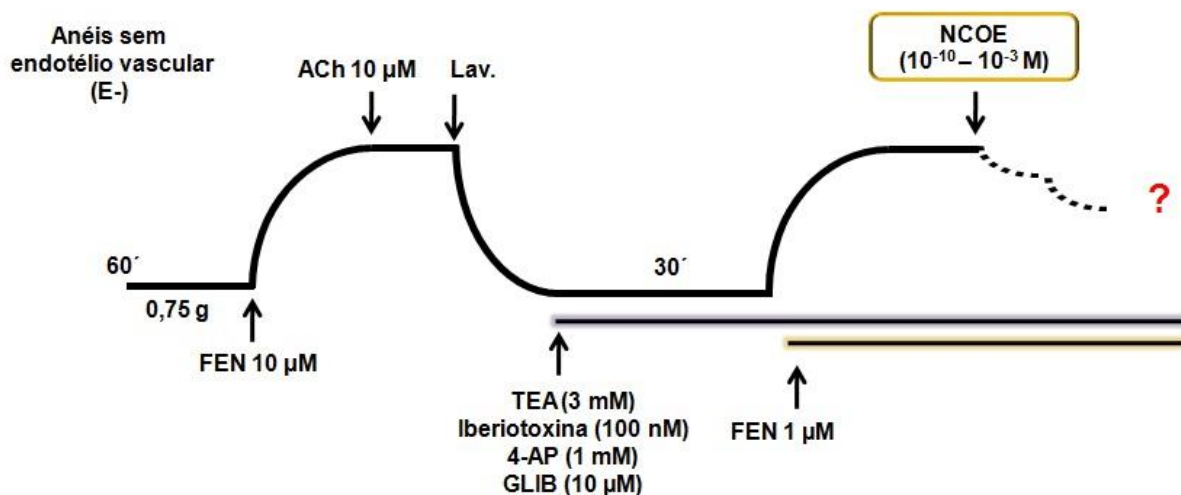


Figura 17 – Representação esquemática do protocolo para investigar o efeito vasodilatador de concentrações crescentes do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato sem endotélio vascular, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na presença do TEA (3 mM), iberiotoxina (100 nM); 4-AP (1 mM); e GLIB (10 μ M)

4.2.2 Dosagem de NO por citometria de fluxo

4.2.2.1 Cultura de células musculares lisas vasculares de aorta de rato

A extração das células musculares lisas vasculares foi realizada a partir da técnica de explantes (KIRSCHENLOHR; METCALFE; GRAINGER, 1996). Inicialmente, os animais foram eutanasiados por dose letal (500 mg/kg de xilasina) de anestésico, em seguida, foi realizada toracotomia e a aorta foi localizada e isolada. Um segmento de aproximadamente 3 cm da aorta torácica foi coletado e transferido para um tubo de 15 mL contendo solução de HANK estéril com antibióticos (penicilina/estreptomicina) e antifúngico (anfotericina B). Todos os passos seguintes foram realizados na câmara de fluxo laminar sob condições assépticas.

Com auxílio de um bisturi a camada adventícia foi removida e o vaso foi seccionado em sentido longitudinal. Em seguida, o endotélio foi removido por raspagem. Após a remoção do endotélio, a aorta foi seccionada em fragmentos de aproximadamente 1 mm² (explantes). Os fragmentos foram posicionados com a parte interna voltada para baixo, no assoalho de poços de placa para cultura de células, pré-tratadas com inibidor do crescimento de fibroblasto. Sobre cada fragmento foi depositado 50 µL do meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ e 37°C e umidade de 90%. O meio DMEN mais SFB (20%) foi renovado a cada 48 horas.

A migração das células musculares lisas vasculares ocorreu entre o sétimo e décimo dia de cultura. Após 30% de ocupação da placa com miócitos, os explantes foram retirados. Quando atingido a confluência de 90%, as células foram dispersas por tratamento com solução tripisina (0,5%)/ EDTA (0,02%), durante 4 minutos em estufa de CO₂. A suspensão obtida foi coletada e centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se DMEM suplementado com SFB (20%) mais antibióticos ao "pellet". Em seguida, as células foram distribuídas em novas placas de cultura celular (primeira passagem) (KIRSCHENLOHR; METCALFE; GRAINGER, 1996), sendo utilizadas células até a sexta passagem.

4.2.2.2 Viabilidade Celular

Os miócitos em confluência (80%) foram soltos por tripsinização e suspensos em DMEM suplementado com SFB (20%), o qual foi centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em solução de HANK-BSA. Uma alíquota foi destinada ao teste de viabilidade celular com 7-aminoactinomicina D (7-AAD) por citometria de fluxo.

As células foram incubadas com 7-AAD (5 μ L para cada 10^6 células) durante 10 minutos a 37°C e no abrigo da luz. Logo após, as análises citofluorográficas foram realizadas em um FACS Canto II da Becton–Dickinson (San Jose, CA, USA) equipado com laser de argônio emitindo feixe de 488 nm. A fluorescência do 7-AAD foi obtida no canal de Per-CP (intervalo de comprimento de onda emitida detectável é de 670 a 735 nm) do equipamento. A média da intensidade de fluorescência emitida foi medida pelo software DIVA versão 4.0 (Becton-Dickson, San Jose, CA, USA). As células também foram analisadas na presença do NCOE, que foi incubado por 20 minutos a 37°C após a adição do 7-AAD (SCHMID et al., 1992).

4.2.2.3 Dosagem de NO em miócitos de artéria aorta

As análises citofluorográficas foram realizadas em um FACS Canto II da Becton–Dickinson (San Jose, CA, USA) equipado com laser de argônio emitindo feixe de 488 nm. Inicialmente, 10^6 células/mL foram analisadas no citômetro na ausência de sondas fluorescentes e drogas (células não marcadas), com o intuito de observar os parâmetros citométricos e autofluorescência celular. Em seguida, as células foram incubadas com a sonda específica para NO, DAF-DA (diacetato 3,4-diaminofluoresceína, 10 μ M) durante 30 minutos e logo depois analisadas. Em outras alíquotas, o veículo, SNP (10 μ M) ou NCOE (100 μ M) foram adicionados às células carregadas com DAF-DA (10^6 células/mL). Após o tratamento de 30 minutos, as amostras foram analisadas isoladamente.

A aquisição para cada amostra foi de 10000 células em fluxo hidrodinâmico e a média da intensidade de fluorescência emitida (obtida em canal FITC, cujo intervalo de comprimento de onda é de 515 a 545 nm) foi medida pelo software

DIVA versão 4.0 (Becton-Dickson, San Jose, CA, USA). Os dados foram expressos na forma de Δ de porcentagem de fluorescência, normalizados pela fluorescência emitida pelo DAF na presença do veículo. Para tanto, a fluorescência obtida na presença de DAF mais veículo foi denominada controle e aquela obtida na presença de DAF mais droga (NCOE ou SNP) foi denominada tratada, de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta\% \text{ Fluorescência} = \frac{(\text{TRATADA} - \text{CONTROLE}) \times 100}{\text{CONTROLE}}$$

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m). As comparações estatísticas entre duas variáveis foram realizadas por meio da utilização do teste *t* de Student não pareado. Para as análises de mais de duas variáveis foi utilizado o teste ANOVA *one way*, seguida do pós-teste de Bonferroni. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando o $p < 0,05$.

Nas curvas concentração-resposta, os valores de $E_{\text{máx}}$ (efeito máximo em porcentagem de relaxamento) e de pD_2 (logaritmo negativo da concentração responsável por 50% do $E_{\text{máx}}$) foram obtidas por regressão não linear. Os dados foram analisados e plotados no programa estatístico GraphPad Prism 5.0[®].

Resultados



5 RESULTADOS

5.1 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS *IN VIVO*

5.1.1 Efeito induzido pelo NCOE sobre a PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados

Após o período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares, a administração *in bolus* e de maneira randômica do NCOE (10; 20; 30; 40 e 60 mg/kg) promoveu hipotensão ($-2,49 \pm 0,86$; $-3,88 \pm 0,71$; $-31,09 \pm 6,59$; $-40,58 \pm 3,97$ e $-50,39 \pm 3,54\%$, respectivamente) e bradicardia transientes ($-5,56 \pm 0,93$; $-8,95 \pm 1,04$; $-57,2 \pm 8,87$; $-70,95 \pm 5,27$ e $-77,90 \pm 2,66\%$, respectivamente). Este efeito, apresentado pelo nitrato, foi de maneira dependente de dose em ratos normotensos não anestesiados. O veículo (cremofor + salina) foi administrado e não promoveu alterações sobre PAM e FC (Figura 18; Gráfico 1).

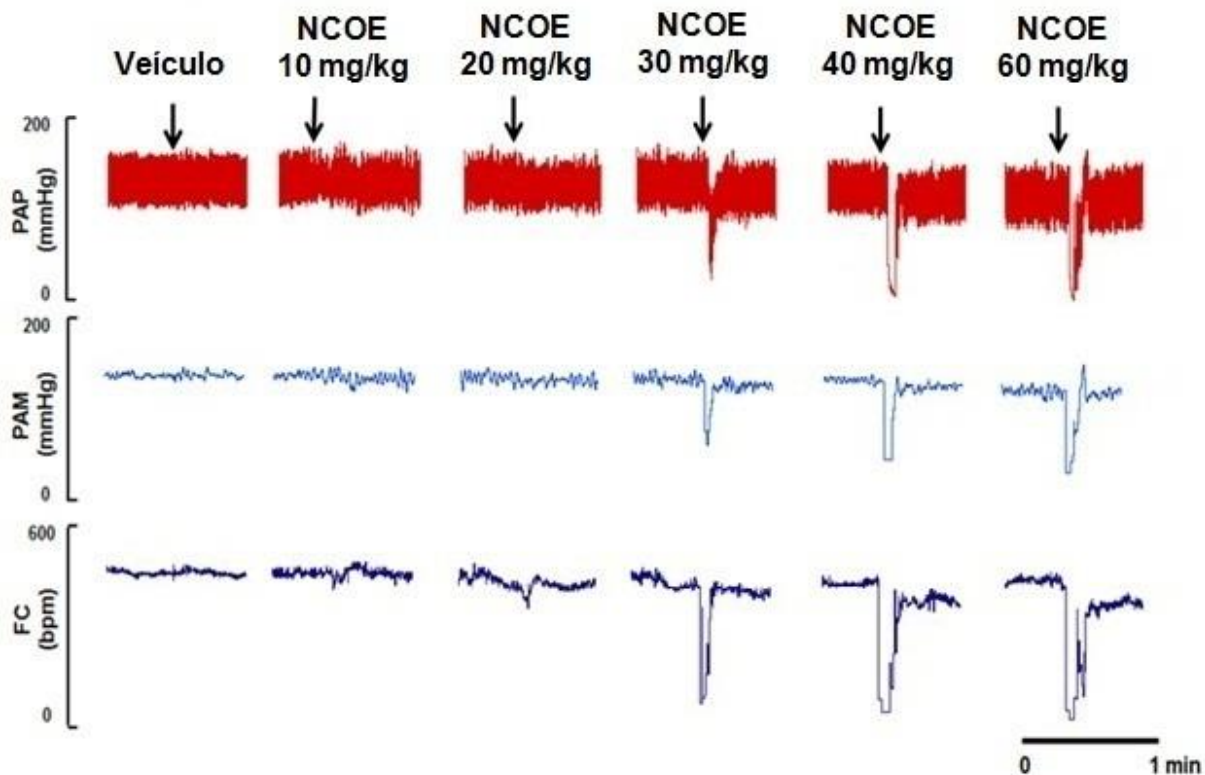


Figura 18 – Registro original representativo ilustrando o efeito do veículo ou de doses crescentes de NCOE (10; 20; 30; 40 e 60 mg/kg) sobre: A) pressão de pulso (PP) B) pressão arterial média (PAM) e C) frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos não anestesiados

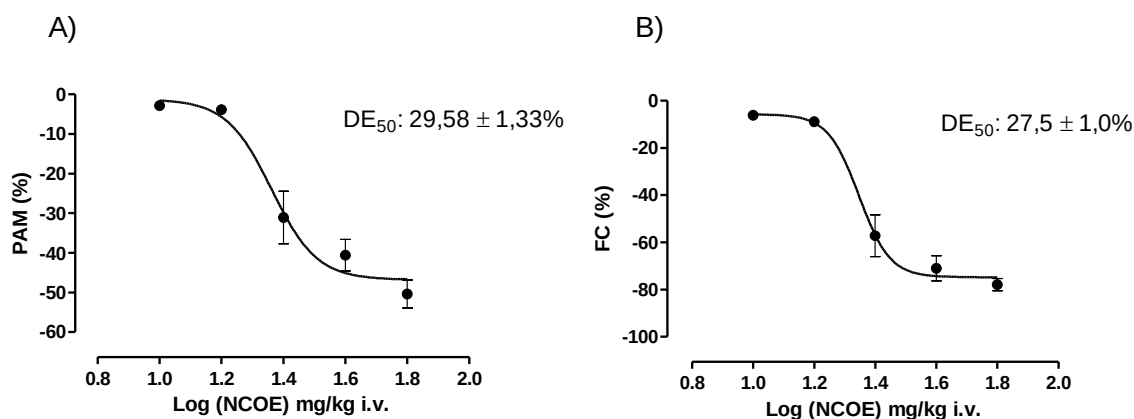


Gráfico 1 – Efeitos de NCOE (10, 20, 30, 40 e 60 mg/kg i.v.) sobre: A) PAM (%), B) FC (%) em ratos normotensos não anestesiados (n = 10). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m.

5.2 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS *IN VITRO*

5.2.1 Influência do endotélio sobre o efeito vasorrelaxante induzido pelo NCOE

Após o período de estabilização (60 minutos) da contração de FEN ($1 \mu\text{M}$) foi adicionado concentrações crescentes do NCOE, de maneira cumulativa (10^{-10} - 10^{-3} M). Este nitrato promoveu um vasorrelaxamento, em anéis com endotélio intacto ($E_{\text{máx}} = 107,1 \pm 4,43\%$; $pD_2 = 5,95 \pm 0,06$; e $n = 8$), de maneira dependente de concentração. A remoção mecânica do endotélio não alterou a resposta relaxante induzida pelo nitrato, como demonstrado pelos valores de $E_{\text{máx}}$ e pD_2 ($118,0 \pm 3,5\%$; $5,90 \pm 0,05$, respectivamente; $n = 9$) (Figura 19; Gráfico 2).

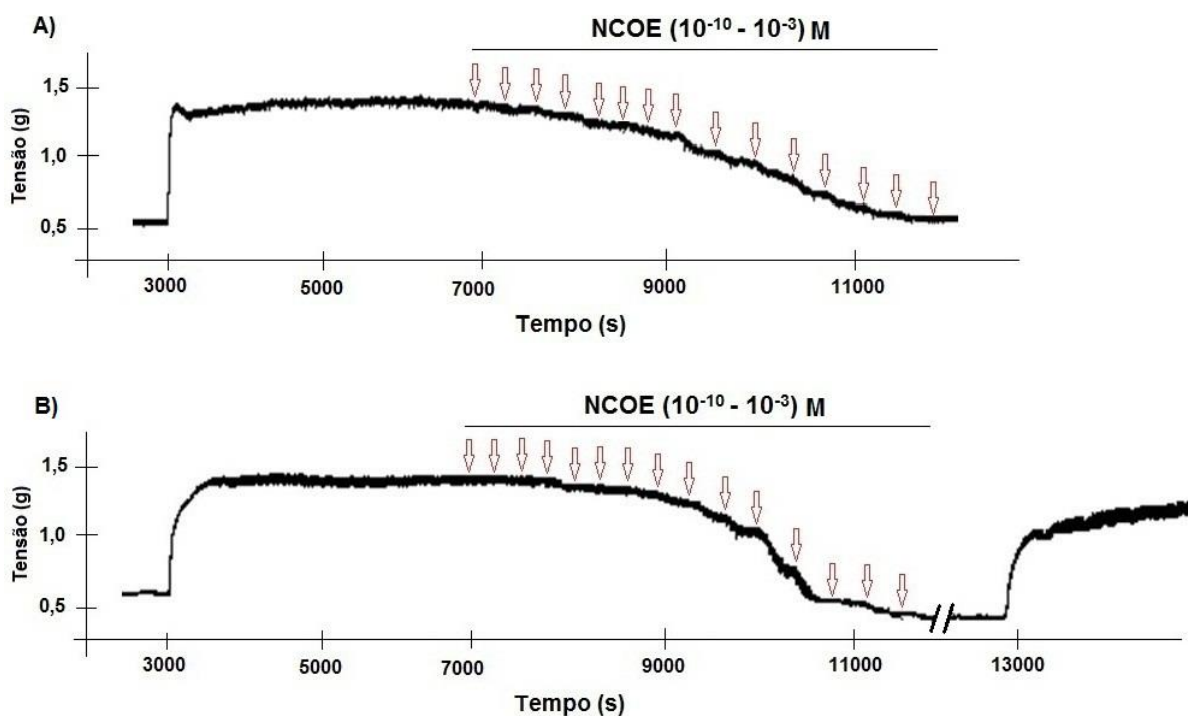


Figura 19 – Registros originais representativos das respostas do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis pré-contraídos com FEN ($1 \mu\text{M}$), na presença (A) ou ausência (B) do endotélio

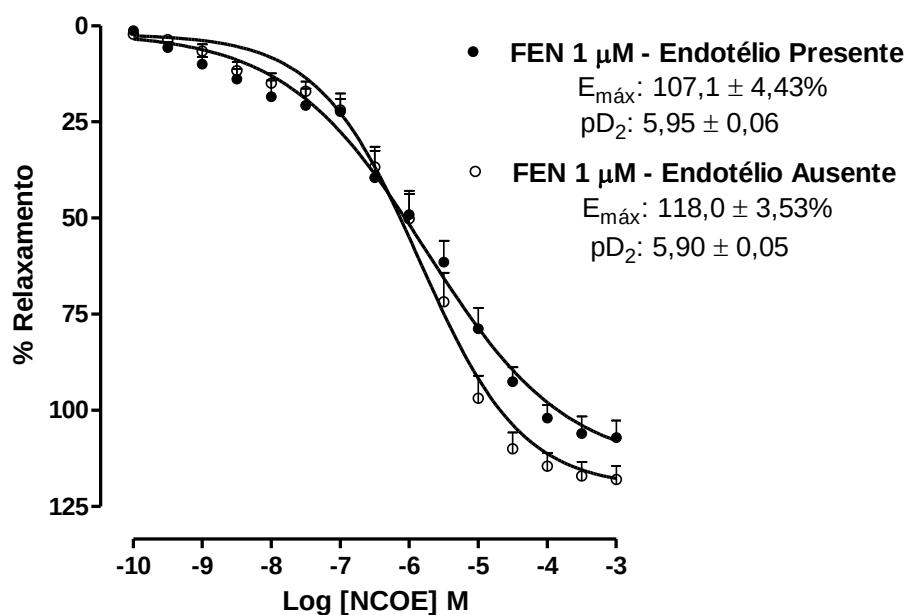


Gráfico 2 – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, na presença (●) ou ausência (○) do endotélio, pré-contraídos com FEN ($1 \mu\text{M}$) ($n = 8$ e 9 , respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m.

O tempo necessário para que fossem obtidas as respostas máximas nas primeiras concentrações (10^{-10} – 10^{-7} M) foi de 4 minutos. O intervalo necessário

para adição das outras concentrações (3×10^{-7} – 10^{-3} M) foi de 6 minutos. O tempo total de relaxamento máximo foi de aproximadamente 76 minutos (Figura 19). Após a aplicação da última concentração, foram realizadas lavagens sucessivas durante 40 minutos. Em seguida, os anéis responderam a uma nova adição de FEN ($1 \mu\text{M}$), com magnitude semelhante à observada na investigação da viabilidade do endotélio vascular.

5.2.2 Efeito do NCOE em anéis de artéria mesentérica isolada de rato sobre o tônus intrínseco vascular

A administração cumulativa do NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M), nas preparações de anéis com endotélio intacto ou em anéis com endotélio ausente, não promoveu alteração sobre o tônus muscular espontâneo (Gráfico 3).

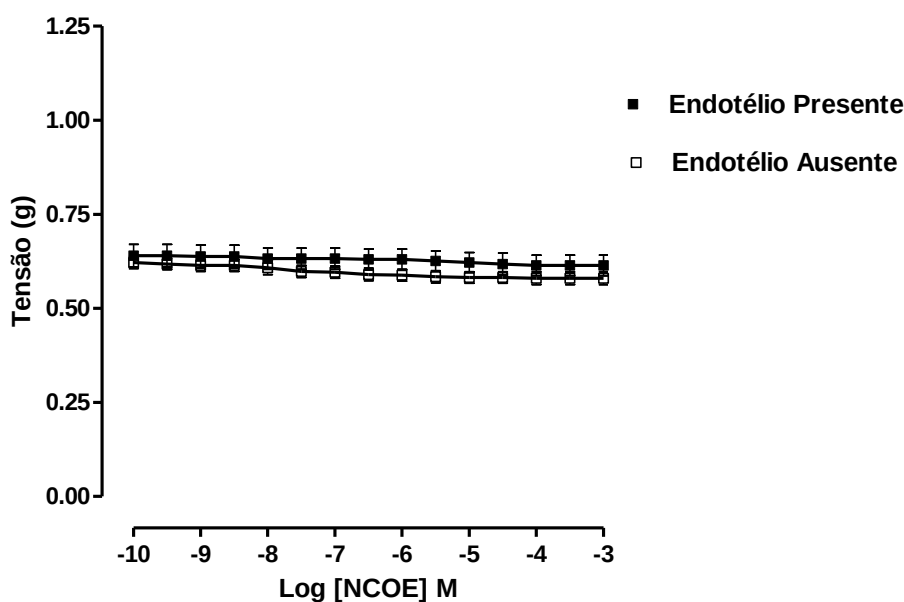


Gráfico 3 – Efeito de NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M) sobre o tônus basal em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos com endotélio intacto (■) ou endotélio ausente (□), (n= 6). Os valores foram expressos como média ± e.p.m.

Para investigar o mecanismo de ação envolvido no efeito vasorrelaxante do NCOE, em todos os experimentos subsequentes foram utilizados anéis na ausência do endotélio vascular.

5.2.3 Efeito do NCOE em anéis de artéria mesentérica pré-contráídos com solução despolarizante de 60 mM de KCl

Em anéis mesentéricos, na ausência do endotélio vascular, pré-contráídos com uma solução despolarizante de 60 mM de KCl, a resposta vasorrelaxante produzida pela adição cumulativa do NCOE foi atenuada significativamente ($E_{\text{máx}} = 92,1 \pm 4,1\%$, $n = 7$, $p < 0,05$), quando comparada ao efeito deste nitrato sobre anéis pré-contráídos com FEN ($E_{\text{máx}} = 118,0 \pm 3,5\%$; $n = 9$) (Gráfico 4).

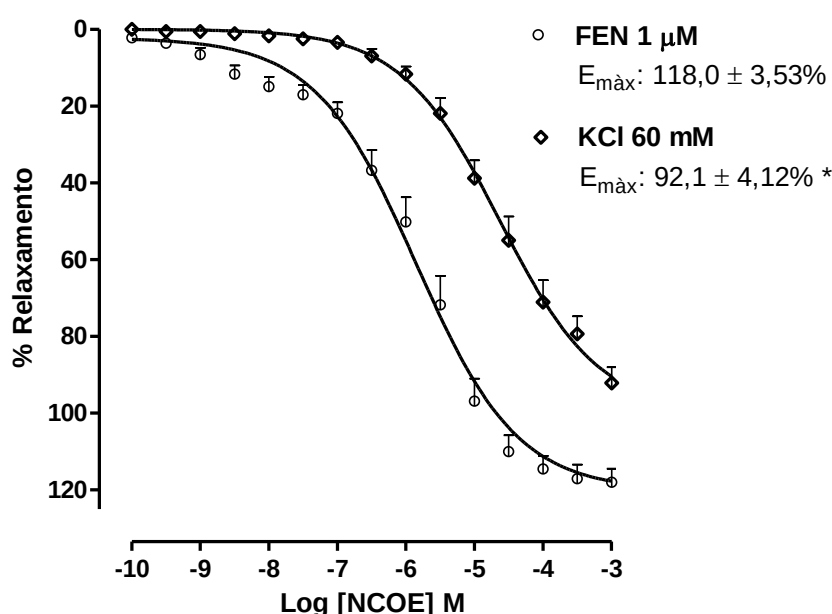


Gráfico 4 – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contráídos com FEN (1 µM) (○) ou pré-contráídos com KCl 60 mM (◊) ($n = 9$ e 7 , respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$

5.2.4 Investigação da via de produção do NO na resposta vasorrelaxante induzida pelo NCOE

5.2.4.1 Participação do NO na forma radicalar ($\text{NO}^\bullet$) no efeito vasorrelaxante induzido pelo NCOE

O tratamento prévio dos anéis mesentéricos com um sequestrador intracelular de NO na forma radicalar, o PTIO (300 µM) (CHAUHAN et al., 2002;

CHALUPSKY et al., 2004), atenuou a resposta vasorrelaxante do NCOE, com redução da potência ($pD_2 = 5,10 \pm 0,05$, $p < 0,05$) e sem alteração do efeito máximo ($E_{m\acute{a}x} = 113 \pm 3,35\%$, $n = 6$), quando comparadas com o controle ($E_{m\acute{a}x} = 118 \pm 3,53\%$; $pD_2 = 5,90 \pm 0,05$, $n = 9$) (Gráfico 5).

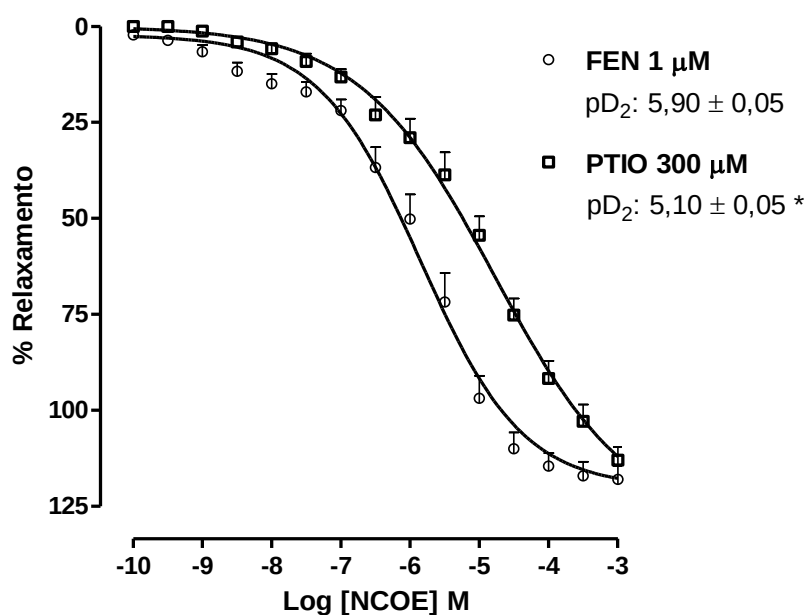


Gráfico 5 – Curvas concentração-resposta para o efeito vasorrelaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, sem endotélio, pré-contráidos com FEN (1 μ M), na ausência ($\circ$) e na presença de PTIO 300 μ M ($\square$), ($n = 9$ e 6 , respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$

5.2.4.2 Avaliação da participação do NO na forma reduzida (NO^-) na resposta vasorrelaxante induzida pelo NCOE

Quando os anéis foram incubados com L-cisteína (3 mM), um sequestrador seletivo do NO^- (IRVINE; FAVALORO; KEMP-HARPER, 2003; IRVINE et al., 2007; ANDREWS et al., 2009), não houve diferença no efeito máximo do NCOE ($E_{m\acute{a}x} = 120,6 \pm 4,18\%$; $n = 9$). Entretanto, a resposta vasodilatadora deste nitrato orgânico foi potencializada de maneira significativa ($pD_2 = 6,34 \pm 0,03$; $p < 0,05$), quando comparado ao controle ($pD_2 = 5,90 \pm 0,05$) (Gráfico 6).

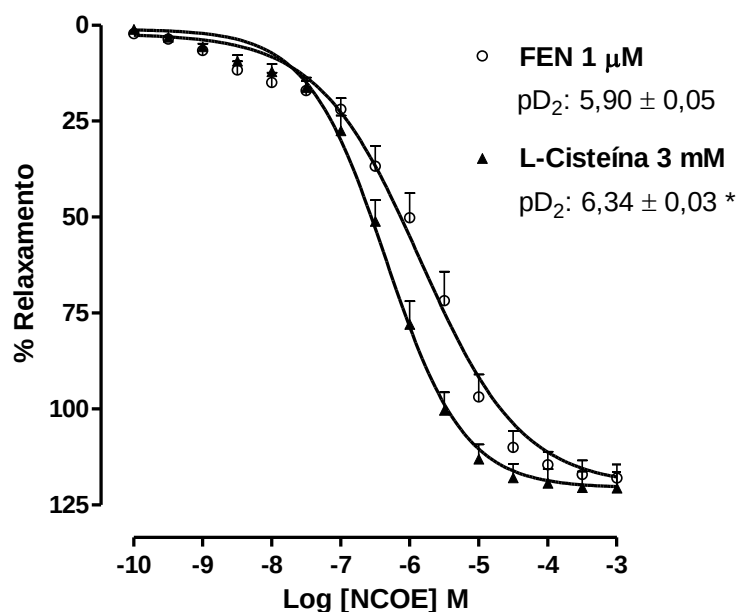


Gráfico 6 – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M) em anéis da artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 µM), na ausência (○) e na presença de L-cisteína 3 mM (▲), (n = 9 e 9, respectivamente). Os valores foram expressos como média ± e.p.m. *p < 0,05

5.2.4.3 Participação dos radicais livres intracelulares no vasorrelaxante induzido pelo NCOE

Na presença de 3 mM do NAC, um sequestrador de radicais livres intracelulares (ZAFARULLAH et al., 2003; PECHÁNOVÁ et al., 2006; AWAD et al., 2010), o efeito relaxante induzido por concentrações crescentes do NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M), foi potencializado, com o deslocamento da curva para esquerda ($pD_2 = 6,56 \pm 0,05$, $p < 0,05$) e sem alteração do efeito máximo ($E_{m\acute{a}x} = 124,5 \pm 2,9\%$), quando comparada com o controle ($E_{m\acute{a}x} = 118,0 \pm 3,53\%$ e $pD_2 = 5,90 \pm 0,05$; n = 7) (Gráfico 7).

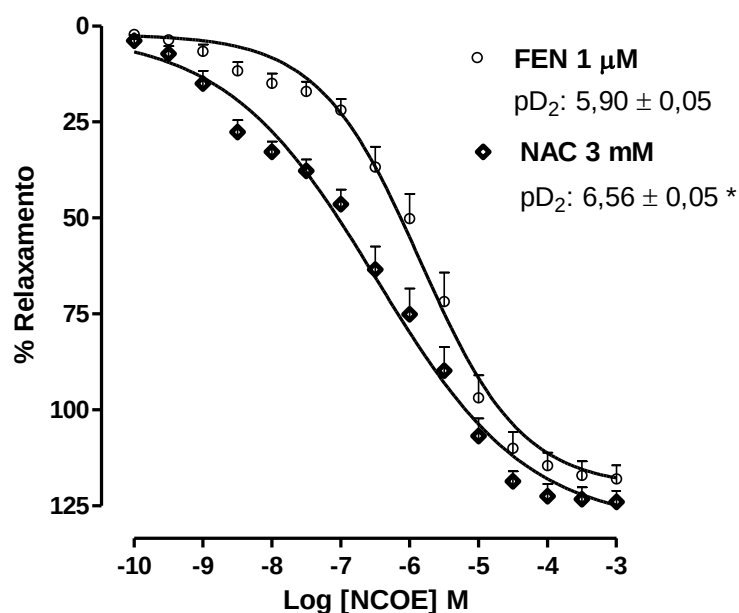


Gráfico 7 - Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contráidos com FEN (1 µM), na ausência (○) e na presença do NAC 3 mM (◊), (n = 9 e 7, respectivamente). Os valores foram expressos como média ± e.p.m. *p < 0,05

5.2.4.4 Avaliação da participação do citocromo P450 no vasorrelaxamento induzido pelo NCOE

Quando os anéis de artéria mesentérica foram incubados com um inibidor do citocromo P450, proadifeno (10 µM) (VETROVSKY et al., 2002; BERANOVA et al., 2005), não houve alteração da resposta vasorrelaxante induzida pela adição cumulativa do NCOE ($E_{\text{máx}} = 119,0 \pm 7,64\%$; e $pD_2 = 5,99 \pm 0,07$, n = 5), quando comparado com o controle ($E_{\text{máx}} = 118,0 \pm 3,53\%$; $pD_2 = 5,90 \pm 0,05$, n = 9) (Gráfico 8).

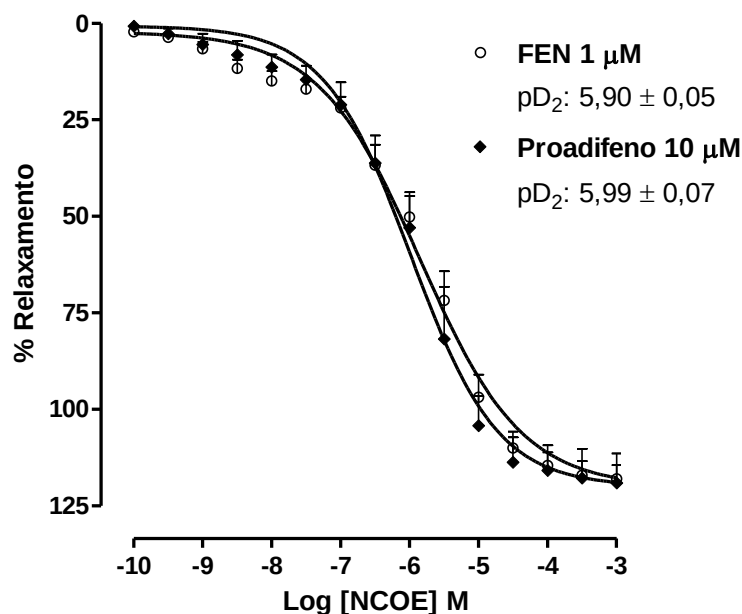


Gráfico 8 – Curvas concentração-resposta para o efeito vasorrelaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, com endotélio ausente, pré-contráidos com FEN (1 µM), na ausência (○) e na presença de proadifeno 10 µM (◆), (n = 9 e 6, respectivamente). Os valores foram expressos como média ± e.p.m.

5.2.4.5 Avaliação da participação da mtALDH no vasorrelaxamento induzido pelo NCOE

Na presença de 1 mM de cianamida, um inibidor da mtADLH (CHEN et al., 2007; CHEN; ZHANG; STAMLER, 2002), o vasorrelaxamento induzido pelo NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M), em anéis da artéria mesentérica superior isolada de rato, foi atenuado, havendo o deslocamento da curva para direita e significativa redução do efeito máximo ($E_{m\grave{a}x} = 94,3 \pm 6,26\%$; n = 7; $p < 0,05$), quando comparada com o controle ($E_{m\grave{a}x} = 118,0 \pm 3,53\%$; pD₂ = $5,90 \pm 0,05$, n = 9) (Gráfico 9).

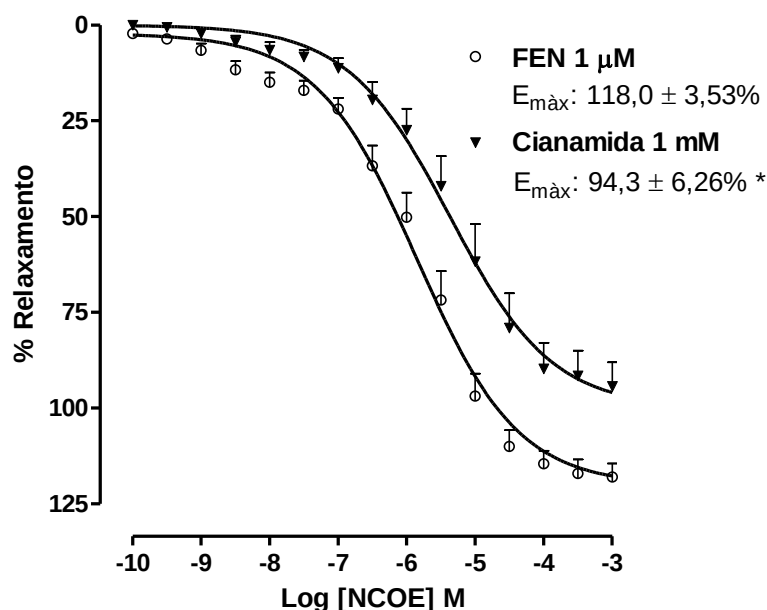


Gráfico 9 – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1 μ M), na ausência (○) e na presença de cianamida 1 mM (▼), (n = 9 e 7, respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0,05

5.2.5 Avaliação da participação da mtALDH no vasorrelaxamento induzido pelo SNP

O tratamento prévio dos anéis de artéria mesentérica com um inibidor da mtALDH, cianamida (1 mM), não alterou a curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido pelo SNP, um doador de NO que não requer a metabolização enzimática para a liberação deste gás (BELLISARII et al., 2012) ($pD_2 = 9,48 \pm 0,05$; $E_{m\acute{a}x} = 112,9 \pm 3,84\%$; n = 7), quando comparada com a curva na ausência do inibidor ($pD_2 = 9,57 \pm 0,07$; $E_{m\acute{a}x} = 113,3 \pm 4,31\%$; n = 6) (Gráfico 10).

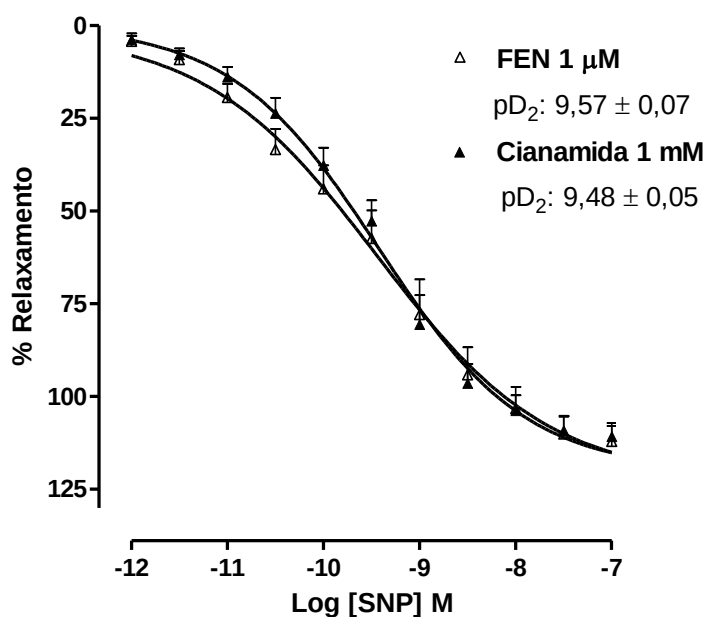


Gráfico 10 – Curvas concentração-resposta para o efeito vasorrelaxante induzido pelo SNP (10^{-12} - 10^{-7} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contráídos com FEN (1 μ M) na ausência (Δ) e na presença de cianamida 1 mM ($\blacktriangle$), (n = 6 e 7, respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m.

5.2.6 Participação da sGC na resposta vasorrelaxante induzida pelo NCOE

A resposta vasorrelaxante induzida pelo NCOE foi fortemente inibida, quando os anéis de artéria mesentérica foram incubados com o ODQ (10 μ M), um inibidor da sGC (GARTHWAITE et al., 1995; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007; FAVALORO; KEMP-HARPER, 2009), com deslocamento da curva para direita e redução do efeito máximo ($E_{m\acute{a}x} = 55,2 \pm 3,60\%$; n = 8, $p < 0,05$), quando comparado ao controle ($E_{m\acute{a}x} = 118,0 \pm 3,53\%$; n = 9) (Gráfico 11).

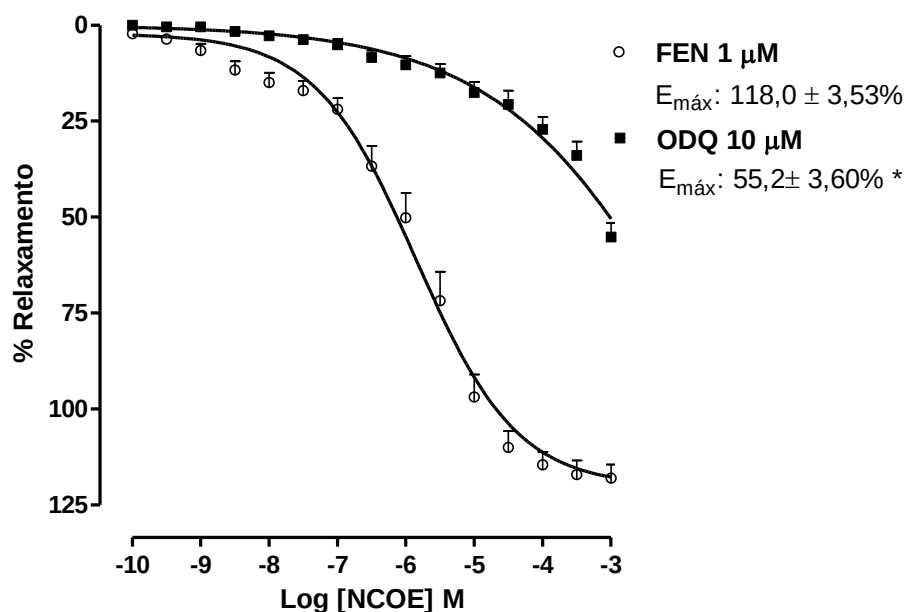


Gráfico 11 – Curvas concentração-resposta para o efeito vasorrelaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} – 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos, com endotélio ausente, pré-contraídos com FEN (1 μ M) na ausência (○) e na presença de ODQ 10 μ M (■), (n = 9 e 8, respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. *p < 0,05

5.2.7 Participação dos canais para K^+ na resposta vasorrelaxante induzida pelo NCOE

O tratamento prévio dos anéis de artéria mesentérica com TEA (3 mM), que nesta concentração atua como um bloqueador não seletivo de canais para K^+ (WANG et al., 2008; SILVA et al., 2011), ou 100 nM de iberiotoxina, um bloqueador seletivo de canais BK_{Ca} (BYCHKOV et al., 1998), atenuou o efeito máximo do vasorrelaxamento produzido pelo NCOE ($E_{\text{máx}}$ = 107,1 $\pm$ 7,09% e 106,2 $\pm$ 1,49%; p < 0,05; n = 6 e 7, respectivamente), quando comparado ao controle ($E_{\text{máx}}$ = 118,0 $\pm$ 3,53%; n = 9) (Gráfico 12A e 12B).

Na presença de glibenclamida (10 μ M), um bloqueador seletivo dos canais K_{ATP} (XU; LEE, 1994; FAROUQUE; OMAR; MEREDITH, 2003), a curva de vasorrelaxamento do NCOE foi deslocada para direita (pD_2 = 5,61 $\pm$ 0,04 p < 0,05), sem alteração no efeito máximo ($E_{\text{máx}}$ = 109,7 $\pm$ 2,59%; n = 6;), quando comparada ao controle ($E_{\text{máx}}$ = 118,0 $\pm$ 3,53%; pD_2 = 5,90 $\pm$ 0,05, n = 9) (Gráfico 12C). Entretanto, o vasorrelaxamento induzido pelo NCOE não foi alterado, quando os

anéis mesentéricos foram incubados com o 4-AP (1 mM), um bloqueador seletivo de canais K_V (OKABE et al., 1987), quando comparado com o controle ($E_{m\acute{a}x} = 116,5 \pm 4,63\%$ e $118,0 \pm 3,53\%$; $pD_2 = 5,70 \pm 0,04$ e $5,90 \pm 0,05$; $n = 8$ e 9 , respectivamente) (Gráfico 12D).

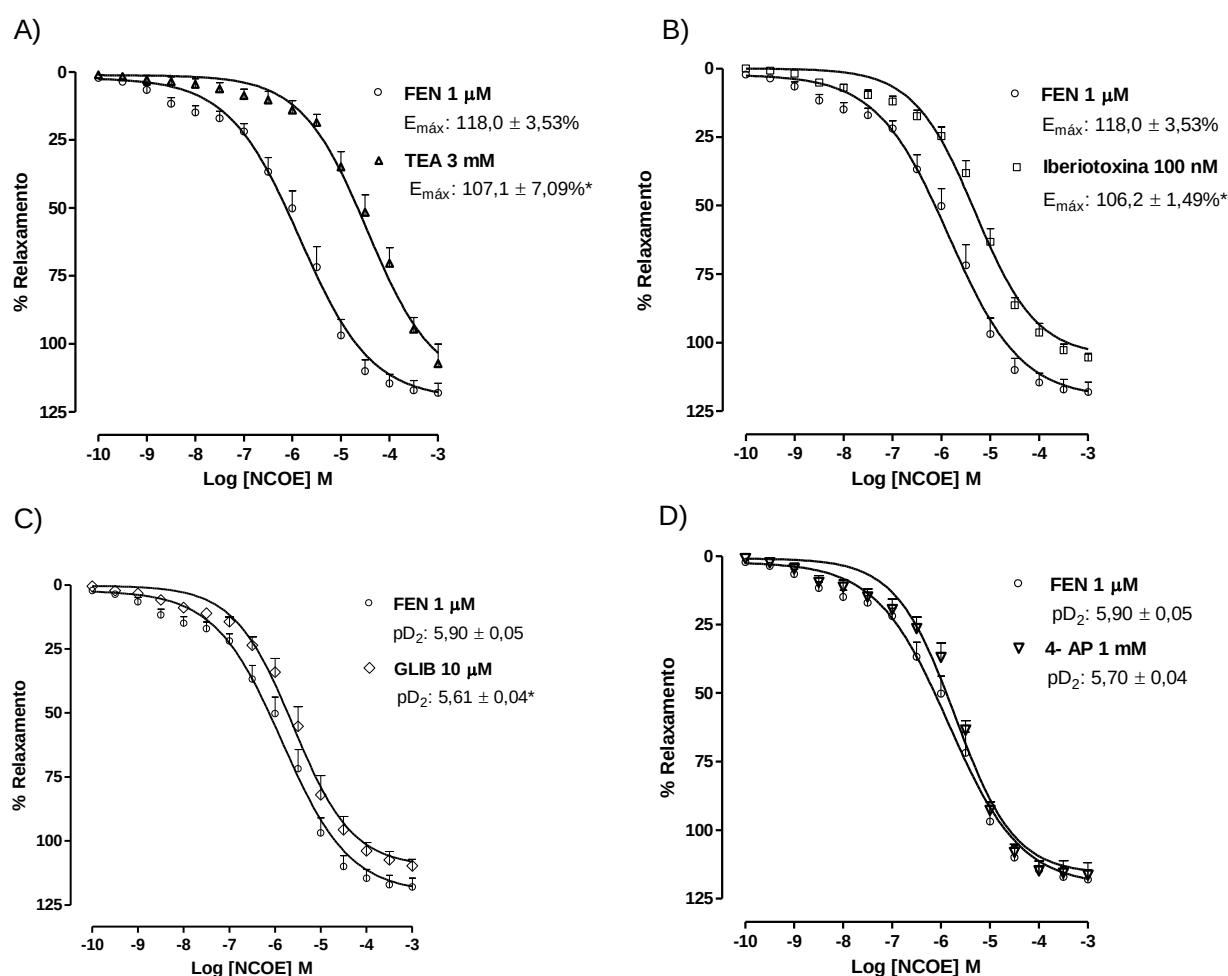


Gráfico 12 – Curvas concentração-resposta para o efeito relaxante induzido pelo NCOE (10^{-10} - 10^{-3} M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem endotélio, pré-contráídos com FEN (1 μM), na ausência ($\circ$) e na presença de A) TEA 3 mM (Δ), B) iberiotoxina 100 nM ($\square$), C) GLIB 10 μM ($\diamond$) ou D) 4-AP 1 mM (∇), ($n = 9, 6, 7, 6$ e 8 , respectivamente). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. $^*p < 0,05$

5.2.8 Liberação de NO pelo NCOE em cultura de células musculares lisas de aorta de rato

As células musculares lisas de aorta, na presença do 7-AAD, apresentaram viabilidade celular superior a 90% após incubação com NCOE.

Após incubação com o DAF-DA (10 μ M), tanto o NCOE (100 μ M) quanto o SNP (10 μ M) aumentaram a fluorescência em $139,6 \pm 28,3\%$ e $80,6 \pm 2,3\%$ respectivamente, quando comparados com a condição controle (DAF-DA (10 μ M) + veículo). Adicionalmente, não houve diferença estatística entre a fluorescência do NCOE e do SNP (Gráfico 13).

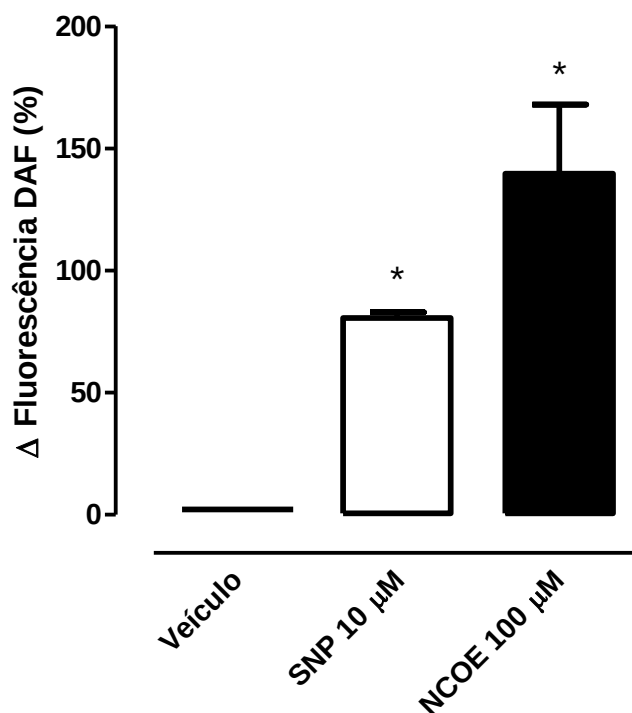


Gráfico 13 - Efeito do NCOE (100 μ M), SNP (10 μ M) e veículo sobre os níveis de NO, expressos em Δ de fluorescência de DAF (%), em células musculares lisas de aorta de rato ($\sim 10^6$ /mL). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ vs veículo.

Discussão



6 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi desenvolvido com a finalidade de avaliar os efeitos do nitrato orgânico, NCOE, sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos, tentando elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos em suas respostas. Como principais resultados, foi constatado que a administração aguda do NCOE promoveu hipotensão e bradicardia transientes, em ratos normotensos não anestesiados. O efeito hipotensor induzido pelo NCOE pode estar relacionado com a diminuição da RVPT, como observado no vasorrelaxamento promovido por este nitrato em artéria mesentérica superior de rato. O mecanismo de ação responsável pela vasodilatação promovida pelo NCOE envolve a liberação de NO, ativação da sGC e consequente ativação dos canais para K^+ .

Atualmente, há um grande interesse em uma classe de moléculas chamadas de doadores de NO, os quais são capazes de transportar este gás para diferentes áreas do organismo (SERAFIM et al, 2012). O NO é uma importante molécula de sinalização, com uma ampla variedade de funções no sistema cardiovascular, incluindo a regulação da PA sistêmica, do fluxo sanguíneo e do tônus vascular (ALZAWAHRA et al., 2008). Como o NO está envolvido em diversas vias biorregulatórias, tem despertado o interesse terapêutico por nitratos orgânicos e outros doadores de NO, como também intensificado o uso destes compostos em estudos farmacológicos (FEELISCH, 1998).

Com o intuito de avaliar o efeito de NCOE sobre a PAM e FC, utilizou-se a metodologia de aferição dos parâmetros cardiovasculares em animais não anestesiados e com livre movimentação, uma vez que a anestesia modifica os níveis de PA e FC. Adicionalmente, também pode ocorrer a alteração dos principais sistemas envolvidos na regulação destes parâmetros, como o sistema renina-angiotensina, o sistema nervoso simpático e o barorreflexo, além de causar depressão das sinapses do sistema nervoso central e modificação de respostas autonômicas (KORNER; LANGSFORD; STARR, 1968; ZIMPFER et al., 1982; DORWARD et al., 1985; FLUCKIGER et al., 1985).

Em animais normotensos, não anestesiados, a administração aguda (i.v – *in bolus*) e randômica do NCOE induziu uma resposta transiente de maneira dependente de dose, caracterizada por uma hipotensão associada a uma

bradicardia. O efeito bradicárdico do NCOE diferencia dos efeitos induzidos pela administração de nitratos orgânicos clássicos, como GTN e 3-morfolino-sidnonimina (SIN-1), que causam taquicardia. Essa taquicardia pode ser um resultado da ativação reflexa do sistema nervoso simpático, com a finalidade de reajustar os níveis de PA (NURMINEN; VAPAATALO, 1996). O efeito bradicárdico induzido pelo NCOE pode está relacionado com uma ação sobre o coração.

Frente às evidências de que o nitrato em estudo possivelmente esteja exercendo seus efeitos por liberar NO, convém relatar a influência do NO sobre a contratilidade cardíaca. Relatos demonstram que o NO, em altas concentrações, promove efeito inotrópico negativo via PKG (COTTON; KEARNEY; SHAH, 2002; RASTALDO et al., 2007). Além disso, o NO, de maneira dependente de cGMP, pode modular a FC por atuar em terminações nervosas vagais cardíacas, estimulando a liberação de ACh e, por outro lado, reduzindo a liberação de noradrenalina a partir das terminações simpáticas (PATON, KASPAROV; PATERSON, 2002; HERRING; PATERSON, 2001; WANG et al., 2007). Desse modo, a liberação do NO pelo NCOE pode ser o mecanismo responsável por sua ação bradicárdica observada. No entanto, estudos adicionais são necessários para investigar melhor este efeito.

Com base no fato de que alterações do tônus da musculatura lisa vascular desempenham um importante papel na manutenção da PA (FOLKOW, 1987; MULVANY; AALKJAER, 1990), foi investigada a atividade do NCOE utilizando uma abordagem *in vitro*. Para este fim, foram utilizados anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato, com o objetivo de melhor compreender a natureza do efeito hipotensor, observado nos experimentos *in vivo*. Nos estudos *in vitro*, foi evidenciado que o NCOE induziu vasodilatação dependente de concentração em anéis mesentéricos pré-contraídos com FEN (1 μ M).

A ação farmacológica de compostos vasodilatadores é principalmente mediada por um efeito direto, sobre o músculo liso vascular, ou um efeito indireto, via liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio vascular (GURNEY et al. 1994). O endotélio vascular apresenta papel importante no controle do tônus vascular e da PA por meio da liberação de substâncias vasoativas, que agem nas células do músculo liso vascular, causando contração ou relaxamento. As células endoteliais, em resposta a uma variedade de estímulos fisiológicos, tais como: a bradicinina; acetilcolina; histamina; substância P; estresse de cisalhamento, entre

outros, liberam substâncias vasodilatadoras, incluindo: a PGI_2 , o NO e o EDHF (VANHEEL; VAN DE VOORDE, 2000; SERBAN et al. 2010).

A partir dessas considerações sobre o endotélio vascular, passou-se a avaliar a influência do mesmo na resposta vasorrelaxante induzida pelo NCOE. Para tanto, foram realizados experimentos, nos quais o endotélio foi mecanicamente removido. Em seguida, a resposta obtida foi comparada à resposta relaxante deste nitrato orgânico na presença do endotélio vascular. O efeito vasorrelaxante do NCOE mostrou-se equipotente, com relação aos valores de eficácia e potência, nos anéis mesentéricos na presença e na ausência do endotélio funcional. Este efeito evidencia que a vasodilatação promovida pelo NCOE ocorre de maneira independente dos fatores relaxantes derivados do endotélio. Adicionalmente, sugere-se que o nitrato orgânico em estudo pode exercer o seu efeito diretamente no músculo liso vascular.

Diante desse contexto, avaliou-se também o efeito induzido pelo NCOE sobre o tônus vascular basal, tanto na presença quanto na ausência do endotélio vascular. A adição de concentrações crescentes do NCOE ao tônus basal não alterou o tônus basal. Esta resposta sugere que para o NCOE induzir um efeito vasorrelaxante é necessário que a artéria mesentérica esteja pré-contraída.

A partir desses resultados preliminares, os experimentos subsequentes foram realizados com anéis de artéria mesentérica sem endotélio vascular e submetidos a uma pré-contração.

A contração do músculo liso ocorre após a elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, em virtude da abertura de canais para Ca^{2+} presentes na membrana plasmática, e devido a liberação deste íon do retículo sarcoplasmático. No meio intracelular, o Ca^{2+} se liga à calmodulina, ativando a MLCK, que fosforila a cadeia leve de miosina (MLC), e esta interage com os filamentos de actina para promover contração do músculo liso. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pode ser influenciada pela ação de agonistas, como a FEN, como também por estímulos eletroquímicos (KARAKI et al., 1997; WEBB, 2003; PEREZ-ZOGHBI et al., 2009).

A FEN induz contração das células do músculo liso por meio da ativação dos receptores α_1 -adrenérgicos. Estes receptores são acoplados à proteína $G_{q/11}$ e, ao serem ativados, levam à ativação da fosfolipase C- β (PLC β). Esta enzima catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em 1,4,5-trifosfato de inositol (IP $_3$) e

diacilglicerol (DAG). O IP_3 ativa os receptores para IP_3 (IP_3R), localizados no retículo sarcoplasmático, promovendo a liberação para o citosol do Ca^{2+} contido neste compartimento intracelular. O DAG, juntamente com a elevação da $[Ca^{2+}]$, promove ativação da proteína cinase C (PKC). Esta proteína cinase fosforila vários alvos, como os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem tipo L ($Ca_v1.2$), presentes na membrana plasmática. A abertura dos $Ca_v1.2$ permite a passagem do Ca^{2+} do meio extracelular para o interior da célula, um evento que resulta na contração das células musculares lisas (MCCARRON et al., 2003; WEBB, 2003; THORNELOE; NELSON, 2005).

O aumento na $[Ca^{2+}]_i$ induzido por estímulos eletroquímicos, como a elevação da $[K^+]$ extracelular, permite a abertura direta dos canais de cálcio, sem a participação de receptores farmacológicos membranares. Este aumento extracelular impede o influxo desse íon, levando à despolarização da membrana plasmática. Por sua vez, a despolarização gerada permite a abertura dos $Ca_v1.2$, levando ao aumento do influxo do Ca^{2+} e, conseqüentemente, à contração muscular (KARAKI et al., 1997; INTERRAMINESE et al., 2007; WANG et al., 2007).

Estudos relatam que contrações induzidas por alterações do potencial membranar, bem como aquelas mediadas por GPCR envolvem a ativação da via RhoA/Rho cinase. Esta serina/treonina cinase, que fosforila a fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) e leva a sua inibição. Isto resulta na inibição da atividade da MLCP de remover o fosfato da cadeia leve da miosina (MLC), fazendo com que esta proteína permaneça no estado fosforilado, um fator que contribui para manutenção da contração (SAKAMOTO et al., 2003; WANG et al., 2006).

Diante destas duas condições contráteis, NCOE induziu um efeito relaxante maior em anéis pré-contraídos com FEN (1 μ M) do que em anéis pré-contraídos com solução despolarizante, KCl 60 mM. Este resultado assemelha-se com outros estudos com nitratos orgânicos, nos quais demonstram que o efeito relaxante é bem mais potente em pré-contrações induzidas por agonistas GPCR do que contrações induzidas por soluções despolarizantes (ALUSTAU, 2010; FRANÇA-SILVA, 2010). Drogas que atuam bloqueando diretamente canais de cálcio apresentam efeito inverso a este demonstrado acima, tal como o nifedipino e seus análogos (DAMIANI; ROSSONI; VASSALO, 2003; QUEIROZ et al., 2011).

Os nitratos orgânicos, como o NCOE, possuem um grupo nitroso funcional em sua molécula, o qual pode liberar NO por influência enzimática ou não enzimática (BONAVENTURA et al., 2007). Assim, buscou-se avaliar o envolvimento do NO na resposta relaxante induzida pelo nitrato em estudo.

Dependendo da origem, o NO pode ser gerado em diferentes estados redox: na forma radicalar ($\text{NO}^\bullet$); na forma reduzida, como íon NO^- ; e na forma oxidada como cátion nitrosonium (NO^+) (BONAVENTURA et al., 2006; IRVINE et al., 2007). Dierks e Burstyn (1996) demonstraram que somente o $\text{NO}^\bullet$ é capaz de ativar a SGC e promover vasorrelaxamento. No entanto, outros estudos mostraram que o NO^- também pode ativar a SGC e os canais para potássio gerando relaxamento em artéria mesentérica de resistência (IRVINE; KEMP-HARPER; FAVALORO, 2003). Foi também demonstrado que o NO^+ não apresenta relevância fisiológica, devido ao fato de ter um tempo de meia vida muito curta, aproximadamente de nanossegundos (BONNER; STEDEMAN, 1996 *apud* PEREIRA, 2011). Devido o envolvimento tanto $\text{NO}^\bullet$ e do NO^- no relaxante da musculatura lisa vascular (IRVINE et al., 2007; FAVALORO; KEMP-HARPER, 2009), avaliou-se a participação destas duas formas no vasorrelaxamento induzido pelo NCOE.

No intuito de investigar a participação do $\text{NO}^\bullet$, utilizou-se o PTIO, um sequestrador intracelular seletivo para esta forma do NO. O PTIO oxida o $\text{NO}^\bullet$, gerando o dióxido de nitrogênio (NO_2) e o 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-óxido (PTI) (MAEDA et al., 1994). Na presença deste sequestrador, o efeito vasorrelaxante induzido pelo NCOE foi atenuado de forma significativa. Esta resposta sugere que a vasodilatação promovida pelo NCOE envolve a liberação de $\text{NO}^\bullet$. Outros estudos relatam que nitratos orgânicos, caracterizados por exercerem seus efeitos vasorrelaxantes a partir da liberação de $\text{NO}^\bullet$, na presença do PTIO, apresentam atenuação da potência, sem alteração do efeito máximo (IRVINE et al., 2007), corroborando com os resultados obtidos com o NCOE.

Para avaliar o envolvimento do NO^- no vasorrelaxamento produzido pelo NCOE, foi utilizado L-cisteína (3 mM), um sequestrador seletivo desta forma de NO. Na presença da L-cisteína, o efeito foi potencializado, porém sem alterar o $E_{\text{máx}}$. Este resultado corrobora com dados da literatura, que mostram que concentrações milimolares de L-cisteína aumentam ou prolongam respostas do $\text{NO}^\bullet$ e excluem a

participação do NO⁻, em preparações vasculares ou em outros tecidos (ELLIS; LI; RAND, 2000).

A potencialização do efeito do NCOE pode ser explicada a partir das características da L-cisteína. Esta substância é considerada um tiol (R-SH), por apresentar em sua estrutura um grupo sulfidril (SH). Tem sido sugerido, que tióis podem reagir diretamente o NO[•] para formar S-nitrosotióis (R-SNO). Estes compostos atuam como moléculas transportadoras e estabilizadoras da atividade do NO, devido ao fato de possuírem um tempo de meia-vida maior que este gás e por serem mais resistentes à degradação pelo superóxido (O₂⁻) do que o NO (ELLIS; LI; RAND, 2000). Adicionalmente, os tióis podem reagir diretamente com nitratos orgânicos levando à liberação de NO (ABRAMS, 1991; WANG; CAI; TANIGUCHI, 2005). Portanto, o vasorrelaxamento produzido pelo NCOE, na presença da L-cisteína, é mais um indício de que o NO[•] está envolvido no efeito deste nitrato.

Neste contexto, foi desenvolvido um protocolo experimental utilizando outro tiol, o NAC (3 mM), um sequestrador de ROS, considerado um potente agente antioxidante (ANDREWS; PRASAD; QUYYUMI, 2001; ZAFARULLAH et al., 2003; PECHÁNOVÁ et al., 2006). Este tiol, quando aplicado em sistemas biológicos, pode ser convertido em metabólitos que estimulam a síntese de glutathione reduzida (AWAD et al., 2010). Após pré-incubação do NAC, o efeito vasorrelaxante do NCOE também foi potencializado, corroborando com estudos que mostraram que este sequestrador de ROS potencializa os efeitos de doadores de NO (WINNIFORD et al., 1986). Este efeito pode estar relacionado com a formação S-nitrosotióis, que protege o NO da degradação de radicais livres. Adicionalmente, o NAC melhora a biodisponibilidade do NO por sequestrar ROS (ANDREWS; PRASAD; QUYYUMI, 2001; PECHÁNOVÁ et al., 2006).

Para que ocorra a liberação de NO a partir de nitratos orgânicos é necessário a biotransformação dos mesmos, que pode ocorrer tanto por via não enzimática (reações com tióis) quanto enzimática (BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005).

De fato, tem sido sugerido que nitratos orgânicos de alta potência, tais como o pentaeritril tetranitrato (PETN) e o GTN, podem ser bioativados tanto pela mtALDH quanto pelo citocromo P450. Já os nitratos de baixa potência, como mononitrato de isossorbida (ISMN), podem ser bioativados pelo citocromo P450 no retículo endoplasmático (DAIBER et al., 2008; MÜNZEL; DAIBER; GORI, 2011). Com o

intuito de investigar se o NCOE necessita de bioativação enzimática para promover a liberação de NO, foi realizado protocolos experimentais na presença de inibidores do citocromo P450 e da mtALDH.

Na presença do proadifeno, um inibidor do citocromo P450 (VETROVSKY et al., 2002; BERANOVA et al., 2005), o efeito vasorrelaxante induzido pelo NCOE não foi alterado, sugerindo que o citocromo P450 não está envolvido no mecanismo de bioativação do NCOE. Para investigar o envolvimento da mtALDH, foi utilizado a cianamida (1 mM), um inibidor desta enzima (CHEN; ZHANG; STAMLER, 2002). Nestas condições, a resposta vasorrelaxante induzida pelo NCOE foi atenuada, com redução da sua eficácia, sugerindo que, pelo menos em parte, o NCOE necessita ser bioativado pela mtALDH para liberar NO e induzir seu efeito vasorrelaxante.

Em contraste, o efeito vasorrelaxante do SNP não foi alterado na presença da cianamida, um doador de NO que não requer uma biotransformação enzimática para disponibilizar NO (BONAVENTURA et al., 2008; BELLISARII et al., 2012). Estes resultados corroboram com dados da literatura, que mostram que o efeito vasorrelaxante do SNP, em aorta de coelho, não foi alterado na presença da cianamida. Com este protocolo, demonstrou-se a viabilidade dos experimentos que avaliam o envolvimento da mtALDH, utilizando a cianamida.

Os resultados apresentados até aqui, em conjunto, reforçam a hipótese de que o NCOE deve exercer o seu efeito vasorrelaxante por meio da liberação de NO[•] no músculo liso vascular, e esta liberação parece envolver a participação de mtALDH.

Uma vez liberado no músculo liso, o NO liga-se ao ferro do grupamento heme da sGC, ativando esta enzima, que é responsável por catalisar a conversão de GTP em cGMP. O aumento dos níveis de cGMP resulta na ativação a PKG, que atua como mediador da vasodilatação das células do músculo liso. A PKG atua por meio da fosforilação de várias proteínas, que levam à abertura de canais de K⁺ na membrana plasmática, inativação da MLCK e diminuição dos níveis de Ca²⁺ intracelular (TAKAHASHI et al., 2008).

Para avaliar a participação da via de sinalização NO-sGC, realizou-se experimentos na presença do ODQ (10 µM), um inibidor seletivo da sGC (ZHAO et al., 2000; IRVINE et al., 2007; ANDREWS et al., 2009). O efeito inibitório do ODQ ocorre devido à oxidação do ferro do grupamento heme da sGC, diminuindo

consideravelmente a ação do NO, sem afetar a atividade catalítica da enzima (SCHRAMMEL et al., 1996; ZHAO et al., 2000; BONAVENTURA et al., 2007). Na presença deste inibidor, o vasorrelaxamento induzido pelo NCOE foi significativamente atenuado, com redução do efeito máximo, sugerindo que o efeito vasorrelaxante do NCOE é mediado pela ativação da sGC.

É bem estabelecido que tanto o cGMP quanto a PKG podem mediar o relaxamento vascular por afetar a funcionalidade dos canais para K^+ (ARCHER et al., 1994). Admite-se, também, que o NO possa ativar diretamente estes canais, de maneira independente do cGMP (BOLOTINA et al., 1994). Os canais para K^+ contribuem para a regulação do potencial de membrana das células do músculo liso, sendo importantes na homeostasia do tônus vascular. A abertura destes canais induz uma mudança no potencial de membrana das células para valores mais negativos (hiperpolarização ou repolarização), devido o efluxo desses íons. Este efeito é seguido pelo fechamento dos $Ca_v1.2$, reduzindo a entrada de Ca^{2+} , resultando na vasodilatação. Em contraste, a inibição da função de canais K^+ leva à despolarização da membrana, com consequente vasoconstrição (KO et al., 2008).

Com base na importância dos canais para K^+ no músculo liso vascular, avaliou-se o envolvimento destes canais na resposta vasodilatadora induzida pelo NCOE. Para tanto, realizou-se experimentos na presença de TEA (3 mM), que nesta concentração é responsável por bloquear, de maneira não seletiva, os canais para K^+ (WANG et al., 2007; SILVA et al., 2011). Nestas condições experimentais, o relaxamento produzido pelo NCOE foi significativamente atenuado, sugerindo a participação dos canais para K^+ na resposta vasorrelaxante promovida pelo nitrato orgânico em estudo.

Sabe-se que na artéria mesentérica são expressos dentre outros canais para K^+ , os K_{Ca} , os K_{ATP} , e os K_V (HADDY; VANHOUTTE; FELETOU, 2006; KO et al., 2008). Diante desse fato, avaliou-se quais subtipos de canais para K^+ estariam envolvidos na resposta vasodilatadora do nitrato em estudo.

Estudos prévios demonstraram que NO promove a abertura dos canais K_V nas células do músculo liso de artéria pulmonar, com consequente hiperpolarização da membrana e diminuição da $[Ca^{+2}]_i$, sugerindo que esse pode ser um dos mecanismos pelo qual o NO induz vasodilatação. No entanto, na presença de 4-aminopiridina (4-AP), um bloqueador dos canais K_V (BERG, 2002; SILVA et al.,

2011), a resposta vasodilatadora induzida pelo NCOE não foi alterada, apontando assim, que os canais K_V não participam da resposta vasorrelaxante induzida pelo nitrato em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.

Outro canal para K^+ envolvido na via de sinalização do NO são os canais K_{ATP} (JACKSON, 2000; KO et al., 2008). Foi demonstrado que a ativação da PKG pelo NO resulta na ativação dos K_{ATP} em células de músculo liso de artéria mesentérica de coelho (MURPHY; BRAYDEN, 1995). Além disso, evidências mostram a hiperpolarização induzida pelo NO foi bloqueada por glibenclamida, um bloqueador dos K_{ATP} , em artéria mesentérica de ratos (GARLAND; MCPHERSON, 1992). Dessa forma, avaliou-se a participação destes canais no efeito induzido pelo NCOE, utilizando a glibenclamida. Nestas condições observou-se uma pequena atenuação no efeito vasorrelaxamento induzido pelo NCOE, sugerindo a participação dos K_{ATP} na resposta vasodilatadora.

Outro importante canal para K^+ , presente na artéria mesentérica de rato, é o BK_{Ca} (KO et al., 2008). Estudos prévios indicam que o NO pode ativar os BK_{Ca} por meio da PKG, por modulação direta, ou pela combinação destes dois mecanismos (MISTRY; GARLAND, 1998). A ativação destes canais, em células musculares lisas de artéria mesentérica de rato, é reduzida na presença de iberiotoxina, um bloqueador seletivo para os BK_{Ca} . Após a realização de um protocolo experimental na presença da iberiotoxina (100 nM) (BYCHKOV et al., 1998), observou-se que a curva concentração-resposta induzida pelo o NCOE foi atenuada, com redução do efeito máximo. Este resultado sugere que os canais BK_{Ca} participam do efeito vasorrelaxante induzido pelo NCOE.

Todos os resultados, em conjunto, sugerem que o efeito vasorrelaxante induzido pelo NCOE é decorrente da produção de NO. Para confirmar essa hipótese, foi avaliada a liberação de NO pelo nitrato orgânico em estudo, em células musculares lisas de aorta de rato, utilizando para tanto a técnica de citometria de fluxo. O nível celular de NO foi mensurado por uma sonda fluorescente permeável à membrana, o DAF-DA, que detecta a formação de NO em tempo real. Dentro das células musculares, o DAF-DA é clivado, por meio da ação de esterases plasmáticas, em 3,4-diaminofluoresceína (DAF-2). O DAF-2 é retido na célula e reage com o NO na presença de oxigênio. Esta reação produz o triazolo-

diaminofluoresceína (DAF-2T), um produto fluorescente, que permite quantificar a formação de NO (KOJIMA et al., 1998).

O tratamento das células musculares lisas com o NCOE (100 μ M) promoveu o aumento de fluorescência, atribuído à elevação dos níveis de NO. Este aumento também foi observado na presença do SNP (10 μ M), um doador clássico de NO. Este achado confirma a hipótese dos resultados funcionais, demonstrando que os efeitos cardiovasculares induzidos pelo NCOE são decorrentes da liberação de NO.

Por fim, os resultados obtidos demonstram que o NCOE promove um efeito hipotensor e bradicárdico, sendo o efeito hipotensor atribuído a redução da RVPT. Esta resposta envolve a liberação de NO na forma radicalar, por meio da metabolização do nitrato orgânico em estudo via mtALDH, com consequente ativação da sGC, e dos canais K_{ATP} e BK_{Ca} .

Conclusão



7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- ❖ O NCOE produz um efeito hipotensor e bradicárdico;
- ❖ O NCOE promove um efeito vasorrelaxante, independente do endotélio vascular, em anéis de artéria mesentérica superior de ratos;
- ❖ O NCOE é, possivelmente, biotransformado pela mtALDH, liberando o NO na forma radicalar para exercer sua resposta vasodilatadora;
- ❖ Como consequência da liberação do NO, ocorre ativação da sGC, com subsequente ativação dos canais K_{ATP} e BK_{Ca} ;

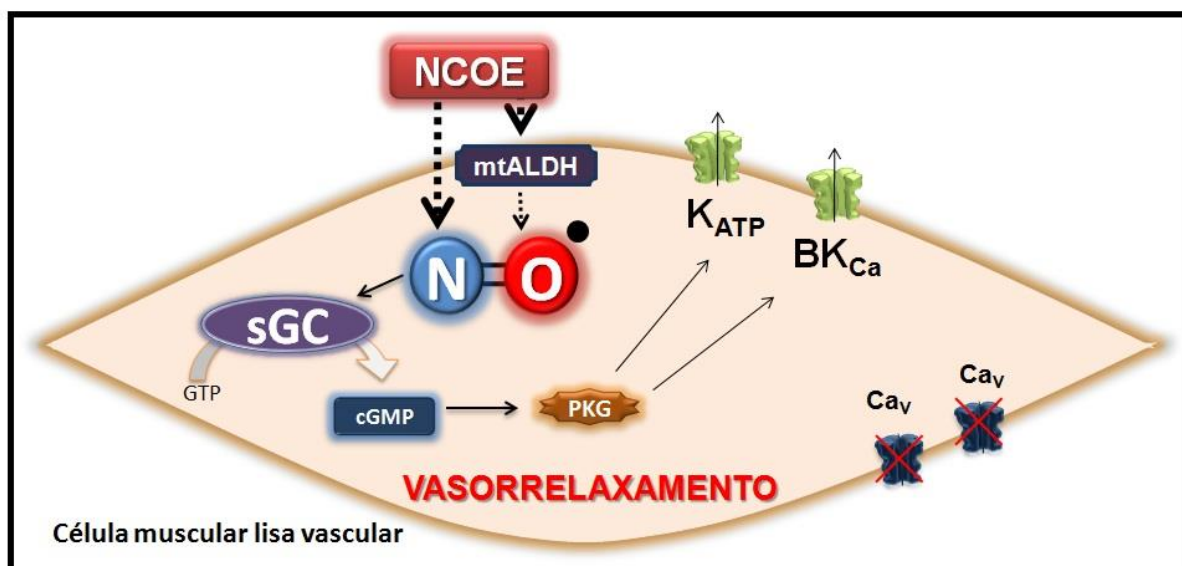


Figura 20 – Representação esquemática do mecanismo de relaxamento da célula muscular lisa vascular induzido pelo NCOE

Perspectivas



8 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste estudo apontam para o potencial terapêutico do NCOE, um novo doador de NO. O próximo passo na investigação de suas propriedades biológicas será: avaliar seus efeitos sobre o infarto do miocárdio, uma das principais enfermidades cardiovasculares tratadas por nitratos orgânicos, bem como investigar se suas ações induzem tolerância, um efeito limitante do uso terapêutico desta classe de fármacos.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, J. Interactions Between Organic Nitrates and Thiol Groups. **The American Journal of Medicine**, v. 91, 1991.
- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, p. 1698-1705, 1970.
- ALUSTAU, M. C. **Envolvimento da via do óxido nítrico na resposta vasodilatadora induzida pelo nitrato tetra-hidrofurfurílico (NTHF) em artéria mesentérica superior de rato**. 2010. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.
- ALZAWAHRA, W. F.; TALUKDER, M. A. H.; LIU, X.; SAMOUILOV, A.; ZWEIER, J. L. Heme proteins mediate the conversion of nitrite to nitric oxide in the vascular wall. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory**, v. 295, p. 499-508, 2008.
- ANDREWS, N. P.; PRASAD, A.; QUYYUMI, A. A. N-acetylcysteine Improves Coronary and Peripheral Vascular Function. **Journal of the American College of Cardiology** v. 37, n. 1, 2001.
- ANDREWS, K. L.; IRVINE, J. C.; TARE, M.; APOSTOLOPOULOS, J.; FAVALORO, J. L.; TRIGGLE, C.; KEMP-HARPER, B. K. A role for nitroxyl (HNO) as an endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factor in resistance arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, p. 540–550, 2009.
- ARCHER, S. L.; HUANG, J. M. C.; HAMPL, V.; NELSON, D. P.; SHULTZ, P. J.; WEIR, E. K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 7583-7587, 1994.
- AWAD, N.; KHATIB, N.; GINSBERG, Y.; WEINER, Z.; MARAVI, N.; THALER, I.; ROSS, M. G.; ITSOKOVITZ-ELDOR, J.; BELOOSESKY, R. N-acetyl-cysteine (NAC) attenuates LPS-induced maternal and amniotic fluid oxidative stress and inflammatory responses in the preterm gestation. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 204, n. 5, p.15-20, 2010.
- BARREIRO, E. J. Estratégia De Simplificação Molecular No Planejamento Racional De Fármacos: A Descoberta De Novo Agente Cardioativo. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1172-1180, 2002.
- BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, p. 1046-1054, 2005.

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, p. 157-165, 1991.

BELLISARII, F. I.; RADICO, F.; MUSCENTE, F.; HOROWITZ, J.; CATERINA, R. Nitrates and Other Nitric Oxide Donors in Cardiology - Current Positioning and Perspectives. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 26, p. 55-69, 2012.

BERANOVAA, P.; CHALUPSKYA, K.; KLESCHYOV, A. L.; SCHOTT, C.; BOUCHERC, J. L.; MANSUYC, D.; MUNZELB, T.; MULLERA, B.; JEAN-CLAUDE, STOCLETA, J. C. NN-hydroxy-L-arginine homologues and hydroxylamine as nitric oxide-dependent vasorelaxant agents. **European Journal of Pharmacology**, v. 516, p. 260-267, 2005.

BERG, T. Analysis of the pressor response to the K⁺ channel inhibitor 4-aminopyridine. **European Journal Pharmacology**, v. 452, p. 325-337, 2002.

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A.; Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 28, p. 850-853, 1994.

BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F. S.; LUNARDI, C. N.; VERCESI, J. A.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex. **Nitric Oxide**, v. 15, p. 387-394, 2006.

BONAVENTURA, D.; LIMA, R. G.; VERCESI, J. A.; SILVA, R. S. 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.

BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C. N.; RODRIGUES, G. J.; NETO, M. A.; BENDHACK, L. M. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. **Nitric Oxide**, v. 18, p. 287-295, 2008.

BONAVENTURA, D.; LIMA, R. G.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. NO donors-relaxation is impaired in aorta from hypertensive rats due to a reduced involvement of K⁺ channels and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. **Life Sciences**, v. 89, p. 595-602, 2011.

BONNER, F. T.; STEDMAN, G. The chemistry of nitric oxide and redox-related species. **Methods in Nitric Oxide Research**, p. 3-18, 1996.

BURGAUD, J. L.; ONGINI, E.; SOLDATO, P. D. Nitric Oxide-Releasing Drugs A Novel Class of Effective and Safe Therapeutic Agents. **New York Academy of Sciences**, v. 962, p. 360-371, 2002.

BÜSCHER, R. H. V.; RING, K. M.; KAILASAM, M. T.; O'CONNOR, D. T.; PARMER, R. J.; INSEL, P. A. Variability in phenylephrine response and essential hypertension: a search for human $\alpha 1B$ -adrenergic receptor polymorphisms. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 291, n. 2, p. 793-798, 1999.

BYCHKOV, R.; GOLLASCH, M.; STEINKE, T.; RIED, C.; LUFT, F.C.; HALLER, H. Calcium-Activated Potassium Channels and Nitrate-Induced Vasodilation in Human Coronary Arteries. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 285, p. 293–298, 1998.

BYLUND, D. B. Subtypes of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors. **The FASEB Journal**, v. 6, p. 832-839, 1992.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e Hipertensão Arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p.30-40, 2001.

CHALUPSKY, K.; LOBYSHEVA, I.; NEPVEU, F.; GADEA, I.; BERANOVA, P.; ENTLICHER, G.; STOCLET, J.; MULLER, B., Relaxant effect of oxime derivatives in isolated rat aorta: role of nitric oxide (NO) formation in smooth muscle. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 1203-1214, 2004.

CARVAJAL, J. A.; GERMAIN, A. M.; HUIDOBRO-TORO, J. P.; WEINER, C. P. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 184, n. 3, p. 409-420, 2000.

CHAUHAN, S.; RAHMAN, A.; NILSSON, H.; CLAPP, L.; MACALLISTER, R.; AHLUWALIA, A. NO contributes to EDHF-like responses in rat small arteries: a role for NO stores. **Cardiovascular Research**, v. 57, p. 207-216, 2002.

CHEN, X. L.; REMBOLD, C. M. Phenylephrine contracts rat tail artery by one electromechanical and three pharmacomechanical mechanisms. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 268, n. 1, H74-H81, 1995.

CHEN Z.; ZHANG J.; STAMLER J. S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 99, p. 8306-8311, 2002.

CHEN, Y.; NIE, S.; SHAN, W.; JIANG, D.; SHI, R.; ZHOU, Z.; GUO, R.; ZHANG, Z.; LI, Y. Decrease in endogenous CGRP release in nitroglycerin tolerance: role of ALDH-2. **European Journal of Pharmacology**, v. 571, p. 44-50, 2007.

CORNWELL, T. L.; PRYZWANSKY, K. B.; WYATT, T. A.; LINCOLN, T. M. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependente protein kinase in vascular smooth muscle cells. **Molecular Pharmacology**, v. 40, p. 923-931, 1991.

CORREIA, C. R. D.; OLIVEIRA, C.C. A evolução da química orgânica sintética. Quo vadis? **Ciência Cultura**, v. 63, n. 1. 2011.

COTTON, J.M.; KEARNEY, M.T.; SHAH, A.M. Nitric oxide and myocardial function in heart failure: friend or foe? **Heart**, v. 88, p. 564-566, 2002.

COWLEY, A. W. The genetic dissection of essential hypertension. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 7, p. 829-840, 2006.

COX, R. H.; HAAS, K. S.; MOISEY, D. M.; TULENKO, T. N. Effects of endothelium regeneration on canine coronary artery function. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 257, p. 1681-1692, 1989.

CSONT, T.; FERDINANDY, P. Cardioprotective effects of glyceryl trinitrate: beyond vascular nitrate tolerance. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 105, p. 57-68, 2005.

DAIBER, A.; WENZEL, P.; OELZE, M.; MÜNZEL, T. New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. **Clinical Research in Cardiology**, v. 97, p. 12-20, 2008.

DAIBER, A.; OELZE, M.; WENZEL, P.; BOLLMANN, F.; PAUTZ, A.; KLEINERT, H. Heme Oxygenase-1 Induction and Organic Nitrate Therapy: Beneficial Effects on Endothelial Dysfunction, Nitrate Tolerance, and Vascular Oxidative Stress. **International Journal of Hypertension**, v. 13, p. 2012, 2012.

DAMIANI C. E. N.; ROSSONI L. V.; VASSALLO D. V. Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta. **Vascular Pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 59-66, 2003.

DAMPNEY, R. A. L.; COLEMAN, M. J.; FONTES, M. A.; HIROOKA, Y.; HORIUCHI, J.; LI, Y. W.; POLSON, J. W.; POTTS, P. D.; TAGAWA, T. Central mechanisms underlying short- and longterm regulation of the cardiovascular system. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, p. 261-268, 2002.

DARNE, B.; GIRERD, X.; SAFAR, M.; CAMBIEN, F.; GUIZE L. Pulsatile versus steady component of blood pressure: a cross-sectional analysis and a prospective analysis on cardiovascular mortality. **Hypertension**, v. 13, p. 392-400, 1989.

DEVIHA, V. S.; RENGARAJAN, P.; HUSSAIN, R. J. Modeling Blood Flow in the Blood Vessels of the Cardiovascular System Using Fractals. **Applied Mathematical Sciences**, v. 7, n. 11, p. 527-537, 2013.

DIERKS, E. A.; BURSTYN, J. N. Nitric oxide (NO[•]), the only capable of activating soluble guanylyl cyclase. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 1593-1600, 1996.

DORWARD, P. K.; RIEDEL, W.; BURKE, S. L.; GIPPS J.; KORNER P. I. The renal sympathetic baroreflex in the rabbit. Arterial and cardiac baroreceptor influences, resetting, and effects of anesthesia. **Circulation Research**, v. 57, p. 618-633, 1985.

ELLIS, A.; LI, C. G.; RAND, M. L. Differential actions of L-cysteine on responses to nitric oxide, nitroxyl anions and EDRF in the rat aorta. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, p. 315-322, 2000.

FAROUQUE, H. M.; OMAR, A. N. D.; MEREDITH, T. I. Relative contribution of vasodilator prostanoids, NO, and KATP channels to human forearm metabolic vasodilation. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 284, p. 2405-2411, 2003.

FAVALORO, J. L.; KEMP-HARPER, B. K. Redox variants of NO (NO $\cdot$ and HNO) elicit vasorelaxation of resistance arteries via distinct mechanisms. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory**, v. 296, p. 1274-1280, 2009.

FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 358, p. 113-122, 1998.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: an update. **Clinical Science**, v. 117, p. 139-155, 2009.

FÉLÉTOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? **British Journal of Pharmacology**, v. 156, p. 545-562, 2009.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived Vasoactive Factors and Hypertension: Possible Roles in Pathogenesis and as Treatment Targets. **Current Hypertension Reports**, v. 12, p. 267-275, 2010.

FLORYSZAK-WIECZOREK, J.; MILCZAREK, G.; ARASIMOWICZ, M.; CISZEWSKI, A. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? **Planta**, v. 224, p. 1363-1372, 2006.

FLUCKIGER, J. P.; SONNAY, M.; BOILLAT, N.; ATKINSON, J. Attenuation of baroreceptor reflex by general anesthetic agent in the normotensive rat. **European Journal of Pharmacology**, v.109, p. 105-109, 1985.

FOLKOW, B. Structure and function of the arteries in hypertension. **American Heart Journal**, v. 114, p. 938-948, 1987.

FÖRSTERMANN, U.; CLOSS, E. I.; POLLOCK, J. S.; NAKANE, M.; SCHWARZ, P.; GATH I.; KLEINERT H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, p. 1121-1131, 1994.

FÖRSTERMANN, U.; KLEINERT H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 352, p. 351-364, 1995.

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

FRANÇA-SILVA, M. S. **Avaliação dos efeitos induzidos pelo 2-nitrato-1,3-dibutoxiopropano (NDBP) sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos - abordagens in vivo e in vitro**. 2010. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

FRANCIS, S. H.; BUSCH, J.; CORBIN, J. D. cGMP-Dependent Protein Kinases and Cgmp Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. **Pharmacological Reviews**, v. 62, p. 525-563, 2010.

FRÜHBECK, G. Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. **Diabetes**, v. 48, p. 903-908, 1999.

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

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M., 1989. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **The FASEB Journal**, v.3, p. 2007-2018, 1989.

GARCIA, J. A. D.; INCERPI, E. K. Factors and mechanisms involved in left ventricular hypertrophy and the anti-hypertrophic role of nitric oxide. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 6, p. 409-16, 2008.

GARLAND, C. J.; MCPHERSON, G. A. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery **British Journal of Pharmacology**, v. 105, p. 429-435, 1992.

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C. L.; NIELSEN, E. B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Molecular Pharmacology**, v. 48, n. 2, p. 184-188, 1995.

GURNEY, A. M. Mechanisms of Drug-induced Vasodilation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 242-251, 1994.

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

HADDY, F. J; VANHOUTTE, P. M; FELETOU, M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n.3, p. R546-552, 2006.

HALL, J. E. Integration and regulation of cardiovascular function. **Advances in Physiology Education** , v. 22, n. 1, p. 1043-4046 ,1999.

HAMMOND, J.; BALLIGAND, J. L. Nitric oxide synthase and cyclic GMP signaling in cardiac myocytes: From contractility to remodeling. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, p. 330-340, 2012.

HERRING, N.; PATERSON, D. J. Nitric oxide-GMPc pathway facilitates acetylcholine release and bradycardia during vagal nerve stimulation in the guinea-pig in vitro. **Journal of Physiology**, v. 535, p. 507-518, 2001.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. **Bioscience Reports** v. 19, p. 51-71, 1999.

INTERAMINENSEA, L. F. L.; JUCÁB, D. M.; MAGALHAESB, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DUARTEA, G. P.; LAHLOU, S. Pharmacological evidence of calciumchannel blockade by essential oil of *Ocimum gratissimum* and its main constituent, eugenol, in isolated aortic rings from DOCA-salt hypertensive rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 5, p. 497-506, 2007.

IRVINE, J. C.; FAVALORO, J. L.; KEMP-HARPER, B. K. NO- activates soluble guanylate cyclase and Kv channels to vasodilate resistance arteries. **Hypertension**, v. 41, p. 1301-1307, 2003.

IRVINE, J. C.; FAVALORO, J. L.; WIDDOP, R. E.; KEMP-HARPER, B. K. Nitroxyl Anion Donor, Angeli's Salt, Does Not Develop Tolerance in Rat Isolated Aortae. **Hypertension**, v. 49, p. 885-892, 2007.

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

JACKSON, W. J.; Potassium Channels in the Peripheral Microcirculation. **Microcirculation**, v. 12, p. 113-127, 2005

JIN X.; SATOH-OTONASHI Y.; ZAMAMI Y.; TAKATORI S.; HASHIKAWA-HOBARA N.; KITAMURA Y.; HIROMU KAWASAKI H. New Molecular Mechanisms for Cardiovascular Disease: Contribution of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in the Regulation of Vasoconstriction in Peripheral Resistance Arteries. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 116, p. 332-336, 2011.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.I.; HARADA K.I.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K.J.; SATO, K. Calcium Movements, Distribution, and Functions in Smooth Muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 49, n. 2, p. 157-230, 1997.

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 NO-cGMP signaling through activation of Akt-eNOS-sGC pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 315-323, 2011.

KIRSCHENLOHR, H. L.; METCALFE, J.C.; GRAINGER, D. J. Cultures of proliferating vascular smooth muscle cells from adult human aorta. **Methods in Molecular Medicine**, v. 2, p. 319-34, 1996.

KLEMENSKA, E.; BERĘSEWICZ, A. Bioactivation of organic nitrates and the mechanism of nitrate tolerance. **Cardiology Journal**, v. 16, n. 1, p. 11-19, 2009.

KO, A.; HAN, J. In Duk JUNG2 and Won Sun PARK1, Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, n. 2, p. 65- 81, 2008.

KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. **Analytical Chemistry**, v. 70, p.2446-2453, 1998.

KORNER, P. I.; LANGSFORD, G.; STARR, D. The effects of chloraloseurethane and sodium pentobarbitone anesthesia on the local and autonomic components of the circulatory response to arterial hypoxia. **Journal of Physiology**, v.199, p. 283-302, 1968.

KRAVTSOV, G. M.; BRUCE, I. C.; WONG, T. M.; KWAN, C. A new view of K⁺-induced contraction in rat aorta: the role of Ca²⁺ binding. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 446, v. 5, p. 529-540, 2003.

LEDOUX, J.; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 21, p. 69-78, 2006.

LINCOLN, T. M.; DEY, N.; SELLAK, H. Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1421-1430, 2001.

MAEDA, H. H.; AKAIKE, T. T.; YOSHIDA, M. M.; SUGA, M. M. Multiple functions of nitric oxide in pathophysiology and microbiology: analysis by a new nitric oxide scavenger. **Journal of Leukocyte Biology**, p. 11-01, 1994.

MCCARRON, J. G.; BRADLEY, K. N.; MCMILLAN, D.; MUIR, T. C. Sarcolemma agonist-induced interactions between InsP3 and ryanodine receptors in Ca²⁺ oscillations and waves in smooth muscle. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 929-924, 2003.

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

MISTRY, D. I.; GARLAND, C. J. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels (BKCa) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 124, p.1131-1140, 1998.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-42, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 193-201, 2009.

MORGADO, M.; CAIRRÃO, E.; SANTOS-SILVA, A. G.; VERDE, I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 247-266, 2012.

MULVANY, M. J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. **Physiological Research**, v. 70, p. 921-951, 1990.

MÜNZEL, T.; DAIBER, A.; GORI, T. Nitrate Therapy : New Aspects Concerning Molecular Action and Tolerance. **Circulation**, v. 123, p. 2132-2144, 2011.

MURPHY, M. E.; BRAYDEN, J.E. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. **Journal of Physiology**, v. 486, n.1, p. 47-58, 1995.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide-releasing drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 43, p. 97-123, 2003.

NASEEM, K. M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 33-65, 2005.

NURMINEN, M.L.; VAPAATALO, H. Effect of intracerebroventricular and intravenous administration of nitric oxide donors on blood pressure and heart rate in anaesthetized rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, p.1422-1426, 1996.

OKABE, K.; KITAMURA, K.; KURIYAMA, H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 409, p. 561-568, 1987.

OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; MAFRA, R. A.; ARAÚJO, D. A.; CRUZ, J. S.; MEDEIROS, I. A. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). **Vascular Pharmacology**, v. 44, p. 338-344, 2006.

OMAR S. A.; ARTIME E.; WEBB A. J. A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites. **Nitric Oxide**, v. 26, p. 229-240, 2012.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 315-424, 2007.

PAGE, I. H. **Hypertension Mechanisms**. Grune and Stratton, Orlando, 1987.

PATON, J. F. R.; KASPAROV S.; PATERSON D.J. Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 12, p. 626-31, 2002.

PECHÁNOVÁ, O.; ZICHA, J.; KOJSOVÁ, S.; DOBESOVÁ, Z.; JENDEKOVÁ, L.; KUNES, J. Effect of chronic N-acetylcysteine treatment on the development of spontaneous hypertension. **Clinical Science**, v. 110, p. 235-242, 2006.

PEREIRA, A. C. **Mecanismos celulares envolvidos no relaxamento da aorta de ratos induzidos pelo composto doador de óxido nítrico cis-[Ru(bpy)2(py)(NO2)](PF6)(RuBPY)**. 2011. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, Ribeirão Preto, 2011.

PEREZ-ZOGHBI, J.F.; KARNER, C.; ITO S.; SHEPHERD, M.; ALRASHDAN, Y.; SANDERSON, M. J. Ion channel regulation of intracellular calcium and airway smooth muscle function. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 22, p. 388-397, 2009.

PINTÉROVÁ, M.; KUNEŠ, J.; ZICHA, J. Altered Neural and Vascular Mechanisms in Hypertension. **Physiological Research**, v. 60, p. 381-402, 2011.

PORTH, C. M. **Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States**. 3^a ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2010.

PUGSLEY, M. K.; TABRIZCHI, R. The vascular system an overview of structure and function. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, p. 333-340, 2000.

QUEIROZ, T. M.; MACHADO, N. T.; FURTADO, F.F.; OLIVEIRA-FILHO, A. A.; ALUSTAU, M. C.; FIGUEIREDO, C. S.; MIRANDA, G. E.C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAGA, V. A.; MEDEIROS, I. A. Vasorelaxation, Induced by Dictyota pulchella (Dictyotaceae), a Brown Alga, Is Mediated via Inhibition of Calcium Influx in Rats. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2075-2088, 2011.

RASTALDO, R.; PAGLIARO, P.; CAPPELLO, S.; PENNA, C.; MANCARDI, D.; WESTERHOF, N.; LOSANO, G. Nitric oxide and cardiac function. **Life Sciences**, v. 81, p. 779-793, 2007.

SAINANI, G. S. Role of Diet, Exercise and Drugs in Modulation of Endothelial Cell Dysfunction. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 60, 2012.

SAKAMOTO, K.; HORI, M.; IZUMI, M.; OKA, T.; KOHAMA, K.; OZAKI, H.; KARAKI, K. Inhibition of High K⁺-Induced Contraction by the ROCKs Inhibitor Y-27632 in Vascular Smooth Muscle: Possible Involvement of ROCKs in a Signal Transduction Pathway. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 92, p. 56-69, 2003.

SANJULIANI, A. F. Fisiopatologia da hipertensão arterial: conceitos teóricos úteis para a prática clínica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**, 2002.

SCATENA, R.; BOTTONI, P.; PONTOGLIO, A.; GIARDINA, B. Pharmacological modulation of nitric oxide release: new pharmacological perspectives, potential benefits and risks. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n.1, p. 61-73, 2010.

SCHMID, I.; KRALL, W. J.; UITTENBOGAART, C. H.; BRAUN, J.; GIORGI, J. V. Dead Cell Discrimination With 7-Amino-Actinomycin D in Combination With Dual Color Immunofluorescence in Single Laser Flow Cytometry. **Cytometry**, v. 13, p. 204-208, 1992.

SCHRAMMEL, A.; BEHREND, S.; SCHMIDT, K. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxidesensitive guanylyl cyclase. **Molecular Pharmacology**, v. 50, p.1-5. 1996.

SEABRA, A. B.; DURÁN, N. Nitric oxide-releasing vehicles for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, p. 1624-1637, 2010.

SERAFIM, R. A. M.; PRIMI, M. C.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I. Nitric Oxide: State of the Art in Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 386-405, 2012.

SERBAN, D. N.; NILIUS, B.; VANHOUTTE, P. M. The endothelial saga: the past, the present, the future. **European Journal of Physiology**, v. 459, p. 787-792, 2010.

SILVA, D. F.; ARAÚJO, I. G. A.; ALBUQUERQUE, J. F.; PORTO, D. L.; DIAS, K. L. G.; CAVALCANTE, K. V. M.; VERAS, R. C.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ARAÚJO, D. A. M.; CRUZ, J. S.; CORREIA, N. A.; MEDEIROS, I. A. Rotundifolone-Induced Relaxation is Mediated by BKCa Channel Activation and Cav Channel Inactivation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, p. 465-475, 2011.

SUPPES, G. J.; DASARI, M. A. Synthesis and Evaluation of Alkyl Nitrates from Triglycerides as Cetane Improvers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 42, p. 5042-5053, 2003.

TAKAHASHI, S.; LIN, H.; GESHI, N.; MORI, Y.; KAWARABAYASHI, Y.; TAKAMI, N.; MORI, M. X.; HONDA, A.; INOUE, R. Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6. **Journal of Physiology**, v. 586, n. 17, p. 4209-4223, 2008.

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

TEIXEIRA, C. E.; PRIVIERO, F. B. M.; WEBB, D. Molecular mechanisms underlying rat mesenteric artery vasorelaxation induced by the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulators bay 41-2272 [5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1h-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]pyrimidin-4-ylamine] and yc-1 [3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl indazole]. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 317, n. 1, p. 258-266, 2005.

THATCHER G. R.; NICOLESCU A. C.; BENNETT B. M.; TOADER V. Nitrates and no Release: Contemporary Aspects in Biological and Medicinal Chemistry. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, p. 1122–1143, 2004.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, n. 3, p. 215-242, 2005.

TOLVANEN, J. P.; SALLINEN, K.; WU, X.; KÄHÖNEN, M.; ARVOLA, P.; PÖRSTI, I. Variations of arterial responses in vitro in different sections of rat main superior mesenteric artery. **Pharmacology & Toxicology**, v. 83, n. 2, p. 75-82, 1998.

TSAI, E. J.; KASS, D. A. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 122, p. 216-238, 2009.

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

VANHOUTTE, P. M.; FELETOU, M.; TADDEI, S.; Endothelium-dependent contractions in hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, p. 449-458, 2005.

VETROVSKY, P.; BOUCHER, J. L.; SCHOTT, C.; BERANOVA, P.; CHALUPSKY, K.; CALLIZOT, N. L.; MULLER, B.; ENTLICHER, G.; MANSUY, D.; STOCLET, J. C. Involvement of NO in the Endothelium-Independent Relaxing Effects of N-Hydroxy-L-arginine and Other Compounds Bearing a C=NOH Function in the Rat Aorta. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 2, 2002.

WANG, L.; HENRICH, M.; BUCKLER, K.; MCMENAMIN, M.; MEE, C. J.; SATTELLE, D. B.; PATERSON, D. J. Neuronal nitric oxide synthase gene transfer decreases $[Ca^{2+}]_i$ in cardiac sympathetic neurons. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 43, p. 717-725, 2007.

WANG, P. G.; CAI, T. B.; TANIGUCHI, N. **Nitric Oxide Donors**. WILEY-VCH, Weinheim, 2005.

WANG, S. P.; ZANG, W. J.; KONG, S. S.; YU, X. J.; SUN, L.; ZHAO, X. F.; WANG, S. X.; ZHENG, X. H. Vasorelaxant effect of isopropyl 3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoate, a novel metabolite from *Salvia miltiorrhiza*, on isolated rat mesenteric artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 579, p. 283-288, 2008.

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

WEBB, R. C.; Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, p. 201-206, 2003.

WINNIFORD, M. D.; KENNEDY, P. L.; WELLS, P. J.; HILLIS, L. D. Potentiation of nitroglycerin-induced coronary dilatation by N-acetylcysteine. **Circulation**, v. 73, n. 1, p. 138-142, 1986.

XU, X.; LEE, K. S. Characterization of the ATP-inhibited K_s current in canine coronary smooth muscle cells. **Pflügers Archiv**, v. 427, p. 110-120, 1994.

ZAFARULLAH, M.; LIA, W. Q.; SYLVESTER, J.; AHMAD, M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 6-20, 2003.

ZHAO, Y.; BRANDISH, H. E.; DIVALENTIN, M.; SCHELVIS, J. P. M.; BABCOCK, G. T.; MARLETTA, M. A. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. **Biochemistry**, v. 39, p. 10848-10854, 2000.

ZIMPFER, M.; MANDERS, W. T.; BARGER, A. C.; VATNER, S. F. Pentobarbital alters compensatory neural and humoral mechanisms in response to hemorrhage. **American Journal of Physiology**, v. 243, p. 713-721, 1982.