

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

MARIA DO CARMO DE ALUSTAU FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO VASODILATADOR DOS NITRATOS
ORGÂNICOS GTN, NTHF, NCOE E BIS-NTHF EM ARTÉRIA E VEIA
ISOLADAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO**

**JOÃO PESSOA
2015**

MARIA DO CARMO DE ALUSTAU FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO VASODILATADOR DOS NITRATOS
ORGÂNICOS GTN, NTHF, NCOE E BIS-NTHF EM ARTÉRIA E VEIA
ISOLADAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO**

Tese 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 obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

**JOÃO PESSOA
2015**

F363c Fernandes, Maria do Carmo de Alustau.
Caracterização do efeito vasodilatador dos nitratos orgânicos GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF em artéria e veia isoladas de cordão umbilical humano / Maria do Carmo de Alustau Fernandes.- João Pessoa, 2015.
182f. : il.
Orientador: Isac Almeida de Medeiros
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. Farmacologia. 3. Nitratos orgânicos. 4. Vasos umbilicais humanos. 5. Óxido nítrico. 6. Cálcio. 7. ROCK.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

MARIA DO CARMO DE ALUSTAU FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO VASODILATADOR DOS NITRATOS
ORGÂNICOS GTN, NTHF, NCOE E BIS-NTHF EM ARTÉRIA E VEIA
ISOLADAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO**

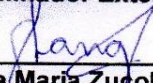
Tese de Doutorado Aprovada em 31/08/2016

Banca examinadora

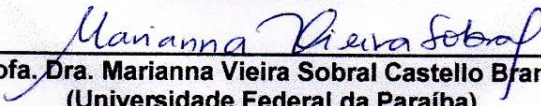


Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientador

Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Externo



Profa. Dra. Silvana/Maria Zucolotto Langassner
(Universidade Federal do Rio Grande do Norte)
Examinador Externo



Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Interno

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

Dedicatória



Este trabalho é dedicado aos meus amores:

À minha mãe-amiga, **Maria Paulina**, um exemplo de mãe, de mulher, de garra, de dignidade, que nunca mediu esforços para proporcionar o melhor que fosse possível para mim e meu irmão, sempre mostrando que a maior riqueza que poderia nos deixar seria nossos estudos.

Ao meu pai, **Gilvan Fernandes**, por ser um exemplo de superação de todos os obstáculos que a vida pode dar, sempre com o pensamento que devemos ser felizes independentemente do que aconteça, e que “em meio de toda dificuldade sempre existe uma oportunidade”.

Ao meu humano amor, **Lázaro Robson**, que me mostrou que “com seu amor veio me lembrar que Deus cuida de mim quando fala pela sua voz e me diz: coragem”.

Ao meu irmão, **Newton**, e sua família que sempre me apoiaram e compreenderam minha ausência durante esse longo tempo.

A todos da família **Alustau** que são essenciais na minha vida, sempre me dando todo o amor que podem, acreditando sempre na minha capacidade, até mesmo quando eu duvido, e vibrando em todas as minhas conquistas.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Ao nosso **Deus**, que sempre me presenteou com mais do que eu mereço.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**, por ter me iniciado não só no mundo da pesquisa, mas também no mundo da docência; por ter me ensinado que na vida precisamos correr atrás do que queremos e não apenas esperar que aconteça; por não ter desistido e sempre ter acreditado em mim, nos meus momentos de dificuldade; e que, por isso, nestes doze anos e quatro meses, tornou-se uma pessoa essencial para minha trajetória.

A todos envolvidos no projeto de cordão umbilical **Fabíola, Leônidas, Marden, Mayara, Natália, Priscilla Maria e Tays Amanda**, os quais foram essenciais para o desenvolvimento e realização deste trabalho, de forma que eu não tenho palavras e atitudes para agradecê-los. A **Anaís, Luara, Mayumi, Nataly, Priscilla Crispiniano e Raphael** que, em algum momento, também auxiliaram no dia a dia do laboratório.

Às **parturientes** que disponibilizaram os cordões umbilicais, sem os quais a pesquisa não seria possível.

À **Prefeitura Municipal de João Pessoa**, por ter permitido o acesso ao Instituto Cândida Vargas.

Aos profissionais da **Maternidade Cândida Vargas**, sempre solícitos em nos auxiliar, em especial à **Sabrina de Melo Gomes**, médica residente de obstetria que ficou responsável pela coleta dos cordões umbilicais.

Aos profissionais do HULW e, em especial, aos do comitê em pesquisa humana, que foram gentis e pacientes ao cederem informações e nos orientar durante o processo para aprovação do projeto.

Ao **Prof. Petrônio Athayde Filho** e aos alunos de doutorado **Alexsandro dos Santos e Cláudia**, pela gentileza ao ceder os compostos NTHF, NCOE e Bis-NTHF.

À equipe do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: **Adriana, Alzimary, Arthur, Bruna, Fátima de Lourdes, Hassler, Jânio, José George, Lidiane, Lisandra, Lorena, Kívia, Matânia, Mônica, Pablo, Rayanne, Suênia, Tereza, Valéria, Thandy e Walma**, por todo companheirismo e apoio.

Aos professores **Islania Giselia, Robson Veras e Thaís Porto** por serem essenciais no dia a dia do nosso laboratório.

Aos amigos, em especial **Abrahão, Camila, Danielle, Fernanda, Heloísa, Inara Rosas, Karine, Mariana, Priscilla e Thyago**, que sempre se fizeram presentes, tanto nos momentos felizes como difíceis dessa jornada.

Aos funcionários que fazem parte não só da pós-graduação mas do nosso dia a dia no laboratório: **Caroline Mangueira, Crispim Duarte, Luiz Cordeiro, Maria, Mônica e Tânia Maria**.

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

**“A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.”
(Guimarães Rosa)**

Resumo



RESUMO

ALUSTAU-FERNANDES, M. C. **Caracterização do efeito vasodilatador dos nitratos orgânicos GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF em artéria e veia isoladas de cordão umbilical humano.** 2015. 182f. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) PgPNSB/CCS/UFPB, 2015.

Vasos umbilicais humano (HUCV), muitas vezes considerado lixo biológico, são bons modelos para avaliação de substâncias vasoativas. O efeito do trinitrato de gliceril (GTN) já foi caracterizado em vários vasos sanguíneos animais, mas em HUCV foi apenas relatado que este nitrato apresenta pouco efeito. O nitrato de tetra-hidrofurfurilo (NTHF) e o 13-nitrato-*cis*-9-octadecanoato de etila (NCOE) são doadores de óxido nítrico (NO), cujo efeito foi caracterizado em vasos animais. O 1,2-bis(tetrahidrofuran-2-il)etano-1,2-diildinitrato (BIS-NTHF) é um composto inédito (duas moléculas de NTHF) que não possui estudos farmacológicos. O objetivo deste estudo foi implantar e padronizar a técnica envolvendo HUCV, e caracterizar o efeito desses quatro nitratos orgânicos tanto em anéis de artéria (HUA) como veia (HUV) isoladas de cordão. A padronização da técnica mostrou que 3 g e 3h são, respectivamente, a tensão e tempo ideais para experimentos com os vasos umbilicais, além do fato de que estes apresentam uma queda espontânea tanto do tônus basal como do contrátil. O estudo com os nitratos mostrou que esses compostos relaxaram o tônus basal de HUCV. Todos os nitratos induziram vasorrelaxamento, em ambos os vasos umbilicais pré-contraídos com serotonina (5-HT), com efeitos máximos superiores a 90%, e com maior eficácia em relaxar HUA do que HUV. Nesta situação, GTN foi o nitrato mais potente em causar vasodilatação, BIS-NTHF apresentou um valor de potência intermediário, enquanto que NCOE e NTHF foram os menos potentes em relaxar HUV e HUA, respectivamente. Quando os anéis de HUA foram pré-contraídos com KCl 60 mM, houve uma atenuação da vasodilatação promovida pelos nitratos. GTN e NTHF também apresentaram o vasorrelaxamento diminuído nos anéis de HUV pré-contraídos com KCl 60 mM, enquanto NCOE e BIS-NTHF tiveram seus efeitos de forma semelhante aos anéis pré-contraídos com 5-HT. A pré-incubação de GTN, NTHF e BIS-NTHF atenuou as contrações induzidas por 5-HT, em anéis de HUA. Adicionalmente, GTN e BIS-NTHF também inibiram a contração estimulada por 5-HT em HUV. Em contrapartida, a pré-incubação de NTHF, em HUV, e de NCOE, tanto em HUV como em HUA, levaram à inibição menor, quando comparados aos outros nitratos. GTN, NTHF e BIS-NTHF inibiram o componente fásico e tônico da contração induzida por 5-HT, na ausência do Ca^{2+} extracelular. NCOE, por sua vez, foi mais eficaz em inibir a contração tônica. A pré-incubação de 10 μ M de ODQ, inibidor da ciclase de guanilil solúvel, fez com que a resposta vasodilatadora de GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF fosse atenuada de maneira significativa. A pré-incubação de 10 mM de TEA, um bloqueador de canais para potássio, em HUA diminuiu a resposta relaxante dos quatro nitratos, não alterando o efeito em HUV. Diante do exposto, pode-se concluir que os nitratos orgânicos GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF causam vasorrelaxamento de anéis de HUCV, tanto no tônus basal quanto de contrações induzidas por 5-HT ou KCl. O mecanismo de ação dos nitratos nestes vasos humanos envolve ativação da sGC e de canais para potássio; e inibição da entrada de cálcio, liberação dos estoques deste íon do retículo sarcoplasmático e da atividade da ROCK.

Palavras-chave: Nitratos orgânicos. Vasos umbilicais humano. Óxido nítrico. Cálcio. ROCK.

Abstract

ABSTRACT

ALUSTAU-FERNANDES, M. C. **Characterization of the vasodilator effect of organic nitrates GTN NTHF, NCOE and BIS NTHF in artery and vein isolated from human umbilical cord.** 2015. 182f. Doctoral thesis (Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) PgPNSB/CCS/UFPB, 2015.

Human umbilical cord vessels (HUCV), often considered biological waste, are good models for evaluation of vasoactive substances. The effect of glyceryl trinitrate (GTN) has been characterized in several animal blood vessels, but this nitrate presents little effect on HUCV. The tetrahydrofurfuryl nitrate (NTHF) and 13-cis-9-octadecanoate acetate nitrate (NCOE) are nitric oxide (NO) donors, whose effect has been characterized in animal vessels. 1,2-bis (tetrahydrofuran-2-yl) ethane-1,2-diildinitrato (BIS-NTHF) is a novel compound (two molecules of NTHF) that has no pharmacological studies. The aim of this study was to implement and standardize the technique involving HUCV, and characterize the effect of these four organic nitrates both in artery (HUA) and vein (HUV) rings isolated from umbilical cord. The standardization of the technique showed that 3g and 3h are, respectively, the ideal voltage and time to experiment with the umbilical vessels, besides the fact that it presents a spontaneous decrease both basal tone as the contractile. The study of nitrates showed that these compounds have relaxed the basal tone of HUCV. All nitrate induced vasorelaxation in both umbilical vessels pre-contracted with serotonin (5-HT), with maximum effects than 90%, and more effectively in relaxing HUA than HUV. In this situation, GTN was the most potent nitrate in causing vasodilation, BIS NTHF presented an intermediate power value, while NCOE and NTHF were less potent in relaxing HUV and HUA, respectively. When HUA rings were pre-contracted with KCl 60 mM, there was an attenuation of vasodilation promoted by nitrates. GTN and the NTHF also showed decreased vasorelaxation in HUV rings contracted with KCl 60 mM, while NCOE and BIS-NTHF have effects similar to the rings pre-contracted with 5 HT. Preincubation of GTN, BIS-NTHF and NTHF attenuated contractions induced by 5-HT in HUA rings. Additionally, GTN and BIS-NTHF also inhibited contraction stimulated by 5-HT in HUV. In contrast, preincubation of NTHF in HUV, and NCOE both in HUV as HUA led to lower inhibition when compared with the other nitrates. GTN, NTHF and BIS-NTHF inhibited the phasic and tonic components of the contraction induced by 5-HT in the absence of extracellular Ca^{2+} . NCOE was more effective to inhibit the tonic contraction. Pre-incubation of 10 μ M of ODQ, inhibitor of soluble cyclase guanylyl, attenuated significantly the vasodilator response to GTN, NTHF, NCOE and BIS NTHF was. Preincubation of 10 mM TEA, a blocker of potassium channels, decreased the relaxant response of the four nitrates in HUA, while do not alter the effect in HUV. In view of what has been exposed here, it can be concluded that GTN, NTHF, NCOE and BIS-NTHF cause vasorelaxation of HUCV rings, both in basal tone as contractions induced by 5-HT or KCl. The mechanism of nitrates action in these human vessels involves activation of sCG and channels for potassium; and inhibition of calcium entry, release of stocks of this ion by sarcoplasmic reticulum and ROCK activity.

Keywords: Organic nitrates. Umbilical cords vessels. Nitric oxide. Calcium. ROCK

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia do Cordão Umbilical.....	31
Figura 2 – Papel dos Canais para Potássio nos HUCVs.....	35
Figura 3 – Representação Esquemática da via do Cálcio Durante a Contração Vascolar.....	36
Figura 4 – Representação Esquemática da via RhoA-ROCK Durante a Contração Vascolar.....	38
Figura 5 – Reações do NO para Formação de RNS.....	40
Figura 6 – Representação Esquemática da via NO-sGC-PKG Durante o Relaxamento Vascolar.....	42
Figura 7 – Estrutura Química de Doadores Clássicos de NO.....	44
Figura 8 – Estruturas Químicas de Nitratos Orgânicos mais Relevantes Clinicamente.....	45
Figura 9 – Reações para Obtenção do NTHF.....	48
Figura 10 – Reações para Obtenção do BIS-NTHF.....	49
Figura 11 – Reações para Obtenção do NCOE.....	49
Figura 12 – Estrutura Química dos Nitratos Orgânicos Utilizados no Estudo.....	50
Figura 13 – Disposição dos Vasos do Cordão Umbilical.....	56
Figura 14 – Aparato Utilizado nos Experimentos com HUCV.....	58
Figura 15 – Estabilização dos HUCV.....	65
Figura 16 – Controle da Contração Induzida por 5-HT em HUCV em Função do Tempo.....	76
Figura 17 – Efeito de GTN sobre HUCV Pré-contraídos com 5-HT.....	79
Figura 18 – Efeito de NTHF sobre HUCV Pré-contraídos com 5-HT.....	81
Figura 19 – Efeito de NCOE sobre HUCV Pré-contraídos com 5-HT.....	83
Figura 20 – Efeito de BIS-NTHF sobre HUCV Pré-contraídos com 5-HT.....	85

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Controle do Tônus Basal de HUCV em Função do Tempo.....	67
Gráfico 2 – Efeito do Cremofor sobre o Tônus Basal de HUCV.....	68
Gráfico 3 – Efeito de GTN sobre o Tônus Basal HUCV.....	69
Gráfico 4 – Efeito de NTHF sobre o Tônus Basal HUCV.....	70
Gráfico 5 – Efeito de NCOE sobre o Tônus Basal HUCV.....	71
Gráfico 6 – Efeito de BIS-NTHF sobre o Tônus Basal HUCV.....	72
Gráfico 7 – Comparação da Eficácia do Relaxamento do Tônus Basal de HUV Induzido pelos Nitratos.....	73
Gráfico 8 – Comparação da Potência do Relaxamento do Tônus Basal de HUV Induzido pelos Nitratos.....	74
Gráfico 9 – Comparação da Eficácia do Relaxamento do Tônus Basal de HUA Induzido pelos Nitratos.....	75
Gráfico 10 – Comparação da Potência do Relaxamento do Tônus Basal de HUA Induzido pelos Nitratos.....	76
Gráfico 11 – Controle da Contração Induzida por 5-HT em HUCV em Função do Tempo.....	78
Gráfico 12 – Efeito do Cremofor sobre o Tônus Contrátil de HUCV.....	79
Gráfico 13 – Efeito de GTN em HUCV Pré-contraídos com 5-HT.....	81
Gráfico 14 – Efeito de NTHF em HUCV Pré-contraídos com 5-HT.....	83
Gráfico 15 – Efeito de NCOE em HUCV Pré-contraídos com 5-HT.....	85
Gráfico 16 – Efeito de BIS-NTHF em HUCV Pré-contraídos com 5-HT.....	87
Gráfico 17 – Comparação da Eficácia da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por 5-HT em HUV.....	88
Gráfico 18 – Comparação da Potência da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por 5-HT em HUV.....	89
Gráfico 19 – Comparação da Eficácia da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por 5-HT em HUA.....	90
Gráfico 20 – Comparação da Potência da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por 5-HT em HUA.....	91
Gráfico 21 – Efeito de GTN em HUV Pré-contraídos com KCl 60 mM.....	92
Gráfico 22 – Efeito de GTN em HUA Pré-contraídos com KCl 60 mM.....	93

Gráfico 23 – Efeito de NTHF em HUV Pré-contraídos com KCl 60 mM.....	94
Gráfico 24 – Efeito de NTHF em HUA Pré-contraídos com KCl 60 mM.....	95
Gráfico 25 – Efeito de NCOE em HUV Pré-contraídos com KCl 60 mM.....	96
Gráfico 26 – Efeito de NCOE em HUA Pré-contraídos com KCl 60 mM.....	97
Gráfico 27 – Efeito de BIS-NTHF em HUV Pré-contraídos com KCl 60 mM...	98
Gráfico 28 – Efeito de BIS-NTHF em HUA Pré-contraídos com KCl 60 mM...	99
Gráfico 29 – Comparação da Eficácia da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por KCl 60 mM em HUV.....	100
Gráfico 30 – Comparação da Potência da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por 5-HT em HUV.....	101
Gráfico 31 – Comparação da Eficácia da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por KCl 60 mM em HUA.....	102
Gráfico 32 – Comparação da Potência da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por 5-HT em HUA.....	103
Gráfico 33 – Efeito da Pré-incubação de GTN sobre a Contração Induzida por 5-HT.....	104
Gráfico 34 – Efeito da Pré-incubação de NTHF sobre a Contração Induzida por 5-HT.....	105
Gráfico 35 – Efeito da Pré-incubação de NCOE sobre a Contração Induzida por 5-HT.....	106
Gráfico 36 – Efeito da Pré-incubação de BIS-NTHF sobre a Contração Induzida por 5-HT.....	107
Gráfico 37 – Comparação dos Efeitos da Pré-incubação de Nitratos na Contração Induzida por 5-HT na Presença do Cálcio Extracelular em HUV....	108
Gráfico 38 – Comparação dos Efeitos da Pré-incubação de Nitratos na Contração Induzida por 5-HT na Presença do Cálcio Extracelular em HUA....	109
Gráfico 39 – Efeitos da Pré-incubação de GTN na Contração Induzida por 5-HT na Ausência de Cálcio Extracelular.....	110
Gráfico 40 – Efeitos da Pré-incubação de NTHF na Contração Induzida por 5-HT na Ausência de Cálcio Extracelular.....	111
Gráfico 41 – Efeitos da Pré-incubação de NCOE na Contração Induzida por 5-HT na Ausência de Cálcio Extracelular.....	112

Gráfico 42 – Efeitos da Pré-incubação de NCOE na Contração Induzida por 5-HT na Ausência de Cálcio Extracelular.....	113
Gráfico 43 – Comparação dos Efeitos da Pré-incubação de Nitratos na Contração Fásica Induzida por 5-HT, na Ausência de Cálcio Extracelular, em HUV.....	114
Gráfico 44 – Comparação dos Efeitos da Pré-incubação de Nitratos na Contração Tônica, Induzida por 5-HT, na Ausência de Cálcio Extracelular, em HUV.....	115
Gráfico 45 – Comparação dos Efeitos da Pré-incubação de Nitratos na Contração Fásica, Induzida por 5-HT, na Ausência de Cálcio Extracelular em HUA.....	116
Gráfico 46 – Comparação dos Efeitos da Pré-incubação de Nitratos na Contração Tônica, Induzida por 5-HT, na Ausência de Cálcio Extracelular em HUV.....	117
Gráfico 47 – Envolvimento da sGC no Efeito de GTN em HUV Pré-contráídos com 5-HT.....	118
Gráfico 48 – Envolvimento da sGC no Efeito de GTN em HUA Pré-contráídos com 5-HT.....	119
Gráfico 49 – Envolvimento da sGC no Efeito de NTHF em HUV Pré-contráídos com 5-HT.....	120
Gráfico 50 – Envolvimento da sGC no Efeito de NTHF em HUA Pré-contráídos com 5-HT.....	121
Gráfico 51 – Envolvimento da sGC no Efeito de NCOE em HUV Pré-contráídos com 5-HT.....	122
Gráfico 52 – Envolvimento da sGC no Efeito de NCOE em HUA Pré-contráídos com 5-HT.....	123
Gráfico 53 – Envolvimento da sGC no Efeito de BIS-NTHF em HUV Pré-contráídos com 5-HT.....	124
Gráfico 54 – Envolvimento da sGC no Efeito de BIS-NTHF em HUA Pré-contráídos com 5-HT.....	125
Gráfico 55 – Envolvimento dos Canais para Potássio no Efeito de GTN em HUV Pré-contráídos com 5-HT.....	126

Gráfico 56 – Envolvimento dos Canais para Potássio no Efeito de GTN em HUA Pré-contraídos com 5-HT.....	127
Gráfico 57 – Envolvimento dos Canais para Potássio no Efeito de NTHF em HUV Pré-contraídos com 5-HT.....	128
Gráfico 58 – Envolvimento dos Canais para Potássio no Efeito de NTHF em HUA Pré-contraídos com 5-HT.....	129
Gráfico 59 – Envolvimento dos Canais para Potássio no Efeito de NCOE em HUV Pré-contraídos com 5-HT.....	130
Gráfico 60 – Envolvimento dos Canais para Potássio no Efeito de NCOE em HUA Pré-contraídos com 5-HT.....	131
Gráfico 61 – Envolvimento dos Canais para Potássio no Efeito de BIS-NTHF em HUA Pré-contraídos com 5-HT.....	132

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Composição do Krebs Modificado para o Transporte de Cordão Umbilical Humano.....	54
Quadro 2 – Composição da Solução de Krebs <i>Henseleit</i>	57
Quadro 3 – Composição da Solução KCl 60 mM.....	59
Quadro 4 – Composição da Solução de Krebs <i>Henseleit</i> zero cálcio.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[NO]	Concentração de óxido nítrico
[Ca²⁺]_i	Concentração de cálcio intracelular
5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
5-HT_{1B/D}	Receptor da 5-hidroxitriptamina: subtipos 1A e 1D
5-HT_{2A}	Receptor da 5-hidroxitriptamina: subtipos 2 ^a
AC	Ciclase de adenilil
ALDH	Aldeído desidrogenase
ATHF	Álcool tetra-hidrofurfurílico
ATP	Trifosfato de adenosina
BIS-NTHF	1,2-bis(tetrahidrofuran-2-il)etano-1,2-diil dinitrato
BK_{Ca}	Canais para potássio sensíveis ao cálcio de grande condutância
C₆H₁₂O₆	Glicose
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CaM	Calmodulina
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
C_v	Canais para cálcio sensíveis à voltagem
C_v-L	Canais para cálcio sensíveis à voltagem tipo L
cGMP	3,5-monofosfato de guanosina cíclico
CN⁻	Cianeto
CO₂	Gás carbônica
CYP	Citrocromo P450
DEA/NO	Dietilamino NONOato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido bis(2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético
E_{máx}	Efeito máximo
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial
e.p.m.	Erro padrão da média
ET-1	Endotelina 1
EtOH	Etanol
GDI	Inibidor de dissociação de nucleotídeo guanina

GDP	Difosfato de guanosina cíclico
GEF	Fator de troca de nucleotídeo cíclico
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GSNO	S-nitrosoglutationa
GTN	Trinitrato de gliceril ou Nitroglicerina
GTP	Trifosfato de guanosina
HEPES	Ácido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfônico
H₂O	Água
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HNO₃	Ácido nítrico
HUA	Artéria de cordão umbilical humano
HUCV	Vasos de cordão umbilical humano
HUV	Veia de cordão umbilical humano
HUVECs	Células endoteliais de veia de cordão umbilical humano
HULW	Hospital Universitário Lauro Wanderley
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzível
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP₃R	Receptores do 1,4,5-trisfosfato de inositol
ISDN	Dinitrato de isossorbida
ISMN	Mononitrato de isossorbida
K_{2P}	Canais para potássio com domínio de dois poros
K_{ATP}	Canais para potássio sensíveis ao trifosfato de adenosina
K_{Ca}	Canais para potássio sensíveis ao cálcio
KCl	Cloreto de potássio
KCl 60 mM	Solução de Krebs Henseleit com [KCl] a 60 mM
KH₂PO₄	Fosfato de potássio
K_{IR}	Canais para potássio retificadores de entrada
MgSO₄	Sulfato de magnésio
MLC	Cadeia leve da miosina
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina
MLCP	Fosfatase da cadeia leve da miosina
K_v	Canais para potássio sensíveis à voltagem

n	Número de experimentos realizados
NA	Noradrenalina
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NCOE	13-nitrato- <i>cis</i> -9-octadecanoato de etila
nNOS	Sintase do óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
NO₂	Dióxido de nitrogênio
NO⁻	Nitroxil
NO⁺	Nitrosônio
NO₂⁻	Nitrito
NO₃⁻	Nitrato
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
NTHF	Nitrato tetra-hidrofurfurílico
O₂	Oxigênio
O₂⁻	Ânion superóxido
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
ONOO⁻	Peroxinitrito
PA	Pressão arterial
pO₂	Pressão de oxigênio
PDE	Fosfodiesterase
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
pD₂	Logaritmo negativo da concentração responsável por 50% do E _{máx}
PETN	Tetranitrato de pentaeritritil
PGI₂	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase
PKG	Proteína cinase dependente de GMPc

RhoA.GDP.GDI	RhoA ligada ao difosfato de guanosina e ao inibidor de dissociação de nucleotídeo guanina
RhoA.GTP	RhoA ligada ao trifosfato de guanosina
Rho-GEF	Proteína Rho ligada ao fator de troca de nucleotídeo cíclico
ROCK	Rho-cinase
RONO₂	Nitratos organânicos
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas do oxigênio
RyR	Receptores de rianodina
sGC	Ciclase de guanilil solúvel
SNP	Nitroprussiato de sódio
SR	Retículo sarcoplasmático
TEA	Tetraetilamônio
TxA₂	Tromboxano A ₂
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VSMC	Células do músculo liso vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
1.1 OBJETIVOS	29
1.1.1 Objetivos Gerais.....	29
1.1.2 Objetivos Específicos	29
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	31
2.1 CARACTERÍSTICAS DOS VASOS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO	31
2.2 TÔNUS VASCULAR	33
2.2.1 Canais para Potássio	33
2.2.2 Canais de Cálcio	35
2.2.3 Via RhoA/ Rho Cinase.....	37
2.2.4 Óxido Nítrico.....	39
2.2 DOADORES DE NO	43
2.2.1 Nitratos Orgânicos	45
3 MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1 TIPO E PERÍODO DO ESTUDO	52
3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA DO ESTUDO	52
3.3 LOCAL DE COLETA	52
3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	52
3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	53
3.6 ASPECTOS LEGAIS DA PESQUISA.....	53
3.7 DILUIÇÃO DAS FERRAMENTAS FARMACOLÓGICAS	53
3.8 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DOS NITRATOS.....	54
3.9 Padronização Da Técnica Para Utilização Dos Vasos Umbilicais	54
3.9.1 Procedimento para Coleta do Cordão Umbilical.....	54
3.9.2 Procedimento para Obtenção dos HUCV	55
3.9.2 Procedimento para a Experimentação com HUCV	57
3.10 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS COM HUCV	59
3.10.1 Investigação do Efeito dos Nitratos Orgânicos no Tônus Basal	59
3.10.2 Investigação do Efeito dos Nitratos Orgânicos sobre Contrações Induzidas por 10 µM de 5-HT.....	60
3.10.3 Investigação do Efeito dos Nitratos Orgânicos sobre Contrações Induzidas por solução de Krebs Modificada com 60 mM de KCl	60
3.10.5 Investigação da Influência da Pré-incubação dos Nitratos Orgânicos sobre Contrações Induzidas por 5-HT na Ausência de Cálcio Extracelular	61
4 RESULTADOS	65
4.1 PADRONIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO hucv	65
4.2 EFEITO SOBRE O TÔNUS BASAL DE HUCV	66

4.1.1 Efeito dos Nitratos sobre o Tônus Basal de HUCV.....	68
4.2 EFEITO SOBRE ANÉIS DE HUCV PRÉ-CONTRAÍDOS COM 10 µM DE 5-HT	76
4.2.1 Efeito dos Nitratos sobre Anéis de HUCV Pré-contraídos com 10 µM de 5-HT	79
4.3 EFEITO DOS NITRATOS ORGÂNICOS SOBRE ANÉIS DE HUCV PRÉ -CONTRAÍDOS COM KCL 60 mM.....	91
4.4 EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DE NITRATOS ORGÂNICOS SOBRE A CONTRAÇÃO INDUZIDA POR 5-HT NA PRESENÇA DE CÁLCIO EXTRACELULAR	103
4.5 EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DE NITRATOS ORGÂNICOS SOBRE A CONTRAÇÃO INDUZIDA POR 5-HT NA AUSÊNCIA DE CÁLCIO EXTRACELULAR .	109
4.6 ENVOLVIMENTO DA SGC NO EFEITO DOS NITRATOS ORGÂNICOS SOBRE ANÉIS DE HUCV PRÉ-CONTRAÍDOS 5-HT	117
4.7 ENVOLVIMENTO DE CANAIS PARA POTÁSSIO NO EFEITO DOS NITRATOS ORGÂNICOS SOBRE ANÉIS DE HUCV PRÉ-CONTRAÍDOS 5-HT	125
5 DISCUSSÃO.....	134
6 CONCLUSÃO.....	148
REFERÊNCIAS.....	150
ANEXOS	
APÊNDICE	

Introdução



1 INTRODUÇÃO

De acordo com o relatório recente do *Global Burden of Disease Study* de 2010, a mortalidade causada por doenças cardiovasculares associadas à idade diminuiu 21% em todo o mundo nos últimos vinte anos (LOZANO et al., 2012; ZHAO et al., 2015). Entretanto, esta redução foi observada apenas nos países de alta renda, enquanto que nos países de baixa e média renda foi observado o aumento de mortes causadas por essas enfermidades (LOZANO et al., 2012; MORAN et al., 2014; FEIGIN et al., 2014).

Doenças que acometem o sistema cardiovascular, como cardiomiopatias, disfunção isquêmica cardíaca, insuficiência cardíaca congestiva, doença arterial coronariana, hipertensão e aterosclerose, envolvem uma multiplicidade de fatores genéticos e ambientais (KUMAR et al., 2007). Estes fatores frequentemente apresentam interações não lineares, bem como são dependentes de gênero, idade e até mesmo das condições maternas (MacLELLAN; WANG; LUSIS, 2012).

Apesar dos avanços consideráveis na farmacoterapia das doenças cardiovasculares, estas permanecem um dos maiores problemas do mundo (KRUM et al., 2011; PAULIS; STECKELINGS; UNGER, 2012). A limitação das terapias atuais tem estimulado a pesquisa para desenvolvimento de novos agentes com diferentes mecanismos de ação, que atuem no sistema cardiovascular e proporcionem um melhor controle da pressão arterial (PA), proteção contra os danos a órgãos, melhor tolerância e prevenção mais efetiva de doenças cardiovasculares (Van ROOIJ; OLSON, 2012; TAMARGO; DUARTE; RUILOPE, 2015).

Substâncias vasodilatadoras são utilizadas em algumas doenças. No caso das cardiovasculares, mais notavelmente na hipertensão, doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca (BANIK; BERGER, 2014). Uma classe de composto vasodilatador amplamente empregada na clínica cardiovascular é a dos doadores de óxido nítrico (NO). Estes fármacos têm sido utilizados durante a gestação devido ao fato do NO apresentar um papel chave na dinâmica vascular maternal e diminuição da resistência vascular periférica total (OUZOUNIAN; ELKAYAM, 2012; RAMSAY et al., 1994).

A maior parte dos estudos para descoberta de novas substâncias com propriedades vasorrelaxantes ocorre em vasos animais (INGELFINGER, 2013; WU et al., 1999). Os leitos vasculares animais são distintos entre si no que diz respeito à fisiologia, à densidade e ao tipo de receptores que expressam, bem como à atividade de determinadas vias de sinalização (ARAÚJO, 2011; BYLUND, 1994; GURNEY, 1994; VANHEEL; VAN; VOORDE, 2000). Estas distinções fisiológicas também são evidenciadas quando se observa a diferença entre a resposta vasodilatadora em vasos animais ou humanos que algumas substâncias apresentam (FEI et al., 2008; WU et al., 1999).

Nesse contexto, o Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba (PPgPNSB/UFPB), tem pesquisado novas substâncias que atuam no sistema cardiovascular, particularmente compostos com efeitos vasodilatadores, como nitratos orgânicos, os quais são fármacos que apresentam molécula(s) de NO em suas estruturas químicas e o liberam no organismo (ALUSTAU, 2010; FURTADO, 2013; VERAS et al., 2013; MACHADO et al., 2014).

Os estudos para investigação das ações de substâncias vasodilatadoras, nesse laboratório, ocorrem, principalmente, em artéria mesentérica superior de ratos. Nestes vasos sanguíneos, os nitratos orgânicos NTHF (nitrito tetra-hidrofurfurílico) e NCOE (13-nitrito-*cis*-9-octadecanoato de etila) apresentaram efeito vasodilatador, o qual envolveu a liberação de NO (ALUSTAU, 2010; FURTADO, 2013; VERAS et al., 2013; MACHADO et al., 2014). A partir dos efeitos de NTHF, foi sintetizado um composto caracterizado por conter duas moléculas deste nitrito: o BIS-NTHF (1,2-bis(tetrahidrofuran-2-il)etano-1,2-diil dinitrito), o qual ainda não apresenta estudos publicados em nenhum vaso sanguíneo, tratando-se de um composto inédito.

Outro nitrito orgânico, o trinitrito de gliceril ou nitroglicerina (GTN), já foi extensamente estudado em vários leitos vasculares (AHLNER et al., 1986; BRIEN et al., 1986; IGNARRO; GRUETTER, 1980), inclusive em vasos humanos (MAY et al., 1987; RAPOPORT et al., 1987; HE et al., 1989; WHITE, 1988), como os vasos

umbilicais (GRUNEWALD et al., 1995; IZUMI et al., 1994; KÄHLER et al., 1997), mas sem caracterização de seus efeitos neste modelo.

As informações sobre as características funcionais dos vasos humanos são limitadas, quando comparadas às conclusões relativas à fisiologia e à fisiopatologia arterial de estudos com animais (WU et al., 1999). Alguns estudos mostram a caracterização de receptores e vias de sinalização nos vasos de cordão umbilical humano (HUCV) (BOERSMA et al., 1999; BOGONI et al., 1996; CHAUDHURI et al., 1991; ERRASTI et al., 1999). Os componentes da microestrutura e as características bioquímicas dos HUCV são similares aos vasos arteriais de pequenos calibres. Desta forma, estes também são vasos utilizados na caracterização de substâncias vasodilatadoras (GUNDUZ et al., 2015; LEUNG et al., 2006; PROTIC et al., 2014).

Vale ressaltar que o cordão umbilical é um material biológico prontamente disponível e, geralmente, descartado após o parto (ABOUSLEIMAN et al., 2008; CAIRRÃO et al., 2009). Adicionalmente, é bem caracterizado na literatura como fonte barata e abundante de tecido vascular humano (DANIEL; McFETRIDGE, 2005; JACOBS et al., 2005; HOENICKA et al., 2008), devido à obtenção de HUCV ser mais fácil do que outros vasos humanos. Apesar disto, pouquíssimos grupos no Brasil trabalham com os vasos umbilicais.

A utilização de HUCV pode ser considerada bastante relevante como um método para avaliação dos efeitos vasculares de drogas, ao levar-se em conta a importância sobre consciência à experimentação animal para fins científicos e didáticos. Os aspectos éticos da utilização de animais em experimento estimulam a adoção de métodos alternativos sempre que possível e o uso destes seres vivos em situações de absoluta imprescindibilidade (BRASIL, 1998; BRASIL, 2008; FERRARI, 2004). A Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou em julho de 2015 uma norma para reduzir a necessidade do uso de animais em teste para pedidos de registro de medicamentos, cosméticos, produtos para saúde, produtos de limpeza, entre outros produtos (ANVISA, 2015).

Diante desse contexto, o presente estudo teve como finalidade caracterizar e comparar os efeitos de nitratos orgânicos doadores de NO sobre HUCV: GTN, NTHF,

NCOE e BIS-NTHF. Trata-se de uma pesquisa inédita, tanto no sentido de descrever e comparar a ação de nitratos orgânicos em HUCV, como pelo fato de ser um estudo pioneiro com estes vasos umbilicais humano no âmbito da Farmacologia Cardiovascular do Brasil.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Padronizar o modelo com vasos de cordão umbilical humano e caracterizar o efeito vasodilatador de nitratos orgânicos (GTN, NTHF, Bis-NTHF e NCOE) em anéis de artéria e veia de cordão umbilical humano.

1.1.2 Objetivos Específicos

Investigar e comparar os efeitos dos nitratos orgânicos sobre HUCV.

Avaliar a ação dos compostos GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF sobre: tônus basal; contração induzida por serotonina; contração induzida por KCl 60 mM.

Caracterizar o efeito vasorrelaxante dos nitratos em vasos de cordão umbilical humano, por meio da investigação do envolvimento de: ciclase de guanilil solúvel; canais para potássio; cálcio; e Rho-cinase.

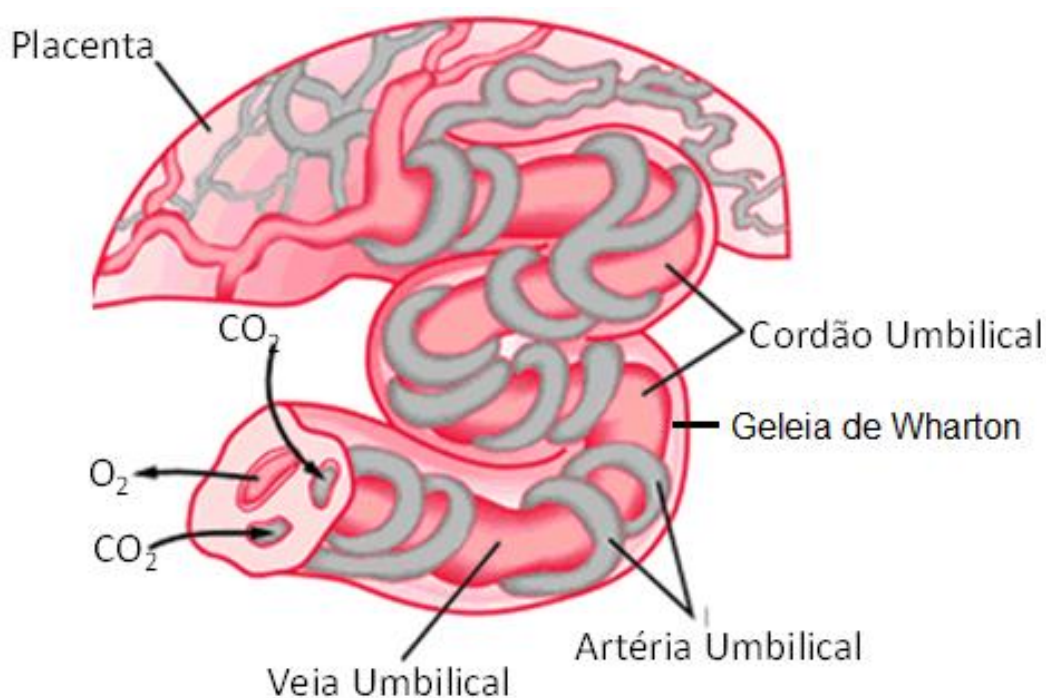
Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CARACTERÍSTICAS DOS VASOS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO

O cordão umbilical é um componente importante da placenta, caracterizado por fazer a ligação entre esta e o feto, e é responsável pelo fluxo sanguíneo materno-fetal (REIS, 2014). Ele fornece ao feto oxigênio e nutrientes que garantem seu crescimento e desenvolvimento durante a gestação (BARBIERI et al., 2011; BINBIR et al., 2012; ROMANOWICZ; BAN´KOWSKI, 2010). A estrutura do cordão umbilical é helicoidal. A disposição espiralada permite que o cordão umbilical estire ou se encurte, de forma a não estirar os vasos umbilicais em demasia, o que evita modificações acentuadas do fluxo sanguíneo ao longo do trajeto dos vasos funiculares (VASQUES et al., 2003). Ele é normalmente composto por duas artérias e uma veia, rodeadas pela geleia de Wharton, por um tecido poroso conjuntivo e por uma camada externa de célula única de âmnio (Figura 1).

Figura 1 – Anatomia do Cordão Umbilical



Estrutura anômica do cordão umbilical, que mostra a disposição das artérias e da veia no cordão

Fonte: Adaptado de <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/umbilical+cord>

A geleia de Wharton é um tecido conectivo gelatinoso, o qual consiste de uma substância fundamental amorfa, a qual contém glicosaminoglicanos, proteoglicanos e, predominantemente, ácido hialurônico, células-tronco mesenquimais e fibras colágenas (FARIVAR et al., 2015; REIS, 2014). Ela também contém células com características semelhantes às encontradas nos músculos lisos, que permite sua função contráctil (BARBIERI et al., 2011). A espessura e turgidez da geleia de Wharton variam de acordo com a expansão e contração dos vasos e podem estruturalmente evitar ou diminuir a probabilidade de hiperdistensão e de compressão dos vasos (FERGUSON; DODSON, 2009; FILIZ et al., 2011). Ela age como uma camada protetora, a qual afeta positivamente a nutrição e crescimento fetal, por proteger o fluxo sanguíneo materno-fetal de influências externas (SOBOLEWSKI et al., 2005).

A adaptação materna à gravidez é conhecida como um processo complexo, caracterizado por alterações acentuadas na perfusão uterina e função vascular sistêmica (KÄHLER et al., 2004). A HUA é um componente crítico da circulação fetoplacentar com a função vital de fornecer a perfusão e nutrição adequada para a placenta (RADENKOVIĆ et al., 2008).

Os HUCV diferem na estrutura e na função, em comparação com outros vasos sanguíneos o corpo. As duas artérias umbilicais (HUA) se encontram em volta da veia (HUV), numa forma helicoidal. O sangue flui de um modo pulsátil do feto para da placenta por meio das duas HUA, que levam o sangue desoxigenado; e da placenta para o feto através da veia umbilical, que conduzem o sangue oxigenado (FERGUSON; DODSON, 2009; FILIZ et al., 2011; MURPHY, 2005; WANG et al., 2004). Desta forma, pode-se destacar que esta circulação possui características distintas da encontrada na maioria dos vasos sanguíneos, uma vez que as artérias e veias umbilicais carregam, respectivamente, sangue rico em CO₂ e O₂.

Durante a gravidez normal, o aumento drástico do fluxo sanguíneo feto- e útero-placentários são altamente relacionados ao crescimento e à sobrevivência fetal (ROSENFELD, et al., 1974; WANG; ZHENG, 2012). O desenvolvimento e a manutenção da perfusão adequada ocorrem, principalmente, por angiogênese, remodelamento vascular e vasodilatação (MAGNESS; ZHENG, 1996; OSOL; MANDALA, 2009; OSOL; MOORE, 2014). Além dos processos biológicos, várias

substâncias estão envolvidas na alteração do tônus vascular dos HUCV (KÄHLER et al., 2004).

2.2 TÔNUS VASCULAR

O diâmetro luminal vascular e, conseqüentemente, o fluxo sanguíneo são determinados pelas células do músculo liso vascular (VSMC) (AMBERG; NAVEDO, 2013), as quais estão sob constante controle de uma variedade de mediadores com propriedades vasoconstritoras e vasodilatadoras (ALTHOFF; OFFERMANN, 2015), responsáveis por manter o tônus vascular (CHISTIAKOV; OREKHOV; BOBRYSHV, 2015; SANDOW et al., 2012). Este controle inclui vários eventos, como: despolarização da membrana; entrada e mobilização do cálcio; e ativação de proteínas contráteis (HILL et al., 2010).

Os mecanismos que regulam o estado contrátil dos HUCV são muito importantes para troca gasosa e de nutrientes entre o feto e a placenta (SANTOS-SILVA et al., 2008). A baixa resistência da circulação feto-placentária não é mantida a partir de um controle nervoso (FOX; KHONG, 1990; CAIRRÃO; SANTOS-SILVA; VERDE, 2010), uma vez que os HUCV são considerados únicos por não serem inervados pelo sistema nervoso autônomo (BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012; FOX; KHONG, 1990; REILLY; RUSSELL, 1977).

A alteração do estado contrátil VSMC dos HUCV é realizado por mecanismos parácrinos e endócrinos, ou seja, autacoides circulantes ou produzidos localmente, tanto pelas células endoteliais quanto por células da geleia de Wharton (BOURA et al., 1994; ERRASTI et al., 2009; LEUNG et al., 2006; MARTÍN et al., 2014). Os principais mediadores locais que regulam o tônus vascular dos HUCV são prostaciclina (PGI₂), NO, 5-hidroxitriptamina ou serotonina (5-HT) e íons, como cálcio e potássio (RANKIN; MCLAUGHLIN, 1979; TUFAN et al., 2003).

2.2.1 Canais para Potássio

O fluxo seletivo de íons potássio, do compartimento intra para o extracelular, através da membrana, é permitido pelos canais para potássio (JACKSON, 2000; ZHU;

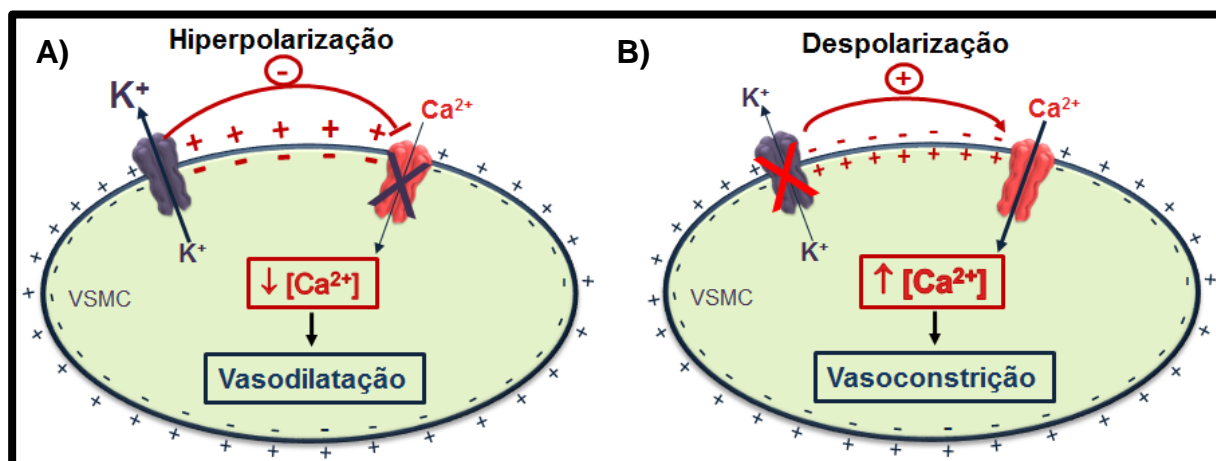
XIAO; ZHANG, 2013). Eles estão envolvidos, principalmente, na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular elétrica (MARTÍN et al., 2014), característica que faz com que estes canais tenham um papel chave na regulação do tônus vascular (JACKSON, 2005; NELSON; QUAYLE, 1995; ZHU; XIAO; ZHANG, 2013).

Alguns tipos de canais para potássio são expressos em VSMCs e células endoteliais, e são classificados com base em suas propriedades farmacológicas e biofísicas (KO et al., 2008; NELSON; QUAYLE, 1995; STANDEN; QUAYLE, 1998). Entre eles estão: canais para potássio sensíveis à voltagem (K_V); canais para potássio sensíveis ao cálcio (K_{Ca}); canais para potássio sensíveis ao trifosfato de adenosina (ATP) (K_{ATP}); canais para potássio retificadores de entrada (K_{IR}); e canais para potássio com domínio de dois poros (K_{2P}) (WERNER; LEDOUX, 2014).

Cada canal para potássio apresenta características diferenciadas, como: K_V são ativados por despolarização e importantes reguladores do potencial de membrana do músculo liso vascular em resposta a um estímulo despolarizante (KOROVKINA; ENGLAND, 2002); K_{Ca} respondem a mudanças na concentração do Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), a qual regula o potencial de membrana e é importante no controle do tônus miogênico em artérias pequenas (PARK et al., 2007); K_{ATP} tem sua função relacionada às mudanças no metabolismo celular e são alvos de uma variedade de estímulos relaxantes (TERAMOTO, 2006); K_{IR} regulam o potencial de membrana nas células musculares lisas de vários tipos de vasos de resistência de pequeno diâmetro (KNOT; ZIMMERMANN; NELSON, 1996); e K_{2P} devem ser um sensor metabólico, envolvidos na regulação aguda do fluxo sanguíneo local (WERNER; LEDOUX, 2014).

Nos HUCV, descreveu-se a presença dos canais K_V e do K_{Ca} de grande condutância (BK_{Ca}) (CAIRRÃO et al., 2008; LOVREN; TRIGGLE, 2000). A ativação dos canais para potássio leva à hiperpolarização do potencial de membrana, a qual impede a abertura dos canais para cálcio sensíveis à voltagem (Ca_V) e resulta na vasodilatação (Figura 2A) (KO et al., 2008; ZHU; XIAO; ZHANG, 2013). Em contraste, a inibição dos canais para potássio leva à despolarização do potencial de membrana, ao diminuir a saída deste íon, de modo que os Ca_V são ativados, o que resulta na vasoconstrição (Figura 2B) (HU et al., 2011).

Figura 2 – Papel dos Canais para Potássio nos HUCVs



VSMC: Célula da musculatura lisa vascular
Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

2.2.2 Canais de Cálcio

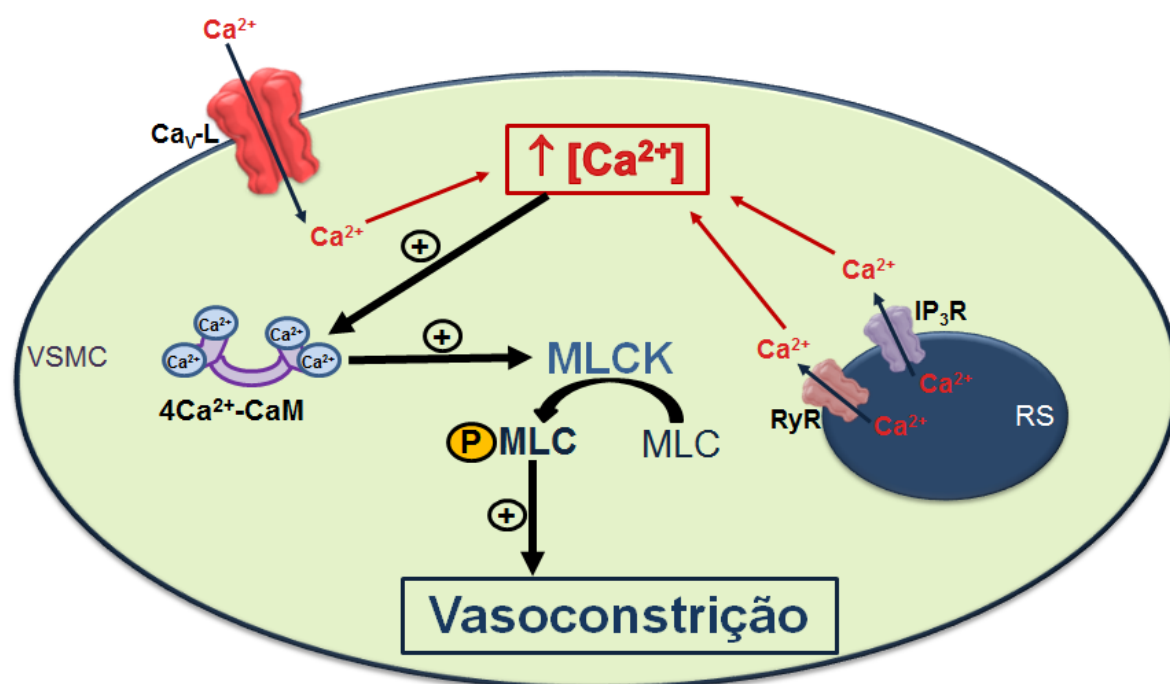
O cálcio é um íon de sinalização universal (FAMELI; van BREEMEN, 2012). Variações cíclicas da sua concentração, por meio do processo de acoplamento excitação-contração, possibilitam a regulação da contratilidade e, assim, a modulação do tônus vascular e da PA (MARCHAND et al., 2012).

Substâncias vasoconstritoras, como a 5-HT (SANTOS-SILVA; CAIRRÃO; VERDE, 2010), agem por meio da elevação da concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), bem como da sensibilidade aparente ao cálcio no processo contrátil das VSMC (LEDOUX et al, 2006).

O aumento transiente da $[Ca^{2+}]_i$ ocorre devido ao influxo de cálcio transmembranar, via Cav , ou liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (SR) (UREÑA et al., 2013). O influxo de cálcio nas VSMC é mediado principalmente pelos Cav tipo-L ($Cav-L$), com a contribuição de outros canais (MATCHKOV; KUDRYAVTSEVA; AALKJAER, 2012; MOOSMANG et al., 2003). Por outro lado, a liberação de cálcio dos estoques intracelulares é mediada por dois tipos de receptores ionotrópicos permeáveis ao cálcio: receptores de rianodina (RyR) e receptores do 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3R) (AMBERG; NAVEDO, 2013). Esse aumento transiente da $[Ca^{2+}]_i$ pode ativar: calmodulina (CaM); BK_{Ca} ; e re-estocagem para o SR (FAMELI; van BREEMEN, 2012).

A contração induzida por cálcio ocorre a partir de um complexo deste íon com a CaM, com subsequente aumento da atividade da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) (AMBERG; NAVEDO, 2013). Esta proteína cinase fosforila a cadeia leve da miosina (MLC), o que leva à interação dos filamentos de actina e miosina no ciclo das pontes cruzadas (IHARA; MacDONALD, 2007; MORGADO et al., 2012) (Figura 3). Trata-se do evento chave na contração da VSMC em resposta a um amplo espectro de sinais extracelulares (SOMLYO; SOMLYO, 2003).

Figura 3 – Representação Esquemática da via do Cálcio Durante a Contração Vascular



VSMC: Célula da musculatura lisa vascular; **Ca_v-L:** Canais de cálcio sensíveis a voltagem tipo L; **IP₃R:** Receptor de IP₃; **RyR:** Receptor de Rianodina; **CaM:** Calmodulina; **MLC:** cadeia leve da miosina; **MLCK:** Cinase da cadeia leve da miosina; **P:** fosforilação; **RS:** Retículo Sarcoplasmático
Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Em contrapartida, em resposta a um estímulo vasodilatador ou remoção do estímulo vasoconstritor, a $[Ca^{2+}]_i$ diminui, principalmente, como resultado da extrusão citoplasmática de cálcio e/ ou captação para o SR. Estes efeitos levam à inativação da MLCK e, conseqüentemente, ao vasorrelaxamento (LEDOUX et al., 2006; MORGADO et al., 2012). Alterações no estado contrátil das VSMC podem tanto

aumentar como diminuir o diâmetro vascular, o que leva ao aumento ou diminuição do fluxo sanguíneo através dos vasos, respectivamente (AMBERG; NAVEDO, 2013).

Nos HUCV, 5-HT induz contrações por influxo de cálcio do meio extracelular através dos canais de cálcio dependentes de receptor e liberação de cálcio dos estoques intracelulares. A resposta contrátil desses vasos por KCl é principalmente devido ao influxo de cálcio extracelular via Cav-L a partir da despolarização de membrana, podendo também envolver a liberação de cálcio induzida pelo cálcio (SALOM et al., 1990; TUFAN et al., 2003; WYLAM et al., 1993). Em contrapartida, há estudos que demonstram que 5-HT e KCl podem induzir contração em HUCV na ausência de cálcio no meio extracelular, o que sugere um mecanismo decorrente da liberação de cálcio dos estoques intracelulares e da Rho-cinase (ROCK) (SANTOS-SILVA; CAIRRÃO; VERDE, 2010), um dos principais alvos *downstream* da proteína com atividade GTPase, a RhoA (ANDRE; LOIRAND; SAUZEAU, 2014).

2.2.3 Via RhoA/ Rho Cinase

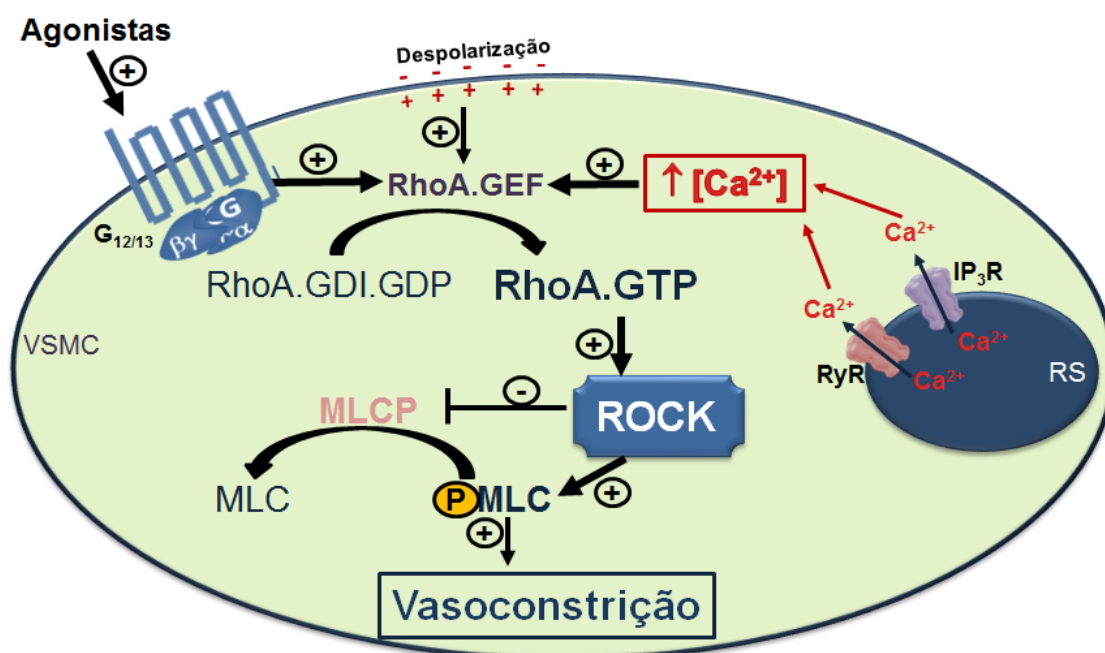
RhoA é ativada por agonistas contráteis, por meio de uma sinalização que envolve receptores acoplados à proteína G (GPCR) (PUETZ, LUBOMIROV, PFITZER, 2009), e por despolarização de membrana (UREÑA; LÓPEZ-BARNEO, 2012). Em condições de repouso, RhoA é mantida no citosol inativa, ligada ao difosfato de guanosina (GDP) e ao inibidor de dissociação de nucleotídeo guanina (GDI) (RhoA.GDP.GDI). Após ativação do GPCR acoplados às $G_{12/13}$, RhoA dissocia-se do GDI e é translocada para a membrana celular. O fator de troca de nucleotídeo cíclico da RhoA (Rho-GEF) é ativado e leva à troca de GDP por trifosfato de guanosina (GTP), tornando a RhoA ativa (RhoA.GTP) (CHERFILS; ZEGHOUF, 2013; PRUDNIKOVA; RAWAT; CHERNOFF, 2015; RAHMAN et al., 2014).

Além da proteína $G_{12/13}$, a RhoA pode ser ativada por despolarização de membrana, de maneira dependente da liberação de cálcio do SR e de ativação de canal de cálcio de membrana (SAKURADA et al., 2003; UREÑA; LÓPEZ-BARNEO, 2012). O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ leva à ativação da fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase (PI3KC- 2α), e esta, por sua vez, ativa a RhoA, o que culmina na ativação da ROCK (AZAM et al., 2007; TAKUWA et al., 2005). Em contraste com essas observações,

contrações induzidas por KCl ou 5-HT, na presença de cálcio extracelular, não parece envolver ROCK (SANTOS-SILVA; CAIRRÃO; VERDE, 2010).

A via RhoA/ROCK leva à sensibilização do cálcio em contrações tônicas (MITA et al., 2002; RATZ et al., 2005; UREÑA; LÓPEZ-BARNEO, 2012). Tal mecanismo ocorre pelo fato de que a via RhoA/ROCK ativada fosforila e inativa a fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), impedindo a desfosforilação da MLC (KIMURA et al., 1996; FENG et al., 1999). Adicionalmente, a ROCK fosforila a MLC no mesmo sítio de fosforilação da MLCK (AMANO et al., 1996; KUREISHI et al., 1997). Desta forma, a fosforilação da MLC e, conseqüentemente, o estado contrátil da VSMC são determinados pelo balanço entre as atividades de ROCK e MLCP (AMANO; FUKATA; KAIBUCHI, 2000; KANEKO-KAWANO et al., 2012) (Figura 4). Adicionalmente, a via RhoA/ROCK leva à sensibilização do cálcio em contrações tônicas decorrentes de despolarização de VSMC, cujo mecanismo ainda não está bem esclarecido (MITA et al., 2002; RATZ et al., 2005; UREÑA; LÓPEZ-BARNEO, 2012).

Figura 4 – Representação Esquemática da via RhoA-ROCK Durante a Contração Vascular



VSMC: Célula da musculatura lisa vascular; **RhoA.GEF:** RhoA ligada ao fator de troca do nucleotídeo de guanosina; **RhoA.GTP:** RhoA ligada ao trifosfato de guanosina; **ROCK:** RhoA Cinase; **MLC:** Cadeia Leve da Miosina; **P:** fosforilação; **MLCP:** fosfatase da cadeia leve da miosina; **MLCK:** cinase da cadeia leve da miosina; **RS:** Retículo Sarcoplasmático.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A ativação crônica da via RhoA/ROCK tem sido associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (KAJIKAWA et al., 2014), como vasoespasmo, aterosclerose, injúria decorrente da isquemia-reperfusão, hipertensão arterial, hipertensão pulmonar e insuficiência cardíaca (SHIMOKAWA; SATOH, 2015). Isto acontece porque, além da regulação do tônus, a ROCK está envolvida em várias outras funções biológicas, como: migração celular; proliferação e fibrose do músculo liso vascular; hipertrofia e remodelamento deletério do miocárdio; e disfunção endotelial mediada pela diminuição da biodisponibilidade do NO (RIENTO; RIDLEY, 2003; SAWADA; LIAO, 2014; TANAKA; NODE, 2015).

2.2.4 Óxido Nítrico

O NO é uma das substâncias mais importantes e indispensáveis para integridade endotelial e para o controle do tônus vascular (FLIERL et al., 2015). Trata-se de uma molécula sinalizadora que atua localmente (TREUER; GONZALEZ, 2015). Desde a descoberta do NO, suas atividades biológicas têm sido interesse de pesquisa extensiva (VERAS et al., 2013), devido ao fato de se tratar de uma molécula sinalizadora ubíqua, envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos (RICCIO; SCHOENFISCH, 2012; SCATENA et al., 2010; TREUER; GONZALEZ, 2015).

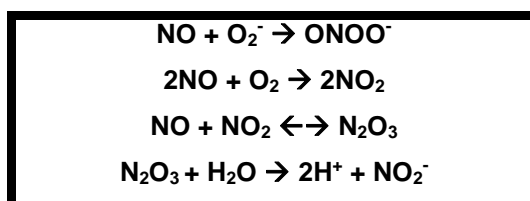
NO é um dos principais reguladores de vários processos cardiovasculares (WALFORD; LOSCALZO, 2003), incluindo agregação e adesão plaquetária (CRANE; ROSSI; MEGSON, 2005; FREEDMAN et al., 1999; RADOMSKI; PALMER; MONCADA, 1991), contratilidade do miocárdio, permeabilidade e tônus vascular (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987; WELCH; LOSCALZO, 1994; UMBRELLO et al., 2013) e inibição da proliferação do músculo liso vascular (GARG; HASSID, 1989; JEREMY et al., 1999). Trata-se de um composto lábil, de baixo peso molecular, com meia-vida de aproximadamente cinco segundos e solúvel tanto em ambientes aquosos como hidrofóbicos (THOMAS et al., 2008; TREUER; GONZALEZ, 2015). Esse gás pode existir numa variedade de formas, como radical livre ($\text{NO}\cdot$) ou íons: nitroxil (NO^-) ou nitrosônio (NO^+), e a forma que domina depende da fonte de NO (BONAVENTURA et al., 2006).

Ainda que o NO tenha uma simplicidade estrutural, este gás possui uma química complexa e ações biológicas amplas e variadas (MILLER; MEGSON, 2007). Esse gás é sintetizado por uma série de tipos celulares, atuando como uma molécula sinalizadora autócrina e parácrina altamente regulada. A natureza reativa do NO faz com que ele possa se difundir para vários sistemas biológicos (TREUER; GONZALEZ, 2015). Sua influência se estende apenas a 100 μm de sua origem. Isso significa que o NO deve ser rapidamente sintetizado na resposta a estímulos. Essa molécula não requer um metabolismo complexo de liberação, sendo simplesmente diluído e oxidado a nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (RASSAF; FERDINANDY; SCHULZ, 2014).

A meia-vida do NO e, portanto, a sua atividade biológica, são decisivamente determinadas por espécies reativas de oxigênio (ROS), que reagem rapidamente com este gás, formando intermediários altamente reativos (BECKMAN; KOPPENOL, 1996), diminuindo a biodisponibilidade do NO e aumentando o estresse oxidativo no tecido vascular (GRYGLEWSKI; MONCADA; PALMER, 1986; SCHULZ et al., 2008).

A bioquímica do NO divide suas ações potenciais em duas categorias: direta e indireta (WINK et al., 1996). Os efeitos diretos do NO são aquelas reações que ocorrem rápido o suficiente para permitir que o NO reaja diretamente com sua molécula alvo, enquanto que os efeitos indiretos requerem que o NO reaja com o oxigênio (O_2) e o superóxido (O_2^-) para gerar espécies reativas do nitrogênio (RNS), como o NO_2^- , o dióxido de nitrogênio (NO_2) e o peroxinitrito (ONOO^-), que subsequentemente reagem com seus alvos biológicos (Figura 5) (IGNARRO et al., 1993; SZABO; ISCHIROPOULOS; RADI, 2007; UMBRELLO et al., 2013). Uma das vantagens de dividir a química do NO nestas duas categorias é que os efeitos diretos geralmente ocorrem em baixas concentrações ($[\text{NO}] < 200 \text{ nM}$) e os indiretos acontecem em concentrações bem mais elevadas ($[\text{NO}] > 400 \text{ nM}$) (THOMAS et al., 2008).

Figura 5 – Reações do NO para Formação de RNS



Fonte: Thomas et al., 2008

Embora haja mecanismos alternativos para gerar NO, como a acidificação ou redução do NO_2^- , a grande maioria da produção deste gás em mamíferos é derivada enzimaticamente a partir da sintase de NO (NOS) (UMBRELLO et al., 2013). Esta família de enzimas converte o substrato *L*-arginina, um aminoácido catiônico e semiessencial, e O_2 em *L*-citrulina e NO (KNOWLES; MONCADA, 1994; WU; MORRIS, 1998).

Existem três isoformas de NOS que oferecem a grande variedade de perfis de concentração do NO (THOMAS et al., 2008). Duas destas, a NOS neuronal (nNOS ou NOS-1) e a NOS endotelial (eNOS ou NOS-3), são dependentes de 4Ca^{2+} -calmodulina (4Ca^{2+} -CaM), constitutivas e produzem NO em baixas concentrações (> 1 nM) (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989; BALLIGAND et al. 1993). A terceira isoforma, a NOS induzível (iNOS ou NOS-2), é independente do Ca^{2+} e a sua expressão segue um estímulo imunológico, produzindo NO em altas concentrações (> 1 μM), servindo para funções citotóxicas/citostáticas (ALDERTON et al., 2005; MONCADA; HIGGS, 2006).

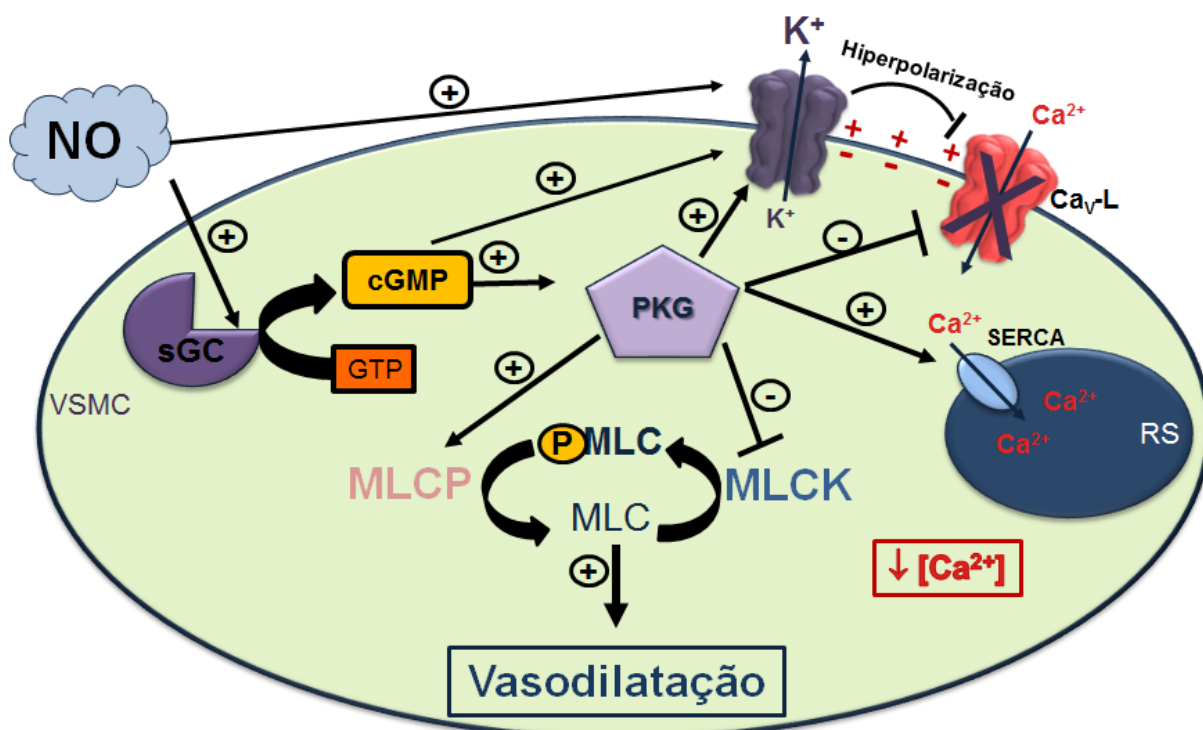
Nas células endoteliais, ocorre a conversão do *L*-arginina e O_2 em NO pela eNOS, em resposta a estímulos mecânicos ou químicos (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006; INAGAMI; NARUSE; HOOVER, 1995). O NO difunde-se da célula de origem, passando facilmente através das membranas das células vizinhas, regulando uma série de efeitos fisiológicos (MILLER; MEGSON, 2007). No sistema cardiovascular, o NO é continuamente produzido a partir das células do endotélio vascular (MILLER; MEGSON, 2007), que é o maior regulador da homeostase vascular local, não apenas por regular a permeabilidade vascular, mas também por regular o calibre dos vasos sanguíneos de acordo com as demandas hemodinâmicas e hormonais e mantendo, assim, a fluidez do sangue (BRUTSAERT, 2003; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006).

O NO e os compostos doadores desse gás podem ativar a ciclase de guanilil solúvel (sGC) (MORGADO et al., 2012). Quando ativada, esta enzima converte o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) (CARY et al., 2006; LOHSE et al., 1998; MACHADO et al., 2014). Esse nucleotídeo é considerado um dos principais segundos mensageiros que medeiam a vasodilatação em condições fisiológicas (MORGADO et al., 2012). Uma vez formado, cGMP ativa a

proteína cinase dependente de cGMP (PKG) (CARVAJAL et al., 2000; KARCZEWSKI et al., 1992).

A ativação da PKG culmina no relaxamento da VSMC a partir da fosforilação de várias proteínas (MACHADO et al., 2014; MILLER; MEGSON, 2007). Entre os efeitos desencadeados a partir da ativação da PKG estão: redução dos níveis de $[Ca^{2+}]_i$ (FRANCIS; BUSCH; CORBINS, 2010; IACHINI-BELLISARII et al., 2012) e diminuição da sensibilidade do sistema contrátil para este íon (CARVAJAL et al., 2000; FRANCIS; BUSCH; CORBINS, 2010); desfosforilação da cadeia leve da miosina (WALDMAN; MURAD, 1987; CARVAJAL et al., 2000); e ativação de K_{ATP} (MURPHY; BRAYDEN, 1995), K_{Ca} (MEERA; WALLNER; TORO, 2011) e K_v (IRVINE; FAVAROLO; KEMP-HARPER, 2003) (Figura 6).

Figura 6 – Representação Esquemática da via NO-sGC-PKG Durante o Relaxamento Vascular



Ca_v-L: Canais de cálcio sensíveis a voltagem tipo-L; **GTP:** trifosfato de guanosina; **cGMP:** Monofosfato de guanosina cíclico; **MLC:** Cadeia Leve da Miosina; **P:** fosforilação; **MLCP:** fosfatase da cadeia leve da miosina; **MLCK:** cinase da cadeia leve da miosina; **RS:** Retículo Sarcoplasmático; **NO:** óxido nítrico; **sGC:** ciclase de guanilil solúvel; **PKG:** proteína cinase dependente de cGMP; **MLCP:** fosfatase da cadeia leve da miosina; **MLCK:** cinase da cadeia leve da miosina; **RS:** Reticulo Sarcoplasmático; **SERCA:** Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático; **VSMC:** Célula da musculatura lisa vascular..

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A via NO/cGMP tem sido implicada no relaxamento de HUCV (LOVREN; TRIGGLE, 2000). Em contrapartida, tal resposta vasodilatadora não é totalmente mediado PKG, o que sugere que outros mecanismos podem estar envolvidos nessa resposta vascular (SANTOS-SILVA; CAIRRÃO; VERDE, 2010), como a ação direta de NO e/ou cGMP sobre canais para potássio.

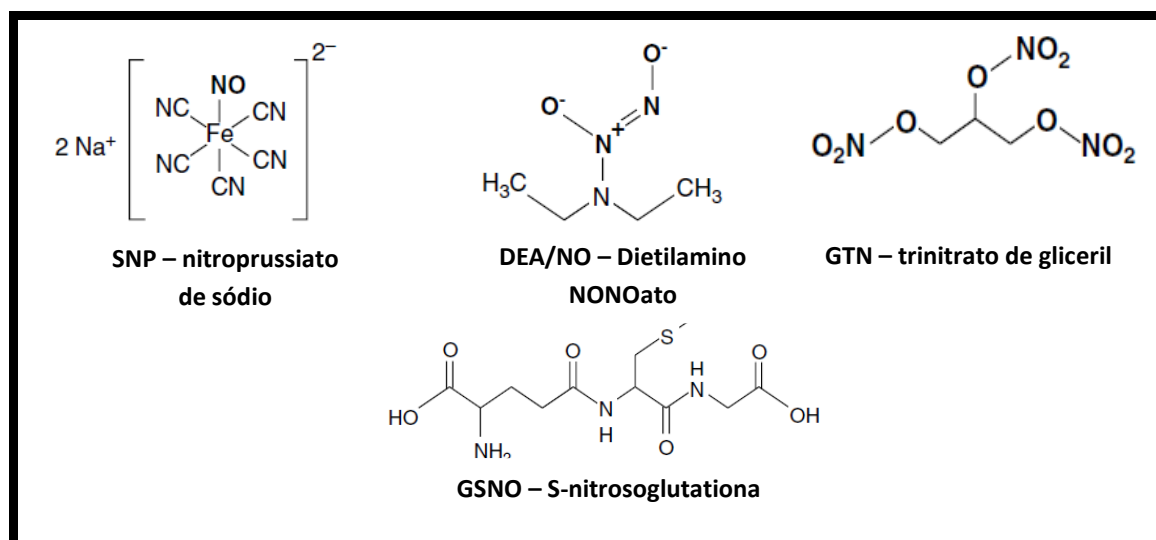
O NO é essencial tanto para regulação como para distribuição regional do fluxo sanguíneo e pressão arterial (UMBRELLO et al., 2013). A desregulação na via do NO desempenha um papel fundamental em várias condições patofisiológicas no sistema cardiovascular (MILLER; MEGSON, 2007; SCATENA et al., 2010; VANHOUTTE, 2009), como é o caso da pré-eclâmpsia. Esta condição clínica ocorre pelo fato de haver uma desregulação da liberação de NO, visto que há deterioração do endotélio. Nesse contexto, a deficiência desse mediador pode estar associada ao comprometimento do fluxo sanguíneo fetoplacentário na pré-eclâmpsia (SELIGMAN et al., 1994; MATSUBARA et al., 2015).

Pesquisadores têm utilizado o atual conhecimento para formular terapias baseadas no NO, as quais têm se destacado nos resultados clínicos obtidos (AL-SA'DONI; FERRO, 2005; SCATENA et al., 2005). Em geral, essas terapias são categorizadas em dois grupos: drogas que alteram a produção de NO ou substâncias que liberam NO ou um de seus análogos redox (CARPENTER; SCHOENFISCH, 2012). Entretanto, a administração de NO é limitada devido ao curto tempo de meia-vida. Pró-fármacos, com base na liberação de NO, têm sido comercializados por décadas (PARENT et al., 2013).

2.2 DOADORES DE NO

Doadores de NO (Figura 7) têm sido desenvolvidos para permitir a estocagem e a liberação desse gás como benefício para uma variedade de aplicações clínicas. Entre esse grupo de substâncias estão: nitroprussiato de sódio (SNP – *sodium nitroprusside*); diazeniodiolatos (ex.: dietilamino NONOato - DEA/NO); nitrosotióis (ex.: S-nitrosoglutathiona; GSNO) e nitratos orgânicos (ex.: trinitrato de gliceril ou *glyceryl trinitrate* – GTN) (MILLER; MEGSON, 2007; SCATENA et al., 2010; RICCIO; SCHOENFISCH, 2012).

Figura 7 – Estrutura Química de Doadores Clássicos de NO



Fonte: Adaptado de Miller e Megson (2007); e Quinn e cols (2015)

Desde meados do século XIX, os cientistas e os clínicos tentam compreender os efeitos biológicos dos nitrovasodiladores orgânicos (BRUNTON, 1867 *apud* JONES; BOLLI, 2006). Durante um século, os nitrovasodiladores foram utilizados clinicamente sem a compreensão de seus mecanismos de ação. Atualmente, sua ação vasodilatadora é conhecida por ser mediada pela liberação de NO (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). As propriedades vasodilatadoras dos doadores de NO clássicos limitam sua aplicação não-cardiovascular, pois a redução da PA representa muitas vezes um efeito indesejado (FEELISCH, 1998).

Devido à diversidade na estrutura dos doadores de NO, o modo de liberação deste gás para cada classe de compostos pode diferir significativamente, o qual pode envolver catálise enzimática, interação com tióis, redução ou oxidação (FEELISCH, 1998). Estes doadores oferecem propriedades bioquímicas distintas, permitindo a escolha do composto que melhor atenda às demandas das investigações específicas (WANG et al., 2002).

O SNP é um complexo inorgânico com um grupo ferroso, utilizado em hospitais para proporcionar uma rápida redução da PA em crises hipertensivas, sendo também o fármaco de escolha em estudos clínicos, reconhecido como padrão na vasodilatação independente do endotélio. A liberação de NO por este composto envolve um mecanismo complexo (BUTLER; MEGSON, 2002; GROSSI; D'ANGELO, 2005), que requer irradiação com luz ou redução de um elétron (FEELISCH, 1998),

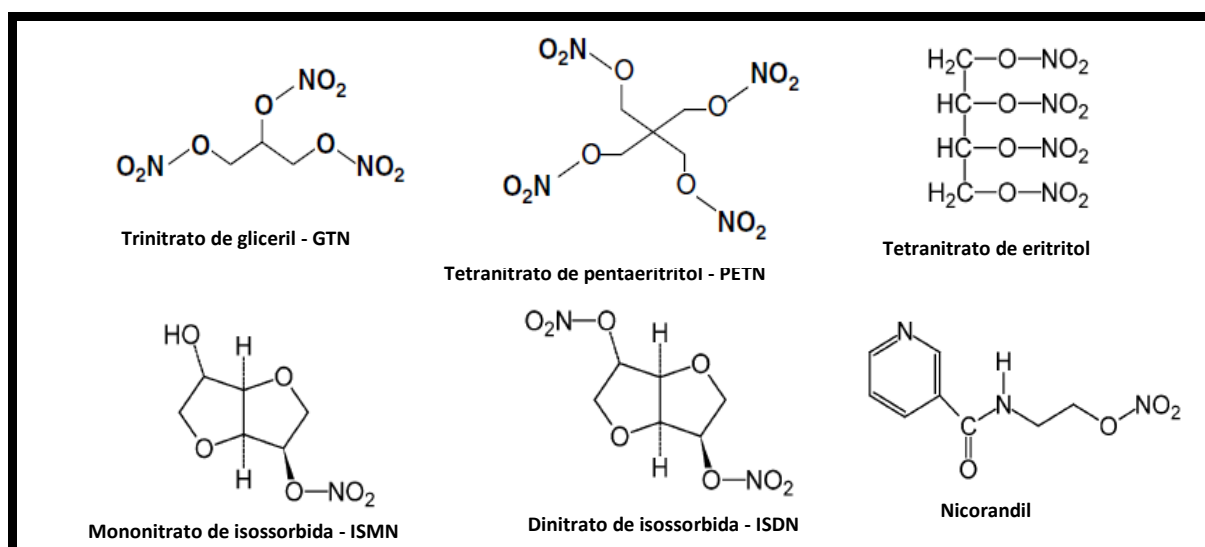
fazendo com que novos doadores sejam mais adequados como padrão do vasorrelaxamento independente do endotélio (MILLER; MEGSON, 2007). Uma das principais limitações do uso do SNP *in vivo* é que quando este composto é reduzido ocorre a liberação de cianeto (CN^-) (ARNOLD; LONGNECKER; EPSTEIN, 1984), que causa uma toxicidade celular pronunciada (WANG et al., 2002).

Diante do potencial significante do NO na medicina cardiovascular, é surpreendente que apenas dois tipos de fármacos doadores de NO, o SNP e os nitratos orgânicos, sejam utilizados clinicamente na atualidade, uma vez que nenhum novo doador chegou ao mercado desde a descoberta do NO, em 1980, como mediador fisiológico (MILLER; MEGSON, 2007).

2.2.1 Nitratos Orgânicos

Os nitratos orgânicos clássicos exibem efeitos terapêuticos benéficos no tratamento de distúrbios cardiovasculares, e são os fármacos mais antigas e usadas entre os doadores de NO (MILLER; MEGSON, 2007; SCATENA et al., 2010; VIZZARDI et al., 2013). Eles são ésteres de ácido nítrico de álcoois mono- e poli-hídricos (RONO_2), e representam a mais antiga classe de doadores de NO aplicadas clinicamente (CSONT; FERDINANDY, 2005) (Figura 8).

Figura 8 – Estruturas Químicas de Nitratos Orgânicos mais Relevantes Clinicamente



Fonte: Csont e Ferdinandy (2005); Miller e Megson (2007)

Estes compostos possuem vantagens claras em relação aos outros compostos doadores de NO, pois seus efeitos *in vivo* são muito bem documentados, tanto em animais como em humanos. Adicionalmente, são moléculas bastante estáveis, podendo ser administradas por meio das vias intraperitoneal, venosa e por via oral, em alguns casos, como o dinitrato de isossorbida (ISDN) e o tetranitrato de pentaeritritil (PETN) (FEELISCH, 1998).

Acredita-se que todos os nitratos orgânicos exercem seus efeitos biológicos por meio da liberação de NO, requerendo uma bioconversão enzimática para disponibilizar deste gás (CSONT; FERDINANDY, 2005). Um número crescente de enzimas potenciais tem sido sugerido para esta bioconversão, incluindo um sistema enzimático microsomal vascular não caracterizado (CHUNG; FUNG, 1990), enzimas encontradas no citocromo P450 (CYP) (McGUIRE et al., 1998), glutationa-S-transferase (KURZ et al., 1993) e a aldeído desidrogenase 2 (ALDH) (CHEN; ZHANG; STAMLER, 2002).

Os nitratos orgânicos são predominantemente utilizados para o tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares (ABRAMS, 1996; ANTMAN et al., 2004; BRAUNWALD et al., 2002; PARKER; PARKER, 1998; THADANI, 1997), tais como: hipertensão arterial sistêmica, infarto agudo do miocárdio, isquemia cardíaca, insuficiência cardíaca congestiva, doenças coronarianas e aterosclerose (KUMAR; SINGH; BAKER, 2007; MÜNZEL; STEVEN; DAIBER, 2014; VIZZARDI et al., 2013).

O principal problema da aplicação clínica dos nitratos está relacionado ao desenvolvimento de tolerância para os efeitos hemodinâmicos que a maioria dessas substâncias apresentam (CSONT; FERDINANDY, 2005; DAIBER et al., 2009; JABS et al., 2015). Trata-se de um fenômeno complexo, definida como a perda de efeito ou necessidade de aumentar a dose para manter o efeito do nitrato orgânico, a qual pode limitar a eficácia na terapia crônica (MÜNZEL; GORI, 2013; MÜNZEL; STEVEN; DAIBER, 2014).

A tolerância a nitratos pode envolver: pseudotolerância, caracterizada por ativação neuro-hormonal e expansão do volume intravascular (KLESCHYOV et al., 2003; PARKER et al., 1991); tolerância vascular, que são processos vasculares intrínsecos, os quais podem envolver desensibilização da sGC (RAPOPORT et al.,

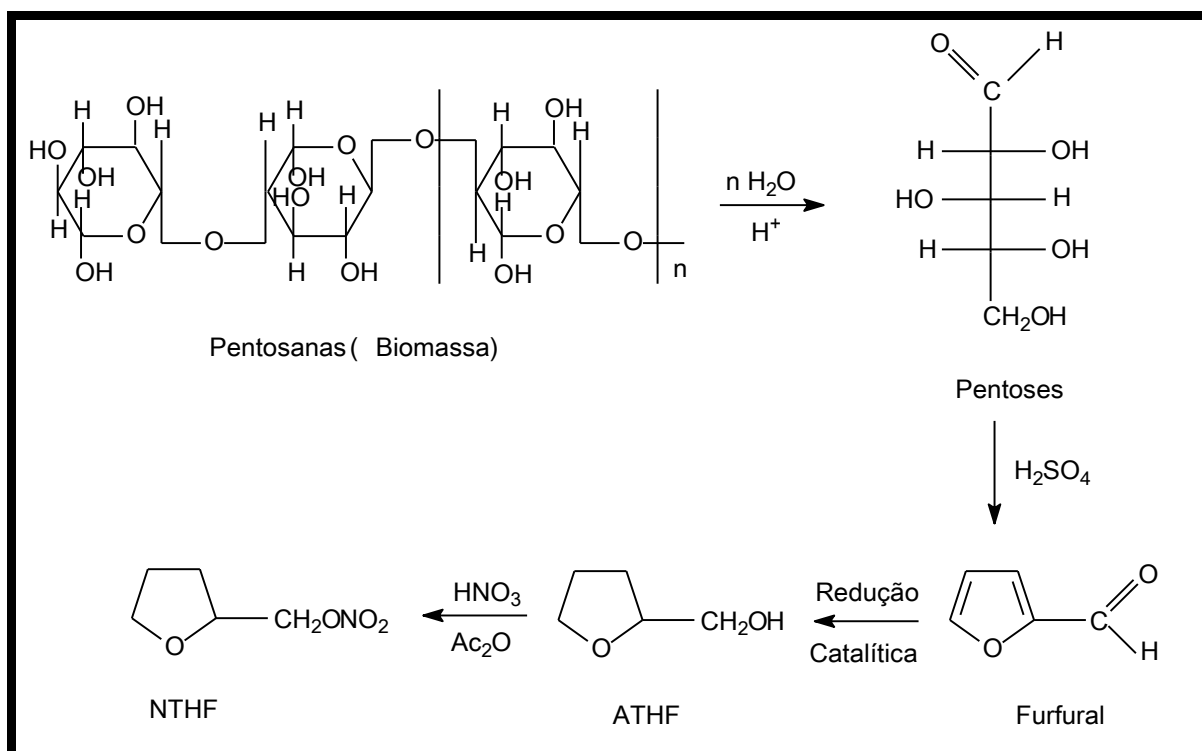
1987) ou aumento da atividade das fosfodiesterases (PDE) (KIM et al., 2001; MÜNZEL; DAIBER; MÜLSCH, 2005); e a *cross-tolerância* para outros compostos doadores de NO (MÜNZEL et al., 1995; MÜNZEL; STEVEN; DAIBER, 2014). PETN é o único nitrato utilizado clinicamente e que não apresenta tolerância nem leva à disfunção endotelial (MÜNZEL; STEVEN; DAIBER, 2014).

GTN, obtido a partir da glicerina, foi o primeiro nitrato descoberto em 1847. É considerado tratamento de primeira linha no tratamento da doença arterial coronariana e de infarto do miocárdio (FERREIRA; MOCHLY-ROSEN, 2012), também podendo ser empregado em outras situações clínicas, como: insuficiência cardíaca congestiva, fissura anal de crianças e como alternativa ao sildenafil (BARRETO; CORREIA, 2005; MAYER; BERETTA, 2008). Tal efeito clínico benéfico é devido à dilatação das grandes artérias coronárias, a qual resulta em melhor fornecimento de sangue para o coração; e venodilatação, que leva a um maior acúmulo venoso e consequente redução do retorno venoso e da pré-carga cardíaca (BODE-BÖORGE; KOJDA, 2005). Entretanto, a tolerância de seus efeitos ocorre após 24-48h de uso, limitando sua aplicação clínica (FRANÇA-SILVA et al., 2014; MAYER; BERETTA, 2008).

Os nitratos NCOE e NTHF, obtidos a partir do grupo do Prof. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho (Centro de Ciências Exatas e da Natureza – CCEN/ UFPB), mostraram não desenvolver tolerância dos seus efeitos vasculares, em estudos realizados no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do PPgPNSB/UFPB (ALUSTAU, 2010; FURTADO, 2013; MACHADO et al., 2014).

NTHF é um nitrato orgânico que pode ser obtido em grandes quantidades a partir de resíduos agrícolas, em particular do bagaço da cana-de-açúcar, gerado em toneladas por usinas de açúcar e álcool. A reação a partir de biomassas consiste em uma rota sintética, por meio da digestão do bagaço da cana seguido da desidratação das pentoses para obtenção do furfural. Na segunda etapa, o furfural é convertido no álcool tetra-hidrofurfurílico (ATHF) e na terceira etapa ocorre a esterificação do ATHF para obtenção do NTHF, com um rendimento de 81% (ATHAYDE-FILHO et al., [S.I.]) (Figura 9).

Figura 9 – Reações para Obtenção do NTHF



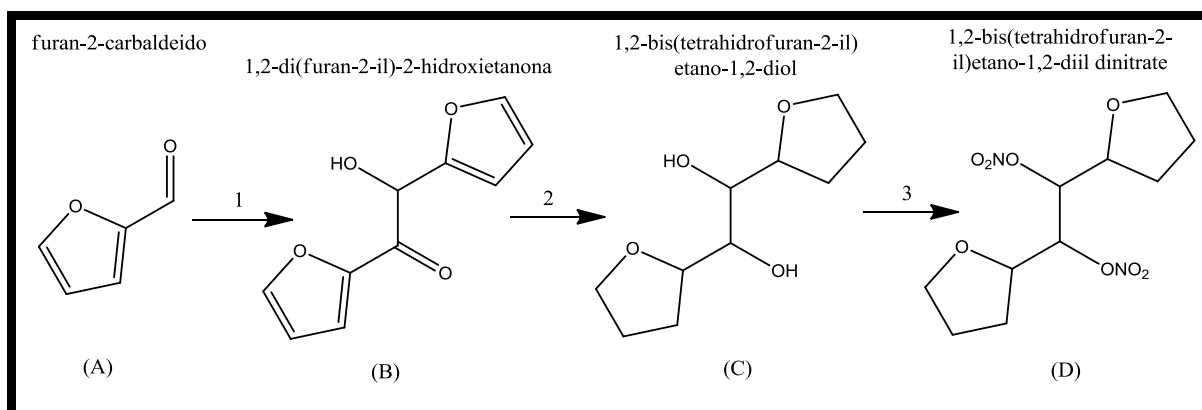
H₂O: água; **H₂SO₄**: Ácido sulfúrico **ATHF**: Álcool tetra-hidrofurfurílico; **NTHF**: nitrato tetra-hidrofurfurílico;

Fonte: ATHAYDE-FILHO et al., [S.I.]

Estudos com NTHF mostraram que esse nitrato apresenta baixa toxicidade aguda por via oral ou intravenosa, em ratos Wistar (FURTADO, 2013). Adicionalmente, esse nitrato apresenta efeitos vasodilatador, sobre artéria mesentérica superior isoladas de ratos; e hipotensor, tanto em ratos Wistar normotensos quanto hipertensos. O mecanismo desses efeitos envolve a liberação de NO e ativação de sGC e canais para potássio (ALUSTAU, 2010; FURTADO, 2013).

Diante das atividades promissoras do NTHF, foi sintetizado um composto que contém duas moléculas de NTHF em sua estrutura: o BIS-NTHF. Este nitrato orgânico é sintetizado a partir do furan-2-carbaldeído (furfural), em um rota sintética que consiste em três etapas: 1 - Obtenção do 1,2-di(furan-2-il)-2-hidroxietanona; 2 - Obtenção do 1,2-bis(tetrahidrofuran-2-il)etano-1,2-diol; 3 - Obtenção do BIS-NTHF (Figura 10). Trata-se de um composto inédito e que, portanto, não foi estudado no sistema cardiovascular.

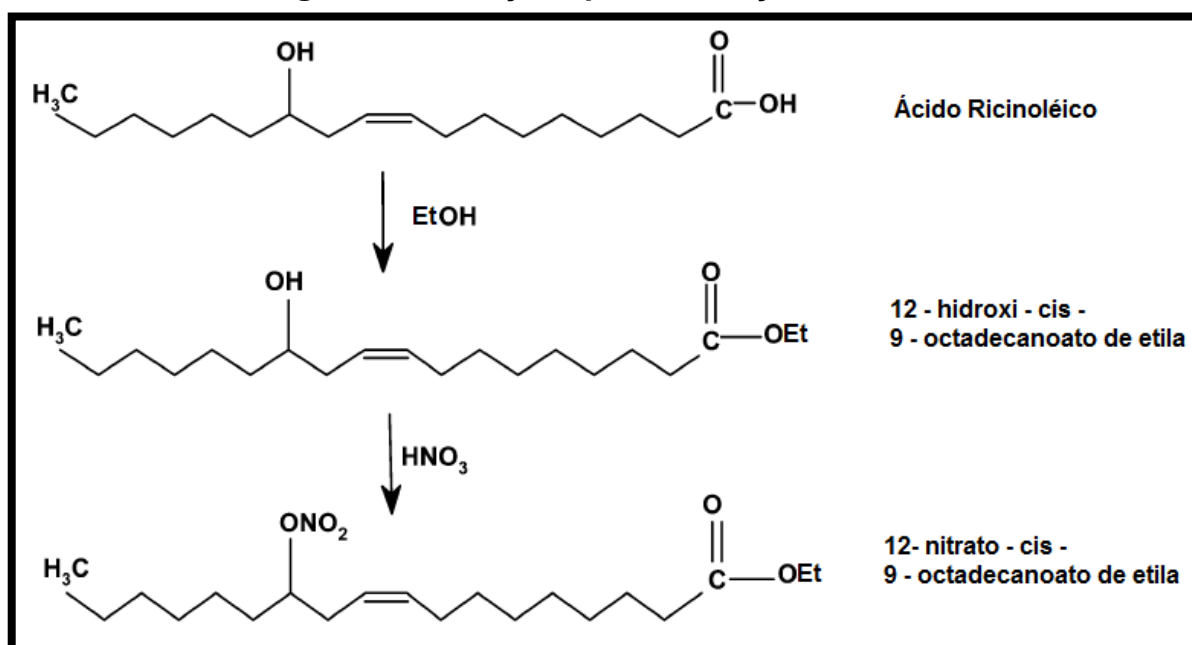
Figura 10 – Reações para Obtenção do BIS-NTHF



Fonte: Síntese realizada no Laboratório do Prof. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho

NCOE, por outro lado, é um nitrato orgânico que pode ser obtido a partir do ácido ricinoléico, o qual representa cerca de 90% do total do óleo da mamona. A reação para obtenção do NCOE ocorre em duas etapas: uma reação de esterificação do ácido ricinoléico, seguida por uma nitração do 12-hidroxi-cis-octadecanoato de etila (SUPPES; DASARI, 2003) (Figura 11).

Figura 11 – Reações para Obtenção do NCOE



EtOH: etanol; HNO_3 : Ácido nítrico.

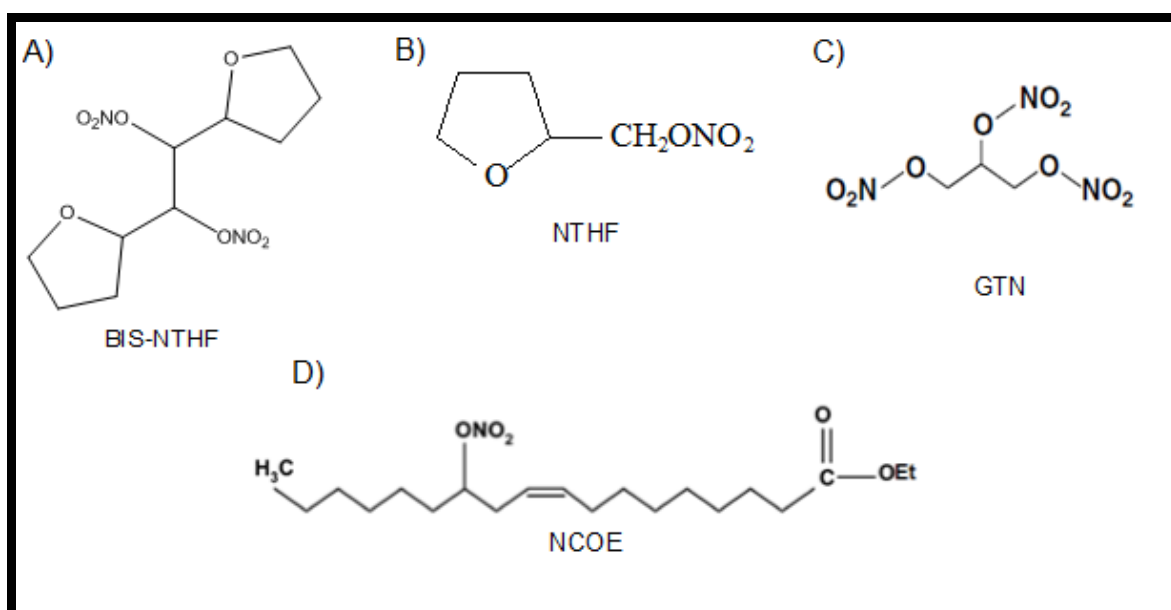
Fonte: SUPPES; DASARI, 2003

O estudo, em animais normotensos, com NCOE demonstrou que este nitrato apresenta efeito hipotensor e vasorrelaxante, em artéria mesentérica superior isolada,

decorrentes da liberação de NO, com consequente ativação de sGC, K_{ATP} e BK_{Ca} (MACHADO et al., 2014).

Não há estudos com NTHF, NCOE e BIS-NTHF em vasos humanos. Ademais, as pesquisas que envolvem GTN em vaso umbilical não detalham seu efeito. Diante desse contexto, é de grande relevância investigar e caracterizar o efeito desses quatro nitratos orgânicos (Figura 12) em vasos humanos. Para isto, serão utilizados HUCV, considerado fonte abundante e barata de material humano.

Figura 12 – Estrutura Química dos Nitratos Orgânicos Utilizados no Estudo



Estrutura química do A) 1,2-bis(tetrahydrofuran-2-il)etano-1,2-diil dinitrato (BIS-NTHF), B) nitrato tetrahydrofurfurílico (NTHF); C) trinitrato de gliceril (GTN), D) e 13-nitrato-*cis*-9-octadecanoato de etila (NCOE).

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO E PERÍODO DO ESTUDO

O presente estudo trata-se de uma pesquisa científica em laboratório, de natureza aplicada, com abordagem quantitativa, procedimento experimental e com o objetivo de estudo explicativo.

3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA DO ESTUDO

A amostra foi escolhida de forma aleatória e constituída de segmentos de cordão umbilical, cedidos voluntariamente por mulheres submetidas ao parto normal ou cesáreo. As parturientes aceitaram participar da pesquisa mediante um termo livre e esclarecido (Apêndice 1).

3.3 LOCAL DE COLETA

Os cordões umbilicais foram coletados no Instituto Cândida Vargas, situado no bairro de Jaguaribe, em João Pessoa-PB (ANEXO 2). Esta maternidade é vinculada ao Sistema Único de Saúde (SUS), integra a rede municipal de hospital de João Pessoa, realiza mais de 700 partos por mês, e é considerada como referência na Paraíba e um dos melhores hospitais na área no Nordeste. Optou-se por este local de coleta, devido à quantidade de partos ser muito superior ao que ocorre no Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW-UFPB), o qual foi o primeiro local de coleta.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram convidadas a participar da pesquisa parturientes com as seguintes características: idade acima de dezoito anos; submetidas ao parto do tipo cesariano ou normal; sem relato de complicações médicas; e com tempo gestacional de trinta e sete a quarenta e uma semanas (BARISKANER et al., 2003; PERUSQUIA et al., 2007).

3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

As características das parturientes, adotadas como critérios de exclusão, foram as seguintes: idade inferior a dezoito anos; com tempo de gestação abaixo ou acima de trinta e sete ou de quarenta e uma semanas, respectivamente; ou que apresentasse hipertensão gestacional, doenças infectocontagiosas (vírus da imunodeficiência humana - HIV, hepatite, dentre outras), diabetes, hipercolesterolemia e doenças autoimunes.

3.6 ASPECTOS LEGAIS DA PESQUISA

Todos os procedimentos da pesquisa respeitaram as recomendações propostas pelo Conselho Nacional de Saúde, por meio da resolução 466/12 (BRASIL, 2012), a qual apresenta diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. O estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética do HULW/UFPB (certidão 016/10/ Anexo 1).

3.7 DILUIÇÃO DAS FERRAMENTAS FARMACOLÓGICAS

Todas substâncias utilizadas nos protocolos experimentais foram obtidas da Sigma. Os compostos 5-hidroxitriptamina (5-HT), tetraetilamônio (TEA), U46619 e histamina eram dissolvidos em água destilada. O 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ, por sua vez, era dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração deste solvente orgânico na cuba foi de até 0,3%. As soluções eram mantidas de 0 a 4 °C e somente retiradas no momento do experimento.

Os sais utilizados para fazer as soluções deste estudo eram provenientes da VETEC®: NaCl; KCl; CaCl₂; MgSO₄; NaHCO₃; KH₂PO₄; C₆H₁₂O₆; HEPES e EDTA.

3.8 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DOS NITRATOS

Os nitratos orgânicos NTHF, NCOE e BIS-NTHF foram cedidos pela equipe do Prof. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho (PgPNSB/UFPB). O GTN (Tridil®) foi utilizado como padrão para os efeitos dos nitratos e foi obtido comercialmente.

Os nitratos NTHF, NCOE e BIS-NTHF foram solubilizados em cremofor e, em seguida, diluídos em água destilada, para a obtenção das concentrações (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-7} M) desejadas para a realização dos protocolos experimentais. A preparação das soluções foi realizada momentos antes de iniciar o experimento. A concentração de cremofor não excedeu 0,001% na solução de banho na cuba.

A solução mãe de GTN utilizada foi de $2,202 \times 10^{-2}$ M, diluída em água destilada para obter as outras concentrações a serem utilizadas no experimento (10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-7} M).

3.9 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA PARA UTILIZAÇÃO DOS VASOS UMBILICAIS

Os experimentos com HUCV foram realizados após a padronização deste modelo experimental no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular. Foi realizada a padronização: das concentrações e tipos de sais utilizados nas soluções de transporte e para o banho; da tensão a qual os anéis seriam submetidos (variação de 1 a 5 g); tempo necessário para estabilização dos vasos isolados (variação de 1 a 3 horas); melhor agente contraturante (5-HT; soluções despolarizantes de KCl, U46619 e Histamina); concentrações das ferramentas farmacológicas a serem utilizadas (5-HT; ODQ; TEA). A partir destas informações, os parâmetros estabelecidos para a padronização seguem descritos nos próximos tópicos.

3.9.1 Procedimento para Coleta do Cordão Umbilical

A coleta dos cordões umbilicais foi feita pela Dra. Sabrina de Melo Gomes, médica residente em ginecologia e obstetrícia. Os segmentos de cordão umbilical, de aproximadamente 10 cm de comprimento, foram coletados apenas as porções que

seriam destinadas ao descarte biológico. Desta forma, a coleta do cordão não acarretou em danos nem riscos à saúde das parturientes ou dos lactentes. Posteriormente, os cordões umbilicais foram imersos em solução de Krebs modificado para transporte (Quadro 1), refrigerados de 4 a 8 °C em caixa térmica, e transportados para o laboratório de Farmacologia Cardiovascular do PPgPNS/UFPB. Os segmentos de cordões foram armazenados na geladeira e mantidos de 4 a 8 °C. Os cordões poderiam ser utilizados em até 48h após a coleta ter sido realizada (MILDENBERGER et al., 2003).

Quadro 1 – Composição do Krebs Modificado para o Transporte de Cordão Umbilical Humano

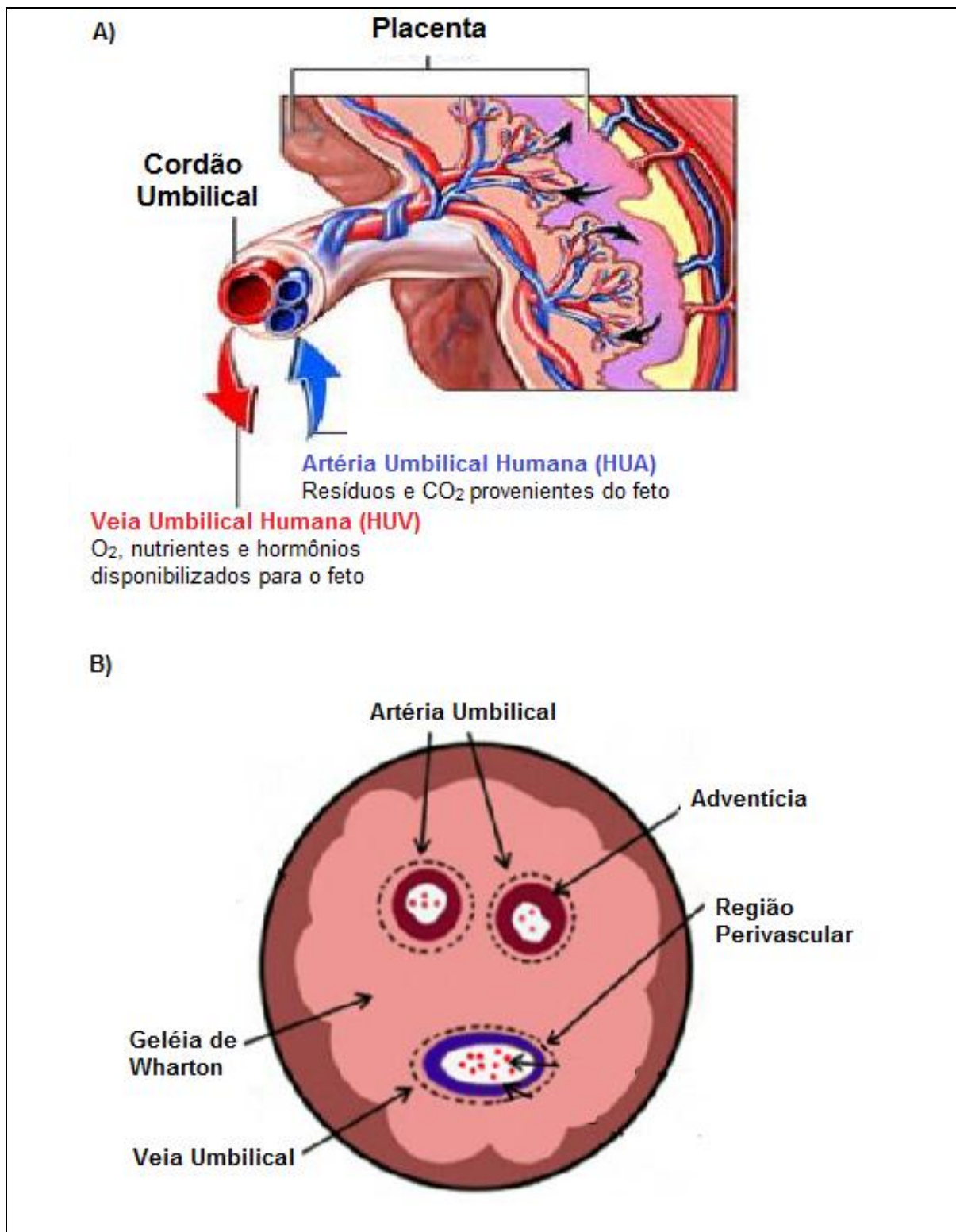
SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	125,0
KCl	4,8
CaCl ₂	1,0
MgSO ₄	1,2
NaHCO ₃	25,0
KH ₂ PO ₄	1,2
C ₆ H ₁₂ O ₆	11,0
HEPES	25,0
EDTA	0,3

C₆H₁₂O₆: Glicose; **CaCl₂**: Cloreto de cálcio; **EDTA**: Ácido etilenodiamino tetra-acético; **HEPES**: ácido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfônico; **KCl**: Cloreto de potássio; **KH₂PO₄**: Fosfato de potássio; **MgSO₄**: Sulfato de magnésio; **NaCl**: Cloreto de sódio; **NaHCO₃**: Bicarbonato de sódio
Fonte: adaptado de LEREIS et al., 2006

3.9.2 Procedimento para Obtenção dos HUCV

O isolamento dos HUCV foi realizado após a retirada da geleia de Wharton (Figura 13), numa placa de Petri contendo a solução de Krebs para transporte (Quadro 1), mantida em baixas temperaturas. Após este procedimento os HUCV foram dissecados e livres de todo tecido conectivo e adiposo. Em sequência, os HUCV foram seccionados em anéis 3-5 mm de comprimento.

Figura 13 – Disposição dos Vasos do Cordão Umbilical



A) Disposição dos vasos no cordão umbilical B) Corte do cordão umbilical, que mostra a disposição das artérias, da veia e da geleia no cordão

Fonte: A) adaptado de <http://miscarriage.about.com/od/stillbirthcausesrisks/p/cordaccident.htm> B) Adaptado de Kim e cols, 2013

3.9.2 Procedimento para a Experimentação com HUCV

Os anéis de HUA e HUV foram transferidos para cubas contendo 10 mL de solução Krebs *Henseleit* (Quadro 2), sob temperatura de 37 °C, continuamente gaseificada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ (SANTOS-SILVA; CARRIÃO, VERDE, 2010), para promover um pH relativamente constante de 7,2-7,4 (TEIXEIRA; PRIVIERO; WEBB, 2005). Em todos os anéis foi realizado o atrito mecânico entre as paredes internas do vaso e uma pinça fina com algodão, para garantir a retirada do endotélio vascular.

Quadro 2 – Composição da Solução de Krebs *Henseleit*

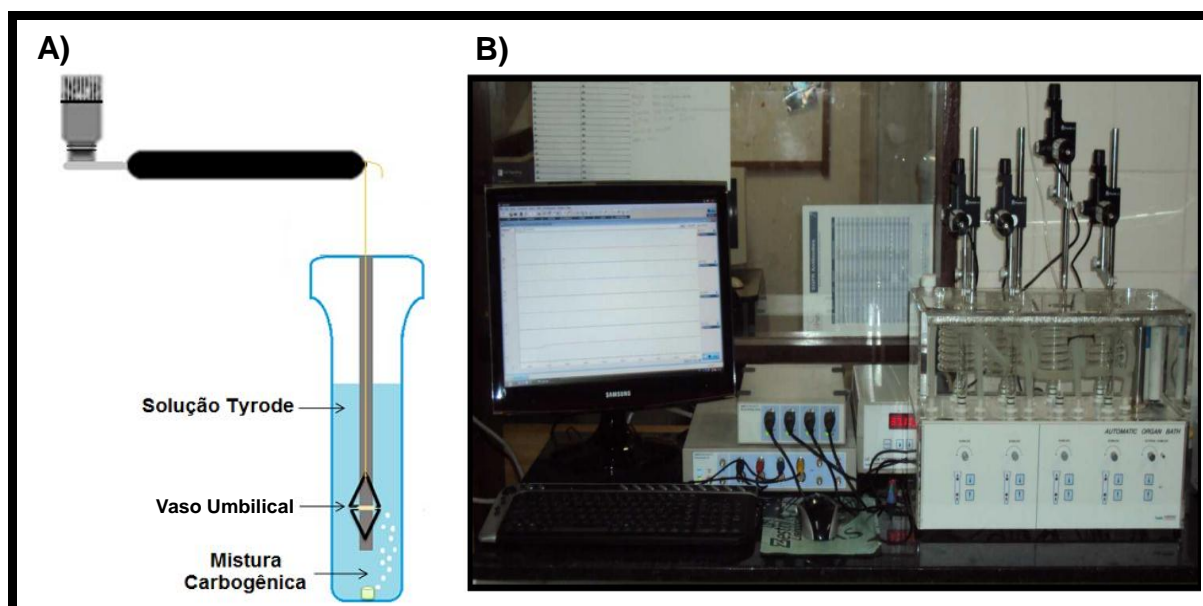
SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	119,0
KCl	4,7
CaCl ₂	2,5
MgSO ₄	1,0
NaHCO ₃	25,0
KH ₂ PO ₄	1,2
C ₆ H ₁₂ O ₆	11,0
EDTA	0,004

C₆H₁₂O₆: Glicose; **CaCl₂**: Cloreto de cálcio; **EDTA**: Ácido etilenodiamino tetra-acético; **KCl**: Cloreto de potássio; **KH₂PO₄**: Fosfato de potássio; **MgSO₄**: Sulfato de magnésio; **NaCl**: Cloreto de sódio; **NaHCO₃**: Bicarbonato de sódio

Fonte: LEREIS et al., 2006

Os HUCV eram suspensos por uma haste metálica e fixados a um transdutor de força (Figura 8), acoplado a um sistema de aquisição (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA) para o registro das tensões isométricas (Figura 14).

Figura 14 – Aparato Utilizado nos Experimentos com HUCV



A) Cubas para órgãos isolados – HUCV suspenso por uma haste fixada a um transdutor de força;
B) Sistema de cubas para órgãos isolados, acoplados ao sistema de aquisição.

Fonte: MACHADO; ASSIS; FURTADO, 2013

Os anéis eram mantidos sobre tensão constante de 3 g, por um período de 3 horas (WYLAM et al., 1993). Nos primeiros 150 min do período de estabilização, o meio nutritivo foi trocado a cada 15 min para prevenir a interferência de metabólitos. Nos últimos 30 min o meio não era mais trocado e a tensão não mais ajustada até o início do experimento.

Após o período de estabilização, uma contração com uma solução de Krebs *Henseleit* modificada com KCl 60 mM foi induzida com a finalidade de certificar a viabilidade do tecido (Quadro 3). Este agente promove contração dos HUCV por meio de uma despolarização das VSMC, a qual leva à abertura de C_{av} entre outros mecanismos (SALOM et al., 1990; SANTOS-SILVA; CAIRRÃO; VERDE, 2010; TUFAN et al., 2003; WYLAM et al., 1993).

Quadro 3 – Composição da Solução de KCl 60 mM

SUBSTÂNCIA	KCl 60 mM
NaCl	63,8
KCl	60,0
CaCl ₂	2,5
MgSO ₄	1,0
NaHCO ₃	25,0
KH ₂ PO ₄	1,2
C ₆ H ₁₂ O ₆	11,0
EDTA	0,004

Composição da solução de Krebs *Henseleit* modificada com altas concentrações de KCl. **C₆H₁₂O₆**: Glicose; **CaCl₂**: Cloreto de cálcio; **EDTA**: Ácido etilenodiamino tetra-acético; **KCl**: Cloreto de potássio; **KH₂PO₄**: Fosfato de potássio; **MgSO₄**: Sulfato de magnésio; **NaCl**: Cloreto de sódio; **NaHCO₃**: Bicarbonato de sódio

Fonte: adaptado de LEREIS et al., 2006

Os anéis de HUA e HUV eram considerados viáveis quando o delta das contrações fosse superior a 2 e 5 g, respectivamente. Após verificação da viabilidade, os anéis eram lavados com Krebs *Henseleit* normal e submetido a outro período de estabilização de, aproximadamente, 60 minutos, até que os valores de tensão voltassem à linha de base inicial.

3.10 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS COM HUCV

3.10.1 Investigação do Efeito dos Nitratos Orgânicos no Tônus Basal

Com a finalidade de investigar a resposta dos nitratos orgânicos sobre o tônus basal dos HUCV, após o retorno à linha de base, concentrações crescentes de GTN (0,1 nM – 1 mM), NTHF, Bis-NTHF ou NCOE (0,1 nM – 3 mM) eram adicionadas à preparação, de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta. A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento do tônus basal. Eficácia e potência dos nitratos foram avaliadas por meio dos valores de E_{máx} (efeito

máximo) e pD_2 (logaritmo negativo da concentração responsável por 50% do $E_{máx}$), respectivamente.

3.10.2 Investigação do Efeito dos Nitratos Orgânicos sobre Contrações Induzidas por 10 μ M de 5-HT

Após certificação da viabilidade do tecido e do segundo período de estabilização, foi induzida uma contração com 10 μ M de 5-HT, um potente vasoconstritor de HUCV (GUPTA et al., 2006), que atua por ativação dos receptores 5-HT_{1B/D} e 5-HT_{2A} (KARLSSON et al., 1999; SANTOS-SILVA; CAIRRÃO; VERDE, 2010). Na fase tônica da contração promovida por 5-HT (30 minutos) foram adicionadas concentrações crescentes de GTN (0,1 nM – 1 mM), NTHF, Bis-NTHF ou NCOE (0,1 nM – 3 mM), de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta. A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento da contração promovida por 5-HT. A potência e eficácia dos nitratos foram avaliadas por meio dos valores de pD_2 e $E_{máx}$, respectivamente.

3.10.3 Investigação do Efeito dos Nitratos Orgânicos sobre Contrações Induzidas por solução de Krebs Modificada com 60 mM de KCl

Após o período de estabilização de 60 minutos, foi induzida uma nova contração com a solução de Krebs *Henseleit* modificada com 60 mM de KCl (Quadro 3) (SANTOS-SILVA; CAIRRÃO; VERDE, 2010). Na fase tônica da contração promovida por 60 mM de KCl (30 minutos) foi adicionado concentrações crescentes de GTN (0,1 nM – 1 mM), NTHF, Bis-NTHF ou NCOE (0,1 nM – 3 mM), de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta. A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento da contração promovida por 60 mM de KCl. A potência e eficácia dos nitratos foram avaliadas por meio dos valores de pD_2 e $E_{máx}$, respectivamente.

3.10.4 Investigação da Influência da Pré-incubação dos Nitratos Orgânicos sobre a Contração Induzida por 5-HT

Decorrida a estabilização de 60 minutos, os anéis foram pré-incubados com a concentração máxima dos nitratos orgânicos em estudo (GTN – 1 mM; NTHF, BIS-NTHF ou NCOE 3 mM). Após aos 60 minutos da pré-incubação, 10 μ M de 5-HT foram adicionados à preparação. A resposta foi expressa como percentagem da contração na presença dos nitratos, comparada à induzida na ausência, que foi considerada o 100%. A eficácia dos nitratos foi avaliada por meio dos valores de $E_{m\acute{a}x}$.

3.10.5 Investigação da Influência da Pré-incubação dos Nitratos Orgânicos sobre Contrações Induzidas por 5-HT na Ausência de Cálcio Extracelular

Decorrida a estabilização de 60 minutos, o banho foi trocado por uma solução de Krebs zero cálcio (Quadro 4). Após 30 minutos, foi induzida uma contração com 10 μ M de 5-HT, cuja resposta foi observada por 15 minutos. Em seguida, o meio foi lavado com Krebs normal (Quadro 2), até que os anéis voltassem para valores aproximados à tensão inicial. Posteriormente, Krebs zero cálcio foi adicionado novamente e, após 30 minutos, a concentração máxima dos nitratos (1 mM de GTN; 3 mM de NTHF; 3 mM de BIS-NTHF; ou 3 mM de NCOE) foi pré-incubada por 60 minutos, seguido da aplicação de 10 μ M de 5-HT. A resposta foi expressa como percentagem da contração na presença dos nitratos, comparada à induzida na ausência, que foi considerada o 100%. A eficácia dos nitratos foi avaliada por meio dos valores de $E_{m\acute{a}x}$.

Quadro 4 – Composição da Solução de Krebs *Henseleit* Zero Cálcio

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	119,0
KCl	4,7
CaCl ₂	0,0
MgSO ₄	1,0
NaHCO ₃	25,0
KH ₂ PO ₄	1,2
C ₆ H ₁₂ O ₆	11,0
EDTA	0,004
EGTA	0,5

Composição da solução de Krebs *Henseleit* na ausência de cálcio

C₆H₁₂O₆: Glicose; **CaCl₂**: Cloreto de cálcio; **EDTA**: Ácido etilenodiamino tetra-acético; **EGTA**:

Ácido bis(2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético; **KCl**: Cloreto de potássio; **KH₂PO₄**: Fosfato de potássio; **MgSO₄**: Sulfato de magnésio; **NaCl**: Cloreto de sódio; **NaHCO₃**: Bicarbonato de sódio

Fonte: LEREIS et al., 2006

3.10.6 Investigação do Envolvimento da Via NO-sGC no Vasorrelaxamento Induzido pelos Nitratos Orgânicos em Anéis Pré-contraídos com 10 µM de 5-HT

Com a finalidade de investigar a participação da via NO-sGC na resposta vasorrelaxante promovida pelos nitratos orgânicos em estudo, foi utilizado o ODQ (10 µM), um potente inibidor que previne a ativação da sGC pelo NO (GARTHWAITE et al., 1995; LOVREN; TRIGGLE, 2000; CAIRRÃO; SANTOS-SILVA; VERDE, 2010).

Após a estabilização de 60 minutos, 10 µM de ODQ foi adicionado à preparação. Posteriormente ao período de incubação de 30 minutos, foi induzida uma contração com 10 µM de 5-HT. Na fase tônica desta (30 minutos) foram adicionadas concentrações crescentes de GTN (0,1 nM – 1 mM), NTHF, Bis-NTHF ou NCOE (0,1 nM – 3 mM), de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta. A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento da contração

promovida por 5-HT. A potência e eficácia dos nitratos foram avaliadas por meio dos valores de pD_2 e $E_{máx}$, respectivamente.

3.10.7 Investigação do Envolvimento dos Canais para Potássio no Vasorrelaxamento Induzido pelos Nitratos Orgânicos em Anéis Pré-contraídos com 10 μ M de 5-HT

Para investigar a participação de canais para potássio na resposta vasorrelaxante promovida pelos nitratos orgânicos em estudo, foi utilizado tetraetilamônio (TEA) na concentração de 10 mM, um bloqueador não seletivo dos canais para potássio (CAIRRÃO et al., 2008; LOVREN; TRIGGLE, 2000; POTRIC et al., 2012).

Decorrida a estabilização de 60 minutos, 10 mM de TEA foi adicionado à preparação e incubado por 30 minutos ou 60 minutos em HUA ou HUV, respectivamente. Em seguida, foi induzida uma contração com 10 μ M de 5-HT. Na fase tônica desta (30 minutos) foram adicionadas concentrações crescentes de GTN (0.1 nM – 1 mM), NTHF, BIS-NTHF ou NCOE (0.1 nM – 3 mM), de maneira cumulativa, para obtenção de uma curva concentração-resposta. A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento da contração promovida por 5-HT. A potência e eficácia dos nitratos foram avaliadas por meio dos valores de pD_2 e $E_{máx}$, respectivamente.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. (e.p.m). As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando o $p < 0,05$. As comparações estatísticas foram realizadas por meio da utilização do teste t de Student não pareado.

Os valores de $E_{máx}$ e de pD_2 foram obtidas por regressão não linear a partir de uma curva concentração-resposta. Os dados alcançados foram analisados e plotados por meio da utilização do programa estatístico *GraphPad Prism 6.0*[®].

Resultados

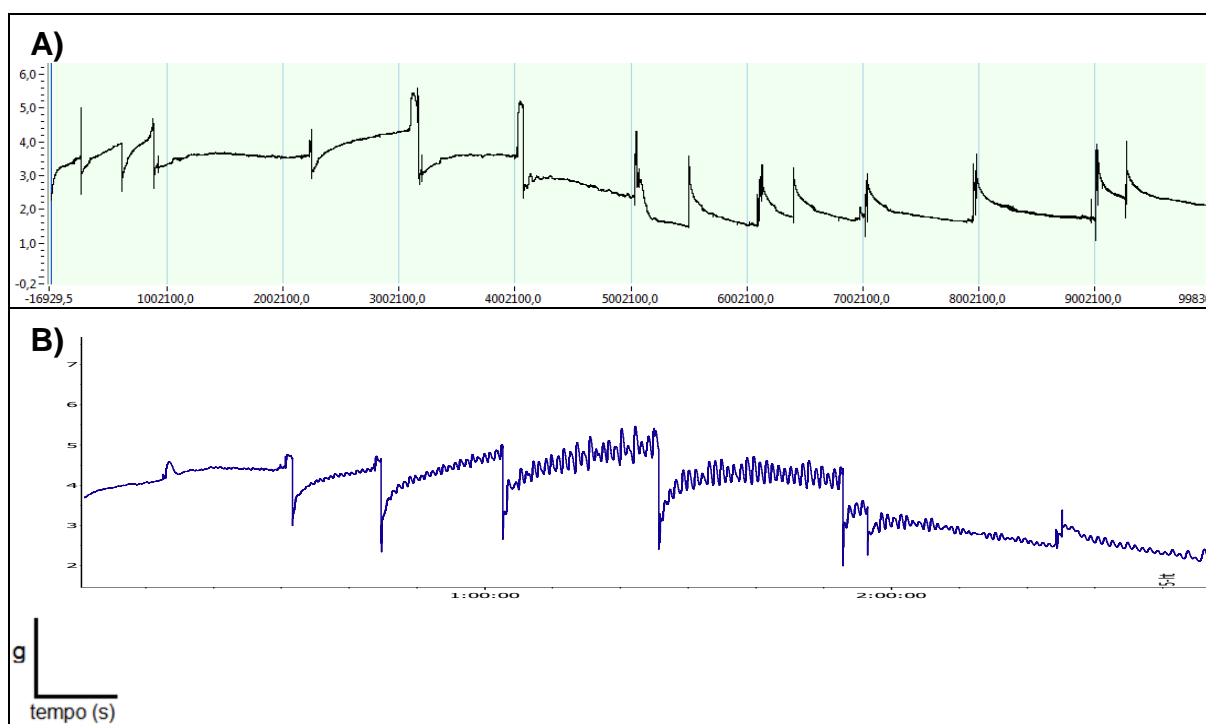
4 RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO HUCV

A partir dos testes para padronização estabeleceu-se o que seria feito em todos os experimentos envolvendo HUCV e que será descrito a seguir.

Os anéis dos vasos umbilicais seriam submetidos a tensão de 3 g, por um de 180 minutos período de estabilização. A tensão era ajustada a cada 15 minutos durante os 150 minutos desse tempo. Nos outros 30 minutos a tensão não foi alterada e o meio não foi mais trocado para que os anéis de HUV (Figura 15A) e HUA (Figura 15B) ficassem estáveis para a inicialização dos experimentos.

Figura 15 – Estabilização dos HUCV



Registro original do período de estabilização de A) HUV e B) HUA. Notar escalas diferentes para A e B.
Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

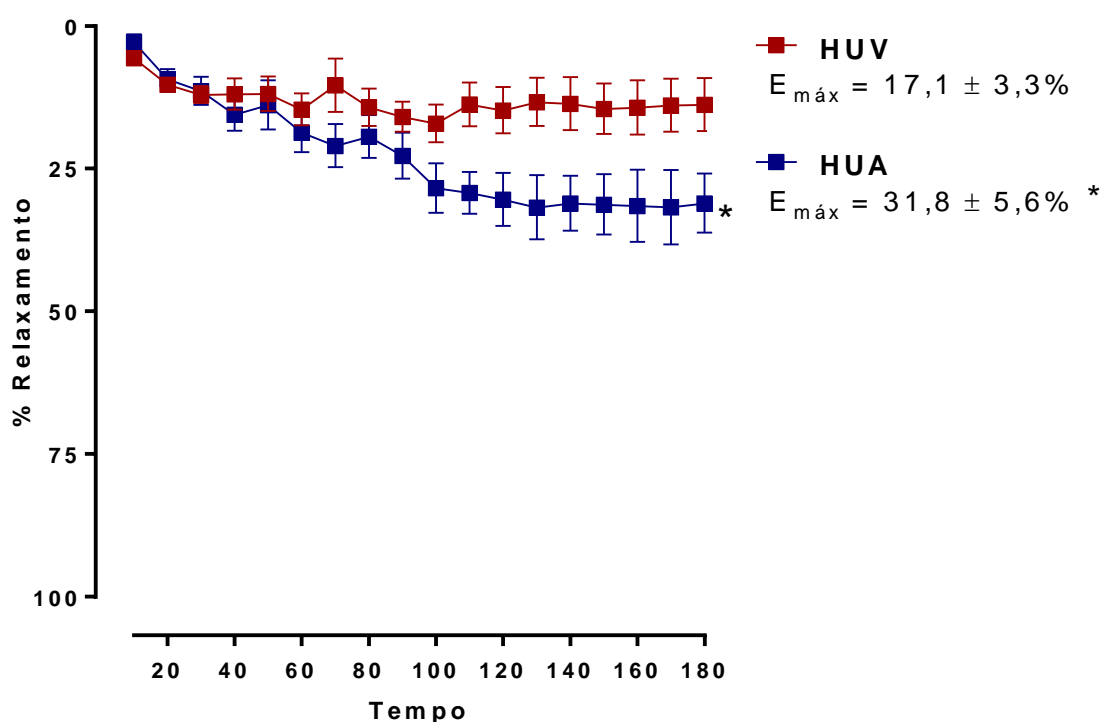
Foi evidenciado que os HUCV apresentam um tônus intrínseco evidenciado, principalmente, nos primeiros 90 a 120 minutos da estabilização, o que faz necessário os ajustes de tensão conforme o descrito acima.

Os agentes contraturantes que tiveram melhor resposta nos vasos umbilicais foram 10 μ M 5-HT e a solução despolarizante de 60 mM de KCl.

4.2 EFEITO SOBRE O TÔNUS BASAL DE HUCV

Após o período de estabilização, os experimentos com HUCV duravam aproximadamente 180 minutos. Durante este período, os vasos umbilicais apresentaram queda da tensão basal. A diminuição do tônus basal foi maior em HUA ($E_{m\acute{a}x} = 31,8 \pm 5,6\%$) do que em HUV ($E_{m\acute{a}x} = 17,1 \pm 3,3\%$, $p < 0,05$), os quais ocorreram em 100 e 130 minutos, respectivamente, após o início do experimento (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Controle do Tônus Basal de HUCV em Função do Tempo

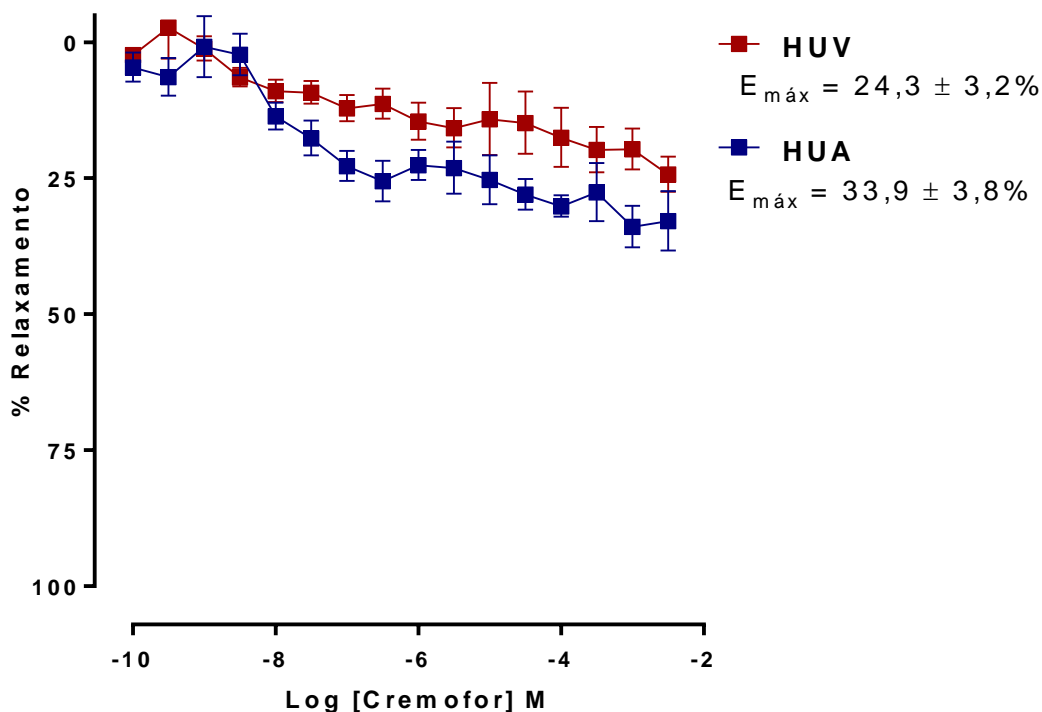


Curva da diminuição do tônus basal em função do tempo, em anéis de HUV (■; n = 6) e HUA (■; n = 6). Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$ vs HUV.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

O cremofor, nas concentrações referentes às utilizadas para solubilizar os nitratos orgânicos, relaxou o tônus basal, tanto de HUV ($E_{m\acute{a}x} = 24,3 \pm 3,2\%$) quanto de HUA ($E_{m\acute{a}x} = 33,9 \pm 3,8\%$), de maneira semelhante ao controle basal em função do tempo ($p > 0,05$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Efeito do Cremofor sobre o Tônus Basal de HUCV



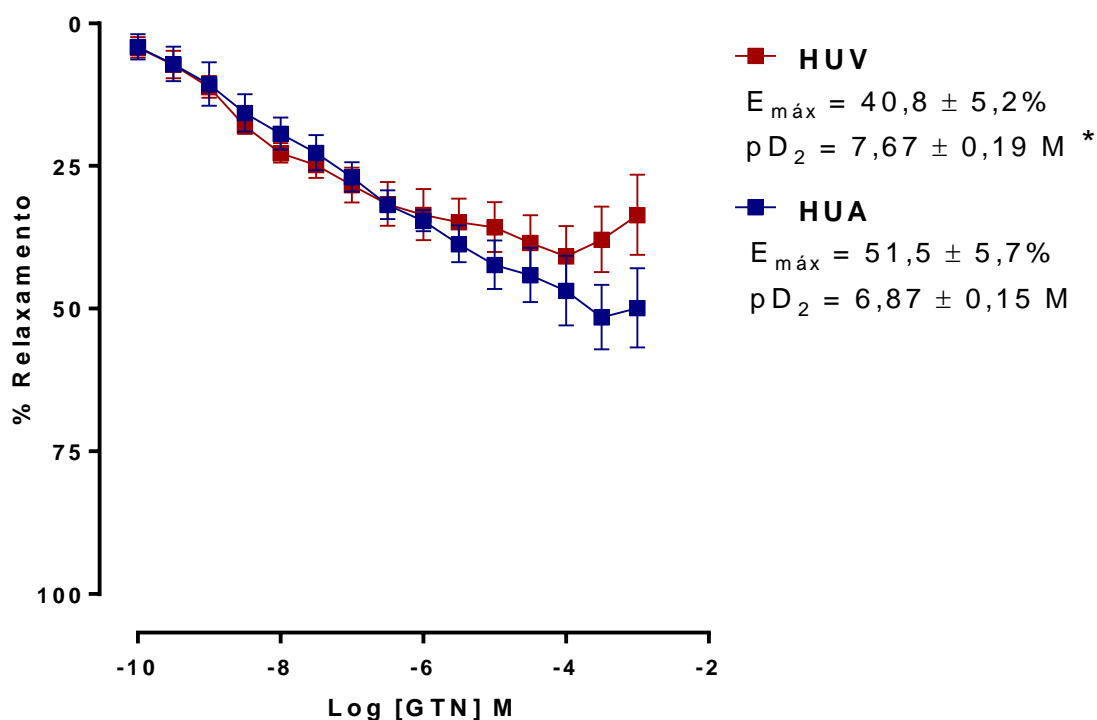
Curva concentração-resposta da diminuição do tônus induzido pelo cremofor (0,1 nM – 3 mM), em anéis de HUV (■; n = 6) e HUA (■; n = 6). Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

4.1.1 Efeito dos Nitratos sobre o Tônus Basal de HUCV

GTN induziu vasorrelaxamento do tônus basal de HUCV. Esta resposta foi mais potente em HUV ($pD_2 = 7,67 \pm 0,19 M$, $p < 0,05$) do que em HUA ($pD_2 = 6,87 \pm 0,15 M$). Em contrapartida, a eficácia desse nitrato não houve diferença estatística entre HUV ($E_{máx} = 40,8 \pm 5,2\%$) e HUA ($E_{máx} = 51,5 \pm 5,7\%$; $p > 0,05$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Efeito de GTN sobre o Tônus Basal HUCV

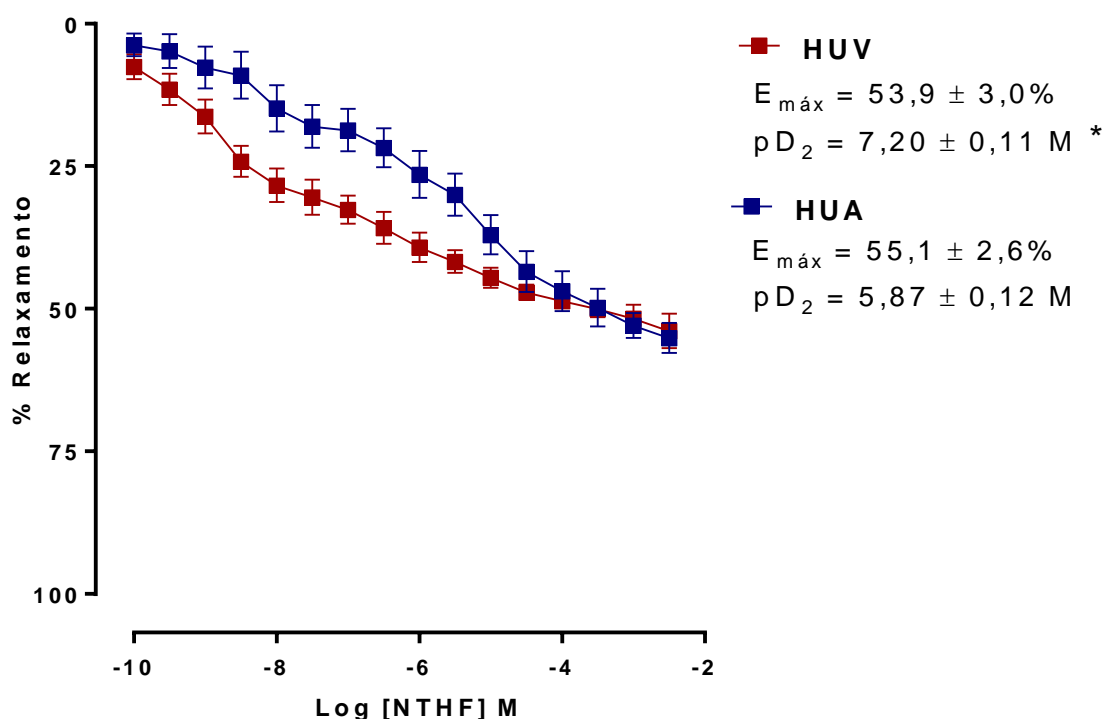


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por GTN (0,1 nM – 1 mM) no tônus basal de anéis de HUV (■; n = 6) e HUA (■; n = 6). Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$ vs HUA.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

O tônus basal dos HUCV relaxou, quando foi exposto ao NTHF. Este efeito resposta foi mais potente em HUV ($pD_2 = 7,20 \pm 0,11 M$, $p < 0,05$) do que em HUA ($pD_2 = 5,87 \pm 0,12 M$). Por outro lado, o vasorrelaxamento promovido por NTHF não exibiu diferença estatística nos valores de eficácia de HUV ($E_{m\acute{a}x} = 53,9 \pm 3,0\%$) e HUA ($E_{m\acute{a}x} = 55,1 \pm 2,6\%$; $p > 0,05$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Efeito de NTHF sobre o Tônus Basal HUCV

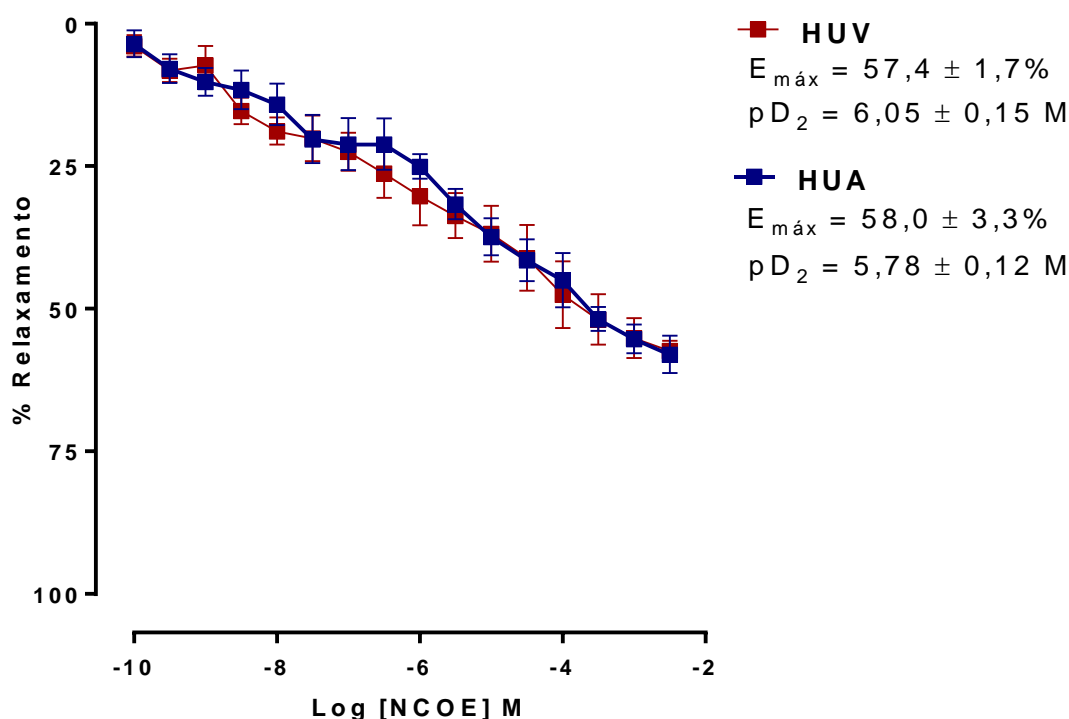


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NTHF (0,1 nM – 3 mM) no tônus basal de anéis de HUV (■; n = 6) e HUA (■; n = 6). Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$ vs HUA.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

NCOE causou vasodilatação, de maneira semelhante, do tônus basal de HUV ($E_{máx} = 57,4 \pm 1,7\%$ e $pD_2 = 6,05 \pm 0,15 M$) e HUA ($E_{máx} = 58,0 \pm 3,3\%$ e $pD_2 = 5,78 \pm 0,12 M$). Desta forma, o nitrato não apresentou diferença estatística de eficácia e potência ($p > 0,05$), quando comparado o efeito em ambos os vasos sanguíneos (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Efeito de NCOE sobre o Tônus Basal HUCV

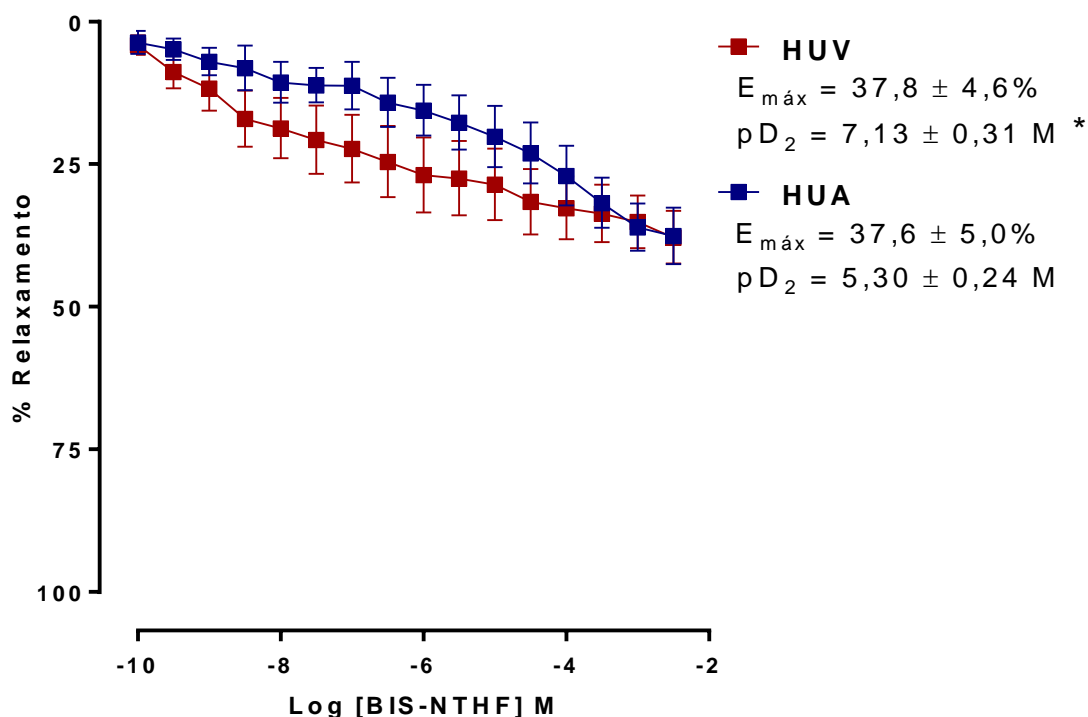


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NCOE (0,1 nM – 3 mM) no tônus basal de anéis de HUV (■; n = 6) e HUA (■; n = 6). Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A resposta vasodilatadora sobre o tônus basal, induzida por BIS-NTHF, foi mais potente em HUV ($pD_2 = 7,13 \pm 0,31 M$; $p < 0,05$) do que em HUA ($pD_2 = 5,30 \pm 0,24 M$). Este resultado não apresentou diferença estatística da eficácia desse nitrato em HUV ($E_{máx} = 37,8 \pm 4,6\%$) e HUA ($E_{máx} = 37,6 \pm 5,0\%$; $p > 0,05$) (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Efeito de BIS-NTHF sobre o Tônus Basal HUCV



Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por BIS-NTHF (0,1 nM – 3 mM) no tônus basal de anéis de HUV (■; n = 6) e HUA (■; n = 6). Os pontos representam a média de 7 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m; * $p < 0,05$

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Todos os nitratos foram mais eficazes em induzir relaxamento do tônus basal de HUV ($E_{m\acute{a}x} = 40,8 \pm 5,2\%$, $53,9 \pm 3,0\%$, $57,4 \pm 1,7\%$ e $37,8 \pm 4,6\%$, GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF, respectivamente; $p < 0,05$) do que cremofor ($E_{m\acute{a}x} = 24,3 \pm 3,2\%$). As eficácias comparadas entre NTHF e GTN/ NTHF e NCOE/ GTN e NCOE foram semelhantes ($p > 0,05$). Em contrapartida, NTHF e NCOE apresentaram eficácia superior em relaxar HUV ($p < 0,05$), quando comparados à BIS-NTHF (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Comparação da Eficácia do Relaxamento do Tônus Basal de HUV Induzido pelos Nitratos

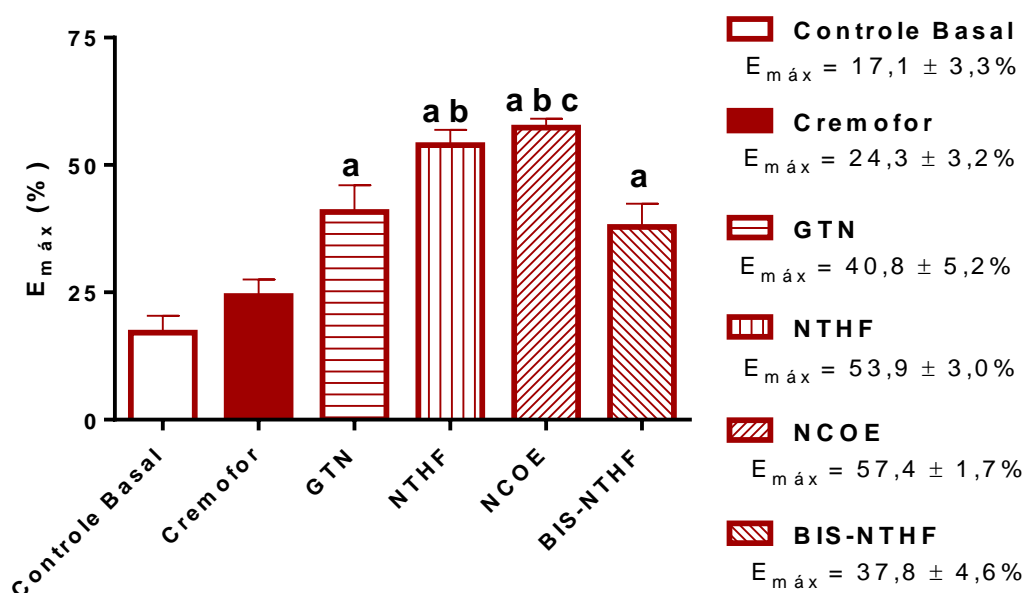


Gráfico comparando os valores de $E_{m\acute{a}x}$ do relaxamento do tônus basal de HUV, no controle basal e induzido após a aplicação de cremofor, GTN, NTHF, NCOE ou BIS-NTHF. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. ^a $p < 0,05$ vs cremofor; ^b $p < 0,05$ vs BIS-NTHF; ^c $p < 0,05$ vs GTN

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

NCOE ($pD_2 = 6,05 \pm 0,15$ M; $p < 0,05$) apresentou a menor potência, quando comparado aos outros nitratos ($pD_2 = 7,67 \pm 0,19$ M e $7,13 \pm 0,31$ M, GTN e BIS-NTHF, respectivamente), que apresentaram semelhança neste parâmetro de avaliação ($p > 0,05$) (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Comparação da Potência do Relaxamento do Tônus Basal de HUV Induzido pelos Nitratos

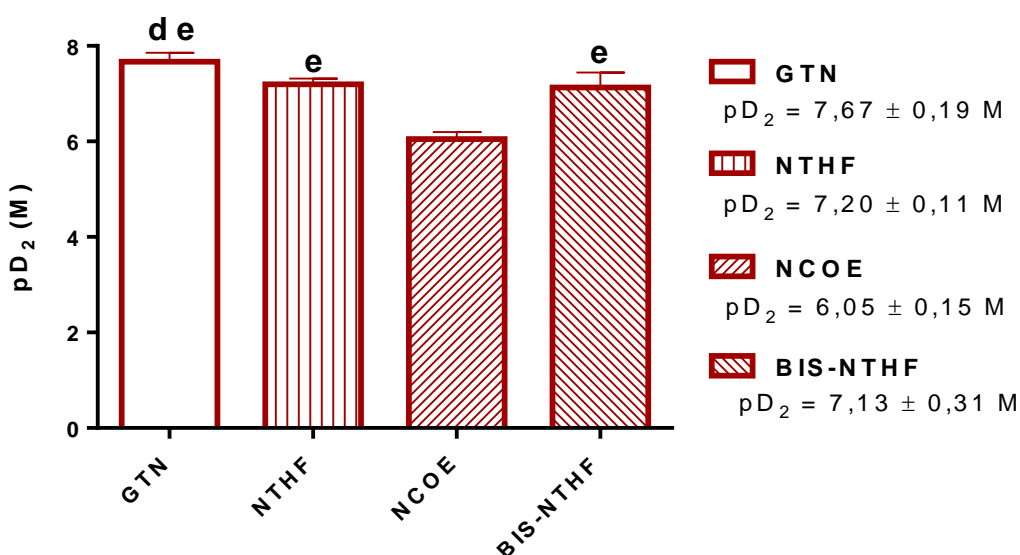


Gráfico comparando os valores de pD_2 do relaxamento do tônus basal induzido por GTN, NTHF, NCOE ou BIS-NTHF, em anéis de HUV. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. ^d $p < 0,05$ vs NTHF; ^e $p < 0,05$ vs NCOE

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

O vasorrelaxamento do tônus basal de HUA ocorreu de forma mais eficaz para GTN, NTHF e NCOE ($E_{m\acute{a}x} = 51,5 \pm 5,7\%$, $55,1 \pm 2,6\%$ e $58,0 \pm 3,3\%$, respectivamente; $p < 0,05$) do que para o cremofor, ($E_{m\acute{a}x} = 33,9 \pm 3,8\%$). BIS-NTHF ($E_{m\acute{a}x} = 37,6 \pm 5,0\%$), por sua vez, apresentou eficácia semelhante a esse agente solubilizante ($p > 0,05$). GTN, NTHF e NCOE apresentaram eficácia semelhante entre eles ($p > 0,05$) e superior ao BIS-NTHF ($p < 0,05$) (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Comparação da Eficácia do Relaxamento do Tônus Basal de HUA Induzido pelos Nitratos

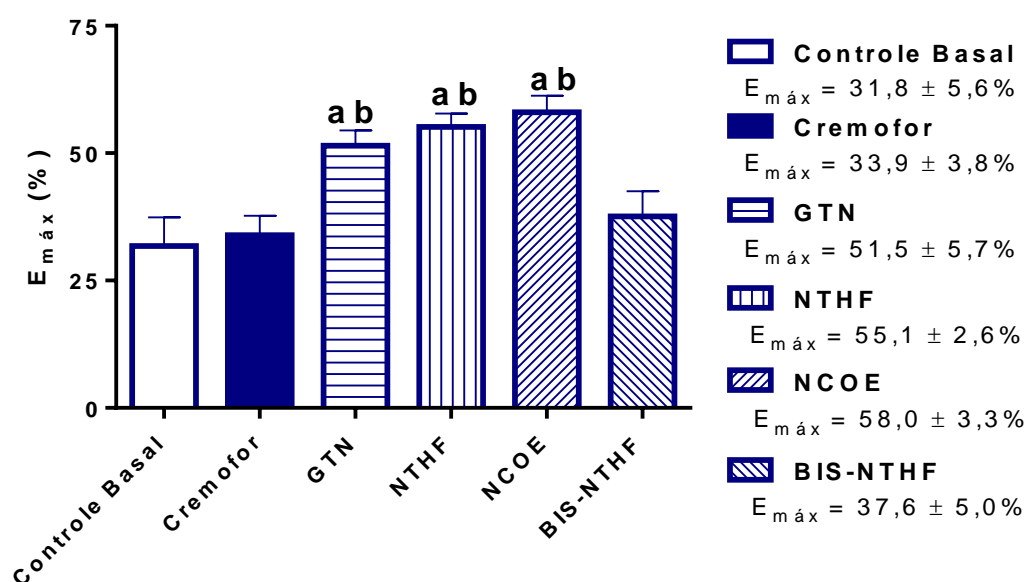


Gráfico comparando os valores de $E_{m\acute{a}x}$ do relaxamento do tônus basal no controle basal e induzido após a aplicação de cremofor, GTN, NTHF, NCOE ou BIS-NTHF, em anéis de HUA. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. ^a $p < 0,05$ vs cremofor; ^b $p < 0,05$ vs BIS-NTHF

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

GTN ($pD_2 = 6,87 \pm 0,15$ M) foi o nitrato mais potente ($p < 0,05$), quando comparado aos outros ($pD_2 = 5,87 \pm 0,12$ M, $5,78 \pm 0,12$ M e $5,30 \pm 0,24$; NTHF, NCOE e BIS-NTHF, respectivamente) (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Comparação da Potência do Relaxamento do Tônus Basal de HUA Induzido pelos Nitratos

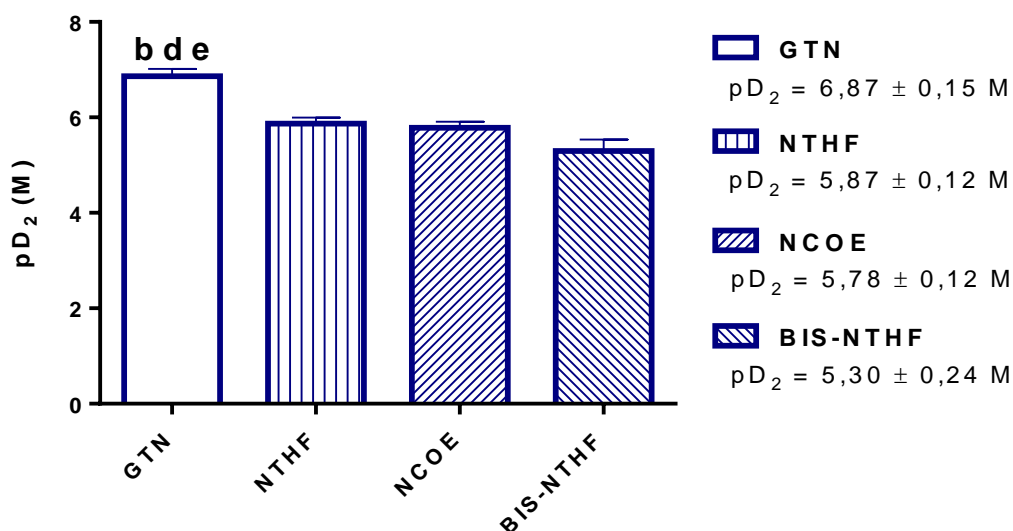


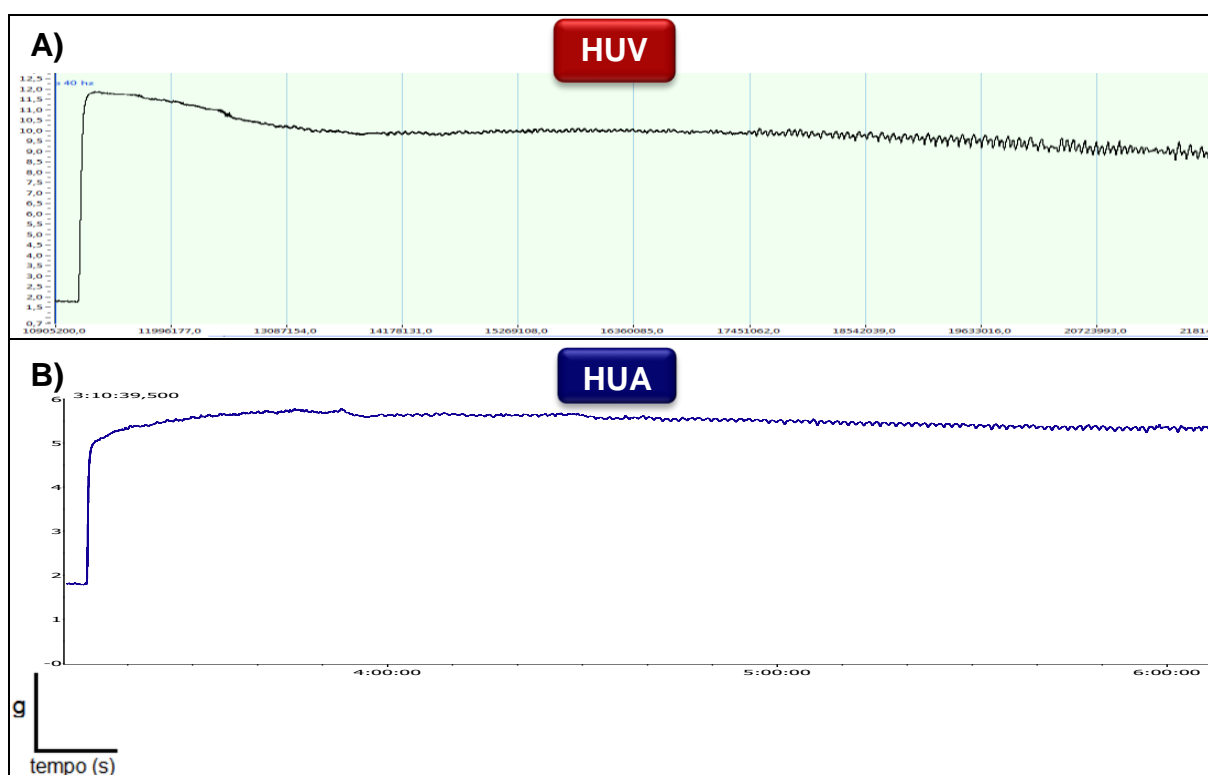
Gráfico comparando os valores de pD_2 do relaxamento do tônus basal induzido por GTN, NTHF, NCOE ou BIS-NTHF, em anéis de HUA. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. ^b $p < 0,05$ vs BIS-NTHF; ^d $p < 0,05$ vs NTHF; ^e $p < 0,05$ vs NCOE

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

4.2 EFEITO SOBRE ANÉIS DE HUCV PRÉ-CONTRAÍDOS COM 10 μ M DE 5-HT

Após cerca de 20 minutos de indução da contração por 5-HT, alguns anéis de HUV e HUA exibiram uma queda do tônus contrátil durante os 180 minutos totais de experimento. Por outro lado, após esse período, o relaxamento causado foi de uma magnitude que não alteraram a avaliação do vasorrelaxamento induzido pelos nitratos (Figura 16).

Figura 16 – Controle da Contração Induzida por 5-HT em HUCV em Função do Tempo



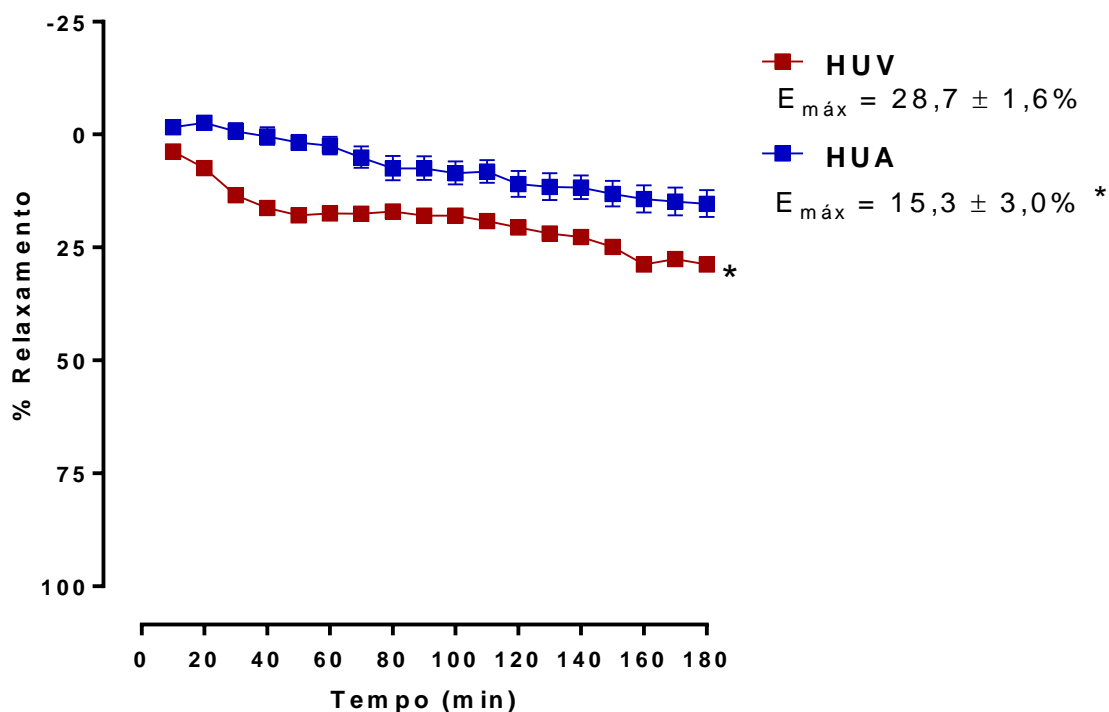
Registro original do controle do tônus contrátil, em função do tempo, induzido por 5-HT em A) HUV e B) HUA. Notar escalas diferentes para A e B.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

De maneira geral, observou-se que quanto maior era a contração maior seria a possibilidade de queda deste, de forma que só eram considerados viáveis os experimentos cujo tônus contrátil só relaxava até no máximo os primeiros 30 minutos subsequentes à aplicação do agente contraturante.

A queda do tônus contrátil, durante o controle da contração, foi maior em anéis de HUV ($E_{máx} = 28,7 \pm 1,6\%$; $p < 0,05$) do que em HUA ($E_{máx} = 15,3 \pm 3,0\%$) (Gráfico 11).

Gráfico 11 – Controle da Contração Induzida por 5-HT em HUCV em Função do Tempo

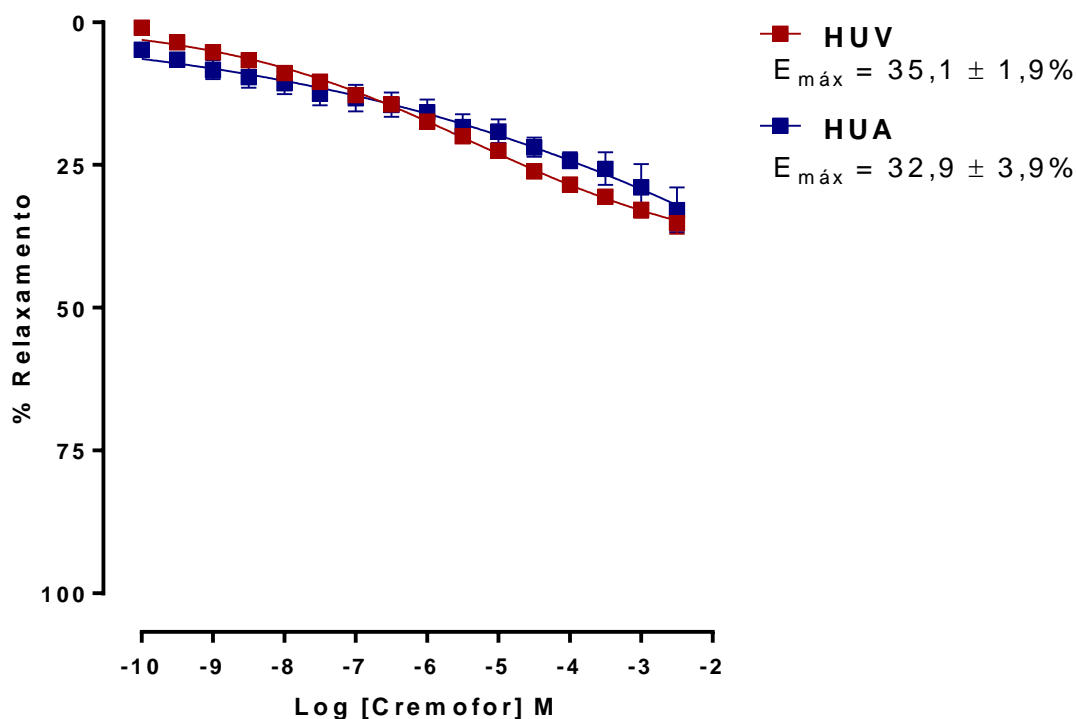


Curva da queda do tônus contrátil, em função do tempo, induzido por 5-HT em anéis de HUV (■; $n = 6$) e HUA (■; $n = 6$). Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$ vs HUV.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

O cremofor, nas concentrações referentes às utilizadas para solubilizar os nitratos orgânicos, também diminuiu, de maneira semelhante, o tônus contrátil, tanto de HUV ($E_{máx} = 35,1 \pm 1,9\%$) quanto de HUA ($E_{máx} = 32,9 \pm 3,9\%$; $p > 0,05$) (Gráfico 12).

Gráfico 12 – Efeito do Cremofor sobre o Tônus Contrátil de HUCV



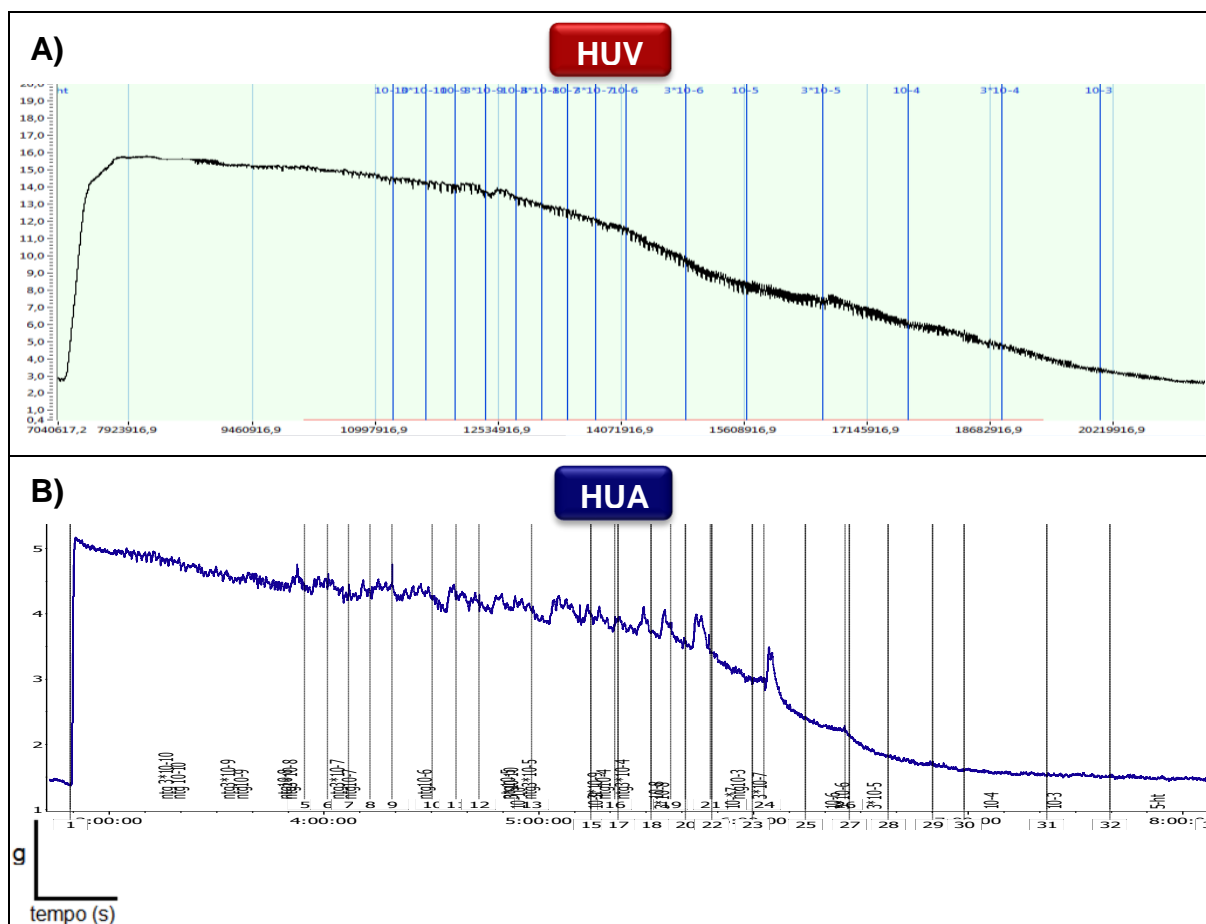
Curva concentração-resposta do efeito induzido por cremofor (0,1 nM – 3 mM), em anéis de HUV (■; n = 6) e HUA (■; n = 6), pré-contráidos com 5-HT. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

4.2.1 Efeito dos Nitratos sobre Anéis de HUCV Pré-contraídos com 10 μ M de 5-HT

GTN induziu vasorrelaxamento, de maneira dependente de concentração, em anéis de HUCV pré-contraídos com 5-HT (Figura 17).

Figura 17 – Efeito de GTN sobre HUCV Pré-contraídos com 5-HT

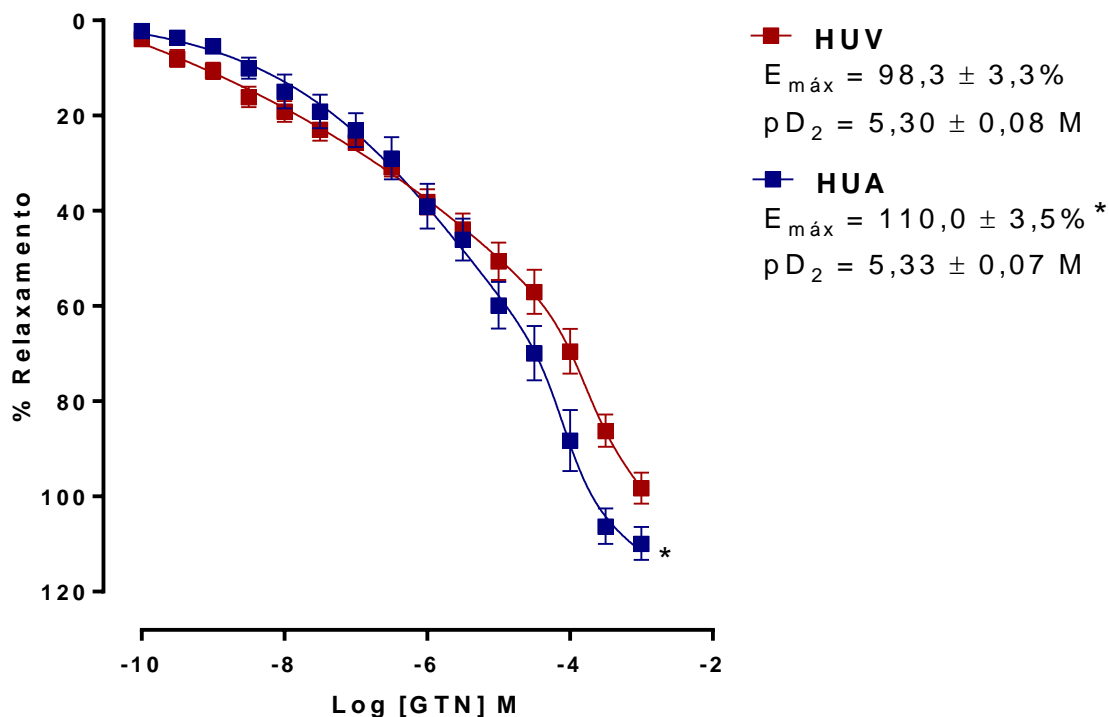


Registro original do vasorrelaxamento induzido por GTN (0,1 nM – 1 mM) em anéis de A) HUV e B) HUA, pré-contraídos com 5-HT. Notar escalas diferentes para A e B.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

GTN foi mais eficaz em dilatar HUA ($E_{máx} = 110,0 \pm 3,5\%$; $p < 0,05$) do que HUV ($E_{máx} = 98,3 \pm 3,3\%$). Por outro lado, esse nitrato não apresentou diferença estatística entre os valores de potência da vasodilatação em HUA ($pD_2 = 5,33 \pm 0,07 M$; $p > 0,05$) e HUV ($pD_2 = 5,30 \pm 0,08 M$) (Gráfico 13).

Gráfico 13 – Efeito de GTN em HUCV Pré-contraídos com 5-HT

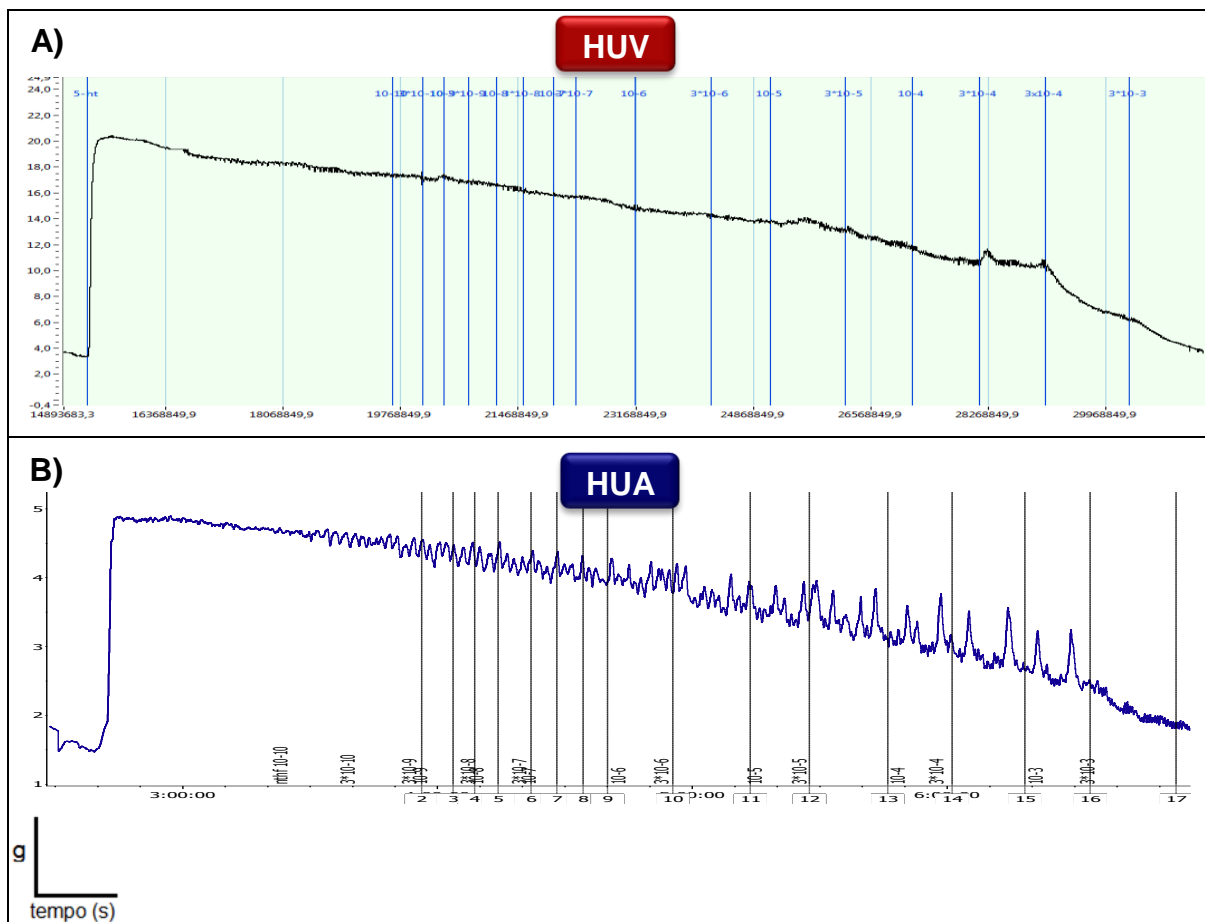


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por GTN (0,1 nM – 1 mM), em anéis de HUV (■; n = 6) e HUA (■; n = 6), pré-contraídos com 5-HT. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$ vs HUV.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Em anéis de HUCV pré-contraídos com 5-HT, NTHF induziu vasodilatação de maneira dependente de concentração (Figura 18).

Figura 18 – Efeito de NTHF sobre HUCV Pré-contraídos com 5-HT

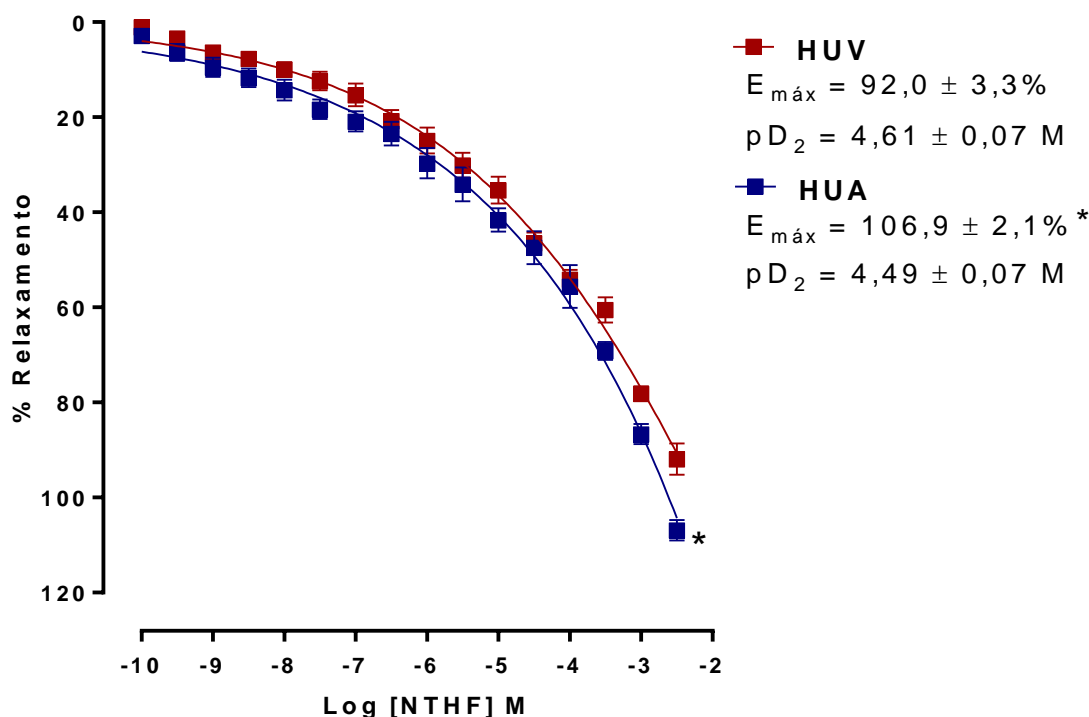


Registro original do vasorrelaxamento induzido por NTHF (0,1 nM – 3 mM) em anéis de A) HUV e B) HUA, pré-contraídos com 5-HT. Notar escalas diferentes para A e B.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

O efeito vasodilatador, induzido por NTHF, foi mais eficaz em HUA ($E_{m\acute{a}x} = 106,9 \pm 2,1\%$; $p < 0,05$) do que HUV ($E_{m\acute{a}x} = 92,0 \pm 3,3\%$). Em contrapartida, a potência desse nitrato foi semelhante em HUA ($pD_2 = 4,49 \pm 0,07 M$) e HUV ($pD_2 = 4,61 \pm 0,07 M$; $p > 0,05$) (Gráfico 14).

Gráfico 14 – Efeito de NTHF em HUCV Pré-contraídos com 5-HT

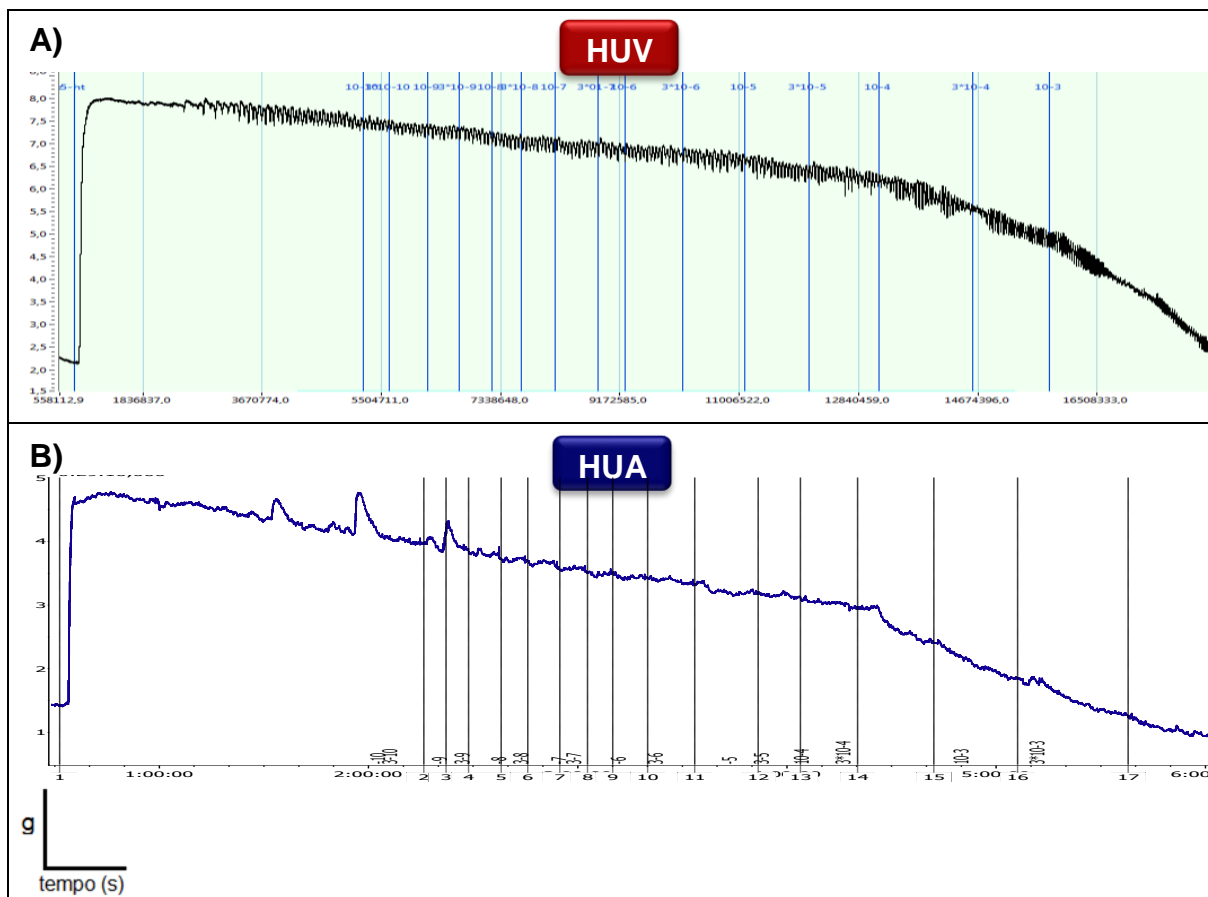


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NTHF (0,1 nM – 3 mM), em anéis de HUV (■; n = 6) e HUA (■; n = 6), pré-contraídos com 5-HT. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

NCOE induziu vasorrelaxamento, de maneira dependente de concentração, em anéis de HUCV pré-contraídos com 5-HT (Figura 19).

Figura 19 – Efeito de NCOE sobre HUCV Pré-contraídos com 5-HT

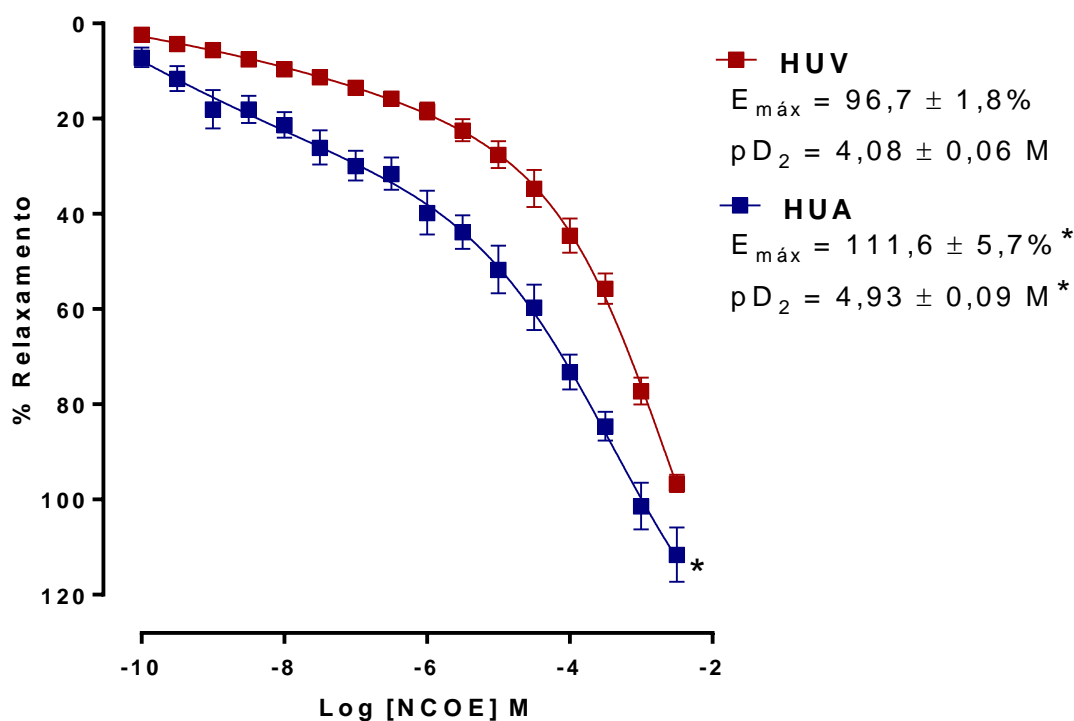


Registro original do vasorrelaxamento induzido por NCOE (0,1 nM – 3 mM) em anéis de A) HUV e B) HUA, pré-contraídos com 5-HT. Notar escalas diferentes para A e B.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A vasodilatação, promovida por NCOE, ocorreu de forma mais eficaz e potente em HUA ($E_{m\acute{a}x} = 111,6 \pm 5,7\%$ e $pD_2 = 4,93 \pm 0,09 M$; $p < 0,05$) do que HUV ($E_{m\acute{a}x} = 96,7 \pm 1,8\%$ e $pD_2 = 4,08 \pm 0,06 M$) (Gráfico 15).

Gráfico 15 – Efeito de NCOE em HUCV Pré-contraídos com 5-HT

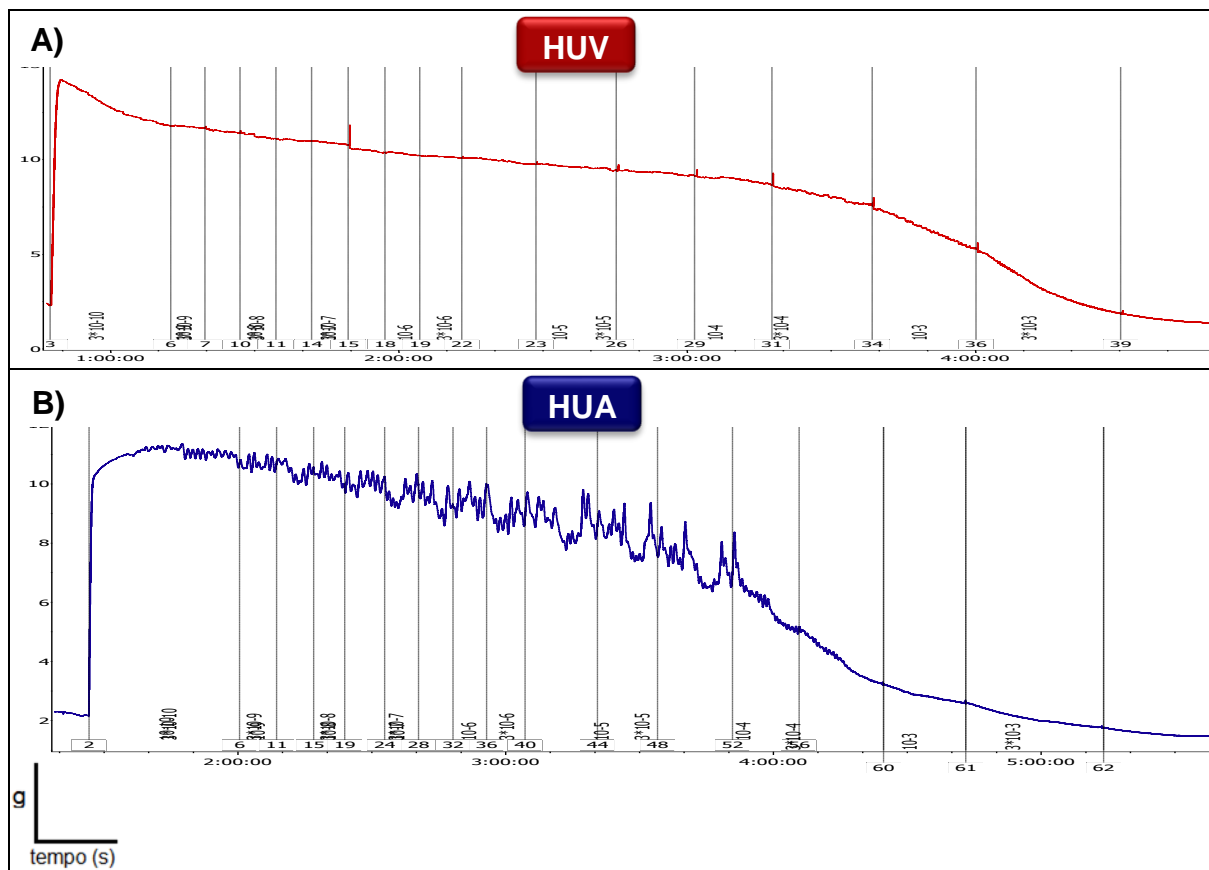


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NCOE (0,1 nM – 3 mM), em anéis de HUV (■; n = 6) e HUA (■; n = 6), pré-contraídos com 5-HT. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

BIS-NTHF exibiu um efeito vasorrelaxante, de maneira dependente de concentração, em anéis de HUCV pré-contraídos com 5-HT (Figura 20).

Figura 20 – Efeito de BIS-NTHF sobre HUCV Pré-contraídos com 5-HT

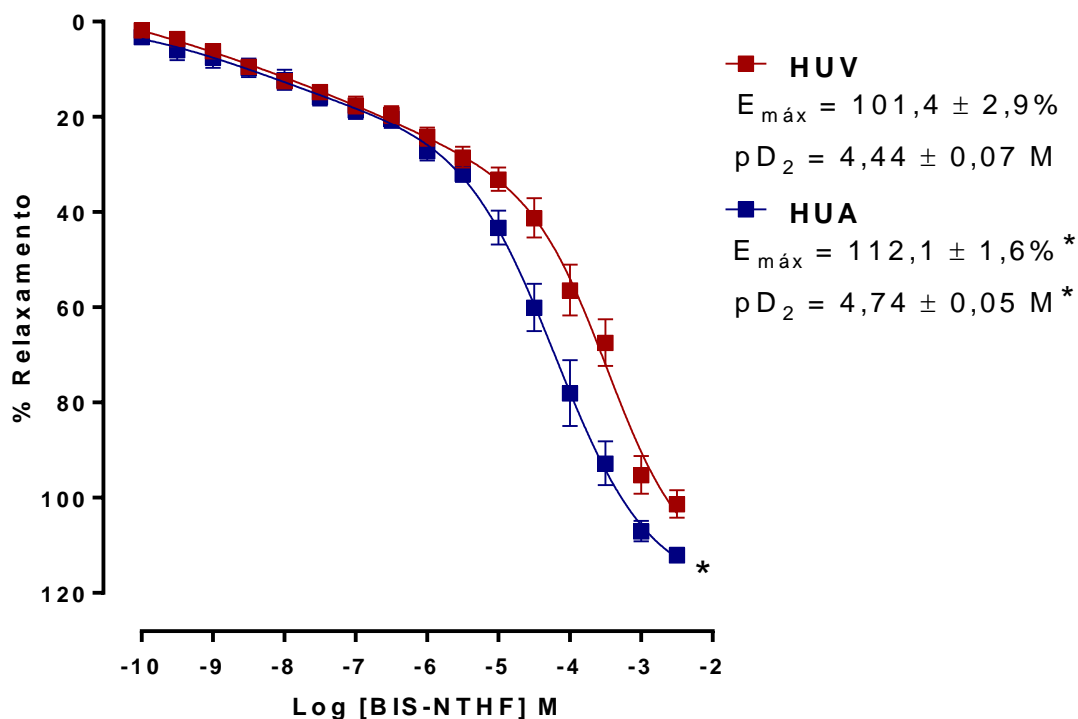


Registro original do vasorrelaxamento induzido por BIS-NTHF (0,1 nM – 3 mM) em anéis de A) HUV e B) HUA, pré-contraídos com 5-HT. Notar escalas diferentes para A e B.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A resposta vasorrelaxante, promovida por BIS-NTHF, ocorreu de forma mais eficaz e potente em HUA ($E_{m\acute{a}x} = 112,1 \pm 1,6\%$ e $pD_2 = 4,74 \pm 0,05 M$; $p < 0,05$) do que HUV ($E_{m\acute{a}x} = 101,1 \pm 2,9\%$ e $pD_2 = 4,44 \pm 0,07 M$) (Gráfico 16).

Gráfico 16 – Efeito de BIS-NTHF em HUCV Pré-contráídos com 5-HT



Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por BIS-NTHF (0,1 nM – 3 mM), em anéis de HUV (■; n = 6) e HUA (■; n = 6), pré-contráídos com 5-HT. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

O relaxamento do tônus contrátil, induzido por cremofor ($E_{m\acute{a}x} = 35,1 \pm 1,9\%$; $p < 0,05$), em anéis de HUV, foi significativamente maior do que a queda do tônus contrátil em função do tempo ($E_{m\acute{a}x} = 28,7 \pm 1,6\%$). Todos os nitratos foram mais eficazes em vasorrelaxar HUV ($p < 0,05$), em comparação ao cremofor (Gráfico 17).

Gráfico 17 – Comparação da Eficácia da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por 5-HT em HUV

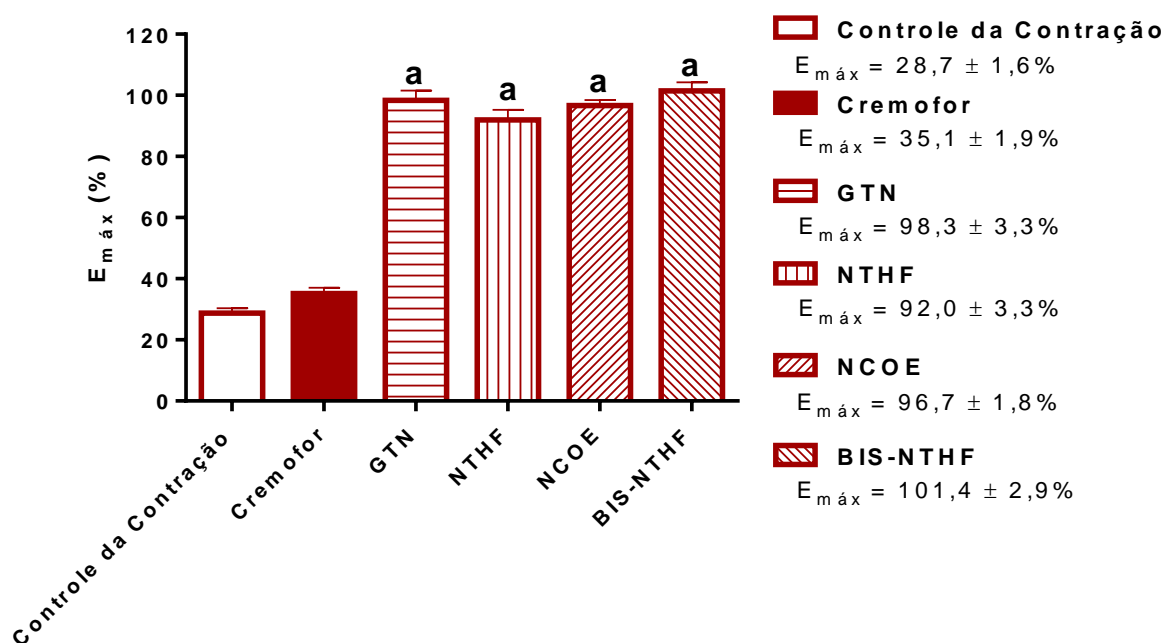


Gráfico comparando os valores de $E_{m\acute{a}x}$ do vasorrelaxamento no controle da contração e após adição de cremofor, GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF, em anéis de HUV pré-contraídos com 5-HT. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. ^a $p < 0,05$ vs cremofor
Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

GTN ($pD_2 = 5,30 \pm 0,08$ M; $p < 0,05$) e NCOE ($pD_2 = 4,08 \pm 0,06$ M) foram, respectivamente, os nitratos mais e menos potentes (Gráfico 18), em relação aos anéis de HUV.

Gráfico 18 – Comparação da Potência da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por 5-HT em HUV

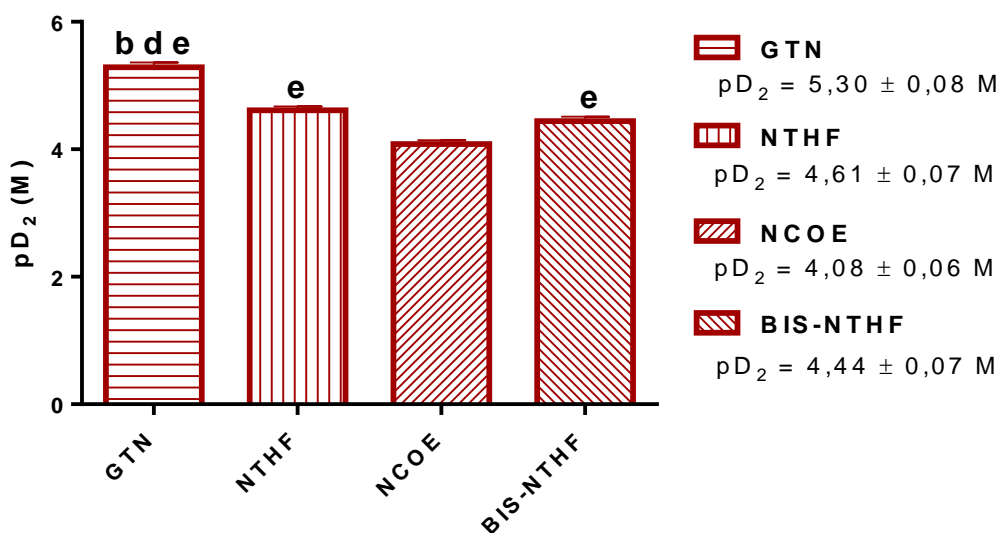


Gráfico comparando os valores de pD_2 do vasorrelaxamento induzido por GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF, em anéis de HUV pré-contraídos com 5-HT. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. ^b $p < 0,05$ vs BIS-NTHF; ^d $p < 0,05$ vs NTHF; ^e $p < 0,05$ vs NCOE
Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Nos anéis de HUA, o relaxamento do tônus contrátil induzido por cremofor ($E_{m\acute{a}x} = 32,9 \pm 3,9\%$; $p < 0,05$), foi significativamente maior do que a queda do tônus em função do tempo ($E_{m\acute{a}x} = 15,3 \pm 3,0\%$). Todos os nitratos foram mais eficazes em induzir vasodilatação de HUA ($p < 0,05$), quando comparados ao cremofor (Gráfico 19).

Gráfico 19 – Comparação da Eficácia da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por 5-HT em HUA

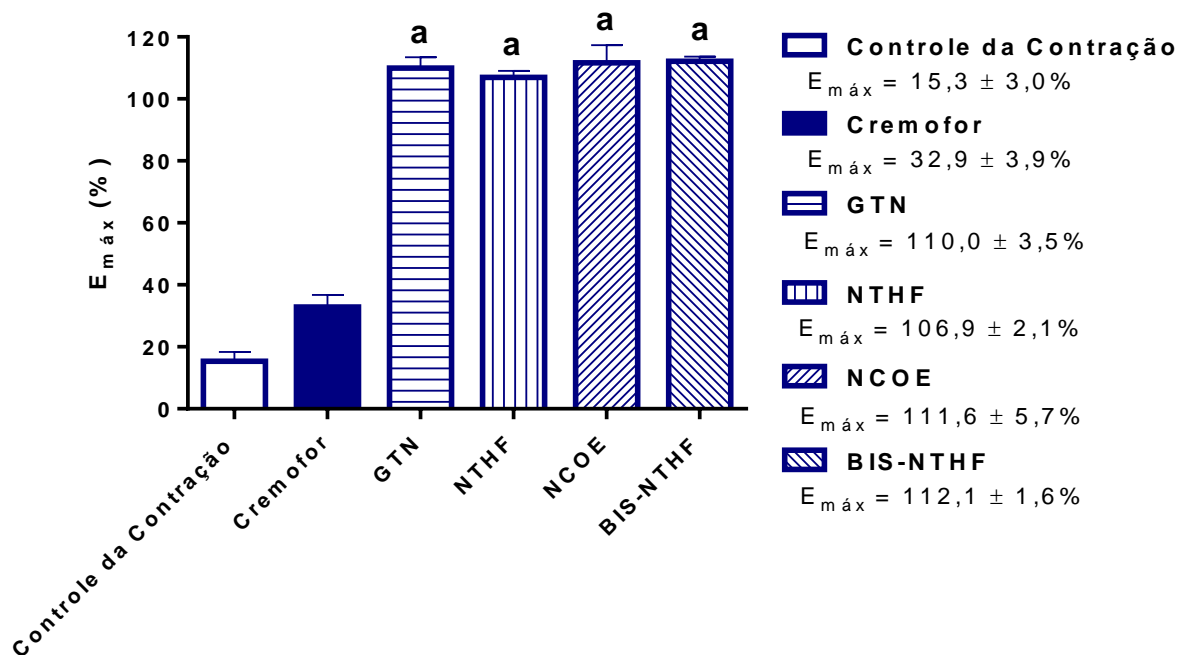


Gráfico comparando os valores de $E_{m\acute{a}x}$ do vasorrelaxamento induzido por GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF, em anéis de HUA pré-contraídos com 5-HT, no controle da contração e após adição de cremofor. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. ^a $p < 0,05$ vs cremofor

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

GTN ($pD_2 = 5,33 \pm 0,07$ M) e NTHF ($pD_2 = 4,49 \pm 0,07$ M) foram, respectivamente, os nitratos mais e menos potentes em relaxar os anéis de HUA (Gráfico 20).

Gráfico 20 – Comparação da Potência da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por 5-HT em HUA

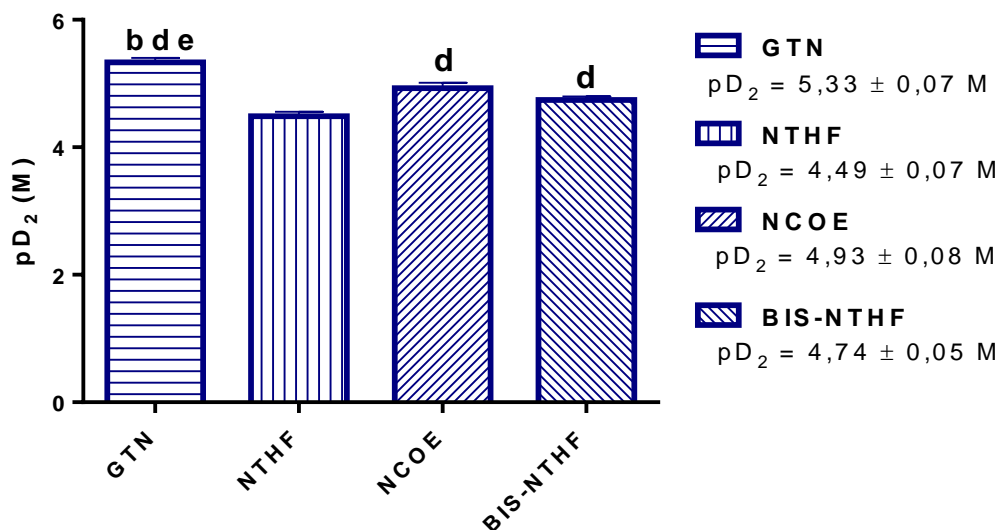


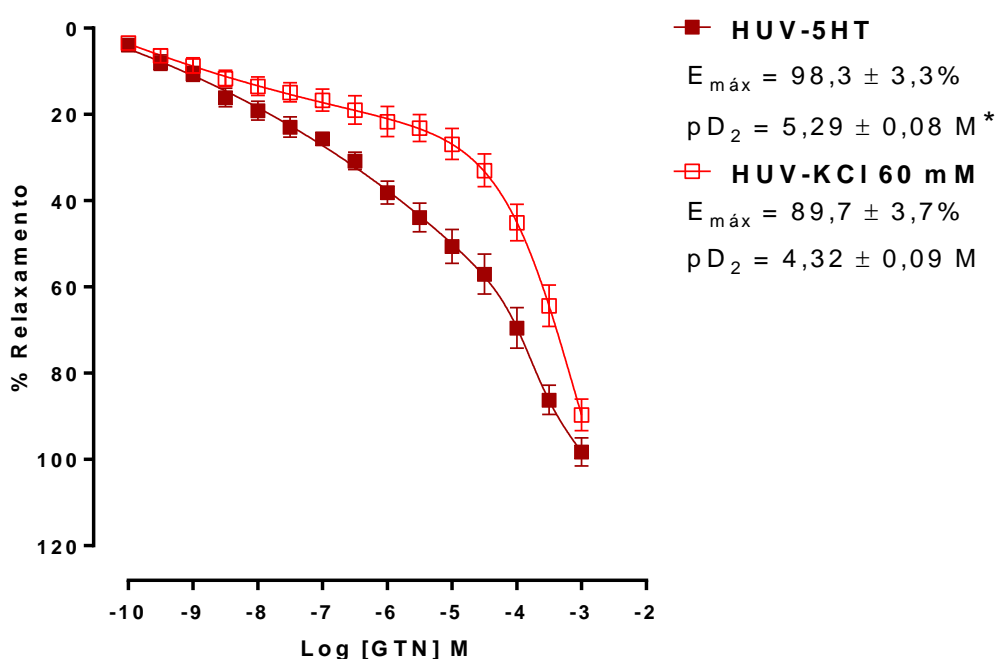
Gráfico comparando os valores de pD_2 do vasorrelaxamento induzido por GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF, em anéis de HUA pré-contraídos com 5-HT. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. ^b $p < 0,05$ vs BIS-NTHF; ^d $p < 0,05$ vs NTHF; ^e $p < 0,05$ vs NCOE

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

4.3 EFEITO DOS NITRATOS ORGÂNICOS SOBRE ANÉIS DE HUCV PRÉ -CONTRAÍDOS COM KCl 60 mM

Em anéis de HUV, pré-contráídos com KCl 60 mM, GTN induziu vasodilatação, de maneira dependente de concentração. A eficácia de GTN nestas condições experimentais não apresentou diferença significativa ($E_{máx} = 89,7 \pm 3,7\%$, $p > 0,05$), em relação aos anéis pré-contráídos com 5-HT ($E_{máx} = 98,3 \pm 3,3\%$). Entretanto, esse nitrato foi menos potente em relaxar anéis pré-contráídos com KCl ($pD_2 = 4,32 \pm 0,09$ M) do que com 5-HT ($pD_2 = 5,29 \pm 0,08$ M; $p < 0,05$) (Gráfico 21).

Gráfico 21 – Efeito de GTN em HUV Pré-contráídos com KCl 60 mM

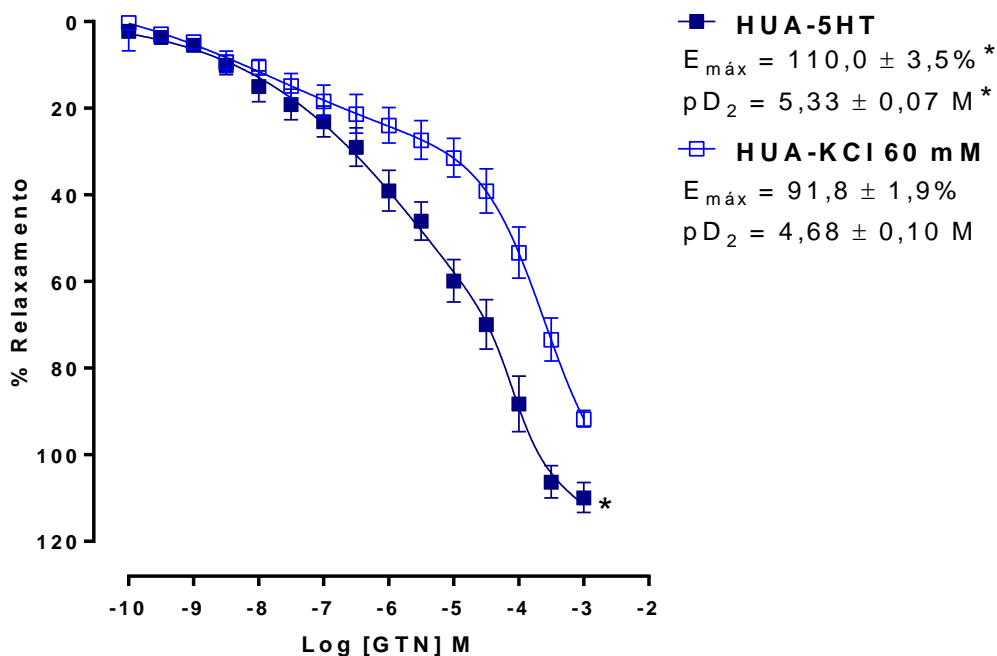


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por GTN (0,1 nM – 1 mM) sobre anéis de HUV, pré-contráídos com 5-HT (■; n = 6) ou KCl 60 mM (□; n = 6). Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$ vs KCl 60 mM.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Por outro lado, GTN foi tanto menos eficaz quanto potente em dilatar anéis de HUA pré-contraídos com KCl 60 mM ($E_{máx} = 91,8 \pm 1,9\%$ e $pD_2 = 4,68 \pm 0,10$ M), quando comparado aos anéis cuja contração foi induzida por 5-HT ($E_{máx} = 110,0 \pm 3,5\%$ e $pD_2 = 5,33 \pm 0,07$ M; $p < 0,05$) (Gráfico 22).

Gráfico 22 – Efeito de GTN em HUA Pré-contraídos com KCl 60 mM

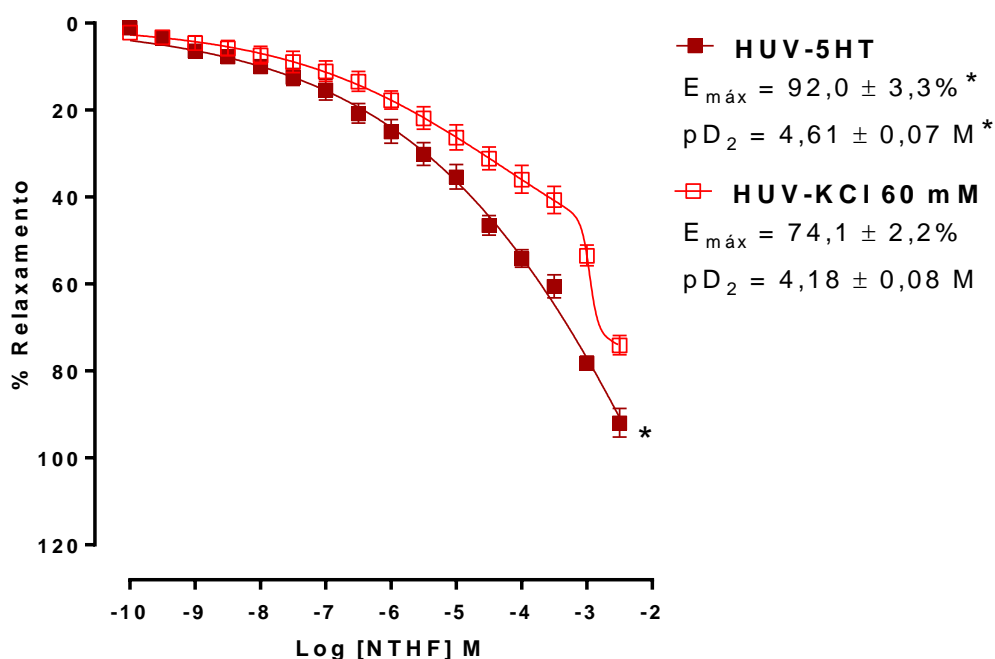


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por GTN (0,1 nM – 1 mM), sobre anéis de HUA, pré-contraídos com 5-HT (■; n = 6) ou KCl 60 mM (□; n = 6), Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$ vs KCl 60 mM.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

O vasorrelaxamento induzido por NTHF, em anéis de HUV pré-contraídos com KCl 60 mM, apresentou menor eficácia e potência ($E_{m\acute{a}x} = 74,1 \pm 2,2\%$ e $pD_2 = 4,18 \pm 0,08$ M, $p < 0,05$), em relação à reposta dos anéis pré-contraídos com 5-HT ($E_{m\acute{a}x} = 92,0 \pm 3,3\%$ e $pD_2 = 4,61 \pm 0,07$ M) (Gráfico 23).

Gráfico 23 – Efeito de NTHF em HUV Pré-contraídos com KCl 60 mM

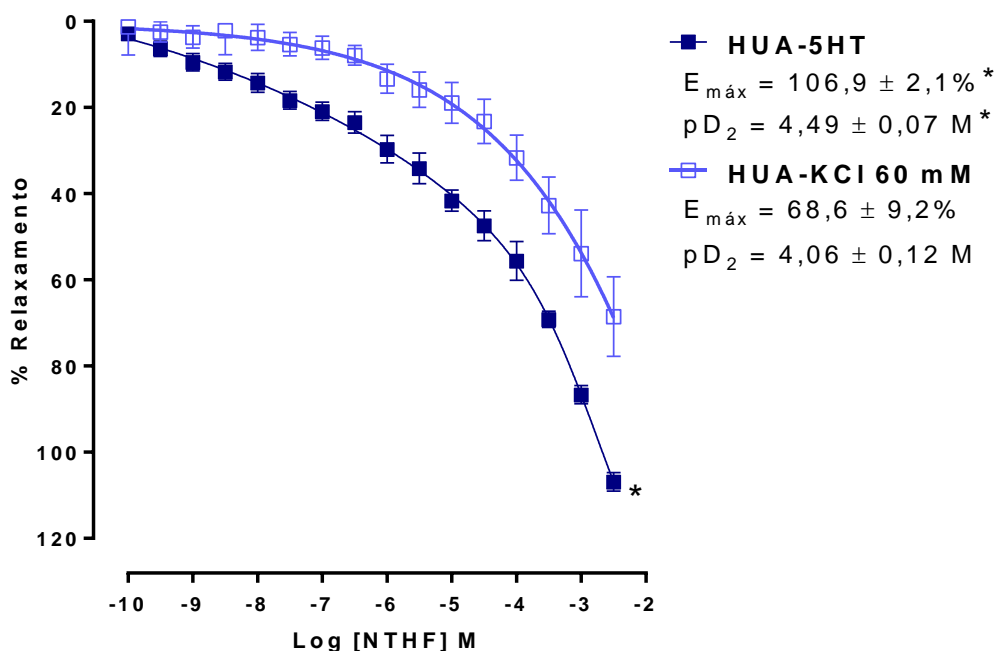


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NTHF (0,1 nM – 3 mM) sobre anéis de HUV, pré-contraídos com 5-HT (■; n = 6) ou KCl 60 mM (□; n = 6). Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m; * $p < 0,05$ vs KCl 60 mM.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Dessa mesma forma, em anéis de HUA pré-contraídos com KCl 60 mM, NTHF exibiu menor eficácia e potência ($E_{máx} = 68,6 \pm 9,2\%$ e $pD_2 = 4,06 \pm 0,12 M$, $p < 0,05$), em relação à reposta dos anéis pré-contraídos com 5-HT ($E_{máx} = 106,9 \pm 2,1\%$ e $pD_2 = 4,49 \pm 0,07 M$) (Gráfico 24).

Gráfico 24 – Efeito de NTHF em HUA Pré-contraídos com KCl 60 mM

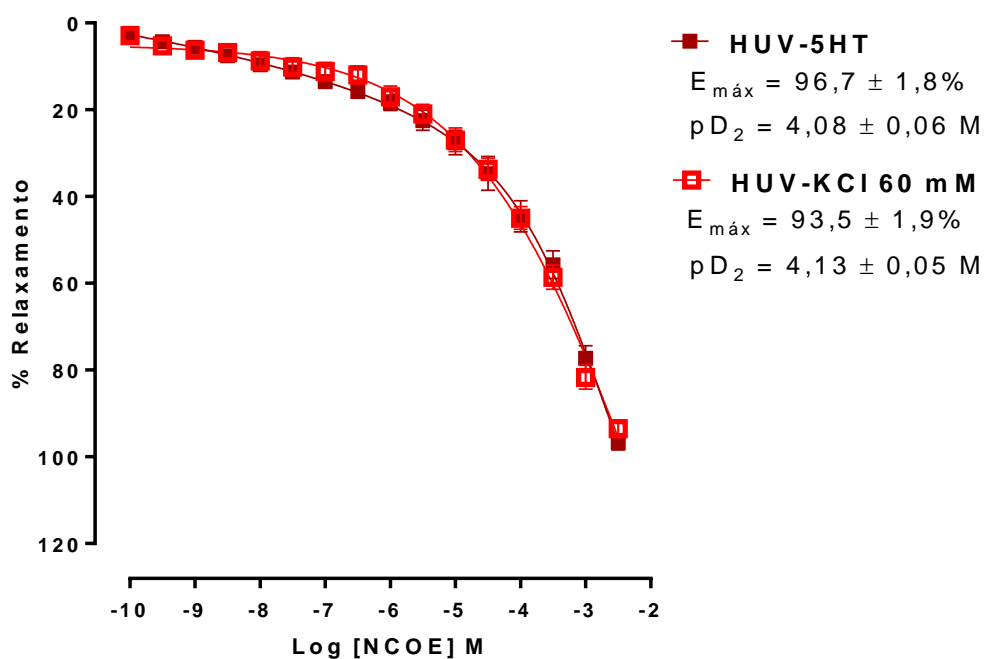


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NTHF (0,1 nM – 3 mM) sobre anéis de HUA, pré-contraídos com 5-HT (■; n = 6) ou KCl 60 mM (□; n = 6), Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m; *p < 0,05 vs KCl 60 mM.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A pré-contracção induzida por KCl 60 mM, em HUV, não alterou o perfil de vasodilatação do NCOE ($E_{m\acute{a}x} = 93,5 \pm 1,9\%$ e $pD_2 = 4,13 \pm 0,05$ M, $p > 0,05$), em relação à pré-contracção com 5-HT ($E_{m\acute{a}x} = 96,7 \pm 1,8\%$ e $pD_2 = 4,08 \pm 0,06$ M) (Gráfico 25).

Gráfico 25 – Efeito de NCOE em HUV Pré-contráídos com KCl 60 mM

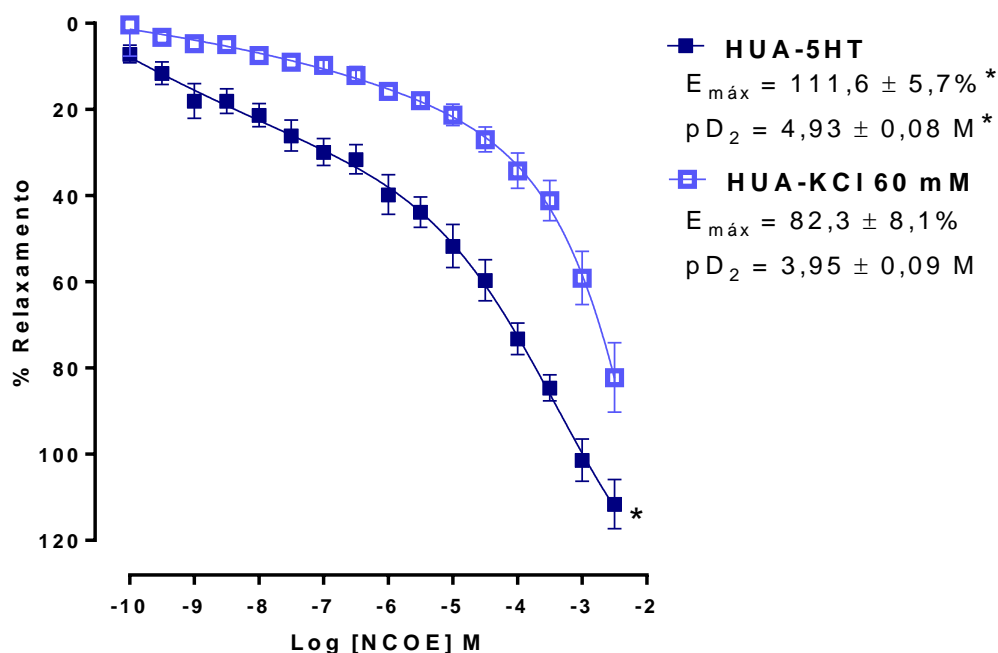


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NCOE (0,1 nM – 3 mM) sobre anéis de HUV, pré-contráídos com 5-HT (■; n = 6) ou KCl 60 mM (□; n = 6). Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Em contrapartida, NCOE exibiu menor eficácia e potência em dilatar anéis de HUA pré-contraídos com KCl 60 mM ($E_{máx} = 82,3 \pm 8,1\%$ e $pD_2 = 3,95 \pm 0,09$ M; $p < 0,05$), quando comparado aos anéis cuja contração foi induzida por 5-HT ($E_{máx} = 111,6 \pm 5,7\%$ e $pD_2 = 4,93 \pm 0,09$ M) do que (Gráfico 26).

Gráfico 26 – Efeito de NCOE em HUA Pré-contraídos com KCl 60 mM

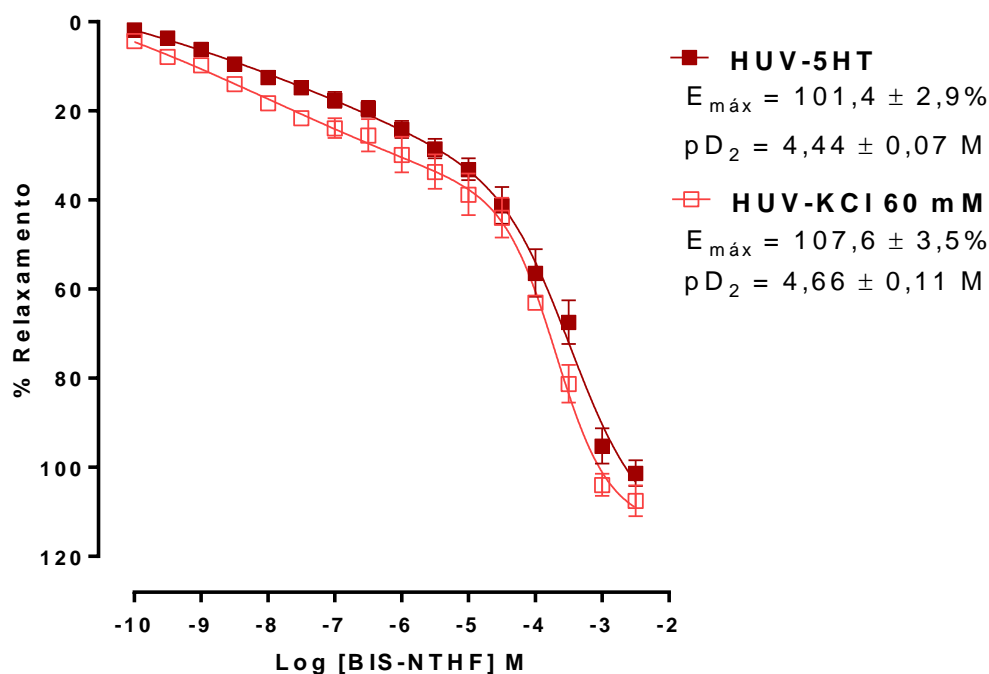


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NCOE (0,1 nM – 3 mM) sobre anéis de HUA, pré-contraídos com 5-HT (■; n = 6) ou KCl 60 mM (□; n = 6). Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$ vs KCl 60 mM.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

BIS-NTHF não apresentou diferença significativa de eficácia e potência em anéis de HUV pré-contraídos com KCl 60 mM ($E_{máx} = 107,6 \pm 3,5\%$ e $pD_2 = 4,66 \pm 0,11$ M, $p > 0,05$), em relação aos pré-contraídos com 5-HT ($E_{máx} = 101,4 \pm 2,9\%$ e $pD_2 = 4,44 \pm 0,07$ M) (Gráfico 27).

Gráfico 27 – Efeito de BIS-NTHF em HUV Pré-contraídos com KCl 60 mM

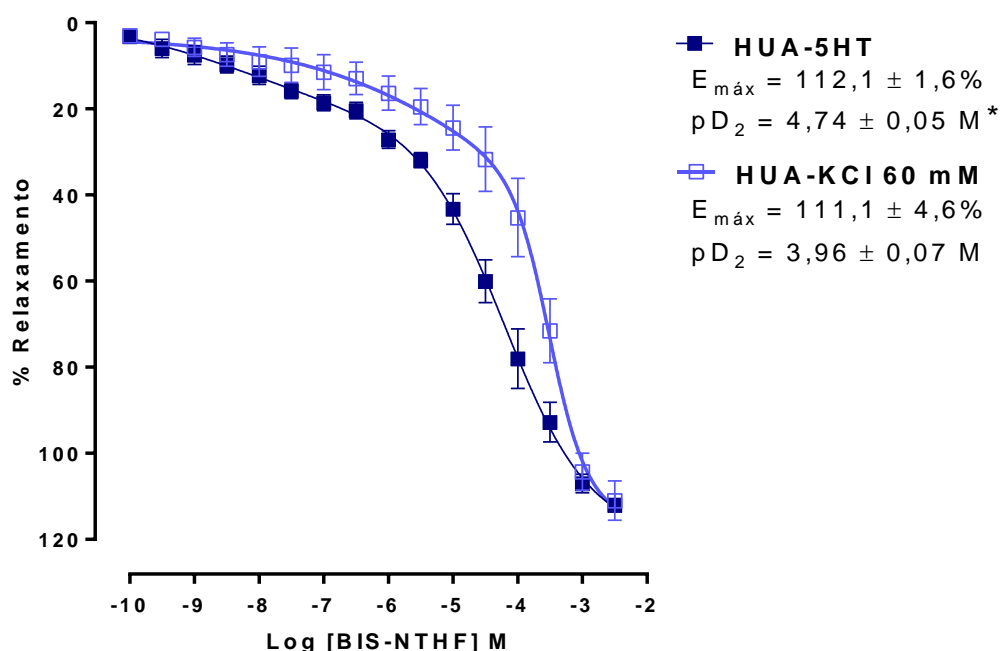


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por BIS-NTHF (0,1 nM – 3 mM) sobre anéis de HUV, pré-contraídos com 5-HT (■; n = 6) ou KCl 60 mM (□; n = 6). Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Em anéis de HUA, por outro lado, BIS-NTHF apresentou eficácia semelhante ($E_{m\acute{a}x} = 111,1 \pm 4,6\%$, $p > 0,05$), mas uma menor potência ($pD_2 = 3,96 \pm 0,07$ M, $p < 0,05$), em dilatar estes vasos pré-contraídos com KCl 60 mM, quando comparado aos anéis cuja contração foi induzida por 5-HT ($E_{m\acute{a}x} = 112,1 \pm 1,6\%$ e $pD_2 = 4,74 \pm 0,05$ M) do que (Gráfico 28).

Gráfico 28 – Efeito de BIS-NTHF em HUA Pré-contraídos com KCl 60 mM



Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por BIS-NTHF (0,1 nM – 3 mM) sobre anéis de HUA, pré-contraídos com 5-HT (■; n = 6) ou KCl 60 mM (□; n = 6). Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$ vs KCl 60 mM.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

BIS-NTHF ($E_{m\acute{a}x} = 107,6 \pm 3,5\%$; $p < 0,05$) e NTHF ($E_{m\acute{a}x} = 74,1 \pm 2,2\%$) foram os nitratos mais e menos eficaz, respectivamente, em relaxar anéis de HUV, pré-contraídos com KCl 60 mM (Gráfico 29).

Gráfico 29 – Comparação da Eficácia da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por KCl 60 mM em HUV

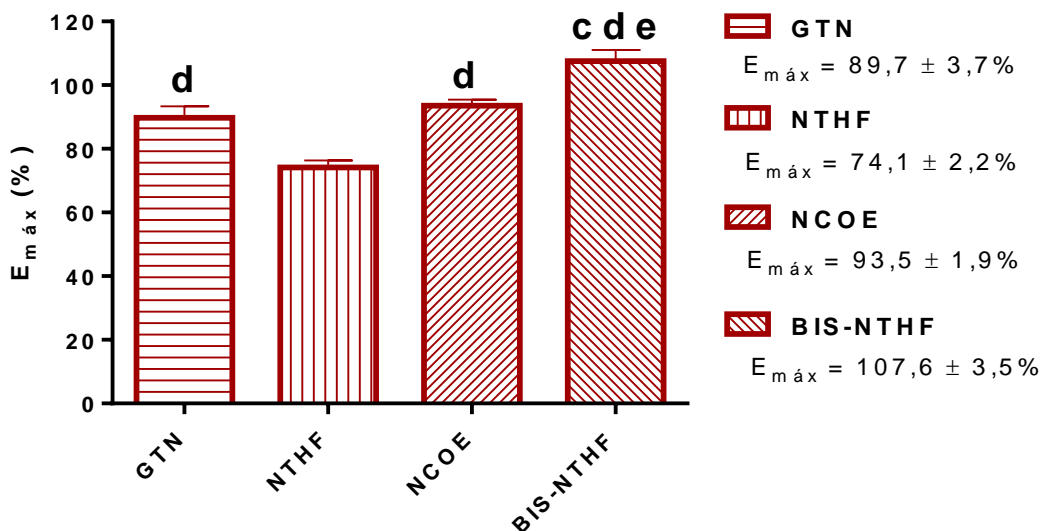


Gráfico comparando os valores de $E_{m\acute{a}x}$ do vasorrelaxamento induzidos por GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF, em anéis de HUV pré-contraídos com KCl 60 mM. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.; ^c $p < 0,05$ vs GTN; ^d $p < 0,05$ vs NTHF; ^e $p < 0,05$ vs NCOE

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Em relação à potência, BIS-NTHF ($pD_2 = 4,66 \pm 0,11$ M) foi o nitrato com maior valor de pD_2 ($p < 0,05$), quando as contrações induzidas por KCl 60 mM em HUV (Gráfico 30).

Gráfico 30 – Comparação da Potência da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por KCl 60 mM em HUV

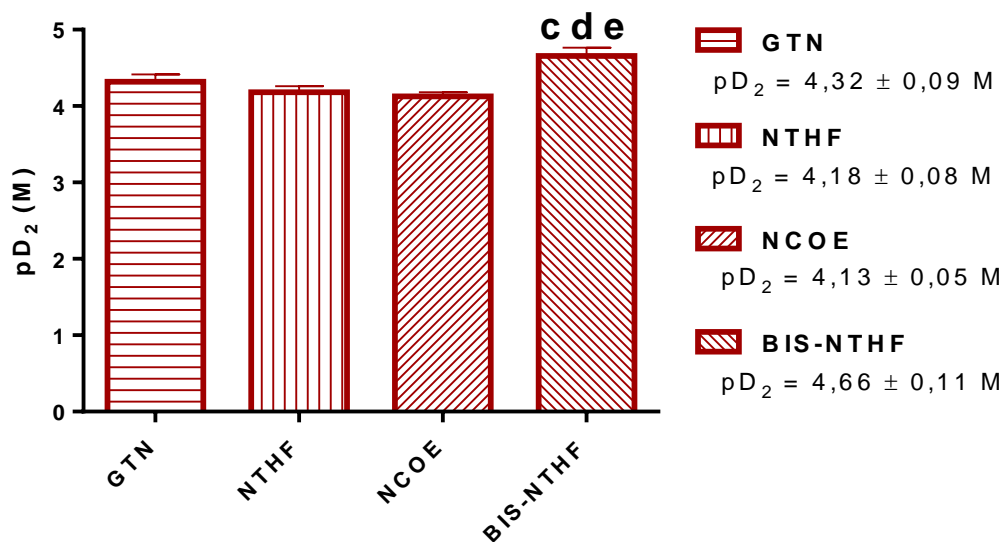


Gráfico comparando os valores de pD_2 do vasorrelaxamento induzido por GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF, em anéis de HUV pré-contraídos com KCl 60 mM,. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.; ^c $p < 0,05$ vs GTN; ^d $p < 0,05$ vs NTHF; ^e $p < 0,05$ vs NCOE

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Nos experimentos em anéis de HUA, pré-contraídos com KCl 60 mM, o nitrato mais eficaz foi BIS-NTHF ($E_{m\acute{a}x} = 111,1 \pm 4,6\%$; $p < 0,05$), enquanto que o NTHF foi o que apresentou uma menor eficácia ($E_{m\acute{a}x} = 68,6 \pm 9,2\%$; $p > 0,05$) (Gráfico 31).

Gráfico 31 – Comparação da Eficácia da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por KCl 60 mM em HUA

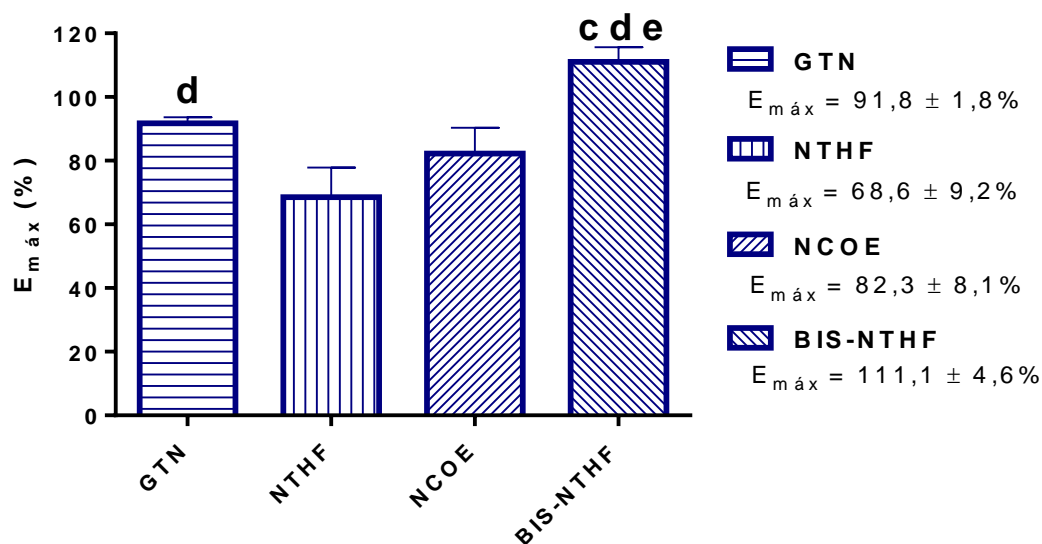


Gráfico comparando os valores de $E_{m\acute{a}x}$ do vasorrelaxamento induzido por GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF, em anéis de HUA pré-contraídos com KCl 60 mM,. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. ^c $p < 0,05$ vs GTN; ^d $p < 0,05$ vs NTHF; ^e $p < 0,05$ vs NCOE

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Por outro lado, o nitrato mais potente, em causar vasodilatação das contrações induzidas por KCl 60 mM, em HUA, foi GTN ($pD_2 = 4,68 \pm 0,10$ M; $p < 0,05$) e o com menor potência foi NCOE ($pD_2 = 3,95 \pm 0,09$ M) (Gráfico 32).

Gráfico 32 – Comparação da Potência da Resposta dos Nitratos sobre Contrações Induzidas por KCl 60 mM em HUA

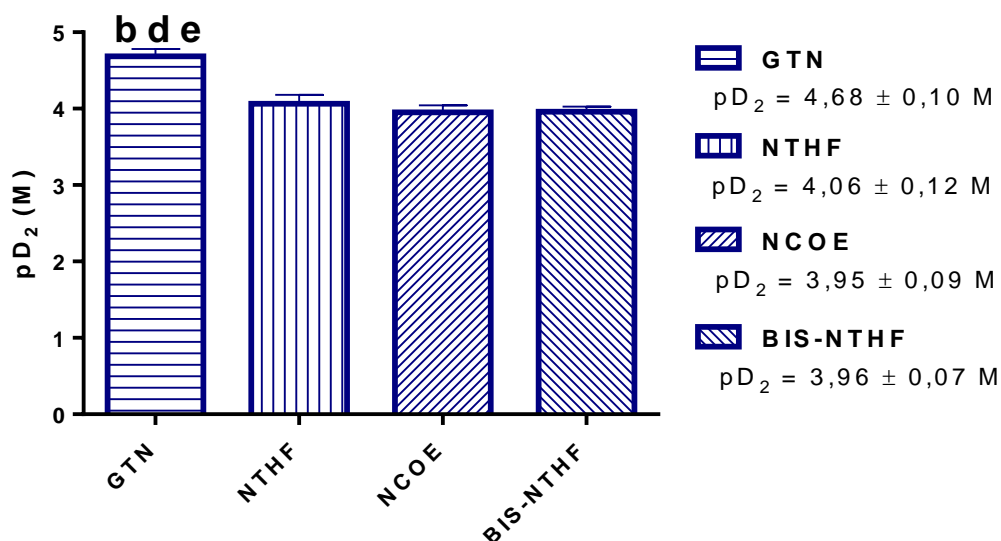


Gráfico comparando os valores de pD_2 do vasorrelaxamento induzido por GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF, em anéis de HUA pré-contraídos com KCl 60 mM. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. ^b $p < 0,05$ vs BIS-NTHF; ^d $p < 0,05$ vs NTHF; ^e $p < 0,05$ vs NCOE;

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

4.4 EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DE NITRATOS ORGÂNICOS SOBRE A CONTRAÇÃO INDUZIDA POR 5-HT NA PRESENÇA DE CÁLCIO EXTRACELULAR

A pré-incubação de 1 mM de GTN, a máxima utilizada no estudo, inibiu a contração induzida por 5-HT, tanto em HUV como em HUA, com efeito inibitório de $88,4 \pm 4,2\%$ e $95,8 \pm 2,0\%$ (Gráfico 33).

Gráfico 33 – Efeito da Pré-incubação de GTN sobre a Contração Induzida por 5-HT

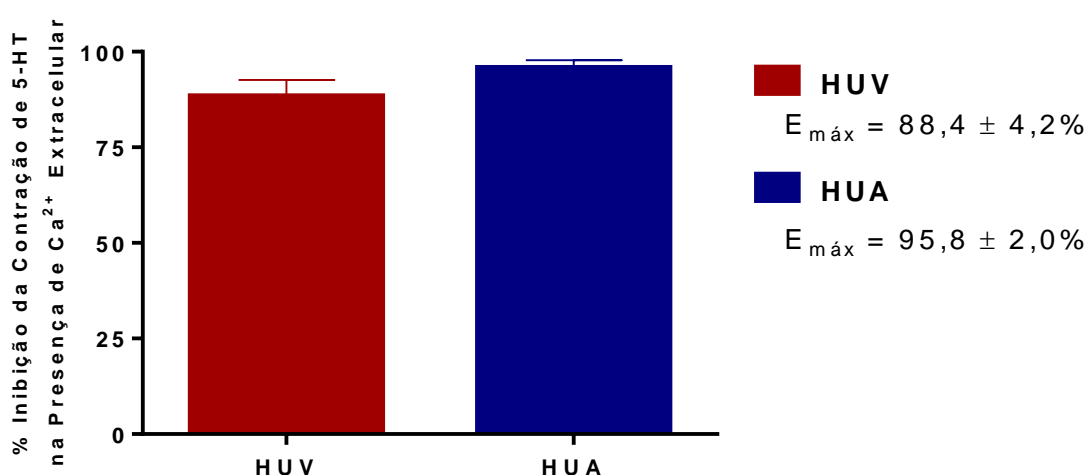


Gráfico do efeito inibitório da pré-incubação de 1 mM de GTN sobre a contração induzida por 5-HT em anéis de HUV (barra vermelha; n = 6) e HUA (barra azul; n = 6). As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A inibição da contração de 5-HT, provocada pela pré-incubação de 3 mM de NTHF, foi maior em HUA ($E_{máx} = 80,8 \pm 9,4\%$; $p < 0,05$) do que em HUV ($E_{máx} = 31,4 \pm 5,1\%$) (Gráfico 34).

Gráfico 34 – Efeito da Pré-incubação de NTHF sobre a Contração Induzida por 5-HT

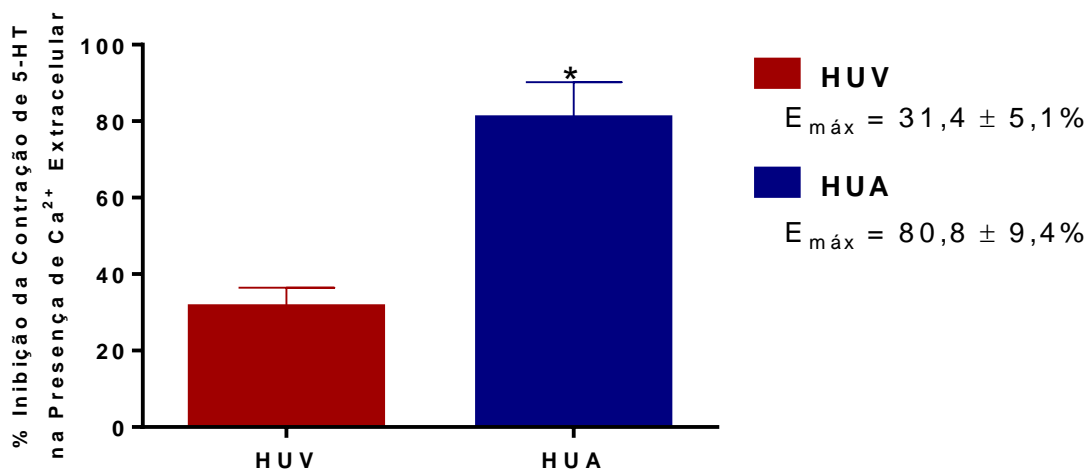


Gráfico do efeito inibitório da pré-incubação de 3 mM de NTHF sobre a contração induzida por 5-HT em anéis de HUV (barra vermelha; $n = 6$) e HUA (barra azul; $n = 6$). As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Ao pré-incubar 3 mM de NCOE, houve uma pequena redução da contração induzida por 5-HT, tanto em HUV ($E_{máx} = 13,7 \pm 1,2\%$) como em HUA ($E_{máx} = 23,0 \pm 9,0\%$), mas sem diferença estatística entre elas ($p > 0,05$) (Gráfico 35).

Gráfico 35 – Efeito da Pré-incubação de NCOE sobre a Contração Induzida por 5-HT

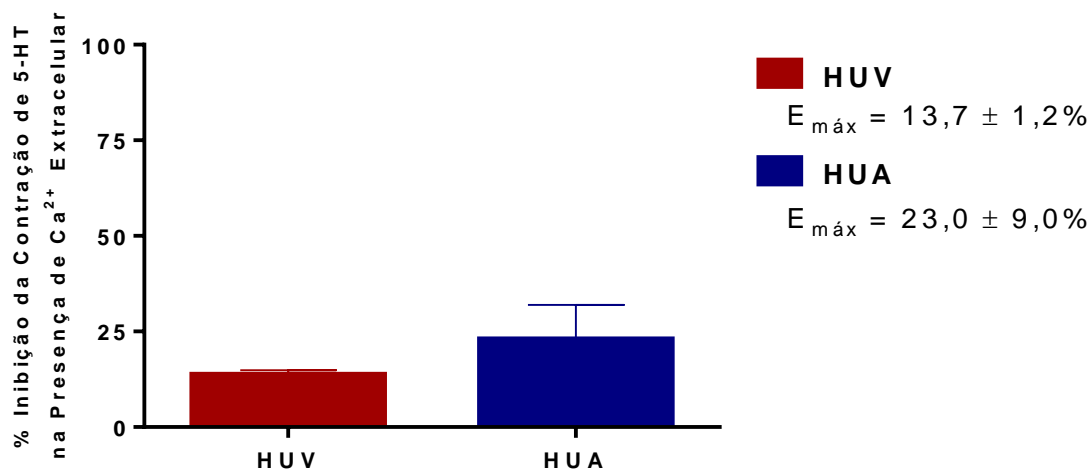


Gráfico do efeito inibitório da pré-incubação de 3 mM de NCOE sobre a contração induzida por 5-HT em anéis de HUV (barra vermelha; $n = 6$) e HUA (barra azul; $n = 6$). As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

BIS-NTHF, na concentração de 3 mM, inibiu em $92,7 \pm 3,5\%$ e $93,3 \pm 2,5\%$, em anéis de HUV e HUA, respectivamente, a contração induzida por 5-HT (Gráfico 36).

Gráfico 36 – Efeito da Pré-incubação de BIS-NTHF sobre a Contração Induzida por 5-HT

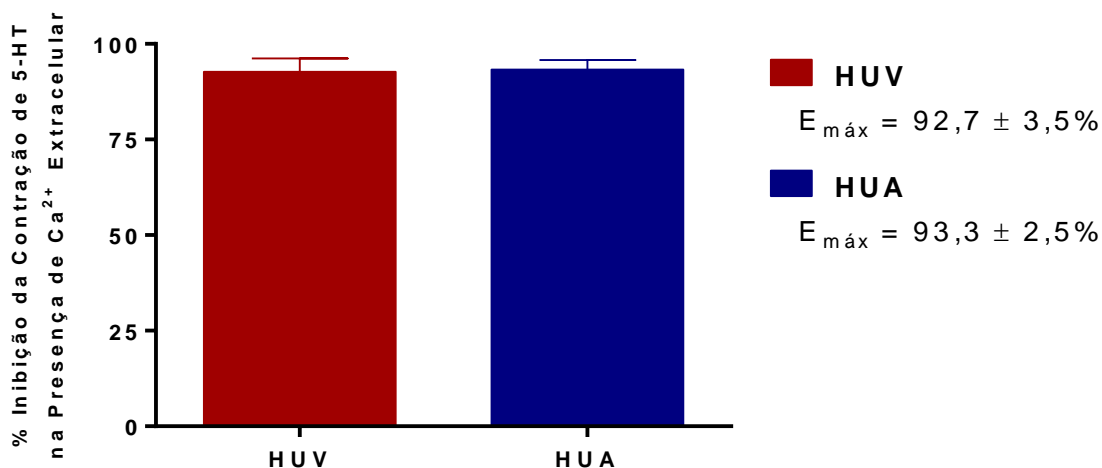


Gráfico do efeito inibitório da pré-incubação de 3 mM de BIS-NTHF sobre a contração induzida por 5-HT em anéis de HUV (barra vermelha; n = 6) e HUA (barra azul; n = 6). As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Ao serem pré-incubados, na concentração máxima utilizada nos experimentos, BIS-NTHF e GTN ($E_{máx} = 92,7 \pm 3,5\%$ e $88,4 \pm 4,2\%$, respectivamente) foram os nitratos mais eficazes em inibir a contração induzida por 5-HT, em anéis de HUV, enquanto NTHF e NCOE apresentaram um menor perfil inibitório ($E_{máx} = 31,4 \pm 5,1\%$ e $13,7 \pm 1,2\%$, respectivamente) (Gráfico 37).

Gráfico 37 – Comparação dos Efeitos da Pré-incubação de Nitratos na Contração Induzida por 5-HT na Presença do Cálcio Extracelular em HUV

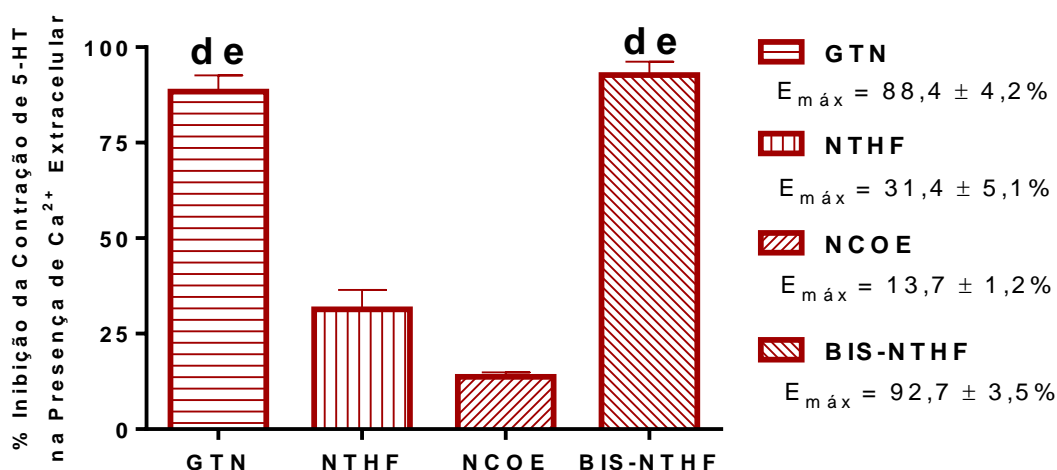


Gráfico comparando $E_{máx}$ da pré-incubação de GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF na contração induzida por 5-HT em anéis de HUV. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. ^dp < 0,05 vs NTHF; ^ep < 0,05 vs NCOE

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Em anéis de HUA, GTN, NTHF e BIS-NTHF ($E_{m\acute{a}x} = 95,8 \pm 2,0\%$; $80,8 \pm 9,4\%$ e $93,3 \pm 2,5\%$, respectivamente) apresentaram eficácia semelhante ao inibir o efeito contrátil da 5-HT. NCOE exibiu um menor perfil inibitório ($E_{m\acute{a}x} = 23,0 \pm 9,0\%$), quando comparado aos outros nitratos (Gráfico 38).

Gráfico 38 – Comparação dos Efeitos da Pré-incubação de Nitratos na Contração Induzida por 5-HT na Presença do Cálcio Extracelular em HUA

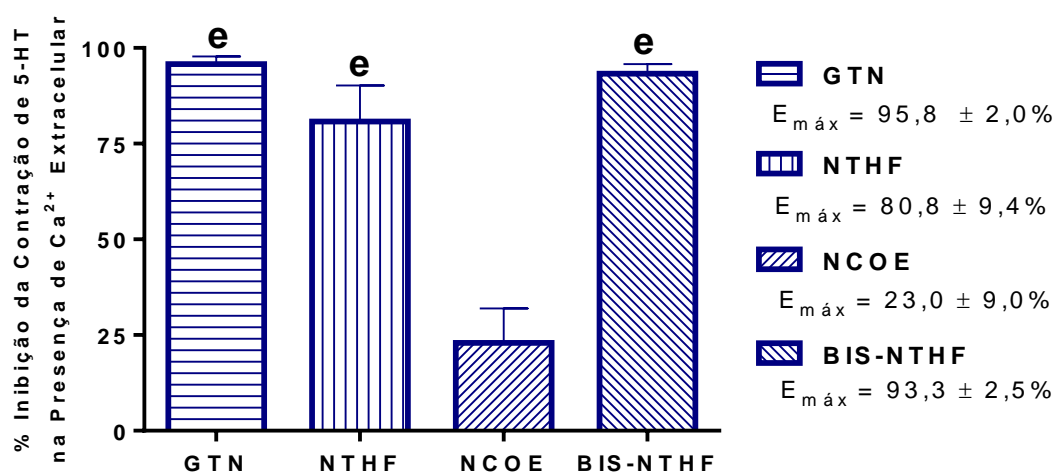


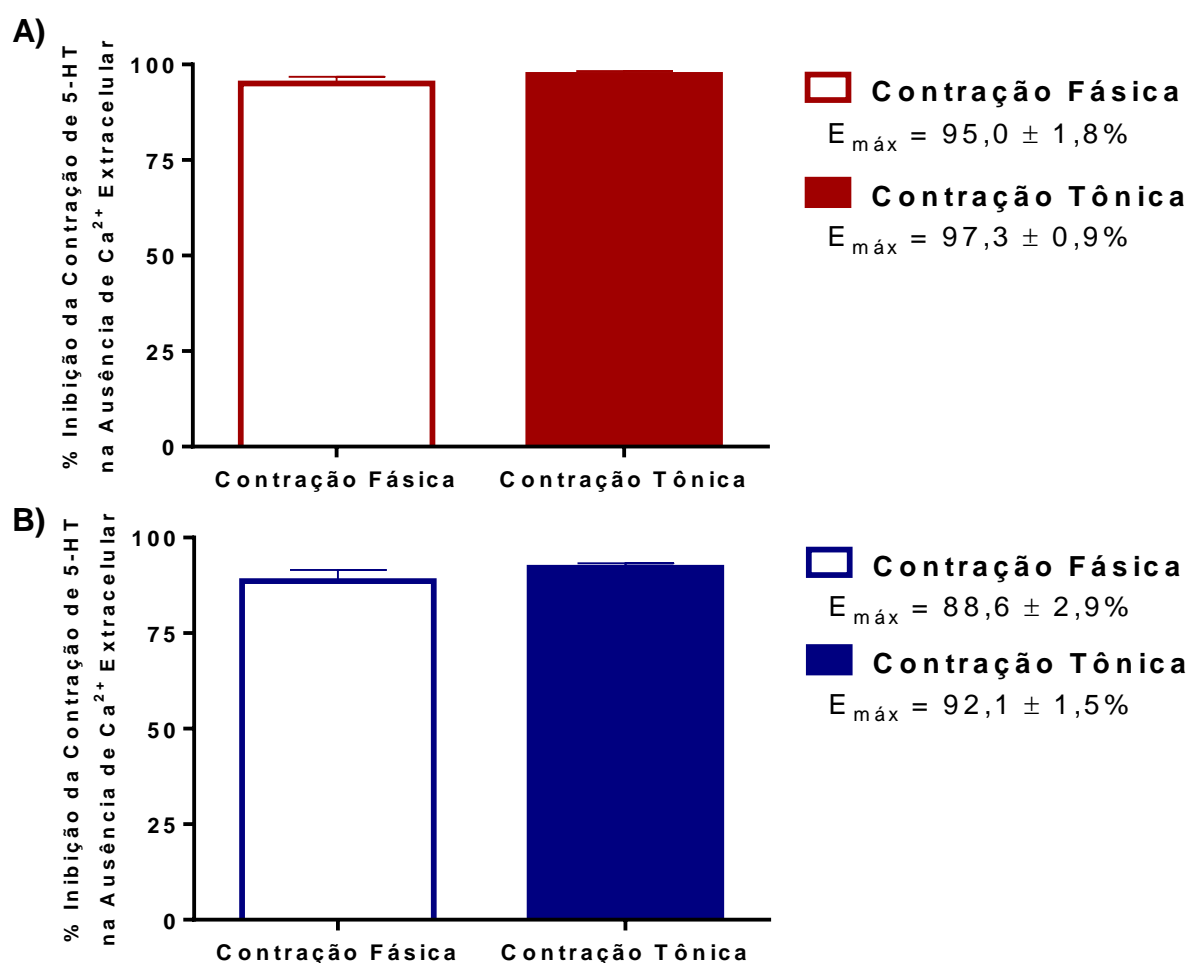
Gráfico comparando $E_{m\acute{a}x}$ da pré-incubação de GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF na contração induzida por 5-HT, em anéis de HUV. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. $^{\circ}p < 0,05$ vs NCOE

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

4.5 EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DE NITRATOS ORGÂNICOS SOBRE A CONTRAÇÃO INDUZIDA POR 5-HT NA AUSÊNCIA DE CÁLCIO EXTRACELULAR

Na ausência do cálcio extracelular, a contração induzida por 5-HT foi inibida ao pré-incubar 1 mM de GTN. Foram inibidas tanto a contração fásica quanto a tônica de HUV ($E_{máx} = 95,0 \pm 1,8\%$ e $97,3 \pm 0,9\%$, fásica e tônica, respectivamente) (Gráfico 39A) e HUA ($E_{máx} = 88,6 \pm 2,9\%$ e $92,1 \pm 1,5\%$, fásica e tônica, respectivamente) (Gráfico 39B).

Gráfico 39 – Efeitos da Pré-incubação de GTN na Contração Induzida por 5-HT na Ausência de Cálcio Extracelular

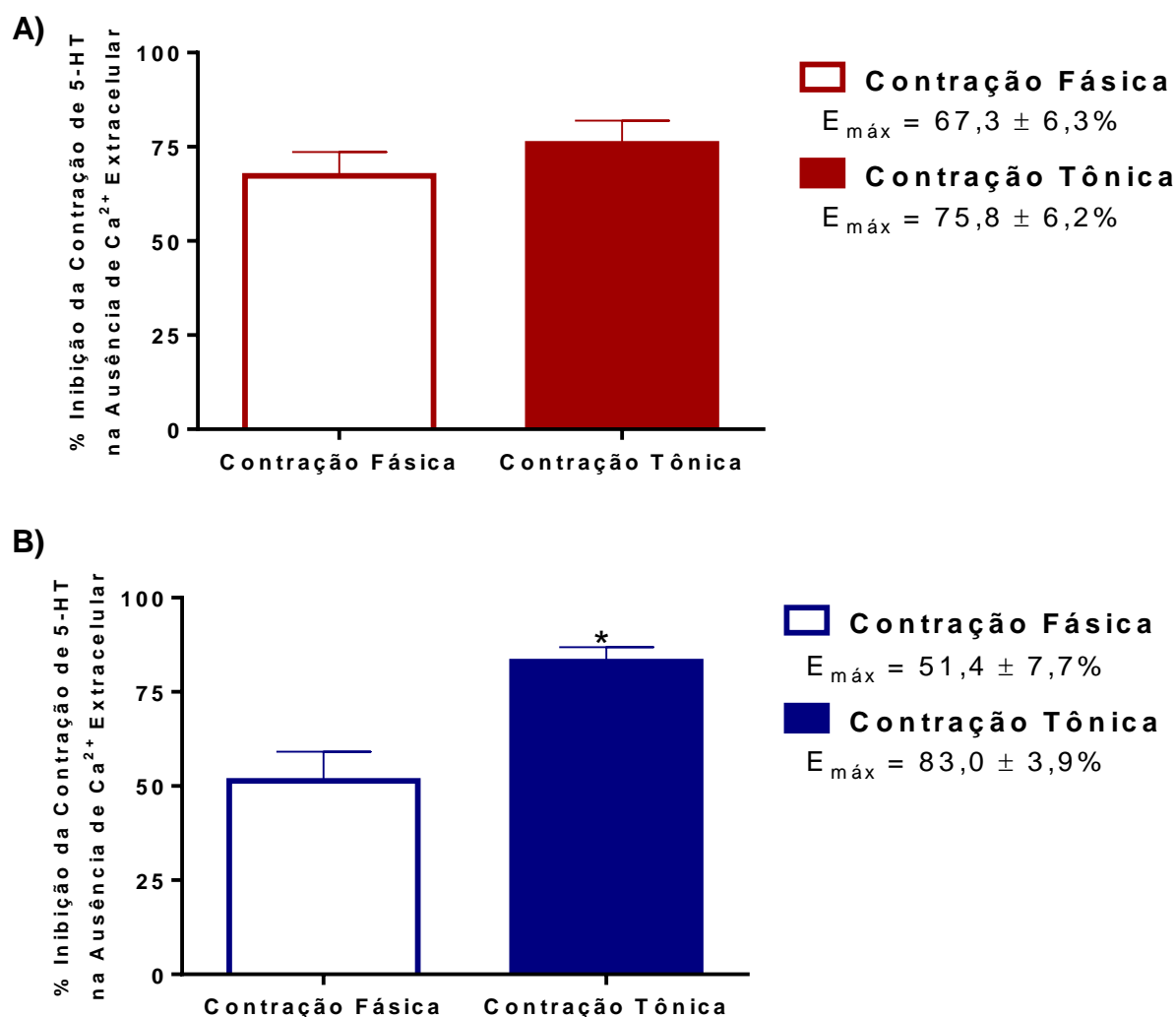


Gráficos em barra que expressa o efeito inibitório de 1 mM de GTN sobre contrações induzidas por 5-HT, na ausência de cálcio extracelular, em anéis de A) HUV e B) HUA. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A pré-incubação de 3 mM de NTHF inibiu, de maneira semelhante, a contração fásica e a tônica, induzida por 5-HT em HUV ($E_{máx} = 67,3 \pm 6,3\%$ e $75,8 \pm 6,2\%$, respectivamente) (Gráfico 40A). Em contrapartida, em HUA, esse nitrato foi menos eficaz em reduzir a contração fásica do que a tônica ($E_{máx} = 51,4 \pm 7,7\%$ e $83,0 \pm 3,9\%$, respectivamente) (Gráfico 40B).

Gráfico 40 – Efeitos da Pré-incubação de NTHF na Contração Induzida por 5-HT na Ausência de Cálcio Extracelular

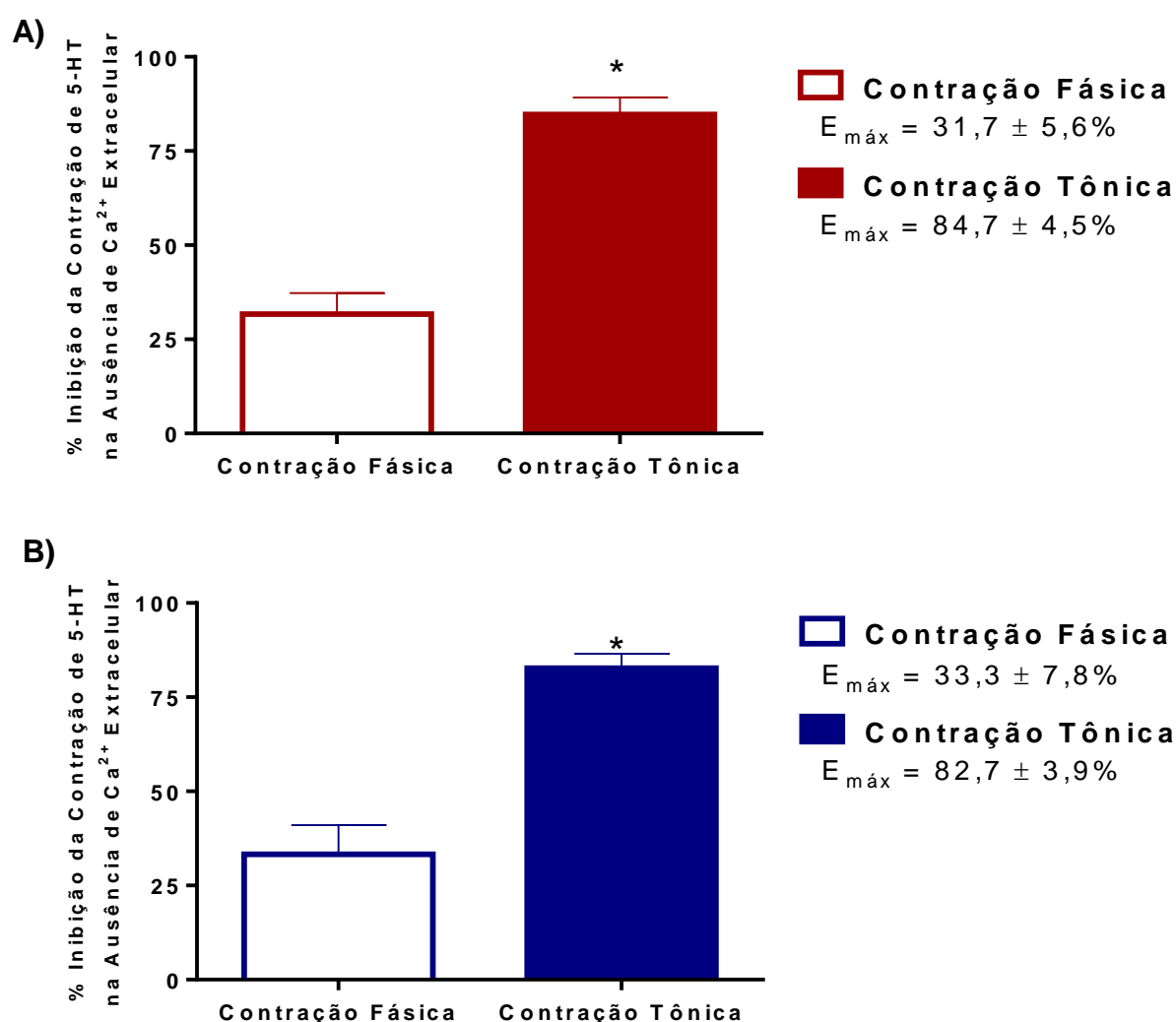


Gráficos em barra que expressa o efeito inibitório de 3 mM de NTHF sobre contrações induzidas por 5-HT, na ausência de cálcio extracelular, em anéis de A) HUV e B) HUA. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.; *p < 0,05

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A contração fásica, induzida por 5-HT na ausência do cálcio extracelular, foi atenuada ao pré-incubar 3 mM de NCOE, tanto de HUV ($E_{máx} = 31,7 \pm 5,6\%$) quanto de HUA ($E_{máx} = 33,3 \pm 7,8\%$). Em contrapartida, esse nitrato foi bem mais eficaz em reduzir a contração tônica de HUV ($E_{máx} = 84,7 \pm 4,5\%$) e HUA ($E_{máx} = 82,7 \pm 3,9\%$) (Gráfico 41).

Gráfico 41 – Efeitos da Pré-incubação de NCOE na Contração Induzida por 5-HT na Ausência de Cálcio Extracelular

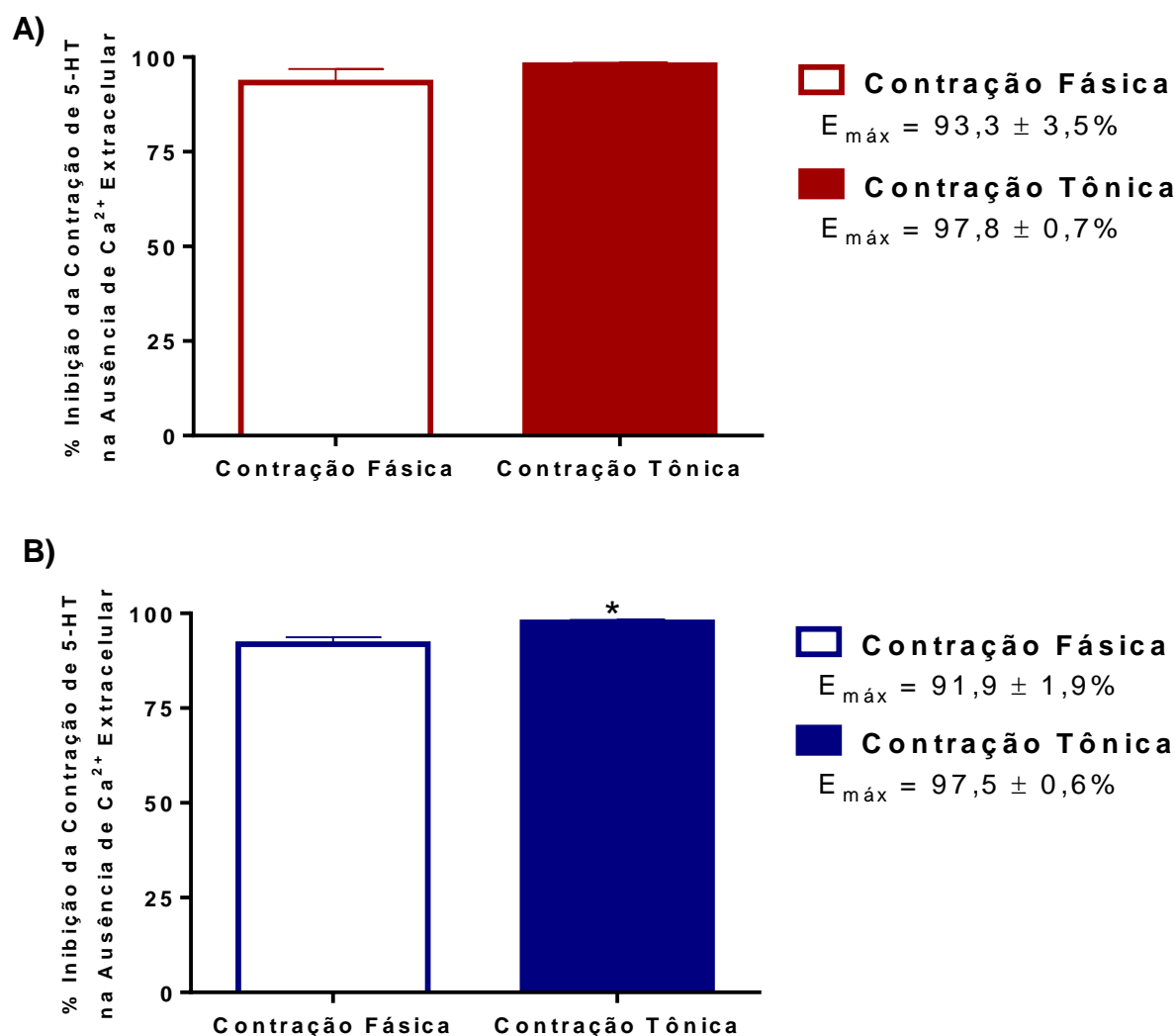


Gráficos em barra que expressa o efeito inibitório de 3 mM de NCOE sobre contrações induzidas por 5-HT, na ausência de cálcio extracelular, em anéis de A) HUV e B) HUA. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.; *p < 0,05

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A contração fásica e tônica, induzida por 5-HT, foi inibida ao pré-incubar 3 mM de BIS-NTHF em HUV ($E_{máx} = 93,3 \pm 3,5\%$ e $97,8 \pm 0,7\%$, respectivamente) (Gráfico 42A). Em contrapartida, esse nitrato foi mais eficaz em reduzir a contração tônica do que a fásica em HUA ($E_{máx} = 97,5 \pm 0,6\%$ e $91,9 \pm 1,9\%$, respectivamente) (Gráfico 42B).

Gráfico 42 – Efeitos da Pré-incubação de BIS-NTHF na Contração Induzida por 5-HT na Ausência de Cálcio Extracelular

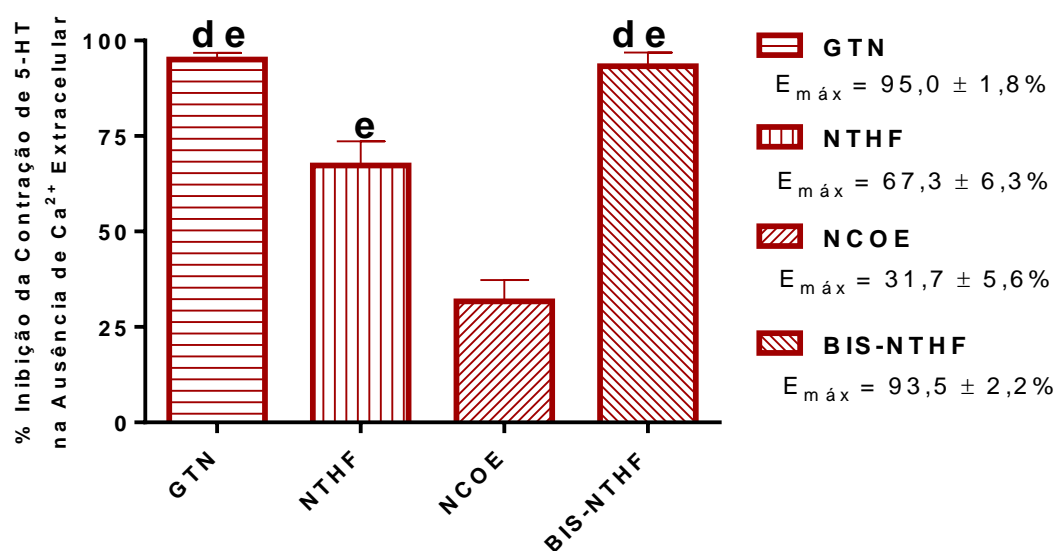


Gráficos em barra que expressa o efeito inibitório de 3 mM de BIS-NTHF sobre contrações induzidas por 5-HT, na ausência de cálcio extracelular, em anéis de A) HUV e B) HUA. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Em anéis de HUV, GTN e BIS-NTHF foram os nitratos mais eficazes em inibir tanto a contração fásica ($E_{m\acute{a}x} = 95,0 \pm 1,8\%$ e $93,5 \pm 2,2\%$, respectivamente). Por outro lado, NCOE foi o nitrato que apresentou menor eficácia em inibir o componente fásico da contração induzida por 5-HT, no meio sem cálcio extracelular (Gráfico 43).

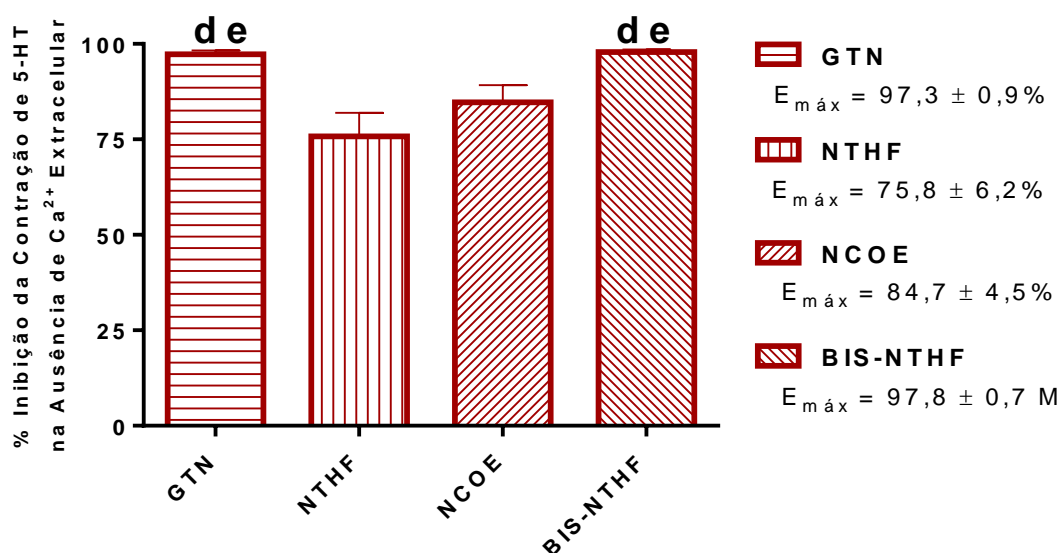
Gráfico 43 – Comparação dos Efeitos da Pré-incubação de Nitratos na Contração Fásica Induzida por 5-HT, na Ausência de Cálcio Extracelular, em HUV



Gráficos em barra que expressa o efeito inibitório de GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF sobre contrações fásicas induzidas por 5-HT, na ausência de cálcio extracelular, em anéis de HUV. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. ^b $p < 0,05$ vs BIS-NTHF; ^d $p < 0,05$ vs NTHF; ^e $p < 0,05$ vs NCOE
Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Todos os nitratos apresentaram um efeito inibitório considerável sobre as contrações tônicas, induzidas por 5-HT, na ausência de cálcio extracelular. Entretanto, os nitratos mais eficazes foram GTN ($E_{m\acute{a}x} = 97,3 \pm 0,9\%$) e BIS-NTHF ($E_{m\acute{a}x} = 97,8 \pm 0,7\%$), enquanto NTHF ($E_{m\acute{a}x} = 75,8 \pm 6,2\%$) foi o que apresentou menor resposta inibitória, quando comparado aos outros nitratos (Gráfico 44).

Gráfico 44 – Comparação dos Efeitos da Pré-incubação de Nitratos na Contração Tônica, Induzida por 5-HT, na Ausência de Cálcio Extracelular, em HUV

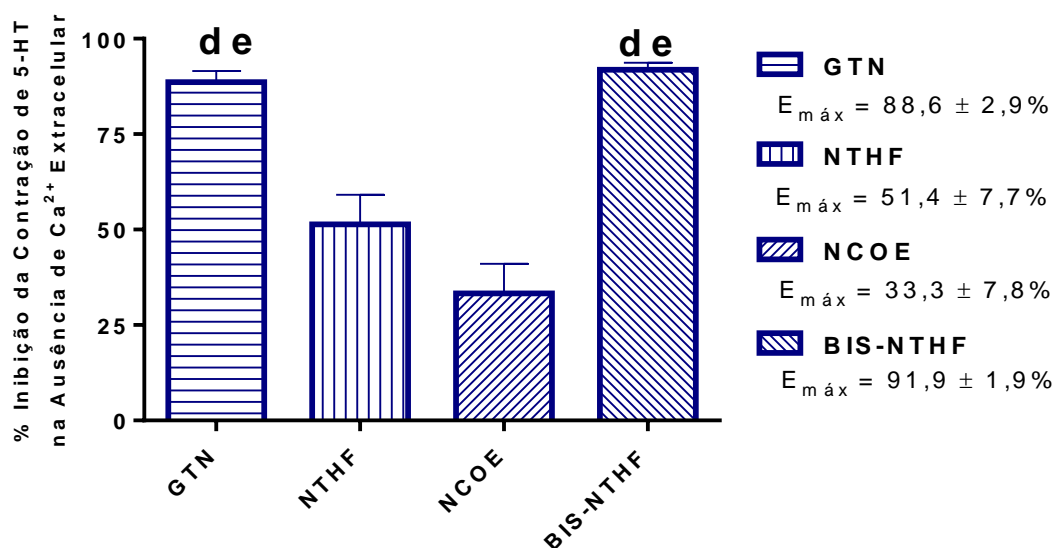


Gráficos em barra que expressa o efeito inibitório de GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF sobre contrações tônicas induzidas por 5-HT, na ausência de cálcio extracelular, em anéis de HUV. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. ^ap < 0,05 vs NTHF; ^bp < 0,05 vs NCOE

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A pré-incubação de GTN e BIS-NTHF foi mais eficaz em inibir contração fásica ($E_{m\acute{a}x} = 88,6 \pm 2,9\%$ e $91,9 \pm 1,9\%$, respectivamente), enquanto NCOE foi o nitrato que apresentou menor eficácia ($E_{m\acute{a}x} = 33,3 \pm 7,8\%$) (Gráfico 45).

Gráfico 45 – Comparação dos Efeitos da Pré-incubação de Nitratos na Contração Fásica, Induzida por 5-HT, na Ausência de Cálcio Extracelular em HUA

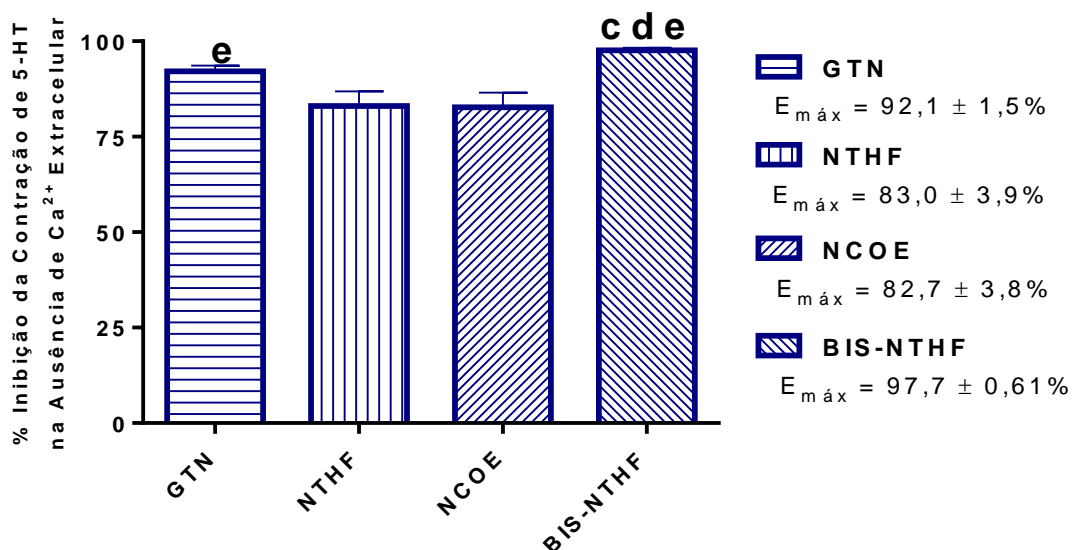


Gráficos em barra que expressa o efeito inibitório de GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF sobre contrações fásicas induzidas por 5-HT, na ausência de cálcio extracelular, em anéis de HUA. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. $^{\circ}p < 0,05$ vs NTHF; $^{\circ}p < 0,05$ vs NCOE

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

GTN e BIS-NTHF também foram mais eficazes em inibir contração tônica induzida por 5-HT, no meio extracelular sem cálcio ($E_{máx} = 92,1 \pm 1,5\%$ e $97,7 \pm 0,6\%$, respectivamente) (Gráfico 46).

Gráfico 46 – Comparação dos Efeitos da Pré-incubação de Nitratos na Contração Tônica, Induzida por 5-HT, na Ausência de Cálcio Extracelular em HUA

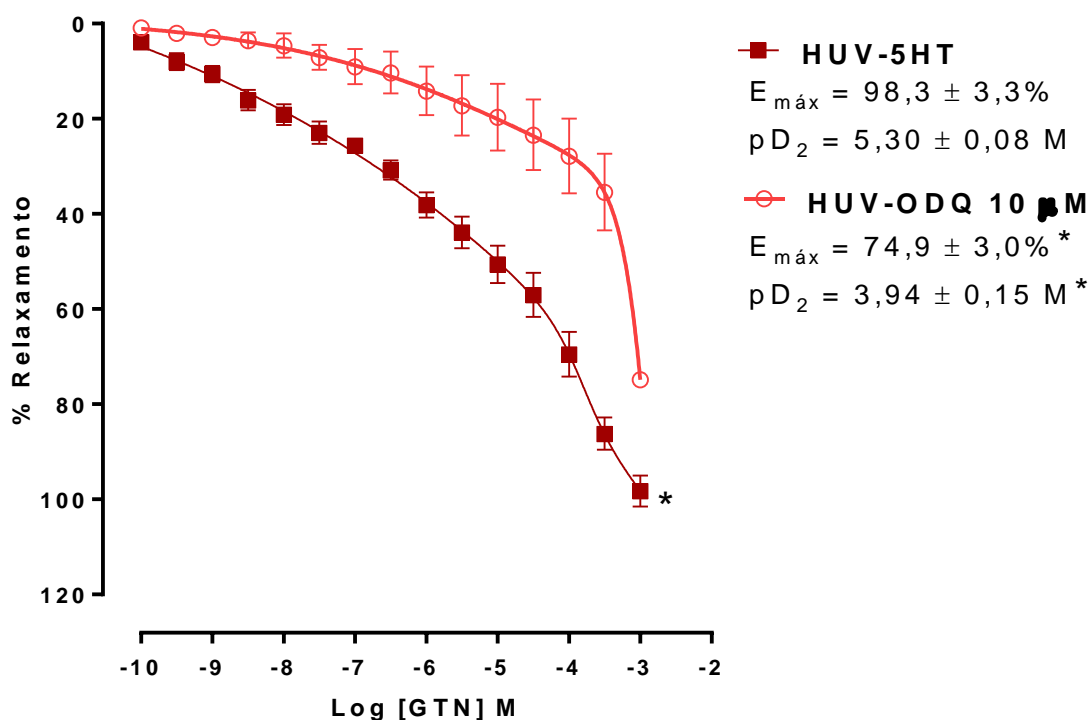


Gráficos em barra que expressa o efeito inibitório de GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF sobre contrações fásicas induzidas por 5-HT, na ausência de cálcio extracelular, em anéis de HUA. As barras representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. ^cp < 0,05 vs GTN; ^dp < 0,05 vs NTHF; ^ep < 0,05 vs NCOE
Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

4.6 ENVOLVIMENTO DA sGC NO EFEITO DOS NITRATOS ORGÂNICOS SOBRE ANÉIS DE HUCV PRÉ-CONTRAÍDOS 5-HT

O vasorrelaxamento induzido por GTN (0,1 nM – 1 mM) apresentou uma redução de eficácia e potência ($E_{máx} = 74,9 \pm 3,0\%$ e $pD_2 = 3,94 \pm 0,15 M$; $p < 0,05$), em anéis de HUV pré-incubados com o inibidor da sGC (10 μ M de ODQ), quando comparados ao relaxamento induzido na ausência deste inibidor ($E_{máx} = 98,3 \pm 3,3\%$ e $pD_2 = 5,30 \pm 0,08 M$) (Gráfico 47).

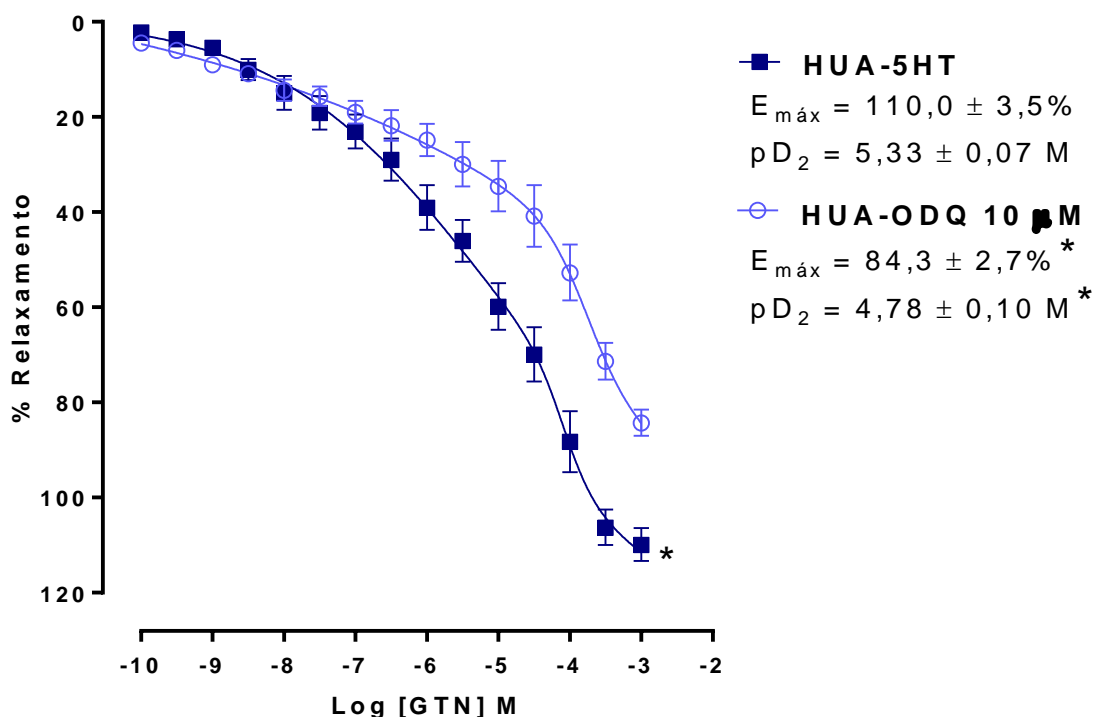
Gráfico 47 – Envolvimento da sGC no Efeito de GTN em HUV Pré-contráídos com 5-HT



Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por GTN (0,1 nM – 1 mM), sobre anéis de HUV, pré-contráídos com 5-HT, na presença (□; n = 6) ou ausência (■; n = 6) de 10 μ M de ODQ. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.; * $p < 0,05$.
Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Em anéis de HUA, GTN exibiu o mesmo perfil, com redução de eficácia e potência ($E_{máx} = 84,3 \pm 2,7\%$ e $pD_2 = 4,78 \pm 0,10 M$; $p < 0,05$), quando os anéis foram pré-incubados com $10 \mu M$ de ODQ, em comparação ao relaxamento induzido na ausência deste inibidor ($E_{máx} = 110,0 \pm 3,5\%$ e $pD_2 = 5,32 \pm 0,07 M$) (Gráfico 48).

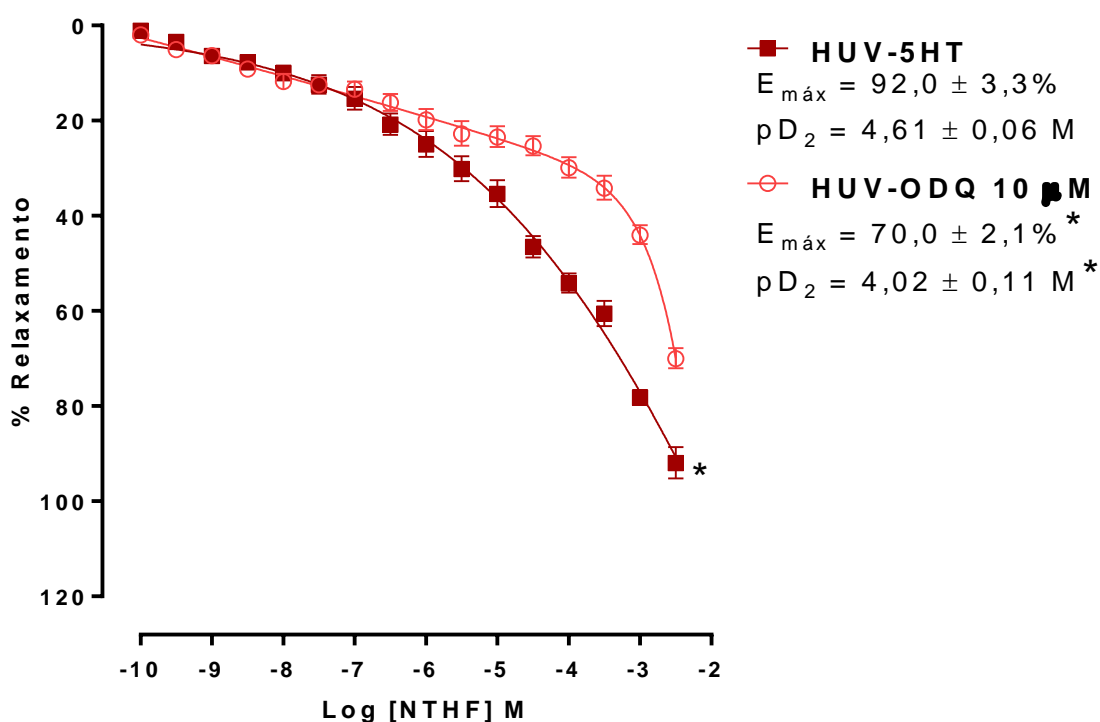
Gráfico 48 – Envolvimento da sGC no Efeito de GTN em HUA Pré-contraídos com 5-HT



Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por GTN ($0,1 nM - 1 mM$), sobre anéis de HUA, pré-contraídos com 5-HT, na presença (\square ; $n = 6$) ou ausência (\blacksquare ; $n = 6$) de $10 \mu M$ de ODQ. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.; $*p < 0,05$
Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A pré-incubação de 10 μ M ODQ, também levou à atenuação da eficácia e da potência, na resposta vasorrelaxante induzida por NTHF (0,1 nM – 3 mM) em anéis de HUV ($E_{máx} = 70,0 \pm 2,1\%$ e $pD_2 = 4,02 \pm 0,11$ M; $p < 0,05$), quando comparado ao relaxamento induzido na ausência deste inibidor ($E_{máx} = 92,0 \pm 3,3\%$ e $pD_2 = 4,61 \pm 0,06$ M) (Gráfico 49).

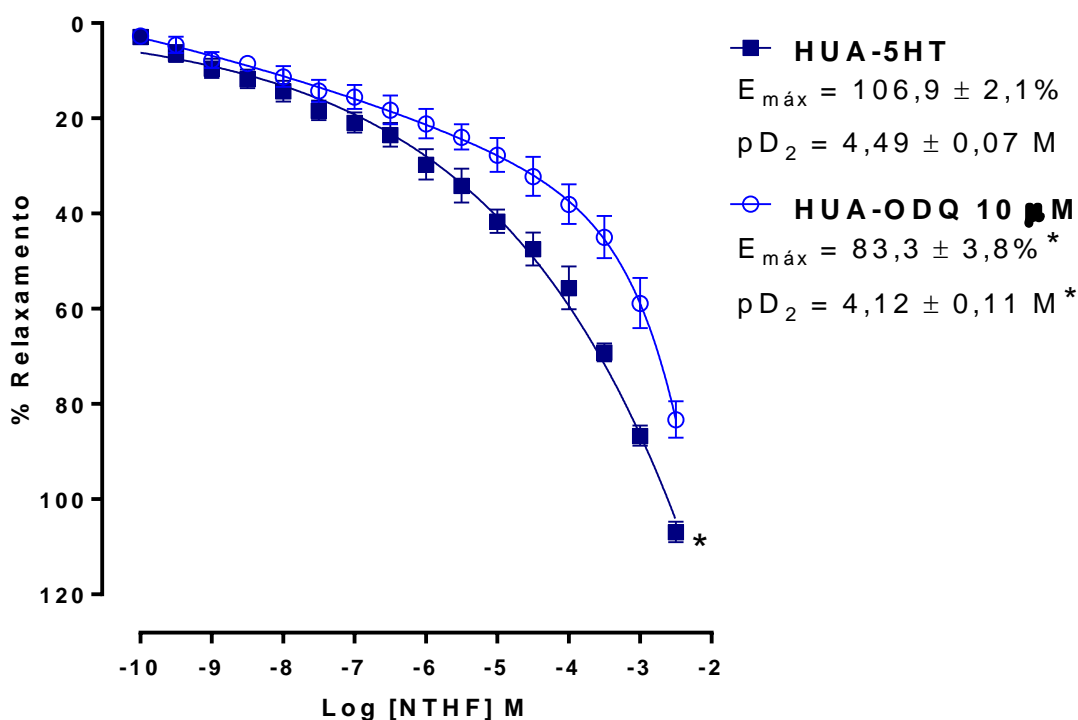
Gráfico 49 – Envolvimento da sGC no Efeito de NTHF em HUV Pré-contraídos com 5-HT



Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NTHF (0,1 nM – 3 mM), sobre anéis de HUV, pré-contraídos com 5-HT, na presença (□; n = 6) ou ausência (■; n = 6) de 10 μ M de ODQ. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m; * $p < 0,05$.
Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Em anéis de HUA, nas mesmas condições, NTHF também apresentou uma diminuição de eficácia e potência ($E_{máx} = 83,3 \pm 3,8\%$ e $pD_2 = 4,49 \pm 0,07 M$; $p < 0,05$) em comparação à resposta na ausência deste inibidor ($E_{máx} = 106,9 \pm 2,1\%$ e $pD_2 = 4,12 \pm 0,011 M$) (Gráfico 50).

Gráfico 50 – Envolvimento da sGC no Efeito de NTHF em HUA Pré-contraídos com 5-HT

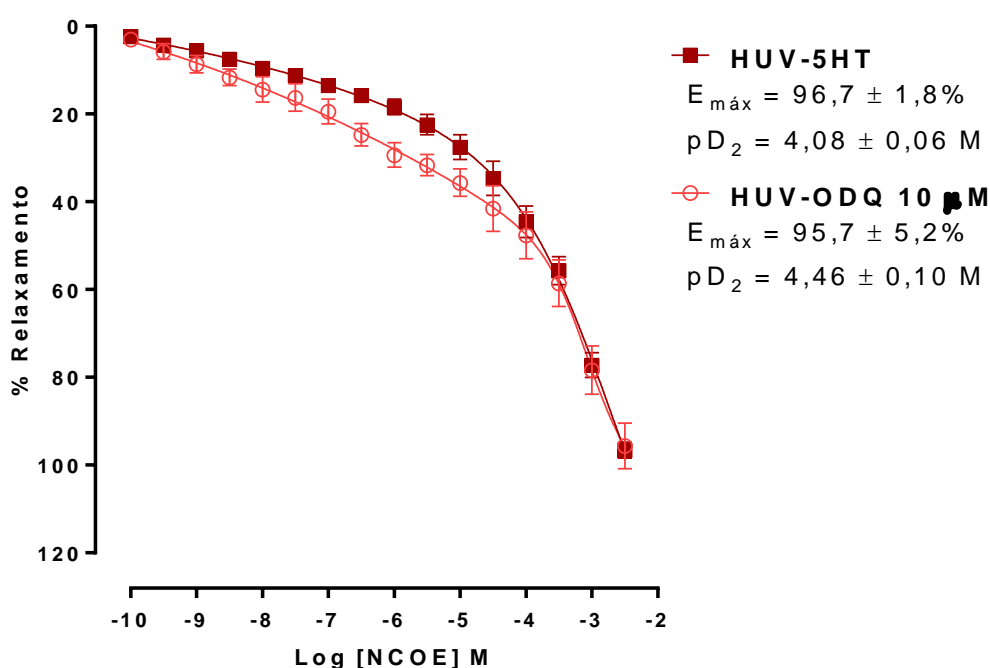


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NTHF (0,1 nM – 3 mM), sobre anéis de HUA, pré-contraídos com 5-HT, na presença (□; n = 6) ou ausência (■; n = 6) de 10 µM de ODQ. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m; *p < 0,05.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A potência da vasodilatação induzida por NCOE (0,1 nM – 3 mM), em anéis de HUV, foi aumentada de forma significativa a partir da pré-incubação de 10 µM de ODQ ($pD_2 = 4,46 \pm 0,10$ M; $p < 0,05$), sem alteração significativa da eficácia ($E_{máx} = 95,7 \pm 5,2\%$; $p > 0,05$), quando comparados à resposta na ausência desse inibidor ($E_{máx} = 96,7 \pm 1,8\%$ e $pD_2 = 4,08 \pm 0,06$ M) (Gráfico 51).

Gráfico 51 – Envolvimento da sGC no Efeito de NCOE em HUV Pré-contraídos com 5-HT

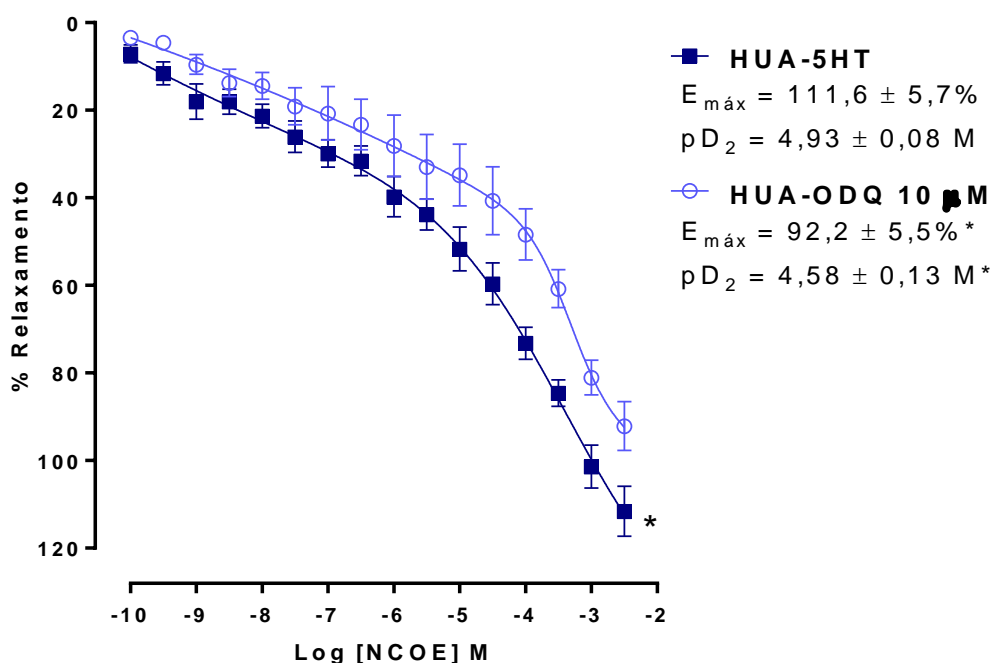


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NCOE (0,1 nM – 3 mM), sobre anéis de HUV, pré-contraídos com 5-HT, na presença (□; n = 6) ou ausência (■; n = 6) de 10 µM de ODQ. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Em contrapartida, a pré-incubação de 10 μ M de ODQ, reduziu tanto a potência quanto a eficácia da vasodilatação induzida por NCOE em HUA ($E_{m\acute{a}x} = 92,2 \pm 5,5\%$ e $pD_2 = 4,58 \pm 0,13M$; $p < 0,05$), quando comparada à resposta na ausência do inibidor ($E_{m\acute{a}x} = 111,6 \pm 5,7\%$ e $pD_2 = 4,93 \pm 0,08 M$) (Gráfico 52).

Gráfico 52 – Envolvimento da sGC no Efeito de NCOE em HUA Pré-contraídos com 5-HT

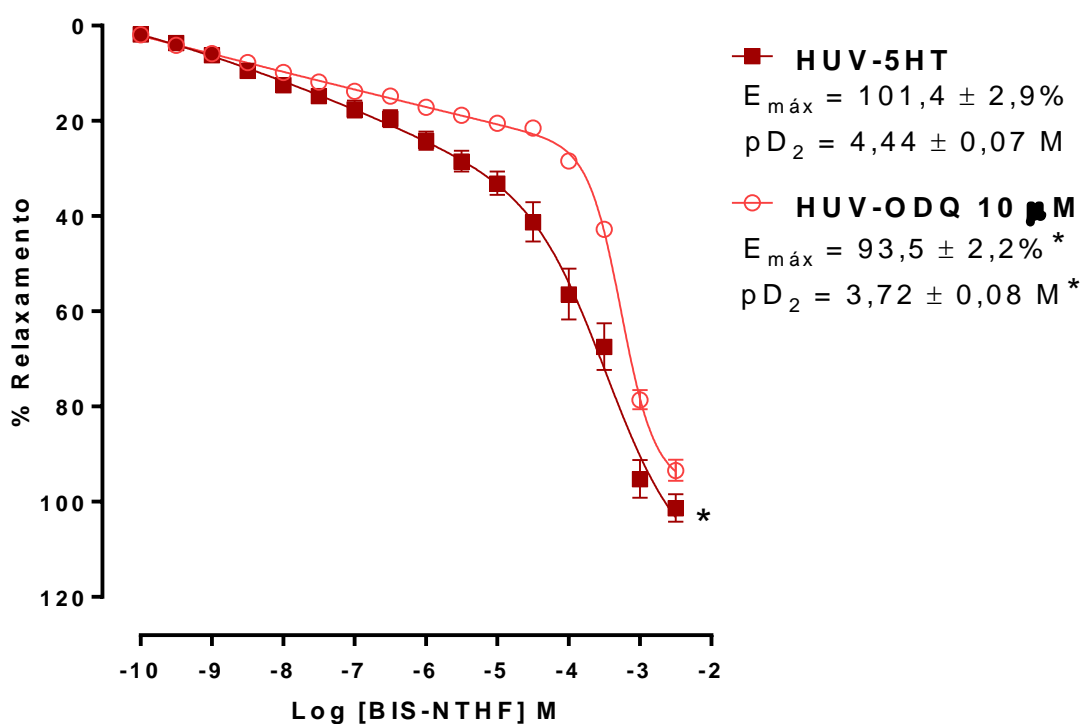


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NCOE (0,1 nM – 3 mM), sobre anéis de HUA, pré-contraídos com 5-HT, na presença (□; n = 6) ou ausência (■; n = 6) de 10 μ M de ODQ. Os pontos representam a média de 7 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A resposta vasorrelaxante induzida por BIS-NTHF (0,1 nM – 3 mM) apresentou uma diminuição de eficácia ($E_{m\acute{a}x} = 93,5 \pm 2,2\%$; $p < 0,05$) e de potência ($pD_2 = 3,72 \pm 0,08$ M; $p < 0,05$), quando os anéis HUV foram pré-incubados com 10 μ M ODQ, em comparação à resposta na ausência deste ($E_{m\acute{a}x} = 101,4 \pm 2,9\%$ e $pD_2 = 4,44 \pm 0,07$ M) (Gráfico 53).

Gráfico 53 – Envolvimento da sGC no Efeito de BIS-NTHF em HUV Pré-contraídos com 5-HT

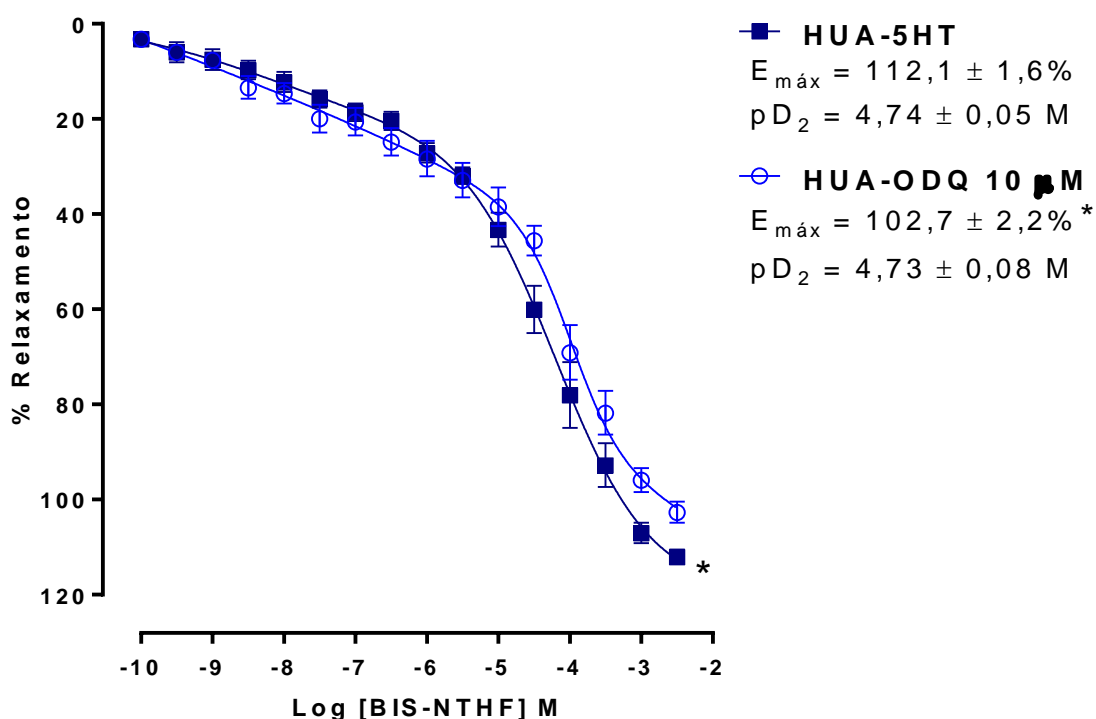


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por BIS-NTHF (0,1 nM – 3 mM), sobre anéis de HUV, pré-contraídos com 5-HT, na presença (□; n = 6) ou ausência (■; n = 6) de 10 μ M de ODQ. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m; * $p < 0,05$.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Em anéis de HUA, a presença do inibidor atenuou a eficácia ($E_{máx} = 112,1 \pm 1,6\%$; $p < 0,05$), sem alterar de maneira significativa a potência ($pD_2 = 4,74 \pm 0,05 M$; $p > 0,05$) de BIS-NTHF, quando comparado à vasodilatação na ausência de ODQ (Gráfico 54).

Gráfico 54 – Envolvimento da sGC no Efeito de BIS-NTHF em HUA Pré-contraídos com 5-HT



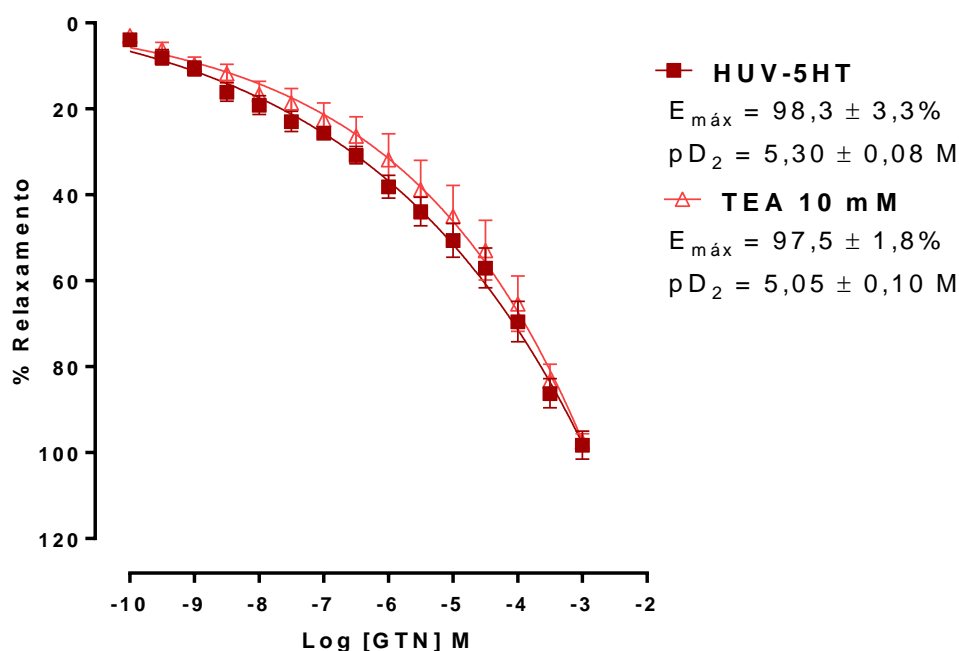
Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por BIS-NTHF (0,1 nM – 3 mM), sobre anéis de HUA, pré-contraídos com 5-HT, na presença (\square ; $n = 6$) ou ausência (\blacksquare ; $n = 6$) de 10 μ M de ODQ. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m; * $p < 0,05$.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

4.7 ENVOLVIMENTO DE CANAIS PARA POTÁSSIO NO EFEITO DOS NITRATOS ORGÂNICOS SOBRE ANÉIS DE HUCV PRÉ-CONTRAÍDOS 5-HT

O vasorrelaxamento induzido por GTN (0,1 nM – 1 mM) não foi alterado quando os anéis de HUV foram pré-incubados com 10 mM de TEA ($E_{máx} = 97,5 \pm 1,8\%$ e $pD_2 = 5,05 \pm 0,10$ M), em comparação ao resultado obtido na ausência deste bloqueador dos canais para potássio ($E_{máx} = 98,3 \pm 3,3\%$ e $pD_2 = 5,30 \pm 0,08$ M) (Gráfico 55).

Gráfico 55 – Envolvimento dos Canais para Potássio no Efeito de GTN em HUV Pré-contraídos com 5-HT

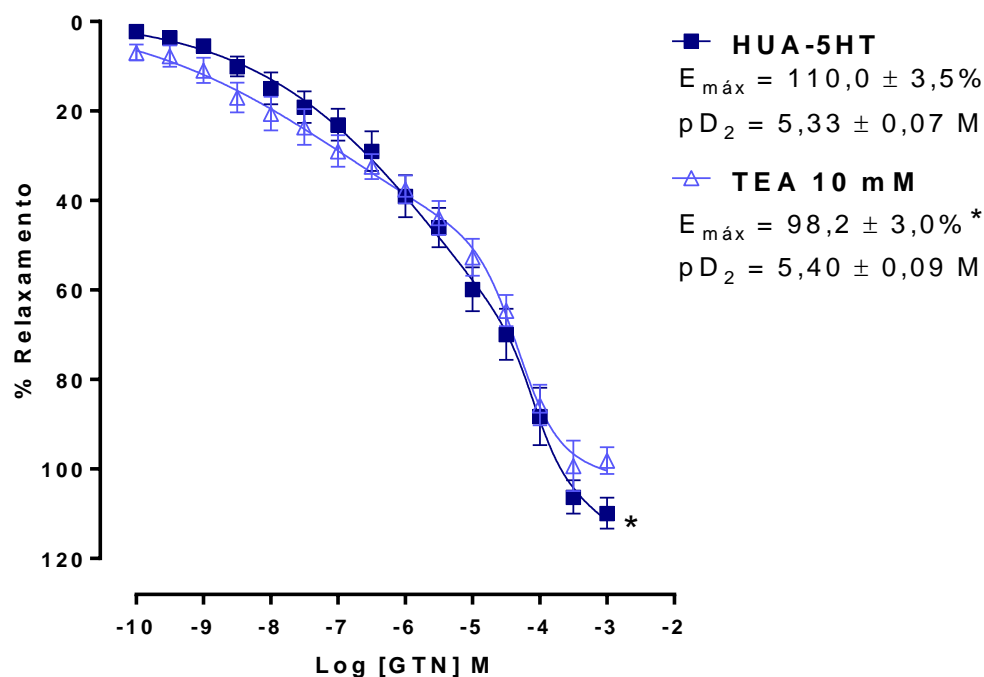


Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por GTN (0,1 nM – 1 mM), sobre anéis de HUV, pré-contraídos com 5-HT, na presença (Δ ; n = 6) ou ausência (\blacksquare ; n = 6) de 10 mM de TEA. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m;

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Entretanto, em anéis de HUA nessas mesmas condições, esse nitrato exibiu uma redução do efeito máximo ($E_{m\acute{a}x} = 98,2 \pm 3,0\%$), sem alteração significativa da potência ($pD_2 = 5,40 \pm 0,09$ M), quando comparados ao efeito sem o TEA ($E_{m\acute{a}x} = 110,0 \pm 3,5\%$ e $pD_2 = 5,33 \pm 0,07$ M) (Gráfico 56).

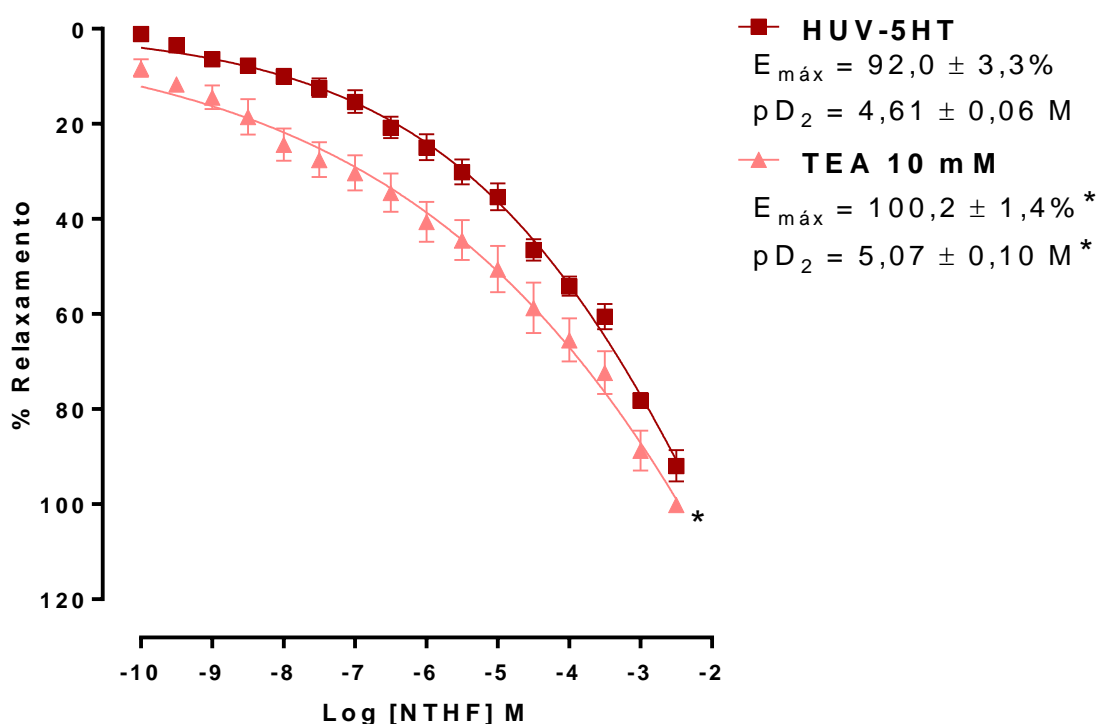
Gráfico 56 – Envolvimento dos Canais para Potássio no Efeito de GTN em HUA Pré-contraídos com 5-HT



Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por GTN (0,1 nM – 1 mM), sobre anéis de HUA, pré-contraídos com 5-HT, na presença (Δ ; n = 6) ou ausência (\blacksquare ; n = 6) de 10 mM de TEA. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. *p < 0,05
Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A pré-incubação com 10 mM de TEA fez com que o vasorrelaxamento, induzido por NTHF (0,1 nM – 3 mM) fosse mais potente e mais eficaz ($E_{m\acute{a}x} = 100,2 \pm 1,8\%$ e $pD_2 = 5,07 \pm 0,10$ M; $p < 0,05$), quando comparado à resposta na ausência deste inibidor ($E_{m\acute{a}x} = 92,0 \pm 3,3\%$ e $pD_2 = 4,61 \pm 0,06$) (Gráfico 57).

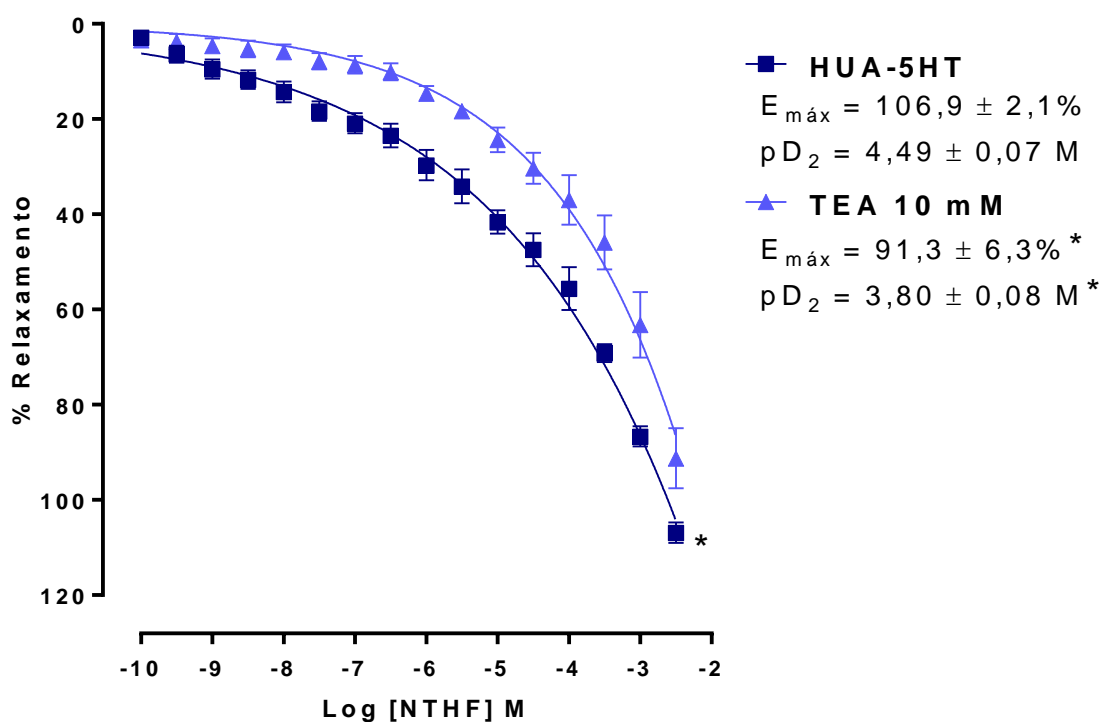
Gráfico 57 – Envolvimento dos Canais para Potássio no Efeito de NTHF em HUV Pré-contraídos com 5-HT



Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NTHF (0,1 nM – 3 mM), sobre anéis de HUV, pré-contraídos com 5-HT, na presença (Δ ; $n = 6$) ou ausência (\blacksquare ; $n = 6$) de 10 mM de TEA. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. $*p < 0,05$
Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

No entanto, nestas mesmas condições em HUA, houve uma redução de eficácia e potência da vasodilatação induzida por NTHF ($E_{máx} = 91,3 \pm 0,6\%$ e $pD_2 = 3,80 \pm 0,13 M$; $p < 0,05$), em relação ao efeito sem TEA ($E_{máx} = 106,9 \pm 2,1\%$ e $pD_2 = 4,49 \pm 0,07 M$) (Gráfico 58).

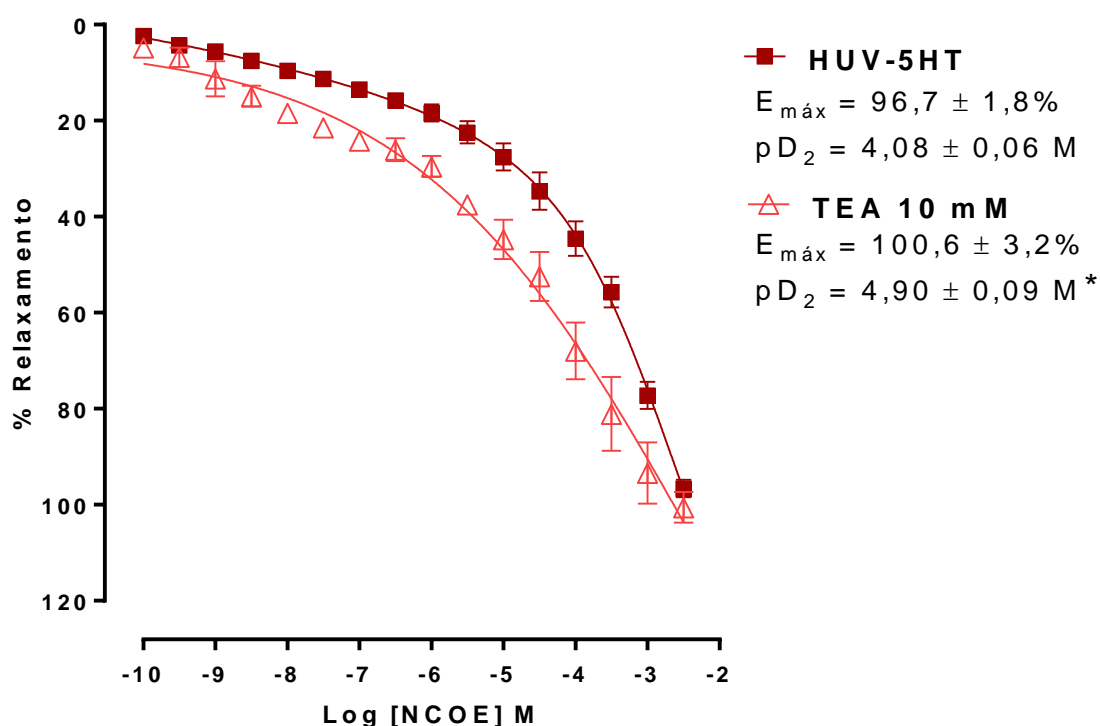
Gráfico 58 – Envolvimento dos Canais para Potássio no Efeito de NTHF em HUA Pré-contráídos com 5-HT



Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NTHF (0,1 nM – 3 mM), sobre anéis de HUA, pré-contráídos com 5-HT, na presença (Δ ; $n = 6$) ou ausência (\blacksquare ; $n = 6$) de 10 mM de TEA. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. $*p < 0,05$
Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

O vasorrelaxamento induzido por NCOE também foi potencializado ($pD_2 = 4,90 \pm 0,09$ M; $p < 0,05$), em anéis de HUV pré-incubados com 10 mM de TEA, sem alteração da eficácia ($E_{máx} = 100,6 \pm 3,2\%$; $p > 0,05$), em comparação à resposta na ausência deste inibidor ($E_{máx} = 96,7 \pm 1,8\%$ e $pD_2 = 4,08 \pm 0,06$ M) (Gráfico 59).

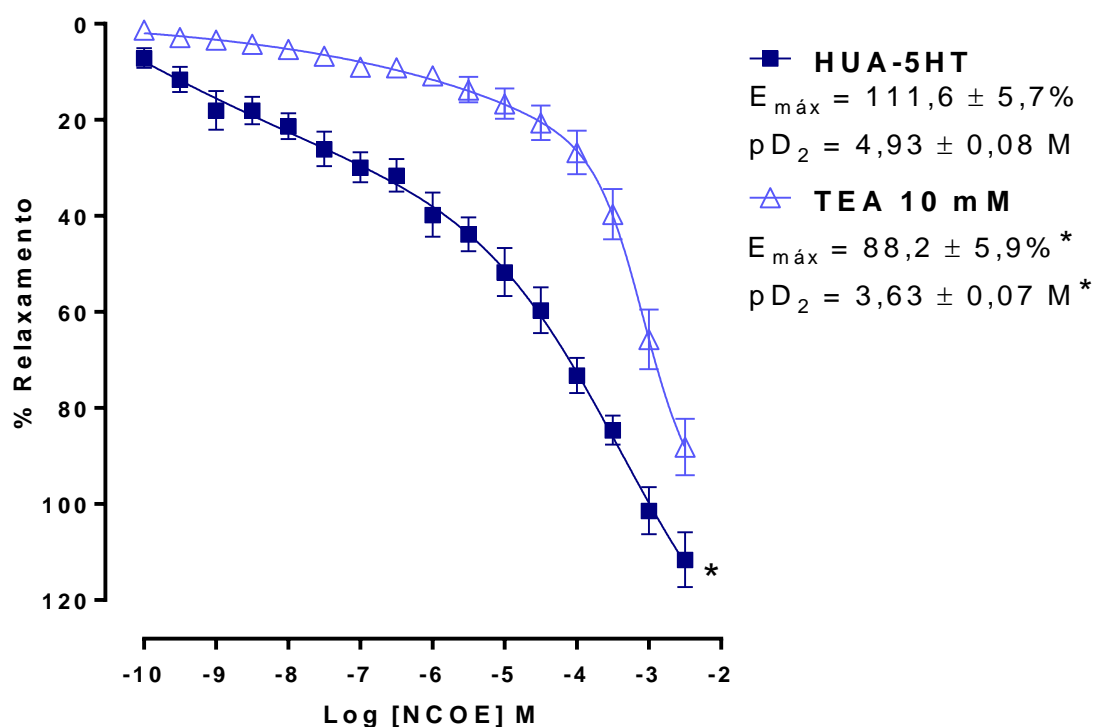
Gráfico 59 – Envolvimento dos Canais para Potássio no Efeito de NCOE em HUV Pré-contraídos com 5-HT



Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NCOE (0,1 nM – 3 mM) sobre anéis de HUV, pré-contraídos com 5-HT, na presença (Δ ; $n = 6$) ou ausência (\blacksquare ; $n = 6$) de 10 mM de TEA. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$
Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Em contrapartida, nestas mesmas condições em HUA, houve uma redução de eficácia e potência do efeito vasodilatador induzido por esse nitrato ($E_{máx} = 88,2 \pm 5,9\%$ e $pD_2 = 3,63 \pm 0,07 M$; $p < 0,05$), em relação ao efeito sem TEA ($E_{máx} = 111,6 \pm 5,7\%$ e $pD_2 = 4,93 \pm 0,08 M$) (Gráfico 60).

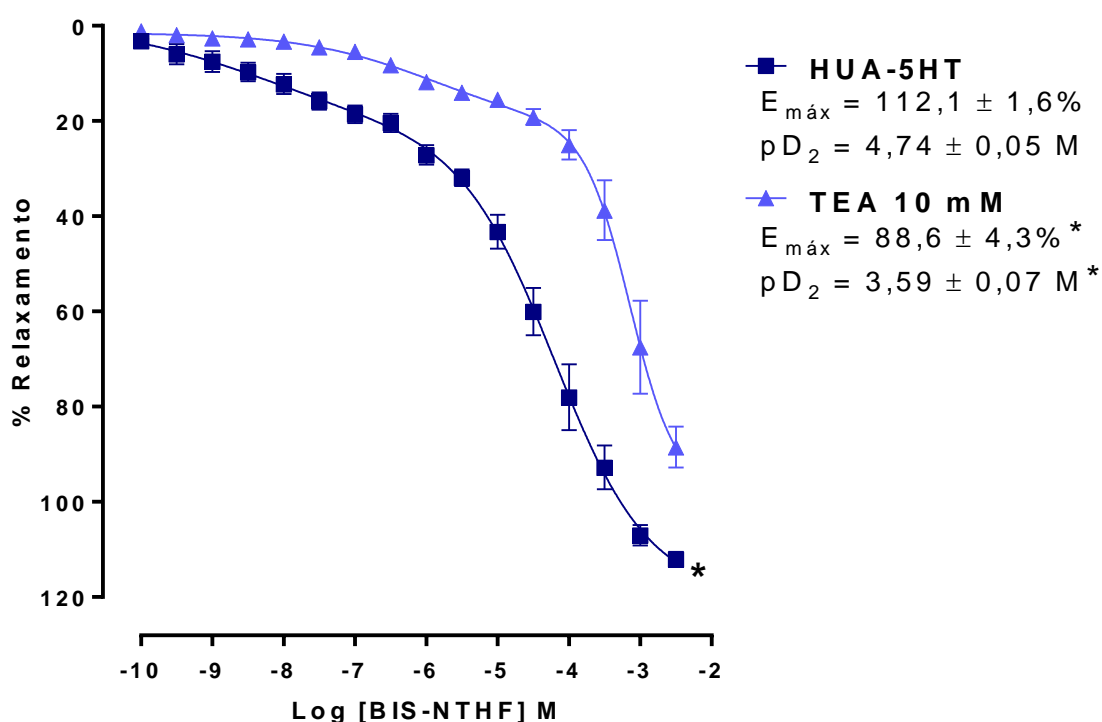
Gráfico 60 – Envolvimento dos Canais para Potássio no Efeito de NCOE em HUA Pré-contraídos com 5-HT



Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por NCOE (0,1 nM – 3 mM) sobre anéis de HUA, pré-contraídos com 5-HT, na presença (Δ ; $n = 6$) ou ausência (\blacksquare ; $n = 6$) de 10 mM de TEA. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.; $*p < 0,05$
Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

A resposta vasodilatadora de BIS-NTHF apresentou redução significativa tanto da eficácia ($E_{máx} = 88,6 \pm 4,3\%$; $p < 0,05$) como de potência ($pD_2 = 3,59 \pm 0,07 M$; $p < 0,05$), nos anéis de HUA pré-incubados com 10 mM de TEA, quando comparado ao efeito sem o bloqueador ($E_{máx} = 112,1 \pm 1,6\%$ e $pD_2 = 4,74 \pm 0,05 M$) (Gráfico 61).

Gráfico 61 – Envolvimento dos Canais para Potássio no Efeito de BIS-NTHF em HUA Pré-contráídos com 5-HT



Curva concentração-resposta do efeito vasorrelaxante induzido por BIS-NTHF (0,1 nM – 3 mM) sobre anéis de HUA, pré-contráídos com 5-HT, na presença (Δ ; $n = 6$) ou ausência (\blacksquare ; $n = 6$) de 10 mM de TEA. Os pontos representam a média de 6 experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m. * $p < 0,05$

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Tabela 1 – Resumo das Condições Experimentais em anéis de HUCV

Condição experimental	HUV	HUA
Tônus Basal em Função do Tempo	17,1 ± 3,3%	31,8 ± 5,6%
Tônus Basal – Cremofor	24,3 ± 3,2%	33,9 ± 3,8%
Tônus Basal – GTN	40,8 ± 5,2%	51,5 ± 5,7%
Tônus Basal – NTHF	53,9 ± 3,0%	55,1 ± 2,6%
Tônus Basal – NCOE	57,4 ± 1,7%	58,0 ± 3,3%
Tônus Basal – BIS-NTHF	37,8 ± 4,6%	37,6 ± 5,0%
Controle da Contração de 5-HT	28,7 ± 1,6%	15,3 ± 3,0%
Contração com 5-HT – Cremofor	35,1 ± 1,9%	32,9 ± 3,9%
Contração com 5-HT – GTN	98,3 ± 3,3%	110,0 ± 3,5%
Contração com 5-HT – NTHF	92,0 ± 3,3%	106,9 ± 2,1%
Contração com 5-HT – NCOE	96,7 ± 1,8%	111,6 ± 5,7%
Contração de 5-HT – BIS-NTHF	101,4 ± 2,9%	112,1 ± 1,6%
Contração com KCl 60 mM – GTN	89,7 ± 3,7%	91,8 ± 1,9%
Contração com KCl 60 mM – NTHF	74,1 ± 2,2%	68,6 ± 9,2%
Contração com KCl 60 mM – NCOE	93,5 ± 1,9%	82,3 ± 8,1%
Contração com KCl 60 mM – BIS-NTHF	107,6 ± 3,5%	111,1 ± 4,6a%
Pré-incubação com GTN – 5-HT	88,4 ± 4,2%	95,8 ± 2,0%
Pré-incubação com NTHF – 5-HT	31,4 ± 5,1%	80,8 ± 9,4%
Pré-incubação com NCOE – 5-HT	13,7 ± 1,2%	23,0 ± 9,0%
Pré-incubação com BIS-NTHF – 5-HT	92,7 ± 3,5%	93,3 ± 2,5%
Pré-incubação com GTN – Contração Fásica 5-HT \emptyset Ca ⁺²	95,0 ± 1,8%	88,6 ± 2,9%
Pré-incubação com GTN – Contração Tônica 5-HT \emptyset Ca ⁺²	97,3 ± 0,9%	92,1 ± 1,5%
Pré-incubação com NTHF – Contração Fásica 5-HT \emptyset Ca ⁺²	63,3 ± 6,3%	51,4 ± 7,7%
Pré-incubação com NTHF – Contração Tônica 5-HT \emptyset Ca ⁺²	75,8 ± 6,2%	83,0 ± 3,9%
Pré-incubação com NCOE – Contração Fásica 5-HT \emptyset Ca ⁺²	31,7 ± 5,6%	33,3 ± 7,8%
Pré-incubação com NCOE – Contração Tônica 5-HT \emptyset Ca ⁺²	84,7 ± 4,5%	82,7 ± 3,9%
Pré-incubação com BIS-NTHF – Contração Fásica 5-HT \emptyset Ca ⁺²	93,3 ± 3,5%	91,9 ± 1,9%
Pré-incubação com BIS-NTHF – Contração Tônica 5-HT \emptyset Ca ⁺²	97,8 ± 0,7%	97,5 ± 0,6%
Pré-incubação com ODQ – GTN	74,9 ± 3,0%	84,3 ± 2,7%
Pré-incubação com ODQ – NTHF	70,0 ± 2,1%	83,3 ± 3,8%
Pré-incubação com ODQ – NCOE	95,7 ± 5,2%	92,2 ± 5,5%
Pré-incubação com ODQ – BIS-NTHF	93,5 ± 2,2%	102,7 ± 2,2%
Pré-incubação com TEA – GTN	97,5 ± 1,8%	98,2 ± 3,0%
Pré-incubação com TEA – NTHF	100,2 ± 1,4%	91,3 ± 6,3%
Pré-incubação com TEA – NCOE	100,6 ± 3,2%	88,2 ± 5,9%
Pré-incubação com TEA – BIS-NTHF	–	88,6 ± 4,3%

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Discussão



5 DISCUSSÃO

Os vasos encontrados nos cordões umbilicais conectam o fluxo fetal ao placentário, permitindo as trocas gasosas e nutrientes entre o feto e a placenta. Os cordões, geralmente, são desprezados após o parto, de maneira a caracterizar-se como fonte abundante de material biológico e, conseqüentemente, de vasos humanos. Apesar destas vantagens, há poucas pesquisas envolvendo estes vasos sanguíneos isolados, quando comparados aos estudos com vasos animais, por exemplo.

A grande maioria dos estudos disponíveis envolvem HUA, enquanto há pouquíssimos com HUV isolada, tanto de caracterização do tecido como de reatividade de substâncias vasoativas. Diferentemente das artérias que são facilmente identificadas e dissecadas, o fato das veias apresentarem uma parede muito mais fina e com aspecto parecido ao da geleia de Wharton, pode confundir o manipulador durante o processo de dissecação, uma característica que pode dificultar o seu isolamento. Em contrapartida, uma das células endoteliais mais utilizadas para estudos moleculares são as células endoteliais de HUV, conhecidas como HUVECs e consideradas um modelo robusto para estudar a maioria das patofisiologias vasculares (TAN et al., 2004).

Um dos possíveis motivos para a escassez de estudo nesse modelo de vaso, deve-se à dificuldade de obtenção do cordão umbilical, como: doação voluntária do cordão, a qual pode gerar desconforto à parturiente pela incerteza em relação à segurança nos procedimentos a serem adotados, apesar destes serem explicitados no momento do convite à participação da pesquisa; dificuldade de acesso ao ambiente do parto, devido às exigências inerentes a estes locais; a seleção de parturientes que atendam aos critérios de inclusão, principalmente, ausência de enfermidades.

Outro desafio da pesquisa envolvendo HUCV é o fato de que, devido ao longo período de estabilização, leva-se a um tempo total de experimento de duas a três vezes maior do que o necessário para outros vasos sanguíneos e, conseqüentemente, aumenta o prazo para obtenção dos resultados e para duração da pesquisa, de uma maneira geral.

Um dos objetivos deste estudo foi implantar e padronizar a técnica para utilização de HUCV, desde a coleta do material até a técnica laboratorial envolvendo estes vasos, no laboratório de Farmacologia Cardiovascular da PgPNSB/UFPB. Tal procedimento foi necessário, uma vez que estudos envolvendo HUCV não mostram os procedimentos necessários para dissecação destes vasos. Adicionalmente, os estudos que envolvem vasos umbilicais são discrepantes, em relação aos parâmetros de coleta e condições experimentais, como: tempo de armazenamento da amostra; solução nutritiva e condições de transporte; período de estabilização e tensão basal; agentes contraturantes; e resposta contrátil, caracterizada pelo delta de contração.

A implantação e padronização da técnica, no nosso laboratório, demorou aproximadamente dois anos. Uma das razões desse extenso tempo, foi devido à dificuldade em haver disponibilidade de parturientes saudáveis no HULW/UFPB, uma vez que este hospital tem a característica de receber, principalmente, mulheres que podem apresentar complicações gestacionais. Tal problema foi parcialmente resolvido quando a coleta passou a ser realizada no Instituto Cândida Vargas, considerada uma maternidade referência da região.

Na ausência de agentes contraturantes, vasos umbilicais apresentam atividade contrátil espontânea e, sob condições isométricas, a tensão de repouso diminui ao longo de várias horas, após aplicação de uma tensão inicial (ALTURA et al., 1972; SOMLYO; WOO; SOMLYO, 1965). Tal fato foi observado neste estudo (Figura 15, p. 65) e, por isto, foi estabelecido o período de estabilização de 3 horas, com a tensão devendo ser ajustada para 3 g, a cada 15 minutos. Este tempo é o suficiente para minimizar a vasomotricidade, caracterizada por contrações espontâneas que ocorrem devido alta reatividade desses vasos.

Mecanismos de regulação da contractilidade dos HUCV são muito importantes para a troca de gases e nutrientes entre o feto e a placenta. Estudos indicam que o sistema umbilical vascular é pouco responsável a alguns agentes relaxantes sistêmicos, como acetilcolina (WEBB, 2003). Por outro lado, a produção endotelial de outros vasodilatadores, como NO, é aumentado durante a gravidez (WANG; ZHENG, 2012), com a finalidade de contrarregular o efeito vasoconstritor do tromboxano A₂ (TxA₂), por exemplo (OUZOUNIAN; ELKAYAM, 2012). A reatividade

umbilical vascular é essencial para manter um sistema dilatado, de forma a manter uma baixa resistência ao fluxo sanguíneo que é transportado para a placenta, durante a gravidez (FOX; KHONG, 1990).

Fármacos que alteram a resistência vascular podem conduzir uma melhora clínica de situações nas quais a PA esteja elevada, por meio de modificações na complacência e reatividade vascular (JACKSON; BELLAMY, 2015). Deste modo, torna-se importante o estudo de dilatadores eficazes em melhorar o fluxo feto-placentário (WEBB, 2003), que possam ser considerados novas estratégias terapêuticas em afecções associadas à gravidez, como a pré-eclâmpsia.

Doadores de NO têm sido desenvolvidos para permitir o estoque e liberação desse gás, com a finalidade de beneficiar uma gama de aplicações (CARPENTER; SCHOENFISCH, 2012). Ao passo que existem várias classes de doadores de NO, incluindo os nitrosils, S-nitrotiois, nitratos e nitritos orgânicos, NONOatos (WANG et al., 2002), poucos têm sido levados para clínica (CARPENTER; SCHOENFISCH, 2012) devido à instabilidade química que vários destes compostos apresentam, por exemplo. Nitratos orgânicos representam a mais antiga classe de doadores de NO utilizado clinicamente (FRANÇA-SILVA et al., 2014), o que pode ser explicado tanto pelo fato de serem os mais estudados, quanto por serem mais estáveis quimicamente.

Diante desse contexto, outra finalidade desta pesquisa foi caracterizar os efeitos de quatro nitratos orgânicos sobre HUCV, uma vez que não há estudos que os caracterizem nesta vasculatura. Para isto, foram avaliadas as respostas dos seguintes nitratos orgânicos: GTN, o nitrato mais extensamente estudado, devido às suas várias ações no sistema cardiovascular; NTHF, proveniente do bagaço da cana; NCOE, derivado ácido ricinoléico; e BIS-NTHF, sintetizado a partir do furan-2-carbaldeído.

O tônus intrínseco nos HUCV depende, em parte, da entrada de cálcio via Cav. Esse tônus é relatado opor ao efeito de nitrovasodilatadores (WYLAN et al., 1993). No presente estudo, foi verificado que há uma diminuição espontânea do tônus ao longo de 180 minutos, e esta é maior em anéis de HUA do que em HUV (Gráfico 1). Uma possível explicação para esta observação, pode ser encontrada no relato de que, em condições de repouso, HUV já funcionaria com a dilatação máxima (GOODWIN, 1968). O tônus da HUV já foi considerado insignificante para a regulação

do fluxo sanguíneo umbilical. Entretanto, estudos recentes mostram que HUV está longe de ser uma via de condução passiva, e que responde a alterações na pressão de O_2 (pO_2), diretamente relacionada à despolarização de membrana (MILDENBERGER et al., 2003).

Diante da importância do tônus intrínseco para HUCV, avaliou-se o efeito da adição cumulativa dos nitratos no tônus basal destes vasos. GTN, NTHF e NCOE relaxam o tônus basal (Gráfico 3; Gráfico 4; Gráfico 5, respectivamente), de maneira mais eficaz do que a queda provocada pela adição do cremofor (Gráfico 3). Por outro lado, BIS-NTHF só apresentou efeito relaxante significativo em HUV (Gráfico 6). NCOE foi o nitrato mais eficaz e, porém, o menos potente em HUV. GTN apresentou a maior potência em ambos HUCV (Gráfico 7; Gráfico 8).

O fato de GTN e BIS-NTHF terem apresentado o menor relaxamento do tônus basal pode sugerir que a biconversão desses nitratos não está envolvida neste efeito, visto que os dois são os que apresentam a maior quantidade de NO em sua estrutura.

O relaxamento induzido pelos nitratos, no tônus basal, sugere que estes compostos alteram os mecanismos que mantém o tônus intrínseco dos vasos umbilicais, provavelmente, devido à diminuição do influxo de cálcio proveniente do meio extracelular. Entretanto, são necessários estudos com ferramentas farmacológicas específicas, como bloqueadores ou ativadores Ca_v , para identificar o mecanismo exato pelo qual os nitratos agem para causarem o relaxamento do tônus basal.

Alguns mediadores já foram descritos por induzirem contração em HUCV, como 5-HT, histamina, angiotensina II e TxA_2 . Entretanto, 5-HT possui extrema importância na regulação da resistência sistêmica fetal (GUPTA et al., 2006), por ser o agente mais potente e com maior eficácia em contrair os vasos umbilicais (CAIRRÃO et al., 2008; SANTOS-SILVA et al., 2008). A ação vasoconstritora de 5-HT ocorre, principalmente, por meio da ativação dos receptores $5-HT_{2A}$, cuja ativação culmina no aumento dos níveis de IP_3 , e $5-HT_{1B/1D}$, o qual inibe a ciclase de adenilil (AC), enzima que converte ATP em monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) (KARLSSON et al., 1999; SANTOS-SILVA et al., 2009; SANTOS-SILVA et al., 2010).

A contração induzida por 5-HT se dá, principalmente, por aumento do influxo de cálcio, proveniente do meio extracelular, via Cav ou canais de cálcio operados por receptores (MEDEIROS; CALIXTO, 1991). A contração da VSCM é regulada pela $[Ca^{2+}]_i$ e pela sensibilidade dos elementos contráteis a este cátion. Neste mecanismo, o Ca^{2+} se liga à CaM, ativando MLCK que, por sua vez fosforila MLC, e esta interage com os filamentos de actina para promover a contração (KARAKI; SATO; OZAKI, 1991; SAKAMOTO et al., 2003).

Estudos demonstram que o relaxamento induzido por nitrovasodilatadores, em anéis de HUA, foi de magnitude pequena e até considerado insignificante (CHAUDHURI et al., 1991; LEUNG et al., 2006; LOVREN; TRIGGLE, 2000; WHITE, 1988; WYLAM et al., 1993). Uma das possíveis explicações para esta observação seria que os vasos umbilicais, provenientes de partos no termo, apresentam baixa sensibilidade em dilatar (RENOWDEN, EDWARDS, GRIFFITH, 1992; SEXTON et al., 1995). Assim, a entrada de cálcio através de Cav atenua significativamente o efeito vasodilatador desses nitrovasodilatadores, o que não se observa quando a entrada de cálcio do meio extracelular é impedida (WYLAM et al., 1993).

Ao levar em conta a importância de 5-HT no estado contrátil de vasos umbilicais e as características dos nitrovasodilatadores em relaxar esses vasos, verificou-se o efeito da adição cumulativa de GTN (Gráfico 13), NTHF (Gráfico 14), NCOE (Gráfico 15) ou BIS-NTHF (Gráfico 16) sobre anéis de HUCV pré-contraídos com $10 \mu M$ de 5-HT.

Todos os nitratos em estudo induziram vasorrelaxamento, em ambos os vasos umbilicais, com efeitos máximos superiores a 90% e 100% em HUV (Gráfico 17) e HUA (Gráfico 19), respectivamente. Estes resultados corroboram o fato de que os efeitos clínicos dos nitratos orgânicos decorrem da vasodilatação de veias e artérias (IACHINI-BELLISARII et al., 2012; KLEMENSKA; BERSEWICZ, 2009), e, por outro lado, diferem dos estudos em HUA que demonstraram uma ação modesta de nitrovasodilatadores nestes vasos, incluindo GTN (WYLAM et al., 1993).

GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF mostraram maior eficácia em relaxar anéis de HUA do que os de HUV. Uma característica da circulação fetoplacentária é o fato de que apresenta um fluxo inverso: as duas HUA fornecem sangue, com baixa

pressão de O_2 (pO_2) do feto para placenta, enquanto a HUV retorna com sangue rico em nutrientes e com uma maior pO_2 para o sistema circulatório fetal (BELLOTTI et al., 2000; PRIOR et al., 2014). No presente estudo, os anéis de HUA e HUV foram gaseificados com uma mistura contendo 95% de O_2 e 5% de CO_2 . Relatos da literatura demonstraram que o aumento na pO_2 , de níveis baixos para os níveis considerados fisiológicos, resulta no aumento da potência vasodilatadora de NO e SNP em HUA (LOVREN; TRIGGLE, 2000), o que pode explicar o fato do maior efeito ter sido observado nestes vasos.

NCOE e BIS-NTHF, além de mais eficazes, também exibiram maior potência em relaxar HUA do que HUV. GTN foi o nitrato mais potente em relaxar os HUCV, BIS-NTHF apresentou um valor de potência intermediário, enquanto que NCOE e NTHF foram o menos potentes em relaxar HUV (Gráfico 18) e HUA (Gráfico 20), respectivamente.

Uma possível explicação para essas diferenças nos valores de pD_2 pode ser o fato de que GTN apresenta três moléculas de NO em sua estrutura, BIS-NTHF duas, enquanto que NTHF e NCOE apresentam apenas uma. O fato destes compostos requererem uma reação química ou enzimática para liberarem o NO contido em suas estruturas, faz com que a localização do grupo éster ($-ONO_2$) possa facilitar ou dificultar a liberação dessa molécula. Esta característica pode estar relacionada ao fato do GTN ter melhor potência, enquanto o NCOE apresentou o menor valor de pD_2 .

Vale salientar que a potência dos quatro nitratos foi reduzida consideravelmente, quando comparada à resposta desses compostos em vasos de animais (ALUSTAU, 2010; KHAN et al., 1998; KHAN; HIGDON; MEISHERI, 1998; MACHADO et al., 2014). Tal resposta pode ser devido às diferenças estruturais e de sinalização dos vasos humanos em relação à vasculatura animal, que pode alterar a bioconversão desses nitratos a NO.

HUCV também contraem quando são expostos a soluções com altas concentrações de KCl. Esta promove a contração por levar à despolarização celular, a qual culmina no influxo de cálcio via Ca_v , principal mecanismo destacado nesta ação do KCl (MARIN et al., 1990; TUFAN et al., 2003; WYLAM et al., 1993). Em outros vasos sanguíneos, é descrito que a via da RhoA/ROCK também está envolvida nas

contrações induzidas por 5-HT e KCl 60 mM. Entretanto, essa via não está envolvida na vasoconstrição induzida por esses agentes, na presença de cálcio extracelular, em vasos umbilicais (SANTOS-SILVA; CAIRRÃO; VERDE, 2010).

Levando-se em conta as características da contração induzida por uma solução despolarizante, investigou-se o efeito da adição cumulativa de GTN (Gráfico 21 e Gráfico 22), NTHF (Gráfico 23 e Gráfico 24), NCOE (Gráfico 25 e Gráfico 26) e BIS-NTHF (Gráfico 27 e Gráfico 28), em anéis de HUCV pré-contraídos por uma solução de Krebs modificado com 60 mM de KCl.

Na presença de uma solução despolarizante, as curvas de relaxamento, em HUA, dos quatro nitratos foram deslocadas para direita, mas ainda com uma resposta vasodilatadora considerável, acima de 60%. GTN e NTHF também apresentaram o vasorrelaxamento atenuado, nos anéis de HUV pré-contraídos com KCl 60 mM, embora tenham sido acima de 70%. Estudos em HUA com nifedipino, um clássico bloqueador de Cav-L, mostrou que seu efeito não foi de 100% em contrações induzidas por KCl 60 mM (BELFORT et al., 1995), o que é explicado por este agente despolarizante também levar à liberação de cálcio dos estoques intracelulares (HALL et al., 2006). Com base nestes resultados, pode-se sugerir que o efeito vasodilatador dos quatro nitratos em HUA e, também, de GTN e NTHF em HUV envolve hiperpolarização celular, que pode fazer com que o influxo de cálcio do meio extracelular, via Cav-L, seja atenuado.

NCOE e BIS-NTHF, por outro lado, induziram vasorrelaxamento em HUV, pré-contraído com KCl 60 mM, de forma semelhante aos anéis pré-contraídos com 5-HT. Levando-se em conta o que foi relatado anteriormente, estes resultados podem indicar que, em HUV, as respostas de NCOE e BIS-NTHF também envolvem diminuição da liberação de cálcio dos estoques intracelulares.

A vasodilatação causada pela liberação contínua de NO reduz, de maneira eficaz, a sensibilidade a autacoides vasoconstritores da circulação umbilical, como 5-HT (GUDE et al., 1993). O componente transiente inicial, da contração induzida por este agente, envolve liberação de cálcio a partir do SR, enquanto que o componente tônico depende do aumento de cálcio extracelular (HILGERS; HIRANO et al., 2003). Nesse contexto, avaliou-se a influência causada pela pré-incubação da concentração

máxima dos nitratos (1 mM de GTN/ 3 mM de NTHF, NCOE ou BIS-NTHF) sobre as contrações induzidas por 10 μ M de 5-HT, na presença do cálcio extracelular.

GTN (Gráfico 33), NTHF (Gráfico 34) e BIS-NTHF (Gráfico 36) atenuaram as contrações induzidas por 5-HT, em anéis de HUA, acima de ~80%. Adicionalmente, GTN e BIS-NTHF também inibiram, acima de ~85%, a contração estimulada por 5-HT em HUV. Em contrapartida, a pré-incubação de NTHF, em HUV, e de NCOE, tanto em HUV (Gráfico 35) quanto em HUA, levaram à inibição de ~30% e ~25%, respectivamente, inferior à resposta inibitória dos outros nitratos. Este efeito pode indicar que GTN e BIS-NTHF atuam diminuindo a atividade dos Ca_v e liberação de cálcio do RS em ambos vasos umbilicais, assim como o NTHF em HUA. Entretanto, a participação desses canais seria menos evidente no efeito de NTHF em HUV e de NCOE nos dois tipos de HUCV. Tais respostas podem ser decorrentes do aumento da disponibilidade de NO, que levaria à diminuição da atividade dos Ca_v e aumento da função dos K_v , também envolvidos na contração induzida por 5-HT.

Estudos evidenciam que 5-HT também contrai vasos umbilicais na ausência do cálcio extracelular (TUFAN et al., 2003). Esse agente promove uma contração fásica, após 2-3 minutos, que se dá a partir da liberação de cálcio dos estoques intracelulares, e uma contração tônica, de 15 a 20 minutos depois, cuja manutenção ocorre a partir da ativação da via da ROCK (SANTOS-SILVA et al., 2010). Desta forma, o mecanismo contrátil de 5-HT, em HUCV, difere no meio com e sem cálcio extracelular. Tal observação faz com que HUCV seja considerado um bom modelo para se avaliar a participação de ROCK na resposta de substâncias vasodilatadoras. A partir dessa informação, foi avaliado o efeito da pré-incubação dos nitratos sobre as contrações induzidas por 5-HT, na ausência do cálcio extracelular.

De maneira semelhante ao observado nos experimentos na presença do cálcio extracelular, GTN (Gráfico 39) e BIS-NTHF (Gráfico 42) inibiram a resposta contrátil de 5-HT em cerca de ~90%, tanto a contração fásica quanto a tônica. Essas contrações também foram atenuadas a partir da pré-incubação de NTHF (Gráfico 40) em HUA e HUV, acima de ~50% e 65%. NCOE (Gráfico 41), por sua vez, inibiu em ~80% a contração tônica e em menos de ~35% a fásica. Estas respostas sugerem que GTN e BIS-NTHF podem levar à diminuição da liberação de cálcio dos estoques

intracelulares, bem como minimizar a atividade da via da ROCK, uma enzima envolvida em disfunção endotelial e várias enfermidades do sistema cardiovascular (TANAKA; NODE, 2015). Estes alvos também estariam envolvidos, numa menor proporção, na resposta de NTHF. Entretanto, a partir do efeito de NCOE pode-se sugerir que há um maior envolvimento da via da ROCK do que dos estoques intracelulares nessa resposta.

Como dito anteriormente, o modo de ação de nitratos orgânicos, de maneira geral, se dá por fornecer NO exógeno, o qual leva ao relaxamento do VSMC, inclusive de HUCV (SANTOS-SILVA; CAIRRÃO; VERDE, 2010). A atividade da ROCK é claramente reduzida a partir de NO exógeno, por meio de um mecanismo que ainda não está totalmente claro, mas que parece envolver mudança conformacional dessa enzima (MARUHASHI et al., 2014; MARUHASHI et al., 2015; TANAKA; NODE, 2015).

O NO exógeno deve compensar o desequilíbrio da síntese de NO, a partir da eNOS, bem como sua sinalização na VSMC danificada. Entretanto, ainda não se sabe se isso acontece por uma ação direta ou indireta do NO. Como a utilização clínica de inibidores seletivos para ROCK ainda é extremamente limitada, a utilização de fármacos disponíveis clinicamente e que atuam inibindo ou modificando a regulação da via da ROCK no sistema cardiovascular, de maneira eficaz e segura, é bastante valioso (KAJIKAWA et al., 2014; SHIMOKAWA; SATOH, 2015; TANAKA; NODE, 2015). Entretanto, é necessário realizar estudos utilizando o inibidor seletivo da ROCK, bem como experimentos que avaliam diretamente os estoques intracelulares, a fim de confirmar essa suposição.

Na gravidez normal, NO contribui para a manutenção do tônus vascular para aumentar o fluxo sanguíneo umbilical (MATSUBARA et al., 2015). O papel desse gás está bem descrito na regulação do tônus dos vasos umbilicais, que ocorre por aumento da vasodilatação dos HUCV durante a gravidez (MYATT et al., 1993; YALLAMPALLI et al., 1994).

O NO, uma vez liberado pelo endotélio vascular ou disponibilizado por compostos doadores, se difunde para as VSMC e reage com o ferro da sGC (JONES; BOLLI, 2006), cuja ativação resulta na produção de cGMP (CARPENTER; SCHOENFISCH, 2012; LOVREN et al., 1999; TANAKA; NODE, 2015). Entretanto, em

HUCV a participação de PKG não é relatada de forma tão clara (SANTOS-SILVA; CAIRRÃO; VERDE, 2010), uma enzima identificada como o principal mecanismo de ação desses compostos (MÜNDEL; STEVEN; DAIBER, 2014). Isto sugere a participação de outros mecanismos independentes dessa proteína cinase (SAUSBIER et al., 2000; SANTOS-SILVA; CAIRRÃO; VERDE, 2010). Por outro lado, a ativação da PKG pela via NO/cGMP pode interferir na ativação da via RhoA/ROCK. Este efeito pode ocorrer porque PKG fosforila a MLCP, ativando-a e impedindo a que a ROCK a fosforile, o que levaria à inibição dessa enzima (GAO et al., 2007).

A partir desse contexto, avaliou-se a participação da sGC na resposta vasorrelaxante induzida pelos nitratos em HUCV, por meio da pré-incubação de 10 μ M de ODQ, antes da contração induzida por 5-HT. Nesta condição experimental, as respostas vasodiladoras de GTN (Gráfico 47 e Gráfico 48), NTHF (Gráfico 49 e Gráfico 50), NCOE (Gráfico 51) e BIS-NTHF (Gráfico 53 e Gráfico 54) foram atenuadas de maneira significativa. Esta redução sugere que a vasodilatação, promovida pelos nitratos em estudo, envolve a ativação da sGC, com provável formação de cGMP. Trata-se de um achado interessante, visto que os estudos que mostraram baixa eficácia de nitrovasodilatadores em relaxarem HUCV atribuem ao fato destes vasos carecerem de sGC ou dos alvos celulares do cGMP (RENOWDEN et al, 1992; BERGH et al, 1995).

Por outro lado, NCOE relaxou anéis de HUV, de maneira semelhante, na presença ou ausência de 10 μ M ODQ (Gráfico 43). Apesar desta resposta, a participação da sGC na vasodilatação mediada por esse nitrato não deve ser descartada, uma vez que estudos reportam que ODQ carece de especificidade por sGC e interfere em outros processos dependentes do grupo heme, como CYP450 (FEELISCH et al., 1999; LOVRE; TRIGGLE, 2000). Entretanto, trata-se de uma suposição que não está clara até o momento.

Vários autores descreveram que a vasodilatação induzida por cGMP é mediada por ativação de canais para potássio em vários leitos vasculares (LI; JIN; CAMPBELL, 1998; WU; CHEN; YEN, 1999), incluindo HUCV (LOVREN; TRIGGLE, 2000). Estes canais desempenham um papel chave no controle do fluxo sanguíneo feto-placentário. (WAREING; GREENWOOD, 2011). Ativadores diretos de canais

para potássio ou compostos que regulem a sua atividade ou a sua expressão devem ter grande interesse terapêutico, pois levam à hiperpolarização de membrana (DUTY; WESTON, 1992; ZHANG; MORICE, 1994), com conseqüente diminuição do influxo de cálcio mediado por Ca_v .

Um exemplo de molécula, que pode atuar ativando BK_{Ca} , é o NO (FÉLÉTOU, 2009), considerado um dos principais fatores relaxantes derivados do endotélio vascular, cuja maioria das ações ocorre no sistema cardiovascular (SCATENA et al., 2010; MILLER; MEGSON, 2007). Estruturalmente, BK_{Ca} são homólogos dos K_v e apresentam um sensor de voltagem e um poro de membrana com domínio (LEE; CUI, 2010).

A investigação da influência dos canais para potássio, no efeito vasodilatador induzido pelos nitratos orgânicos em estudo, foi realizada por meio da pré-incubação de 10 mM de TEA, que nesta concentração atua bloqueando canais para potássio, de maneira não seletiva. A pré-incubação deste bloqueador, em HUA, diminuiu a resposta relaxante de todos os quatro nitratos (Gráfico 56, Gráfico 58, Gráfico 60 e Gráfico 61). Entretanto, a atenuação mais discreta foi observada no efeito de GTN em HUA. Por outro lado, em anéis de HUV pré-incubados com 10 mM de TEA, a resposta de GTN não foi alterada (Gráfico 55), enquanto o efeito de NTHF (Gráfico 57) e NCOE (Gráfico 59) foram potencializadas.

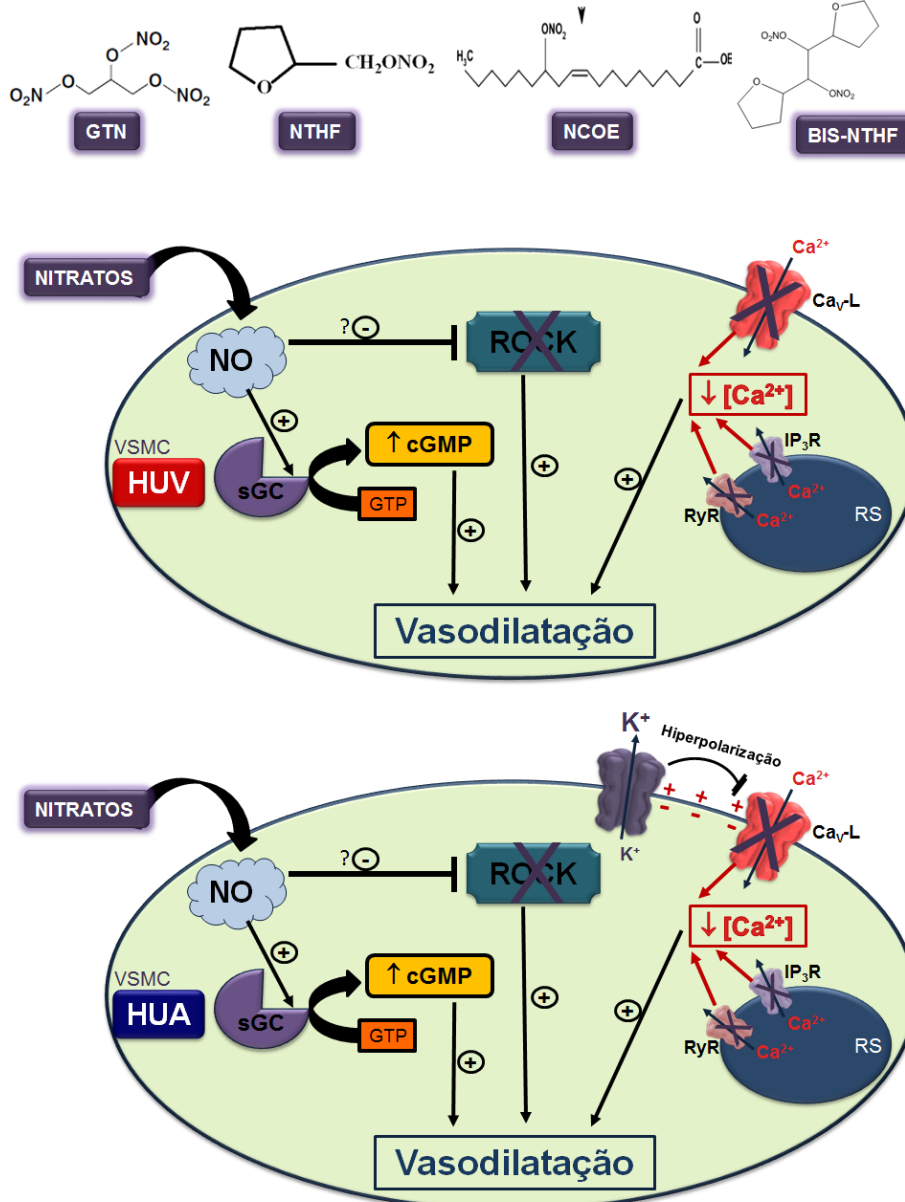
O efeito vasorrelaxante de cGMP, mediado por esses canais, pode ser baixo em HUCV, uma vez que estes vasos contraídos com 5-HT ou KCl bloqueiam K_v (SANTOS-SILVA; CAIRRÃO; VERDE, 2010). Adicionalmente, o bloqueio de K_{ATP} está relacionado à diminuição da corrente de potássio transmembranar, com conseqüente liberação de cálcio dos estoques intracelulares (TUFAN et al., 2003).

Os resultados obtidos na presença de TEA, sugerem que canais para potássio estão envolvidos na resposta vasorrelaxante dos nitratos em HUA, mas que, provavelmente, não participam da vasodilatação desses compostos em HUV.

A partir do que foi exposto, o desenvolvimento desse estudo demonstrou que todos os nitratos levam à vasodilatação, tanto de anéis HUV quanto de HUA, no tônus basal, pré-contraídos com 5-HT ou com KCl. O mecanismo de ação vasodilatador dos nitratos, em HUA, parece envolver ativação da enzima sGC e de canais para potássio,

embora em HUV não tenha sido evidenciado a participação destes canais. Adicionalmente, os nitratos diminuem contrações induzidas por 5-HT, na presença ou ausência do cálcio extracelular, um efeito que sugere o envolvimento de Cav, estoques intracelulares de cálcio e da via da ROCK (Figura 21).

Figura 21 – Efeito dos Nitratos GTN, NTHF, NCOE e BIS-NTHF sobre HUCVs



Ca_v-L: Canais de cálcio sensíveis a voltagem tipo-L; **GTP:** trifosfato de guanosina; **cGMP:** Monofosfato de guanosina cíclico; **HUA:** Arteria Umbilical Humana; **HUV:** Veia Umbilical Humana; **IP₃R:** Receptor de IP₃; **RS:** Retículo Sarcoplasmático; **RyR:** Receptor de Rianodina; **NO:** óxido nítrico; **sGC:** ciclase de guanilil solúvel; **RS:** Retículo Sarcoplasmático; **VSMC:** Célula da musculatura lisa vascular.

Fonte: ALUSTAU-FERNANDES, 2015

Com a bioprospecção dos novos papéis fisiológicos para o NO, a descoberta de fármacos novas mais potentes e seletivas é um fator almejado pela química medicinal do NO, a qual gera a perspectiva de que estas estejam disponíveis no mercado em um curto prazo de tempo (BARRETO; CORREIA, 2005). Desta forma, o estudo com nitratos que não promovam tolerância, como NTHF e NCOE, ou que sejam potentes, como GTN e BIS-NTHF é de extrema relevância. Adicionalmente, os três novos nitratos orgânicos são compostos obtidos de fontes abundantes, o que mostra, também, a importância da química sintética aliada aos produtos naturais.

No contexto apresentado, também deve ser considerado o fato de que há uma diminuição da atividade da via NO/GMPc na pré-eclampsia e, por isso, é relatado que a utilização de doadores de NO pode ser considerada uma abordagem farmacológica potencial nesta condição clínica (JOHAL et al., 2013; MAUL et al., 2003). Alguns estudos mostram que nitratos orgânicos podem ser úteis para diminuir a resistência do fluxo sanguíneo para a placenta e em melhorar o fluxo sanguíneo útero-placentária (KALINDINDI et al., 2012; FRANÇA-SILVA et al., 2014), uma característica a qual pode-se pensar em possíveis aplicações clínicas dos compostos estudados.

O presente estudo é de extrema relevância, pois, além de caracterizar o efeito de quatro nitratos orgânicos, também é pioneiro no Brasil, por utilizar HUCV para reatividade de substâncias vasoativas, e descrever as principais vantagens e desvantagens da utilização destes vasos sanguíneos. Adicionalmente, o fato de implantar uma técnica que envolve vasos humanos, em um custo baixo, pode ser uma alternativa não só de modelo humano, mas também como opção frente aos vasos animais.

Conclusão



6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- ❖ Os vasos umbilicais devem ser submetidos à tensão de 3 g durante 3 h para estabilização dos seus parâmetros;
- ❖ Tanto HUA como HUV apresentam relaxamento espontâneo do tônus basal e do tônus contrátil, principalmente, nos 20 primeiros minutos de experimento;
- ❖ GTN, NTHF, NCOE e BIS-TNHF promovem relaxamento do tônus basal e em anéis pré-contraídos com 5-HT e KCl 60 mM;
- ❖ Todos os nitratos causam vasodilatação em HUCV, de maneira semelhante, mas com uma maior eficácia em relaxar HUA do que HUV;
- ❖ GTN é o nitrato mais potente, seguido do BIS-NTHF, enquanto NCOE e NTHF são os menos potentes em HUV e HUA, respectivamente;
- ❖ As respostas dos nitratos não são idênticas entre eles;
- ❖ Há diferença no perfil de resposta de HUA e HUV;
- ❖ sGC e canais para potássio parecem estar envolvidos na vasodilatação induzida por nitratos em HUA, embora em HUV, provavelmente, esses canais não participam da resposta relaxante;
- ❖ Os nitratos diminuem a resposta contrátil de 5-HT, possivelmente, por diminuírem: entrada de cálcio extracelular, via Ca_v ; liberação de cálcio do RS; e atividade da via da ROCK.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABOUSLEIMAN, R. I.; REYES, Y.; MCFETRIDGE, P.; SIKAVITSAS, V. The human umbilical vein: a novel scaffold for musculoskeletal soft tissue regeneration. **Artificial Organs**, v. 32(9), p. 735-742, 2008.
- ABRAMS, J. Beneficial actions of nitrates in cardiovascular disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 77, n. 13, p. C31-C37, 1996.
- AHLNER, J.; AXELSSON, K. L.; LJUSEGREN, M. E.; GRUNDSTRÖM, N.; ANDERSSON, R. G. Demonstration of a high affinity component of glyceryl trinitrate induced vasodilatation in the bovine mesenteric artery. **Journal of Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research**, v. 11(6), p. 445-456, 1986.
- ALDERTON, W. K.; ANGELL, A. D. R.; CRAIG, C.; DAWSON, J.; GARVEY, E.; MONCADA, S.; MONKHOUSE, J.; REES, D.; RUSSELL, L. J.; RUSSELL, R. J.; SCHWARTZ, S.; WASLIDGE, N.; KNOWLES, R. G. GW274150 and GW273629 are potent and highly selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **British Journal of Pharmacology**, 145, 301-312, 2005.
- AL-SA'DONI, H. H.; FERRO, A. Current Status and Future Possibilities of Nitric Oxide-Donor Drugs: Focus on S-Nitrosothiols. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5(3), p. 247-254, 2005.
- ALTHOFF, T. F.; OFFERMANN, S. G-protein-mediated signaling in vascular smooth muscle cells — implications for vascular disease. **Journal of Molecular Medicine**, 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00109-015-1305-z>. Acesso em julho de 2015.
- ALUSTAU, Maria do Carmo (2010) **Envolvimento da via do óxido nítrico na resposta vasodilatadora induzida pelo nitrato tetra-hidrofurfurílico (NTHF) em artéria mesentérica superior de ratos**. 2010, 99f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – UFPB, 2010.
- ALTURA, B. M.; MALAVIYA, D.; REICH, C. F.; ORKIN, L. R. Effects of vasoactive agents on isolated human umbilical arteries and veins. **American Journal of Physiology**, v. 222, n. 2, 1972.
- AMANO, M.; FUKATA, Y.; KAIBUCHI, K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. **Experimental Cell Research**, v. 261, p. 44-51, 2000.
- AMANO, M.; ITO, M.; KIMURA, K.; FUKATA, Y.; CHIHARA, K.; NAKANO, T.; MATSUURA, Y.; KAIBUCHI, K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, nº 34, p. 20246–20249, 1996.

AMBERG, G. C.; NAVEDO, M. F. Calcium dynamics in vascular smooth muscle. **Microcirculation**, v. 20(4), p. 281-289, 2013.

ANDRE, G. LOIRAND, G.; SAUZEAU, V. Smooth muscle specific Rac1 deficiency induces hypertension by over activation of Rhoa/Rho-kinase signaling pathway. **Circulation**, v. 130, p. A18529, 2014.

ANTMAN, E. M.; ANBE, D. T.; ARMSTRONG, P. W.; BATES, E. R.; GREEN, L. A.; HAND, M.; HOCKMAN, J. S.; KRUMHOLZ, H. M.; KUSHNER, F. G.; LAMAS, G. A.; MULLANY, C. J.; OMATO, J. P.; PEARLE, D. L.; SLOAN, L. A.; SMITH, S. C. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of patients with acute myocardial infarction). **Journal of the American College of Cardiology**, v. 44, n. 3, p. 671-719, 2004.

ARAÚJO, Islania Giselia de Araújo. **Efeitos Hipotensor e Vasorrelaxante do Óleo Essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seu Constituinte Principal Timol: Envolvimento do Bloqueio de Canais para Cálcio**. 2011, 157f, Tese (Doutorado em Farmacologia) – Pós-graduação em Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2011.

ARNOLD, W. P.; LONGNECKER, D. E.; EPSTEIN, R. M. Photodegradation of sodium nitroprusside: biologic activity and cyanide release. **Anesthesiology**, v. 61, n. 3, p. 254-260, 1984.

ATHAYDE-FILHO, P. F.; BOTELHO, J. R.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; SANTOS, A. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MILLER, J.; LIRA, B. F. Otimização do processo de obtenção do nitrato de tetraidrofurfurila – um ótimo corretor do atraso de ignição e reforçador de cetanagem para motores do ciclo diesel. **Biodiesel**, v. [S.I.], p. 38-42, [S.I.].

AZAM, M. A.; YOSHIOKA, K.; OHKURA, S.; TAKUWA, N.; SUGIMOTO, N.; SATO, K.; TAKUWA, Y. Ca²-independent, inhibitory effects of cyclic adenosine 5'-monophosphate on ca² regulation of phosphoinositide 3-kinase c2, rho, and myosin phosphatase in vascular smooth muscle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, n. 2 p. 907-916, 2007.

BALLIGAND, J. L.; KELLY, R. A.; MARSDEN, P. A.; SMITH, T. W.; MICHEL, T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 90, p. 347-351, 1993.

BANIK, R. K.; BERGER, J. S. Peripheral vasodilators. **Essential of Pharmacology for Anesthesia, Pain Medicine and Critical Care**, p. 257-273, 2014.

- BARBIERI, C.; CECATTI, J. G.; SURITA, F. G.; COSTA, M. L.; MARUSSI, E. F.; COSTA, J. V. Area of Wharton's jelly as an estimate of the thickness of the umbilical cord and its relationship with estimated fetal weight. **Reproductive Health**, v. 8(32), p. 2-6, 2011.
- BARISKANER, H.; TUNCER, S.; TANER, A.; DOGAN, N. Effects of bupivacaine and ropivacaine on the isolated human umbilical artery. **International Journal of Obstetric Anesthesia**, v. 12, p. 261-265, 2003.
- BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Química Nova*, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v. 271, p. C1424–1437, 1996.
- BELFORT, M. A.; SAADE, G. R.; SURESH, M.; JOHNSON, D; VEDERNIKOV, Y.P. Human umbilical vessels: responses to agents frequently used in obstetric patients. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 172, p. 1395-1403, 1995.
- BELLOTTI, M.; PENNATI, G.; GASPERI, C.; BATTAGLIA, F. C.; FERRAZZI, E. Role of ductus venosus in distribution of umbilical blood flow in human fetuses during second half of pregnancy. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, p. H1256–H1263, 2000.
- BENIRSCHKE, K.; BURTON, G. J.; BAERGEN, R. N. Anatomy and pathology of the umbilical cord. **Pathology of the Human Placenta**, p. 309-375, 2012.
- BERGH, C. M.; BROPHY, C. M.; DRANSFIELD, D. T.; LINCOLN, T.; GOLDENRING, J. R.; RASMUSSEN, H. Impaired cyclic nucleotide-dependent vasorelaxation in human umbilical artery smooth muscle. **American Journal of Physiology**, v. 286, p. H202-H212, 1995.
- BINBIR, B.; YENIEL, A. O.; ERGENOGLU, A. M.; KAZANDI, M.; AKERCAN, F.; SAGOL, S. The role of umbilical cord thickness and HbA1c levels for the prediction of fetal macrosomia in patients with gestational diabetes mellitus. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 285(1), p. 635-639, 2012.
- BODE-BÖGER, S. M.; KOJDA, G. Organic nitrates in cardiovascular disease. **Cell Molecular Biology**, v. 51, p. 307–320, 2005.
- BOERSMA, J. I.; JANZEN, K. M.; OLIVEIRA, L.; CRANKSHAW, D. J. Characterization of excitatory prostanoid receptors in the human umbilical artery *in vitro*. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 1505-1512, 1999.

BOGONI, G.; RIZZI, A.; CALO, G.; CAMPOBASSO, C.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; REGOLI, D. Characterization of endothelin receptors in the human umbilical artery and vein. *British Journal of Pharmacology*, v. 119, p. 1600-1604, 1996.

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: Biology and Chemistry**, v. 15, p. 387-394, 2006.

BOURA, L. A.; WALTERS, W. A. W.; READ, M. A.; LEITCH, I. M. Autacoids and control of human placental blood flow. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 21, p. 131-148, 1994.

BRASIL. Lei 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 – **Lei de Crimes Ambientais**.

BRASIL. Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008 – **Lei Arouca: Estabelece procedimentos para uso científico de animais**.

BRASIL. Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde - **diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos**.

BRAUNWALD, E.; ANTMAN, E. M.; BEASLEY, J. W.; CALIFF, R. M.; CHEITLIN, M. D.; HOCHMAN, J. S.; JONES, R. H.; KEREIAKES, D.; KUPERSMITH, J.; LEVIN, T. N.; PEPINE, C. J.; SCHAEFFER, J. W.; SMITH, E. E.; STEWARD, D. E.; THEROUX, P.; GIBBONS, R. J.; ANTMAN, E. M.; ALPERT, J. S.; FAXON, D. P.; FUSTER, V.; GREGORATOS, G.; HIRATZKA, L. F.; JACOBS, A. K.; SMITH, S. C. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). **Circulation**, v. 106, p. 1893-1900, 2002.

BRIEN, J. F.; McLAUGHLIN, B. E.; BREEDON, T. H.; BENNETT, B. M.; NAKATSU, k.; MARKS, G. S. Biotransformation of glyceryl trinitrate occurs concurrently with relaxation of rabbit aorta. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 237, n. 2, 1986.

BRUNTON, T. L. On the use of nitrite of amyl in angina pectoris. **Lancet**, v. 2, p. 97, 1867.

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

BUTLER, A. R.; MEGSON, I. L. Non-heme iron nitrosyls in biology. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 4, p. 1155-1166, 2002.

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

CAIRRÃO, E.; ALVAREZ, E.; SANTOS-SILVA, A. J.; VERDE, I. Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 376, p. 375-383, 2008.

CAIRRÃO, E.; SANTOS-SILVA, A. J.; ALVAREZ, E.; CORREIA, I.; VERDE, I. Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels. **In Vitro Cellular and Developmental Biology. Animal**, v. 45, p. 175-184, 2009.

CAIRRÃO, E.; SANTOS-SILVA, A. J.; VERDE, I. PKG is involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 640, p. 94-101, 2010.

CARPENTER, A. W.; SCHOENFISCH, M. H. Nitric Oxide Release Part II. Therapeutic Applications. **Chemical Society Review**, v. 21; 41(10), p. 3742-3752, 2012.

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.

CARY, S. P.; WINGER, J. A.; DERBYSHIRE, E. R.; MARLETTA, M. A. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31(4), p. 231-239, 2006.

CHAUDHURI, G.; BUGA, G. M.; GOLD, M. E.; WOOD, K. S.; IGNARRO, L. J. Characterization and actions of human umbilical endothelium derived relaxing factor. **British Journal Pharmacology**, v. 102, p. 331-336, 1991.

CHEN, Z.; ZHANG, J.; STAMLER, J. S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 99, n. 12, p. 8306-8311, 2002.

CHERFILS, J.; ZEGHOUF, M. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. **Physiological Reviews**, v. 93 n. 1, p. 269-309, 2013.

CHISTIYAKOV, D. A.; OREKHOV, A. N.; BOBRYSEV, Y. V. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. **Acta Physiologica**, v. 214 (1), p. 33-50, 2015.

CHUNG, S. J.; FUNG, H. L. Identification of the subcellular site for nitroglycerin metabolism to nitric oxide in bovine coronary smooth muscle cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 253, n. 2, p. 614-619, 1990.

CRANE, M. S.; ROSSI, A. G.; MEGSON, I. L. A potential role for extracellular nitric oxide generation in cGMP-independent inhibition of human platelet aggregation: biochemical and pharmacological considerations. **British Journal Pharmacology**, v. 144, p. 849-859, 2005.

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.; SCHUHMACHER, S.; JANSEN, T.; MÜNZEL, T. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) - maker of and marker for nitrate tolerance in response to nitroglycerin treatment. **Chemical-Biological Interactions**, v. 178, p. 40-47, 2009.

DANIEL, J.; ABE, K.; McFETRIDGE, P. S. Development of the human umbilical vein scaffold for cardiovascular tissue engineering applications. **Asaio Journal (American Society for Artificial Internal Organs)**, v. 51, n. 3, p. 252-261., 2005.

DUTY, S.; WESTON, A. H. Characteristics of the contractile response of rabbit aorta produced by cromakalim in calcium-free solution. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, p. 1198-204, 1992.

ERRASTI, A. E.; DEL-REY, G.; CESIO, C. E.; SOUZA, G.; NOWAK, W.; PELOROSSO, F. G.; DARAY, F. M.; ROTHLIN, R. P.; Expression and functional evidence of the prostaglandin F_{2α} receptor mediating contraction in human umbilical vein. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, p. 68-74, 2009.

ERRASTI, A. E.; VELO, M. P. R.; TORRES, R. M.; SARDI, S. P.; ROTHLIN, R. P. Characterization of α1-adrenoceptor subtypes mediating vasoconstriction in human umbilical vein. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, p. 437-442, 1999.

FAMELI, N.; van BREEMEN, C. The role of cytoplasmic nanospaces in smooth muscle cell Ca²⁺ signalling. **Protoplasma**, v. 249 (Suppl 1), p. S39–S48, 2012.

FARIVAR, S.; MOHAMADZADE, Z.; SHIARI, R.; FAHIMZAD, A. Neural differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells by cerebrospinal fluid. **Iran Journal of Child Neurology**, v. 9(1), p. 87-93, 2015.

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

FEELISCH, M.; KOTSONIS, P.; SIEBE, J.; CLEMENT, B.; SCHMIDT, H. H. H. W. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3,-a]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. **Molecular Pharmacology**, v. 56, p. 243-253, 1999.

FEI, J. Q.; ZHOU, H. B.; SHEN, Y. L.; CHEN, X. Z.; WANG, L. L. A comparison study on the responses of umbilical arteries and thoracic aorts to the adrenergic receptor agonists. **Cell Biology International**, v. 32, p. S55, 2008.

FEIGIN, V. L.; FOROUZANFAR, M. H.; KRISHNAMURTHI, R.; MENSAH, G. A.; CONNOR, M.; BENNETT, D. A.; MORAN, A. E.; SACCO, R. L.; ANDERSON, L.; TRUELSEN, T.; O'DONNELL, M.; VENKETASUBRAMANIAN, N.; BARKER-COLLO, S.; LAWES, C. M. M.; WANG, W.; SHINOHARA, Y.; WITT, E.; EZZATI, M.; NAGHAVI, M. Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 383, p. 245-255, 2014.

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

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). **American Journal of Physiology: Heart and Circulation Physiology**, v. 291, n. 3, p. H985-H1002, 2006.

FENG, J.; ITO, M.; ICHIKAWA, K.; ISAKA, N.; NISHIKAWA, M.; HARTSHORNE, D. J.; NAKANO, T. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n° 52, p. 37385-37390, 1999.

FERREIRA, J. C. B.; MOCHLY-ROSEN, D. Nitroglycerin use in myocardial infarction patients: risks and benefits. **Circulation Journal**, v. 76(1), p. 15–21, 2012.

FERGUSON, V. L.; DODSON, R. B. Bioengineering aspects of the umbilical Cord. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 144(1), p. 108-113, 2009.

FERRARI, B. G. **Experimentação animal: aspectos históricos, éticos, legais e o direito à objeção de consciência**. 2004, 111f, Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia de Direito) – Faculdade de Direito de Bauru, Bauru, 2004.

FILIZ, A. A.; RAHIME, B.; KESKIN, L. H.; ESRA, A. K. Positive correlation between the quantity of Wharton's jelly in the umbilical cord and birth weight. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 50(1), p. 33-36, 2011.

FLIERL, U.; FRACCAROLLO, D.; WIDDER, J. D.; MICKA, J.; NEUSER, J.; BAUERSACHS, J.; SCHÄFER, A. The Nitric Oxide Donor Pentaerythritol Tetranitrate Reduces Platelet Activation in Congestive Heart Failure. **PLoS ONE**, v. 10(4), 2015.

FOX, S. B.; KHONG, T.Y. Lack of innervation of human umbilical cord. An immunohistological and histochemical study. **Placenta**, v. 11 (1), p. 59–62, 1990.

FRANÇA-SILVA, M. S.; BALARINI, C. M.; CRUZ, J. C.; KHAN, B. A.; RAMPELOTTO, P. H.; BRAGA, V. A. Organic nitrates: past, present and future. **Molecules**, v. 24:19(9), p. 15314-15323, 2014.

FRANCIS, S. H.; BUSCH, J. L.; CORBIN, J. D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacological Reviews**, v. 62, nº 3, p. 525-563, 2010.

FREEDMAN, J. E.; SAUTER, R.; BATTINELLI, E. M.; AULT, K.; KNOWLES, C.; HUANG, P. L.; LOSCALZO, J. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. **Circulation Research**, v. 84, p. 1416-1421, 1999.

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

FURTADO, F. F. **Efeitos cardiovasculares induzidos por um novo doador de óxido nítrico, o nitrato tetra-hidrofurfurílico (NTHF), em ratos**. 2013, 137f, Tese (Doutorado em Farmacologia) – Pós-graduação em Produtos Naturais e/ou Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2013.

GAO, Y.; PORTUGAL, A. D.; NEGASH, S.; ZHOU, W.; LONGO, L. D.; USHA, R. J. Role of Rho kinases in PKG mediated relaxation of pulmonary arteries of fetal lambs exposed to chronic high altitude hypoxia. **American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 292, p. L678-84, 2007.

GARG, U.C.; HASSID, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 83, n. 5, p. 1774-1777, 1989.

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.

GOODWIN, J. W. The impact of the umbilical circulation on the fetus. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 100, p. 461-471, 1968.

GROSSI, L.; D'ANGELO, S. Sodium nitroprusside: Mechanism of NO release mediated by sulfhydryl-containing molecules. **Journal of Medicine Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2622-2626, 2005.

GRUNEWALD, C.; KUBLICKAS, M.; CARLSTRÖM, K.; LUNELL, N. O.; NISELL, H. Effects of nitroglycerin on the uterine and umbilical circulation in severe preeclampsia. **Obstetrics & Gynecology**, - v. 86 (4), 1995.

GRYGLEWSKI, R. J.; MONCADA, S.; PALMER, R. M. Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 87, n. 4, p. 685-694, 1986.

GUDE, N. M.; XIE, C. Y.; KING, R. G.; BRENNECKE, S. P.; READ, M. A.; BOURA, A. L. A.; WALTERS, W. A. W. Effects of eicosanoid and endothelial cell derived relaxing factor inhibition on fetal vascular tone and responsiveness in the human perfused placenta. **Nophoblast Research**, v. 7, p. 133-145, 1993

GUPTA, S.; HANFF, L. M.; VISSER, W.; STEEGERS, E. A. P.; SAXENA, P. R.; VULTO, A. G.; MAASSEN VAN DEN BRINK, A. Functional reactivity of 5-HT receptors in human umbilical cord and maternal subcutaneous fat arteries after normotensive or pre-eclamptic pregnancy. **Journal of Hypertension**, v. 24, p. 1345-1353, 2006.

GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilatation. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 242-251, 1994.

HALL, J.; JONES, T. H.; CHANNER, K. S.; JONES, R. D. Mechanisms of agonist-induced constriction in isolated human mesenteric arteries. **Vascular Pharmacology**, v. 44, p. 427-433, 2006.

HE, G. W.; ROSENFELDT, F. L.; BUXTON, B. F.; ANGUS, J. A. Reactivity of human isolated internal mammary artery to constrictor and dilator agents. Implications for treatment of internal mammary artery spasm. **Circulation**, v. 80(3), p. 1141-50, 1989.

HILGERS, R. H.; WEBB, R. C. Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: Focus on Rho. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, v. 230, p. 829-835, 2005.

HILL, M. A.; YANG, Y.; ELLA, S. R.; DAVIS, M. J.; BRAUN, A. P. Large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channels (BKCa) and arteriolar myogenic signaling. **FEBS Letters**, v. 584, p. 2033-2042, 2010.

HIRANO, K.; DERKACH, D. N.; HIRANO, M.; NISHIMURA, J.; KANAIDE, H. Protein kinase network in the regulation of phosphorylation and dephosphorylation of smooth muscle myosin light chain. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 248, p. 105-114, 2003.

HOENICKA, M.; JACOBS, V. R.; HUBER, G.; SCHMID, F. X.; BIRNBAUM, D. E. Advantages of human umbilical vein scaffolds derived from cesarean section vs. vaginal delivery for vascular tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, p. 1075-1084, 2008.

HU, X. Q.; XIAO, D.; ZHU, R.; HUANG, X.; YANG, S.; WILSON, S.; ZHANG, L. Pregnancy upregulates large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel activity and attenuates myogenic tone in uterine arteries. **Hypertension**, v. 58(6), p. 1132-1139, 2011.

IACHINI-BELLISARII, F.; RADICO, F.; MUSCENTE, F.; HOROWITZ, J.; DE CATERINA, R. Nitrates and other nitric oxide donors in cardiology - Current Positioning and Perspectives. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 26, p. 55-69, 2012.

IGNARRO, L. J.; FUKUTO, J. M.; GRISCAVAGE, J. M.; ROGERS, N. E.; BYRNS, R. E. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 90, p. 8103-8107, 1993.

IGNARRO, L. J.; GRUETTER, C. S. Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite possible involvement of S-nitrosothiols. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General**, v. 631(2), p. 221-231, 1980.

IHARA, E.; MacDONALD, J. A. The regulation of smooth muscle contractility by zipper-interacting protein kinase. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 85(1), p. 79-87, 2007.

INAGAMI, T.; NARUSE, M.; HOOVER, R. Endothelium as an endocrine organ. **Annuals Reviews of Physiology**, v. 57, p. 171-189, 1995.

INGELFINGER, J. R. Experimental models of hypertension and their relevance to human hypertension. **Pediatric Hypertension: Clinical Hypertension and Vascular Diseases**, p 121-128, 2013

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

IZUMI, H.; GARFIELD, R. E.; MAKINO, Y.; SHIRAKAWA, K.; ITOH, T. Gestational changes in endothelium-dependent vasorelaxation in human umbilical artery. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 170 (1), p. 236-245, 1994.

JABS, A.; OELZE, M.; MIKHED, Y.; STAMM, P.; KRÖLLER-SCHÖN, S.; WELSCHOF, P.; JANSEN, T.; HAUSDING, M.; KOPP, M.; STEVEN, S.; SCHULZ, E.; STASCH, J. P.; MÜNZEL, T.; DAIBE, A. Effect of soluble guanylyl cyclase activator and stimulator therapy on nitroglycerin-induced nitrate tolerance in rats. **Vascular Pharmacology**, 2015. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1537189115000452#>> Acesso em julho de 2015

JACKSON, R. E.; BELLAMY, M. C. Antihypertensive drugs. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, *Advance Access published 14 January*, 2015.

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

JACKSON, W. F. Potassium channels in the peripheral microcirculation. **Microcirculation**, v. 12, p. 113-127, 2005.

JACOBS, V. R.; NIEMEYER, M.; GOTTSCHALK, N.; SCHNEIDER, K. T. M.; KIECHLE, M.; OOSTENDORP, R. A. J. The STEMMAT project as part of the health initiative BayernAktiv: adult stem cells from umbilical cord and cord blood as alternative to embryonic stem cell research. **Zentralblatt Gynäkologie**, v. 127, n. 6, p. 368–372, 2005.

JEREMY, J. Y.; ROWE, D.; EMSLEY, A. M.; NEWBY, A. C. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. **Cardiovascular Research**, v.43, n. 3, p. 580-594, 1999.

JOHAL, T.; LEES, C. C.; EVERETT, T. R.; WILKINSON, I. B. The nitric oxide pathway and possible therapeutic options in pre-eclampsia. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78 (2), p. 244-257, 2013.

JONES, S. P.; BOLLI, R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 40, p. 16-23, 2006.

KÄHLER, C.; SCHLEUßNER, E.; MÖLLER, A.; SEEWALD, H. J. Nitric oxide donors: effects on fetoplacental blood flow. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 115, p. 10-14, 2004.

KÄHLER, C.; SCHLEUßNER, E.; MÖLLER, A.; SEEWALD, H. J. The effect of nitric oxide on uterine and umbilical artery flow velocity waveform in pre-eclampsia. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 73, p. J139-143, 1997.

KAJIKAWA, M.; NOMA, K.; MARUHASHI, T.; MIKAMI, S.; IWAMOTO, Y.; IWAMOTO, A.; MATSUMOTO, T.; HIDAKA, T.; KIHARA, Y.; CHAYAMA, K.; NAKASHIMA, A.; GOTO, C.; LIAO, J. K.; HIGASHI, Y. Rho-associated kinase activity is a predictor of cardiovascular outcomes. **Hypertension**, v. 63, p. 856-864, 2014.

KALIDINDI, M.; VELAUTHAR, L.; KHAN, K.; AQUILINA, J. The role of nitrates in the prevention of preeclampsia: An update. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, v. 24, p. 361–367, 2012.

KANEKO-KAWANO, T.; TAKASU, F.; NAOKI, H.; SAKIMURA, Y.; ISHII, S.; UEBA, T.; EIYAMA, A.; OKADA, A.; KAWANO, Y.; SUZUKI, K. Dynamic regulation of myosin light chain phosphorylation by Rho-kinase. **PLoS On line**, v. 7 (6), 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0039269>> Acesso em julho de 2015.

KARAKI, H.; SATO, K.; OZAKI, H. Different effects of verapamil on cytosolic Ca²⁺ and contraction in norepinephrine-stimulated vascular smooth muscle. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 55, p. 35-42, 1991.

KARCZEWSKI, P.; KELM, M.; HARTMANN, M.; SCHRADER, J. Role of phospholamban in NO/EDRF-induced relaxation in rat aorta. **Life Sciences**, v. 51, n. 15, p. 1205-1210, 1992.

KARLSSON, C.; BODELSSON, G.; BODELSSON, M.; STJERNQUIST, M. Characterization of 5-hydroxytryptamine receptors mediating circular smooth muscle contraction in the human umbilical artery. **Gynecologic and Obstetrics Investigation**, v. 47, n. 2, p. 102-107, 1999.

KHAN, S. A.; HIGDON, N. R.; MEISHERI, H. Coronary vasorelaxation by nitroglycerin: involvement of plasmalemmal calcium-activated K channels and intracellular Ca stores. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 284, n. 3, p. 838–846, 1998.

KHAN, S. A.; MATHEWS, W. R.; MEISHERI, K. D. Role of calcium-activated K channels in vasodilation induced by nitroglycerine, acetylcholine and nitric oxide. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 267, n. 3, p. 1327-1335, 1998.

KIM, D. W.; STAPLES, M.; SHINOZUKA, K.; PANTCHEVA, P.; KANG, S. D. BORLONGAN, C. V. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, p. 11692-11712, 2013.

KIM, D.; RYBALKIN, S. D; PI, X.; WANG, Y.; ZHANG, C.; MUNZEL, T.; BEAVO, J. A.; BERK, B. C.; YAN, C. Upregulation of phosphodiesterase 1A1 expression is associated with the development of nitrate tolerance. **Circulation**, v. 104, p. 2338-2343, 2001.

KIMURA, K.; ITO, M.; AMANO, M.; CHIHARA, K.; FUKATA, Y.; NAKAFUKU, M.; YAMAMORI, B.; FENG, J.; NAKANO, T.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; KAIBUCHI, K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated

kinase (Rho-Kinase). **Science**, v. 273, nº 5272, p. 245-248, 1996.

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

KLESCHYOV, A. L.; OELZE, M.; DAIBER, A.; HUANG, Y.; MOLLNAU, H.; SCHULZ, E.; SYDOW, K.; FICHTLSCHERER, B.; MÜLSCH, A.; MÜNZEL, T. Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin? **Circulation Research**, v. 93, p. e104-12, 2003.

KNOT, H. J.; ZIMMERMANN, P. A.; NELSON, M. T. Extracellular K⁺-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K⁺ channels. **The Journal Physiology**, v. 492, p. 419-430, 1996.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **The Biochemical Journal**, v. 298, p. 249-258, 1994.

KO, E. A.; HAN, J.; JUNG, I. D.; PARK, W. S. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, n. 2, p. 65-81, 2008.

KOROVKINA, V.P.; ENGLAND, S.K. Molecular diversity of vascular potassium channel isoforms. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, p. 317-323, 2002.

KRUM, H.; SOBOTKA, P.; MAHFOUD, F.; BÖHM, M.; ESLER, M.; SCHLAICH, M. Device-based antihypertensive therapy therapeutic modulation of the autonomic nervous system. **Circulation**, v. 123, p. 209-215, 2011.

KUMAR, R.; SINGH, V. P.; BAKER, K. M. Kinase inhibitors for cardiovascular diseases. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 73, p. 199-207, 2007.

KUREISHI, Y.; KOBAYASHI, S.; AMANO, M.; KIMURA, K.; KANAIDE, H.; NAKANO, T.; KAIBUCHI, K.; ITO, M. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 12257-12260, 1997.

KURZ, M. A.; BOYER, T. D.; WHALEN, R.; PETERSON, T. E.; HARRISON, D. G. Nitroglycerin metabolism in vascular tissue: role of glutathione-S-transferases and relationship between NO⁻ and NO₂⁻ formation. **Biochemical Journal**, v. 292, p. 545-550, 1993.

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

LEE, U. S.; CUI, J. BK channel activation: structural and functional insights. **Trends in Neurosciences**, v. 33, p. 415-423, 2010.

LEREIS, V. A. P.; HITA, F. J.; GOBBI, M. D.; VERDI, M. G.; RODRIGUEZ, M. C.; ROTHLIN, R. P. Pharmacological characterization of muscarinic receptor subtypes mediating vasoconstriction of human umbilical vein. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 516-523, 2006.

LEUNG, S. W.; QUAN, A.; LAO, T. T.; MAN, R. Y. Efficacy of different vasodilators on human umbilical arterial smooth muscle under normal and reduced oxygen conditions. **Early Human Development**, v. 82, p. 457-462, 2006.

LI, P. L.; JIN, M. W.; CAMPBELL, W. B. Effect of selective inhibition of soluble guanylyl cyclase on the KCa channel activity in coronary artery smooth muscle. **Hypertension**, v. 31, p. 303-308, 1998.

LI, W. C.; RUAN, X. Z.; ZHANG, H. M.; ZENG, Y. J. Biomechanical properties of different segments of human umbilical cord vein and its value for clinical application. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 76, n 1, p. 93-97, 2006.

LI, W. C.; ZHANG, H. M.; WANG, P. J.; XI, G. M.; WANG, H. Q.; CHEN, Y.; DENG, Z. H.; ZHANG, Z. H.; HUANG, T. Z. Quantitative analysis of the microstructure of human umbilical vein for assessing feasibility as vessel substitute. **Annals of Vascular Surgery**, v. 22, n. 3, 2008.

LOHSE, M. J.; FORTEMANN, U.; SCHMITT, H. Pharmacology of NO: cGMP signal transduction. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, p. 111-112, 1998.

LOVREN, F.; LI, X. F.; LYTTON, J.; TRIGGLE, C. Functional characterization and m-RNA expression of 5-HT receptors mediating contraction in human umbilical artery. **British Journal of Pharmacology**, 127, 1247-55, 1999.

LOVREN, F.; TRIGGLE, C. Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, p. 521 ± 529, 2000.

LOZANO, R. *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, p. 2095-2128, 2012.

MACHADO, N. T.; MACIEL, P. M. P.; ALUSTAU, M. C.; QUEIROZ, T. M.; FURTADO, F. F.; ASSIS, V. L.; VERAS, R. C.; ARAÚJO, I. G. A.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; MEDEIROS, I. A. Nitric oxide as a target for the hypotensive and vasorelaxing effects induced by (Z)-ethyl 12-nitrooxy-octadec-9-enoate in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, p. 317–325, 2014.

MacLELLAN, W. R.; WANG, Y.; LUSIS, A. J. Systems-based approaches to cardiovascular disease. **Nature Reviews. Cardiology**, v. 9, p. 172-184, 2012.

MAGNESS, R. R.; ZHENG, J. **Circulatory changes during gestation**. In: Gluckman, PD.; Heymann, MA., editors. *Scientific Basis of Pediatric and Perinatal Medicine*. 2. London: Edward Arnold Publishers; 1996. p. 762-772

MARCHAND, A.; ABI-GERGES, A.; SALIBA, Y.; MERLET, E.; LOMPRÉ, A. M. Calcium signaling in vascular smooth muscle cells: from physiology to pathology. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 740, p. 795-810, 2012.

MARIN, J.; REVIRIEGO, J.; FERNANDEZ-ALFONSO, M. S.; GUERRA, P. Effect of nifedipine in arterial vasculature of human placenta. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 21(5), p. 629–33, 1990.

MARTÍN, P.; REBOLLEDO, A.; ANA ROCIO ROLDÁN PALOMO, A. R. R.; MONCADA, M.; PICCININI, L.; MILESI, V. Diversity of potassium channels in human umbilical artery smooth muscle cells: A review of their roles in human umbilical artery contraction. **Reproductive Sciences**, v. 21, n. 4, p. 432-44, 2014.

MARUHASHI, T.; NOMA, K.; FUJIMURA, N.; KAJIKAWA, M.; MATSUMOTO, T.; HIDAKA, T.; NAKASHIMA, A.; KIHARA, Y.; LIAO, J. K.; HIGASHI, Y. Exogenous nitric oxide inhibits rho-associated kinase activity in patients with angina pectoris: a randomized controlled trial. **Hypertension Research**, V. 38, P. 485-490, 2015.

MARUHASHI, T.; NOMA, K.; IWAMOTO, Y.; IWAMOTO, A.; ODA, N.; KAJIKAWA, M.; MATSUMOTO, T.; HIDAKA, T.; KIHARA, Y.; CHAYAMA, K.; NAKASHIMA, A.; GOTO, C.; LIAO, J. K.; HIGASHI, Y. Critical role of exogenous nitric oxide in rock activity in vascular smooth muscle cells. **PLO One**, 2014. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0109017&representation=PDF>> Acesso em junho de 2015.

MATCHKOV, V. V.; KUDRYAVTSEVA, O.; AALKJAER, C. Intracellular Ca²⁺ signalling and phenotype of vascular smooth muscle cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110(1), p. 42-48, 2012.

MATSUBARA, K.; HIGAKI, T.; MATSUBARA, Y.; NAWA, A. nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16(3), p. 4600-4614, 2015,

MAUL, H.; LONGO, M.; SAADE, G. R.; GARFIELD, R. E. Nitric oxide and its role during pregnancy: From ovulation to delivery. **Current Pharmaceutical Design** 2003, v. 9, n. 5, p. 359–380, 2003.

MAY, D. C.; POPMA, J.; BLACK, W. H.; SCHAEFER, S.; LEE, H. R.; LEVINE, B. D.; HILLIS, L. D. *In vivo* induction and reversal of nitroglycerin tolerance in human coronary arteries. **The New England Journal of Medicine**, v. 317, p. 805-809, 1987.

MAYER, B.; BERETTA, M. The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: news, views and troubles. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, p. 170–184, 2008

McGUIRE, J. J.; ANDERSON, D. J.; McDONALD, B. J.; NARAYANASAMI, R.; BENNETT, B. M. Inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase and glyceryl trinitrate biotransformation by diphenyleiiodonium sulfate. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, p. 881-893, 1998.

MEDEIROS, Y. S.; CALIXTO, J. B. Influence of calcium entry blockers and calmodulin inhibitors on 5-HT-, potassium- and calcium-induced contractions in human umbilical artery in vitro. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 43, p. 411-416, 1991.

MEERA, P.; WALLNER, M.; TORO, L. **Molecular biology of high conductance Ca²⁺-activated potassium channels**. In: Archer S, Rush N (eds). Potassium Channels in Cardiovascular Biology. New York, Kluwer Academic/Plenium Publishers. 2001. p. 49-70.

MILDENBERGER, E.; BIESEL, B.; SIEGEL, G.; VERSMOLD, H. T. Nitric oxide and endothelin in oxygen-dependent regulation of vascular tone of human umbilical vein. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, p. H1730-H1737, 2003.

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

MITA, M.; YANAGIHARA, H.; HISHINUMA, S.; SAITO, M.; WALSH, M. Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase. **The Biochemical Journal**, v. 364, p. 431-440, 2002.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The Discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S193-S201, 2006.

MOOSMANG, S.; SCHULLA, V.; WELLING, A.; FEIL, R.; FEIL, S.; WEGENER, J. W.; HOFMANN, F.; KLUGBAUER, N. Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. **The EMBO Journal**, v. 22(22), p. 6027-6034, 2003.

MORAN, A. E.; FOROUZANFAR, M. H.; ROTH, G. A.; MENSAH, G. A.; EZZATI, M.; MURRAY, C. J.; NAGHAVI, M. Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. **Circulation**, v. 129(14), p. 1483-1492, 2014.

MORGADO, M.; CAIRRÃO, E.; SANTOS-SILVA, A. J.; VERDE, I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 69(2), p. 247-266, 2012.

MÜNZEL, T.; DAIBER, A.; MÜLSCH, A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. **Circulation Research**, v. 97, p. 618-628, 2005.

MÜNZEL, T.; GORI, T. Nitrate therapy and nitrate tolerance in patients with coronary artery disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13 (2), p. 251-259, 2013.

MÜNZEL, T.; SAYEGH, H.; FREEMAN, B. A.; TARPEY, M. M.; HARRISON, D. G. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 187-194, 1995.

MÜNZEL, T.; STEVEN, S.; DAIBER, A. Organic nitrates: Update on mechanisms underlying vasodilation, tolerance and endothelial dysfunction. **Vascular Pharmacology**, v. 63 (3), p. 105-113, 2014.

MURPHY, P. J. The fetal circulation. **Continuing Education in Anaesthesia, Intensive Care & Pain**, v. 5(4), p. 2017-112, 2005.

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.

MYATT, L.; BROCKMAN, D. E.; LANGDON, G.; POLLOCK, J. S. Constitutive calcium-dependent isoform of nitric oxide synthase in the human placental villous vascular tree. **Placenta**, 14, 373-83, 1993.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological Roles and Properties of Potassium Channels in Arterial Smooth Muscle. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v. 268 (4), p. C799-C822, 1995.

OSOL, G.; MANDALA, M. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. **Physiology**, v. 24, p. 58-71, 2009.

OSOL, G.; MOORE, L. G. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. **Microcirculation**, v. 21(1), p. 38-47, 2014.

OUZOUNIAN, J. G.; ELKAYAM, U. Physiologic changes during normal pregnancy and delivery. **Cardiology Clinics**, v. 30, 317-329, 2012.

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

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

PARENT, M.; DUPUIS, F.; MAINCENT, P.; VIGNERON, C.; LEROY, P.; BOUDIER, A. [Which future in cardiovascular therapy for nitric oxide and its derivatives?]. [Article in French]. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 71(2), p. 84-94, 2013.

PARK, W. S.; SON, Y. K.; KIM, N. R.; YOUM, J. B.; WARDA, M.; KO, J. H.; KO, E. A.; KANG, S. H.; KIM, E. Y.; EARM, Y. E.; HAN, J. Direct modulation of Ca^{2+} -activated K^+ current by H-89 in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 105-113, 2007.

PARKER, J. D.; PARKER, J. O. Nitrate therapy for stable angina pectoris. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 8, p. 520-531, 1998.

PARKER, J. D.; FARRELL, B.; FENTON, T.; COHANIM, M.; PARKER, J. O. Counter-regulatory responses to continuous and intermittent therapy with nitroglycerin. **Circulation**, v. 84, p. 2336-2345, 1991.

PARSONS, S. J. W.; HILL, A.; WALDRON, G. J.; PLANE, F.; GARLAND, G. J. The relative importance of nitric oxide and nitric oxide-independent mechanisms in acetylcholine-evoked dilatation of the rat mesenteric bed. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, p. 1275-1280, 1994.

PAULIS, L.; STECKELINGS, U. M.; UNGER, T. Key advances in antihypertensive treatment. **Nature Reviews. Cardiology**, v. 9(5), p. 276-285, 2012.

PERUSQUÍA, M.; NAVARRETE, E.; GONZÁLEZ, L.; VILLALÓN, C. M. The modulatory role of androgens and progestins in the induction of vasorelaxation in human umbilical artery. *Life Sciences*, v. 81, p. 993-1002, 2007.

PRIOR, T.; MULLINS, E.; BENNETT, P.; KUMAR, S. Umbilical venous flow rate in term fetuses: can variations in flow predict intrapartum compromise? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 210 (61), p. e1-8, 2014.

PROTIĆ, D. D.; NOVAKOVIĆ, R. B.; SPREMOVIĆ-RADJENOVIĆ, S.; RADUNOVIĆ, N. V.; HEINLE, H.; KANJUJH, V. I.; GOJKOVIĆ-BUKARICA, L. C. The role of potassium channels in the mechanism of vasodilatation of human umbilical vein induced by resveratrol. **Pharmacology and Toxicology**, v. 13 (Suppl 1), p. A29, 2012.

PRUDNIKOVA, T. Y.; RAWAT, S. J.; CHERNOFF, J. Molecular pathways: Targeting the kinase effectors of Rho-family GTPases. **Clinical Cancer Research**, v. 21, p. 1772, 2015.

PUETZ, S.; LUBOMIROV, L. T.; PFITZER, G. Regulation of Smooth Muscle Contraction by Small GTPases. **Physiology**, v. 24, p. 342-356, 2009.

QUINN, J. F.; WHITTAKER, M. R.; DAVIS, T. P. Delivering nitric oxide with nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 205, p. 190–205, 2015.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, n. 3, p. 87-88, 1991.

RADENKOVIĆ, M.; MOMČILOV, P.; RADUNOVIĆ, N.; GRBOVIĆ, L. Contribution of potassium channels in human umbilical artery contractions. **BMC Pharmacology**, v. 8(Suppl 1), p. A1, 2008.

RAHMAN, A.; DAVIS, B.; LÖVDAHL, C.; HANUMAIAH, V. T.; FEIL, R.; BRAKEBUSCH, C.; ARNER, A. The small GTPase Rac1 is required for smooth muscle contraction. **The Journal of Physiology**, p. 592 (5), p. 915-926, 2014.

RAMSAY, B.; DE BELDER, A.; CAMPBELL, S.; MONCADA, S.; MARTIN, J. F. A nitric oxide donor improves uterine artery diastolic blood flow in normal early pregnancy and in women at high risk for preeclampsia. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 24, p. 76-78, 1994.

RANKIN, J. H. G.; MCLAUGHLIN, M. K. The regulation of the placental blood flows. **Journal of Developmental Physiology**, v.1, p. 3-30, 1979.

RAPOPORT, R. M.; WALDMAN, S. A.; GINSBURG, R.; MOLINA, C.; MURAD, F. Effects of glyceryl trinitrate on endothelium-dependent and -independent relaxation and cyclic GMP levels in rat aorta and human coronary artery. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 10, p. 82-89, 1987.

RASSAF, T.; FERDINANDY, P.; SCHULZ, R. Nitrite in organ protection. **British Journal of Pharmacology**, v. 171 (1), p. 1-11, 2014.

RATZ, P. H.; BERG, K. M.; URBAN, N. H.; MINER, A. S. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. **American Journal of Physiology**, v. 288, p. C769-C783, 2005.

REILLY, F. D.; RUSSELL, P. T. Neurohistochemical evidence supporting an absence of adrenergic and cholinergic innervation in the human placenta and umbilical cord. **The Anatomical Record**, v. 188, Issue 3, p. 277–285, 1977.

RENOWDEN, S.; EDWARDS, D. H.; GRIFFITH, T. M. Impaired cyclic nucleotide-mediated vasorelaxation may contribute to closure of the human umbilical artery after birth. **British Journal of Pharmacology**, v. 106, p. 348-53, 1992.

RICCIO, D. A.; SCHOENFISCH, M. H. Nitric oxide release: Part I. Macromolecular scaffolds. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 3731-3741, 2012.

RIENTO, K.; RIDLEY, A. J. ROCKs multifunctional kinases in cell behavior. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 446-456, 2003.

ROMANOWICZ, L.; BAN'KOWSKI, E. Lipid compounds of human Wharton's jelly and their alterations in preeclampsia. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 91(1), p. 1-9, 2010.

ROSENFELD, C. R.; MORRIS, F. H.; MAKOWSKI, E. L.; MESCHIA, G.; BATTAGLIA, F. C. Circulatory changes in the reproductive tissues of ewes during pregnancy. **Gynecological Investigation**, v. 5, p. 252-268, 1974.

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

SAKURADA, S.; TAKUWA, N.; SGIMOTO, N.; WANG, Y.; SETO, M.; SASAKI, Y.; TAKUMA, Y. Ca²⁺ -dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circulation Research*, v. 93, p. 548-556, 2003.

SALOM J. B.; CAMPOS, V.; PERALES, A.; TORREGROSA, G.; MIRANDA, F. J.; ALABADI, J. A.; ALBORCH, E. Effects of calcium entry blockers on KCL- and 5-hydroxytryptamine-induced contractions of human umbilical arteries. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 304, p. 219-31, 1990.

SANDOW, S. L.; SENADHEERA, S.; GRAYSON, T. H.; WELSH, D. G.; MURPHY, T. V. Calcium and endothelium-mediated vasodilator signaling. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 740, p. 811-831, 2012.

SANTOS-SILVA, A. J.; CAIRRÃO, E.; MORGADO, M.; ÁLVAREZ, E.; VERDE, I. PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 582, p. 102-109, 2008.

SANTOS-SILVA, A. J.; CAIRRÃO, E.; VERDE, I. Study of the mechanisms regulating human umbilical artery contractility. **Health**, v. 2, nº 4, p. 321-331, 2010.

SANTOS-SILVA, A. J.; CAIRRÃO, E.; MARQUES, B.; VERDE, I. Regulation of human umbilical artery contractility by different serotonin and histamine receptors. **Reproductive Sciences**, 2009. Disponível em:

<<http://rsx.sagepub.com/content/early/2009/10/02/1933719109343787.full.pdf+html>>
Acesso em junho de 2015.

SAUSBIER, M.; SCHUBERT, R.; VOIGT, V.; HIRNEISS, C.; PFEIFER, A.; KORTH, M.; KLEPPISCH, T.; RUTH, P.; HOFMANN, F. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. **Circulation Research**, v. 87, p. 825-830, 2000.

SAWADA, N.; LIAO, J. K. Rho/rho-associated coiled-coil forming kinase pathway as therapeutic targets for statins in atherosclerosis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20 (8), p. 1251-1267, 2014.

SCATENA, R.; BOTTONI, P.; MARTORANA, G. E.; GIARDINA, B. Nitric oxide donor drugs: an update on pathophysiology and therapeutic potential. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 14(7), p. 835-846, 2005.

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.

SCHULZ, E.; JANSEN, T.; WENZEL, P.; DAIBER, A.; MÜNDEL, T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. **Antioxidants & Redox Signalling**, v. 10, n. 6, p. 1115-1126, 2008.

SELIGMAN, S. P.; BUYON, J. P.; CLANCY, R. M.; YOUNG, B. K.; ABRAMSON, S. B. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 171, p. 944-948, 1994.

SEXTON, A. J.; LOESCH, A.; TURMAINE, M.; MIAH, S.; BURNSTOCK, G. Nitric oxide and human umbilical vessels: pharmacological and immunohistochemical studies. **Placenta**, v. 16, p. 277-228, 1995.

SHIMOKAWA, H.; SATOH, K. Translational research on Rho-Kinase in cardiovascular medicine. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 2015. Disponível em:
<<http://atvb.ahajournals.org/content/early/2015/06/11/ATVBAHA.115.305353.shor>
> Acesso em junho 2015.

SOBOLEWSKI, K.; MALKOWSKI, A.; BANKOWSKI E.; JAWORSKI, S. Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors. **Placenta**, v. 26, p. 747-52, 2005.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 1325-1358, 2003.

SOMLYO, A. V.; WOO, C. Y.; SOMLYO, A. P. Responses of nerve-free vessels to vasoactive amines and polypeptides. **The American Journal of Physiology**, v. 208, p. 748-753, 1965.

STANDEN, N. B.; QUAYLE, J. M. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 164, p. 549-557, 1998.

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.

SZABO, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 6, p. 662-680, 2007.

TAKUWA, Y.; YOSHIOKA, K.; TAKUWA, N.; WANG, Y.; AZAM, M. A.; SUGIMOTO, N. Calcium-dependent regulation of rho and myosin phosphatase in vascular smooth muscle. **Biomedical Reviews**, v. 16, p. 13-21, 2005.

TAMARGO, J.; DUARTE, J.; RUILOPE, L. M. New antihypertensive drugs under development. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 305-342, 2015.

TAN, P. H.; CHAN, C.; XUE, S. A.; DONG, R.; ANANTHESAYANAN, B.; MANUNTA, M.; KEROUEDAN, C.; CHESHIRE, N. J. W.; WOLFE, J. H.; HASKARD, D. O.; TAYLOR, K. M.; GEORGE, A. J. T. Phenotypic and functional differences between human saphenous vein (HSVEC) and umbilical vein (HUVEC) endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 173, p. 171-183, 2004.

TANAKA, A.; NODE, K. A novel cardioprotective mechanism of exogenous nitric oxide: inhibition of Rho-associated kinase activity. **Hypertension Research**, p. 1-2, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/hr/journal/vaop/ncurrent/full/hr201561a.html>> Acesso em junho 2015.

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.

TERAMOTO, N. Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 572, p. 617-624, 2006.

THADANI, U. Oral nitrates: more than symptomatic therapy in coronary artery disease? **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 11, n. 1, p. 213-218, 1997.

THOMAS, D. D.; RIDNOUR, L. A.; ISENBERG, J. S.; FLORES-SANTANA, W.; C SWITZER, H.; DONZELLI, S.; HUSSAIN, P.; VECOLI, C.; PAOLOCCI, N.; AMBS, S.; COLTON, C. A.; HARRIS, C. C.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, p.18-31, 2008.

TREUER, A. V. GONZALEZ, D. R. Nitric Oxide Synthases, S-Nitrosylation and Cardiovascular Health: from Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 11(3), 2015.

TUFAN, H.; AYAN-POLAT, B.; TECDER-UNAL, M.; POLAT, G.; KAYHAN, Z.; ÖGÜS, E. Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levromakalim. **Life Sciences**, v. 72, p. 1321-1329, 2003.

UMBRELLO, M.; DYSON, A.; FEELISCH, M.; SINGER, M. The key role of nitric oxide in hypoxia: hypoxic vasodilation and energy supply–demand matching. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 14, p. 1690-1710, 2013.

UREÑA, J.; FERNÁNDEZ-TENORIO, M.; PORRAS-GONZÁLEZ, C.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, P.; CASTELLANO, A.; LÓPEZ-BARNEO, J. A new metabotropic role for L-type Ca(2+) channels in vascular smooth muscle contraction. **Current Vascular Pharmacology**, v. 11(4), p. 490-496, 2013.

UREÑA, J.; LÓPEZ-BARNEO, J. Metabotropic regulation of RhoA/Rho-associated kinase by L-type Ca²⁺ channels. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 22, n. 6, 2012.

Van ROOIJ, E; OLSON, E. N. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, p. 860-872, 2012.

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

VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. **Circulation Journal**, v. 73, n. 4, p. 595-601, 2009.

VASQUES, F. A. P.; MORON, A. F.; MURTA, C. G. V.; GONÇALVES, T. R.; CARVALHO, F. H. C. Correlação da área do cordão umbilical com parâmetros antropométricos em gestações normais. **Radiologia Brasileira**, v. 36(5), p. 299-303, 2003.

VERAS, R. C.; RODRIGUES, K. G.; ALUSTAU, M. C.; ARAÚJO, I. G. A.; BARROS, A. L. B.; ALVES, R. J.; NAKAO, L. S.; BRAGA, V. A.; SILVA, D. F.; MEDEIROS, I. A. Participation of nitric oxide pathway in the relaxation response induced by e-cinnamaldehyde oxime in superior mesenteric artery isolated from rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 62, p. 58-66, 2013.

VIZZARDI, E.; BONADEI, I.; ROVETTA, R.; D'ALOIA, A.; QUINZANI, F.; CURNIS, A.; DEI CAS, L. When Should we Use Nitrates in Congestive Heart Failure? **Cardiovascular Therapeutics**, v. 31(1), p. 27-31, 2013.

WALDMAN, S. A.; MURAD, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacological Reviews**, v. 39, n. 3, p. 163-196, 1987.

WALFORD, G.; LOSCALZO, J. Nitric oxide in vascular biology. **Journal of Thrombosis and Haemostase**, v. 1(10), p. 2112-2118, 2003.

WANG, H. S.; HUNG, S. C.; PENG, S. T.; HUANG, C. C.; WEI, H. M.; GUO, Y. J.; FU, Y. S.; LAI, M. C.; CHEN, C. C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem Cells**, v. 22(1), p. 1330-1337, 2004.

WANG, K.; ZHENG, J. Signaling regulation of fetoplacental angiogenesis. **The Journal of Endocrinology**, v. 212(3), p. 243-255, 2012.

WANG, P. G.; XIAN, M.; TANG, X.; WU, X.; WEN, Z.; CAI, T.; JANCZUK, A. J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 102(4), p. 1091-134, 2002.

WAREING, M.; GREENWOOD, S. L. Review: Potassium channels in the human fetoplacental vasculature. **Placenta**, V. 32, Supplement 2, p. S203-S206, 2011.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27 (4): p. 201-206, 2003.

WELCH, G.; LOSCALZO, J. Nitric oxide and the cardiovascular system. **Journal of Cardiac Surgery**, v. 9: 361-371, 1994.

WERNER, M. E.; LEDOUX, J. K⁺ Channels in Biological Processes: Vascular K⁺ Channels in the Regulation of Blood Pressure. **Journal of Receptor, Ligand & Channel Research**, v. 7, p. 51-60, 2014.

WHITE, R. P. Comparison of vasorelaxants in human basilar arteries and umbilical arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 155, p. 109-115, 1988.

WINK, D. A.; HANBAUER, I.; GRISHAM, M. B.; LAVAL, F.; NIMS, R.W.; LAVAL, J.; COOK, J. C.; PACELLI, R.; LIEBMANN, J.; KRISHNA, M. C.; FORD, M. C.; JB, M. The chemical biology of NO: insights into regulation, protective and toxic mechanisms of nitric oxide. **Current Topics in Cellular Regulation**, v. 34, p. 159-187, 1996.

WU, G.; MORRIS, S. M. J. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **The Biochemical Journal**, v. 336, p. 1-17, 1998.

WU, C. C.; CHEN, S. J.; YEN, M. H. Cyclic GMP regulates cromakalim-induced relaxation in the rat aortic smooth muscle: role of cyclic GMP in KATP-channels. **Life Sciences**, v. 64, p. 2471-2478, 1999.

WYLAM, M. E.; SAMSEL, R. W.; SCHUMACKER, P. T.; UMANS, J. G. Extracellular calcium and intrinsic tone in the human umbilical artery. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 266(3), p. 1475-1481, 1993.

YALLAMPALLI, C.; IZUMI, H.; BYAM-SMITH, M.; GARFIELD, R. E. An L-arginine-nitric oxide cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 170, 175-85, 1994.

ZHANG, F.; MORICE, A. H. Effect of levromakalim on hypoxia-, KCl- and prostaglandin F2a-induced contractions in isolated rat pulmonary artery. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 271(1), p. 326-333, 1994.

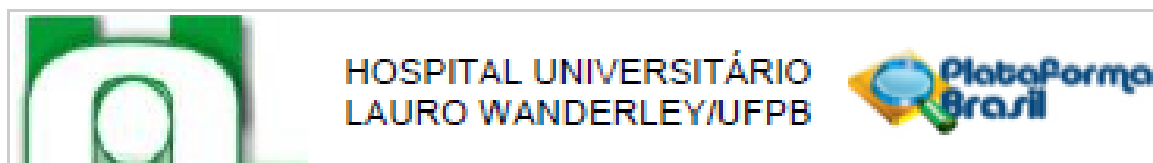
ZHAO, D.; LIU, J.; XIE, W.; QI, Y. Cardiovascular risk assessment: a global perspective. **Nature Review. Cardiology**, *Advance Online Publication 10 March*, 2015.

ZHU, R.; XIAO, D. L.; ZHANG, L. Potassium channels and uterine vascular adaptation to pregnancy and chronic hypoxia. **Current Vascular Pharmacology**, v. 11(5), p. 737-747, 2013.

<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/umbilical+cord>

Anexos

ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO VASODILATADOR DOS NITRATOS ORGÂNICOS GTN, NTHF, NCOE E BIS NTHF EM ARTÉRIA E VEIA ISOLADAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO

Pesquisador: Maria do Carmo de Alustau Fernandes

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 48359915.5.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.200.327

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um sub-projeto oriundo do projeto guarda-chuva intitulado "Avaliação do efeito induzido por milonina em veia de cordão umbilical humano", sob a orientação do Prof. Dr. Isaac Almeida de Medeiros, do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos.

As informações sobre as características funcionais dos vasos humanos são limitadas, quando comparadas às conclusões relativas à fisiologia e à fisiopatologia arterial de estudos com animais (WU et al., 1999). Alguns estudos mostram a caracterização de receptores e vias de sinalização nos vasos de cordão umbilical humano (HUCV) (BOERSMA et al., 1999; BOGONI et al., 1996; CHAUDHURI et al., 1991; ERRASTI et al., 1999).

Sabendo-se que o cordão umbilical humano tomou-se uma das fontes mais importantes de células endoteliais vasculares, a elevada disponibilidade destas células faz um importante papel, principalmente no desenvolvimento da biologia vascular. (YAMADA et al., 1992; DAVIES, 1997). A perfusão da veia de cordão umbilical, com colagenase, resulta em uma preparação pura da camada de células endoteliais que revestem os vasos (GIMBRONE, 1976). As HUVECs (células endoteliais de cordão umbilical) configura-se como um relevante modelo para o estudo da regulação da função

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.050-900
UF: PB Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7064 Fax: (83)3216-7522 E-mail: cephuw@hotmail.com

ANEXO 2



Prefeitura Municipal de João Pessoa Secretaria de Saúde

João Pessoa, 27 de setembro de 2010.

ENCAMINHAMENTO

Cumprimentando-os cordialmente, encaminhamos o (a) pesquisador (a), “FABÍOLA FIALHO FURTADO, MARIA DO CARMO DE ALUSTAU, ABRHÃO ALVES DE OLIVEIRA FILHO, NATÁLIA TABOSA MACHADO E THYAGO MOREIRA DE QUEIROZ”, para realização de coleta de material para a pesquisa intitulada “AVALIAÇÃO DO EFEITO INDUZIDO POR MILONINA EM VEIA DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO”, a ser realizada no Hospital Maternidade Cândida Vargas, conforme Processo Administrativo nº 25863/2010.

Sem mais, e visando o bom andamento das pesquisas na Rede SUS de João Pessoa, subscrevo-me,

Atenciosamente,


Evellin Bezerra
Gerente de Educação na Saúde
Município de João Pessoa

Gerente de Educação na Saúde

Apêndices

APÊNDICE 1

Título do Projeto: CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO VASODILATADOR DOS NITRATOS ORGÂNICOS GTN, NTHF, NCOE E BIS-NTHF EM ARTÉRIA E VEIA ISOLADAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO

<p>Pesquisador (s) Responsável: Aluna de Pós-Graduação Maria do Carmo de Alustau Fernandes Instituição: UFPB Telefones para Contatos: (83) 3216-7366</p>

Você está sendo convidado (a) a participar do estudo científico acima citado que será realizado no HULW/ UFPB. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre o estudo. Sua colaboração voluntária será de muita importância, mas se não quiser ou se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

O objetivo do estudo é comprovar se nitratos orgânicos, substâncias desenvolvidas pela UFPB possuem atividade em vasos humanos. Os nitratos vêm sendo estudados em animais e apresentando promissores efeitos. A finalidade desta pesquisa é contribuir com o desenvolvimento de um produto que poderá ter uso terapêutico.

Solicitamos a sua colaboração para autorizar o uso do cordão umbilical neste estudo, sendo coletado após o parto apenas o segmento destinado ao descarte pelo hospital. O cordão será encaminhado para o laboratório farmacologia cardiovascular da UFPB. Onde serão isolados apenas os vasos do cordão umbilical para o estudo, após os experimentos os vasos serão descartados como material biológico. Solicitamos ainda a autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos que essa pesquisa não oferece riscos, previsíveis, para a sua saúde, no entanto pode gerar desconforto pela incerteza quanto à segurança nos procedimentos.

Sua contribuição é de extrema importância uma vez que o presente trabalho objetiva obter resultados científicos que comprovem a ação de nitratos em humanos.

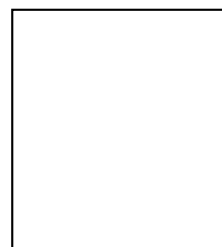
Eu,....., concordo de livre e espontânea vontade, em participar como voluntário(a) do estudo, cedendo o resto dos segmentos do cordão umbilical que sobraem do parto para a realização de experimentos científicos no LTF/UFPB e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma via desse documento.

Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) Este estudo científico não tem como objetivo me submeter a nenhum tratamento, não será realizado em mim nenhum procedimento diferente do que seria realizado durante o procedimento, bem como não me acarretará nenhum tipo de prejuízo à minha saúde, nem ao recém-nascido;
- II) Este estudo foi aprovado por um comitê de ética que julgou ético e procedente o estudo;
- III) Só serão utilizados para o estudo os segmentos de cordão umbilical que sobraem da cirurgia e que seriam descartados como material biológico, após o procedimento;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem a necessidade de qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico;
- VI) Concordo que os resultados obtidos durante este estudo sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados e que os aspectos éticos necessários ao estudo em humanos seja mantido conforme declara a resolução 466/12 do CNS, MS.
- VII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final deste estudo.
 - () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
 - () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

João Pessoa, ____ de _____ de _____ .



Espaço para impressão
dactiloscópica

.....

Assinatura da Participante e/ou Responsável Legal

Responsável pelo Projeto: Me. Maria do Carmo de Alustau Fernandes/UFPB

Telefone para contato: **(83) 3216-7366**

Responsável pela aprovação do projeto: Comitê de Ética em Pesquisa HULW/UFPB

.Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley, segundo andar do HU, Campus I,
S/n - Cidade universitária, João Pessoa - PB, 58.059-900-Fone: (83) 3216-7955.